

Untersuchung der Effekte von Prednisolon
auf die HIV-Progression
und Ermittlung der Medikamentenresistenz
in antiretroviral-unbehandelten HIV-Patienten
in Tansania

Durchführung einer randomisierten, Placebo-kontrollierten Studie
am Bugando Medical Centre in Mwanza, Tansania
und Untersuchung immunologischer und virologischer Parameter
bei HIV-Patienten in der Latenzperiode



Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

Vorgelegt von
Christa Kasang

Aus Starnberg

Würzburg 2013

Dissertation eingereicht am:.....

Bei der Fakultät für Biologie

Mitglieder der Promotionskommission

Vorsitzender: Prof. Dr. Wolfgang Rössler

Erstgutachter: Priv. Doz. Dr. Carsten Scheller

Zweitgutachterin: Prof. Dr. Ute Hentschel Humeida

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Wir haben hier keine bleibende Stadt,
sondern die zukünftige suchen wir.
Hebr. 13,14

Jahreslosung 2013 der EKD

Eidesstattliche Erklärung:

Hiermit erkläre ich ehrenwörtlich, dass ich die Dissertation „Untersuchung der Effekte von Prednisolon auf die HIV-Progression und Ermittlung der Medikamentenresistenz in antiretroviral-unbehandelten HIV-Patienten in Tansania“ selbständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Ich erkläre außerdem, dass diese Dissertation weder in gleicher, noch in anderer Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Ich habe früher außer den mit dem Zulassungsgesuch urkundlich vorgelegten Graden, keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Würzburg, den

Meiner Familie
und unseren afrikanischen Freunden

Zusammenfassung

Hintergrund: Bei einer HIV-Infektion ist die Kombinationstherapie mit antiretroviralen Substanzen (ARVs), auch antiretrovirale Therapie (ART) genannt, zur Zeit die beste und nahezu einzige Behandlungsoption. Trotz großer Fortschritte in der globalen Verfügbarkeit dieser Therapie haben immer noch Millionen von Patienten keinen Zugang zu diesen Medikamenten. Daneben besteht eine berechtigte Sorge vor möglichen Resistenzentwicklungen, da die ART, die in Ländern mit begrenzten Ressourcen als first-line Therapie gegeben wird, aus Substanzen mit einer geringen genetischen Barriere und hohen Gefahr der Resistenzentwicklung zusammengesetzt ist (Barth, Wensing et al. 2008). Insofern besteht hoher Bedarf für ein Konzept, das einerseits preiswert und verträglich ist und andererseits in der Lage ist, die Krankheitsprogression in der asymptomatischen Phase zu verzögern. Die Progression der HIV Infektion ist vermutlich bedingt von einer unspezifischen generalisierten Immunaktivierung des Patienten (Sousa, Carneiro et al. 2002; Hazenberg, Otto et al. 2003). Somit könnte ein immunsuppressives Medikament wie das Kortisonpräparat Prednisolon die Progression der Erkrankung verlangsamen. Im Rahmen nicht-kontrollierter Studien konnte die Stabilisierung der CD4+ T-Lymphozyten in HIV-Patienten durch den Einsatz von Kortison beobachtet werden (Andrieu, Lu et al. 1995; Lu, Salerno-Goncalves et al. 1995). Dieser Effekt konnte auch mit niedrig dosiertem Prednisolon (5 mg/Tag) nachgewiesen werden (Ulmer, Muller et al. 2005). Jedoch zeigen neuere Ergebnisse, dass der CD4+ T-Lymphozytenwert bei Studien zu Immunmodulatoren kein verlässlicher Surrogatmarker für die Progression ist (Abrams, Levy et al. 2009). In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob sich zum Einen der stabilisierende Effekt von niedrig dosiertem Prednisolon (5 mg pro Tag) auf CD4+ T-Lymphozyten in einer kontrollierten Studie bestätigt, ob zum Zweiten die CD4+ T-Lymphozytenstabilisierung auf eine Senkung der Immunaktivierung zurückgeführt werden kann und ob zum Dritten die CD4+ T-Lymphozytenstabilisierung die klinische Krankheitsprogression verlangsamt.

Im Rahmen der ProCort-Studie sollte außerdem eine Bestimmung der Prävalenz medikamentenresistenter HIV-Infektionen bei ART unbehandelten Patienten erfolgen. Hierbei wurden die WHO Kriterien überprüft, die als Einschlusskriterien für Patienten in Resistenz-Überwachungsstudien ein Höchstalter von 25 Jahren festgelegt hat. In unserer Untersuchung wurden demgegenüber Proben von Patienten mit höherem Alter und bereits therapierten Partnern analysiert.

Methoden: Im Rahmen einer doppelblinden randomisierten klinischen Studie (ProCort1) im Bugando Medical Center (BMC) in Mwanza, Tansania, wurden 326 HIV-Patienten eingeschlossen, die zuvor noch nie mit ART behandelt wurden und einen CD4+ T-Lymphozytenwert von mindestens 300/ μ l aufwiesen. In 14 Visiten wurden, während einer zweijährigen Behandlungsdauer entweder mit 5mg Prednisolon täglich oder mit Placebo, die CD4+ T-Lymphozytenwerte und das Auftreten von Progression der HIV-Infektion bestimmt. Primärer Studienendpunkt war die Krankheitsprogression, definiert als ein Unterschreiten von 200 CD4-Zellen/ μ l oder dem Auftreten AIDS-definierender Erkrankungen. Um die immunologische Wirkungsweise von Prednisolon in HIV-infizierten Patienten zu untersuchen wurden sowohl in den tansanischen Studienpatienten als auch in einer mit 5 mg Prednisolon behandelten deutschen Kohorte die Lymphozytenaktivierungsmarker CD38/HLADR auf CD3/CD8-Zellen, der Monozytenaktivierungsmarker sCD14 und der Entzündungsmarker suPAR bestimmt. Um die Prävalenz der HIV Medikamentenresistenz (HIVDR) in der ProCort Studienpopulation zu ermitteln wurden 88 Proben der ART unbehandelten Patienten sequenziert.

Ergebnisse: Die Ergebnisse der ProCort Studie zeigten eine statistisch signifikante Stabilisierung der CD4+ T-Lymphozytenwerte im Vergleich zum Ausgangswert durch Einsatz einer niedrig dosierten Prednisolonbehandlung (5 mg täglich). In der Intent to treat Analyse wurde ein Zugewinn von +20,1 Zellen/ μ l pro Jahr für den Prednisolonarm ($p < 0.0001$) im Vergleich zu -54,2 Zellen/ μ l pro Jahr für den Placeboarm ($p < 0.0001$) bestimmt. Die CD4+ T-Lymphozytenwerte zum Zeitpunkt der Startvisite waren im Prednisolonarm statistisch signifikant niedriger (Mean 512.14 Zellen/ μ l \pm S.E.M. 13.39) als im Placeboarm (Mean 554.40 \pm S.E.M 15.75; $p = 0.042$). Dies bedeutet eine schlechtere Ausgangslage für die mit Prednisolon behandelten Patienten. Trotzdem entwickelten nur vier Patienten mit Prednisolonbehandlung im Vergleich zu 11 Patienten mit Placebobehandlung AIDS, was eine statistisch signifikante Verringerung der Progressionsrate bedeutet ($p=0.0196$). In 16 Patienten versus 18 Patienten fielen die CD4+ T-Lymphozytenwerte unter die Werte von 200 Zellen/ μ l. Die Behandlung mit Prednisolon war nicht mit einer höheren Rate von unerwünschten Ereignissen oder höherer Viruslast assoziiert.

Anhand der Ergebnisse zur Immunaktivierung konnte eine statistisch signifikante Verringerung der Immunaktivierung durch 5 mg Prednisolon sowohl in den tansanischen Studienpatienten als auch in der deutschen Kohorte nachgewiesen werden. Die Veränderung der Lymphozytenaktivierung in der tansanischen Studienpopulation, untersucht anhand der CD38-Expression auf CD8+ T-Lymphozyten, zeigte eine signifikante Reduktion der

Aktivierung in Prednisolon-behandelten Patienten im Vergleich zu Placebo-behandelten Patienten (-4.101% versus 2.637%, $p = 0.0018$). Die Analyse des Entzündungsmarkers suPAR Antigen erbrachte ebenso eine signifikante Reduktion zu Baseline in Prednisolon-behandelten Patienten im Vergleich zu Placebo-behandelten Patienten (-0.147 ng/ml, versus 0,325 ng/ml, $p < 0.0001$). Die Ergebnisse für die Veränderung des Markers für Monozytenaktivierung (sCD14) durch Prednisolontherapie verfehlten knapp die statistische Signifikanz (Prednisolon: 4.030 ng/ml, vs. Placebo: 3.513 ng/ml, $p = 0.062$). In der deutschen Kohortenanalyse war die Lymphozytenaktivierung (CD3/CD8/CD38/HLADR) signifikant niedriger in Prednisolon-behandelten Patienten im Vergleich zu unbehandelten Patienten (55,40% im Vergleich zu 73,34%, $p = 0,0011$). Ebenso wurden in der behandelten Gruppe niedrigere Werte bei Markern der Monozytenaktivierung, wie z.B. sCD14 (3,6 ng/ml versus 6,11 ng/ml, $p = 0,0048$) und LBP (2,18 ng/ml versus 3,45 ng/ml, $p = 0,0386$) nachgewiesen, ebenso wie beim Entzündungsmarker suPAR Antigen (2,17ng/ml versus 2,56 ng/ml, $p = 0,0351$). Ein Trend zu niedrigeren Konzentrationen wurde beim Marker sCD40L (2,70 pg/ml versus 3,60 pg/ml, $p = 0,0782$) beobachtet. Die Viruslast war in beiden Gruppen ähnlich ($0,8 \times 10^5$ Kopien/ml versus $1,1 \times 10^5$ Kopien/ml, $p = 0,3806$) (Kasang, Ulmer et al. 2012).

Im Rahmen der Resistenzuntersuchungen konnten folgende HIV-Subtypen nachgewiesen werden A1 (34% der Proben), A1D (7%), C: (26%), CRF10_CD (4%), D (28%) und B (1%). Zwanzig Patienten der untersuchten 88 waren unter 25 Jahren und entsprachen somit den von der WHO festgelegten Kriterien zur Überwachung der übertragenen HIVDR, 68 Patienten waren zwischen 25 und 63 Jahre alt. Der Prozentsatz an HIVDR in der gesamten untersuchten Patientengruppe war 14.8% und unabhängig von Resistenzen die durch den Nevirapin Einsatz im Rahmen von „Prevention of Mother-to-Child Transmission (PMTCT) Programme entstehen können. Die Patienten über 25 Jahre hatten ein signifikant höheres HIVDR Vorkommen als jüngere Patienten (19.1%, versus 0%, $P = 0.0344$).

Diskussion: Mit der ProCort1-Studie konnte nachweisen werden, dass die Behandlung mit 5 mg Prednisolon pro Tag über zwei Jahre im afrikanischen Umfeld sicher ist und zu einer Erhöhung der CD4+ T-Lymphozytenwerte führt. Zusätzlich entwickelten Patienten im Prednisolonarm statistisch signifikant weniger AIDS. Dies ist durch die im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesene Reduktion der allgemeinen Immunaktivierung mittels niedrig dosiertem Prednisolon zu erklären. Diese Ergebnisse beweisen, dass die Behandlung mit niedrig dosiertem Prednisolon geeignet ist, die Progression der HIV Infektion zu verlangsamen und somit eine Behandlungsoption für asymptomatische Patienten in Ländern mit begrenzten Ressourcen darstellt. Interessant wäre eine weitere Studie, in der geklärt wird,

ob die Behandlung mit niedrig dosiertem Prednisolon auch in Kombination mit ART einen Vorteil für die Patienten bringen könnte.

Bis jetzt ist die von der WHO berichtete Prävalenz von übertragener HIVDR in der Bevölkerung im südlichen Afrika unter 5 % (WHO 2012). Die Untersuchungen zur HIVDR Prävalenz in unseren Studienpatienten zeigte, dass Patienten älter als 25 Jahre eine signifikant höhere HIVDR aufweisen als jüngere Patienten ($p=0.0344$). Es konnte mittels Vergleich der HIV Sequenzen der behandelten Partner und der unbehandelten Patienten eine Übertragung einer durch Therapie erworbene Medikamenten-Resistenz direkt auf den unbehandelten Patienten nachgewiesen werden. Weitere Gründe könnten neben Übertragung auch Missbrauch von antiretroviralen Medikamenten sein, wie Spuren von ART in einigen Proben bewiesen. Der Nachweis von Resistenzen in 19% der älteren unbehandelten Patientengruppe legen den Schluss nahe, dass die Auswahl einer Patientengruppe nach Alter, wie sie die WHO Kriterien zur Überwachung von HIVDR verlangen, zu einer Unterschätzung der Prävalenz von HIVDR in der ART unbehandelten Bevölkerung führt. Eine Veränderung der WHO-Kriterien erscheint daher sinnvoll, um verlässlichere Zahlen zur Prävalenz der HIV-Medikamentenresistenz erhalten zu können.

Summary

Background: A combination-therapy approach with antiretroviral substances (ARVs), also called antiretroviral therapy (ART) is at present, the best and almost the only treatment option for HIV infected individuals. While combination ART is the best treatment to prevent the onset of AIDS in HIV infection, it is still not available for millions of patients in resource-limited areas, despite the substantial improvements achieved in the past 10 years. There is a justified concern of the acceleration of HIV-drug-resistance (HIVDR) development caused by first-line ART medication available in countries with restricted resources, as the ART available often has low genetic barriers causing resistance mutations (Barth, Wensing et al. 2008). There is a strong need for treatment that is inexpensive and effective of delaying the progress of the illness in the asymptomatic phase. HIV-associated general immune activation is a strong predictor for HIV disease progression, suggesting that chronic immune activation may drive HIV pathogenesis (Sousa, Carneiro et al. 2002; Hazenberg, Otto et al. 2003). Therefore immunomodulating agents like the corticosteroid prednisolone may decelerate HIV disease progression. This is the rationale for the use of prednisolone in HIV therapy. In non-randomised monocentric observational studies it was shown that certain corticosteroids has a stabilizing effect on the CD4+T-lymphocytes in HIV-infected patients (Andrieu, Lu et al. 1995; Lu, Salerno-Goncalves et al. 1995). This effect could also be proven with low dose prednisolone (5 mg daily) (Ulmer, Muller et al. 2005). However, recent studies demonstrate that the CD4+T-lymphocytes are not stable predicting markers for HIV progression (Abrams, Levy et al. 2009). This thesis examines, first if the CD4+T-lymphocytes stabilizing effect of 5 mg prednisolone can be proven in a double-blind controlled randomized clinical trial, second if this effect is dependent of the reducing generalized immune activation and third if the CD4+T-lymphocytes stabilizing effect reduces the clinical progression of HIV infection. A study to identify the prevalence of HIVDR was also conducted within the ProCort study. To validate the current WHO tHIVDR survey criteria, focused on patients age below 25 years, our study included also patients over 25 years with partners already on treatment as well.

Methods:The ProCort Study (Progression of HIV-Disease under Low Dose Corticosteroids) was designed as a double blinded randomized clinical trial including 326 ART-naïve patients in Bugando Medical Centre in Mwanza, Tansania, with a minimum cell count of 300 CD4+T-lymphocytes per μ l. Patients were treated with either 5mg prednisolone daily or with placebo for two years. The CD4+T-lymphocytes were measured in 14 visits and progression factors were evaluated. Progression was defined as qualifying for start of ART either due to CD4 Cell

count below 200 cells per μl or due to developing AIDS defining symptoms. Immune activation markers were determined both for the ProCort patients and for a German cohort-study group receiving 5 mg Prednisolon. The lymphocyte activation marker CD3/CD8/CD38/HLADR, monocyte activation marker sCD14 and markers for inflammation suPAR was targeted during the study. To identify the HIVDR in the ProCort study population sequencing was conducted in 88 sequentially enrolled ART-naïve patients.

Results:The results of the ProCort study showed a statistical significant stabilizing effect of CD4+T-lymphocyte count compared to baseline counts in 5 mg prednisolone treated patients. In an intent-to-treat analysis, average changes in CD4+T-lymphocyte counts versus baseline were +20,1 cells/ μl per year for prednisolone ($P = 0.0002$) and -54,2 cells/ μl per year for placebo ($P = 0.0027$). The Baseline CD4+T-lymphocyte count recovery were significantly lower in the prednisolone arm (mean 512.14 cells/ μl \pm S.E.M. 13.39) than in the placebo arm (554.40 \pm 15.75 $P = 0.042$) which implies a disadvantage for this group. However, only four patients treated with prednisolone and 11 patients treated with placebo developed stage C opportunistic diseases (Kaplan Meyer analysis, $p = 0.0196$ Gehan-Breslow-Wilcoxon test). For the CD4+T-lymphocyte counts 16 patients, compared to 18 patients in the placebo group? fall under 200 cell/ μl . Prednisolone treatment was not associated with an increase in adverse events or HIV viral load. A statistically significant reduction in immune activation markers were obtained by 5 mg prednisolone therapy in both the German and the Tanzanian study group. In the Tanzanian study group the lymphocyte activation change to baseline, determined by CD38/HLADR-expression on CD8+ T lymphocytes, showed a significantly reduction of activation in prednisolone-treated patients compared to an increase in the untreated patients (-4.101% compared to 2.637%, $p = 0.0018$). The analysis of the immune system activation markers for inflammation (suPAR) showed a significant reduced difference to baseline in prednisolone-treated patients compared to untreated patients (-0.147 ng/ml, compared to 0,325 ng/ml, $p < 0.0001$). In the results for monocytes activation markers for soluble CD14 just failed the significant difference between prednisolone and placebo treated patients (4.030 ng/ml, vs. 3.513 ng/ml, $p = 0.062$). In the German Study cohort lymphocyte activation determined by CD38-expression on CD8+ T lymphocytes was significantly lower in prednisolone-treated patients compared to untreated patients (55.40% versus 73.34%, $p = 0.0011$). Similarly, we detected for monocyte activation markers lower levels of sCD14 (3.6 ng/ml vs. 6.11 ng/ml, $p = 0.0048$), and of LBP (2.18 ng/ml compared to 3.45 ng/ml; $p = 0.0386$) and for inflammation markers suPAR antigen (2.17 ng/ml vs. 2.56 ng/ml, $p = 0.0351$) and a trend towards lower levels of sCD40L (2.70 pg/ml vs. 3.60 pg/ml, $p = 0.0782$).

Viral load in both groups were similar (0.8×10^5 copies/ml compared to 1.1×10^5 copies/ml, $p = 0.3806$) (Kasang, Ulmer et al. 2012). By sequencing the HIV samples of ProCort patients we identified the HIV-1 subtype frequency A1: 34%, A1D: 7%, C: 26%, CRF10_CD: 4%, D: 28%, B: 1%. Twenty patients of the 88 were aged <25 years (meeting the WHO-initiated transmitted HIVDR surveillance criteria) and 68 patients were aged 25–63 years. The frequency of HIVDR in the study population was 14.8% (95%; CI 0.072–0.223) and independent of NVP-resistance induced by prevention of mother-to-child transmission programs. Patients >25 years had a significantly higher HIVDR frequency than younger patients (19.1%, versus 0%, $P = 0.0344$). ART-naïve patients aged over 25 years exhibited significantly higher HIVDR than younger patients. Detection of traces of ARVs in individuals with HIVDR suggests that besides transmission, undisclosed misuse of ARVs may constitute a significant factor in the generation of the observed high HIVDR rate.

Discussion: The results in the context of the ProCort Study showed that treatment with 5 mg per day prednisolone for two years in ART-naïve HIV patients is safe in an African setting and was associated with a significant increase of CD4+T-lymphocyte counts compared to the placebo group. In addition, prednisolone-treated patients developed significantly fewer AIDS-defining conditions, indicating that prednisolone slows HIV disease progression. This can be explained by the justified reduction of general immune activation in low-dose prednisolone treated patients. We suggest low-dose prednisolone as a treatment option for asymptomatic HIV infection in resource-limited settings. Additionally it should be clarified if low-dose prednisolone therapy is also an option for an ART combined treatment.

So far, the reported prevalence of HIVDR in eligible patient populations is below 5% across Sub-Saharan Africa (WHO 2012). Our study identified that patients over 25 years of age showed a significant higher prevalence of HIVDR than younger patients ($p=0.0344$). By phylogenetic alignment for two samples of treated partners and untreated patients we demonstrate a transmission of HIVDR probably achieved by treatment to the therapy naïve patient. Detection of traces of ARVs in some other individuals with HIVDR suggests that besides transmission, undisclosed misuse of ARVs may constitute a significant factor in the generation of the observed high HIVDR rate. The current WHO HIVDR survey that is solely focused on the transmission of HIVDR and that excludes patients over 25 years of age may therefore result in substantial underestimation of the prevalence of HIVDR in the therapy-naïve population. A modification of WHO HIVDR survey criteria is strongly recommended.

Inhaltsverzeichnis

Eidesstattliche Erklärung:	4
Zusammenfassung	6
Summary	10
Inhaltsverzeichnis	13
Abbildungsverzeichnis:	15
Tabellenverzeichnis:.....	15
1 Einleitung	16
1.1 Struktur und Aufbau von HIV-1	16
1.1.1 Die Morphologie des HIV-1	16
1.1.2 Die Organisation des viralen Genoms	17
1.1.3 Der Replikationszyklus von HIV-1	18
1.2 Die genetische Variabilität von HIV-1	20
1.2.1 Gruppen und Subtypen von HIV	20
1.2.2 HIV-1 Subtypenverteilung und deren Bedeutung	21
1.3 Die Verbreitung von HIV	24
1.3.1 Die Verbreitung von HIV im südlichen Afrika und die Präventions- und Behandlungskampagnen am Beispiel von Tansania	25
1.4 Die verschiedenen Phasen der HIV Infektion.	28
1.4.1 Die Akutphase	29
1.4.2 Die Latenzphase	30
1.4.3 AIDS.....	31
1.4.4 Die Einteilung der verschiedenen Krankheitsstadien.....	31
1.5 Die Aktivierung der T-Zell gesteuerten Immunantwort als Progressionsfaktor	32
1.5.1 Die Behandlung von HIV infizierten Patienten mit Glukokorti- koiden (Prednisolon) zur Reduktion der Immunaktivierung	34
1.6 HIV Therapie und Resistenzentwicklung unter Antiretroviraler Therapie	36
1.6.1 Nukleos(t)idische Reverse-Transkriptase-Inhibitoren (NRTIs).....	37
1.6.2 Nicht-Nukleosidische Reverse-Transkriptase-Inhibitoren (NNRTIs).....	38
1.6.3 Proteaseinhibitoren (PIs)	39
1.6.4 Entry-Inhibitoren	39
1.6.5 Integrase Inhibitoren (INIs).....	39
1.7 Die Antiretrovirale Therapie in Tansania	40
1.8 Primäre Resistenz ART naiver Patienten durch Übertragung von resistenten Virusquasispezies mit ART behandelter Partner	41
2 Material	43
2.1 Geräteliste	43
2.2 Verbrauchsmaterialienliste	44
2.2.1 Glas.....	44
2.2.2 Kunststoff	44
2.2.3 Sonstiges.....	44
2.3 Chemikalien.....	45
2.4 Enzyme und Reaktionspuffer	46
2.4.1 Enzyme.....	46
2.4.2 Reaktionspuffer vorgefertigt	46
2.4.3 Puffer und Lösungen selbst gemischt.....	46
2.5 Kits.....	47
2.6 Größenstandards	47
2.7 Zellmedien	47

2.8	Antikörper.....	47
2.9	Primer und Oligonukleotide	48
2.10	Computerprogramme und Internetseiten	49
3	Methoden	50
3.1	Studienort Tansania	50
3.1.1	Mwanza	50
3.1.2	Das Bugando Medical Centre als Studienort	50
3.1.3	Die ProCort Studie und das tansanische Patientenkollektiv	50
3.2	Studienort Deutschland.....	52
3.2.1	Deutsche Studienpatienten der Schwerpunktpraxis HIV in Stuttgart	52
3.3	Blutentnahme.....	52
3.3.1	Durchführung in Tansania.....	52
3.3.2	Durchführung in Deutschland	53
3.4	Isolierung und Konservierung von PBMCs aus Vollblut.....	53
3.4.1	Vacutainer	53
3.4.2	Kryokonservierung.....	54
3.4.3	Transport der PBMC und Langzeitkryokonservierung.....	54
3.4.4	Auftauen eukaryotischer Zellen	54
3.4.5	Bestimmung der PBMC Zellzahl mit der Neubauer Zählkammer.....	55
3.5	Gewinnung von EDTA und Heparin Plasma	55
3.5.1	Gewinnung von EDTA Plasma.....	55
3.5.2	Gewinnung von Heparin Plasma.....	55
3.6	Bestimmung der Zelltypen und Aktivierungsmarker mittels Antikörperfärbung und nachfolgender Durchflusszytometrie.....	56
3.6.1	Extrazelluläre Antikörperfärbung von CD4+ T-Lymphozyten und CD8+ T-Lymphozyten im Vollblut	56
3.6.2	Extrazelluläre Antikörperfärbung von PBMCs zur Bestimmung der Aktivierungsmarker CD38 und HLADR	56
3.7	Durchflusszytometrie (Fluorescence Activated Cell Sorting = FACS).....	57
3.8	DNA-Extraktion aus PBMC.....	57
3.9	RNA-Extraktion aus EDTA Plasma.....	58
3.10	Konzentrationsbestimmung mittels Spektralphotometrie.....	58
3.11	Polymerasekettenreaktion (PCR)	58
3.11.1	Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)	59
3.11.2	Nested PCR zur Amplifikation der HIV-1 cDNA	59
3.11.3	Sequenzierungs-PCR.....	60
3.12	Reinigung von PCR-Produkten	61
3.13	Agarosegelelektrophorese von Nukleinsäuren	61
3.14	Resistenz- und Phylogenetische-Analyse anhand der HIV-1 cDNA Sequenzen.....	62
3.15	Viruslastmessung.....	62
3.16	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) zur Bestimmung von LPS, LBP, CD14, suPAR und sCD40L.....	62
3.17	Therapeutisches Drug Monitoring.....	63
4	Ergebnisse (Publikationen)	64
4.1	HIV patients treated with low-dose prednisolone exhibit lower immune activation than untreated patients	64
4.2	HIV Drug Resistance (HIVDR) in Antiretroviral Therapy-Naive Patients in Tanzania Not Eligible for WHO Threshold HIVDR Survey Is Dramatically High. 64	
4.3	Low-dose Prednisolone Increases CD4+ T Cell Counts and Reduces Occurrence of AIDS-Defining Conditions in HIV Patients in Africa.....	88
4.4	Ergebnisse aus den Immunaktivierungsuntersuchungen der ProCort Studie.....	108

4.4.1	soluble urokinase plasminogen activator receptor (suPAR)	108
4.4.2	lösliches CD14 (sCD14).....	109
4.4.3	Aktivierungsmarker (CD8 CD38 HLADR) der CD8+T-Lymphozyten	110
5	Diskussion.....	111
6	Anhang.....	117
6.1	Stadieneinteilung von HIV Krankheitsprogression nach WHO.....	117
6.2	Stadieneinteilung von HIV Krankheitsprogression für Jugendliche und Erwachsene nach CDC	118
6.3	Übersicht über antiretrovirale Medikamente	119
6.4	Prüfplan der ProCort Studie	120
7	Lebenslauf.....	159
8	Danksagung.....	161
9	Literaturverzeichnis	163
10	Abkürzungsverzeichnis	176

Abbildungsverzeichnis:

Abb. 1:	Die Struktur von HIV (eigene Darstellung).....	17
Abb. 2:	Aufbau des HIV-Genoms (eigene Darstellung)	18
Abb. 3:	Weltweite Verteilung von Anzahl HIV-Infizierter und HIV-Subtypen.....	23
Abb. 4:	Die Subtypenverteilung von HIV-1 im südlichen Afrika	24
Abb. 5:	Anzahl weltweiter HIV-assoziiertes Todesfälle.....	25
Abb. 6:	Anzahl HIV-assoziiertes Todesfälle in Regionen unterteilt.....	25
Abb. 7:	Die Prävalenz in % der Bevölkerung im südlichen Afrika aufgeteilt nach Ländern ..	26
Abb. 8:	Die Anzahl HIV infizierter Menschen im südlichen Afrika aufgeteilt nach Ländern	26
Abb. 9:	Epidemiologische Daten zu HIV Infektionen im südlichen Afrika von 1990 bis 2009.	28
Abb. 10:	Der Krankheitsverlauf in Korrelation zur Anzahl der CD4-Zellen und der Viruslast.	29
Abb. 11:	Absolute und relative CD4+ T-Lymphozyten Differenz mit und ohne 5 mg Prednisolon Gabe.	35
Abb.12:	Progression von ART-unbehandelten Patienten mit und ohne Therapie mit 5 mg Prednisolon.	36
Abb. 13:	Studien Flow chart	51
Abb. 14:	Blutentnahme "Flowchart" für ProCort Studie.	52
Abb. 15:	a. + b Isolierung vom PBMCs mithilfe von Zell-Präparations Röhren (CPT).....	53
Abb. 16:	a. + b. Veränderung der relativen und absoluten suPAR Werte.	109
Abb. 17:	a. + b. Veränderung der relativen und absoluten sCD14 Werte.....	109
Abb. 18:	a. + b. Veränderung der relativen und absoluten CD3/CD8/CD38/HLADR Werte.	110
Abb. 19:	a,b,c,d die HIV-1 Subtypenverteilung in Tansania verschiedener Regionen.....	114

Tabellenverzeichnis:

Tabelle 1:	Stadieneinteilung von HIV Krankheitsprogression für Jugendliche und Erwachsene nach WHO (WHO 2007).....	117
Tabelle 2:	Stadieneinteilung von HIV Krankheitsprogression für Jugendliche und Erwachsene nach CDC (CDC 1993).	118
Tabelle 3:	Antiretrovirale Medikamente, Übersicht	119

1 Einleitung

Laut den Daten der Weltgesundheitsorganisation (WHO) sind derzeit weltweit etwa 33-34 Millionen Menschen HIV-positiv, also mit dem HI-Virus (human immunodeficiency virus) infiziert, bei einer immer noch steigenden Zahl von Neuinfektion (UNAIDS 2010). Die HIV-Infektion führt untherapiert innerhalb von ca. 10 Jahren zum Tod aufgrund eines progredient verlaufenden Immunschwächesyndroms, genannt AIDS (Acquired Immunodeficiency Syndrome), in dessen Verlauf opportunistische Infektionen lebensbedrohliche Erkrankungen auslösen. Im Jahr 2011 starben daran ca. 1,7 Millionen Menschen, wobei Sub-Sahara Afrika mit ca. 1,2 Millionen AIDS-Toten immer noch am stärksten betroffen war (UNAIDS 2012).

1.1 Struktur und Aufbau von HIV-1

HIV-1 wurde im Jahr 1983 erstmals als Auslöser der erworbenen Immunschwäche AIDS identifiziert (Barre-Sinoussi, Chermann et al. 1983; Gallo, Sarin et al. 1983). 1986 erfolgte die Isolierung eines zweiten Virustyps, genannt HIV-2 (Clavel, Guetard et al. 1986). Beide Viren sind in jeweils mehreren Übertragungen vom Schimpansen (HIV-1) bzw. einer Mangabenart (Sooty Mangabey) (HIV-2) Anfang des 20. Jahrhunderts auf den Menschen übertragen worden (Hahn, Shaw et al. 2000; Korber, Muldoon et al. 2000; Bailes, Gao et al. 2003). HIV-1 hat sich epidemiologisch weltweit verbreitet und ist bekannt als der Virustyp mit einer höheren Virulenz, was sich in höherer Infektiosität und Pathogenität niederschlägt. HIV-2 ist regional in Ländern Westafrikas wie Guinea-Bissau, Gambia, der Elfenbeinküste, Kap Verde, Mali, Mauretanien und dem Senegal verbreitet. Der Krankheitsverlauf ist deutlich weniger progredient (Marlink, Kanki et al. 1994), auch wenn beide HIV-Typen beim Menschen eine ähnliche Symptomatik verursachen. Morphologisch sind beide Typen nicht zu unterscheiden, sehr wohl jedoch durch Unterschiede in der Genomsequenz und im Genomaufbau (Guyader, Emerman et al. 1987). Weltweit sind nach Schätzungen mit HIV-2 ca. 1-2 Mio. Menschen infiziert (Gottlieb, Eholie et al. 2008; Campbell-Yesufu and Gandhi 2011), mit HIV-1 ca. 33 Mio. Menschen. Da HIV-2 epidemiologisch nur eine untergeordnete Rolle spielt, soll in der vorliegenden Arbeit nicht näher auf den HIV-2 Typ eingegangen werden.

1.1.1 Die Morphologie des HIV-1

Das HIV-1 zählt zu der Familie der Retroviren. Es wird aufgrund des verzögerten Krankheitsverlaufs der Patienten nach der Infektion zu der Gattung der Lentiviren gerechnet (Sonigo, Alizon et al. 1985). HIV-1 ist wie alle Retroviren mit einer Lipiddoppelmembran umhüllt, in die sowohl zelluläre als auch virale Proteine eingelagert sind (s. Abb. 1). Diese

viralen Proteine werden aufgrund ihrer starken Glykosylierung auch Glykoproteine genannt oder Env- Proteine, wobei Env für envelope = Hülle steht. Man unterscheidet zwischen dem in der Membran eingelagerten gp41 und dem daran nicht-kovalent gebundenen gp 120. Gp120 ist nur lose an gp41 und die Lipiddoppelmembran gebunden und kann auch spontan freigesetzt werden (Shedding).

Im Innern des Virus befindet sich ein zylindrisch geformtes Kapsid, das aus dem Strukturprotein p24 aufgebaut wird. Mit dem Kapsid und dem gp41 interagiert das p17 Matrixprotein, das die Lipiddoppelmembran innen auskleidet. Das Kapsid beinhaltet zwei gleiche einzelsträngige RNA-Moleküle, die als Protein-Nukleinsäurekomplex vorliegen, gebunden an das Protein p7 und das Enzym Reverse Transkriptase (RT) p66.

Daneben enthält das Viruspartikel noch weitere Enzyme wie die Protease (PR) p11 und die Integrase p32 (Gelderblom, Hausmann et al. 1987; Gelderblom 1991) (s. Abb. 1).

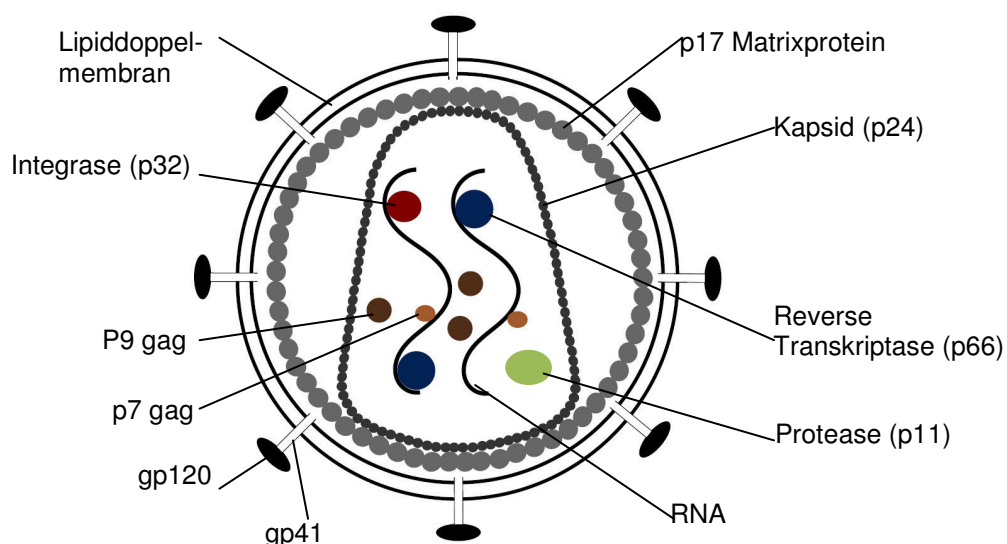


Abb. 1: Die Struktur von HIV (eigene Darstellung).

1.1.2 Die Organisation des viralen Genoms

Das im Kapsid vorliegende RNA-Genom umfasst jeweils eine Sequenz von ca. 9200 Nukleotiden. Die RNA enthält neun offene Leserahmen (open reading frames, ORF), welche 15 verschiedene Gene beherbergen und damit 15 Proteine kodieren. Die drei größten ORF (Gag, Pol, Env) beinhalten die viralen Strukturproteine (Gag) p17, p24 und p7, die virusspezifischen Enzyme (Pol) Protease p11, reverse Transkriptase p66 und die Integrase p32 und die Hüllproteine (Env) gp 120 und gp 41. Die weiteren ORF, die sich teilweise mit den Gag, Pol und Env Genen überlappen, kodieren Regulator- und Hilfsproteine (s. Abb. 2) (Briggs, Wilk et al. 2003). Links und rechts flankiert wird das Genom von langen terminalen

repetitorischen Sequenzen (LTR), die zur Integration des Virus in das Wirtsgenom und zur Kontrolle der Gentranskription dienen. In diesen LTR finden sich Bindungsstellen für zelluläre Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B.

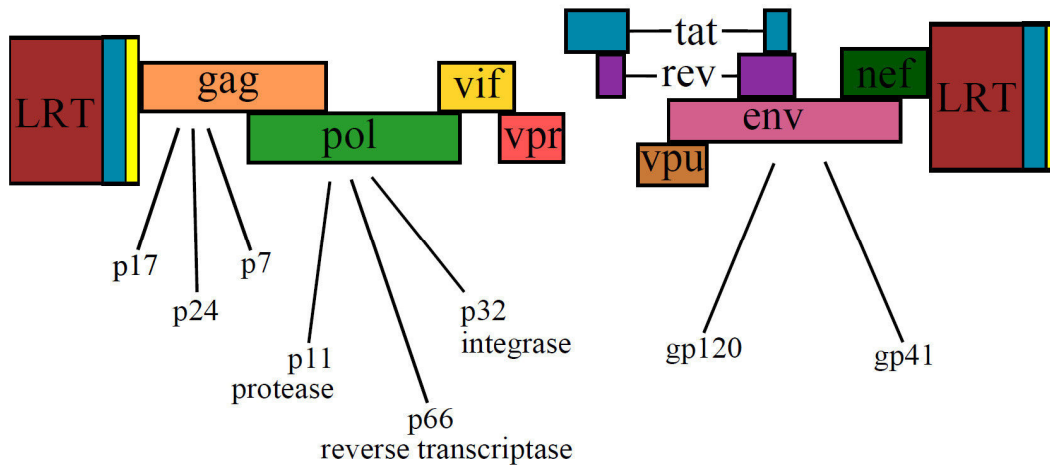


Abb. 2: Aufbau des HIV-Genoms (eigene Darstellung)

1.1.3 Der Replikationszyklus von HIV-1

Der Replikationszyklus von HIV beginnt mit der Anheftung von HIV an die Wirtszelle und soll im Folgenden kurz dargestellt werden.

1.1.3.1 Der CD4 Rezeptor als Eintrittspforte für HIV

Der CD4 Rezeptor der Wirtszelle ist der primäre Rezeptor für den HIV Eintritt in die Zielzelle (Dalglish, Beverley et al. 1984; Klatzmann, Champagne et al. 1984). Er ist ein Glykoprotein, welches auf der Oberfläche von lymphatischen Zellen (T-Lymphozyten) und monozytären Zellen (Makrophagen, dendritischen Zellen) vorkommt. Auf den T-Lymphozyten dient der CD4 Rezeptor als Co-Rezeptor, der gemeinsam mit dem T-Zell Rezeptor ein antigenpräsentierendes MHC Klasse II Molekül erkennt und eine Aktivierung der T-Lymphozyten und damit der T-Zell gesteuerten Immunantwort einleitet.

1.1.3.2 Fusionsprozess mit der Wirtszelle

Der CD4 Rezeptor ist die primäre Andockstation des HIV an eine Zelle. Hierbei wird die Fusion durch die Bindung des Glykoproteins gp120 an den CD4-Rezeptor eingeleitet. Danach bindet gp120 zusätzlich an die Co-Rezeptoren CCR5 oder CXCR4. Der Co-Rezeptor CCR5 wird überwiegend auf monozytären Zellen, aktivierten CD4+T-Lymphozyten und Memory T-Zellen exprimiert, während der CXCR4 Rezeptor auf naiven CD4+T-Lymphocyten zu finden ist. Phänotypisch können zwei verschiedene Virusisolate beschrieben werden, zum Einen die

monozytotropen (M-trope) Virusstämme, die an den Co-Rezeptor CCR5 binden und zum anderen die T-Zell-tropen (T-trop), die an den CXCR4 Rezeptor binden (Deng, Liu et al. 1996; Dragic, Litwin et al. 1996; Feng, Broder et al. 1996). Die Bindung an die Rezeptoren lockert die Bindung des externen Glykoproteins gp120 an das Transmembranprotein gp41. Gp120 und gp41 trennen sich voneinander, wodurch eine Konformationsänderung bei gp41 entsteht (Chan and Kim 1998). Das gp41 kann sich daraufhin wie ein Anker an die Wirtszelle andocken. Durch eine weitere Konfirmationsänderung des gp41 wird die Membran der Zelle so nahe an die Lipiddoppelmembran des Virus gezogen, dass es zu einer Membranfusion führt.

1.1.3.3 Lebenszyklus innerhalb der Wirtszelle und Freisetzung des neuen Viruspartikels

Nach erfolgter Membranfusion werden die beiden einzelsträngigen RNA-Genome, die Integrase, die Reverse Transkriptase und die Protease ebenso wie die Hilfsproteine p7gag und p9gag aus dem Capsid in das Zytoplasma der Wirtszelle freigesetzt. Dieser Prozess wird „Uncoating“ genannt. Das virale Enzym Reverse Transkriptase beginnt die viralen RNA-Genome in eine doppelsträngige DNA umzuschreiben. Die Integrase spaltet von dieser DNA auf beiden Seiten ein Dinukleotid ab und bildet so „klebrige Enden“. Die Integrase transferiert die verarbeitete virale DNA in den Zellkern und ermöglicht so die Integration der proviralen DNA in das Wirtszellen Genom. Diese Integration kann nur in aktivierten CD4+ T-Lymphozyten erfolgen (Zack, Arrigo et al. 1990). In ruhenden CD4+T-Lymphozyten liegt nur eine nicht-integrierte HIV-DNA vor und macht sie neben den Monozyten, Makrophagen und Zellen des ZNS zu einem langlebigen Virusreservoir (Chun, Carruth et al. 1997; Ostrowski, Chun et al. 1999).

Die HIV-DNA wird durch zelluläre RNA-Polymerasen transkribiert und die entstandene virale RNA gelangt ins Zytoplasma, wo sie in das Gag-Pol Polyprotein GagPol und in Env translatiert werden. Das Gag-Pol Polyprotein wird von der viralen Protease in die einzelnen Bestandteile gespalten, Env gp160 von zellulären Proteasen in gp41 und gp120. So entsteht aus dem gp160-Protein das gp120 und das gp41. Aus einem 53kDa Gag-Vorläuferprotein entstehen die Gag-Proteine p24, p17, p9 und p7. Schon früh wurde die Bedeutung der Protease für den viralen Replikationszyklus entdeckt (Kohl, Emini et al. 1988). Zuletzt erfolgt ein schrittweiser Zusammenbau des neuen Viruspartikels. HIV-1 RNA, Gag-Proteine und Pol-Enzyme bilden das Kapsid und lagern sich an der Zellwand an. Durch Ausstülpung (budding) erhält das Virus seine Lipidmembran als Außenhülle von der Wirtszelle, in die die Env-Proteine eingelagert bzw. angebunden werden.

1.2 Die genetische Variabilität von HIV-1

Die im Replikationszyklus neugebildeten Virionen gleichen genetisch jedoch nur in seltenen Fällen zu 100% dem Vorgängervirus. Durch eine hohe Mutationsrate von einem Fehler pro Genom pro Replikationsrunde (Geretti 2006), aber auch durch Rekombinationen, Insertionen oder Deletionen relativ großer Genbereiche, entstehen neben vielen nicht mehr replikationsfähigen Viren in jedem infizierten Individuum zahlreiche genetische Varianten, die als Quasispezies bezeichnet werden und unter hohem Selektionsdruck wie z.B. einer antiretroviralen Therapie oder der körpereigenen Immunantwort einen Selektionsvorteil aufweisen können (Korber, Gaschen et al. 2001). Stabile Mutanten und Rekombinanten haben sich über einen längeren zeitlichen Verlauf geographisch unterschiedlich etabliert und phylogenetisch voneinander abgetrennt (Zhang, Foley et al. 2010). Daraus sind HIV-1 Subtypen entstanden, die sich in den env-Genen zu 25-35% und in der serokonservativen Region der pol-Gene zu 10-15% unterscheiden (Shafer, Eisen et al. 1997; Meloni, Kim et al. 2004). Zur Bestimmung der Subtypen ist es aufgrund der hohen Diversität ausreichend, die stark konservierte pol-Region zu sequenzieren (Kantor and Katzenstein 2003).

1.2.1 Gruppen und Subtypen von HIV

HIV-1 wird auf der Basis von phylogenetischen Vergleichen in vier Gruppen eingeteilt. So sind bisher die Gruppen M, O, N und P bekannt (Ayoub, Mauclore et al. 2001; Roques, Robertson et al. 2004; Plantier, Leoz et al. 2009). Die Gruppe M (major group) ist mit einem Anteil an allen HIV Infektionen von weit über 90% am weitesten verbreitet und umfasst neun Subtypen, die mit den Buchstaben A, B, C, D, F, G, H, J, K bezeichnet werden. Die Subtypen E und I wurden nachträglich als keine echten Subtypen, sondern als Rekombinanten typisiert und aus der Klassifikation ausgeschlossen (Carr, Salminen et al. 1996; Gao, Robertson et al. 1998). Rekombinanten werden als "circulating recombinant forms" oder CRFs bezeichnet, durchnummeriert und mit den Subtypenbuchstaben versehen, aus denen die Rekombinante entstanden ist (z.B. CRF10_CD (Koulinska, Ndung'u et al. 2001)). In der „Los Alamos“ Datenbank sind bisher 54 CRF's eingetragen (Kuiken C 2010). In einigen Subtypengruppen sind inzwischen weitere Differenzierungen vorgenommen und Sub-Subtypen benannt worden. Diese werden mit Zahlen hinter den Großbuchstaben gekennzeichnet, wie es bereits bei Subtyp A (A1 und A2) und Subtyp F (F1 und F2) geschehen ist.

Die Gruppen O (outlier group), N (non-M non-O) und P sind bisher nur in West-Zentralafrika nachgewiesen worden. Mit HIV-1 der Gruppe O sind wenige zehntausend Menschen infiziert, Gruppe N und P wurden in Kamerun nachgewiesen (Hemelaar 2012). In diesen Gruppen wurden bisher keine Subtypen definiert, obwohl die Diversitäten der Sequenzen innerhalb

dieser Gruppen zum Teil erheblich sind. Alle vier Gruppen sind vermutlich das Ergebnis von vier separaten Transmissionen von Simian Immunodeficiency Viren (SIVs) nichtmenschlicher Primaten. Die Gruppe M (major) und die Gruppe N stammen von einem SIV Schimpansen Stamm (SIVcpz; Schimpanse *Pan troglodytes troglodytes*) ab, während das Vorgängervirus SIV der Gruppe O (outlier) noch nicht identifiziert wurde. Die Gruppe P ist eng mit einem SIV des Gorillas verwandt (SIVgor; *Gorilla gorilla gorilla*) (Vallari, Holzmayer et al. 2011).

HIV-2 wird analog zu HIV-1 aufgrund seiner phylogenetischen Verwandtschaftsgrade in verschiedene Gruppen eingeteilt. Die sieben Gruppen werden als A, B, C, D, E, F und G bezeichnet und sind aufgrund ihrer Sequenz-Diversität und Epidemiologie vermutlich Ergebnisse einzelner Transmissionen von Mangaben-Affen auf den Menschen (Alamos ; Santiago, Range et al. 2005; Kuiken C 2010).

1.2.2 HIV-1 Subtypenverteilung und deren Bedeutung

Die Diversifizierung von HIV-1 Gruppe M in verschiedene Subtypen hat einen direkten Einfluss auf die Krankheitsverläufe und Epidemiologie von HIV-1. So ist beschrieben worden, dass Infektionen mit verschiedenen Subtypen unterschiedliche Progressionsgeschwindigkeit und unterschiedliche Krankheitsverläufe aufweisen. Aus Ostafrika zeigen Daten aus zwei Studien, dass bei Patienten mit einer Infektion mit Subtyp D sowohl die Mortalität höher ist als auch die Entwicklung zum Vollbild AIDS schneller erfolgt, als bei Patienten mit dem Subtyp A (Kaleebu, French et al. 2002; Baeten, Chohan et al. 2007; Kiwanuka, Laeyendecker et al. 2008). Insgesamt weist der Subtyp A einen eher milden Verlauf in der Krankheitsprogression auf. So wurde im Vergleich des Subtyp A zu C, D oder G eine geringere 5 Jahres AIDS Rate beschrieben (Kanki, Hamel et al. 1999). Der Subtyp CRF01A_E wurde im asiatischen Raum als besonders progredient beobachtet (Nelson, Costello et al. 2007).

Es besteht die Frage, ob die Infektiosität von HIV verschiedener Subtypen unterschiedlich ist und sich somit auf die Epidemiologie auswirken könnte. Der Subtyp C steht im Verdacht leichter von der Mutter zum Kind übertragen werden zu können als der Subtyp A, B oder D. Hierzu gibt es jedoch widersprüchliche Aussagen (Murray, Embree et al. 2000; Blackard, Renjifo et al. 2001; Tapia, Franco et al. 2003; Renjifo, Gilbert et al. 2004; Taylor and Hammer 2008). Eine weitere wichtige Frage ist, ob die heute verfügbaren Therapieoptionen, die zum großen Teil an HIV Populationen getestet wurden, die mit dem Subtyp B infiziert waren, die gleiche Effizienz bei Infektionen mit anderen Subtypen haben. Dabei könnte es eine therapeutische Rolle spielen, dass bei Patienten mit einem progredienteren Subtyp die

Therapie nach anderen Kriterien begonnen werden muss, so z.B. bereits bei noch höheren CD4+ T-Lymphozyten Werten. Der Erfolg der antiretroviralen Therapie ist eng mit der Entwicklung von Resistenzen des Virus gegen die Medikamente verbunden. So ist beobachtet worden, dass sowohl HIV-1 der Gruppe O und HIV-2 eine primäre Resistenz gegen Nicht-Nukleosidale Reverse Transkriptaseinhibitoren (NNRTI) aufweisen (Tuailon, Gueudin et al. 2004; Taylor and Hammer 2008). In den Non-B Subtypen der M-Gruppe sind solche Resistenz auslösenden Polymorphismen bisher noch nicht beschrieben worden. Im Kodierungsbereich der Reversen Transkriptase und Protease wurden jedoch Polymorphismen nachgewiesen, die Subtyp-spezifisch die genetischen Barriere herabsetzen und damit eine Entwicklung zu einer sekundären Resistenz unter ART fördern können (Kantor and Katzenstein 2003; Perno, Cozzi-Lepri et al. 2004; Geretti 2006; Taylor and Hammer 2008). So wurde in vitro beobachtet, dass in mit HIV-C infizierten und mit Tenofovir behandelten Zellen die Mutation K65 → R schneller auftrat, als im HIV-B Subtyp (Brenner, Oliveira et al. 2006). Dies deckt sich auch mit Beobachtungen aus einer klinischen Studie in Botswana mit HIV-C infizierten Patienten, die mit Didanosine (DDI) und Stavudine (d4T) behandelt wurden und innerhalb von 8 Monaten die K65 → R Mutationen entwickelten, schneller als jemals bei Subtyp B beobachtet (Frater, Beardall et al. 2001; Taylor and Hammer 2008). Auch wurde beschrieben, dass Subtyp C gegen NNRTI häufig Resistenzen in den Positionen K103N oder V106M entwickeln, während in Subtyp B diese V106M nur sehr selten beschrieben worden ist (Grossman, Istomin et al. 2004). Insgesamt ist jedoch die klinische Datenlage zu den Progressionsverhalten, Infektiositäten und Resistenzentstehungen der verschiedenen Subtypen noch sehr gering und es wäre aufgrund der möglichen Implikationen für die Therapie der Patienten dringend erforderlich, hier weitere Untersuchungen durchzuführen.

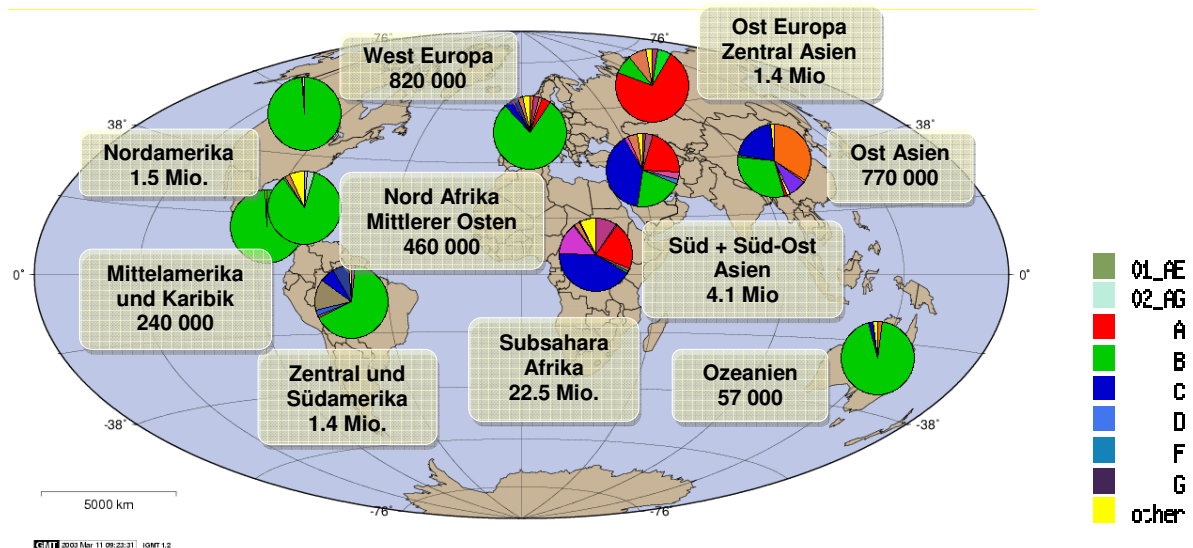


Abb. 3: Weltweite Verteilung von Anzahl HIV-Infizierter und HIV-Subtypen. Eigene Darstellung verändert nach Los Alamos Database und Daten von UNAIDS Global Report 2010 (Alamos ; Kuiken C 2010; UNAIDS 2010).

Weltweit ist zu beobachten, dass sich die Diversifizierung in verschiedene Subtypen vor allem auf Afrika und Asien beschränkt. In Nord und Südamerika, Australien und Europa herrschen vor allem der Subtyp B vor, während in Afrika und den arabischen Ländern neben einer Vielzahl verschiedener Subtypen und CRFs der Subtyp C eine bedeutende Rolle einnimmt. Der Subtyp C ist verantwortlich für die Hälfte aller HIV-Infektionen (Geretti 2006). In Asien ist eine Dominanz des CRFs 01_AE wahrzunehmen, während in den GUS Staaten der Subtyp A die vorherrschende Rolle einnimmt (Menu, Truong et al. 1996; Motomura, Kusagawa et al. 2000; Piyasirisilp, McCutchan et al. 2000; Bobkov, Kazennova et al. 2004) (s. Abb. 3).

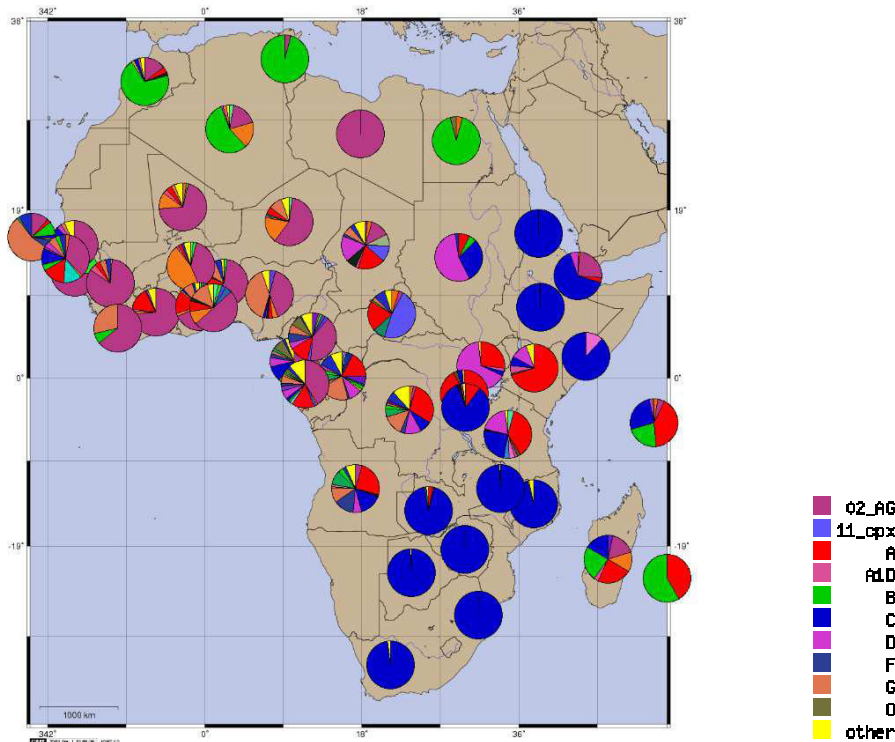


Abb. 4: Die Subtypenverteilung von HIV-1 im südlichen Afrika (Los Alamos Database <http://www.hiv.lanl.gov/>).

Die Subtypenverteilung innerhalb Afrikas erfolgt in einer Nord/Süd/West-Ausrichtung. So ist im Norden der Subtyp B präsent, im Westen überwiegend CRF02_AG, während im Süden der Subtyp C klar vorherrscht. Tansania hat bezüglich der Subtypenverteilung eine sehr interessante Position. Es weist neben Kenia als eines der wenigen afrikanischen Länder den Subtyp A als vorherrschend neben C und D auf (Alamos).

1.3 Die Verbreitung von HIV

33 Millionen Menschen lebten nach Schätzungen der WHO (UNAIDS 2010) im Jahr 2009 mit HIV und AIDS; das waren 16,4 Prozent mehr als 2001. Dieser Anstieg ist zum Einen auf eine anhaltende Verbreitung von HIV zurückzuführen, zum Anderen sind die HIV assoziierten Todesfälle durch Einführung von antiretroviraler Therapie gesunken. Die Inzidenz von HIV bei Erwachsenen und Kindern ist von 3.1 Mio. (2.9 Mio. -3.4 Mio.) im Jahr 1999 auf 2.6 Mio. (2.3 Mio. -2.8 Mio.) im Jahr 2009 um 500 000 gesunken (UNAIDS 2010), gleichzeitig ist auch die Zahl der HIV assoziierten Todesfälle weltweit vom Höhepunkt im Jahr 2004 mit 2.1 Millionen Menschen (1.9 Mio. -2.3 Mio) auf 1.8 Mio (1.6 Mio. -2.1 Mio) im Jahr 2009 gesunken (s. Abb. 5). Die HIV Prävalenz, Inzidenz und die Anzahl HIV assoziierter Todesfälle ist weltweit regional sehr unterschiedlich. Während im südlichen Afrika, der Region mit der höchsten HIV Prävalenz, die Inzidenz und die Anzahl HIV assoziierte Todesfälle zurückgegangen ist, stieg z.B. im osteuropäischen Raum die Anzahl der

Todesfälle von 18 000 (14 000 – 23000) im Jahr 2001 auf 76 000 (60 000 – 95 000) im Jahr 2009 (UNAIDS 2010; WHO 2010)(s. Abb. 6).

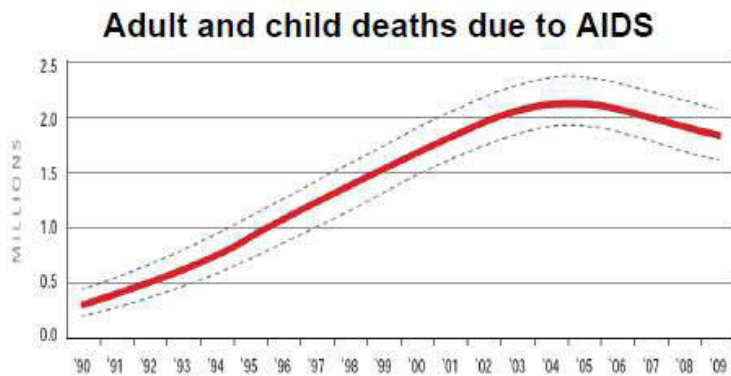


Abb. 5: Anzahl weltweiter HIV-assoziierter Todesfälle.
Todesfälle von Erwachsenen und Kindern seit 1990 bis 2009 vgl. (UNAIDS 2010)

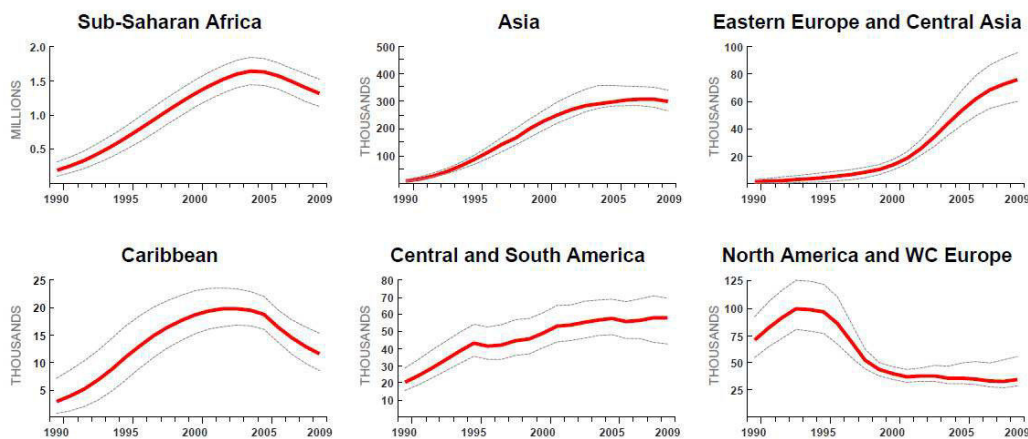


Abb. 6: Anzahl HIV-assoziierter Todesfälle in Regionen unterteilt.
Todesfälle von Erwachsenen und Kindern seit 1990 bis 2009 (UNAIDS 2010)

Die Prävalenz der HIV-Infektion lag 2009 in der erwachsenen Bevölkerung in Subsahara-Afrika mit ca. 5% weltweit am höchsten, jedoch mit sehr großen regionalen Unterschieden (s. Kap. 1.3.1), gefolgt von 1% in der Karibik, 0,8% in Ost-Europa und Zentral Asien, 0,5% in Nord Amerika, 0,5% in Zentral- und Südamerika, 0,3% in Süd- und Südostasien, 0,3% in Ozeanien, 0,2% im Mittleren Osten und Nordafrika, 0,2% in West und Zentral Europa und 0,1% in Ostasien (UNAIDS 2010; WHO 2010).

1.3.1 Die Verbreitung von HIV im südlichen Afrika und die Präventions- und Behandlungskampagnen am Beispiel von Tansania

Die afrikanischen Länder südlich der Sahara sind von der HIV Infektion am meisten betroffen. Hier waren 2009 22,5 Millionen Menschen mit HIV infiziert, das sind 67% aller weltweit infizierten Menschen. Im Jahr 2009 kamen 1,8 Millionen Neuinfizierte hinzu. Im

südlichen Afrika spielt hauptsächlich die heterosexuelle Transmission des Virus eine Rolle. Laut Statistik sind mehr Frauen (56%) betroffen als Männer (UNAIDS 2010). Süd-Afrika weist mit 17,8% die höchste Prävalenz Afrikas auf (5,6 Mio. Menschen) und hat Regionen, in denen bis zu 30% der Bevölkerung HIV-infiziert sind. In Ost-Afrika hat sich die Prävalenz auf unter 10 % stabilisiert. So war sie 2009 in Uganda ca. 6,5% (1991 10,7%), in Kenya 6,3% (1996 10,5%), in Rwanda 2,9% (1990 5,2%) und in Tansania 5,6% (1996 7,9%) (UNAIDS 2010). Tansania war im afrikanischen Vergleich des Jahres 2009 bezüglich der HIV-Prävalenz auf Platz 12. Aufgrund der hohen Bevölkerungszahl ist das Land jedoch bezüglich der absoluten Anzahl der Menschen die mit HIV/Aids (1,4 Mio) (TACAIDS 2012) leben auf Platz drei.

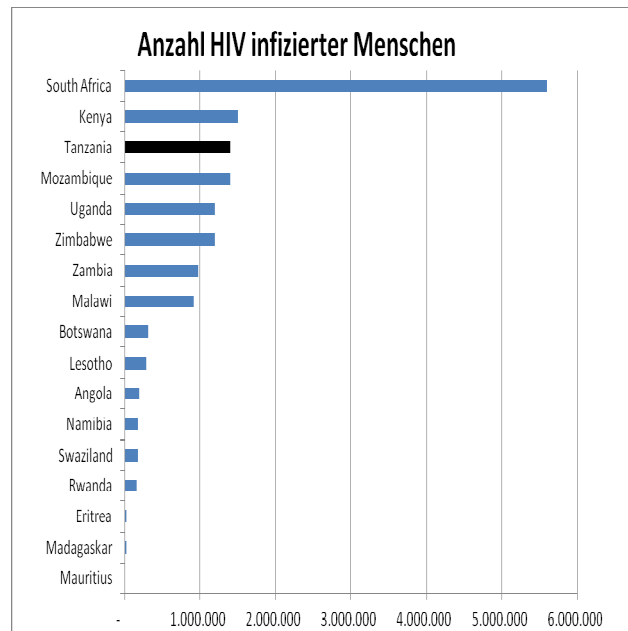
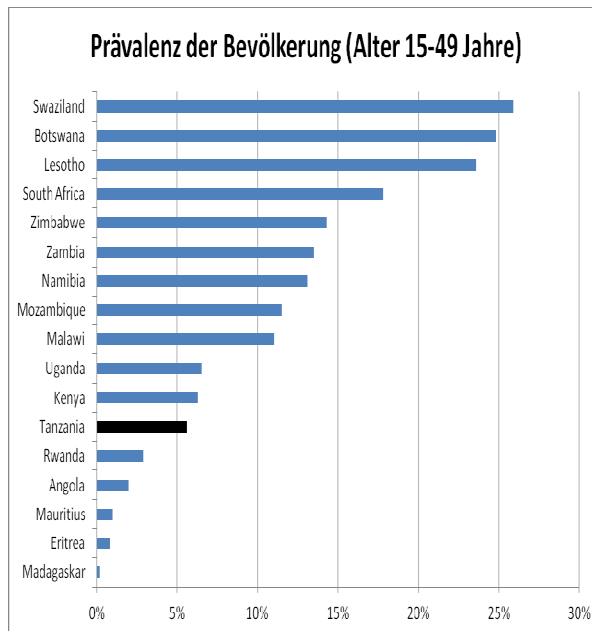


Abb. 7: Die Prävalenz in % der Bevölkerung im südlichen Afrika aufgeteilt nach Ländern

Abb. 8: Die Anzahl HIV infizierter Menschen im südlichen Afrika aufgeteilt nach Ländern

Eigene Darstellung verändert nach (UNAIDS 2004; UNAIDS 2010).

Die HIV-Prävalenz in Tansania ist regional sehr unterschiedlich. So gibt es Regionen (Iringa), die eine Prävalenz von über 10% aufweisen.

Die erste HIV Infektion in Tansania wurde 1983 in der Region Kagera diagnostiziert. Trotz der Gründung eines nationalen AIDS Kontrollprogramms (National AIDS Control Program NACP) bereits 1985 und einigen Aufklärungskampagnen wie z.B. dem MTP I (Medium Term Plan 1) zur Sicherstellung von HIV-freien Blutkonserven und Management von sexuell übertragenen Krankheiten, lag der Peak der HIV Prävalenz im Jahr 1996 bei 7,9% (TACAIDS 2009 ; UNAIDS 2010). Zu diesem Zeitpunkt waren die Aufklärungskampagnen noch spärlich

und es gab keine effektiven Behandlungsregime; auch standen nicht genügend Kapazitäten zur Diagnose zur Verfügung (TACAIDS 2009 ; Marum, Taegtmeier et al. 2012). Im Jahr 1999 wurde die HIV Bekämpfung im Rahmen der Formulierung der weltweiten UN Millenniumsziele in das PRSP (Poverty reduction strategy paper) als eines von sieben Prioritäten aufgenommen (UN 2000). Um die Millenniumsziele zu erreichen, wurden zahlreiche Programme zur Aufklärung, Prävention und Therapie auf dem afrikanischen Kontinent initiiert. Die zwei größten Organisationen Global Fund und PEPFAR (US President's Emergency Plan for AIDS Relief) finanzieren über 90% der ART in Entwicklungsländern (Bilimoria 2012).

In Tansania wurde im Rahmen der Umsetzung dieses Strategieprogrammes die tansanische AIDS Kommission gegründet (TACAIDS), die für die strategische Koordination und Vernetzung verschiedener HIV Behandlungs- und Präventionsprogramme zuständig ist. Im Jahr 2003 wurde ein großes ART Behandlungsprogramm initiiert. Hierbei wurden von der WHO standardisierte Therapieschemata eingesetzt (letzte Aktualisierung (WHO 2008)), die immer mehr mit Generika abgedeckt werden konnten (Holmes, Coggin et al. 2010). Die antiretrovirale Therapie ebenso wie alle begleitenden Laboruntersuchungen (z.B. CD4+ T-Lymphozyten Messung) sind für die HIV-infizierten Patienten kostenlos. Besonders die lokale Anbindung an schon vorhandenen Strukturen wurde bei der Implementierung der Programme beachtet und mit Hilfe der TACAIDS organisiert. Es wurde neben dem antiretroviralen Therapieprogramm („Roll out program“) in CTC („Care and Treatment Centers“) und „home based care“ Zentren, das Programm zur Verhinderung der Übertragung von HIV von der Mutter zum Kind (PMTCT, prevention of mother-to-child transmission), ein freiwilliges HIV Nachweisprogramm (VCT – voluntary counselling and testing) und Aufklärungsprogramme wie ABC („abstain, be careful and use condoms“) oder DSI („delaying sexual initiation“) finanziert und durchgeführt (TACAIDS 2008; El-Sadr, Holmes et al. 2012).

Die von der WHO definierten Millenniumsziele zur Bekämpfung von HIV/AIDS (UN 2010), mit den Zielvorgaben bis 2015 die Ausbreitung von HIV/AIDS zum Stillstand zu bringen und allmählich umzukehren und bis 2010 den Zugang zu antiretroviraler Behandlung für alle Behandlungsbedürftigen sicher zu stellen, werden jedoch nur ansatzweise erreicht. Zwar war 2009 in Afrika erstmalig eine abnehmenden Tendenz bei den Zahlen der Neuinfektionen und der HIV assoziierten Todesfälle zu beobachten (s. Abb. 9) (UNAIDS 2010), die Verfügbarkeit der antiretroviralen Medikamente ist jedoch weiterhin eingeschränkt. So waren im Jahr 2009 im südlichen Afrika nur ca. 44% der Patienten, die nach den Kriterien der WHO mit einer

Therapie hätten beginnen müssen, in Behandlung (Geng, Hunt et al. 2011). Die Einschlusskriterien für ART waren entweder Messung von weniger als 200 CD4+ T-Lymphozyten/ μ l oder zwischen 200 und 350 CD4+ T-Lymphozyten/ μ l assoziiert mit Auftreten HIV assoziierter Symptome.

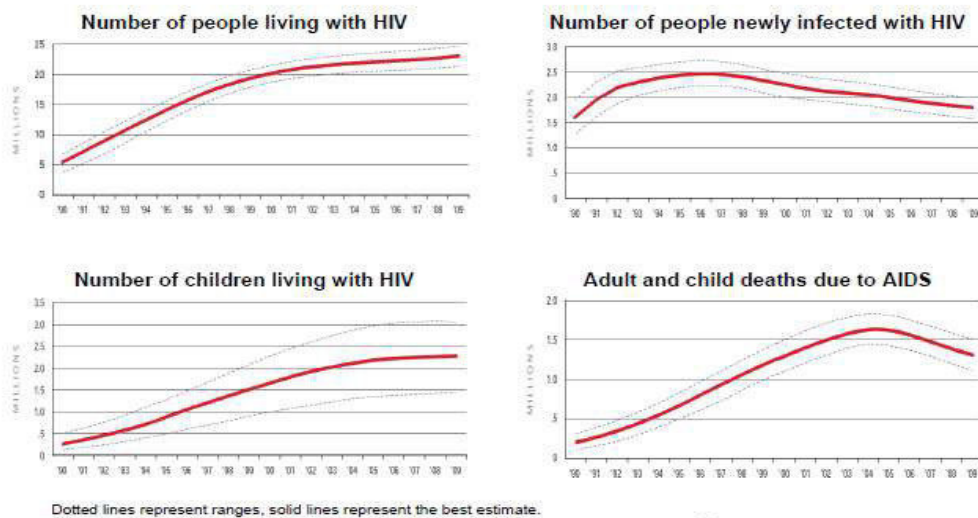


Abb. 9: Epidemiologische Daten zu HIV Infektionen im südlichen Afrika von 1990 bis 2009.

Trends in Anzahl HIV Infizierter, Neuinfektionen, Anzahl HIV infizierter Kinder und HIV-bedingter Todesfälle bei Erwachsenen und Kindern im südlichen Afrika (UNAIDS 2010).

1.4 Die verschiedenen Phasen der HIV Infektion.

Der Verlauf der HIV Infektion ist von Mensch zu Mensch sehr unterschiedlich. In der Regel geht nach Abklingen der ersten Akut-Phase mit starker Virusvermehrung und grippeähnlichen Symptomen erst eine jahrelange, weitgehend symptomlose Phase, „die Latenzphase“, der eigentlichen Erkrankung voraus (Simon, Ho et al. 2006). Während dieser Phase ist die Krankheitsprogression bereits im Blut am Verlust der für die Immunantwort notwendigen CD4+T-Lymphozyten (auch CD4+T-Zellen, CD4-Zellen oder Helferzellen benannt) ablesbar (Douek, Picker et al. 2003). Als Normalwert bei gesunden, nicht HIV-infizierten Menschen wird für Afrika die Anzahl der CD4+ T-Lymphozyten mit 400-2000 bzw. 500-2000 Zellen/ μ l Blut angegeben (Zeh, Amornkul et al. 2011; Adoga, Pennap et al. 2012). AIDS-definierende Krankheiten treten gehäuft auf, wenn ihre Zahl unter 200 / μ l gefallen ist (Douek, Picker et al. 2003) (s. Abb. 10).

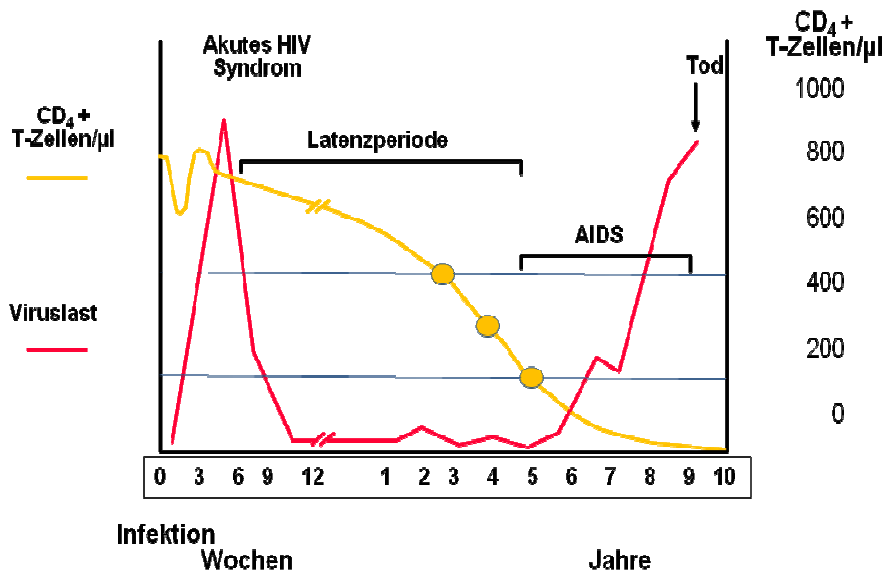


Abb. 10: Der Krankheitsverlauf in Korrelation zur Anzahl der CD4-Zellen und der Viruslast.

Zwischen HIV-Infektion und AIDS vergehen in der Regel Jahre.

Bei unbehandeltem Krankheitsverlauf führt die Infektion mit HIV in der Regel nach 10-15 Jahren zum Tod des Patienten. Es gibt einige wenige Patienten, die keine Progression des Krankheitsverlaufes erleben und deren immunologische Marker (z.B. Zahl der CD4+T-Lymphozyten) als auch die virologischen Marker (Viruslast) keine Verschlechterung aufweisen. Sie werden als Long-Term Non-Progressors (LTNP) oder Elite Controller bezeichnet. Die Gründe dafür können vielfältig sein. Es sind Populationen bekannt, die mit einem attenuierten Virus (nef-Gen Deletion) infiziert sind (Rhodes, Ashton et al. 2000), aber auch Individuen, die aufgrund ihrer genetischen Disposition in der Lage sind, die Replikation des Virus zu kontrollieren. So ist eine Mutation im Co-Rezeptor CCR5 (CCR5 Δ 32) (Sabeti, Walsh et al. 2005) oder eine bestimmte HLA-Gruppe (HLA-B*5705 and/or HLA-B*2705) (Migueles, Sabbaghian et al. 2000) für diese „natürlich Resistenz“ verantwortlich gemacht worden. Weiterhin gibt es aber noch eine Vielzahl von LTNP-Fällen, die ungeklärt bleiben (Lambotte, Boufassa et al. 2005).

1.4.1 Die Akutphase

Die Infektion eines Organismus mit HIV beginnt, wenn es einem oder mehreren HI-Viren gelingt, mit lymphatischen oder monozytären Zellen des Immunsystems zu fusionieren. In 80% aller Patienten stammt die Infektion von nur einem erfolgreichen Viruspartikel (Keele, Giorgi et al. 2008). Die Anfangsphase der HIV Infektion findet hauptsächlich im Mukosa-assoziierten lymphatischen Gewebe statt, unter anderem auch im Darm. Dort erfolgt eine massive Infektion und Depletion von CD4⁺CCR5⁺ Memory T-Zellen (Mehandru, Poles et al.

2004). In dieser frühen Phase der Infektion führt die Infektion aktivierter CD4+ T-Lymphozyten zu einem starken Anstieg der Virusreplikation und zu einem kurzfristigen starken Abfall der CD4+ T-Lymphozyten (Cooper, Gold et al. 1985; Kahn and Walker 1998; Simon, Ho et al. 2006). Mit Hilfe von Zellen des monozytären/makrophagozytären Systems gelangt das Virus in für das Immunsystem schwer zugängliche Organe des Körpers, wie z.B. die Hoden und das Gehirn (Roy and Wainberg 1988). Mit Anstieg der Virämie in der Akutphase der HIV-1 Infektion entwickelt sich eine ausgeprägte Aktivität HIV-1-spezifischer CD8+ T-Lymphozyten, die zunächst zu einer Eindämmung der Plasmavirämie führt (Borrow, Lewicki et al. 1994; Koup, Safrit et al. 1994; Goonetilleke, Liu et al. 2009). Klinisch ist eine Differentialdiagnose des akuten HIV-Syndroms schwierig. Das Krankheitsbild ähnelt einer fieberhaften grippeähnlichen Infektion mit Lymphknotenschwellungen und selten Exanthem oder aseptischer Meningitis (Daar, Little et al. 2001).

1.4.2 Die Latenzphase

In der Latenzphase, einer unterschiedlich langen symptomfreien Zeit, die mehrere Jahre dauern kann, wird die Viruslast zusätzlich von der humoralen Immunantwort mit Antikörperbildung kontrolliert (Montefiori, Pantaleo et al. 1996; Trkola, Kuster et al. 2005). Die fundamentale pathologische Auffälligkeit bei HIV-Infizierten in dieser Phase ist die progrediente Abnahme der Anzahl der CD4+ T-Lymphozyten und damit die Abnahme der immunkompetenten Zellen der zellulären Immunantwort (Douek, Picker et al. 2003). Diese Abnahme kann zum Teil dadurch erklärt werden, dass die zytotoxischen CD8+ T-Lymphozyten virusinfizierte CD4+-Zellen zerstören (Borrow, Lewicki et al. 1994). Daneben kann auch HIV-induzierter Zelltod (Nagata and Golstein 1995; Porichis and Kaufmann 2012) beziehungsweise HIV induzierte Verschmelzung der Zellen (Lifson, Reyes et al. 1986; Sodroski, Goh et al. 1986) zum Zellverlust führen. Jedoch kann die starke quantitative Abnahme der CD4+ T-Lymphozyten nicht alleine auf diesem Mechanismus beruhen, da die Zerstörung der CD4+ T-Lymphozyten unabhängig von der Viruslast auftritt (Sousa, Carneiro et al. 2002). So werden für die Zerstörung der CD4+ T-Lymphozyten weitere Faktoren diskutiert, wie den Verlust der immunkompetenten Zellen durch unspezifische chronische Immunaktivierung mit Erschöpfung der regenerativen Kapazitäten des Immunsystems (Giorgi, Liu et al. 1993). Die Latenzphase kann klinisch in zwei unterschiedliche Phasen eingeteilt werden, nämlich in die klinisch asymptomatische und in die symptomatische Phase. In der symptomatischen Phase treten die ersten HIV-assoziierten Erkrankungen auf.

1.4.3 AIDS

Vom AIDS-Stadium (*engl.* Acquired Immunodeficiency Syndrome) spricht man, wenn die Immunsuppression weit fortgeschritten ist. Dies ist erreicht, wenn die Anzahl der CD4+ T-Lymphozyten den Wert von 200 Zellen/ μ l unterschreitet oder der Ausbruch AIDS-definierender opportunistischer Infektionen diagnostiziert wird. Hierbei kann es sich zum Einen um die Reaktivierung endogener Keime handeln wie z.B. *Pneumocystis jirovecii*, Cytomegalievirus, oder *Candida albicans*, oder zum Anderen um Erkrankungen, die in der Bevölkerung mit einem guten Immunstatus seltener vorkommen, wie z.B. das Kaposi Sarkom oder die Tuberkulose (Buchacz, Baker et al. 2010).

1.4.4 Die Einteilung der verschiedenen Krankheitsstadien

Der verzögerte klinische Verlauf der HIV Infektion bedeutet eine besondere Herausforderung an den Kliniker und Forscher. Zum Einen hat diese Eigenschaft der Infektion eine große epidemiologische Dimension, viele Patienten nehmen von der Infektion zunächst keine Notiz, somit ist auch deren soziales Verhalten unverändert und die Übertragung kann ungehindert von statten gehen (Pinkerton 2012). Zum Anderen kommen viele Patienten erst mit einem bereits fortgeschrittenen Stadium der HIV Infektion in Behandlung (Waters and Sabin 2011). Nach initialer HIV Diagnose wird zunächst der klinische Zustand beurteilt. Hierbei spielt neben der Ermittlung des Körpergewichts und das Screening auf Vorliegen opportunistischer Infektionen eine große Rolle (WHO 2006). Es haben sich zur Beurteilung des Zustandes des Patienten ebenfalls verschiedene Laborwerte etabliert. So werden die Anzahl der CD4+ T-Lymphozyten und CD8+ T-Lymphozyten im peripheren Blut und die Viruslast im Plasma gemessen. Aus den CD4 und CD8 Werten werden zusätzlich die Ratio (CD4 Werte/CD8 Werte) und der Anteil der CD4 Zellen an den gesamten T-Lymphozyten (CD4%) berechnet (Douek, Picker et al. 2003). Mit diesen prognostischen Markern kann eine Einschätzung über den Verlauf der Erkrankung gemacht werden. Die Ergebnisse der klinischen Erhebungen und der Laborwerte fließen in die Beurteilung zur Einteilung der verschiedenen Krankheitsstadien ein. Auf dieser Grundlage wird der Zeitpunkt des Starts mit der antiretroviralen Therapie bestimmt. Es gibt zwei verschiedene Klassifikationssysteme die entwickelt wurden, um diesen Zeitpunkt festzulegen. Zum Einen ein System, das vom U.S. Center for Disease Control and Prevention (CDC) entwickelt wurde (CDC 1993; CDC 1999). In diesem werden die Stadien anhand zweier Kriterien definiert, nämlich nach der Zahl der CD4+T-Lymphozyten im peripheren Blut und dem Auftreten von opportunistischen und malignen Erkrankungen, die als HIV assoziierte Erkrankungen klassifiziert sind. Eingeteilt werden in das Stadium 1 Patienten mit mehr als 500 CD4+T-Lymphozyten pro μ l, in das Stadium 2 mit

mehr als 200 aber weniger als 500 CD4+T-Lymphozyten pro μl und in das Stadium 3 mit weniger als 200 CD4+T-Lymphozyten pro μl . Zum Anderen gibt es ein Klassifikationssystem, das von der Weltgesundheitsorganisation (WHO) vorgeschlagen wurde (WHO 2007). Das WHO-Klassifikationssystem stützt sich ausschließlich auf die Ergebnisse der klinischen Parameter und ist damit unabhängig von CD4-Messungen (s. Tab. 1). Das WHO-Klassifikationssystem ist daher insbesondere in Ländern mit begrenzten Ressourcen einfacher einzusetzen als das CDC-System.

1.5 Die Aktivierung der T-Zell gesteuerten Immunantwort als Progressionsfaktor

Die T-Zell gesteuerte Immunantwort spielt, wie oben beschrieben, in der HIV Infektion eine zentrale Rolle. Das Immunsystem von HIV-infizierten Patienten zeigt eine chronische Aktivierung der T-Zellen (im Folgenden Immunaktivierung), diese wird sowohl von CD4+ T-Lymphozyten als auch von zytotoxischen CD8+ T-Lymphozyten beschrieben (Giorgi, Hultin et al. 1999). Sie resultiert jedoch nicht in einer effizienten Kontrolle der Infektion, sondern hat im Gegenteil eine Erschöpfung der regenerativen Kapazitäten des Immunsystems zur Folge. Die Höhe der Immunaktivierung beeinflusst den individuellen Verlauf der Progression der HIV Infektion (Sousa, Carneiro et al. 2002). So ist eine hohe Aktivierung der T-Zellen, gemessen anhand der Expression der Aktivierungsmarker CD38 und HLA-DR (Giorgi, Liu et al. 1993), mit einem schnellen Fortschreiten der Krankheitsprogression verbunden (Hazenber, Otto et al. 2003).

Eine interessante Beobachtung aus dem Bereich der SIV-Forschung lässt die Bedeutung der Immunaktivierung für die Progression von HIV erahnen. SIV-infizierte Rhesusaffen (*Macaca mulatta*) entwickeln eine ähnliche Erkrankung wie AIDS, mit Verlust der CD4+ T-Lymphozyten und weisen ebenso wie Menschen mit HIV-Infektion eine hohe Immunaktivierung auf. Im Gegensatz dazu kann diese hohe Immunaktivierung bei den natürlichen Wirten von SIV, den Rußmangaben (*Cercocebus atys*), nicht gefunden werden, und diese Affenart entwickelt auch kein AIDS Syndrom (Silvestri, Sodora et al. 2003).

Zunächst wurde eine Aktivierung der T-Zellen aufgrund einer direkten Stimulierung durch HIV vermutet. Durch weitere Untersuchungen wurde jedoch ersichtlich, dass die Gründe für diese Immunaktivierung multikausal sind und unabhängig von der HIV Viruslast auftreten (Sousa, Carneiro et al. 2002; Hunt, Martin et al. 2003). Es werden neben der direkten Stimulierung HIV-spezifischer T-Lymphozyten auch T-Lymphozyten anderer Spezifität stimuliert. Der Grund hierfür könnte sein, dass in der Frühphase der Infektion zumeist CD4+ CCR5+ Memory T-Lymphozyten des lymphatischen Gewebes des Darms infiziert werden

(Mehandru, Poles et al. 2004). Dieser Pool der Memory CD4+T-Lymphozyten in der Darmmukosa dient normalerweise als Barriere für den Übertritt von Darmkeimen (Mehandru, Tenner-Racz et al. 2005). Die gestörte antimikrobielle Funktion führt zu einer vermehrten mikrobiellen Translokation von Keimen aus dem Darm in den Blutkreislauf und diese dann zu der chronischen Immunaktivierung (Jiang, Lederman et al. 2009). Die mikrobielle Translokation konnte durch erhöhte Lipopolysaccharid (LPS)-Konzentrationen direkt im Blutplasma, insbesondere bei Patienten in fortgeschrittenen Krankheitsstadien, nachgewiesen werden (Brenchley, Price et al. 2006). Alternativ lassen sich erhöhte LPS-Spiegel auch indirekt nachweisen, wie z.B. durch Bestimmung der Aktivierung des LPS-Systems des Körpers. Dieser reagiert auf erhöhte LPS-Konzentrationen mit der Ausschüttung des LPS-Bindeproteins (LBP) aus der Leber, sowie der Freisetzung von löslichem CD14 (sCD14), einem Korezeptormolekül für LPS, das von Makrophagen ausgeschüttet wird (Kitchens and Thompson 2005). Der Komplex aus LPS, LBP und sCD14 bindet an den Toll-Like Rezeptor (TLR)-4 der Makrophagen und löst damit eine Enzymkaskade aus, die zu einer Bildung von Zytokinen (wie z.B. TNF α) und zur Aktivierung der Immunantwort führt (Cohen 2002). Die Plasma-Konzentrationen von LBP und sCD14 lassen sich mit Hilfe handelsüblicher Enzyme Linked Immunosorbent Assays (ELISA) einfach bestimmen (Kitchens and Thompson 2005) (Diacclone, Besançon, France; Hycult, PB Uden, The Netherlands).

Die dauerhafte Immunaktivierung beschleunigt zum Einen die Vermehrung von HIV, dessen Replikation nur in aktivierten CD4+ T-Lymphozyten erfolgreich ablaufen kann (Zack, Arrigo et al. 1990), und zum Anderen führt sie zu einem größeren „turnover“, einer gesteigerten Proliferationsrate der CD4+ T-Lymphozyten und erhöhter Apoptoserate (Massanella, Negro et al. 2010). Vormalig naive oder Memory CD4+ T-Lymphozyten werden zu aktivierten Effektor CD4+ T-Lymphozyten, deren Lebenszeit erheblich reduziert ist (Douek, Picker et al. 2003). Die Aktivierung der CD8+ T-Lymphozyten hat ebenfalls einen gesteigerten „turn over“ zur Folge (Sachsenberg, Perelson et al. 1998; Mohri, Perelson et al. 2001). Außerdem ist ein Verlust der Effektorfunktion der CD8+ T-Lymphozyten beschrieben worden (Kostense, Ogg et al. 2001; Lozano, De la Rosa et al. 2007). Eine solche Dysfunktion der zytotoxischen CD8+ T-Lymphozyten kann vermehrt mit der Expression eines Oberflächenmoleküls PD-1 („programmed death-1“) in Verbindung gebracht werden, deren Wechselwirkung mit dem PD-1 Liganden die Apoptose einleitet (Freeman, Wherry et al. 2006).

Eine Rolle von regulatorischen CD4+ T-Lymphozyten (Treg) in diesem Regelkreis wird ebenfalls diskutiert (Eggena, Barugahare et al. 2005). Es wurde beobachtet, dass in

Patientenkollektiven mit hoher generalisierter Immunaktivierung und schnellem progredienten Krankheitsverlauf, so genannte „fast progressors“, der Anteil der regulatorischen T-Zellen höher ist, als in sogenannten „slow-Progressors“ mit niedriger generalisierter Immunaktivierung. Dies könnte bedeuten, dass auch die Aktivität der Tregs durch die allgemeine Erhöhung der Aktivierung gesteigert wird und dieses könnte die beobachtete Dysfunktionen der Effektorzellen erklären (Cao, Jamieson et al. 2009). Der Zusammenhang zwischen der Infizierbarkeit von T-Zellen mit HIV und der Immunaktivierung könnte sich auf die Epidemiologie der Infektion auswirken. Es wurde *in vitro* gezeigt, dass nach einer Immunisierung mit Tetanus Toxoid und anschließender Immunaktivierung durch Präsentation des Tetanus Toxins, hundertfach weniger HIV benötigt wird, um CD4+ T-Lymphozyten zu infizieren, als vor einer Immunisierung (Weissman, Barker et al. 1996). Gerade in Ländern mit einer hohen Parasitämie und einer daraus resultierenden hohen Immunaktivierung könnte das bedeuten, dass das Risiko der HIV-Infektion nach Exposition steigt. Die bei HIV-Patienten beobachtete chronische Immunaktivierung steht nicht nur mit der Progredienz der HIV-Immundefizienz in Zusammenhang, sondern korreliert auch mit dem Auftreten von neurologischen Dysfunktionen im Rahmen der HIV Infektion (Ryan, Zheng et al. 2001; Gonzalez-Scarano and Martin-Garcia 2005; Meisner, Neuen-Jacob et al. 2008).

In der Regel geht die chronische Immunaktivierung unter ART auf Normalwerte zurück (Piconi, Trabattoni et al. 2010). Bei einigen Patienten beobachtet man jedoch trotz guter Virussuppression eine fortbestehende Immunaktivierung (Ostrowski, Katzenstein et al. 2005). Die Persistenz der chronischen Immunaktivierung unter ART korreliert mit mangelnder Immunrekonstitution (Aiuti and Mezzaroma 2006).

1.5.1 Die Behandlung von HIV infizierten Patienten mit Glukokortikoiden (Prednisolon) zur Reduktion der Immunaktivierung

Wenn die chronische Immunaktivierung ein kausaler Faktor der AIDS-Progression ist, sollten immunmodulatorische Substanzen, die in der Lage sind die Immunaktivierung zu senken, Einfluss auf die Krankheitsprogression haben. In einer prospektiven, aber nicht Placebo kontrollierten, klinischen Studie ist beobachtet worden, dass der Einsatz von Glukokortikoiden (0,3 -0,5 mg/kg Prednisolon) in HIV infizierten Patienten mit einer CD4+ T-Lymphozytenzahl von mehr als 200 Zellen/ μ l zu einer Regeneration der CD4+T-Lymphozyten Zahl (Anstieg um 119 Zellen/ μ l in einem Jahr) führt und sich damit die Latenzzeit der Erkrankung bis zum Auftreten der ersten AIDS Symptomatik verlängern lässt. (Andrieu, Lu 1995; 2004). Hierbei könnte die immunsupprimierende und antientzündliche

Wirkung der Glukokortikoide der chronischen Immunaktivierung entgegenwirken und somit deren destruktive Folgen dämpfen. Der Einsatz von Prednisolon-Dosierungen über 7,5 mg/Tag kann jedoch zu einer Akkumulation von Prednisolon im Körper führen und somit zu zahlreichen Nebenwirkungen wie z.B. Ödemen, Diabetes, Hypertonie oder Osteoporose (Kaiser 1997), daher sind diese hohen Dosierungen für den Einsatz über einen längeren Zeitraum an Patienten problematisch.

Im Rahmen einer nicht prospektiven und nicht randomisierten Kohorten-Studie wurde ein vergleichbarer CD4+T-Lymphozyten-stabilisierender Effekt mit einer Dosis von täglich nur 5 mg Prednisolon nachgewiesen (Ulmer, Muller et al. 2005; Ulmer, Muller et al. 2005). Diese Dosierung ist aus der Asthmatherapie als praktisch nebenwirkungsfrei bekannt, selbst bei jahrelangem Einsatz. Nach 2 Jahren Behandlung mit 5 mg Prednisolon wurden in 28 von 65 Patienten ein durchschnittlicher Zuwachs von 67,9 CD4+ T-Lymphozyten/ μ l im Vergleich zu einem Verlust von 108,2 CD4+ T-Lymphozyten/ μ l in 62 von 136 Kontrollpatienten gemessen ($p = 0,0009$) (s. Abb. 11). Ebenso konnte das Fortschreiten der Erkrankung verlangsamt werden. So waren nach zwei Jahren 62,5 % der mit 5mg Prednisolon therapierten Patienten progredient im Gegensatz zu 79,1 % der Patienten ohne Therapie (s. Abb. 12). Bisher lagen jedoch noch keine Daten aus placebokontrollierten Studien über die Sicherheit und Effektivität dieser Therapie bei HIV infizierten Patienten vor.

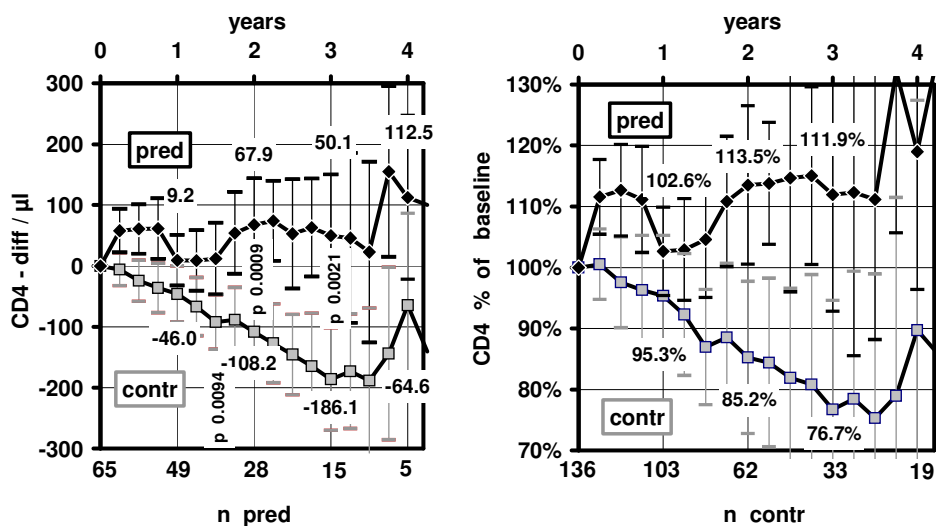


Abb. 11: Absolute und relative CD4+ T-Lymphozyten Differenz mit und ohne 5 mg Prednisolon Gabe in ART unbehandelten Patienten. (Ulmer, Muller et al. 2005).

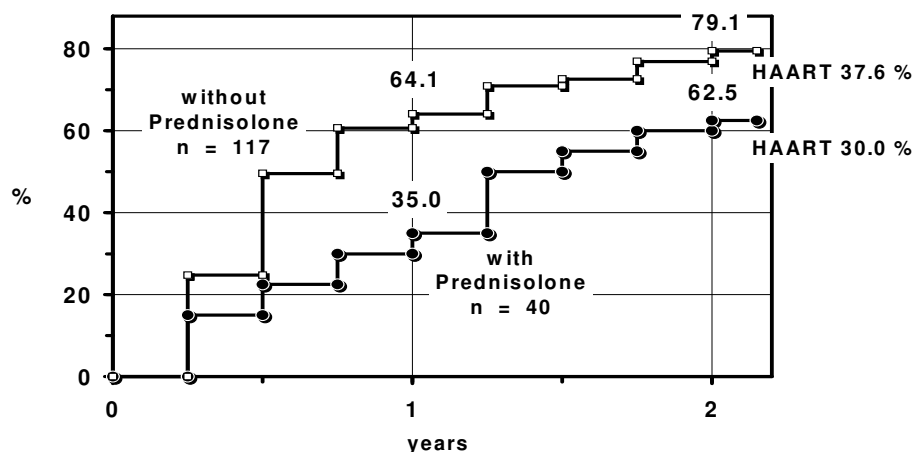


Abb.12: Progression von ART-unbehandelten Patienten mit und ohne Therapie mit 5 mg Prednisolon.

Die Progression wurde definiert als erstmaliger CD4+ T-Zell Verlust von mehr als 100/ μ l gegenüber Baseline oder ART Behandlung aufgrund klinischer Symptomatik (Ulmer, Muller et al. 2005)

Der Nachweis, dass die niedrig dosierte (5mg) Prednisolontherapie geeignet ist, die Immunaktivierung zu reduzieren, wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit erbracht (Kasang, Ulmer et al. 2012). Desweiteren wurde eine doppelblinde randomisierte Studie in Tansania durchgeführt, um die Sicherheit und Effektivität dieser Therapie in Ländern mit begrenzten Ressourcen zu überprüfen (Kasang and Kalluvya 2013).

1.6 HIV Therapie und Resistenzentwicklung unter Antiretroviraler Therapie

Die antiretrovirale HIV Therapie hat sich in den letzten zwei Jahrzehnten zu einer Erfolgsgeschichte entwickelt. Die Diagnose einer HIV Infektion in Deutschland und anderen Industrieländern bedeutet heutzutage keine Verkürzung der Lebenserwartung mehr (Hogg 2008; van Sighem, Gras et al. 2010; Vogel, Schwarze-Zander et al. 2010). Auch in Ländern Afrikas hat die Einführung der antiretroviralen Therapie zu einer Reduktion der durch HIV/AIDS bedingten Mortalität geführt. So fiel z.B. die AIDS bedingte Mortalität in Malawi von 6.4 pro 1000 Personenjahre in der Zeit kurz vor ART Einführung (August 2002-Juni 2005) auf 2.7 pro 1000 Personenjahre nach erfolgreicher Einführung (Oktober 2006-September 2008) (Floyd, Molesworth et al. 2010). Ende 2010 wurden 6,6 Millionen Menschen in Ländern mit begrenzten Ressourcen mit antiretroviralen Medikamenten therapiert (El-Sadr, Holmes et al. 2012), das sind in Afrika 49 % und in Süd-Ost Asien 43% derjenigen, die eine Therapie benötigen. Etabliert hat sich eine Kombinationstherapie aus drei

verschiedenen Medikamenten, die ART oder auch hoch aktive antiretrovirale Therapie (HAART) bezeichnet wird. Diese Kombinationstherapie ist notwendig, da es bei Mono- oder Duo-Therapien schnell zur Resistenzentwicklung kommt (Lange 1997). Es sind 23 (Stand März 2011) verschiedene Substanzen zugelassen, darüber hinaus einige Kombinationspräparate. Die Medikamente werden in fünf verschiedene Substanzklassen eingeteilt und greifen in unterschiedlichen Schritten des viralen Replikationszyklus ein.

1. Nukleos(t)idische Reverse-Transkriptase-Inhibitoren (NRTIs)
2. Nicht-nukleosidische Reverse-Transkriptase-Inhibitoren (NNRTIs)
3. Protease-Inhibitoren (PIs)
4. Entry-Inhibitoren (Korezeptorantagonisten und Fusionsinhibitoren)
5. Integrase-Inhibitoren.

In der Tabelle 3 sind Informationen über die Markennamen, die Wirkstoffe, die Klassenzugehörigkeit und die Therapiekosten zusammengefasst.

1.6.1 Nukleos(t)idische Reverse-Transkriptase-Inhibitoren (NRTIs)

Die Substanzklasse der Nukleos(t)id Reverse Transkriptase Hemmer ist die älteste Medikamentenklasse, die zur Therapie gegen HIV zur Verfügung steht. Diese Medikamente hemmen kompetitiv den Replikationsschritt der Reversen Transkriptase (RT), indem Nukleos(t)idanaloga bei der Synthese der viralen cDNA mit den zelleigenen Nukleotiden konkurrieren. Durch Einbau dieser Analoga kommt es zu einem Abbruch der cDNA-Strangsynthese, da diese Substanzen über keine freie 3'-Hydroxylgruppe verfügen und somit die Bildung einer Phosphodiesterbindung nicht möglich ist (Fischl, Richman et al. 1987). NRTIs müssen vor dem Einbau durch zelleigene Kinasen in Nukleosid-Triphosphate umgewandelt werden (auch die Nukleotidanaloga sind lediglich Monophosphate). Aufgrund dieses notwendigen intrazellulären Phosphorylierungsschrittes ist es nicht möglich, durch einen Nachweis der NRTI-Medikamentenkonzentration im Blutplasma Rückschlüsse auf eine optimale Medikamentenkonzentration in der Zelle zu ziehen. Damit ist ein therapeutisches Drug Monitoring (TDM) für NRTIs nicht sinnvoll (Pretorius, Klinker et al. 2011). Eine Problematik in der Gabe von NRTIs ist die Entwicklung von Langzeitnebenwirkungen wie z.B. Übelkeit, Anämie, Leukopenie, Polyneuropathie, Lipatrophie (Mallal, John et al. 2000; Galli, Ridolfo et al. 2002). Bei NRTI Monotherapie kann es zu einer Resistenzentwicklung kommen. So bewirkt bei Therapie mit Lamivudin oder Emtricitabin bereits eine Punktmutation M184V im HIV Genom (Eron, Benoit et al. 1995) und bei Tenofovir die Mutation K65R (Clavel and Hance 2004), dass HIV gegen die Substanz unempfindlich wird. Bei den anderen NRTI sind zwar mehrere Mutationen notwendig, es bestehen aber auch hier

unterschiedlich starke Kreuzresistenzen. Die NRTIs waren lange weltweit das Rückgrat der HIV Therapie. In Ländern mit begrenzten Ressourcen sind sie aufgrund der im Verhältnis geringeren Medikamentenkosten immer noch in der First-Line Therapie (s. Kap. 1.7) von Bedeutung.

1.6.2 Nicht-Nukleosidische Reverse-Transkriptase-Inhibitoren (NNRTIs)

Die NNRTI greifen ebenfalls an der reversen Transkriptase in den Replikationszyklus von HIV ein. Sie binden nahe der Nukleotidbindungsstelle und bewirken durch eine Konformationsänderung der reversen Transkriptase eine allosterische Hemmung (Havlir, Cheeseman et al. 1995). Die Substanzen wirken direkt und müssen nicht intrazellulär weiter verarbeitet werden. Daher ist es gut möglich, optimale Wirkspiegel über die Konzentration der NNRTI im Plasma mit Hilfe von TDM zu bestimmen. Nevirapin (NVP) und Efavirenz (EFV) werden als Vertreter der NNRTI auch heute noch in der First-Line Therapie in Ländern mit begrenzten Ressourcen eingesetzt. Die Plasmahalbwertszeit ist mit 25-30 h für NVP (Merry, Barry et al. 1998) und bis zu 48 h für EFV (Ribaldo, Haas et al. 2006) relativ lang. Diese lange Halbwertszeit hat es ermöglicht, Nevirapin als Übertragungshemmer von HIV durch einmalige Gabe bei der Geburt eines Kindes einzusetzen (PMTCT) (Cunningham, Chaix et al. 2002; Johnson, Li et al. 2005). Diese Form der PMTCT wurde in Ländern mit begrenzten Ressourcen viele Jahre durchgeführt. Allerdings lässt die Problematik der Resistenzbildung diese Praxis heute als fragwürdig erscheinen (Arrive, Newell et al. 2007) und die PMTCT wurde in den letzten Jahren durch Gabe von Kombinationstherapien über ca. 3 Monate grundlegend modifiziert. Die werdenden Mütter bekommen nun wenn möglich eine Kombinationstherapie aus Zidovudine (AZT), Lamivudin (3TC) und Nevirapin (NVP) (Bedri, Gudetta et al. 2008). Die Problematik der Resistenzbildung ist beim Einsatz von NNRTIs besonders hoch, da beim Absetzen eines NNRTI-haltigen Therapieregimes aufgrund der vergleichsweise langen Halbwertszeit der NNRTIs (1-2 Tage gegenüber 3-12 Stunden bei NRTIs) die Gefahr der Resistenzselektion gegenüber der NNRTI-Komponente besteht. Es ist daher sinnvoll, die Einnahme der anderen Komponenten erst eine Woche nach dem Absetzen des NNRTIs zu beenden oder die NNRTI-Komponente vor dem Absetzen der HAART durch einen anderen Therapiebaustein zu ersetzen (DAIG 2005). Bereits einzelne Punktmutationen, z.B. an der Position 103 (K103N), reichen aus, um eine Resistenz gegen die gesamte Medikamentenklasse auszulösen.

1.6.3 Proteaseinhibitoren (PIs)

Proteaseinhibitoren (PI) greifen zu einem späteren Zeitpunkt der viralen Replikation ein. Zur Herstellung von infektiösen Viruspartikeln ist es notwendig, dass die entstandenen Polyproteine (gag-pol) in ihre Untereinheiten gespaltet werden. Dafür bringt das Virus seine eigene Protease mit. PI binden in dem aktiven Zentrum der Protease und blockieren somit deren Aktivität. Proteasehemmer haben ein ausgeprägtes Langzeitnebenwirkungsprofil. Besonders die bekannte Lipodystrophie (Abbau des Unterhautfettgewebes) macht ihren Einsatz mitunter schwierig. PI sind jedoch immer noch sowohl in Industrieländern als auch in Ländern mit begrenzten Ressourcen (als Second-Line Therapie) eine wichtige Therapieoption (Humphreys, Hernandez et al. 2007). Der Plasmaspiegel kann mit Hilfe von TDM bestimmt werden (Pretorius, Klinker et al. 2011). Lopinavir ist der weltweit am häufigsten verwendete PI. Durch den Einsatz eines Boosters (Ritonavir), der als Inhibitor des gastrointestinalen und hepatischen Cytochrom P450 Enzymsystems den Katabolismus von vielen PIs herabsetzt, ist es gelungen, die Einnahmehäufigkeit der PI zu reduzieren (Kempf, Marsh et al. 1997; Hammer, Vaida et al. 2002).

1.6.4 Entry-Inhibitoren

Entry-Inhibitoren greifen bereits zu einem frühen Zeitpunkt in den Lebenszyklus des Virus ein. Unter dieser Wirkstoffklasse sind Medikamente zusammengefasst, die verhindern, dass das Virus in die Zielzelle gelangt. Hierbei wird entweder die Bindung des gp120 an CD4-Rezeptoren oder Co-Rezeptoren (CCR5, CXCR4) durch Antagonisten verhindert oder die Fusion von HIV mit der Zellmembran gehemmt. Als Co-Rezeptor-Antagonist ist bisher einzig der CCR5-Antagonist Maraviroc zugelassen (Fatkenheuer, Pozniak et al. 2005). Das Medikament ist noch sehr teuer und es ist für eine effiziente Therapie notwendig, vor der Therapie zu ermitteln, ob die Viren eines Patienten einen CCR5 Tropismus (s. Kap. 1.1.3.2) aufweisen. Daher ist Maraviroc bisher noch nicht für die Therapie von HIV in Ländern mit begrenzten Ressourcen möglich. Als Fusionsinhibitor ist das Medikament T20 zugelassen (Nelson, Arasteh et al. 2005). Es muss subkutan injiziert werden und führt bei fast allen Patienten zu lokalen Reaktionen an der Einstichstelle (Lalezari, Eron et al. 2003; Harris, Joy et al. 2006). Auch diese Substanz ist bisher noch nicht für den weltweiten Einsatz geeignet.

1.6.5 Integrase Inhibitoren (INIs)

Mit Hilfe von Integrase-Inhibitoren gelingt es, die Integration der HIV-cDNA in das Zellgenom zu hemmen und somit die folgende Virusreplikation zu verhindern. 2007 wurde das erste Medikament dieser Substanzklasse, das Raltegravir, zugelassen (Markowitz,

Morales-Ramirez et al. 2006). Die Zulassungsstudie BENCHMARK zeigte eine hohe Effektivität in Patienten mit einem optimalen Therapieschema. In 57% der Patientengruppe, die zusätzlich mit Raltegravir behandelt wurde, konnte nach 96 Wochen keine Viruslast mehr nachgewiesen werden (Plasma HIV-1 RNA <50 Kopien/mL) im Vergleich zu 26% der Gruppe mit ausschließlich optimaler Therapie und Placebo. Das Nebenwirkungsprofil war in beiden Gruppen gleich (Steigbigel, Cooper et al. 2010). Die Resistenzentwicklung unter Raltegravir zeigt das Vorliegen einer niedrigen genetischen Barriere. So wurden in vorbehandelten Patienten unter geboosterten PIs (Viruslast unter der Nachweisgrenze) bei Therapiewechsel auf Raltegravir vermehrt eine Virusreplikation bei bestehenden Resistenzen beschrieben (Eron, Benoit et al. 1995; Grinsztejn, Nguyen et al. 2007). Raltegravir ist für den weltweiten Einsatz noch zu teuer.

1.7 Die Antiretrovirale Therapie in Tansania

Seit 2004 sind in den „Care and Treatment Center“ in Tansania, unterstützt von Global Fund und PEPFAR, antiretrovirale Medikamente für die Patienten verfügbar (s. Kap.1.3.1). Bis zum Jahr 2010 wurden kumulativ in 825 Behandlungszentren 740 040 Patienten registriert. In den Jahren 2008-2010 wurden 355359 Erwachsene und 29457 Kinder, die weniger als 200 CD4+ T-Zellen pro μ l Blut hatten oder die AIDS-assoziierte Symptome entwickelten, mit antiretroviralen Medikamenten versorgt (TACAIDS 2012). Alle antiretroviralen Medikamente werden kostenlos an die HIV infizierte Bevölkerung abgegeben, ebenso wie die medizinische Standardbehandlung für die Patienten ebenfalls kostenfrei ist. Die Therapie besteht aus einer prädefinierten Kombination aus antiretroviralen Medikamenten (First-Line), die nach Ausbleiben einer klinischen Verbesserung des Patienten (erkennbar durch weiteres Absinken der CD4-Zellzahl oder dem Auftreten AIDS-assoziiierter Symptome) gegebenenfalls durch eine zweite Kombination von Medikamenten (Second Line) ersetzt werden kann (Somi, Matee et al. 2009; NACP 2012). Die First-Line Therapie setzt sich aus den Medikamenten Zidovudin/ Lamivudin (AZT/3TC) oder Stavudin/Lamivudine (d4T/3TC) zusammen, jeweils kombiniert mit Nevirapine (NVP) oder Efavirenz (EFV). Die Second-Line Therapie beinhaltet Abacavir/Didanosine (ABC/ddI) in Kombination mit Liponavir/Ritonavir oder Saquinavir/Ritonavir (LPV/r or SQV/r) (NACP 2008). Im Jahr 2010 hat die WHO für Ressourcen-schwache Länder die Einschlusskriterien für den Beginn der antiretroviralen Behandlung auf 350 CD4+ T-Lymphozyten/ μ l Blut angehoben, wenn zugleich die ersten AIDS assoziierten klinischen Symptome (entsprechend dem WHO Stage 2 (s. Tab. 1) auftreten. Bei WHO Stage 3 oder 4 soll sofort, unabhängig von den CD4+ T-Lymphozytenzahlen, mit ART begonnen werden (WHO 2010; NACP 2012). Doch trotz der

Veränderungen der Leitlinien in Ländern mit begrenzten Ressourcen entspricht diese Vorgehensweise noch nicht denen durch Studien belegten Therapieempfehlungen, zu noch früheren Zeitpunkten mit der ART zu beginnen. So wird in Deutschland mit ART immer bei weniger als 350 CD4+ T-Lymphozyten begonnen, bei einem CD4+T-Lymphozytenwert zwischen 350-500 Zellen/ μ l wird der Beginn der ART als vertretbar bzw. ratsam beschrieben und bei mehr als 500 Zellen/ μ l als vertretbar. Es kann also bereits zum Zeitpunkt der HIV Diagnose mit ART begonnen werden, wenn es nach Arzt und Patienteneinschätzung angebracht ist (DAIG 2012). Diese Empfehlungen sind auf Studien begründet, die eine Erhöhung der Progressionsrate und Mortalität bei zu spätem Beginn von ART nachgewiesen haben (Egger, May et al. 2002; Palella, Deloria-Knoll et al. 2003; Kitahata, Gange et al. 2009; Sterne, May et al. 2009). Eine Anpassung an die erweiterten Therapieempfehlungen ist z.B. für Tansania aus finanziellen und organisatorischen Gründen eine Herausforderung für das nationale Gesundheitssystem. So lag im Jahr 2009 die Versorgungsrate mit ART bei knapp über 40 % der eigentlich benötigten Menge (Hanson, Thorson et al. 2009). Engpässe in der Medikamentenversorgung und daraus resultierende eventuelle Therapieunterbrechungen können die Stabilisierung der CD4+ T-Lymphozytenzahl der Patienten gefährden und die Gefahr der Entwicklung opportunistischer Infektionen vergrößern (Kaufmann, Elzi et al. 2011), sowie zu Resistenzentstehung gegen antiretrovirale Medikamente führen (Sethi, Celentano et al. 2003). Eine weitere große Herausforderung besteht weiterhin in der fehlenden Infrastruktur der Laboruntersuchungen. So werden in Tansania bestenfalls regelmäßige CD4+ T-Lymphozyten Messungen erhoben; die Messung von Viruslast ist eingeschränkt verfügbar und Resistenztestungen fehlen gänzlich (persönliche Mitteilung von Dr. S. Kalluvya, Head of Department Internal Medicine, BMC).

1.8 Primäre Resistenz ART naiver Patienten durch Übertragung von resistenten Virusquasispezies mit ART behandelter Partner

Das Roll-out mit ART in afrikanischen Ländern (Gilks, Crowley et al. 2006) beinhaltet die Sorge um die Selektion medikamentenresistenter Virusstämme (Deeks 2008; WHO 2012). Diese Sorge wird dadurch noch verstärkt, dass die eingesetzten Medikamente zum Teil eine sehr geringe genetische Barriere besitzen und bereits Punktmutationen zu Resistenzen gegen gesamte Wirkstoffklassen führen können (s. Kap 1.6). Unter Selektionsdruck durch antiretrovirale Therapie entstandene Resistenzen können bei der Infektion übertragen werden, und, so sie Einzug in die Population der therapienaiven Patienten halten können, von vorherein eine Unwirksamkeit der First-Line Therapie bewirken. Von der WHO ist darum gefordert worden, in allen Ländern ein stichprobenbasiertes Überwachungsprogramm zur

HIV Medikamentenresistenz durchzuführen, bei dem die Prävalenz der Medikamentenresistenz in der therapie-naiven Bevölkerung in Form von Grenzwerten angegeben wird (transmitted HIVDR Threshold Survey) (Bennett, Bertagnolio et al. 2008). Für diese Stichproben waren nach den WHO-Empfehlungen des Jahres 2008 folgende Patienten geeignet: Patienten, die vorher keinerlei ART erhalten haben, unter 25 Jahren alt sind und noch nie schwanger waren (Bennett, Myatt et al. 2008). Außerdem sollen nach Möglichkeit nur solche Patienten eingeschlossen werden, die eine frisch-diagnostizierte HIV-Infektion haben, um die Möglichkeit einer bereits erfolgten ART-Exposition zu minimieren. Dadurch soll erreicht werden, dass möglichst nur übertragene (engl. *transmitted*), nicht aber durch Medikamentenexposition (z.B. durch PMTCT) erworbene Resistenzen detektiert werden (Bennett, Myatt et al. 2008). Es wurde festgelegt, dass wenn in weniger als 5% der therapie-naiven Patienten Medikamenten-Resistenzen nachgewiesen werden, keinerlei zusätzliche Aktivitäten seitens der WHO erfolgen sollen. Wird ein moderater Resistenzprozentsatz von 5-15% in Patienten nachgewiesen, sollen die Überwachungsuntersuchungen wiederholt und auf zusätzliche Regionen erweitert werden, ebenso sollen Faktoren in der Region untersucht werden, die zu dieser hohen Übertragung der Resistenzen beitragen können. Werden in mehr als 15% der therapie-naiven Patienten Resistenzen nachgewiesen, muss sofort eine landesweite Überwachungsuntersuchung eingeleitet werden, um Effektivität und eventuelle Veränderungen in der First- und Secondline Therapie zu identifizieren (Bennett, Bertagnolio et al. 2008; WHO 2012). Da frühes Versagen der ART im BMC beobachtet wurde, das vermutlich auf übertragene HIV Medikamenten-Resistenzen (HIVDR) zurückzuführen ist, wurden im Rahmen der ProCort Studie HIVDR-Bestimmungen in den Studienpatienten durchgeführt. Hierbei wurden jedoch nicht nur Proben jüngerer Patienten unter 25 Jahren untersucht, die den Überwachungskriterien der WHO entsprechen, sondern auch Patienten mit höherem Alter und bereits therapierten Partnern.

2 Material

2.1 Geräteliste

Gerät:	Hersteller:	Typenbezeichnung:
Agarosegel-Gießkammer	Institutswerkstatt	
Agarosegel-Laufkammer	Institutswerkstatt	
Biochemieanalyser (BMC)	Boehringer Ingelheim	Reflotron
Brutschrank	Hartenstein	Incubat
Durchflusszytometer (BMC)	Becton & Dickinson	FACScan (Tri immun)
Durchflusszytometer (BMC)	Becton & Dickinson	FACS Calibur
Durchflusszytometer	Becton & Dickinson	FACS Calibur
Eismaschine	Scotsman	AF-10
ELISA Reader	Tecan	
Gefrier- und Kühlschränke	Bosch	
Genetik Analyser	Applied Biosystems	3130
Geldokumentationsgerät	Intas	Gel Imager
Hematologieanalyser (BMC)	Sysmex	KX21
HPLC	Beckman-Coulter	508 System Gold
Lichtmikroskop	Leitz	Fluorover
Magnetrührer	Heidolph	
Mikroliterpipette	Gilson, Eppendorf	
Mikrowelle	Brother	Powerwave ER-200
Netzgerät	BioRad	3600 XI
Neubauer-Zählkammer	Marienfeld	
pH-Meter	Schott	
Photometer	Eppendorf	Biophotometer 6131
Pipettierhilfe (elektrisch)	Integra	
Schüttler für Reaktionsgefäße	Janke-Kunkel	Typ VX2E
Schüttler: Plattform	B. Braun	Certomat S2
Schüttler: Thermohaube	Sartorius	Certomat-H
Sterilwerkbank	Gelaire Flow Laboratories	BSB4A
Stickstoffbehälter		
Thermoblock	Hartenstein	TDB 120
Thermocycler	Perkin Elmer	Gene Amp 9600
Thermocycler	BioRad	MyCycler
Thermocycler	BioRad	MiniCycler PTC 1152
Thermocycler	Biometra	T3
Tischzentrifuge	Eppendorf	5417C
Tischzentrifuge	Hettich	Universal 320
Ultrazentrifuge	Sorvall	Evolution RC
Ultrazentrifuge	Hettich	Universal 16R
Ultrazentrifuge (BMC)	Hettich	Rotofix 32 A
Vortexer	Hartenstein	
Waage	ScaleTec	SBA 51
Wasserbad: Heizspirale	Hartenstein	Typ WTH500
Wasserbad: Wasserbecken	Institutswerkstatt	

2.2 Verbrauchsmaterialienliste

2.2.1 Glas

Material	Volumen, Ausmaße	Firma, Lieferant
Bechergläser	50ml,100ml,250ml,500ml,1L,2L	Schott
Erlenmeyerkolben	50ml,100ml,250ml,500ml,1L,2L	Schott
Kulturröhrchen	d: 16mm, h: 160mm	Schott
Messzylinder	50ml,100ml,250ml,1000ml	Schott
Objektgläser+träger	-	Marienfeld
Pipetten	1ml,2ml,5ml,10ml,25ml	Brand
Schraubverschlussflaschen	80ml,250ml,500ml,1000ml	Schott
Vacutainer® CPT™ mit Heparin	8ml	BD

2.2.2 Kunststoff

Material	Volumen, Ausmaße	Firma, Lieferant
Bechergläser	800ml, 1L, 2L, 5L	Brand
Schraubverschlussröhrchen	15ml, 50ml	Greiner
FACS-Röhrchen	5ml	Multimed
FACS-Röhrchen	5ml	BD
FACS-Trucount™ tubes	12 x 75-mm	BD
FACS-Röhrchen Deckel	12mm Ø	Hartenstein
Kryoröhrchen	1,5 ml	Nalgene
Messzylinder	50ml,10ml,250ml,500ml,1L,2L	Vitlab
Parafilm	k.A.	Roth
PCR-Reaktionsplatte	96-Vertiefungen	Peqlab
Pipetten	1ml, 2ml	Sarstedt
Pipetten	5ml, 10ml	Greiner
Pipettenspitzen	2-1000µl	Gilson
Pipettenspitzen mit Filter	2-1000µl	Peqlab
Reaktionsgefäße	0,2ml	BioRad
Reaktionsgefäße	1,5ml	Eppendorf, Sarstedt
Spritzen	2ml, 5ml, 10ml	Primo
Transformationsröhrchen	14ml	Falcon
UV-Küvette	50-2000µl	Eppendorf
Vacutainer-EDTA Röhrchen, lila, K ₂ EDTA 1,8mg/ml	4ml,	BD
Vacutainer-Gerinnungsröhrchen, rot,	4ml	BD
Urinbehälter	100 ml	Aktion medeor
Zentrifugenbecher	500ml	Nalgene

2.2.3 Sonstiges

Material	Verwendung	Firma, Lieferant
Cryo 1°C Freezing Container	Zellen auf -80°C einfrieren	Nalgene
Sterilfilter (Porengröße: 0,22µm)	Sterilfiltration	Millipore
Sterilfilter (Porengröße: 0,45µm)	Sterilfiltration	Schleicher & Schüll
Vacutainer safety lock Butterfly Nadel mit Halter 21 G, grün.	Blutabnahme	BD

2.3 Chemikalien

Substanz	Firma
Acrylamid/Bisacrylamid (30:0,8)	Roth
Agar	Sigma
Agarose	Eurogentec
7-Aminoactinomycin D (7-AAD)	Becton & Dickinson
Ampicillin	Gibco, BRL
β -Mercaptoethanol	Sigma
Bromphenolblau	Sigma
Bovines Serumalbumin (BSA)	Roth
Diatomeen-Erde	Sigma
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma
Dinatriumcarbonat	Merck
Dinatriumhydrogencarbonat	Merck
DNA –Probenpuffer (6x)	Fermentas
dNTPs	Fermentas
EDTA	Roth
Ethidiumbromid	Sigma
Fluorescein Calibration Dye	BioRad
Formaldehyd (37%ige wässrige Lösung)	Sigma
Glucose	Sigma
Glycerin	Roth
Guanidin (Thiocyanatsalz)	Roth
HEPES	Roth
Kaliumchlorid	Roth
LB Broth Base	Invitrogen
Magnesiumchlorid	Roth
Magnesiumsulfat	Roth
Methanol	Roth
Natriumazid	AppliChem
Natriumbutyrat	Roth
Natriumchlorid	Roth
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma
Natriumhydrogencarbonat	Roth
Natriumhydroxid	Roth
Natriumhydroxydplätzchen	Sigma
Dinatriumhydrogenphosphat	Roth
PEI (Polyethylenimin, linear 25kD)	Polyscience
Penicillin/Streptomycin	Gibco, BRL
Phenol –Chloroform -Isoamylalkohol	Appllichem
2-Propanol	Roth
Salzsäure	Merck
Saponin	Sigma
Tris	Roth
Trypanblau	Sigma
Tween-20	Sigma

2.4 Enzyme und Reaktionspuffer

2.4.1 Enzyme

Enzym	Firma
RevertAID H Minus M-MuLV Reverse Transkriptase	Fermentas
TaKaRa Ex Taq (5U/ μ l) Polymerase	Qiagen
RNase	Roche
T4-DNA-Ligase	Fermentas
Taq-DNA-Polymerase (Reaktionsmix)	Peqlab, peqGOLD PCR-Master-Mix S

2.4.2 Reaktionspuffer vorgefertigt

Puffer	Firma
Cobas Amplicor HIV-1 Monitor specimen diluent	Roche
Cobas Amplicor HIV-1 Monitor Lysis Reagenz	Roche
TaKaRa ex Taq Puffer	Qiagen
FACS-Lysing-Solution	BD

2.4.3 Puffer und Lösungen selbst gemischt

Lösung/Puffer	Zusammensetzung
FACS-Färbung-Puffer (FM)	<ul style="list-style-type: none">• 0,1 % BSA (v/v)• 0,1 % Natriumazid (w/v)• in PBS
FACS-Färbung-Intrazellulär-Puffer (Saponin)	<ul style="list-style-type: none">• 0,1 % BSA (v/v)• 0,1 % Natriumazid (w/v)• 0,5 % Saponin (w/v)• in PBS
FACS-Färbung-Intrazellulär-Puffer (Tween-20)	<ul style="list-style-type: none">• 0,1 % BSA (v/v)• 0,1 % Natriumazid (w/v)• 0,2 % Tween /w/v)• in PBS
Paraformaldehydlösung 4%	<ul style="list-style-type: none">• 11 ml Formaldehydlösung (37%)• 89 ml PBS
Phosphate Buffered Saline (PBS)	<ul style="list-style-type: none">• 137mM NaCl• 2,7mM KCl• 4,3mM Na₂HPO₄• 1,4mM KH₂PO₄• 1,5mM CaCl₂• 1,0mM MgCl₂
Phosphate Buffered Saline (PBS) -MgCl ₂ -CaCl ₂	<ul style="list-style-type: none">• 137mM NaCl• 2,7mM KCl• 4,3mM Na₂HPO₄• 1,4mM KH₂PO₄

2.5 Kits

Kit

BigDye™ Terminator 1.1

Cytofix/Cytoperm Fixation/Permeabilization Kit (Ki-67)

FoxP3 Staining Buffer Set

GenElute™ Gel Extraction

GenElute™ PCR Clean-Up

LBP Elisa Kit

NucleoBond PC 500

PCR-Purification Kit

QIAamp DNA Micro Kit

sCD14 Elisa Kit

sCD40 Elisa Kit

suPAR Elisa Kit

Firma

Biosystems

BD Biosciences

eBioscience

Sigma Aldrich

Sigma Aldrich

Hycult Biotech

Macherey Nagel

Qiagen

Qiagen

Diaclone

Bender MedSystems

Virogates

2.6 Größenstandards

Substanz

FastRuler™ DNA Ladder, Middle Range

Firma

Fermentas

2.7 Zellmedien

Medium

Fetales Kälberserum

Zusammensetzung

RPMI R10

- 0,5 ml Penicillin/Streptomycin
 - 3,5 ml Glutamin
- in 500 ml RPMI 1640 (Rosswell Park Memorial Institute Medium) (Invitrogen)

RPMI R0 Medium

- 0,5 ml Penicillin/Streptomycin
- 3,5 ml Glutamin
- in RPMI 1640 (Rosswell Park Memorial Institute Medium) (Invitrogen)

2.8 Antikörper

Die folgenden Antikörper wurden in Verbindung mit der FACS-Färbung von Blutzellen (Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs)) verwendet.

Antikörper

Ki-67

Konjugierter Farbstoff

PE

Firma

BD Biosciences

CD4	PerCP Cy5.5	BD Biosciences
CD8	PerCP	BD Biosciences
CD45RA	APC	BD Biosciences
CD3	FITC	BD Biosciences
CD25	FITC	BD Biosciences
CD62L	FITC	BD Biosciences
CD45RO	APC	BD Biosciences
FoxP3	PE	BD Biosciences
IgG1 κ Isotyp Kontrolle	PE	BD Biosciences
Multitest BD		
CD3	FITC	BD
CD45	PerCP	BD
CD4	APC	BD
CD8	PE	BD
Tritest BD		
CD4	PE	BD
CD3	FITC	BD
CD45	Per-CP	BD

2.9 Primer und Oligonukleotide

Die für die HIV-1 Viruslastbestimmung und Sequenzierung der PR und RT Region verwendeten Primer wurden zuvor in (Plantier, Dachraoui et al. 2005) beschrieben. Alle Primer wurden bei der Firma Sigma Aldrich (www.sigma.com) bestellt und mit dH₂O auf die gewünschte Konzentration eingestellt. Oligonukleotide

Primernamen	Sequenz (5' - 3')
HIR1	CACTAGAAGA AATGATGACA GCATGTCAG
HIR2	CCTGCCCTGT TTCTGCTGGA ATAACT
HIR3	AAATTGCAGG GCCCCTAGGA AAAAGGG
HIR4	TGCCATATTC CTGGACTACA GTCTACTT
Sequenzier-Primer:	
HI-A	GAGCCAACAGCCCCACC
HI-B	CAATGGCCATTGACAGAAG
HI-C	GGATCACCAGCAATATTCCA
HI-F	TGGGCCATCCATTCCTGGCTT
HI-G	CATCCCTGTGGAAGCACATT
HI-H	TCTGCTATTAAGTCTTTTGAT
HI-3532a	TTCTGCTATTAAGTCTTTTGATGGGTCA

2.10 Computerprogramme und Internetseiten

Programm	Firma
Adobe Photoshop 7.0	Adobe Systems Inc.
Cell Quest Pro 3	Becton&Dickinson
Entrez PubMed	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/
Endnote 5.0	ResearchSoft
FlowJo Software	Tree Star Inc.
GraphPad Prism 4.00	© 1992-2003 GraphPad Software, Inc.
iCycler iQ Software	BioRad
Lasergene Seqman	DNASTAR Inc.
MegAlign Version 7	DNASTAR Inc.
Microsoft Access Database	Microsoft
Microsoft Office 2007	Microsoft
NCBI-Blast	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/mmtrace
Stanford University Drug Resistance Database.	http://hivdb.stanford.edu/
Los Alamos HIV Database	http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/mainpage.html

3 Methoden

3.1 Studienort Tansania

3.1.1 Mwanza

Mwanza ist mit über 800 000 Einwohnern die zweitgrößte Stadt Tansanias ganz im Norden Tansanias direkt am Viktoriasee. Seine besondere Nähe der Grenze zu Kenia, Uganda und Ruanda macht Mwanza zu einem Schmelztiegel verschiedener Landsleute. Migration ist ein großes Thema aufgrund politischer Unruhen in Uganda, Ruanda und zuletzt auch in Kenia und führt unter anderem dazu, dass die HIV Prävalenz in einigen Bereichen der Viktoriaseeregion überproportional hoch ist.

3.1.2 Das Bugando Medical Centre als Studienort

Die Patienten der klinischen Studie ProCort1 wurden im Bugando Medical Centre (BMC) in Mwanza rekrutiert. Das BMC ist ein von der katholischen Kirche geführtes „Referral Hospital“ mit 850 Betten und einer angeschlossenen medizinischen Universität in der Viktoriasee-Region und hat einen Einzugsbereich von ca. 13 Mio. Menschen. Zu diesem Krankenhaus besteht eine langjährige Partnerschaft vom Missionsärztlichen Institut Würzburg. Als das Roll-out Programm für antiretrovirale Therapie 2004 in Tansania etabliert wurde entstand hier ein „Center for Treatment and Care“ (CTC) für HIV infizierte Patienten. Im Rahmen der Patientenbetreuung wurde neben HIV Testung, Counselling und Behandlung auch ein Monitoring Programm für Patienten entwickelt, die noch nicht ART pflichtig sind. Hierbei werden diese Patienten halbjährlich zu einer Untersuchung eingeladen, die eine CD4+ T-Lymphozyten Messung und klinische Untersuchung einschließt, um den richtigen Zeitpunkt zum Beginn mit ART festzulegen.

3.1.3 Die ProCort Studie und das tansanische Patientenkollektiv

Die ProCort Studie (Progression of HIV disease under low dose Prednisolon Therapy) wurde 2007 als eine doppelblinde randomisierte klinische Studie konzipiert und nach Good Clinical Practice (GCP) Kriterien durchgeführt (s. Prüfplan im Anhang). Es wurden Ethikvoten sowohl von der Ethikkommission der Universität CUHAS (Catholic University of Health and Allied Sciences, Bugando, Mwanza, Tanzania) und der Nationalen Ethikkommission Tansania eingeholt (s. Anhang). Desweiteren wurde eine Genehmigung der TFDA (Tansanian Food and Drug administration) in Mwanza eingeholt.

Die Studie ist bei ClinicalTrials.gov unter der Nummer NCT01299948 registriert. In die Studie wurden Patienten der CTC Klinik des BMC eingeschlossen die HIV positiv waren,

noch nie ART bekommen hatten und deren CD4+ T-Lymphozyten Wert mindestens 300 Zellen pro μl betrug. Die ersten Patienten wurden im Juni 2007 in die Studie aufgenommen. Jeder Patient wurde über zwei Jahre im Rahmen der Studie entweder mit 5mg Prednisolon oder mit einem Placebo gleichen Aussehens behandelt. Nach dem Screening von 406 Patienten konnten bis März 2009 insgesamt 326 Patienten in die Studie eingeschlossen werden. In einer „Intent to Treat“ (ITT) Analyse wurden alle Ergebnisse der 326 Patienten ausgewertet, daneben wurde im Rahmen einer post hoc Analyse eine „per Protokoll“ (PP) Auswahl an Studienpatienten definiert, die den Protokollvorgaben entsprachen und in jeder drei Monatskontrolle mindestens 75% der Medikamenteneinnahme nachweisen konnten. Im Rahmen der Studie wurden jeweils 14 Visiten pro Patient durchgeführt, zu denen Daten zum Zeitpunkt der Diagnose der Infektion, Stadium der Erkrankung, WHO Status, Größe, Gewicht, Laborparameter (Hämatologie, Biochemie, CD4+ Zellzahl, CD8+ Zellzahl), Schwangerschaft, Tuberkulose, Begleiterkrankungen, Begleitmedikationen, unerwünschte Ereignisse und eine kurze Lebensqualitätserhebung erfasst wurden (siehe Abb. 13: Studien Flow chart). Hierfür wurde ein Patientenfragebogen konzipiert, der visitenweise ausgefüllt wurde. Diese Daten wurden in eine eigens hierfür erstellte Access Datenbank eingetragen. Hierbei wurde zur Sicherung der Datenqualität zwei zeitlich unabhängige Eintragungen unternommen und diese dann miteinander verglichen. Ebenso wurde ein Plausibilitätscheck der Daten durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte mit SPSS und PRISM.

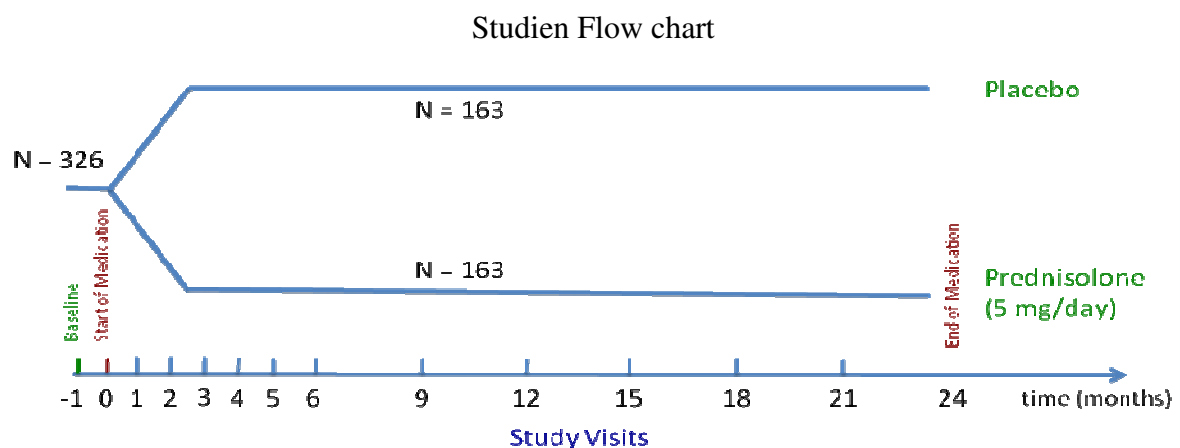


Abb. 13: Studien Flow chart
Zeitlicher Ablauf der ProCort Studie.

3.2 Studienort Deutschland

3.2.1 Deutsche Studienpatienten der Schwerpunktpraxis HIV in Stuttgart

Das Patientenkollektiv (101 Patienten) der deutschen Kohortenanalyse waren Patienten, die in der Schwerpunktpraxis von Dr. Albrecht Ulmer in Stuttgart behandelt wurden. Dieses Patientenkollektiv wurde bereits in einer Veröffentlichung (Ulmer, Muller et al. 2005) beschrieben. Es bestand aus vier verschiedenen Patientengruppen, die entweder unbehandelt blieben, oder jeweils ART oder Prednisolon allein erhielten, oder eine Kombination mit Prednisolon und ART als Therapie bekamen. Die Patienten mit ART wurden nach den Richtlinien der Deutschen AIDS Gesellschaft (DAIG 2012) behandelt.

3.3 Blutentnahme

3.3.1 Durchführung in Tansania

Bei allen 326 tansanischen Studienteilnehmern wurden auf 14 Visiten verteilt über 2 Jahre 8 ml Vollblut (4ml EDTA, 4ml ohne Antikoagulantia) zur hämatologischen und biochemischen Untersuchung und zur Gewinnung von EDTA-Plasma abgenommen. Zusätzlich wurden zu den Zeitpunkten Baseline, Monat 3, Monat 6 und Monat 12 jeweils 8 ml Vollblut in Cell Preparation Tubes zur Gewinnung von mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC, Peripheral Blood Mononuclear Cells) und Heparin-Plasma abgenommen.

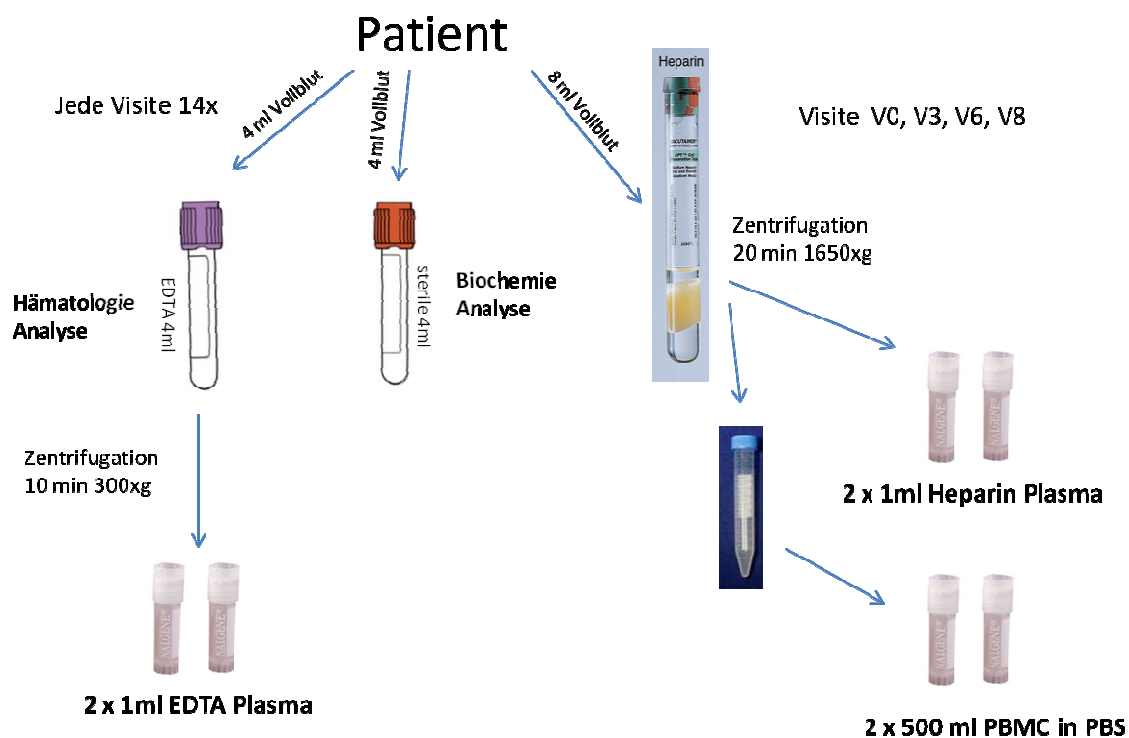


Abb. 14: Blutentnahme "Flowchart" für ProCort Studie.

3.3.2 Durchführung in Deutschland

Die Blutentnahme bei den deutschen Patienten erfolgte einmalig bei einer normalen Routineuntersuchung. Insgesamt wurden 16 ml Vollblut abgenommen, davon 8 ml in Cell Preparation Tube (CPT) Röhren und jeweils 4 ml mit EDTA und 4 ml ohne Antikoagulantia.

3.4 Isolierung und Konservierung von PBMCs aus Vollblut

3.4.1 Vacutainer

Für die Isolierung von PBMC wurden 8 ml Vollblut mit einem speziellen Vacutainersystem CPT von Becton Dickinson (BD) abgenommen. In diesen Röhren ist eine künstliche Polysaccharidschicht als Separationsgel eingefügt, die aufgrund der unterschiedlichen Schwebedichte der verschiedenen Zelltypen diese während der Zentrifugation separiert. Nach der Blutabnahme wurde das CPT 20 Minuten bei 1650 xg zentrifugiert. Hierbei wurden die mononukleären Zellen (Lymphozyten/Monozyten) von den restlichen Blutzellen wie z.B. Granulozyten oder Erythrozyten abgetrennt (s. Abb. 15). Die Monozyten und Lymphozyten verbleiben oberhalb des Separationsgels wie in einer Wolke, darüber befindet sich die Phase des überständigen Blutplasmas, welches zur Verhinderung der Agglutination mit Heparin versetzt ist, während die Granulozyten und Erythrozyten durch das Separationsgel wandern.

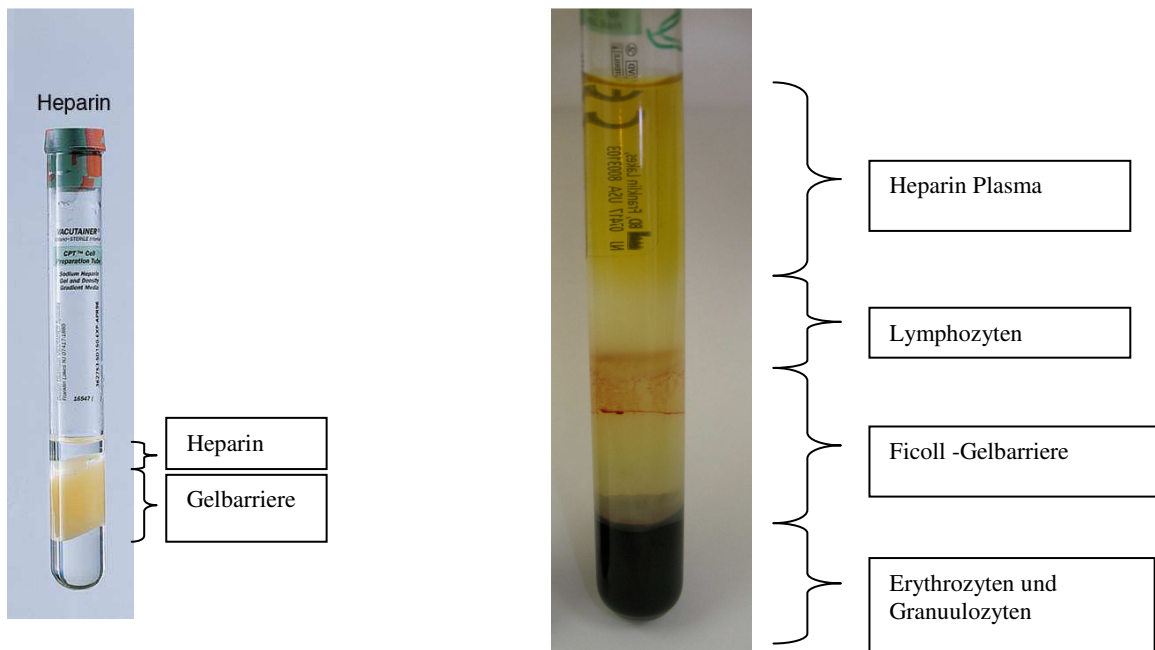


Abb. 15a: CPT vor Blutabnahme

Abb. 15b: CPT nach 8ml Blutabnahme und 20 Minuten Zentrifugation bei 1650 xg

Abb. 15: a. + b Isolierung von PBMCs mithilfe von Zell-Präparations Röhren (CPT). Durch den enthaltenen FICOLL-Gradienten werden die verschiedenen Blutzellen ihrer Dichte entsprechend durch die Zentrifugation voneinander abgetrennt. Die weniger dichten Blutzellen (Lymphozyten und Monozyten) sammeln sich oberhalb des künstlichen Polysaccharids (FICOLL) zusammen mit dem Blutplasma.

Es wurden vorsichtig, ohne Verwirbelung der Lymphozytenwolke, mit einer Pipette zweimal 1 ml des Heparin-Plasmas abgenommen und in zwei Kryoröhrchen überführt. Danach wurden die Lymphozyten und Monozyten durch Schwenken im restlichen Blutplasma suspendiert und in ein 15 ml-Schraubverschlussröhrchen (Falcon) pipettiert. Es wurden 4 ml PBS (-CaCl₂, -MgCl₂) hinzugegeben und für 15 Minuten bei 300 xg zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes und Resuspendierung des Zellpellets wurde ein weiterer Waschschrift mit 8 ml PBS (-CaCl₂, -MgCl₂) und folgender Zentrifugation bei 300 xg für 10 Minuten durchgeführt. Der verbleibende Überstand wurde vorsichtig abgenommen und die PBMC in ca. 500 ml RPMI-R0 gelöst.

3.4.2 Kryokonservierung

Die isolierten PBMCs (3.4.1) wurden in 500 µl RPMI-R0 resuspendiert zu einer Lösung aus 20% DMSO (v/v) in FCS mit dem Volumen von 500 µl hinzugefügt. Die PBMCs wurden in der so hergestellten Lösung (10% DMSO/ 40% FCS/ 50% RPMI-R0) von 1 ml in Kryoröhrchen überführt. Diese wurden unverzüglich in einen Cryo 1°C Freezing Container gegeben und bei -70°C über Nacht langsam eingefroren, um die Zellschäden durch das Einfrieren möglichst gering zu halten.

3.4.3 Transport der PBMC und Langzeitkryokonservierung

Die in Tansania bei -70°C kryokonservierten PBMC wurden halbjährlich auf Trockeneis per Flugzeug nach Deutschland transportiert. Ein elektronisches Temperaturlog wurde zur Überwachung der Temperatur beigefügt. Um eine stabile Langzeitlagerung der PBMC in Deutschland zu gewährleisten wurden sie hier unverzüglich in flüssigen Stickstoff überführt und somit bei -196°C gelagert.

3.4.4 Auftauen eukaryotischer Zellen

Die eingefrorenen Zellen (PBMCs) wurden unmittelbar nach dem Auftauvorgang im warmen Wasserbad für 2-3 Minuten in ein 15 ml Schraubverschlussröhrchen überführt, das 8 ml PBS (-CaCl₂, -MgCl₂) enthielt und dann für 10 min bei 300 xg zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand dekantiert, um das zellschädigende DMSO aus der Zelllösung zu entfernen. Das Zellpellet wurde durch leichte Schläge gegen das Schraubverschlussröhrchen mit dem verbliebenen Medium resuspendiert. Danach wurde ein weiterer Waschschrift mit 8 ml PBS (-CaCl₂, -MgCl₂) und Zentrifugation für 10 min bei 300 xg angeschlossen, um das DMSO restlos von den Zellen zu entfernen. Nach dem zweiten Waschschrift wurde der Überstand mit einer Pipette möglichst vollständig abgenommen und das resuspendierte Zellpellet in der gewünschten Menge PBS (-CaCl₂, -MgCl₂) aufgenommen.

3.4.5 Bestimmung der PBMC Zellzahl mit der Neubauer Zählkammer

Die Zelldichte wurde durch eine Neubauer Zählkammer bestimmt. Diese enthält eine Gravur aus 4 Großquadraten, die wiederum in 16 Kleinquadrate unterteilt sind. Die zu untersuchende Zellsuspension wurde gut resuspendiert. 50 µl der Zellsuspension wurden in 50 µl Trypanblaulösung und 100 µl PBS vermisch (Verdünnungsfaktor 4). Dieses Gemisch wurde vorsichtig zwischen Deckglas und Zählkammer gegeben und durch die entstehenden Kapillarkräfte unter das Deckglas transportiert, bis das Deckglas an der Unterseite vollständig mit Zellsuspension bedeckt worden war. Nun wurden die Quadrate unter einem Lichtmikroskop (Leica) ausgezählt. Die Trypanblau-Lösung ermöglicht, die lebenden Zellen von den toten Zellen unterscheiden zu können. Trypanblau kann bei toten Zellen durch die schadhafte Zellmembran in das Zytoplasma eindringen und Proteine anfärben, bei lebenden Zellen jedoch nicht. Somit erscheinen die toten Zellen unter dem Lichtmikroskop blau, die lebenden farblos. Zur Berechnung der Anzahl der lebenden Zellen wird mindestens eines der Großquadrate ausgezählt. In einem Großquadrat befindet sich ein Volumen von 0,1 µl der Probe (Fläche des Großquadrates = 1 mm² multipliziert mit Abstand Deckglas zu Glassteg = 0,1 mm => 1 mm² x 0,1 mm = 1 mm³ = 0,1 µl).

Mit der folgenden Formel, in der der Verdünnungsfaktor und die Anzahl an gezählten Zellen pro Großquadrat integriert sind, wurde die Zelldichte in Zellzahl pro ml bestimmt:

$$D = \frac{N}{Q} \cdot V \cdot 10^4$$

D: Zelldichte (Zellen / ml), N: Gezählte Zellen, Q: Anzahl der ausgezählten Großquadrate, V: Verdünnungsfaktor, 10⁴: Volumenfaktor für die Umrechnung von Zellen / µl auf Zellen / ml

3.5 Gewinnung von EDTA und Heparin Plasma

3.5.1 Gewinnung von EDTA Plasma

Das EDTA-Plasma wurde aus 4 ml EDTA Vollblut-Röhrchen gewonnen. Hierfür wurde das Röhrchen bei 300 xg 10 min zentrifugiert und dann 2 mal jeweils 1 ml EDTA Plasma abgenommen und in zwei Kryoröhrchen überführt. Das Plasma wurde am selben Tag bei -70°C eingefroren.

3.5.2 Gewinnung von Heparin Plasma

Das Heparin-Plasma wurde aus den CPT Vacutainer-Röhrchen gewonnen. Nach Zentrifugation bei 1650 xg für 20 min wurden 2 mal je 1 ml Heparin-Plasma aus der obersten Schicht abgenommen, wobei genau darauf geachtet wurde die darunter liegende

Lymphozytenwolke nicht zu berühren. Das Heparin-Plasma wurde in zwei Kryoröhrchen überführt und am selben Tag bei -70°C eingefroren.

3.6 Bestimmung der Zelltypen und Aktivierungsmarker mittels Antikörperfärbung und nachfolgender Durchflusszytometrie

Zellpopulationen werden durch ihre verschiedenen Oberflächenproteine (CD = cluster of differentiation) klassifiziert. Durch Analyse dieser immunphänotypischen Oberflächenmerkmale können die Zellpopulationen voneinander abgegrenzt werden. Im Rahmen unserer Blutuntersuchungen wurden verschiedene CD verwendet, um die Zellpopulationen zu beschreiben.

Hierbei wurden die Zellen mit einem Antikörper versetzt, der an ein gewünschtes CD bindet. An diesen Antikörper ist ein Fluoreszenzfarbstoff gebunden der nach Bestrahlung mit einem Laserlicht in einer bestimmten Wellenlänge emittiert. Diese Emissionen können durch ein Durchflusszytometer erkannt werden.

3.6.1 Extrazelluläre Antikörperfärbung von CD4+ T-Lymphozyten und CD8+ T-Lymphozyten im Vollblut

Zur Identifizierung der CD4+ T-Lymphozyten und CD8+ T-Lymphozytenpopulationen wurde ein Trucounttube mit der CTC Nummer des Patienten beschriftet. 20 µl des 4 Farben Multitestes der Firma BD, CD3 FITC/CD8 PE/CD45 PerCP/CD4 APC, wurden auf den Boden des Tubes pipettiert und 50 µl gut vermisches EDTA Vollblut dazu pipettiert. Das Tube wurde verschlossen, kurz mit einem Vortexer gemixt und für 15 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert, um die Bindung der Antikörper mit den Oberflächenproteinen der Zellen zu ermöglichen. Danach wurden 450 µl von BD Multitest-Lysing-Puffer zu dem Tube gegeben und wieder mit einem Vortexer gemixt, um die Erythrozyten zu lysieren und somit eine Störung der Messung durch diese zu verhindern. Es folgte eine weitere Inkubationszeit von 15 Minuten im Dunkeln. Die Proben waren nun bereit für die Analyse mit einem Durchflusszytometer und wurden bis zur Messung, jedoch höchstens 8 Stunden, im Dunkeln aufbewahrt.

3.6.2 Extrazelluläre Antikörperfärbung von PBMCs zur Bestimmung der Aktivierungsmarker CD38 und HLADR

Die PBMC wurden zunächst aufgetaut (s. Kap. 3.4.4) und die Vitalität und die Zellzahl bestimmt (s. Kap. 3.4.5). Es wurden mindestens 10^5 Zellen für die jeweilige Färbung in 50 µl FACS-Färbungsmedium (FM) verwendet. Für jeden Patienten wurden zwei Facsröhrchen vorbereitet. Eines für die Vierfachfärbung mit CD3-PerCP/CD8-FITC/CD38-PE/HLADR-

APC und eines für die Isotypenkontrolle mit CD3-PerCP/CD8-FITC/IgG1-PE/IgG2-APC. Die Isotypenkontrolle wurde durchgeführt, um spezifische Antikörperbindungen von unspezifischen Bindungen bzw. FC-Rezeptorbindungen zu unterscheiden. Das Fluoreszenzsignal der Isotyp-Antikörper wurde bei der Auswertung als negatives Signal angenommen und die Auswertungsmaske entsprechend eingestellt. 20 µl des jeweiligen Vierfarbengemisches wurde auf den Boden der Tubes pipettiert und 50 µl der in FM gemischten Zellen dazu pipettiert. Das Tube wurde verschlossen, kurz mit einem Vortexer gemixt und für 20 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert um die Bindung der Antikörper mit den Oberflächenproteinen der Zellen zu ermöglichen. Nach einmaligem Waschen mit 1 ml FM wurden die Zellen zur Fixierung und Aufbewahrung in eine 4% ige Paraformaldehydlösung (200 µl) resuspendiert. Nach der Durchführung der Färbungen wurden die Zellen innerhalb von zwei Tagen im Durchflusszytometer analysiert.

3.7 Durchflusszytometrie (Fluorescence Activated Cell Sorting = FACS)

Um Zellpopulationen zu analysieren, die mit Farbstoff-konjugierten Antikörpern (s. Kap. 3.6.1 und 3.6.2) behandelt worden sind, wurde die Durchflusszytometrie (FACS) verwendet. Hiermit können Fluoreszenz- und Streulichteigenschaften von Einzelzellen in Suspension bestimmt werden. Die zu untersuchende Zellsuspension wird über eine enge Kapillare in den Messbereich befördert, dort vereinzelt und mit einem Laser bestrahlt. Abhängig von Größe, Zellmembranstruktur und Granularität des Zytoplasmas wird der, am Messpunkt auf die Zellen treffende, Laserstrahl in spezifischer Weise gestreut. Das Emissionsspektrum wird dabei vom Durchflusszytometer FACS Calibur (BD) detektiert. Zunächst können die Zellen nach ihren Merkmalen sortiert und gezählt werden. Diesem Zweck dienen der *Forward Scatter* (FSC = Vorwärtsstreulicht) und der *Side Scatter* (SSC = Seitwärtsstreulicht). Der FSC nimmt die Beugung des Lichts auf, die durch die Größe der Zellen bestimmt wird. Dagegen wird der SSC durch die Brechung des Lichts bestimmt, was Rückschlüsse auf die Granularität der Zellen zulässt. Die Fluoreszenzimpulse der Zellen mit Farbstoff-markierten Antikörper wurden unter Berücksichtigung der Eigenfluoreszenz mit Hilfe des FACS Calibur und der Aufnahmesoftware Cell Quest Pro 3 (BD) gemessen.

3.8 DNA-Extraktion aus PBMC

Die DNA-Extraktion aus PBMCs wurde mit Hilfe des QIAamp DNA Micro Kits der Firma Qiagen nach Herstellerangaben durchgeführt. Hierzu wurden $1 \cdot 10^5$ Zellen in 50 µl RPMI und 50 µl ATL Puffer suspendiert. Die DNA-Extraktion beruht auf der Basis der reversiblen Bindung von DNA an Kieselgel Membranen (Säulen) in Anwesenheit hoher

Salzkonzentrationen nach einem Lysierungsschritt. Die DNA wurde nach multiplen Waschschritten mit entsprechenden Puffern des Kits schlussendlich mit 30 µl Puffer eluiert.

3.9 RNA-Extraktion aus EDTA Plasma

Die RNA-Extraktion wurde mittels Isopropanol und Ethanol Fällung nach Lysis durchgeführt. Hierzu wurden 500 µl des aufgetauten EDTA Plasmas 60 Minuten bei 6 °C und 24 000 xg zentrifugiert und der Überstand abgenommen. 600 µl des Cobas Amplicor HIV-1 Monitor-Lysis-Reagenz wurde dazugegeben und bei RT 10 min inkubiert. Nach kurzer Zentrifugation wurden 600 µl absolutes Isopropanol zugefügt, gut gevortext und dann 15 Minuten zentrifugiert bei 24 000 xg. Der Überstand wurde abgezogen und dann 1000 µl 70% Ethanol dazugegeben, gut gemixt und anschließend 5 Minuten zentrifugiert. Das Ethanol wurde gründlich abgezogen und das Pellet zum Trocknen kurz bei RT inkubiert. Nachdem das Ethanol vollkommen verdampft war, wurde das Pellet in 100 µl Cobas-Amplicor-HIV-1-Monitor-Specimen-Diluent gelöst.

3.10 Konzentrationsbestimmung mittels Spektralphotometrie

Die Konzentration der Nukleinsäuren wurde über die Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 260 nm (UV-Licht) bestimmt. Sie errechnet sich aus der Extinktion bei der optischen Dichte 260 nm (OD_{260}), der Verdünnung (V) und einem spezifischen Multiplikationsfaktor (F), der für doppelsträngige DNA 50, für einzelsträngige DNA 33, für RNA 40 und für Oligonukleotide 20 beträgt:

$$c[\mu\text{g/ml}] = OD_{260} \times V \times F$$

Das Verhältnis der OD_{260} und der OD_{280} gibt zudem Aufschluss über Proteinkontaminationen in der Lösung. Dieses Verhältnis liegt in Abhängigkeit vom pH-Wert und dem Salzgehalt der Nukleinsäurelösung zwischen 1,5 und 2,2 für reine Lösungen. Die zu messenden Nukleinsäuren wurden im Verhältnis 1:50 mit Nuklease-freiem Wasser verdünnt. Die Verdünnung wurde in eine für Messungen im UV-Bereich geeignete Kunststoff-Küvette gegeben. Durch Wahl eines geeigneten Programms wurde im Photometer die OD_{230} , OD_{260} und OD_{280} bestimmt, sowie das Verhältnis der OD_{260} zur OD_{230} und das Verhältnis der OD_{260} zur OD_{280} . Die Berechnung der Nukleinsäurekonzentration erfolgte ebenfalls automatisch und wurde in µg/µl ausgegeben.

3.11 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion entwickelt von Kary B. Mullis (Mullis, Faloona et al. 1986; Mullis and Faloona 1987) wurde in der vorliegenden Arbeit sowohl zur Herstellung von HIV-1 cDNA von HIV-1 RNA aus EDTA-Plasma-Proben als auch zur Amplifizierung und nachfolgenden Sequenzierung der hergestellten HIV-1 cDNA aus EDTA-Proben und der

extrahierten HIV-1 cDNA aus PBMC verwendet. Es handelt sich bei der PCR um eine *in-vitro*-Technik, die es ermöglicht, von geringsten Ausgangskonzentrationen an RNA oder DNA gezielt Sequenzen definierter Länge zu amplifizieren, um diese in größeren Mengen zur Weiterverarbeitung zu gewinnen. Grundlage dieser Technik ist die Fähigkeit von DNA-Polymerasen, aus einzelsträngigen DNA-Matrizen vollständige, doppelsträngige DNA-Moleküle synthetisieren zu können, welche bei zyklischer Wiederholung der Synthese zur exponentiellen Vervielfältigung einer bestimmten template- oder target-DNA führt.

Zur Durchführung einer PCR werden die Original-Matrizen (DNA oder RNA), welche den zu amplifizierenden Abschnitt beinhaltet, sowie zwei 20-30 Basen lange synthetisch hergestellte Oligonukleotide (Primer) benötigt. Diese sind komplementär zu bestimmten Endbereichen der zu vervielfältigenden Einzelstränge, binden sequenzspezifisch an die Matrizen-DNA und legen durch zur Verfügungstellung eines freien 3'Endes den Startpunkt der Polymerisation fest. Um den festgelegten Bereich zu replizieren, wird eine thermostabile Polymerase eingesetzt. Diese fügt die ebenfalls dem Reaktionsgemisch beizufügenden Nucleotide (dATP, dGTP, dCTP und dTTP) komplementär zur DNA an die Primermoleküle an.

Liegt als Ausgangsmolekül HIV-1-RNA vor, so ist ein Zwischenschritt notwendig in dem mit Hilfe des Enzyms „Reverse-Transkriptase“ eine Umschreibung von RNA in DNA erfolgen kann.

3.11.1 Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

In dieser Reaktion wurde mit Hilfe der RevertAid-H-Minus-Reversen-Transkriptase (Fermentas) die, aus dem EDTA-Plasma der ProCort Patienten gewonnene, HIV-1 RNA in komplementäre HIV-1 cDNA umgeschrieben. 10 µl der extrahierten HIV-1 Patienten-RNA (s. Kap. 3.9.) wurden zu 20 µM Primer (Plantier, Dachraoui et al. 2005) in ein PCR Tube gegeben und bei 70°C für 10 Minuten (min) denaturiert. Die Proben wurden danach sofort auf Eis gelegt und 9 µl RT-Mix dazu pipettiert. Der RT-Mix setzte sich zusammen aus 4 µl 5x Reaktionspuffer, 1 µl Ribonuklease-Inhibitor (20 U/µl), 2 µl dNTP-Mix (je 10 mM), 1 µl RevertAID-H-Minus-M-MuLV-Reverse-Transkriptase (200 U/µl) und 1 µl H₂O. Es folgt eine Inkubation bei 42°C für 60 min. Die Reaktion wurde durch Erhitzen auf 99 °C für 5 min gestoppt und die Proben dann auf 4°C. Zur Aufbewahrung wurden die Proben bei -20°C gelagert.

3.11.2 Nested PCR zur Amplifikation der HIV-1 cDNA

Die nested PCR (= geschachtelte PCR) ist ein Verfahren, bei dem zwei PCR-Reaktionen nacheinander durchgeführt werden, um die Sensitivität und Menge der

Amplifikationsprodukte zu erhöhen. Ein Aliquot des PCR-Produktes aus der ersten Amplifikation (= externe PCR) dient als Matrize für die zweite (= interne) PCR. In dieser wird durch ein zweites Primerpaar, das an Sequenzbereiche innerhalb dieser Matrize bindet, ein kürzeres DNA-Fragment amplifiziert.

3.11.2.1 PCR extern

Zur Vervielfältigung der geringen Mengen an gewonnener cDNA aus der RT-PCR oder aus der cDNA-Extraktion von PBMC's wurde eine PCR mit folgenden Reaktionsbedingungen angeschlossen: Es wurden 5 µl des Reaktionsproduktes aus Kap 3.11.1 oder aus Kap 3.8 eingesetzt und dazu 45 µl PCR-Mix, bestehend aus 5 µl 10xTaKaRa-ex-Taq-Puffer, 0,5 µl d-NTP-Mix (je 20 mM), 1 µl Primer (0,5 µl HIR1+ 0,5 µl HIR2) und 0,5 µl TaKaRa-Ex-Taq (5 U/µl)-Polymerase in 38 µl H₂O pipettiert. Das Reaktionsgemisch wurde zur Denaturierung für 1 Minute auf 95°C erhitzt und dann in 40 Zyklen jeweils 45 Sekunden auf 94°C, 45 Sekunden auf 62°C und 150 Sekunden auf 68°C erhitzt. Das Endprodukt wurde zunächst für 10 min auf 72°C erhitzt und danach für spätere Verwendung auf -20 °C eingefroren. Um eine größere Ausbeute an Amplifikationsprodukten zu erlangen wurde mit allen Reaktionsansätzen eine Nested-PCR angeschlossen.

3.11.2.2 PCR intern

Eine interne PCR folgt dem gleichen Reaktionsschema wie die externe PCR. Es wurden 2 µl des Reaktionsproduktes aus der externen PCR eingesetzt und dazu 50 µl PCR-Mix bestehend aus 5 µl 10xTaKaRa-ex-Taq-Puffer, 0,5 µl d-NTP-Mix (je 20 mM), 1 µl primer (0,5 µl HIR3+ 0,5 µl HIR4), 0,25 µl TaKaRa-Ex-Taq (5 U/µl)-Polymerase in 43,25 µl H₂O pipettiert. Das Reaktionsgemisch wurde zur Denaturierung für 2 Minuten auf 95°C erhitzt und dann in 20 Zyklen jeweils 60 Sekunden auf 94°C, 60 Sekunden auf 62°C und 210 Sekunden auf 68°C erhitzt, danach folgten weitere 20 Zyklen jeweils 60 Sekunden auf 94°C, 60 Sekunden auf 62°C und 240 Sekunden auf 68°C erhitzt. Das Endprodukt wurde zunächst für 10 min auf 72°C erhitzt und danach für spätere Verwendung auf -20 °C eingefroren.

Zur Analyse der PCR-Produkte wurden 5 µl der Reaktionsansätze in Ladepuffer verdünnt und auf ein 1%iges Agarose-TAE-Gel aufgetragen und elektrophoretisch getrennt (s. Kap. 3.13). Als Marker wurde eine 1 kb DNA-Ladder aufgetragen.

3.11.3 Sequenzierungs-PCR

Bei der Sequenzierung von DNA wird die genaue Nukleotidabfolge einer DNA bestimmt. In der vorliegenden Arbeit wurden die PCR-Produkte der Nested-PCR einer basengenauen Überprüfung durch eine Cycle-Sequencing-Reaktion mit einem „BigDyeTM-Terminator 1.1

Ready-Reaction-Cycle-Sequencing-Kit“ unterzogen. Das Prinzip dieses Kits beruht auf der Kettenabbruchreaktion (Didesoxyribonukleotid-Abbruch-Methode) nach Sanger et al. (Sanger, Nicklen et al. 1977). Die Didesoxynukleotide des Bigdye sind in diesem Fall mit einem fluoreszierenden Farbstoff (dye) versehen, der von einer DNA-Sequenziermaschine mit Hilfe eines Lasers detektiert werden kann. Ein Reaktionsvolumen von 5 µl bestehend aus 1 µl BigDyeTM-Terminator-1.1-Enzym-Mix (Applied Biosystems), 5 pmol Primer, 500 ng DNA und Wasser wurden in ein 0,2 ml Sequenzierungsröhrchen (Hartenstein) pipettiert. Folgende Sequenzzyklen wurden 25 mal durchgeführt: Denaturierung bei 96°C für 10 Sekunden, Primer-Anlagerung bei 55°C für 5 Sekunden und Verlängerung des DNA-Stranges bei 60°C für 4 Minuten. Das Endprodukt mit den verschieden langen und markierten DNA-Stücken wurde zunächst auf 4°C abgekühlt, dann aufgereinigt (s.Kap. 3.12) und mit dem automatisierten ABI-Prism-310-Genetic-Analyzer-System (Applied Biosystems) ausgewertet.

3.12 Reinigung von PCR-Produkten

Um überschüssige dNTP's, Enzyme und Puffer von den amplifizierten PCR-Produkten zu trennen wurde zur Aufreinigung der PCR-Produkte das GenEluteTM PCR-Clean-Up von Sigma-Aldrich nach Herstellerprotokoll verwendet. Die Aufreinigung basiert auf der Basis der reversiblen Bindung von DNA an Kieselgelmembranen in Anwesenheit großer Salzkonzentrationen. Nach multiplen Waschschritten konnte die reine DNA mit dem entsprechenden Puffer des Kits oder reinem Wasser eluiert werden.

3.13 Agarosegelelektrophorese von Nukleinsäuren

Die DNA-Agarosegelelektrophorese dient sowohl der Trennung als auch der Analyse von DNA-Fragmenten. Aufgrund der negativen Ladung der DNA ist es möglich, die DNA-Fragmente im Agarosegel, an dem elektrische Spannung anliegt, der Größe nach aufzutrennen. Die Auftrennung erfolgt nach dem Molekulargewicht der DNA, die während der Elektrophorese in Richtung Anode wandert. Für die vorliegende Arbeit wurden 1 %-ige Agarosegele verwendet, die 1 µg/ml Ethidiumbromid enthielten. Die DNA-Proben wurden mit 6x Bromphenolblaupuffer versetzt und auf das Agarosegel aufgetragen. Durch Anlegen einer Spannung von 70-120 V erfolgte die elektrophoretische Trennung. Durch das in der DNA interkalierte Ethidiumbromid wurde der DNA/Ethidiumbromid-Komplex mit Hilfe eines Geldokumentationsgerätes (Gel Imager, INTAS) mit UV-Licht sichtbar gemacht, digital mit einem Computer aufgenommen und archiviert.

3.14 Resistenz- und Phylogenetische-Analyse anhand der HIV-1 cDNA Sequenzen

Mit Hilfe der ermittelten HIV-1 Sequenzen wurden Subtypen- und Resistenzbestimmung durchgeführt. Die Chromatogramme des ABI-Prism-310-Genetic-Analyzer-System wurden mit der Lasergene-Seqman und MegAlign-Version 7-Software (DNASTAR Inc.) ausgewertet und als FASTA-Files gespeichert. Die FASTA-Files wurden mittels der Stanford-Datenbank (HIV-Database-Genotypic-Resistance-Interpretation-Algorithm-Version 4.6.2) auf ihr Resistenzprofil überprüft. Zur Subtypenbestimmung wurde eine phylogenetische Analyse durchgeführt. Hierzu wurden die cDNA-Sequenzen mittels des Programmes ClustalW-Version-2 (Larkin, Blackshields et al. 2007) miteinander verglichen und anhand der evolutionären Verwandtschaftsgraden ein phylogenetischer Baum mittels der Software-Mega-Version-5.0 (Tamura, Dudley et al. 2007) erstellt. Je ähnlicher sich Sequenzen sind, um so näher sind sie miteinander verwandt. Die Referenzsequenzen wurden hierfür aus der Datenbank „Los-Alamos-National-Laboratory-Database“ entnommen.

3.15 Viruslastmessung

Die HIV-1 Viruslastbestimmung des Patientenplasmas wurde nach erfolgter RT-PCR (s. Kap. 3.11.1) mittels Cobas-Amplicor-HIV-1-Monitor nach Herstellerangaben durchgeführt.

3.16 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) zur Bestimmung von LPS, LBP, CD14, suPAR und sCD40L

Als ELISA wird ein immunologisches Nachweisverfahren bezeichnet, das auch gleichzeitig zur Konzentrationsbestimmung von Antigenen genutzt werden kann. ELISA sind Mikrotiterplattentests. Spezifische Erstantikörper gegen die zu messende Substanz (Antigene) werden an die Wand des Probengefäßes gebunden. An sie lagern sich Antigene aus der Probenlösung an. Enzym-tragende Sekundärantikörper werden zugesetzt, die an jedes, im ersten Schritt fixierte Antigenmolekül binden. Die Enzymaktivität des über Antikörper-Antigen-Antikörper (Sandwich-Technik) an der Probengefäßwand gebundenen Enzyms wird nach Zugabe des entsprechenden Substrates photometrisch gemessen. Dabei ist die Substratumsetzung dem Enzymgehalt und somit auch dem Antigengehalt direkt proportional. Der Nachweis dieses Antigens erfolgt über eine enzymatische Farbreaktion.

In der vorliegenden Arbeit wurden ELISA-Tests zum Nachweis von Lipopolysacchariden (LPS) im Blutplasma, dem LPS-Bindungsprotein LBP (Hycult Biotech), dem LBP-Bindungsprotein sCD14 (Diaclone), dem Entzündungsmarker suPAR (ViroGates) und dem Zytokin sCD40L (Bender MedSystems) nach Herstellerprotokoll durchgeführt. Die enzymatische Farbreaktion wurde mittels ELISA-Reader Tecan-Spectra-Mini bei 450 nm

detektiert und mit Microsoft-Excel ausgewertet. Mit Hilfe einer Kalibriergeraden des Standards konnten die Antigene quantifiziert werden.

3.17 Therapeutisches Drug Monitoring

Therapeutisches-Drug-Monitoring (TDM) ist eine etablierte Methode in der HIV-Behandlung zur Bestimmung von antiretroviralen Medikamentenspiegeln im Plasma der Patienten. In der vorliegenden Arbeit wollten wir sicher gehen, dass wir tatsächlich nur unbehandelte Patienten beobachten. Aus diesem Grund wurden in den Plasmen der Baseline Visiten die Medikamentenspiegel überprüft. Dafür wurden Plasmaproben mittels HPLC/GC (High performance liquid chromatographic/gas chromatography) auf Spuren der ARV-Medikamente Efavirenz, Nevirapine, Nelfinavir, Saquinavir, Atazanavir und Lopinavir nach beschriebener Methode (Langmann, Weissbrich et al. 2002; Langmann, Heinz et al. 2008) überprüft. Die Detektionslevel waren hierbei für Nevirapin 2 ng/ml und für Efavirenz 3 ng/ml.

4 Ergebnisse (Publikationen)

- 4.1 HIV patients treated with low-dose prednisolone exhibit lower immune activation than untreated patients**

Seiten unnummeriert

S. 65 - 76

- 4.2 HIV Drug Resistance (HIVDR) in Antiretroviral Therapy-Naive Patients in Tanzania Not Eligible for WHO Threshold HIVDR Survey Is Dramatically High**

Seiten unnummeriert

S. 77 – 87

- 4.3 Low-dose Prednisolone Increases CD4+ T Cell Counts and Reduces Occurrence of AIDS-Defining Conditions in HIV Patients in Africa**

Seiten nummeriert

S. 88 - 107

RESEARCH ARTICLE

Open Access

HIV patients treated with low-dose prednisolone exhibit lower immune activation than untreated patients

Christa Kasang¹, Albrecht Ulmer², Norbert Donhauser³, Barbara Schmidt³, August Stich⁴, Hartwig Klinker⁵, Samuel Kalluvya⁶, Eleni Koutsilier¹, Axel Rethwilm¹ and Carsten Scheller^{1*}

Abstract

Background: HIV-associated general immune activation is a strong predictor for HIV disease progression, suggesting that chronic immune activation may drive HIV pathogenesis. Consequently, immunomodulating agents may decelerate HIV disease progression.

Methods: In an observational study, we determined immune activation in HIV patients receiving low-dose (5 mg/day) prednisolone with or without highly-active antiretroviral therapy (HAART) compared to patients without prednisolone treatment. Lymphocyte activation was determined by flow cytometry detecting expression of CD38 on CD8(+) T cells. The monocyte activation markers sCD14 and LPS binding protein (LBP) as well as inflammation markers soluble urokinase plasminogen activated receptor (suPAR) and sCD40L were determined from plasma by ELISA.

Results: CD38-expression on CD8+ T lymphocytes was significantly lower in prednisolone-treated patients compared to untreated patients (median 55.40% [percentile range 48.76-67.70] versus 73.34% [65.21-78.92], $p = 0.0011$, Mann-Whitney test). Similarly, we detected lower levels of sCD14 (3.6 $\mu\text{g/ml}$ [2.78-5.12] vs. 6.11 $\mu\text{g/ml}$ [4.58-7.70]; $p = 0.0048$), LBP (2.18 ng/ml [1.59-2.87] vs. 3.45 ng/ml [1.84-5.03]; $p = 0.0386$), suPAR antigen (2.17 $\mu\text{g/ml}$ [1.65-2.81] vs. 2.56 $\mu\text{g/ml}$ [2.24-4.26]; $p = 0.0351$) and a trend towards lower levels of sCD40L (2.70 pg/ml [1.90-4.00] vs. 3.60 pg/ml [2.95-5.30]; $p = 0.0782$). Viral load in both groups was similar (0.8×10^5 ng/ml [$0.2-42.4 \times 10^5$] vs. 1.1×10^5 [$0.5-12.2 \times 10^5$]; $p = 0.3806$). No effects attributable to prednisolone were observed when patients receiving HAART in combination with prednisolone were compared to patients who received HAART alone.

Conclusions: Patients treated with low-dose prednisolone display significantly lower general immune activation than untreated patients. Further longitudinal studies are required to assess whether treatment with low-dose prednisolone translates into differences in HIV disease progression.

Background

Progressive depletion of helper T cells is a hallmark of untreated HIV infection. There is accumulating evidence that chronic immune activation may be a fundamental driving force of this T cell loss. HIV infection triggers a general activation of the immune system that persists for years, which may eventually result in exhaustion of the regenerative capacities of the immune system,

causing immunodeficiency and AIDS [1-3]. The trigger for this chronic stimulation is probably multifactorial, including a direct stimulation of HIV-specific cells by the ongoing replication of HIV [4]. Furthermore, elevated levels of plasma lipopolysaccharide (LPS) and bacterial DNA in chronic HIV patients suggest that microbial translocation from the damaged gut contributes to this hyperactivation by triggering an innate immune response to Gram-negative bacteria [5,6]. During this process, the two host factors LPS binding protein (LBP) and soluble CD14 neutralize plasma LPS and

* Correspondence: scheller@vim.uni-wuerzburg.de

¹University of Wuerzburg, Institute of Virology und Immunobiology, 97078 Wuerzburg, Germany

Full list of author information is available at the end of the article

direct it to the Toll-like receptor (TLR)-4 molecule expressed on macrophages [7,8].

The pivotal role of chronic immune activation in HIV pathogenesis is underlined by the fact that immune activation parameters such as expression of CD38 or HLA-DR on CD8+ T are good predictors of subsequent T cell loss and correlate much better with HIV disease progression than plasma viral load or chemokine coreceptor usage [2]. In a similar way, plasma levels of soluble sCD14, LBP and soluble urokinase plasminogen activator receptor (suPAR) correlate with HIV disease progression [2,9,10]. The transmembrane glycoprotein CD40L (CD154), a member of the tumor necrosis factor family, is primarily expressed on activated CD4+ T cells, but also detected on many other cell populations including a small proportion of CD8+ cells [11]. The soluble form (sCD40L) still binds to the receptor and delivers biological signals in a cytokine-like manner [12]. Increased sCD40L levels were detected in the serum of HIV-infected patients [13].

Chronic immune activation as a consequence of immunodeficiency virus infection is restricted to man and Asian monkeys, who both develop AIDS following untreated HIV/SIV infection. In contrast, African monkeys which do not exhibit chronic immune activation following SIV infection do not progress to AIDS and remain healthy, despite high viral load [6,14,15].

Treatment with antiretroviral therapy does not only suppress virus replication but also substantially reduces HIV-associated general immune activation [16-21]. Compared to uninfected controls, HAART-treated patients however still exhibit slightly elevated immune activation that is being considered a risk factor for ongoing disease progression (albeit at much slower pace than in untreated patients) [22-27]. Despite the dramatic success of antiretroviral therapy on reduction of mortality in HIV infection, HIV-infected patients treated with HAART still have a life expectancy below the average of the uninfected population [28]. Immune-based therapies that aim to further reduce immune activation under HAART may therefore further close this gap. In resource-limited areas with later onset of HAART compared to more industrialized countries, cheap and robust immunomodulating regimens preceding antiretroviral therapy may be another option to reduce worldwide HIV mortality until HAART becomes universally available.

In this study we investigated general immune activation in HIV patients who received low-dose (5 mg/day) prednisolone in combination with or without HAART compared to untreated patients.

Methods

Subjects

The patients analyzed in this study received HIV-treatment according to the treatment recommendations of

the “Deutsche AIDS Gesellschaft” (DAIG). In addition to antiretroviral medication, some of our patients also received low-dose (5 mg/day) prednisolone as part of their individual treatment plan. Among the 101 HIV patients included into our study, 27 received low-dose (5 mg/day) prednisolone, 31 received low-dose prednisolone in combination with HAART, 30 received HAART alone and 13 received neither HAART nor prednisolone.

Prednisolone medication

We (A. Ulmer) have previously reported that HIV patients who do not yet meet the eligibility criteria for antiretroviral therapy seem to profit from treatment with low-dose (5 mg per day) prednisolone by a stabilization of helper T cell counts compared to patients that remained therapy-naive [29,30]. Due to these encouraging observations, patients at the site of A. Ulmer are being offered low-dose prednisolone (prior or accompanying to HAART) and patients decide individually of whether or not to receive prednisolone. We therefore supervise a population of patients that can be categorized into four subgroups: untreated-patients, prednisolone-treated patients, and at later stages of the infection HAART-treated patients who receive or do not receive prednisolone. All patients investigated in this study derive from the same study center (A. Ulmer), which was the only participating site that could enroll prednisolone-treated patients. To compare immune activation in patients with therapeutic (HAART) and immunologic control of virus replication, we included 3 additional treatment-naïve patients (elite controllers who suppress virus replication beyond the detection limit of 50 copies/ml) from another site (H. Klinker).

Study design

In an observational study we compared immune activation parameters in 5 different subject groups: (1) HIV-1-infected subjects who receive neither HAART nor prednisolone and with detectable viral load, referred to as “untreated”; (2) HIV-1 infected subjects treated with 5 mg/day prednisolone, referred to as “Prednisolone”; (3) HIV-1 infected subjects treated with antiretroviral therapy, referred to as “HAART”; (4) HIV-1 infected subjects treated with antiretroviral therapy in combination with 5 mg/day prednisolone, referred to as “HAART+Prednisolone”; (5) HIV-1 infected subjects as described for (1) but with undetectable viral load referred to as “elite controllers”. Patients have been asked to participate in the study during their routine visits at the site. Patients willing to participate in the study signed an informed consent. No additional selection criteria other than willingness to participate were applied for inclusion into the study.

The study was approved by the ethical committees of the Landesärztekammer Baden-Württemberg, the Bayerische Landesärztekammer, and the University of Würzburg.

Isolation of plasma

7.5 ml of whole blood were collected from each patient with a vacutainer supplemented with EDTA (BD Biosciences) for flow cytometric analysis of PBMC. EDTA plasma was used for sCD40L-ELISA. Additional 8 ml of blood were collected for plasma preparation from heparin-blood. Heparin-plasma was used for sCD14- and LBP-ELISAs.

Flow cytometry

Fresh EDTA-blood was used within 8 h after collection. Erythrocytes were lysed using a lysis solution (BD Biosciences) and PBMC were stained in triplicates with antibodies directed at CD3 (labeled with FITC) and CD8+ (labeled with PerCP) and counterstained with anti-CD38-PE (all antibodies from were purchased from BD Biosciences, Heidelberg, Germany) according to the "lysis no wash" protocol (BD Biosciences). Cells were analyzed by flow cytometry using a FACS-Calibur flow cytometer (Becton Dickinson). Markers were set according to cells stained with fluorochrome-conjugated isotype control antibodies (all from BD Biosciences).

Lymphocytes were identified by gating in a dot plot of forward and sideward scatter (FSC/SSC). For analysis of T cell activation, cells were stained with anti-CD3 (PerCP)/CD8(FITC)/CD38(PE)-antibodies. CD3+/CD8+ cells within the FSC/SSC lymphocyte gate were scored as CD8+ T-lymphocytes. CD3+/CD8- cells within the FSC/SSC lymphocyte gate were scored as CD4-positive T cells. CD38 expression was determined in CD3+/CD8+ lymphocytes (CD8 T lymphocytes) and CD3+/CD8- lymphocytes (scored as CD4+ T lymphocytes). CD38+ lymphocytes were scored as activated cells. For analysis of naïve T cells, cells were stained with anti-CD3 (PerCP)/CD4(APC)/CD45RA(FITC)/CD62L(PE)-antibodies. CD3+/CD4+ cells within the FSC/SSC lymphocyte gate were scored as CD4+ T-lymphocytes. CD3+/CD4- cells within the FSC/SSC lymphocyte gate were scored as CD8-positive T cells. CD45RA/CD62L-expression was determined in CD3+/CD4+ lymphocytes (CD4 T lymphocytes) and CD3+/CD4- lymphocytes (scored as CD8+ T cells). CD45RA/CD62L-positive lymphocytes were scored as naïve cells.

Viral load and CD4 counts

CD4 counts and viral load were determined from EDTA-blood by a commercial virusdiagnostic laboratory during routine medical care (CD4: Prof. Enders, Stuttgart, viral load: Dr. Jaegel-Guedes/Jäger, München).

sCD14, LBP, suPAR and sCD40L

ELISAs to detect plasma levels of sCD14 (Diaclone), LBP (Hycult Biotech), suPAR (ViroGates) and sCD40L (Bender MedSystems) were performed according to the manufacturer's instructions. For the latter, 100 µl of EDTA plasma samples were analyzed that had been thawed once.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using the GraphPad Prism software (version 4.0c for Macintosh). About half of the data showed a non-Gaussian distribution (according to D'Agostino-Pearson test) so that medians and interquartile range (expressed as 25%-75% percentile) were chosen to describe the results. Differences between untreated and Prednisolone-treated or HAART-treated and HAART + Prednisolone-treated groups were analyzed by Mann-Whitney *U*-test and $p < 0.05$ was regarded as statistically significant. Correlations were performed using linear regression.

Results

Patient population

In this observational study we analyzed general immune activation parameters in patients with HIV infection receiving individual therapy regimes. Patients who were willing to participate in the study gave written informed consent and donated a single blood sample. We divided the patients into five different groups, including a) untreated patients ($n = 10$), b) patients being treated with low-dose prednisolone ($n = 27$), c) with HAART ($n = 30$), d) HAART plus prednisolone ($N = 31$) or e) treatment-naïve patients with undetectable viral load (Table 1). At the time of blood sampling, the 27 patients in the prednisolone group received prednisolone medication for a median duration of 2.3 years (Table 1). Although the exact time of infection for each patient is unknown, the date of the first HIV diagnosis indicates that patients in the prednisolone and HAART groups are probably much longer infected with HIV (median of 9 years in both HAART groups and median of 5 years in the prednisolone-only group) than patients in the no-treatment group (median of 2 years) (Table 1).

Values represent medians [interquartile range as 25%-75% percentile]. *) As the number of elite controllers in this study is only 3, all three single values are depicted instead of the median. Cutoff for viral load (VL) for all patients is 40 copies/ml plasma, except for the three patients (elite controllers) derived from H. Klinker with a detection limit of 50 copies/ml. Values in double brackets [[x]] represent VL of individual HAART-treated patients with detectable VL. **) For 7 patients treated with HAART+prednisolone the exact time of prednisolone treatment was unknown but their medical records

Table 1 Patient characteristics

Treatment group	Untreated (n = 10)	Prednisolone (n = 27)	HAART	Prednisolone/HAART	no treatment, elite controllers
number of patients	10	27	30	31	3
age in years	39 [28.0-50.5]	38 [32.0-47.0]	47 [42.5-61.0]	48 [40.0-58.0]	28, 43, 56*
sex m/f	9 m/1 f	22 m/5 f	24 m/6 f	23 m/8 f	2 m/1 f
time since first HIV diagnosis in years	2 [1.0-4.0]	5 [3.0-13.0]	9 [4.5-16.0]	9 [3.0-14.0]	3, 15, 21*
prednisolone treatment in years	n.a.	2.3 [1.2-3.5]	n.a.	5 [2.0-5.7]**	n.a.
viral load (RNA copies/ml plasma)	1.1×10^5 [0.5- 12.2×10^5]	0.8×10^5 [0.2- 42.4×10^5]	27 undetectable, others [[46;66;191]]	25 undetectable, others: [[41; 46; 63; 74; 131; 1085]]	undetectable
CD4+ counts (cells/ μ l)	520 [350-670]	550 [460-700]	465[320-655]	390[280-600]	284, 554, 892*

documented treatment for more than 5 years. For the calculation of the median, the time of treatment for these patients was set to 5 years

Viral load

Patients in the no-treatment and prednisolone-treatment groups presented with comparable amounts of viral load (medians 1.1×10^5 and 0.8×10^5 , respectively) (Table 1). Most of the patients who received HAART (both in combination with or absence of prednisolone) had undetectable viral load (below 40-50 copies/ml).

CD38-expression on T cells

T cell activation was studied by flow cytometric analysis of whole blood stained with anti-CD3/CD8/CD38. CD3-positive/CD8-negative cells were scored as CD4-positive T lymphocytes. Patients in the prednisolone group exhibited statistically significant lower activation of CD8 + T cells than patients in the untreated group patients (median 55.40% [percentile range 48.76-67.70] versus 73.34% [65.21-78.92], $p = 0.0011$). (Figure 1A). The lowest activation rates were measured in HAART and HAART+prednisolone-treated patients (median 22.07% [15.49-38.27] versus 28.85% [20.69-36.87]) and prednisolone comedication had no detectable effect on CD8-activation in HAART-treated patients ($p = 0.2515$). CD38-expression on CD8 T cells in patients receiving HAART was similar to CD38 expression in "elite controllers" but due to the very limited number of patients in this group (n = 3) we will not go into further details.

Prednisolone medication had apparently no effect on CD38 expression in CD8-negative T cells, independent of whether patients received prednisolone in the absence or presence of HAART (Figure 1B)

sCD14 and LBP

In order to determine the effects of low-dose prednisolone on monocyte activation associated with the LPS-response, we analyzed levels of soluble CD14 (sCD14)

and LPS-binding protein (LBP). We found significantly lower concentrations of plasma sCD14 in patients treated with prednisolone alone compared to untreated patients (3.6 μ g/ml [2.78-5.12] vs. 6.11 μ g/ml [4.58-7.70]; $p = 0.0048$) (Figure 2A). No effects attributable to prednisolone could be observed in HAART-treated patients. Similar to what we found for sCD14 levels, patients in the prednisolone-only group showed significantly lower LBP-levels compared to untreated patients (2.18 ng/ml [1.59-2.87] vs. 3.45 ng/ml [1.84-5.03]; $p = 0.0386$) (Figure 2B), and again no additional effects related to prednisolone were observed in HAART-treated patients.

suPAR and sCD40L

Comparing patients treated with prednisolone alone and untreated patients, significantly lower concentrations of plasma suPAR levels were detected in prednisolone-treated patients (2.17 μ g/ml [1.65-2.81] vs. 2.56 μ g/ml [2.24-4.26]; $p = 0.0351$) as well as a strong trend towards lower levels of sCD40L (2.70 pg/ml [1.90-4.00] vs. 3.60 pg/ml [2.95-5.30]; $p = 0.0782$) (Figure 3B). In the presence of HAART, no effects attributable to prednisolone could be observed for the two markers (Figure 3A, B).

CD4 T cell counts, CD4/CD8 ratio and naïve cells

As depicted in Figure 4A, patients treated with prednisolone-only presented with CD4+ T cell counts comparable to untreated patients (550 cells/ μ l [460-700] vs. 520 cells/ μ l [350-670]; $p = 0.7067$). Patients treated with HAART or HAART/prednisolone exhibited a trend towards lower CD4 T cell counts compared to therapy naïve and prednisolone-treated patients. The CD4/CD8 ratio in prednisolone-only-treated patients was significantly decreased compared to treatment-naïve patients (ratio 0.46 [0.38-0.72] vs. ratio 0.755 [0.55-0.97]), and comparable to HAART and HAART/prednisolone-treated patients (Figure 4B). As the CD4+ T cell counts in prednisolone-treated and naïve patients are similar

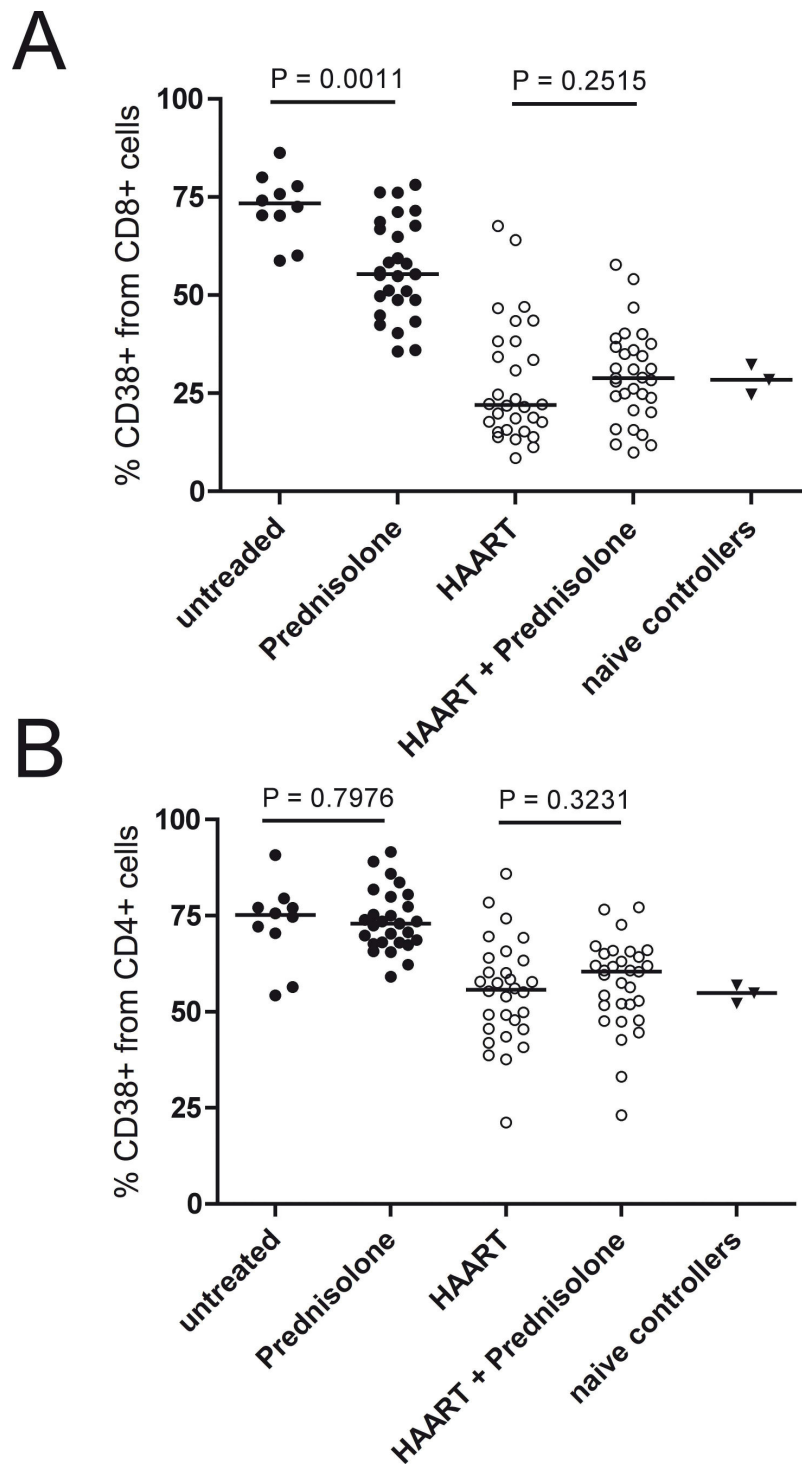


Figure 1 Prednisolone medication in untreated HIV infection is associated with lower CD8+ T cell activation. Whole blood from donors of different treatment groups was stained with fluorescent dye-coupled anti-CD3, anti-CD8 and anti-CD38 antibodies. Cells were analyzed by flow cytometry after erythrocyte lysis. Lymphocytes were gated in a FSC/SSC scatter. CD3+/CD8+ cells from the lymphocyte gate were scored as CD8+ T cells, CD3+/CD8- cells were scored as CD4+ T cells. Horizontal bars represents medians. Statistical analysis was performed using a Mann-Whitney *U* test. **A:** Percentage of CD8+ T cells expressing CD38. **B:** Percentage of CD4+ T cells expressing CD38

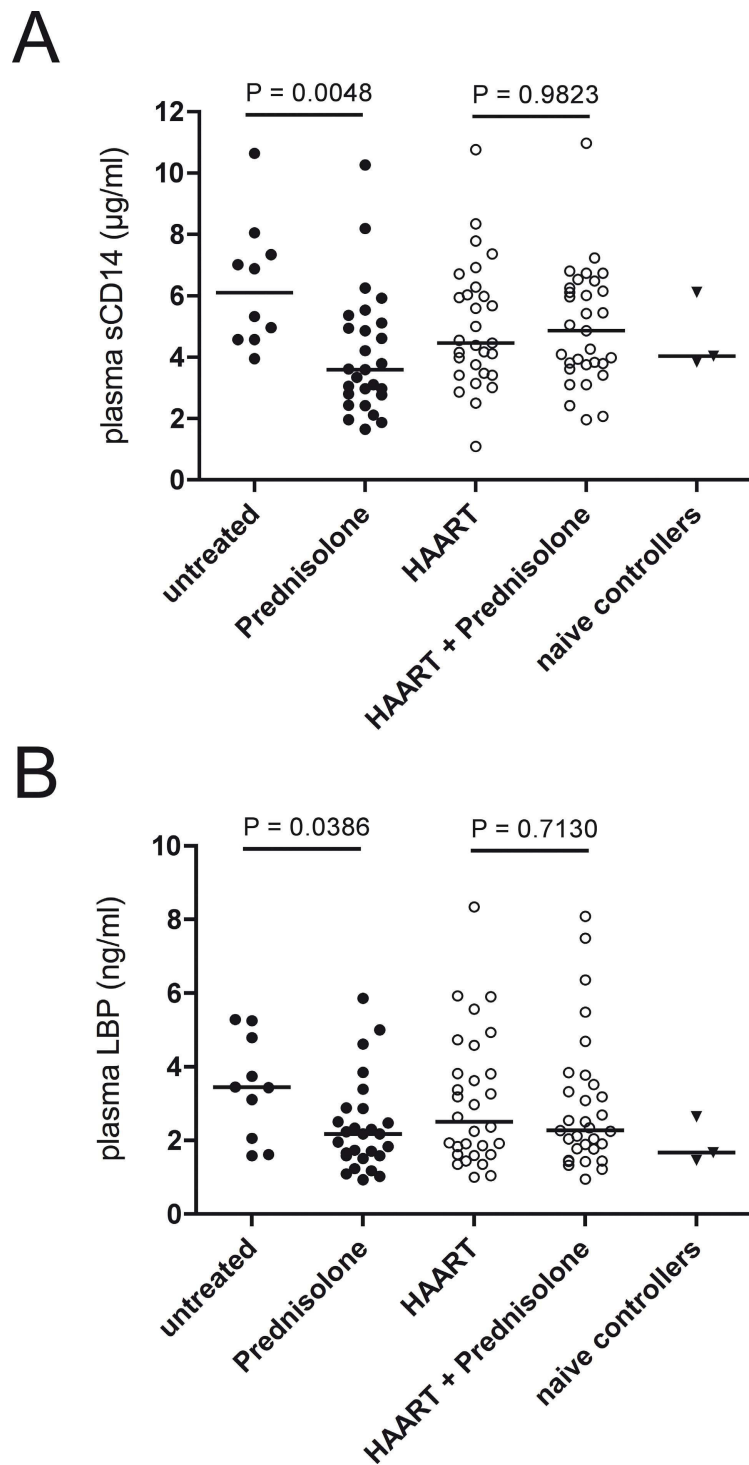


Figure 2 Prednisolone medication in untreated HIV infection is associated with lower monocyte activation. sCD14 and LBP concentrations were determined by ELISA from plasma from donors of different treatment groups. Horizontal bars represents medians. Statistical analysis was performed using a Mann-Whitney *U* test. **A:** Plasma concentrations of sCD14. **B:** Plasma concentrations of LBP.

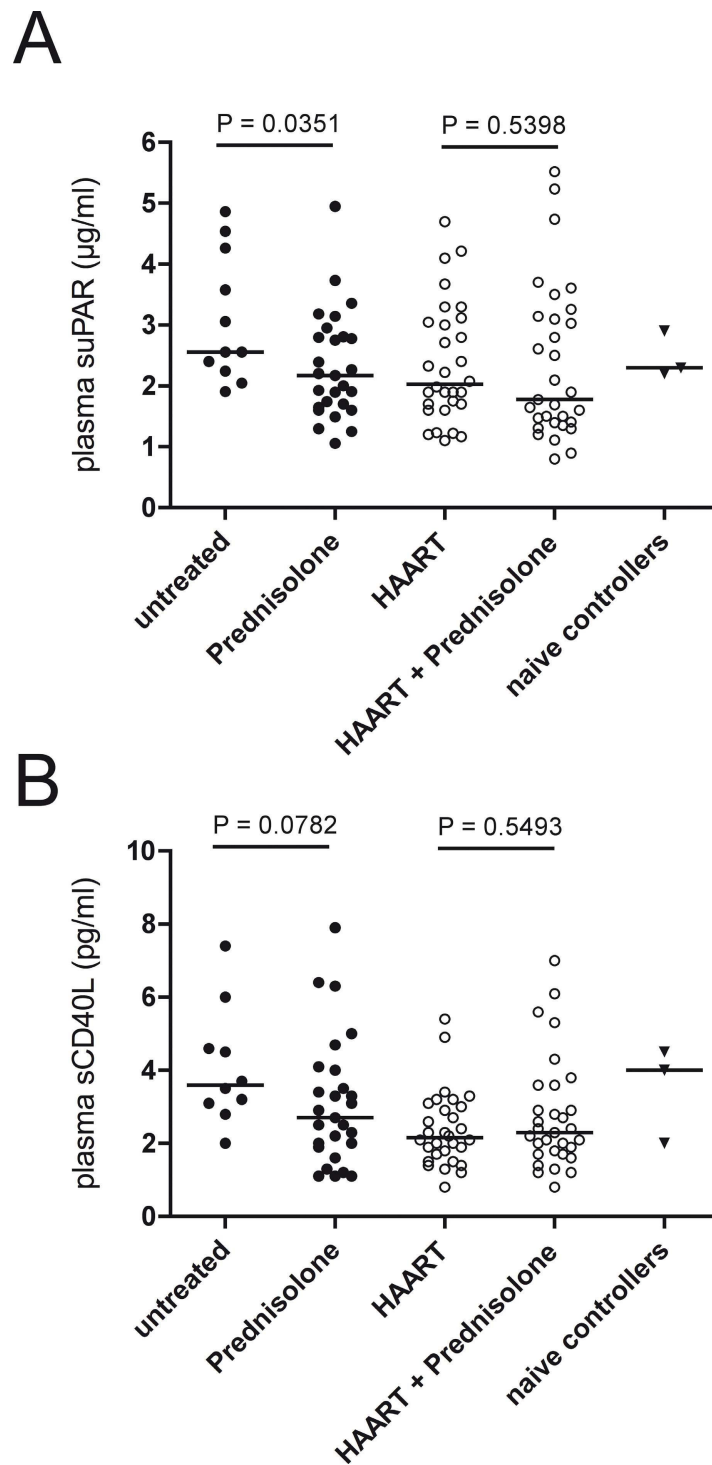
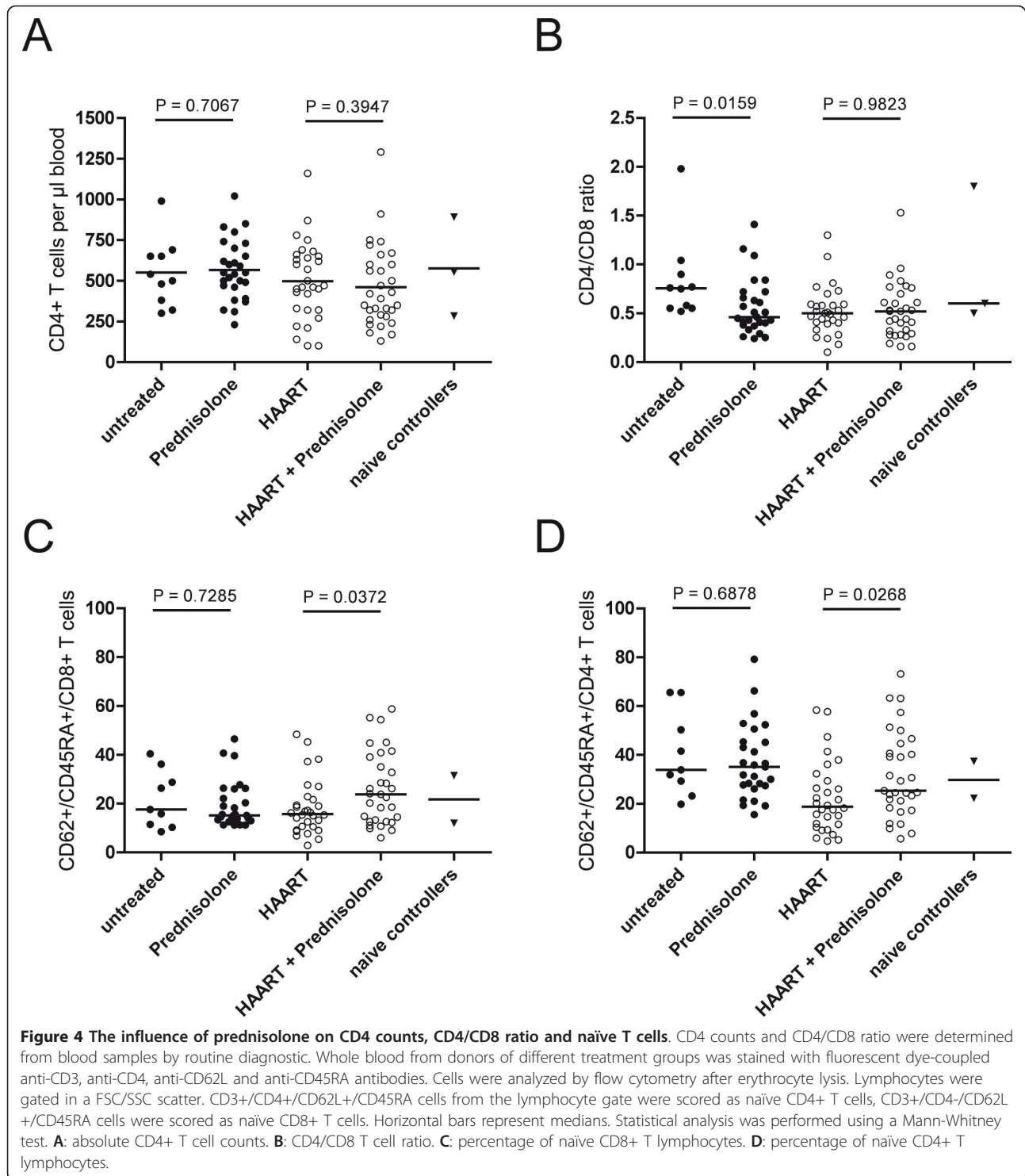


Figure 3 Prednisolone medication in untreated HIV infection is associated with lower inflammation. Concentrations of suPAR and sCD40L were determined by ELISA from plasma from donors of different treatment groups. Horizontal bars represents medians. Statistical analysis was performed using a Mann-Whitney test *U*-test. **A:** suPAR. **B:** sCD40L.



(Figure 4 A), the decrease of the observed CD4/CD8 ratio in prednisolone-treated patients reflects a relative increase of the CD8+ T cell population. This increase could be a direct consequence of the observed reduced immune activation of this population (Figure 1A), which may translate into reduced turnover rates.

In patients treated with HAART, prednisolone-medication was associated with a significantly higher percentage of memory (CD62L+/CD45RA+) CD8+ T cells (23.8% [12.6 - 39.1] vs. 15.8% [9.84-22.25]; $p = 0.0372$) (Figure 4C) and memory CD4+ T cells (25.4% [18.3 - 44.6] vs. 18.8% [10.9-30.85]; $p = 0.0268$) (Figure 4D). No

effects attributable to prednisolone on the frequency of naive T cells were detected between untreated and prednisolone-only-treated patients.

Discussion

In this study we investigated factors of general immune activation associated with HIV disease progression, and we found significantly lower values in patients receiving prednisolone compared to untreated patients, suggesting that prednisolone may have beneficial effects on immunological correlates of HIV disease progression in otherwise untreated patients. In patients treated with HAART, no additional beneficial effects attributable to prednisolone could be observed. The immune-modulating activity of prednisolone in otherwise untreated patients described in this manuscript is in line with previous observations, reported by Andrieu et al., who observed in an uncontrolled, open-label study an increase in CD4+ T cell counts following administration of 0.3-0.5 mg/kg prednisolone over a period of 12 months [31]. Prednisolone treatment (with a concentration about 4-8 times higher than in our study) was accompanied by a reduction of immune activation. Patients were encouraged to continue 0.3 mg/kg prednisolone as follow up-medication as long as their CD4+ T cell levels remained above baseline levels. Follow-up prednisolone treatment postponed CD4+ T cell decrease (relative to baseline levels) by two years [32]. A few patients experienced relatively mild prednisolone-associated side effects such as face swelling, an increase in body weight and elevated blood pressure.

In another, randomized, placebo-controlled trial, prednisolone was given for 8 weeks with a decreasing dose from 50 mg to 15 mg per day; the main outcome was survival [33]. Elliot and colleagues observed only a trend towards better survival in prednisolone-treated patients compared to HIV controls (21 versus 25 deaths per 100 person years; difference statistically not significant) but a statistically significant increase in the incidence of Kaposi sarcoma (4.2 versus 0 cases per 100 person years). The study population was not being stratified for HHV-8 seropositivity, the causative factor of Kaposi sarcoma, and HHV-8 infection status was not being analyzed. (In another short-term randomized, placebo-controlled trial studying the effects of prednisolone on effusive tuberculous pericarditis in HIV-infected individuals, with a similar dosage and time scale [60 mg starting dose, tapered with 10 mg per week until completion at the sixth week], three cases of Kaposi sarcoma were observed among the 58 study participants and all of them received placebo [34].) The main difference in the treatment regime towards other studies, including ours, is the relative short duration of prednisolone treatment of only 8 weeks, which may hamper the observation of a

therapeutic benefit with the primary endpoint of survival.

Two other randomized, placebo-controlled trials investigated the effects of prednisolone on HIV-infection in the presence of HAART. In a study with a dose of 0.5 mg per kg body weight per day given for 8 weeks, a decrease in CD8+/CD38+ cells was reported with no changes in viral load and CD4+ cell counts [35]. In partial contrast to this, a fixed daily dose of 40 mg prednisolone was given for 8 weeks in another trial, resulting in an increase of CD4+ counts compared to baseline values of 40%, but no changes in HLADR/CD38-positive CD8 cells and naive T cells (CD45RA+/CD62L+) were reported [36].

We have previously analyzed the CD4+ cell counts of some of our patients in a longitudinal observational study and found that long-term treatment with low-dose prednisolone is safe and - similar to what has been found by Andrieu et al. [31] - associated with a postponement of CD4+ T cell loss by about 2 years relative to baseline values [29,30]. Our present study may offer a mechanistic explanation for the T cell preserving activity of low-dose prednisolone, i.e. by reducing general immune activation. Unfortunately, the previously described CD4+ T cell preserving activity of prednisolone cannot be directly addressed in this study (although a trend towards higher counts in prednisolone-treated patients was visible), as this would require a longitudinal analysis and probably also a more homogenous patient sample with respect to time to infection and therapy initiation.

The strong association between general immune activation and HIV disease progression is also seen in studies investigating the effects of HAART on immune activation. Similar to what we found in our study, HAART does not only suppress virus replication but also reduces immune activation [18-20]. In some patients - the so-called virological nonresponders - HAART fails to suppress virus replication but effectively restores immune activation and CD4 T cell counts [37]. On the other hand, immunological nonresponders, who do not regenerate helper T cell counts despite HAART-mediated suppression of virus replication, show enhanced immune activation [38]. Massanella et al. reported in a cross sectional study that patients with limited CD4 T-cell repopulation under HAART exhibited high T-cell activation rates (CD38+, HLA-DR+), suggesting that immunomodulating strategies should be envisaged to treat discordant patients [39].

General immune activation not only correlates with progression of immunodeficiency, but also with neurological complications of HIV infection. HIV patients with cognitive impairment or brain atrophy exhibit more elevated sCD14 levels than neurologically asymptomatic

HIV-positive controls [40]. This link between monocyte activation and the neurological complications of HIV infection fits well into the overall picture in which microglia activation has been identified as a correlate with immunodeficiency virus-mediated neuropathy [41,42].

Due to the non-prospective and non-randomized design of our study, our findings should be interpreted with caution, as potential yet undiscovered confounding mechanisms may have biased the result. Moreover, the low sample size of our study is relatively low and differences in individual viral loads (although not statistically significant between untreated and prednisolone-treated patients) are possible limitations. As we found significantly lower immune activation in patients treated with prednisolone compared to untreated patients, the critical reader might object that this difference might have been caused by an unintended enrichment of natural slow-progressors in the group of prednisolone-treated patients over time, who would lower the average immune activation in this group due to intrinsically lower immune activation in these patients. (The argument in this case would be that patients who progressed under prednisolone sooner or later would have left this group to become treated with HAART. Hence, over time, patients with an intrinsic slower disease progression would have become enriched in this group. At a closer look, this mechanism would, however, also apply for patients in the untreated group - compared to which prednisolone-treated patients exhibited significantly lower activation.) We therefore checked whether there is any correlation in prednisolone-treated patients between immune activation (CD8/CD38, sCD14, LBP, suPAR) and the duration of prednisolone medication or the (known) time of infection and found no correlation whatsoever for any of the markers (P values of correlations ranged between 0.2748 and 0.9399, data not shown). These findings suggest that a prednisolone-independent enrichment over time of slow-progressing patients in this group has not taken place, otherwise one should have expected to observe lower levels of immune activation in patients with longer treatment times.

As for the absence of detectable effects of prednisolone in HAART-treated patients in almost all analyzed parameters in this study, this may well be attributed to the heterogeneity of the patients (differences in CD4 counts, time to infection), differences in the composition of individual antiretroviral regimens that may have different effects on immune activation or to the low dose of prednisolone used. Further studies specifically addressing the effects of prednisolone in the presence of HAART looking at more homogenous patient groups are therefore needed. Studying the effects of immune

modulators in the presence of HAART (in contrast to immune modulators preceding HAART) is of particular interest, since there is residual immune activation in HAART-treated patients associated with accelerated disease progression [25].

In countries with lesser access to (and therefore later onset of) HAART, prednisolone medication preceding antiretroviral treatment might be considered as a supplement regimen in HIV therapy, provided that prednisolone-mediated immune modulation is safe and translates into a clinical benefit for the patients. In order to address this question, we are currently performing a randomized, double-blinded, placebo-controlled clinical trial to assess the effects of low-dose prednisolone on immune activation and HIV disease progression in otherwise treatment-naïve patients, recruiting 326 patients in Tanzania (trial name: "Pro-Cort1"; registry: <http://ClinicalTrials.gov>; registration number: NCT01299948). Recruitment is now completed and first results will be available soon.

Conclusions

General immune activation is considered to be a key factor for HIV disease progression and the results of our study indicate that treatment with low-dose prednisolone may reduce this activation. Further studies are required to analyze whether attenuation of immune activation achieved by immunomodulatory substances translates into clinical benefit for the patients.

List of abbreviations

AIDS: acquired immunodeficiency syndrome; EDTA: ethylene-diamin tetraacetic acid; ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay; FCS/SSC: forward scatter/sideward scatter; HAART: highly-active antiretroviral therapy; HHV-8: human herpesvirus 8; HIV: human immunodeficiency virus; LBP: LPS-binding protein; LPS: lipopolysaccharide; PBMC: peripheral blood mononuclear cells; SIV: simian immunodeficiency virus; suPAR: soluble urokinase plasminogen activator receptor

Acknowledgements

We thank Ingeborg Euler-König, Waltraud Tüchel and Cornelia Meinhold for excellent technical assistance. The study was supported by grants from the "Deutsche Forschungsgemeinschaft" (GRK 1522/1, SCHM1703/3-1), the ELAN funds (VI-08-06.18.1) and the "Gesellschaft für AIDS-Forschung". C.K. was supported by the "Evangelisches Studienwerk e.V. Villigst". A. Ulmer and B. Schmidt are members of the German competence network HIV/AIDS. Publication costs were covered by the Deutsche Forschungsgemeinschaft <http://www.dfg.de> and the University of Würzburg <http://www.uni-wuerzburg.de> by the funding programme "Open Access Publishing." The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Author details

¹University of Würzburg, Institute of Virology und Immunobiology, 97078 Würzburg, Germany. ²HIV-Intensive Care Unit, Schwabstr. 26, 70197 Stuttgart, Germany. ³Institute of Virology, Clinical and Molecular Virology, National Reference Center for Retroviruses, University of Erlangen-Nuernberg, Erlangen, Germany. ⁴Medical Mission Institute, Department of Tropical Medicine, 97067 Würzburg, Germany. ⁵University of Würzburg, Medical Clinic and Policlinic II, Josef-Schneider-Str. 2, 97080 Würzburg, Germany. ⁶Bugando Medical Center, Mwanza, Tanzania.

Authors' contributions

CK, AU, AS, SK and CS participated in the design and coordination of the study. CK, ND, BS, and CS carried out the immune activation studies. BS and CS performed the statistical analysis. CK, AU, BS, AS, HK, EK, AR and CS drafted the manuscript and CS wrote its final version. All authors read and approved the final manuscript.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Received: 1 August 2011 Accepted: 20 January 2012

Published: 20 January 2012

References

- Deeks SG, Kitchen CM, Liu L, Guo H, Gascon R, Narvaez AB, Hunt P, Martin JN, Kahn JO, Levy J, et al: Immune activation set point during early HIV infection predicts subsequent CD4+ T-cell changes independent of viral load. *Blood* 2004, **104**(4):942-947.
- Giorgi JV, Hultin LE, McKeating JA, Johnson TD, Owens B, Jacobson LP, Shih R, Lewis J, Wiley DJ, Phair JP, et al: Shorter survival in advanced human immunodeficiency virus type 1 infection is more closely associated with T lymphocyte activation than with plasma virus burden or virus chemokine coreceptor usage. *J Infect Dis* 1999, **179**(4):859-870.
- Hazenber MD, Otto SA, van Benthem BH, Roos MT, Coutinho RA, Lange JM, Hamann D, Prins M, Miedema F: Persistent immune activation in HIV-1 infection is associated with progression to AIDS. *AIDS* 2003, **17**(13):1881-1888.
- Fauci AS: Multifactorial nature of human immunodeficiency virus disease: implications for therapy. *Science* 1993, **262**(5136):1011-1018.
- Jiang W, Lederman MM, Hunt P, Sieg SF, Haley K, Rodriguez B, Landay A, Martin J, Sinclair E, Asher AI, et al: Plasma Levels of Bacterial DNA Correlate with Immune Activation and the Magnitude of Immune Restoration in Persons with Antiretroviral-Treated HIV Infection. *J Infect Dis* 2009, **199**(8):1177-1185.
- Brenchley JM, Price DA, Schacker TW, Asher TE, Silvestri G, Rao S, Kazzaz Z, Bornstein E, Lambotte O, Altmann D, et al: Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. *Nat Med* 2006, **12**(12):1365-1371.
- Kitchens RL, Thompson PA: Modulatory effects of sCD14 and LBP on LPS-host cell interactions. *J Endotoxin Res* 2005, **11**(4):225-229.
- Cohen J: The immunopathogenesis of sepsis. *Nature* 2002, **420**(6917):885-891.
- Lien E, Aukrust P, Sundan A, Muller F, Froland SS, Espevik T: Elevated levels of serum-soluble CD14 in human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infection: correlation to disease progression and clinical events. *Blood* 1998, **92**(6):2084-2092.
- Ostrowski SR, Piironen T, Hoyer-Hansen G, Gerstoft J, Pedersen BK, Ullum H: High plasma levels of intact and cleaved soluble urokinase receptor reflect immune activation and are independent predictors of mortality in HIV-1-infected patients. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2005, **39**(1):23-31.
- van Kooten C, Banchereau J: CD40-CD40 ligand. *J Leukoc Biol* 2000, **67**(1):2-17.
- Mazzei GJ, Edgerton MD, Losberger C, Lecoanet-Henchoz S, Graber P, Durandy A, Gauchat JF, Bernard A, Allet B, Bonnefoy JY: Recombinant soluble trimeric CD40 ligand is biologically active. *J Biol Chem* 1995, **270**(13):7025-7028.
- Sipsas NV, Sfikakis PP, Kontos A, Kordossis T: Levels of soluble CD40 ligand (CD154) in serum are increased in human immunodeficiency virus type 1-infected patients and correlate with CD4(+) T-cell counts. *Clin Diagn Lab Immunol* 2002, **9**(3):558-561.
- Pandrea I, Onanga R, Kornfeld C, Rouquet P, Bourry O, Clifford S, Telfer PT, Abernethy K, White LT, Ngari P, et al: High levels of SIVmnd-1 replication in chronically infected *Mandrillus sphinx*. *Virology* 2003, **317**(1):119-127.
- Silvestri G, Sodora DL, Koup RA, Paiardini M, O'Neil SP, McClure HM, Staprans SI, Feinberg MB: Nonpathogenic SIV infection of sooty mangabeys is characterized by limited bystander immunopathology despite chronic high-level viremia. *Immunity* 2003, **18**(3):441-452.
- Autran B, Carcelain G, Li TS, Blanc C, Mathez D, Tubiana R, Katlama C, Debre P, Leibowitch J: Positive effects of combined antiretroviral therapy on CD4+ T cell homeostasis and function in advanced HIV disease. *Science* 1997, **277**(5322):112-116.
- Lederman MM, Connick E, Landay A, Kuritzkes DR, Spritzler J, St Clair M, Kotzin BL, Fox L, Chiozzi MH, Leonard JM, et al: Immunologic responses associated with 12 weeks of combination antiretroviral therapy consisting of zidovudine, lamivudine, and ritonavir: results of AIDS Clinical Trials Group Protocol 315. *J Infect Dis* 1998, **178**(1):70-79.
- Bisset LR, Cone RW, Huber W, Battegay M, Vernazza PL, Weber R, Grob PJ, Opravil M: Highly active antiretroviral therapy during early HIV infection reverses T-cell activation and maturation abnormalities. *Swiss HIV Cohort Study. AIDS* 1998, **12**(16):2115-2123.
- Dyrhol-Riise AM, Voltersvik P, Olofsson J, Asjo B: Activation of CD8 T cells normalizes and correlates with the level of infectious provirus in tonsils during highly active antiretroviral therapy in early HIV-1 infection. *AIDS* 1999, **13**(17):2365-2376.
- Gray CM, Schapiro JM, Winters MA, Merigan TC: Changes in CD4+ and CD8+ T cell subsets in response to highly active antiretroviral therapy in HIV type 1-infected patients with prior protease inhibitor experience. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1998, **14**(7):561-569.
- Silvestri G, Munoz C, Butini L, Bagnarelli P, Montroni M: Changes in CD8 cell subpopulations induced by antiretroviral therapy in human immunodeficiency virus infected patients. *Viral Immunol* 1997, **10**(4):207-212.
- Gandhi RT, Spritzler J, Chan E, Asmuth DM, Rodriguez B, Merigan TC, Hirsch MS, Shafer RW, Robbins GK, Pollard RB: Effect of baseline- and treatment-related factors on immunologic recovery after initiation of antiretroviral therapy in HIV-1-positive subjects: results from ACTG 384. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2006, **42**(4):426-434.
- Gazzola L, Tincati C, Bellistri GM, Monforte A, Marchetti G: The absence of CD4+ T cell count recovery despite receipt of virologically suppressive highly active antiretroviral therapy: clinical risk, immunological gaps, and therapeutic options. *Clin Infect Dis* 2009, **48**(3):328-337.
- Goicoechea M, Smith DM, Liu L, May S, Tenorio AR, Ignacio CC, Landay A, Haubrich R: Determinants of CD4+ T cell recovery during suppressive antiretroviral therapy: association of immune activation, T cell maturation markers, and cellular HIV-1 DNA. *J Infect Dis* 2006, **194**(1):29-37.
- Hunt PW, Martin JN, Sinclair E, Bredt B, Hagos E, Lampiris H, Deeks SG: T cell activation is associated with lower CD4+ T cell gains in human immunodeficiency virus-infected patients with sustained viral suppression during antiretroviral therapy. *J Infect Dis* 2003, **187**(10):1534-1543.
- Hunt PW, Martin JN, Sinclair E, Epling L, Teague J, Jacobson MA, Tracy RP, Corey L, Deeks SG: Valganciclovir reduces T cell activation in HIV-infected individuals with incomplete CD4+ T cell recovery on antiretroviral therapy. *J Infect Dis* 2011, **203**(10):1474-1483.
- Valdez H, Connick E, Smith KY, Lederman MM, Bosch RJ, Kim RS, St Clair M, Kuritzkes DR, Kessler H, Fox L, et al: Limited immune restoration after 3 years' suppression of HIV-1 replication in patients with moderately advanced disease. *AIDS* 2002, **16**(14):1859-1866.
- Lohse N, Hansen AB, Pedersen G, Kronborg G, Gerstoft J, Sorensen HT, Vaeth M, Obel N: Survival of persons with and without HIV infection in Denmark, 1995-2005. *Ann Intern Med* 2007, **146**(2):87-95.
- Ulmer A, Muller M, Bertisch-Mollenhoff B, Frietsch B: Low-dose prednisolone has a CD4-stabilizing effect in pre-treated HIV-patients during structured therapy interruptions (STI). *Eur J Med Res* 2005, **10**(6):227-232.
- Ulmer A, Muller M, Bertisch-Mollenhoff B, Frietsch B: Low dose prednisolone reduces CD4+ T cell loss in therapy-naive HIV-patients without antiretroviral therapy. *Eur J Med Res* 2005, **10**(3):105-109.
- Andrieu JM, Lu W, Levy R: Sustained increases in CD4 cell counts in asymptomatic human immunodeficiency virus type 1-seropositive patients treated with prednisolone for 1 year. *J Infect Dis* 1995, **171**(3):523-530.
- Andrieu JM, Lu W: Long-term clinical, immunologic and virologic impact of glucocorticoids on the chronic phase of HIV infection. *BMC Med* 2004, **2**:17.
- Elliott AM, Luzze H, Quigley MA, Nakiyingi JS, Kyaligonza S, Namujji PB, Ducar C, Ellner JJ, Whitworth JA, Mugerwa R, et al: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of the use of prednisolone as an adjunct to treatment in HIV-1-associated pleural tuberculosis. *J Infect Dis* 2004, **190**(5):869-878.

34. Hakim JG, Ternouth I, Mushangi E, Siziya S, Robertson V, Malin A: **Double blind randomised placebo controlled trial of adjunctive prednisolone in the treatment of effusive tuberculous pericarditis in HIV seropositive patients.** *Heart* 2000, **84**(2):183-188.
35. McComsey GA, Whalen CC, Mawhorter SD, Asaad R, Valdez H, Patki AH, Klaumunzner J, Gopalakrishna KV, Calabrese LH, Lederman MM: **Placebo-controlled trial of prednisone in advanced HIV-1 infection.** *AIDS* 2001, **15**(3):321-327.
36. Wallis RS, Kalayjian R, Jacobson JM, Fox L, Purdue L, Shikuma CM, Arakaki R, Snyder S, Coombs RW, Bosch RJ, *et al*: **A study of the immunology, virology, and safety of prednisone in HIV-1-infected subjects with CD4 cell counts of 200 to 700 mm⁻³.** *J Acquir Immune Defic Syndr* 2003, **32**(3):281-286.
37. Weiss L, Burgard M, Cahen YD, Chaix ML, Laureillard D, Gilquin J, Piketty C, Viard JP, Kazatchkine MD, Girard PM, *et al*: **Immunological and virological features of HIV-infected patients with increasing CD4 cell numbers despite virological failure during protease inhibitor-based therapy.** *HIV Med* 2002, **3**(1):12-20.
38. Aiuti F, Mezzaroma I: **Failure to reconstitute CD4+ T-cells despite suppression of HIV replication under HAART.** *AIDS Rev* 2006, **8**(2):88-97.
39. Massanella M, Negro E, Perez-Alvarez N, Puig J, Ruiz-Hernandez R, Bofill M, Clotet B, Blanco J: **CD4 T-cell hyperactivation and susceptibility to cell death determine poor CD4 T-cell recovery during suppressive HAART.** *AIDS* 2010, **24**(7):959-968.
40. Ryan LA, Zheng J, Brester M, Bohac D, Hahn F, Anderson J, Ratanasuwan W, Gendelman HE, Swindells S: **Plasma levels of soluble CD14 and tumor necrosis factor-alpha type II receptor correlate with cognitive dysfunction during human immunodeficiency virus type 1 infection.** *J Infect Dis* 2001, **184**(6):699-706.
41. Meisner F, Neuen-Jacob E, Sopper S, Schmidt M, Schlamme S, Scheller C, Vosswinkel D, Ter Meulen V, Riederer P, Koutsilieri E: **Disruption of excitatory amino acid transporters in brains of SIV-infected rhesus macaques is associated with microglia activation.** *J Neurochem* 2008, **104**(1):202-209.
42. Gonzalez-Scarano F, Martin-Garcia J: **The neuropathogenesis of AIDS.** *Nat Rev Immunol* 2005, **5**(1):69-81.

Pre-publication history

The pre-publication history for this paper can be accessed here:
<http://www.biomedcentral.com/1471-2334/12/14/prepub>

doi:10.1186/1471-2334-12-14

Cite this article as: Kasang *et al.*: HIV patients treated with low-dose prednisolone exhibit lower immune activation than untreated patients. *BMC Infectious Diseases* 2012 **12**:14.

**Submit your next manuscript to BioMed Central
and take full advantage of:**

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



HIV Drug Resistance (HIVDR) in Antiretroviral Therapy-Naïve Patients in Tanzania Not Eligible for WHO Threshold HIVDR Survey Is Dramatically High

Christa Kasang¹, Samuel Kalluvya^{2,3}, Charles Majinge², August Stich⁴, Jochen Bodem¹, Gilbert Kongola³, Graeme B. Jacobs¹, Mathias Mlewa², Miriam Mildner¹, Irina Hensel¹, Anne Horn¹, Wolfgang Preiser⁵, Gert van Zyl⁵, Hartwig Klinker⁶, Eleni Koutsilieri¹, Axel Rethwilm¹, Carsten Scheller^{1*}, Benedikt Weissbrich¹

1 Institute of Virology and Immunobiology, University of Würzburg, Würzburg, Germany, **2** Bugando Medical Centre, Mwanza, Tanzania, **3** BUCHS, Mwanza, Tanzania, **4** Medical Mission Institute, Würzburg, Germany, **5** Division of Medical Virology, Department of Pathology, National Health Laboratory Service, University of Stellenbosch, Cape Town, South Africa, **6** Division of Infectious Diseases, Department of Internal Medicine, University of Würzburg, Würzburg, Germany

Abstract

Background: The World Health Organization (WHO) has recommended guidelines for a HIV drug resistance (HIVDR) survey for resource-limited countries. Eligibility criteria for patients include age below 25 years in order to focus on the prevalence of transmitted HIVDR (tHIVDR) in newly-infected individuals. Most of the participating sites across Africa have so far reported tHIVDR prevalences of below 5%. In this study we investigated whether the rate of HIVDR in patients <25 years is representative for HIVDR in the rest of the therapy-naïve population.

Methods and Findings: HIVDR was determined in 88 sequentially enrolled ART-naïve patients from Mwanza, Tanzania (mean age 35.4 years). Twenty patients were aged <25 years and 68 patients were aged 25–63 years. The frequency of HIVDR in the study population was 14.8% (95% CI 0.072–0.223) and independent of NVP-resistance induced by prevention of mother-to-child transmission programs. Patients >25 years had a significantly higher HIVDR frequency than younger patients (19.1%; 95% CI 0.095–0.28) versus 0%, $P=0.0344$). In 2 out of the 16 patients with HIVDR we found traces of antiretrovirals (ARVs) in plasma.

Conclusions: ART-naïve patients aged over 25 years exhibited significantly higher HIVDR than younger patients. Detection of traces of ARVs in individuals with HIVDR suggests that besides transmission, undisclosed misuse of ARVs may constitute a significant factor in the generation of the observed high HIVDR rate. The current WHO tHIVDR survey that is solely focused on the transmission of HIVDR and that excludes patients over 25 years of age may therefore result in substantial underestimation of the prevalence of HIVDR in the therapy-naïve population. Similar studies should be performed also in other areas to test whether the so far reported optimistic picture of low HIVDR prevalence in young individuals is really representative for the rest of the ART-naïve HIV-infected population.

Citation: Kasang C, Kalluvya S, Majinge C, Stich A, Bodem J, et al. (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(8): e23091. doi:10.1371/journal.pone.0023091

Editor: Esper Georges Kallas, University of Sao Paulo, Brazil

Received: February 22, 2011; **Accepted:** July 5, 2011; **Published:** August 19, 2011

Copyright: © 2011 Kasang et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: The study was funded by Deutsche Forschungsgemeinschaft (www.dfg.de; DFG IRTG 1522), German Leprosy and Tuberculosis Relief Association (www.dahw.de), Evangelisches Studienwerk e.V. Villigst (www.evstudienwerk.de), Deutscher Akademischer Austauschdienst (www.daad.de), Bayerische Staatsregierung (www.bayern.de), and Gesellschaft für AIDS-Forschung e.V. (Göttingen, no URL). Publication costs were covered by Deutsche Forschungsgemeinschaft (www.dfg.de) and the University of Würzburg (www.uni-wuerzburg.de) by the funding programme "Open Access Publishing." The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: scheller@vim.uni-wuerzburg.de

Introduction

The World Health Organization (WHO), together with the Joint United Nations Programme on AIDS (UNAIDS) and other partners pursue the goal of providing worldwide access to ART [1]. In most African countries the ART roll-out [2] takes place in a context of a medical infrastructure with limited resources and a low number of available antiretroviral drugs and HIV infection is treated with standardised first- and second-line ART regimens.

Since 2004, a nation-wide care and treatment program has been implemented for HIV-infected individuals in Tanzania.

Patients receive their antiretroviral medication free of charge in more than 200 nationwide Care and Treatment Centers (CTCs) and by the end of 2007 more than 165,000 eligible patients have been started on ART. Patients eligible for ART belong to one of the following three groups: a) patients with WHO clinical stage irrespective of their CD4 counts, b) patients with WHO clinical stage 3 and CD4 counts below 350/ml and c) all patients with CD4 counts <200/ml, regardless of their clinical symptoms [3]. The first-line regimens consist of a combination of zidovudine/lamivudine (AZT/3TC) or stavudine/lamivudine (d4T/3TC) together with nevirapine (NVP) or efavirenz (EFV). After therapy

failure, a second-line regimen that includes abacavir/didanosine (ABC/ddI) in combination with liponavir or saquinavi boosted with ritonavir (LPV/r or SQV/r) is used [3]. Neither viral load monitoring nor resistance testing are routinely done. HIV-positive pregnant women have been offered participation in a prevention of mother-to-child transmission (PMTCT) programme since 2004 consisting of one single dose of NVP for the mother at onset of labour, followed by a single dose of NVP for the newborn within 72 hours after delivery. Since 2009, a combination therapy of AZT, NVP and 3TC is recommended for PMTCT at sites that have the possibility to offer and monitor this ARV regimen [3].

Although ARV therapy is now available free of charge for eligible patients, ARVs are also sold on the black market in Tanzania. We do not know to which extent this phenomenon contributes to self-medication, especially because these drugs are quite expensive when not being prescribed. However, the fear of stigmatization when receiving ARV regimens at HIV CTCs as well as a general lack of knowledge of HIV treatment guidelines could be factors promoting unadvised medication.

The large-scale availability of first- and second-line ART regimens in a resource-limited area bears the risk of an unnoticed evolution of drug-resistant quasiespecies in treated patients and their subsequent transmission into the ART-naïve population [4]. The WHO therefore recommends the monitoring of HIVDR among newly infected individuals in order to estimate the extent to which transmission of drug resistant HIV occurs, classifying HIVDR prevalence into three groups (low: <5%, moderate 5–15%, and high >15%) [5]. Mandatory criteria for inclusion into the WHO-initiated transmitted HIVDR (tHIVDR) surveillance are a) age below 25 years, b) no previous pregnancies, and c) no previous ART use [6]. Their rationale is to exclude people with long-standing infections, infected before ART was widely available in the country, or patients previously exposed to antiretrovirals (ARVs), e.g. through participation in PMTCT programs [5].

So far, the reported prevalence of tHIVDR in eligible patient populations is below 5% across Africa [7,8,9,10,11,12] and only for some areas moderate HIVDR rates have been reported in some studies [11]. These rather optimistic findings are in sharp contrast to observations from sub-Saharan Africa, that a significant proportion of HIV patients who start first-line ART encounter early virological failure within the first 12 months of therapy [13,14,15]. This may suggest that the true prevalence of HIVDR in patients presenting for ART initiation might be significantly higher than estimated from tHIVDR data.

Therefore, we hypothesized that HIVDR prevalence may differ between people eligible for WHO tHIVDR surveillance and the rest of the HIV-infected population. A systematic underestimation of the prevalence of HIVDR would misguide health care decision makers in resource-limited countries and result in fatal consequences for ART efficacy. In this study we determined the frequency of HIVDR in ART-naïve patients in Tanzania aged below and above the WHO-initiated tHIVDR survey limit of 25 years of age.

Methods

Ethics statement

The study was approved by the National Institute for Medical Research (Tanzania), Bugando Centre Ethical Board, and Ministry of Health (Tanzania). All patients gave written informed consent. All clinical investigations have been conducted according to the principles expressed in the Declaration of Helsinki.

Patients

In this study we investigated samples from HIV patients enrolled in the clinical trial ProCort1 (trial name: “ProCort1”; registry: ClinicalTrials.gov; registration number: NCT01299948). ProCort1 is a randomized, double-blinded placebo-controlled trial testing low-dose (5 mg/day) prednisolone on HIV disease progression in ART-naïve patients who are not yet eligible for ART. According to ProCort1 inclusion criteria, patients were HIV positive but ART-naïve with CD4+ cell counts >300 cells/μl and no other clinical conditions that require ART. For the ProCort1 trial, a total number of 416 consecutively enrolled HIV patients were initially screened. 90 patients presented as screening failures, mostly (about 80%) because of CD4 counts below 300 cells/μl. The other screening failures were due to TB-coninfections, abnormal blood parameters (HB, ALT, AST, creatinin) or diabetes. Plasma and peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were collected from every patient at baseline and at 12 later time points covering a time span of two years. The study was performed at the Bugando Medical Centre in Mwanza (Tanzania).

Samples and bulk sequencing reaction

75 samples of DNA isolated from frozen PBMC and 55 samples of RNA isolated from frozen plasma collected from 120 randomly-selected patients (from 10 patients both DNA and RNA were isolated) enrolled in the ProCort study were amplified as described [16] by HIV-Pol-specific PCR or RT-PCR, respectively. A positive PCR reaction was yielded from 46 plasma samples and 48 PBMC samples, corresponding to a recovery rate of 84% (46/55) from plasma and 64% (48/75) from PBMC samples. PBMCs used for these experiments had a low viability, probably a result of suboptimal freezing conditions during transport or storage, which may explain the low PCR recovery rate from these samples. Bulk-sequencing of the PCR products was performed as described [16]. Sequences were submitted to GenBank, accession numbers HM572334–HM572422.

HIV drug resistance and subtype analysis

For analysis of resistance-associated mutations (RAM), the FASTA files were submitted to Stanfords HIV drug resistance database [17]. The 2009 HIVDR surveillance database [18] was used to identify mutations eligible for the WHO HIVDR surveillance analysis. HIV subtype analysis was performed by phylogenetic analysis of the FASTA files as described [16].

Therapeutic Drug Monitoring (TDM)

Plasma samples collected at baseline from patients with RAM were subjected to TDM for the detection of Efavirenz, Nevirapine, Nelfinavir, Saquinavir, Atazanavir, and Lopinavir as described [19,20]. TDM is a well-established investigation in HIV-patients during antiretroviral treatment and part of international guidelines. The methods to determine plasma concentrations of HIV-protease inhibitors (PI) and non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTI) are highly specific and sensitive. In the HPLC/GC methods used in the study, the limit of detection (LOD) of nevirapine was determined at 2 ng/ml, the lower limit of quantification (LLQ) of nevirapine was reached at a concentration of 10 ng/ml. For efavirenz the LOD was 3 ng/ml, and the LLQ was 25 ng/ml.

Statistical Analysis

Patients in different age groups were sorted according to the absence or presence of HIVDR in a 2×2 contingency table. Frequency of HIVDR in different age groups was compared using

Fisher's exact probability test. $P < 0.05$ was considered as statistically different. 95% confidence intervals (CI) were calculated using GraphPad Prism Software. 95% CIs were truncated at 0.000 if lower CI was negative.

Results

Patient characteristics

The sequences analyzed in this study derive from 88 ART-naïve HIV-infected patients in Mwanza, Tanzania, enrolled in the clinical trial ProCort1 (mean age 35.4 years, 78% female) (Table 1). The mean duration since HIV diagnosis was 1.3 years. Twenty patients were younger than 25 years and thus fulfilled the age criteria of the WHO tHIVDR surveillance program, while 68 patients (77%) were aged above 25. This corresponds to the typical age distribution of ART-naïve patients in Mwanza.

High frequency of drug-resistant HIV

With bulk sequencing reactions from PBMC-derived DNA (46 cases) and plasma-derived RNA (42 cases) we detected HIV-pol mutations associated with drug resistance in 16 of 88 patients (18.2%; 95% CI 0.100–0.264) (Table 2). Only four of the 16 RAM were initially detected from plasma and 12 from PBMC. In order to investigate if there is any difference in RAM frequency in the two compartments, we sequenced plasma specimens from five patients who were initially tested positive for RAM with PBMC-derived DNA and found the same RAM also in plasma. In five additional cases we retested RAM-negative patients who were initially tested in plasma and found no sequence differences in PBMC (data not shown). Three of the 16 samples had RAM associated with polymorphic positions (T98G; T69N; one patient with both E44D and V118I) that are excluded from WHO tHIVDR surveillance [18]. We hence use the term “WHO-defined HIVDR” to refer to mutations listed by WHO for tHIVDR surveillance [18] and the term “HIVDR” on its own to refer to all RAM according to the Stanford Database, irrespective of their association with polymorphic sites [17]. The frequency of

“WHO-defined HIVDR” was 14.8% (13/88, 95% CI 0.072–0.223) in the entire study population (Fig. 1A, white bar).

Age-dependent frequency of drug-resistant HIV

The occurrence of RAM was highly correlated with the age (Fig. 1). WHO-defined HIVDR frequency was 0% (0/20) in patients aged under 25 but 19.1% (13/68; 95% CI 0.095–0.28) in patients older than 25 years (Fig. 1A), which is statistically significantly different ($p = 0.0344$, Fishers exact test).

As depicted in figure 1B, frequency of HIVDR seems to peak in middle-aged patients, although the number of patients in each age-group is too small in order to reach statistical significance. Some of the patients presented with two or three different RAM (Fig. 1C). This “RAM burden”, i.e. the number of different RAM contributing to resistance against ARVs per individual, correlates with impairment of a greater spectrum of classes of ARVs (Fig. 1D).

Clinical impact of the RAM

The resistance pattern detected could severely limit the options for ART once the patients become eligible for antiviral therapy. About every fifth patient (21.6%; 8/37) in the group 25–39 years has a predicted reduced susceptibility towards the local first-line ART regimens according to Stanford Database (Fig. 2A). Without prior resistance testing, prescribing this regimen would result in insufficient suppression of viral replication, likely leading to a rapid development of further mutations conferring resistance to other components of the regimen and – finally – to complete virological failure. Even more concerning are the findings that the efficacy of the local second-line regimens is also affected by the detected mutation profile: a) 24% (9/37) of the patients aged between 25–39 have RAM that correspond to low- and high-level resistance towards ARVs included in the local second-line regimens according to Stanford Database (Fig. 2B) and b) 8 out of 9 patients (89%) in this age group with predicted reduction of first-line efficacy also have a predicted reduction of second-line efficacy (Fig. 2C). Related to the whole study population, these numbers

Table 1. Demographic patient characteristics of the study population.

	PCR-negative	PCR-positive	PCR-positive	PCR-positive
		all	Age < 25 years	Age ≥ 25 years
total n = 120	n = 32	n = 88	n = 20	n = 68
Age (years)	35.0 ± 12.2 (21.1–59.0)	35.2 ± 11.3 (18.6–63.7)	22.6 ± 1.5 (18.7–24.9)	38.9 ± 10.1 (25.2–63.7)
Gender	77% female	78% female	95% female	75% female
CD4+ T-Cell count (cells/μl)	664 ± 299 (224–1435)	490 ± 222 (99–1056)	534 ± 215 (140–1037)	478 ± 223 (99–1056)
time since first diagnosis (years)	1.30 ± 2.75 (0.05–15.09)	1.30 ± 1.75 (0.04–9.97)	0.77 ± 0.83 (0.05–2.99)	1.45 ± 1.92 (0.04–9.97)
Sequencing from PBMC (%) compared to plasma	–	52%	50%	53%
Clinical stage (CDC) A1	56%	33%	45%	29%
Clinical stage (CDC) A2	38%	51%	45%	53%
Clinical stage (CDC) B1	0%	9%	10%	9%
Clinical stage (CDC) B2	6%	7%	0%	9%

The study population consisted of 120 ART-naïve HIV-1 infected adults. PBMC- or plasma samples from 88 patients yielded amplicons for the bulk sequencing reaction. Data are expressed as means ± S.D. and range in parentheses. Patients with CD4 counts < 200/ml at sample date initiated ART if CD4 counts remained below 350/ml four weeks later.

doi:10.1371/journal.pone.0023091.t001

Table 2. HIVDR in the Mwanza cohort.

Age (years)	Sample number	NRT RAM	NNRTI RAM	PI RAM	Affected drug (low-level resistance)	Affected drug (high-level resistance)	TDM	time since HIV test (years)
20.5	TZ.09.032647		A98G ¹		<u>NVP</u>		neg.	0.31
25.4	TZ.08.029746			D30N	ATV	NFV	neg.	0.58
26.4	TZ.08.017184	M41L			<u>D4T, AZT, ddl, ABC</u>		neg.	1.05
28.0	TZ.08.014495	M184I			<u>ABC</u>	<u>3TC, FTC</u>	EFV	0.33
30.2	TZ.08.022112	M184I	G190E		<u>ABC</u>	<u>3TC, FTC, NVP, EFV</u>	neg.	8.3
32.2	TZ.09.001336			G73S	<u>SQV</u> , NFV, ATV		neg.	0.28
32.4	TZ.09.001332	M184I	K103N		<u>ABC</u>	<u>3TC, NVP, EFV, DLV</u>	neg.	0.18
33.2	TZ.08.017176	M41L			<u>D4T, AZT, ddl, ABC</u>		NVP	2.50
33.7	TZ.08.023280	V75A			<u>D4T, ddl</u>		neg.	1.63
36.7	TZ.08.017197	T215I	K103N	V82T	<u>D4T, AZT, ddl, ABC, SQV/r, LPV/r</u> , ATV, NFV	<u>NVP, EFV, DLV</u>	n.d.	2.81
38.7	TZ.09.001323		G190E	G73S	<u>SQV/r</u> , NFV, ATV, DLV	<u>NVP, EFV</u>	neg.	1.06
42.6	TZ.09.006017			V82A	<u>LPV/r, SQV/r</u> , ATV, NFV		neg.	4.60
44.9	TZ.10.002035	T69N ²			<u>ddl</u>		negative	1.14
46.7	TZ.08.017195		K103N			<u>NVP, EFV, DLV</u>	n.d.	0.38
46.8	TZ.10.003309	E44D ³ V118I ³			<u>3TC</u>		neg.	0.15
51.4	TZ.08.017193		Y188H		<u>NVP, EFV, DLV</u>		neg.	0.04

RAM according to the Stanford HIV Drug Resistance Database [17] in 16/88 baseline samples. Mutations associated with a score of 60 were attributed as high-level resistance-associated mutations (RAM) and mutations with a score of 10–35 were attributed as low-level RAM. Mutations listed for WHO HIVDR surveillance [18] are indicated in bold. Superscripted numbers identify the reasons for excluding the respected mutations from the HIVDR list: 1) nonpolymorphic, but at highly polymorphic position; 2) polymorphic position in subtypes B, F, CRF01_AE; 3) polymorphic in multiple subtypes. ABC: Abacavir; ATV: Atazanavir; AZT: Zidovudine; ddl: Didanosine; DLV: Delaviridine; D4T: Stavudine; EFV: Efavirenz; FTC: Emtricitabine; LPV: Lopinavir; NFV: Nelfinavir; NVP: Nevirapine; SQV: Saquinavir; 3TC: Lamivudine [29]. Underlined drugs are part of the local first line regimens, double line underlined drugs are part of local second line regimens. Data derived from 88 sequenced samples. Therapeutic drug monitoring (TDM) was performed from plasma samples collected at baseline for NNRTIs (Efavirenz and Nevirapine) and PIs (Nelfinavir, Saquinavir, Atazanavir and Lopinavir).

doi:10.1371/journal.pone.0023091.t002

could translate into complete ART failure (first- and second-line) in about 9% (8/88) of all patients.

Long-term persistence of RAM

In order to determine the long-term persistence of RAM in the 16 patients with baseline RAM, plasma specimens collected up to 21 month later were analyzed. Three different scenarios were observed: In five patients the initially-detected RAM persisted, in six patients RAM detected at baseline became undetectable later, and in five patients RAM that were undetected at baseline were found in follow-up samples (Table 3).

Therapeutic drug monitoring

Baseline plasma samples of 14 patients with RAM were screened for the presence of antiretroviral substances. We detected traces of efavirenz (160 ng/ml, sample number TZ.08.014495) and nevirapine (202 ng/ml, sample number TZ.08.017176) in two samples (Table 2). These drugs are, however, unrelated to the RAM detected in these patients (M184I and M41L). For one patient (TZ.08.017195) in which we detected K103 that confers resistance to EFV or NVP and was stable for at least 18 months, we screened additional plasma samples donated at 3, 6, 12 and 18 months after initial sampling and found no traces of either drug.

HIV-1 subtype distribution

Subtype analysis identified seven different clusters that can be divided into different HIV subtype groups, including A1 (34% of

the samples), B (1%), C (26%), D (28%), CRF10_CD (4%) and recombinants A1D (7%) (Fig. 3). These findings are in line with previous reports from the area [10,21].

Discussion

The frequency of RAM in our ART-naïve study group is much higher than expected from hitherto reported prevalence rates of below 5% from WHO tHIVDR threshold surveys across Africa [22]. This difference is probably mainly attributed to the different criteria for choosing patients for HIVDR surveillance: The WHO surveillance criteria define eligible patients as presumably recently infected patients below 25 years of age with CD4+ T-cell counts above 500 cells/ μ l, and – if female - restricted to women without prior history of pregnancies to avoid PMTCT-induced resistance. Our study population, in contrast, consists of HIV patients with a probably slightly longer history of infection (1.30 ± 1.75 years since diagnosis) with a mean age of 35.4 years, a mean baseline CD4+ T-cell count of 483 cells/ μ l and amongst females predominantly multigravidae (Table 1).

By applying the age criteria of WHO HIVDR surveillance to our analysis, we would have concluded that the prevalence of drug resistant HIV in the Mwanza region is below 5% similar to what was reported for the Dar es Salaam region in Tanzania in 2008 [23] and from most other HIVDR surveillance sites across Africa so far [7,8,9,10,11,12]. However, the true frequency of HIVDR in our study population is much higher: 14.7%, if mutations at polymorphic sites are excluded and even 18.2% if they are included.

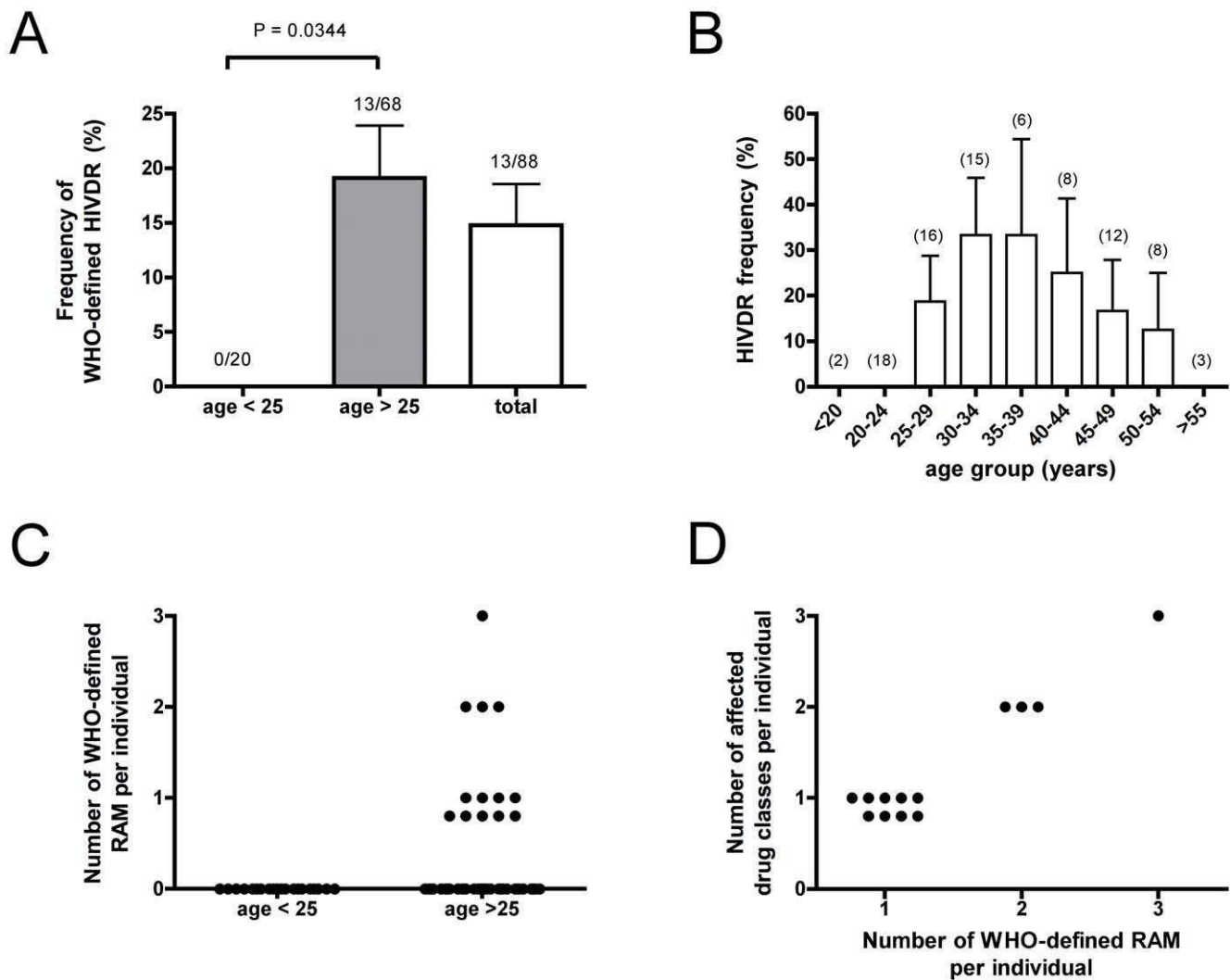


Figure 1. The frequency of HIVDR is age-dependent. HIVDR was determined by bulk sequencing from ART-naïve patients. A.: Frequency of WHO-defined HIVDR in patients aged under 25 years ($n=20$, left bar), patients aged over 25 years ($n=68$, middle bar), and in the total study population ($n=88$, right white bar). B: Frequency of WHO-defined HIVDR peaks in different age groups. Numbers in brackets indicate the number of individuals tested in each age group. Data as means \pm S.E.M.. For statistical analysis, Fisher's exact test was performed. Differences with a $P<0.05$ were regarded as statistically significant. C: Number of WHO-defined RAM per individual ("RAM burden"). D: Number of affected antiretroviral drug classes (NRTI, NNRTI, PI) per individual in relation to the number of WHO-defined RAM per individual. doi:10.1371/journal.pone.0023091.g001

This alarmingly high frequency of HIVDR could have been generated by two different ways: a) by direct transmission of drug resistant viruses from sexual partners carrying the resistant virus or b) by selection from the natural pool of quasispecies in each individual patient following undisclosed antiretroviral drug experience. It is reasonable to suggest that both factors may have contributed to the observed high frequency of RAM in our Tanzanian study group.

Intra-patient generated drug resistance in ART-naïve patients can either result from episodes of NVP monotherapy of pregnant women during PMTCT or from undisclosed (self-) medication with ARVs. To exclude PMTCT-generated NVP resistances from tHIVDR surveillance, the WHO criteria exclude multigravidae, which results in excluding many, if not the majority of women.

In our study group we identified seven patients with NVP resistance (Table 4). We can exclude PMTCT as a possible cause for the occurrence of the NVP resistance mutation in five of them (71%), because the patients are either male (two cases) or the

pregnancies date before HIV infection was diagnosed (three cases). In one additional case we were unable to ascertain the patient's PMTCT status and in only one case we positively identified a patient who actually received PMTCT. Therefore, the vast majority of NVP resistance in our study group is obviously unrelated to PMTCT. The two NVP resistance mutations that can be potentially attributed to PMTCT have, however, no influence on the overall HIVDR frequency in our study group, as the respective patients (TZ.09.001332, TZ.09.001323) present with multiple RAM against other ARVs that are completely unrelated to the Tanzanian PMTCT program. Since these other mutations (M184I and G73S, respectively) must have been acquired independently of PMTCT, there is no reason to exclude these two patients from the analysis.

As for undisclosed self-medication, all patients who presented with RAM repeatedly reported that they were treatment-naïve (except for those who participated in PMTCT programs) and also their medical records – if available – were negative in this respect,

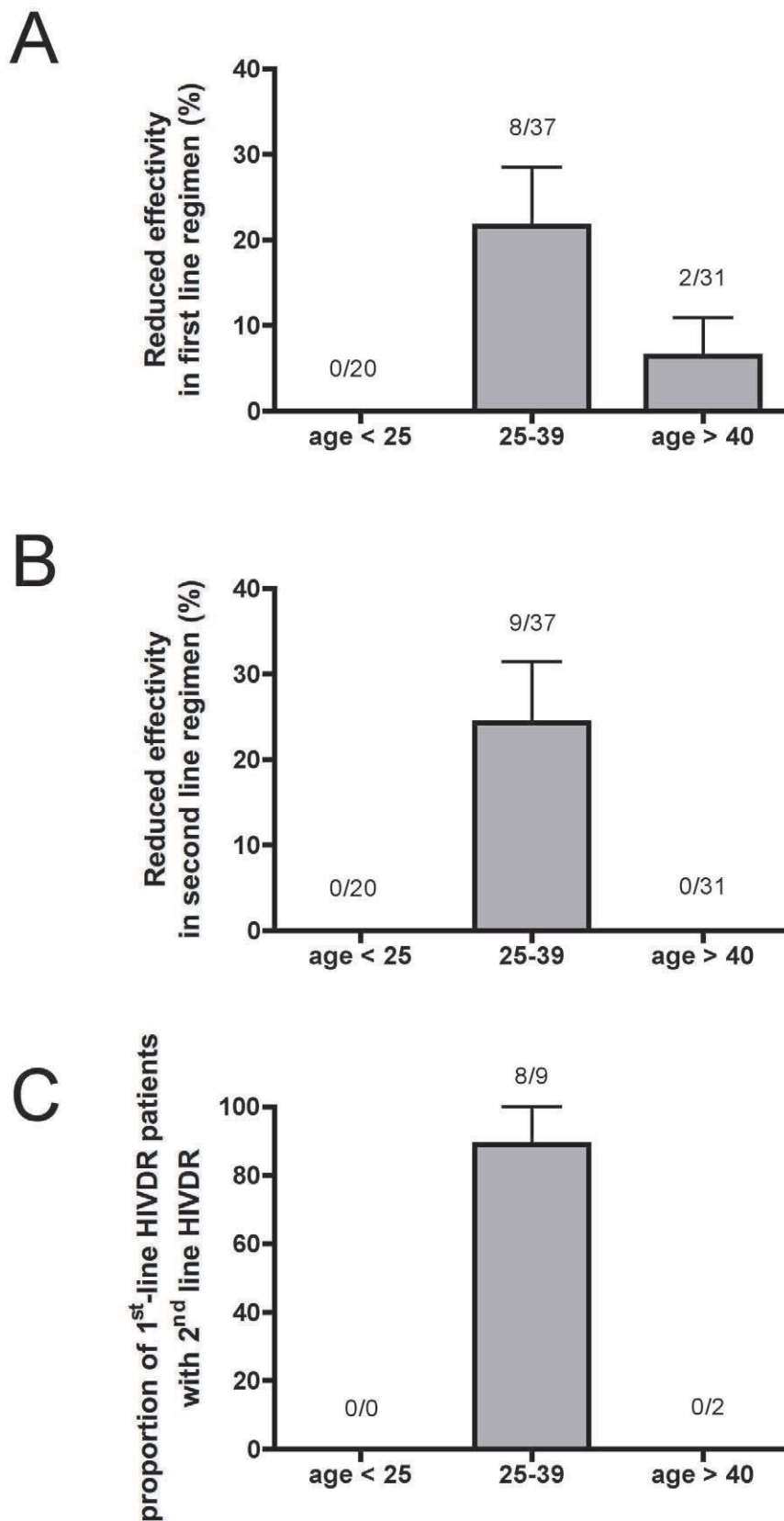


Figure 2. HIVDR affects efficacy of local first- and second-line ART regimens. Effects of HIVDR (high- and low-level resistances) on drugs included in the local antiretroviral regimens. A: Effects on local first-line ART regimen. HIVDR that affects at least one of the drugs included in first-line therapy (AZT/D4T plus 3TC plus NVP/EFV) scored positive. B: Effects on local second-line ART regimen. HIVDR that affects at least one of the drugs included in second-line therapy (ddI/ABC plus LPV/SQV plus RTV) scored positive. C: Proportion of patients with HIVDR that affects first-line ART regimen who also carry HIVDR that affects second-line ART regimen.
doi:10.1371/journal.pone.0023091.g002

Table 3. Long-term persistence of RAM.

	Sample number	RAM at baseline	Time to Follow-up 1 (months)	RAM at Follow-up 1	Time to Follow-up 2 (months)	RAM at Follow-up 2
	TZ.09.032647	A98G	5	A98G	n.a.	n.d.
	TZ.08.017184	M41L	11	M41L	18	M41L
persistent RAM	TZ.08.017176	M41L	12	M41L	21	M41L
	TZ.08.017195	K103N	13	K103NS, Y188HY	18	K103N
	TZ.10.003309	E44D, V118I	21	E44D, V118I	n.a.	n.d.
	TZ.08.029746	D30N	12	none	n.a.	n.d.
	TZ.09.006017	V82A	18	none	n.a.	n.d.
RAM disappeared	TZ.08.022112	M184I, G190E	15	Q151QR	18	none
	TZ.09.001336	G73S	18	V179T	n.a.	n.d.
	TZ.08.023280	V75A	12	T69ST	14	T69ST
	TZ.08.017193	Y188H	6	L10V	n.a.	n.d.
	TZ.08.022112	M184I, G190E	15	Q151QR	18	none
	TZ.09.001336	G73S	18	V179T	n.a.	n.d.
new RAM	TZ.08.023280	V75A	12	T69ST	14	T69ST
	TZ.08.017193	Y188H	6	L10V	n.a.	n.d.
	TZ.08.017195	K103N	13	K103NS, Y188HY	18	K103N
	TZ.08.014495	M184I	6	no PCR product	n.a.	n.d.
	TZ.09.001323	G190E, G73S	18	no PCR product	n.a.	n.d.
unclear	TZ.09.001332	M184I, K103N	n.a.	n.d.	n.a.	n.d.
	TZ.08.017197	T215I, K103N, V82T	n.a.	n.d.	n.a.	n.d.
	TZ.10.002035	T69N	n.a.	n.d.	n.a.	n.d.

Of the 16 patients who presented with RAM at baseline, we analyzed plasma specimens collected at later time points ("follow-up 1", "follow-up 2") for the presence of RAM. We detected three different scenarios, including persistent RAM, disappearing RAM, and newly emerging RAM (some samples appear in more than one scenario). Time to follow-up sample is indicated in months. In some cases, no PCR product from plasma samples could be generated. The investigation for long-term stability of RAM is insofar incomplete as plasma specimens collected at later time points were not available ("n.a.") for all patients, referred to as "n.d." (not determined). doi:10.1371/journal.pone.0023091.t003

suggesting that not only the majority of NVP mutations but also a great proportion of the other detected mutations were acquired by transmission.

In an attempt to challenge the given disclosure about the patients' drug status, we used TDM as a forensic method in order to determine whether the patient has taken NNRTIs or PIs within the past 1–2 weeks, the time window in which we can detect these drugs in plasma samples [24,25]. Of the 16 patients who presented with RAM, traces of ARVs were detected in two (Table 2), indicating that at least some of the patients gave a false statement regarding their drug status. We can almost exclude that the patients studied here received ARVs by CTCs, as their health status was still good enough to be eligible for ART and any clinically-advised antiretroviral medication would have been documented in their medical records – which were negative in this regard. To our knowledge, this is the first reported evidence for undisclosed self-medication with ARVs in Africa, a phenomenon that has unfortunately not yet been addressed by systematic analyses. The detected ARVs were, however, not related to the RAM found in these patients, so that the undisclosed medication with ARVs might just have been an epiphenomenon and the detected RAM may nonetheless have been acquired by transmission.

According to WHO criteria, these two patients are not eligible for tHIVDR survey, because they were (as found by experimental evidence) not ARV naïve. Even if we excluded these patients from our analysis, HIVDR frequency would still be 12.5% (11/88) and therefore much higher than anticipated from previous reports

from Tanzania [23]. However, we did not exclude the patients from our analysis for the following reasons: a) First and foremost, the aim of our study is not to fulfil current WHO criteria as good as possible and to see how close we can get to previous-published results, but rather to challenge these very criteria by looking into a therapy-naïve population as it is, i.e. not being filtered by additional criteria concerning age or drug naivety (not to be mistaken with therapy naivety!). In our case, the frequency of HIVDR in patients who have never before received medically-advised antiretroviral therapy is in the range of 15% and this constitutes a severe medical problem for future antiretroviral therapy with predefined regimens - no matter how many patients we exclude from our analysis for not fulfilling WHO criteria for whatever reasons. b) The availability of ARVs on the black market is a known phenomenon in many sub-Saharan countries and there is no reason to believe that undisclosed self-medication is a phenomenon restricted to our study population. It is rather plausible to assume that self-medication with ARVs (be it from black-market supplies or by drug-sharing within a family) is inevitably connected to ART roll-out programs and surveys to monitor the prevalence of HIVDR in therapy-naïve patients should not exclude this source of drug resistance. c) WHO criteria do not include forensic methods to control whether the studied populations are really drug-naïve, and to our knowledge, drug monitoring has not been done in any of the tHIVDR surveys published so far.

In five out of the 16 RAM carriers we observed the emergence of new RAM at later time points (Table 3). It seems very unlikely

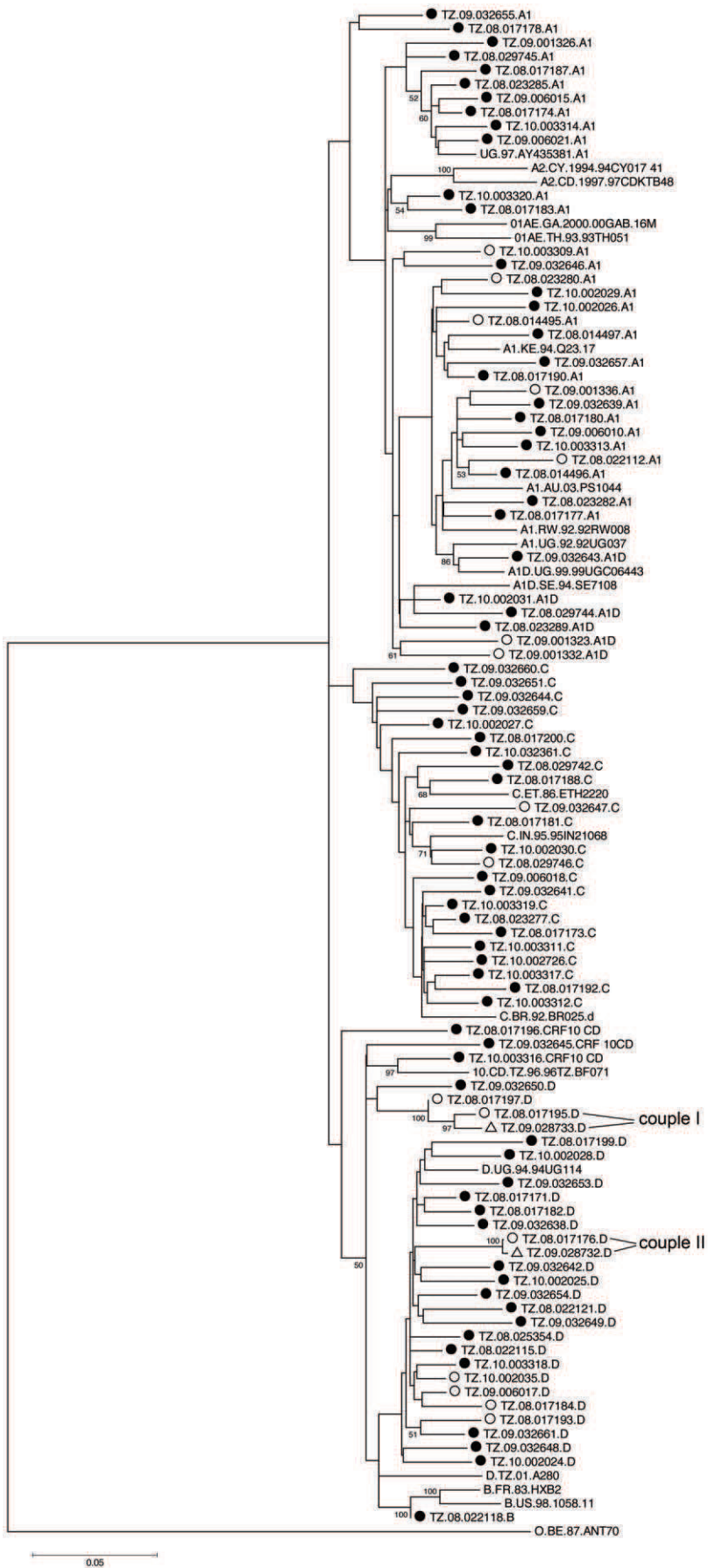


Figure 3. Phylogenetic analysis of RT and PR sequences from the Tanzanian cohort. A neighbour-joining phylogenetic tree [30] was constructed from the 88 patient derived HIV-1 sequences from the Tanzania cohort and the two partner-derived sequences. Reference sequences were obtained from the Los Alamos HIV sequence database. The analyzed 1302 bp region includes the complete Protease and Reverse Transcriptase coding region. The tree was constructed using Mega software version 4, and the evolutionary distances were calculated using the Kimura 2-parameter method. The bootstrap consensus tree was inferred from 50000 replicates and values greater than 70% are indicated on the branch lengths. The scale at the bottom left indicates the calculated genetic distances between the branches of the phylogenetic tree. Circles represent the 88 samples from our cohort. Black-dotted circles are without RAM, open-circled sequences are with RAM, open triangles are sequences with RAM from HIV-infected partners of two study subjects, which were not included in the determination of HIVDR as these patients received ART. Sequences without symbols are subtype reference sequences derived from Los Alamos database. The subtype is indicated at the end of each sequence name. Relative subtype frequency: A1: 34%, A1D: 7%, C: 26%, CRF10_CD: 4%, D: 28%, B: 1%. Sequences isolated from two couples (couple I, couple II) with NVP resistances.

doi:10.1371/journal.pone.0023091.g003

that these newly-detected RAM originate from superinfections with drug-resistant viruses but rather that the emergence of these RAM was either caused by recent misuse of ARVs or - probably the more plausible interpretation - simply reflects a false-negative result of the bulk sequencing method at baseline determination (for discussion of bulk sequencing sensitivity see also below). In three cases the RAM detected at baseline remained stable for more than 18 months. Two of these patients carried the mutation M41L and one carried the mutation K103N. For both mutations a long-term stability has been reported even in the absence of antiviral medication [26].

In four of the 16 patients presenting with RAM, plasma samples could be obtained from their HIV-infected partners. Two of these could be sequenced and had the same RAM as their partners (K103N detected in TZ08.017195 and the partner's sequence TZ09.028733, and M41L detected in TZ08.017176 and the partner's sequence TZ09.028732). In a phylogenetic analysis these sequences clustered in direct neighbourhood to the partner's sequences (marked with "couple I" and "couple II" in Fig. 3). As it is rather unlikely that a potential misuse of an ARV generates exactly the same RAM profile in both partners (many different RAMs can become selected by a given ARV), it is reasonable to assume that the respective RAM was received by transmission, although we cannot say in which direction the transmission occurred.

Irrespective of whether the observed high frequency of RAM is predominantly caused by transmission or by selection with undisclosed medication with ARVs, such a high frequency of RAM in patients who are likely to start ART in the near future translates into an expected reduction of first- and second-line ART regimen efficacy. The full extent of the problem may be even greater, as we generated our data from bulk sequencing reactions, which are known to underestimate the number of RAM, because

they fail to reliably detect mutations if the respective quasispecies contribute less than 20–30% to the total viral population [27]. More sensitive techniques, such as real time PCR-based resistance testing, show that bulk sequencing considerably underestimates the true frequency of HIVDR [28].

If the observed level of HIVDR in our study group is representative of other regions of Africa, this would affect the settings in which ART roll-out programmes are being implemented. The current WHO surveillance criteria bear the danger of answering a merely academic question (i.e. the transmission rate of resistant viruses in people aged under 25), whereas the clinical reality has to deal with pre-existing HIVDR in all patients eligible for ART, irrespective of their origin (transmitted or inpatient-selected) and irrespective of the patient's age. Beyond that, it is questionable whether the under-25 year olds are a representative "sentinel group" for HIVDR transmission in the rest of the population, because important social parameters that presumably affect the rate of resistance transmission, such as promiscuity or the ART status of the sexual partners are likely to significantly differ between different age groups, which may compromise the current resistance surveys. Moreover, the (so far excluded) patients over 25 years of age represent a significant proportion in the group of patients eligible for ART. Over the years at Bugando Medical Centre, the proportion of those older than 25 years amongst patients eligible for ART has been between 70 to 80 percent. This is similar to the age distribution in our study group, which in this respect quite accurately pictures the characteristics of patients seeking for ART at Bugando Medical Center. Our study population was, however, not intentionally designed to represent the whole HIV-infected population in Mwanza, so that an extrapolation of our data to the whole population in Mwanza must be taken with caution. Moreover, the patients investigated in this study have been reenrolled for an interventional clinical trial

Table 4. NVP resistance and PMTCT.

Sample number	Gender	PMTCT with NVP	Birth dates of children	First HIV diagnosis	NVP resistance caused by PMTCT
TZ.09.032647	female	none	2007	24.08.08	no
TZ.08.022112	male	n.a.	n.a.	24.09.04	no
TZ.09.001332	female	unknown	unknown	23.08.07	unclear
TZ.08.017197	female	none	1989, 1993, 1995	16.04.07	no
TZ.09.001323	female	yes	1990, 1992, 1994, 1996, 2004, 2006	26.01.06	possible
TZ.08.017195	female	none	1992, 1993, 1995, 1997, 1999	22.05.07	no
TZ.08.017193	male	n.a.	n.a.	15.09.05	no

Patients with NVP resistance mutations were analyzed regarding PMTCT (with NVP monotherapy) as a possible cause for the emergence of the mutation. PMTCT as a cause for the mutation's appearance is discussed as "possible" if the mother received PMTCT; it is discussed as "unclear" if the PMTCT status and the dates of birth of the children are unknown; for plausibility reasons PMTCT was excluded ("no") as a trigger of the NVP mutation if the patient is either male or if a female patient presented with unknown PMTCT history combined with the HIV infection being diagnosed only since the date of birth of the youngest child.

doi:10.1371/journal.pone.0023091.t004

(“ProCort1”), which may have caused a selection bias (like, for instance, patients who agree to join an interventional trial may or may not be more prone for self-medication with ARVs in the past or to keep information about ARV misuse undisclosed). We therefore refer to the term “frequency” rather than “prevalence” when describing the rate of RAM in our patient population.

WHO recommends the analysis of at least 34–47 specimens (34 if no mutations were found, ≥ 47 if one or more mutations are detected within the first 34 sequences) of consecutively enrolled patients for the threshold survey method in order to categorize HIVDR as $<5\%$, $5\text{--}15\%$ or $>15\%$ [18]. Here we analyzed 88 samples and the determined frequency of HIVDR is therefore quite robust. Although we did find a frequency of HIVDR in the range of $5\text{--}15\%$ in our study group – a finding that in the context of an expected low HIVDR rate is remarkable in itself – the most important aspect of our study is that this relatively high frequency of HIVDR would have remained completely unnoticed, if we strictly applied the current age criteria (<25) of the WHO threshold survey method to our analysis. The difference in HIVDR between the two age groups was so pronounced that it reached statistical significance despite the relatively low number of only 20 studied patients aged below 25 years. On the other hand, the estimation of a 0% HIVDR frequency in patients <25 years remains relatively uncertain, as the number of analyzed sequences in this subgroup is smaller than recommended.

The most substantial argument in favor of an age restriction of HIVDR surveys to patients younger than 25 years is probably the intention to exclude as much as possible older infections that reflect HIVDR transmission rates of the past rather than the current situation. In our study, the mean time since HIV diagnosis of the patients under 25 years old was $0.77 (\pm 0.19 \text{ SD})$ years with a range of $0.05\text{--}2.99$ years, compared to $1.45 (\pm 0.23 \text{ SD})$ years for patients aged above 25 years ($p = 0.1285$, non-significant) (Table 1). Moreover, 10 of 13 (77%) patients with HIVDR had a known infection time within the range of the young age group, and 6 of 13 (46%) had infection times even below the average of the young group (Table 2). This is in fact not very astonishing, as young people in Tanzania are considered to be at substantial risk of HIV infection by sexual intercourse already at the age of 15 [3] which is still ten years away from the 25 years limit. Combined with an asymptomatic phase of infection that can last on the one hand for several years but on the other hand turns into a symptomatic disease within less than a decade, it is not very surprising that the asymptomatic (hence therapy-naïve) individuals under and over 25 years of age do not significantly differ in time of infection. In the light of this argument it appears that the age-restriction to under-25 years old is not very effective in terms of selecting recent infections. (The same argument would also apply for the intention to minimize chances of being exposed to ARVs.) Moreover, given that the over-25 years old – at least in our study – significantly differ in HIVDR frequency compared to young patients, this age-restriction may turn out to be even counterproductive in an attempt to determine representative HIVDR prevalence rates.

References

- Gilks CF, Crowley S, Ekpini R, Gove S, Perriens J, et al. (2006) The WHO public-health approach to antiretroviral treatment against HIV in resource-limited settings. *Lancet* 368: 505–510.
- WHO progress report (2010) <http://www.who.int/hiv/pub/2010progressreport/report/en/index.html>. Accessed 2011 May 15th.
- National Guidelines for the management of HIV and AIDS in Tanzania.
- Deeks SG (2008) Transmitted minority drug-resistant HIV variants: a new epidemic? *PLoS Med* 5: e164.
- Bennett DE, Bertagnolio S, Sutherland D, Gilks CF (2008) The World Health Organization's global strategy for prevention and assessment of HIV drug resistance. *Antivir Ther* 13 Suppl 2: 1–13.
- Bennett DE, Myatt M, Bertagnolio S, Sutherland D, Gilks CF (2008) Recommendations for surveillance of transmitted HIV drug resistance in countries scaling up antiretroviral treatment. *Antivir Ther* 13 Suppl 2: 25–36.
- Kamoto K, Aberle-Grasse J (2008) Surveillance of transmitted HIV drug resistance with the World Health Organization threshold survey method in Lilongwe, Malawi. *Antivir Ther* 13 Suppl 2: 83–87.
- Maphalala G, Okello V, Mndzebele S, Gwebu P, Mulima N, et al. (2008) Surveillance of transmitted HIV drug resistance in the Manzini-Mbabane corridor, Swaziland, in 2006. *Antivir Ther* 13 Suppl 2: 95–100.
- Ayoub A, Lien TT, Nouhin J, Vergne L, Aghokeng AF, et al. (2009) Low prevalence of HIV type 1 drug resistance mutations in untreated, recently

Considering the high frequency of HIVDR in our study population, we recommend the implementation of ART baseline resistance testing in the Mwanza area, as HIVDR prevalence in this area may have reached a critical level. In this regard, we encourage the development of cheap, robust and easy-to-use methods for detection of the commonest resistance-associated mutations as well as the regular monitoring of viral load during ART also in resource-limited settings. This would allow the selection of suitable ARVs from the available repertoire and prevent early therapy failure.

In conclusion, the results of this study demonstrate that the frequency of HIVDR in our study population is much higher than anticipated from the so-far published data of low HIVDR levels in Tanzania and sub-Saharan Africa in general, and – even more important – that a restriction to patients <25 years of age as implemented in the current criteria of the WHO-initiated HIVDR threshold survey would have dramatically failed to detect this. The reason for this discrepancy is that the frequency of HIVDR correlated with age, for it was totally absent in young individuals, but surprisingly high in individuals being older than 25 years. Sporadic and undisclosed misuse of ARVs may have contributed to the observed high resistance rate. This indicates that the exclusive focus on transmission of HIVDR in under 25-years old as recommended by the current WHO HIVDR threshold survey, instead of a broader approach that is open to HIVDR accumulation by different mechanisms and across all age groups, may fail to adequately monitor the effects of ART roll out programs on the spread of HIV drug resistance into the therapy-naïve population. We therefore recommend to perform similar studies in other resource-limited areas to test whether the so far reported optimistic picture of low HIVDR prevalence in young individuals is really representative for the rest of the ART-naïve HIV-infected population.

Acknowledgments

We are grateful to MDs Neema Chami, Eliawema Mwitani, Rogartus Kabemera, Hauli Kinyeti, Kinanga Magambo, Mohamed Jan Mubarak and Irene Massawe for patient care. We are indebted to our study nurse Lydia Makege, our documentation assistant Theresia Gabriel Juma, our laboratory technicians Ingeborg Euler-König, Ulrike Lenker, Anne Elter, Diana Schirmer, Omary Kapande, and John Myombe. The patients enrolled in this study were participants of the clinical trial “ProCort1”. The National Institute of Medical Research in Mwanza, head by John Chungalucha, kindly provided sample storage facilities. We dedicate this paper to Gerhard Bringmann on the occasion of his 60th birthday.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: CS BW JB WP GvZ HK SK CM AS AR EK CK. Performed the experiments: CK GBJ MMildner IH AH. Analyzed the data: CS BW CK HK. Contributed reagents/materials/analysis tools: EK BW SK CM GK HK AR CS. Wrote the paper: CS EK AR WP GvZ BW SK JB GBJ. Study conduct in the field: SK CM AS GK MMlewa. Clinical data management: CK.

- infected patients from Burkina Faso, Cote d'Ivoire, Senegal, Thailand, and Vietnam: the ANRS 12134 study. *AIDS Res Hum Retroviruses* 25: 1193–1196.
10. Ndembu N, Lyagoba F, Nanteza B, Kushemererwa G, Serwanga J, et al. (2008) Transmitted antiretroviral drug resistance surveillance among newly HIV type 1-diagnosed women attending an antenatal clinic in Entebbe, Uganda. *AIDS Res Hum Retroviruses* 24: 889–895.
 11. Aghokeng AF, Vergne L, Mpoudi-Ngole E, Mbangue M, Deoudje N, et al. (2009) Evaluation of transmitted HIV drug resistance among recently-infected antenatal clinic attendees in four Central African countries. *Antivir Ther* 14: 401–411.
 12. Nyombi BM, Holm-Hansen C, Kristiansen KI, Bjune G, Muller F (2008) Prevalence of reverse transcriptase and protease mutations associated with antiretroviral drug resistance among drug-naive HIV-1 infected pregnant women in Kagera and Kilimanjaro regions, Tanzania. *AIDS Res Ther* 5: 13.
 13. Harries AD, Zachariah R, van Oosterhout JJ, Reid SD, Hosseinipour MC, et al. (2010) Diagnosis and management of antiretroviral-therapy failure in resource-limited settings in sub-Saharan Africa: challenges and perspectives. *Lancet Infect Dis* 10: 60–65.
 14. Barth RE, van der Loeff MF, Schuurman R, Hoepelman AI, Wensing AM (2010) Virological follow-up of adult patients in antiretroviral treatment programmes in sub-Saharan Africa: a systematic review. *Lancet Infect Dis* 10: 155–166.
 15. Barth RE, Wensing AM, Tempelman HA, Moraba R, Schuurman R, et al. (2008) Rapid accumulation of nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor-associated resistance: evidence of transmitted resistance in rural South Africa. *AIDS* 22: 2210–2212.
 16. Jacobs GB, Laten A, van Rensburg EJ, Bodem J, Weissbrich B, et al. (2008) Phylogenetic diversity and low level antiretroviral resistance mutations in HIV type 1 treatment-naive patients from Cape Town, South Africa. *AIDS Res Hum Retroviruses* 24: 1009–1012.
 17. Stanford University Drug Resistance Database. <http://hivdb.stanford.edu/>. Accessed 2011 May 15.
 18. Bennett DE, Camacho RJ, Otelea D, Kuritzkes DR, Fleury H, et al. (2009) Drug resistance mutations for surveillance of transmitted HIV-1 drug-resistance: 2009 update. *PLoS ONE* 4: e4724.
 19. Langmann P, Heinz W, Klinker H, Schirmer D, Guhl C, et al. (2008) High performance liquid chromatographic method for the determination of HIV-1 protease inhibitor tipranavir in plasma of patients during highly active antiretroviral therapy. *Eur J Med Res* 13: 52–58.
 20. Langmann P, Weissbrich B, Desch S, Vath T, Schirmer D, et al. (2002) Efavirenz plasma levels for the prediction of treatment failure in heavily pretreated HIV-1 infected patients. *Eur J Med Res* 7: 309–314.
 21. Herbig KH, Gerhardt M, Piyasirisilp S, Mloka D, Arroyo MA, et al. (2006) Frequency of HIV type 1 dual infection and HIV diversity: analysis of low- and high-risk populations in Mbeya Region, Tanzania. *AIDS Res Hum Retroviruses* 22: 599–606.
 22. World Health Organization (WHO) HIVDR status report. <http://www.who.int/hiv/topics/drugresistance/status/en/index.html>. Accessed 2011 May 15.
 23. Somi GR, Kibuka T, Diallo K, Tuhuma T, Bennett DE, et al. (2008) Surveillance of transmitted HIV drug resistance among women attending antenatal clinics in Dar es Salaam, Tanzania. *Antivir Ther* 13 Suppl 2: 77–82.
 24. Haas DW, Gebretsadik T, Mayo G, Menon UN, Acosta EP, et al. (2009) Associations between CYP2B6 polymorphisms and pharmacokinetics after a single dose of nevirapine or efavirenz in African Americans. *J Infect Dis* 199: 872–880.
 25. Smith PF, DiCenzo R, Morse GD (2001) Clinical pharmacokinetics of non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors. *Clin Pharmacokinet* 40: 893–905.
 26. Pao D, Andrady U, Clarke J, Dean G, Drake S, et al. (2004) Long-term persistence of primary genotypic resistance after HIV-1 seroconversion. *J Acquir Immune Defic Syndr* 37: 1570–1573.
 27. Gunthard HF, Wong JK, Ignacio CC, Havlir DV, Richman DD (1998) Comparative performance of high-density oligonucleotide sequencing and dideoxynucleotide sequencing of HIV type 1 pol from clinical samples. *AIDS Res Hum Retroviruses* 14: 869–876.
 28. Johnson JA, Li JF, Wei X, Lipscomb J, Irlbeck D, et al. (2008) Minority HIV-1 drug resistance mutations are present in antiretroviral treatment-naive populations and associate with reduced treatment efficacy. *PLoS Med* 5: e158.
 29. Joint United Nations Programme on HIV/AIDS () Financial resources required to achieve universal access to HIV prevention, treatment, care and support. September 2007. (Accessed 3 April 2008.) Available from http://data.unaids.org/pub/Report/2007/20070925_advocacy_gme2_en.pdf.
 30. Saitou N, Nei M (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4: 406–425.

4.3 Low-dose Prednisolone Increases CD4+ T Cell Counts and Reduces Occurrence of AIDS-Defining Conditions in HIV Patients in Africa

Christa Kasang¹, Samuel Kalluvya^{2,3}, Charles Majinge², Gilbert Kongola³, Mathias Mlewa², Irene Massawe², Albrecht Ulmer⁶, Hartwig Klinker⁵, Eleni Koutsilieri¹, Wolfgang Preiser⁷, Daniela Hofmann¹, Johannes Hain⁸, Andreas Müller⁴, Benedikt Weissbrich¹, Axel Rethwilm¹, August Stich⁴, Carsten Scheller¹

¹ University of Würzburg, Institute of Virology and Immunobiology, Versbacher Strasse 7, 97078 Würzburg, Germany

² Bugando Medical Centre, P.O. Box 1370, Mwanza, Tanzania

³ BUCHS, P.O. Box 1370, Mwanza, Tanzania

⁴ Medical Mission Institute, Salvatorstrasse 7, 97067 Würzburg, Germany

⁵ University of Würzburg, Division of Infectious Diseases, Dept. of Internal Medicine, Josef-Schneider-Str. 2, 97080 Würzburg, Germany

⁶ HIV-Intensive Care Unit, Schwabstr. 26, 70197 Stuttgart, Germany

⁷ Division of Medical Virology, National Health Laboratory Service / University of Stellenbosch, Tygerberg 7505, South Africa

⁸ University of Würzburg, Institute of Mathematics and Informatics, Chair of Mathematics VIII (Statistics), Am Hubland, 97074 Würzburg, Germany

Abstract

BACKGROUND: While combination antiretroviral therapy is the best treatment to prevent AIDS in HIV infection, it is still not available for millions of patients in resource-limited areas, despite the substantial improvements achieved in the past 10 years. We therefore investigated the effect of the universally available generic prednisolone to slow down HIV disease progression for it has been reported to stabilize HIV T cell counts.

METHODS: We conducted a randomized, double-blinded, placebo-controlled 2-year clinical study (ProCort1; clinicaltrials.gov NCT01299948) to assess the effect of prednisolone on HIV disease progression in the absence of antiretroviral therapy. A total of 326 HIV-infected patients with initial CD4 counts higher than 300 cells/ μ l were included in the study and randomly assigned to receive 5 mg prednisolone per os per day or placebo for 24 months. The primary end point of the study was progression to CDC stage 3 (i.e. AIDS) as defined by onset of an AIDS-defining condition or a drop of CD4 counts below 200 cells per μ l, or death from any cause.

RESULTS: Baseline CD4 counts were significantly lower in the prednisolone arm (mean 512.14 cells/ μ l \pm S.E.M. 13.39) than in the placebo arm (554.40 \pm 15.75; $p = 0.042$). In an intent-to-treat analysis, average changes in CD4 counts versus baseline were +20.1 cells/ μ l in the first year for prednisolone ($P = 0.0002$) and -54.2 cells/ μ l for placebo ($P = 0.0027$). Four patients receiving prednisolone and 11 receiving placebo developed an AIDS-defining condition ($p = 0.0196$, GBW test) and 16 versus 18 patients developed CD4 counts < 200 cells/ μ l. No death occurred during the study. The hazard ratio for the primary endpoint progression under prednisolone versus placebo was 0.66 (95% CI 0.38- 1.15). Prednisolone treatment was not associated with an increase in adverse events or HIV viral load.

CONCLUSIONS: Treatment with 5 mg per day prednisolone for two years in ART-naive HIV patients is safe in an African setting and was associated with a significant increase of CD4 counts compared to placebo. In addition, prednisolone-treated patients developed significantly fewer AIDS-defining conditions, indicating that prednisolone slows HIV disease progression. We suggest low-dose prednisolone as a treatment option for asymptomatic HIV infection in resource-limited settings.

INTRODUCTION

The use of immunomodulating agents to stabilize the immune system has been suggested to slow HIV disease progression (Marchetti, Franzetti et al. 2005; Aiuti and Mezzaroma 2006). The best-studied substance, interleukin-2, has been shown to increase CD4 cell counts if used in combination with antiretroviral therapy (ART) as compared to ART alone (Kovacs, Baseler et al. 1995; Kovacs, Vogel et al. 1996; Levy, Capitant et al. 1999; Davey, Murphy et al. 2000; Losso, Belloso et al. 2000; Ruxrungtham, Suwanagool et al. 2000; Abrams, Bebhuk et al. 2002; Levy, Durier et al. 2003; Arduino, Nannini et al. 2004). Two large trials (SILCAAT and ESPRIT) to assess whether the IL-2 mediated increase in CD4 cell counts translates into clinical benefit however demonstrated that despite substantial increases in CD4 cell counts there was no clinical benefit (Abrams, Levy et al. 2009).

Another drug that may have an impact on CD4 counts in HIV infection but has not been studied well is the corticosteroid prednisolone. In contrast to interleukin-2, prednisolone has a mode of action that is immunosuppressive and short-term administration of prednisolone is associated with general lymphocytopenia (including CD4 cells) (Fauci, Dale et al. 1976). In this light it seemed rather surprising that in a prospective but uncontrolled clinical trial performed by Andrieu et al. prednisolone treatment with 0.3-0.5 mg/kg body weight increased CD4 counts by 119 cells/ μ l within one year without concomitant changes in HIV viral load (Andrieu, Lu et al. 1995; Andrieu and Lu 2004). In a previous observational study we found that even lower doses of prednisolone (5 mg daily) have a stabilizing effect on CD4 cell counts (Ulmer, Muller et al. 2005; Ulmer, Muller et al. 2005). Prednisone, the precursor of prednisolone, has been investigated in short-term studies showing increases in CD4 cell counts in HIV infection (Ferdman and Church 1994; McComsey, Whalen et al. 2001; Wallis, Kalayjian et al. 2003).

In order to analyze the effects of prednisolone on HIV disease progression in a developing country, we designed a two-year, randomized, placebo-controlled clinical trial assessing the effects of low-dose prednisolone (5 mg/day) on HIV disease progression in the absence of ART in 326 patients with initial CD4 counts > 300 cells/ μ l (ProCort1; clinicaltrials.gov NCT01299948). The trial was conducted at Bugando Medical Center in Mwanza, Tanzania.

METHODS

TRIAL DESIGN

The study was a two-year, randomized, double-blinded, placebo-controlled, single-center trial studying the effects of prednisolone *per os* in daily dose of 5 mg on HIV disease progression in the early phase (CDC stage A1, A2, B2, B2) of HIV infection with CD4 counts > 300 cells/ml in the absence of antiretroviral medication. A total of 326 patients were randomized; 163 patients received placebo and 163 patients received prednisolone.

The study was performed at the Bugando Medical Center (BMC) in Mwanza Tanzania. Clinical and laboratory evaluations were performed before start of treatment (baseline) and at months 1, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 12, 15, 18, 21 and 24. Study start (first patient first visit; FPFV) was 06/2007, and study end (last patient last visit; LPLV) was 03/2011. Patient information was provided in Kiswaheli and in English. Written informed consent was obtained from all patients. The study was performed according to the declaration of Helsinki and approved by the ethics committees of the Tanzanian National Institute for Medical Research (NIMR) and the Catholic University of Health & Allied Sciences, Mwanza.

PARTICIPANTS

Patients eligible for the study had to fulfill the following criteria: 18 years of age or older, proven HIV-infection according to WHO guidelines, CD4 counts above 300 cells/ μ l, negative pregnancy test, and a CDC stage of A1, A2, B1 or B2. Patients with prior antiretroviral medication, active tuberculosis, abnormal laboratory results (glucose level >160 mg/dl, liver enzymes AST and/or ALT \geq 1,5 x ULN, bilirubin \geq 4 x ULN, alkaline phosphatase \geq 5 x ULN, creatinine \geq 2 mg/dl) or serious other diseases including psychiatric disorders were excluded from the study.

STUDY DRUG ADMINISTRATION AND ADHERENCE

At each study visit, patients received enough study drugs to cover the time until the next visit. Study drugs were self-administered by the patients at home. Patients were asked to return unused study drug at the next study visit. We assessed study drug adherence on the basis of pill counts at every visit.

END POINTS

The primary study endpoint was time to progression. Progression was defined as the occurrence of one of the following events: a) death, b) progression to CDC stage A3 or B3 (i.e. CD4 T cell counts < 200) or progression to CDC stage C (AIDS-defining illnesses, including tuberculosis). Following progression, study drug medication was discontinued and patients received the standard of care antiretroviral medication. This endpoint was at the beginning of the study in 2007 in agreement with the “National Guidelines for the Clinical Management of HIV/AIDS – Tanzania” of the National AIDS Control Programme (NACP), edition 2005, which recommended ART at CD4 counts < 200 or WHO stage 4 disease. Shortly after the study was started, the National guidelines were updated (edition 2008) and ART treatment was recommended at CD4 counts < 200, or at CD4 < 350 in combination with an opportunistic disease of WHO stage 3, or at WHO stage 4, regardless of the CD4 count. All patients who qualified for ART according to these updated criteria also terminated participation in the study and received antiretroviral therapy. (In 2012 the most recent update was released, which recommends treatment at WHO stage 3 and 4, regardless of the CD4 count, or at a CD4 count < 350. By that time, the study was already closed (LPLV 03/2011)).

STATISTICAL ANALYSIS

Study data was subjected to *intention-to-treat* (ITT) analysis, i.e. all patients who entered randomization also entered analysis. Missing data (e.g. from patients lost to follow-up or who discontinued study drug) was handled according to the Last-Observation-Carried-Forward (LOCF) method. Estimated proportions of patients surviving without progression were calculated using the Kaplan-Meier method. Differences between two survival curves were tested by Gehan-Breslow-Wilcoxon test and Log-rank test. The Gehan-Breslow-Wilcoxon seems to us the more appropriate test of the two for the following reasons: the almost 50% loss of patients over time, as it places more weight on early events that still occurred against the background of a large sample size; the hazard ratios for disease progression are not equal over time, as they increase as HIV infection causes a progressive deterioration of the immune system; and finally, the sample sizes are large enough (> 50) to give enough power to a Gehan-Breslow-Wilcoxon analysis. Hazard ratios for progression within a 12-month period were calculated using a logrank test. Anova test with

repeated measurements was used to assess differences between the two treatment arms in CD4 counts. Average changes of CD4 counts per year were calculated using linear regression of changes in CD4 counts relative to baseline in both treatment groups over the 2-year study period. In order to enhance the sensitivity of our analysis for the biological effects of prednisolone, we also performed a *per protocol* (PP) analysis, in which we included only patients who had a minimum estimated adherence to study drug greater than 75% at every three-month interval in between the study visits.

LABORATORY ANALYSES

CD4 counts were determined at Bugando Medical Center using a FACScan or a FACS Calibur (Becton & Dickinson) during clinical routine. HIV viral load (VL) was determined from plasma using a COBAS[®] AmpliPrep Instrument (Roche Diagnostics) for all patients at baseline and at month 12. As this is not routinely performed at the study site in Tanzania it was determined in the Institute of Virology, Würzburg, Germany.

CLINICAL EVALUATION

Patients were clinically examined at every study visit for vital signs, HIV staging according to CDC criteria, and pregnancy (urine test). Tuberculosis was tested by sputum test every 3 months and by chest X-ray every 6 months. Malaria was diagnosed on clinical grounds and mostly confirmed by microscopic analysis of blood films. Patients positively diagnosed for malaria received artemether/lumefantrine and for severe forms quinine.

RESULTS

BASELINE CHARACTERISTICS

From 06/2007 to 02/2009, 406 patients were enrolled at Bugando Medical Center (Fig. 1). Eighty patients were excluded from randomization for not fulfilling the inclusion criteria (n=76), or for not having signed the informed consent (n=2) or for loss to follow-up before randomization (n=2). The remaining 326 patients were randomized to either 5 mg/day prednisolone *per os* (n=163) or placebo (n=163).

Treatment was double-blind for two years. The two treatment groups were well balanced with respect to most baseline characteristics (Tab. 1). Of note, however, is that patients in the prednisolone arm presented with significantly lower baseline CD4 counts (mean 512.14 cells/ μ l \pm S.E.M. 13.39) than in the placebo arm (554.40 \pm 15.75 P = 0.042*). In particular, 90 patients (55,21%) in the prednisolone arm had CD4 counts below 500 cells/ μ l versus only 70 patients (42.94%) in the placebo arm (p=0.027*, χ^2 test).

FOLLOW-UP AND ADHERENCE

Of the 326 patients who underwent randomization 36 patients (22.1%) in the prednisolone group and 41 patients (25.1%) in the placebo group were lost to follow up during the 2-year study period. Adherence to study regimens was estimated by the amount of unused and returned study drug. Overall adherence was similar in both groups with 87.89% \pm 0.64% in the prednisolone group and 90.72% \pm 0.75% in the placebo group (p = 0.108).

EFFECT OF PREDNISOLONE ON CD4 COUNTS

Prednisolone treatment had a stabilizing effect on CD4 counts with an average increase +20.1 (\pm 4.7) cells/ μ l in the first year for prednisolone (P = 0.0002) calculated by linear regression (Fig. 2 A). In contrast, patients treated with placebo experienced a significant loss of CD4 counts by -54.2 (\pm 8.5) cells/ μ l in the first year (P < 0.0027). Differences in CD4 changes between the two treatment groups were statistically significant (P = 0.004). The difference in absolute CD4 counts between the two treatment arms did not reach statistical significance (P = 0.910) as the T cells gains under prednisolone were too mild to compensate for the disadvantage of having started with significantly lower CD4 T cells in the prednisolone arm at baseline (Fig. 2 B). In order to increase the sensitivity to detect the biological effects of prednisolone on CD4 counts, we also performed a per protocol (PP) analysis including only patients with a drug adherence greater than 75% at every 3-months interval in-between the study visits. One year CD4 changes versus baseline were +38.4 for prednisolone (P = 0.0192) and -52.1 for placebo (P < 0.0001), indicating that our study may even underestimate the positive effects of prednisolone on CD4 counts in HIV infection due to noncompliance to the study drugs. Differences in CD4

changes between the two treatment groups were statistically significant ($P = 0.014$) (Fig. 2 C) but again differences in absolute CD4 numbers did not reach statistical significance (Fig. 2D).

PRIMARY END POINT: DISEASE PROGRESSION

The primary endpoint of our study was progression to CDC stages A3, B3, C or death. A total of 20 (12.3%) patients treated with prednisolone reached this combined endpoint compared to 29 (17.8%) patients in the placebo arm in the ITT population. Progression was caused by drop of CD4 counts below 200 cells/ μ l in 16 patients under prednisolone treatment versus 18 patients under placebo or by occurrence of AIDS-defining conditions in 4 cases under prednisolone versus 11 cases under placebo. No deaths occurred during the study (Tab. 2). Progression as defined in the primary study endpoint was therefore dominated by the CD4 criterion, which has a strong bias against the prednisolone arm due to the lower baseline counts in this group. A Kaplan Meier estimate of the primary study endpoint as defined above did not reveal statistically relevant differences between the two treatment groups ($P = 0.1892$ Gehan Brelow Wilcoxon test; $p = 0.1362$, log rank test) (Fig. 2A). A per protocol analysis, in which only patients with an estimated drug adherence of higher than 75% were analyzed, revealed a stronger trend towards slower progression as defined in the primary study endpoint ($p = 0.1611$, Gehan Brelow Wilcoxon test; $p = 0.088$, log rank test). Some of the patients who received ART in our study did not fulfill the endpoint criteria (five patients treated with prednisolone and one patient treated with placebo) but received ART by the discretion of the treating clinician (Tab. 2).

Clinical progression, as defined by occurrence of AIDS-defining conditions, was significantly slowed under prednisolone, despite the disadvantage of having started with lower baseline CD4 counts. A Kaplan Meier estimate revealed a statistically significant increase in AIDS-free survival under prednisolone ($p = 0.0196$, Gehan-Breslow-Wilcoxon test; $p = 0.058$, log rank test) (Fig. XXX), demonstrating that low dose prednisolone not only improved the CD4 surrogate marker but also attenuated clinical HIV disease progression.

HIV VIRAL LOAD AND MAJOR CLINICAL OUTCOMES

We determined HIV viral load at baseline and at month 12. As depicted in Fig. 4, prednisolone treatment had no influence on HIV viral load (changes between placebo- and prednisolone-treated patients statistically not significant with $p = 0.5536$). The rate of adverse events was not elevated under prednisolone, including typical side effects of higher-dose prednisolone (Tab. 3). An interesting observation is the significant reduction of malaria cases in prednisolone-treated patients versus placebo-treated patients (31 cases versus 60 cases, $p = 0.0016$), which merits further investigation in future trials.

DISCUSSION

Our study demonstrates that prednisolone administered in a 5 mg daily dose *per os* increases CD4 T cell counts in HIV-infected patients in the absence of ART and also prolongs AIDS-free survival.

Our findings are of particular significance for the clinical management of HIV infection in resource-limited countries: Prednisolone is a generic drug and its production costs are very low. For the ProCort study, prednisolone drug costs were in the range of five dollars per patient per year and it could be provided at an even lower price if used as a prescribed drug and not as study medication. In many countries that are most severely affected by the global HIV pandemic, access to ART is still limited, despite the substantial improvements that have been achieved so far: More than 9 million life-years have been saved due to the introduction of ART in sub-Saharan Africa since 1995 and 56% of eligible patients had access to ART in 2011 . However, tightening budgets in donor countries cast doubts on whether substantial improvement can be achieved in the near future (Hayden 2012). Moreover, compared to what is considered to be the best time point to start ART in industrialized countries (e.g.), ART is still initiated relatively late in resource-limited countries at CD4 counts below 350 cells/ μ l (Ulmer, Muller et al. 2005). Our results indicate that 5 mg/day prednisolone might be a treatment option for patients for whom ART is not yet available (e.g. in rural areas) or for patients who are still in the

asymptomatic phase of the infection with CD4 counts higher than 350 cells/ μ l in order to slow disease progression.

Virological failure due to resistance to first-line (and even second-line) regimens in sub-Saharan countries is increasingly recognized (Kasang, Kalluvya et al. 2011; Gupta, Jordan et al. 2012) and for these patients there is currently no treatment option available. Low-dose prednisolone does not affect virus replication and does therefore not carry a resistance risk in poorly adherent patients. Prednisolone could therefore be considered as a salvage therapy for patients who experienced virological failure of first- and second-line ART.

Prednisolone treatment in our study was associated with modest but significant increases in CD4 T cell counts: CD4 T cells increased by +19 cells/ μ l per year and in the PP population by +26 cells/ μ l per year. Although substantial, this is still relatively low compared to what can be achieved with ART, even in resource-limited settings (Barth, van der Meer et al. 2008). We therefore would certainly not advise the use of prednisolone as an alternative to ART if ART is available, due to its lower efficacy, let alone the beneficial effects of ART on reducing the risk of HIV transmission. In line with this argumentation, the results of this study should not be used to argue for a decrease in global efforts to provide ART for all HIV patients. But as long as this goal has not been achieved, low-dose prednisolone could easily be offered as an *ad-hoc* regimen to prolong AIDS-free survival in HIV infection.

The relatively low dose of 5 mg per day used in our study is usually not associated with long-term side effects typically seen with higher doses of glucocorticoid treatment, such as Cushing's syndrome, osteoporosis, glaucoma or cataracts. Daily doses of 5 mg prednisolone are also being used for long-term treatment of other chronic diseases such as rheumatoid arthritis (van Everdingen, Jacobs et al. 2002). During the 2-year period of our study, no case of Cushing syndrome was observed and the typical side effects associated with higher-dose prednisolone-treatment were not more common in the prednisolone compared to the placebo group.

The mechanism of the observed beneficial effects of prednisolone on HIV progression remains to be elucidated. We and others have shown earlier that prednisolone (administered at relatively high doses but also at 5 mg/day as in the current study) reduces immune activation in HIV infection (Andrieu, Lu et al. 1995; Andrieu and Lu 2004; Kasang, Ulmer et al. 2012). Immune activation is considered to be a driving force for HIV progression (Giorgi, Hultin et al. 1999; Deeks, Kitchen et al.

2004; Klatt, Funderburg et al. 2013). It seems therefore a plausible hypothesis that prednisolone might have attenuated disease progression by reducing HIV-associated general immune activation. In order to shed more light on this question, we will also determine immune activation parameters of the ProCort samples in future analyses. It is unclear, whether the observed increase in CD4 counts reflects higher absolute helper T cell numbers in the body or whether prednisolone predominantly influenced the distribution of CD4 cells within the body by preventing activated T cells to enter peripheral organs, leading to increased numbers of CD4 cells in the blood. Irrespective of the mechanism of the observed CD4 cell increase in blood, the immune reconstitution under prednisolone was functional as we observed significantly fewer AIDS-defining opportunistic diseases. This is in sharp contrast to what has been observed for IL-2 in the ESPRIT and SILCAAT trials, which showed a substantial increase in CD4 counts but very surprisingly a lack of clinical benefit (Abrams, Levy et al. 2009). Prednisolone with a completely different mode of action than interleukin-2 may therefore be an attractive drug to be further explored for improvement of immune reconstruction under HAART. Our results warrant further investigation by larger trials in order to better quantify the beneficial effects of low-dose prednisolone on HIV disease progression. The effects of prednisolone on immune reconstitution in combination with ART should be explored. In resource-limited countries, the cheap, already approved and robust drug prednisolone may be a readily available option to reduce HIV mortality until ART becomes universally available.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to MDs Neema Chami, Eliawema Mwitani, Rogatus Kabyemera, Kinanga Magambo, Hauli Kinyeti, and Mohamed Jan Mubarak for patient care and to Claudia Bohnert for study coordination in the beginning. We are indebted to our study nurse Lydia Makenge, our documentation assistant Theresia Gabriel Juma, our laboratory technicians Omary Kapand and Ingeborg Euler-Koenig, and our pharmacist John Myombe.

This study was funded by the German Leprosy and Tuberculosis Relief Association, Evangelisches Studienwerk e.V. Villigst, The Georg Ludwig Rexroth Foundation, Deutscher Akademischer Austauschdienst (DAAD) and the Unibund Würzburg.

REFERENCES

1. Aiuti F, Mezzaroma I. Failure to reconstitute CD4+ T-cells despite suppression of HIV replication under HAART. *AIDS reviews* 2006;8:88-97.
2. Marchetti G, Franzetti F, Gori A. Partial immune reconstitution following highly active antiretroviral therapy: can adjuvant interleukin-2 fill the gap? *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 2005;55:401-9.
3. Ruxrungtham K, Suwanagool S, Tavel JA, et al. A randomized, controlled 24-week study of intermittent subcutaneous interleukin-2 in HIV-1 infected patients in Thailand. *AIDS* 2000;14:2509-13.
4. Losso MH, Bellosso WH, Emery S, et al. A randomized, controlled, phase II trial comparing escalating doses of subcutaneous interleukin-2 plus antiretrovirals versus antiretrovirals alone in human immunodeficiency virus-infected patients with CD4+ cell counts $\geq 350/\text{mm}^3$. *The Journal of infectious diseases* 2000;181:1614-21.
5. Levy Y, Durier C, Krzysiek R, et al. Effects of interleukin-2 therapy combined with highly active antiretroviral therapy on immune restoration in HIV-1 infection: a randomized controlled trial. *AIDS* 2003;17:343-51.
6. Levy Y, Capitant C, Houhou S, et al. Comparison of subcutaneous and intravenous interleukin-2 in asymptomatic HIV-1 infection: a randomised controlled trial. ANRS 048 study group. *Lancet* 1999;353:1923-9.
7. Kovacs JA, Vogel S, Albert JM, et al. Controlled trial of interleukin-2 infusions in patients infected with the human immunodeficiency virus. *The New England journal of medicine* 1996;335:1350-6.
8. Kovacs JA, Baseler M, Dewar RJ, et al. Increases in CD4 T lymphocytes with intermittent courses of interleukin-2 in patients with human immunodeficiency virus infection. A preliminary study. *The New England journal of medicine* 1995;332:567-75.
9. Davey RT, Jr., Murphy RL, Graziano FM, et al. Immunologic and virologic effects of subcutaneous interleukin 2 in combination with antiretroviral therapy: A randomized controlled trial. *JAMA : the journal of the American Medical Association* 2000;284:183-9.
10. Arduino RC, Nannini EC, Rodriguez-Barradas M, et al. CD4 cell response to 3 doses of subcutaneous interleukin 2: meta-analysis of 3 Vanguard studies. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 2004;39:115-22.
11. Abrams DI, Bebhuk JD, Denning ET, et al. Randomized, open-label study of the impact of two doses of subcutaneous recombinant interleukin-2 on viral burden in patients with HIV-1 infection and CD4+ cell counts of $\geq 300/\text{mm}^3$: CPCRA 059. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2002;29:221-31.
12. Abrams D, Levy Y, Losso MH, et al. Interleukin-2 therapy in patients with HIV infection. *The New England journal of medicine* 2009;361:1548-59.
13. Fauci AS, Dale DC, Balow JE. Glucocorticosteroid therapy: mechanisms of action and clinical considerations. *Annals of internal medicine* 1976;84:304-15.
14. Andrieu JM, Lu W. Long-term clinical, immunologic and virologic impact of glucocorticoids on the chronic phase of HIV infection. *BMC medicine* 2004;2:17.
15. Andrieu JM, Lu W, Levy R. Sustained increases in CD4 cell counts in asymptomatic human immunodeficiency virus type 1-seropositive patients treated with prednisolone for 1 year. *The Journal of infectious diseases* 1995;171:523-30.
16. Ulmer A, Muller M, Bertisch-Mollenhoff B, Frietsch B. Low-dose prednisolone has a CD4-stabilizing effect in pre-treated HIV-patients during structured therapy interruptions (STI). *European journal of medical research* 2005;10:227-32.
17. Ulmer A, Muller M, Bertisch-Mollenhoff B, Frietsch B. Low dose prednisolone reduces CD4+ T cell loss in therapy-naive HIV-patients without antiretroviral therapy. *European journal of medical research* 2005;10:105-9.
18. Ferdman RM, Church JA. Immunologic and virologic effects of glucocorticoids on human immunodeficiency virus infection in children: a preliminary study. *The Pediatric infectious disease journal* 1994;13:212-6.

19. McComsey GA, Whalen CC, Mawhorter SD, et al. Placebo-controlled trial of prednisone in advanced HIV-1 infection. *AIDS* 2001;15:321-7.
20. Wallis RS, Kalayjian R, Jacobson JM, et al. A study of the immunology, virology, and safety of prednisone in HIV-1-infected subjects with CD4 cell counts of 200 to 700 mm⁻³. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2003;32:281-6.
21. UNAIDS report on the global AIDS epidemic 2012. Available at http://www.unaids.org/en/media/unaids/contentassets/documents/epidemiology/2012/gr2012/20121120_UNAIDS_Global_Report_2012_en.pdf. Section accessed on 10/01/2013.
22. Hayden EC. Cuts hamper bid to tackle AIDS. *Nature* 2012;483:131-2.
23. Panel on Antiretroviral Guidelines for Adults and Adolescents. Guidelines for the use of antiretroviral agents in HIV-1-infected adults and adolescents. Department of Health and Human Services. Available at <http://aidsinfo.nih.gov/ContentFiles/AdultandAdolescentGL.pdf>. Section accessed on 10/01/2013.
24. Antiretroviral Therapy for HIV Infection in Adults and Adolescents 2010 revision. Available at <http://www.who.int/hiv/pub/arv/adult2010/en/index.html>. Section accessed on 10/01/2013.
25. Kasang C, Kalluvya S, Majinge C, et al. HIV drug resistance (HIVDR) in antiretroviral therapy-naive patients in Tanzania not eligible for WHO threshold HIVDR survey is dramatically high. *PLoS one* 2011;6:e23091.
26. Gupta RK, Jordan MR, Sultan BJ, et al. Global trends in antiretroviral resistance in treatment-naive individuals with HIV after rollout of antiretroviral treatment in resource-limited settings: a global collaborative study and meta-regression analysis. *Lancet* 2012;380:1250-8.
27. Barth RE, van der Meer JT, Hoepelman AI, et al. Effectiveness of highly active antiretroviral therapy administered by general practitioners in rural South Africa. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases* : official publication of the European Society of Clinical Microbiology 2008;27:977-84.
28. van Everdingen AA, Jacobs JW, Siewertsz Van Reesema DR, Bijlsma JW. Low-dose prednisone therapy for patients with early active rheumatoid arthritis: clinical efficacy, disease-modifying properties, and side effects: a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Annals of internal medicine* 2002;136:1-12.
29. Kasang C, Ulmer A, Donhauser N, et al. HIV patients treated with low-dose prednisolone exhibit lower immune activation than untreated patients. *BMC infectious diseases* 2012;12:14.
30. Deeks SG, Kitchen CM, Liu L, et al. Immune activation set point during early HIV infection predicts subsequent CD4+ T-cell changes independent of viral load. *Blood* 2004;104:942-7.
31. Giorgi JV, Hultin LE, McKeating JA, et al. Shorter survival in advanced human immunodeficiency virus type 1 infection is more closely associated with T lymphocyte activation than with plasma virus burden or virus chemokine coreceptor usage. *The Journal of infectious diseases* 1999;179:859-70.
32. Klatt NR, Funderburg NT, Brenchley JM. Microbial translocation, immune activation, and HIV disease. *Trends in microbiology* 2013;21:6-13.

Tables and figures

Tab. 1: Patient characteristics. Data as means \pm S.E.M.

Patient characteristics total n=326	Placebo n=163	Prednisolon n = 163	p-value
Age (years)	35.27 \pm 0.70	34.09 \pm 0.66	p = 0.221
Gender	80.4 % female	81.0 % female	p = 0.888
CD4 counts \pm SEM	554.40 \pm 15.75	512.14 \pm 13.39	p = 0.042*
CD4 counts < 500	42.97%	55.21%	p = 0.027* (χ^2 - test)
Time since first diagnosis (days)	407.99 \pm 46.77	413.51 \pm 52.98	p = 0.938

Tab. 2: Clinical Endpoints and other Reasons for ART

		Prednisolone (n = 163)	Placebo (n = 163)
clinical endpoints	AIDS-defining condition	4	11
	Candidiasis oesoph.	0	1
	Cervix carcinoma	0	1
	Kaposi sarcoma	0	1
	M. tuberculosis disease	3	3
	Toxoplasmosis of brain	0	1
	P. jirovecii pneumonia	1	1
	Pneumonia recurrent	0	2
	Wasting syndrome	0	1
		CD4 < 200	16
	Death	0	0
	Total	20	29
CD4 < 350 with non-AIDS opportunistic infection**	3		1
	candidiasis, oropharyngeal	1	0
	cough, fever, weight loss	1	0
	fever, prolonged	0	1
	tonsillitis, pneumonia	1	0
other reasons***	candidiasis, oral	1	0
	CD4 of 380 cells/ μ l		
total receiving ART		24	30

*) one patient under placebo developed an AIDS-defining condition with CD4 counts < 200. In this table this patient was only listed under AIDS-defining conditions and not under the CD4 criterion.

**) According to the national treatment guidelines updated in 2008, ART treatment in Tanzania was indicated at WHO stage 4 or at CD4 counts < 350 cells/ μ l if a (non-AIDS-defining) opportunistic infection (WHO stage 3) is present. Patients who fulfilled this condition discontinued the study and received ART.

***) In one case the decision to initiate ART was not in accordance with the study protocol or the national guidelines, but was done at the discretion of the treating clinician. Before initiation of ART at study month 4 with a CD4 count of 380 cells/ μ l and a non-AIDS-defining condition (oral candidiasis), the patient presented with stable CD4 counts of 723 cells/ μ l (baseline), 754 cells/ μ l (month 1), 524 cells/ μ l (month 2), and 812 cells/ μ l (at month 3). CD4 counts continued to be stable immediately after initiation of ART (486 cells/ μ l at week 6 and 714 cells/ μ l at week 10).

Tab. 3: Adverse Events

	Adverse event	Prednisolone (N=163)		Placebo (N=163)		P Value	
		patients	events	patients	events	patients	events [§]
general	Any adverse event	144	669	143	711	1.0000	n.d.
	Any serious adverse event	15	16	14	15	1.0000	n.d.
	Any grade 3 or 4 events	8	9	8	10	1.0000	n.d.
	grade 3 event	7	8	8	9	1.0000	n.d.
	grade 4 event	1	1	1	1	1.0000	n.d.
infections	Herpes	15	16	12	14	0.6884	0.9336
	Malaria	30	31	42	60	0.1416	0.0016**
	Pneumonia	26	28	19	22	0.3354	0.5597
	Respiratory tract infections	75	122	68	113	0.5031	0.8004
	Tonsillitis	6	8	15	16	0.0689	0.1275
	Tuberculosis	3	3	3	3	1.0000	0.7158
	Urinary tract infections	24	30	24	28	1.0000	0.9942
GI symptoms	Candidiasis	22	32	28	38	0.4424	0.4481
	Abdominal pain	33	38	31	41	0.8892	0.6952
	Diarrhoe	24	32	34	41	0.1922	0.2691
	Epigastric pain	8	12	12	13	0.4896	0.9272
	Nausea	10	12	8	8	0.8092	0.5542
	Peptic ulcer	2	3	6	6	0.2830	0.4700
	Vomiting	4	4	3	3	1.0000	0.9616
cancers	Kaposi sarcoma	0	0	1	1	1.0000	0.9855
Prednisolone related	Hyperglycemia	1	1	1	1	1.0000	0.4954
	Fluid retention	0	0	1	1	1.0000	0.9855
	Skin disorders	50	79	39	56	0.2137	0.0853
	Hypertension	0	0	0	0	n.a.	n.a.
	Pain	37	60	58	88	0.0146*	0.0123*
others	Fever	45	54	47	65	0.9021	0.2553
	Neurological disorders	5	5	5	5	1.0000	0.7955
	Other*	71	99	63	88	0.4308	0.2479
	*): conjunctivitis, otitis media, prolonged menstruation, dental pain, flue like symptoms, worm infections, dental pain, dizziness, numbness etc.						

§ = scale basis for χ^2 calculation: 163 patients x 12 visits => 1956 potential number of events per AE

Fig. 1

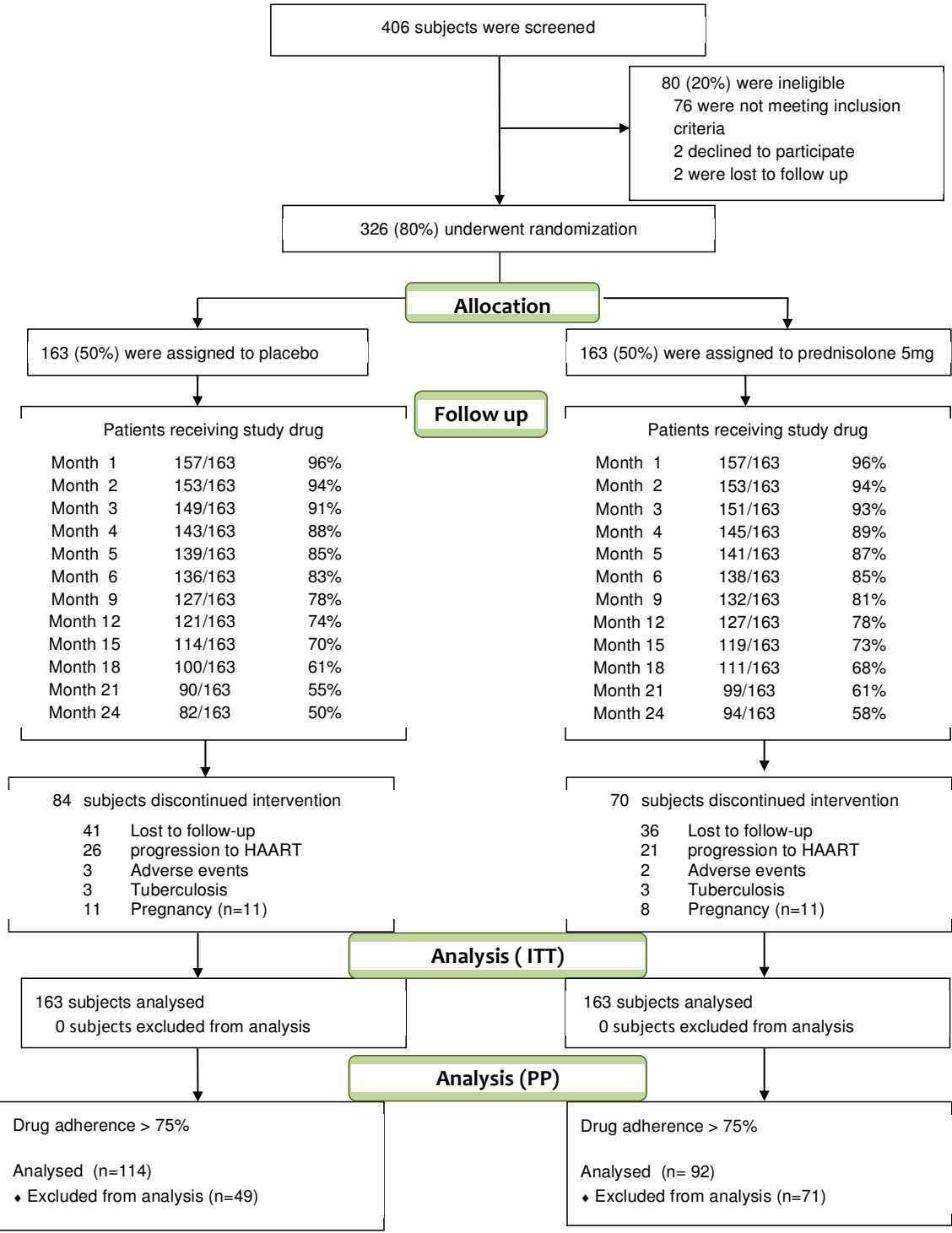


Fig. 1: CONSORT Flow diagram of the ProCort1 study.

Fig. 2

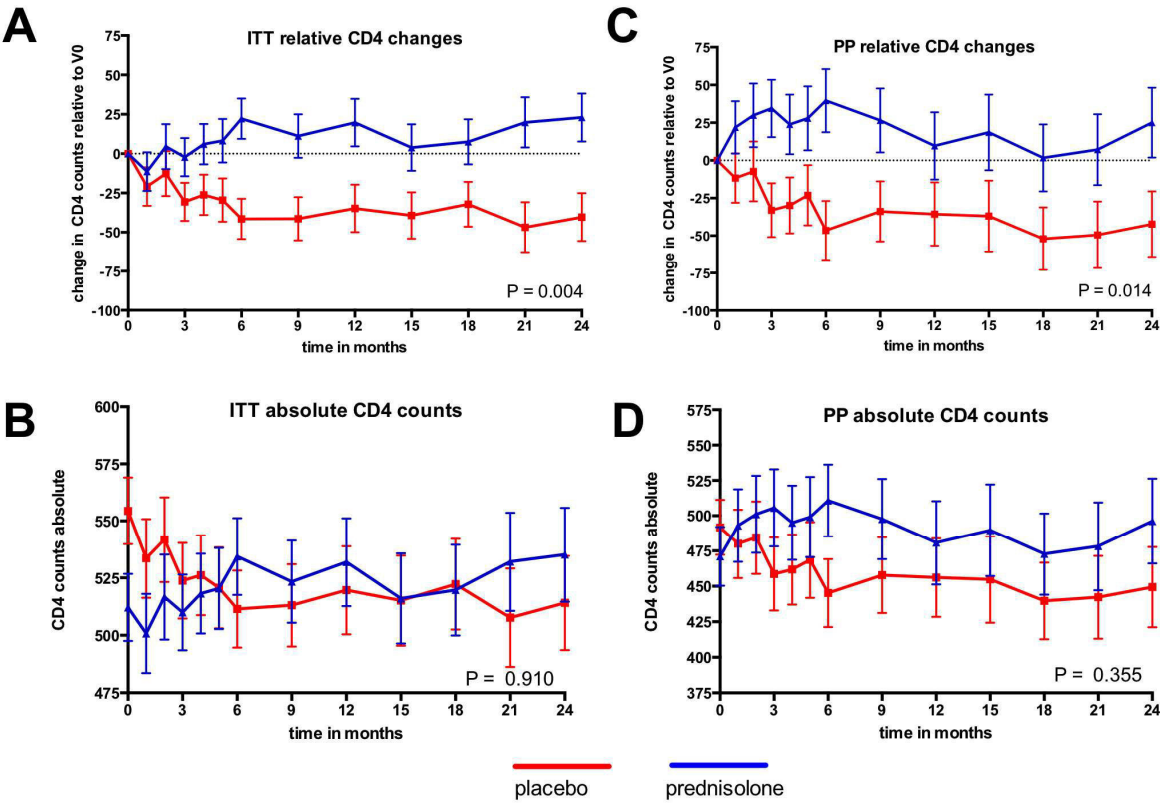


Fig.2: Effects of Prednisolone on CD4 cell counts. A: CD4 changes relative to baseline of the Intent to treat (ITT) population. B: Absolute CD4 counts of the ITT population. C: CD4 changes relative to baseline of the per protocol (PP) population. D: Absolute CD4 counts of the PP population.

Fig. 3

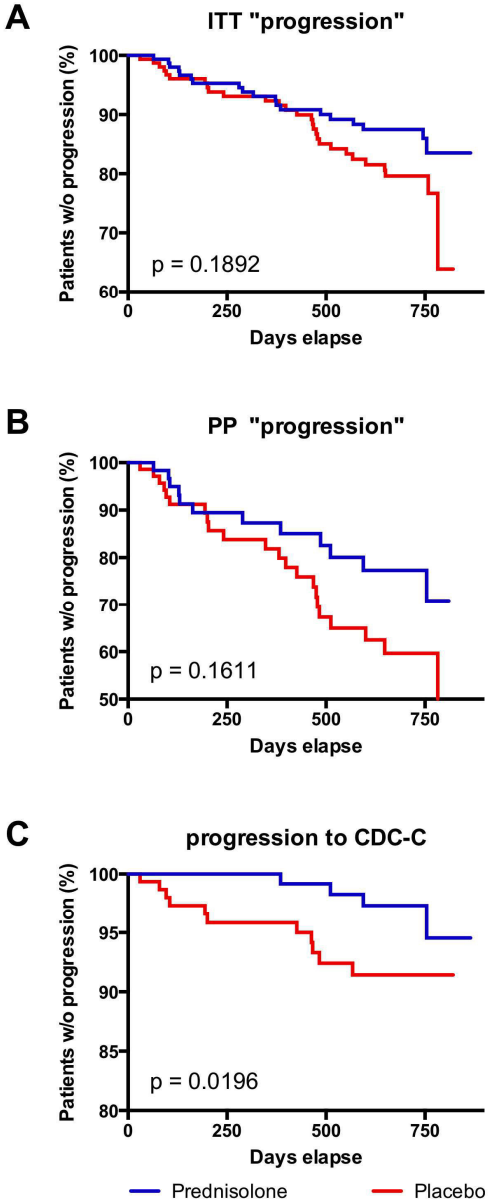


Fig.3: Progression under prednisolone. A: Intent to treat (ITT) analysis of progression as defined by the primary clinical end point. B: Per protocol (PP) analysis of progression as defined by the primary clinical end point. C: Progression to CDC stage C within the ITT population.

Fig. 4

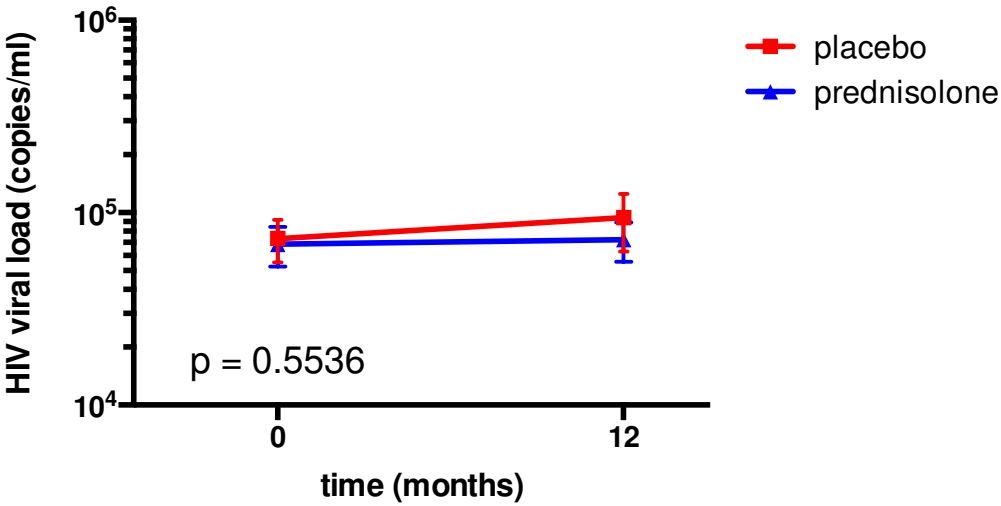


Fig.4: **HIV viral load.** Viral load was determined from available plasma sample pairs (76 patients treated with placebo and 62 patients treated with prednisolone) at baseline and at month 12. Data as means \pm S.E.M. Mean viral load under placebo at baseline was 7.4×10^4 (95% CI 3.7×10^4 - 1.1×10^5) copies/ml and at month 12 was 9.4×10^4 (95% CI 3.2×10^4 - 1.6×10^5) copies/ml. Mean viral load under prednisolone at baseline was 6.9×10^4 (95% CI 3.7×10^4 - 1.0×10^5) copies/ml and at month 12 was 7.2×10^4 (95% CI 3.9×10^4 - 1.1×10^5) copies/ml.

4.4 Ergebnisse aus den Immunaktivierungsuntersuchungen der ProCort Studie

Zusätzlich zu den bereits veröffentlichten Ergebnissen wurden im Rahmen dieser Arbeit Immunaktivierungsparameter der in Tansania behandelten Patienten gemessen, um die Hypothese zu untersuchen, inwieweit tatsächlich eine Reduktion der Immunaktivierung durch ein niedrig dosiertes Prednisolon in einem Umfeld wie Tansania mit hoher Prävalenz von Infektionskrankheiten zu erreichen ist.

4.4.1 soluble urokinase plasminogen activator receptor (suPAR)

Der “soluble urokinase Plasminogen Activator Receptor” (suPAR) Blutplasmalevel zeigt Entzündungen an und kann als Marker in verschiedenen Infektionskrankheiten und Krebserkrankungen verwendet werden. Der Rezeptor uPAR ist auf immunologisch aktiven Zellen wie Monozyten, T-Lymphozyten und Makrophagen zu finden, aber auch unter anderem auf Tumorzellen (Estreicher, Muhlhauser et al. 1990; de Bock and Wang 2004; Thuno, Macho et al. 2009). Die lösliche Form suPAR entsteht bei Abspaltung des membrangebundenen uPAR und ist in Vollblut, Plasma, Serum, Urin und Cerebrospinal Flüssigkeit nachweisbar. Es wurde eine direkte Korrelation zwischen der Konzentration von suPAR im Plasma und der Aktivierung des Immunsystems beschrieben (Backes, van der Sluijs et al. 2012). Für Patienten mit HIV Infektion ist suPAR als Marker der Progressions- und Mortalitätsrisikofaktor identifiziert worden (Lawn, Labeta et al. 2000; Fourie, Van Rooyen et al. 2012; Rabna, Andersen et al. 2012).

In unserem Patientenkollektiv konnten wir in der ITT Analyse nach einem Jahr eine signifikante Veränderung der suPAR Werte zur Ausgangsvisite in der mit Prednisolon behandelten Patientengruppe im Vergleich zur der mit Placebo behandelten Patientengruppe nachweisen ($-0.147 \text{ ng/ml} \pm 0.102$, versus $0,325 \text{ ng/ml} \pm 0.103$; $p < 0.0001$), die absoluten Werte zeigten keine statistisch signifikante Veränderung ($2.510 \text{ ng/ml} \pm 0.105$, vs. $2.770 \text{ ng/ml} \pm 0.106$; $p = 0.485$), da die Prednisolon Patienten mit höheren suPAR Werten in die Studie gestartet waren.

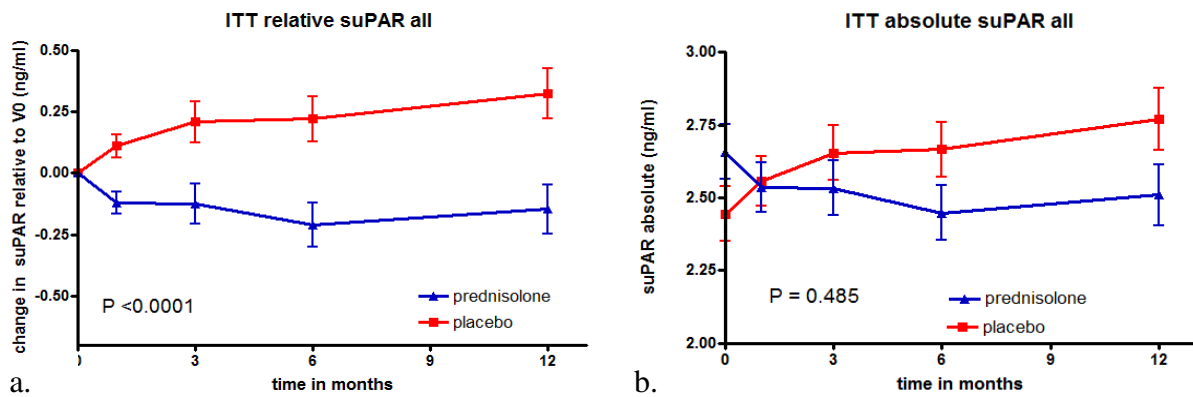


Abb. 16: a. + b. Veränderung der relativen und absoluten suPAR Werte.

- Veränderung der suPAR Werte im Verlauf eines Jahres im Vergleich zum Ausgangswert mit 5mg Prednisolon täglich oder mit Placebo.
- Veränderung der absoluten suPAR Werte im Verlauf eines Jahres mit 5 mg Prednisolon täglich oder mit Placebo.

4.4.2 lösliches CD14 (sCD14)

Der Übertritt von LPS durch die Darmmukosa ist als maßgeblicher Auslöser einer generalisierten Immunaktivierung in HIV Patienten bekannt (Brenchley, Price et al. 2006). Erhöhte LPS-Spiegel lassen sich im Blutplasma durch Bestimmung von sCD14, einem Korezeptormolekül für LPS, das von Makrophagen ausgeschüttet wird, indirekt nachweisen (Kitchens and Thompson 2005). Die Veränderungen des sCD14 Wertes im Blutplasma von Prednisolon-behandelten Patienten im Vergleich zu Placebo-behandelten Patienten hat sich weder in den sCD14 Absolutwerten (4.030 ng/ml \pm 0.171, vs. 3.513 ng/ml \pm 0.167; p=0.062) noch im Verhältnis der sCD14 Werte zur Ausgangsvisite (-0.352 ng/ml \pm 0.172, vs. 0.005 ng/ml \pm 0.176; p=0.165) statistisch signifikant verbessert.

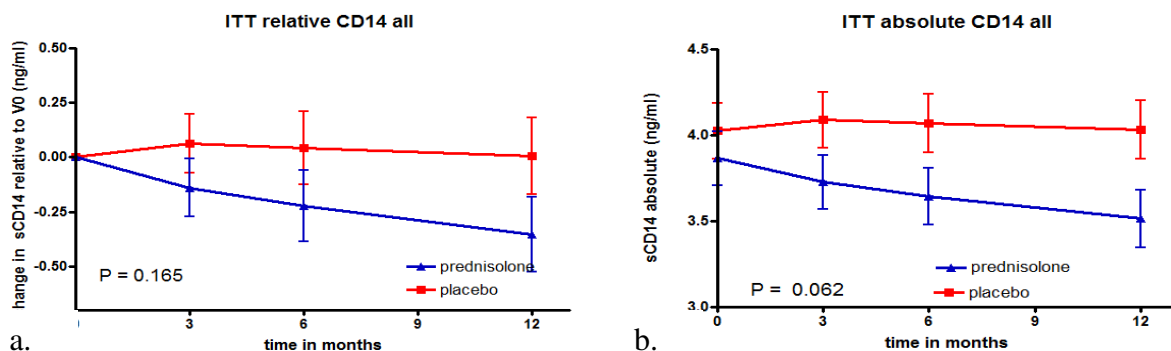


Abb. 17: a. + b. Veränderung der relativen und absoluten sCD14 Werte.

- Veränderung der sCD14 Werte im Verlauf eines Jahres im Vergleich zum Ausgangswert mit 5 mg Prednisolon täglich oder mit Placebo.
- Veränderung der absoluten sCD14 Werte im Verlauf eines Jahres mit 5 mg Prednisolon täglich oder mit Placebo.

4.4.3 Aktivierungsmarker (CD8 CD38 HLADR) der CD8+T-Lymphozyten

Eine dauerhaft erhöhte Aktivierung der Lymphozyten ist als Risiko für eine schnelle Progression der HIV-Infektion bekannt (Hazenberg, Otto et al. 2003). Besonders der Nachweis der Aktivierung der CD8+ T-Lymphozyten ist geeignet für eine Prognose des Krankheitsverlaufs (Giorgi, Liu et al. 1993).

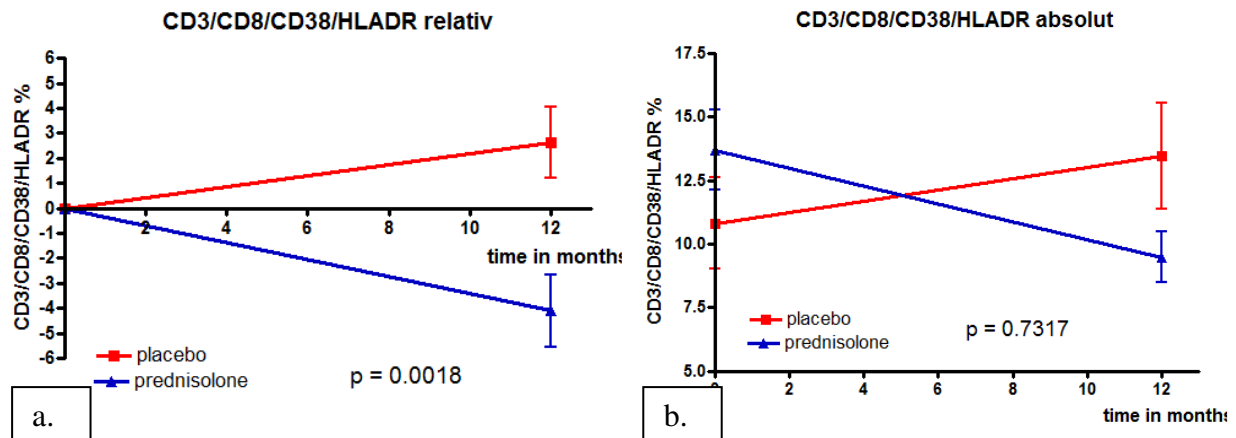


Abb. 18: a. + b. Veränderung der relativen und absoluten CD3/CD8/CD38/HLADR Werte.

- Veränderung der CD3/CD8/CD38/HLADR Werte im Verlauf eines Jahres im Vergleich zum Ausgangswert mit 5 mg Prednisolon täglich oder mit Placebo
- Veränderung der absoluten CD3/CD8/CD38/HLADR Werte im Verlauf eines Jahres mit 5 mg Prednisolon täglich oder mit Placebo.

Die Messungen der Lymphozyten-Aktivierungsmarker CD38/HLADR auf CD3/CD8-positiven Zellen zeigten im Vergleich von Prednisolon-behandelten Patienten zu Placebo-behandelten Patienten eine statistische Signifikanz bezogen auf den Ausgangswert ($-4.101\% \pm 1.458\%$, vs. $2.637\% \pm 1.431\%$; $p=0.0018$) während für die absoluten Werte aufgrund der hohen Startwerte in der Prednisolongruppe keine statistische Signifikanz nachgewiesen werden konnte ($9.482\% \pm 0.991\%$, vs. $13.46\% \pm 2.089\%$; $p=0.7317$).

5 Diskussion

In Tansania waren im Jahr 2012 1,4 Millionen Menschen mit HIV infiziert. Die hohe Anzahl an immunsupprimierten Patienten bedeutet eine besondere Herausforderung an das Land und seine Gesundheitspolitik (TACAIDS 2012) und bewirkt zudem das Risiko der vermehrten Ausbreitung anderer Infektionskrankheiten, wie z.B. der Tuberkulose. Die Infektion mit HIV erhöht das Risiko an Tuberkulose zu erkranken um das 20-fache im Vergleich zu HIV-negativer Bevölkerung in Ländern mit hoher TB Prävalenz (WHO 2009; Martinson, Hoffmann et al. 2011).

In den Industrieländern werden HIV Patienten immer früher in die Therapie eingeschlossen (Start Studie: Strategic Timing of Antiretroviral Treatment, ClinicalTrials.gov Identifier: NCT00867048). Auch in Tansania wurden die Behandlungsrichtlinien in den letzten Jahren so verändert, dass nun Patienten mit dem WHO Stage 2, also begrenztem Auftreten von HIV assoziierten Erkrankungen, bereits bei einer CD4+ T-Lymphozytenzahl von 350 Zellen/ μ l in die Therapie aufgenommen werden sollen (NACP 2012). Leider ist jedoch die Versorgungssituation mit antiretroviralen Medikamenten in Ländern mit begrenzten Ressourcen immer noch insuffizient (Hanson, Thorson et al. 2009). Auch ist die Dauer der First-Line Therapie aufgrund der Problematik der Resistenzentwicklung nur begrenzt. Im BMC wurde in 17.1% der Patienten nach 20 Monaten ein Versagen der First-Line Therapie nachgewiesen (Jaka HM 2009). Diese Faktoren bedingen die Notwendigkeit, Patienten bei denen HIV neu diagnostiziert wurde, so lange als möglich stabil zu halten und die Progression zu verlangsamen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde überprüft, ob niedrig dosiertes Prednisolon (5 mg pro Tag) geeignet ist, die Krankheitsprogression dieser normalerweise unbehandelten Patienten zu verlangsamen. Die Arbeitshypothese war, dass eine durch HIV ausgelöste gesteigerte generalisierte Immunaktivierung den CD4+ T-Lymphozytenverlust bedingt, mit darauf folgender Erschöpfung des Immunsystems und Entwicklung von HIV assoziierten Erkrankungen (Hazenberg, Otto et al. 2003). Durch unsere Untersuchungen eines mit 5 mg Prednisolon behandelten deutschen Patientenkollektives konnte nachgewiesen werden, dass der Einsatz dieser Therapie zu einer statistisch signifikanten Reduktion der allgemeinen Immunaktivierung führt (Kasang, Ulmer et al. 2012). Diese Beobachtung deckte sich mit den Ergebnissen aus Studien mit 10 – 20 fach höheren Dosierungen von Prednisolon in HIV infizierten unbehandelten Patienten (Andrieu, Lu et al. 1995; Lu, Salerno-Goncalves et al. 1995). Neu ist jedoch, dass die niedrige Dosierung eine nebenwirkungsarme Therapie über

einen längeren Zeitraum ermöglicht (van Everdingen, Jacobs et al. 2002). Unsere Untersuchungen zum Einsatz dieser Behandlungsstrategie, erstmals im Rahmen einer doppelblinden randomisierten Studie in Tansania, konnten klären, dass das Nebenwirkungsspektrum tatsächlich auch in einer Umgebung mit einer hohen Prävalenz von Infektionskrankheiten gering ist und im Besonderen für den Einsatz in einem Tuberkulose endemischen Gebiet tauglich ist. Die Inzidenz mit 1,8% der im Verlauf der zweijährigen Prednisolonbehandlung an Tuberkulose erkrankten HIV Patienten (3 in jeder Gruppe; Placebo und Prednisolon) lag unter der normalen Co-Infektionsrate von HIV/TB die für 2010 von der WHO mit 6,7% angegeben ist (WHO TB Country profile <http://www.who.int/tb/country/data/profiles/en/index.html>). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Behandlung von nur 5 mg Prednisolon geeignet ist die CD4+ T-Lymphozytenzahl zu stabilisieren. Während in dem zweijährigen Zeitraum der Studie die Placebo Patienten im Mittel 54,2 CD4+ T-Lymphozyten/ μ l verloren, profitierten Prednisolon Patienten sogar noch mit einen Zugewinn von 20,1 Zellen/ μ l. Dies ist ein Unterschied von 74,3 Zellen/ μ l und statistisch signifikant. Obwohl die Patienten zum Zeitpunkt des Studienstarts im Prednisolonarm mit einem signifikant geringeren Mittelwert von 512 CD4+ T-Lymphozyten im Gegensatz zum Placeboarm von 554 CD4+ T-Lymphozyten ($p = 0.042$) begonnen hatten, konnte in den mit Prednisolon behandelten Patienten eine Verlangsamung der Progression der HIV Erkrankung nachgewiesen werden. So entwickelten nur vier, der mit Prednisolon behandelten Patienten AIDS, im Vergleich zu 11 Patienten in der Placebogruppe. Die Ergebnisse der Untersuchungen der Immunaktivierungsmarker unterstreichen die Arbeitshypothese, dass die generelle Immunaktivierung verantwortlich für den CD4+ T-Lymphozytenverlust und die Progression der HIV-Erkrankung ist. Durch die Behandlung mit 5 mg Prednisolon konnten die Ausgangswerte sowohl des Entzündungsmarker suPAR als auch des Aktivierungsmarkers CD38+HLADR der CD8+ T-Lymphozyten signifikant gesenkt werden (suPAR $p < 0.0001$, CD38+HLADR $p = 0.0018$). Im LPS nachweisenden Cofaktor sCD14 konnte ein Trend zu niedrigeren Konzentrationen durch die Prednisolonbehandlung nachgewiesen werden ($p = 0.062$). Somit ist im Rahmen dieser Arbeit erstmalig in einer kontrollierten randomisierten klinischen Studie nachgewiesen worden, dass der Einsatz von niedrig dosiertem Prednisolon einen senkenden Einfluss auf die HIV-assozierte generelle Immunaktivierung hat und deren Reduktion zur einer Verlangsamung der Progression der Erkrankung führt. Zusätzlich konnte bewiesen werden, dass der Einsatz dieser Therapie über einen Zeitraum von zwei Jahren auch in einem Umfeld mit hoher Prävalenz von Infektionskrankheiten sicher ist.

Die Behandlung mit niedrig dosiertem Prednisolon könnte negative epidemiologische Auswirkungen haben. Unbehandelte Patienten mit hoher Viruslast beinhalten ein höheres Ansteckungsrisiko für andere, als gut ART behandelte Patienten (Quinn, Wawer et al. 2000; Granich, Gilks et al. 2009). Nachdem sich durch die Behandlung mit Prednisolon die Viruslast nicht verändert hat, kann postuliert werden, dass die epidemiologischen Auswirkungen durch die Therapie mit Prednisolon, für den Zeitraum in dem die Patienten auch normalerweise unbehandelt gewesen wären, keine höhere Ansteckungsrate relevant ist. Natürlich muss bei Stabilisierung der CD4+ T-Lymphozytenwerte der Effekt der Verlängerung der ART freien Phase mit hohen Viruslasten diskutiert werden und deren epidemiologischen Auswirkungen kalkuliert werden. Dies soll in einer weiteren folgenden Publikation erfolgen. Diese ART freie Phase muss jedoch auf jeden Fall mit einer hervorragenden Aufklärung und Begleitung erfolgen, um jedwede Risikofaktoren zu minimieren.

Durch immer größere Verfügbarkeit der ART weltweit steigt die Sorge, dass die Resistenzentwicklung gegen ART im besonderen Maße zunimmt (WHO 2012). Waren die Ergebnisse der HIV Medikamenten Resistenz der Untersuchungen in den letzten Jahren bisher im südlichen Afrika unter 5 % in der von der WHO ausgewählten Patientengruppe (<25 Jahre, keine Therapie, keine vorhergehende Schwangerschaft) (Ndembi, Lyagoba et al. 2008; Nyombi, Holm-Hansen et al. 2008; Aghokeng, Vergne et al. 2009), zeigen neueste Daten eine Prävalenz von Medikamentenresistenz von 7,5% in therapienaiven Patienten (Gupta, Jordan et al. 2012) zumindest in Ost-Afrika. In den Ergebnissen der im Rahmen dieser Doktorarbeit 2011 publizierten Daten wurde in älteren Patienten im Bugando Medical Centre in Tansania sogar eine noch weit höhere Prävalenz von 19,1% nachgewiesen (Kasang, Kalluvya et al. 2011). Dies ist zum Teil darauf zurückzuführen, dass die Partner der älteren Patienten (>25 Jahre) bereits antiretrovirale Therapie bekommen haben und, wie wir anhand phylogenetischer Analysen des HIV beider Partner nachweisen konnten, eine durch ART erworbene direkte Übertragung resistenter Viren möglich war. Die Ergebnisse unserer Daten implizieren, dass die Ausweitung der Untersuchungen auf Medikamentenresistenz auf verschiedene Altersgruppen nötig ist. Die Fokussierung auf die jungen Patienten (<25 Jahre) (Bennett, Bertagnolio et al. 2008) bedeutet eine gravierende Unterschätzung der aktuellen Resistenzsituation, die nicht nur ein Versagen der First-Line Therapie zur Folge hat, sondern aufgrund des von uns bestimmten Resistenzprofils auch zu erheblichen Einschränkungen der Wirksamkeit der Second-Line Therapie führt (Kasang, Kalluvya et al. 2011). Im Jahr 2012 hat die WHO unter anderem auch aufgrund unserer Ergebnisse eine Ausweitung der

Patientengruppen bei der HIVDR Überwachung vorgenommen. Es wurde zusätzlich zu der monitorierten Gruppe junger Patienten (< 25 bzw. < 22 Jahren) eine weitere Patientengruppe aufgenommen die, unabhängig vom Alter, aufgrund einer progressiven Erkrankung kurz vor dem Start mit ART stehen (WHO 2012). Hiermit kann die Gefahr des Therapieversagens bei Standard First-Line Therapie weltweit besser differenziert werden. Für das Jahr 2013 ist eine weitere Studie anhand der neuen Überwachungskriterien der WHO im BMC geplant um Klarheit über die aktuelle Situation zu bekommen.

Zu einer weiteren Schwierigkeit in Behandlung und Management der HIV Infektion in Tansania kann auch die HIV-1 Subtypenverteilung beitragen, die ebenfalls im Rahmen dieser Arbeit überprüft wurde. Das Land liegt wie ein Schmelztiegel an den Grenzen verschiedener Subtypen (Alamos) und somit ist die Zusammensetzung der verschiedenen HIV Subtypen sehr heterogen. Vorherrschend sind die Subtypen A (als A und A1), C, und D. Es sind aber auch der CRF 10_CD und einige CRFs und Rekombinanten präsent (A1C, A1D, AC, AD, CD) (Alamos). Die von uns gefundene relative Subtypen Frequenz (A1: 34%, A1D: 7%, C: 26%, CRF10_CD: 4%, D: 28%, B: 1%) (Kasang, Kalluvya et al. 2011) bestätigte die bereits berichteten Ergebnisse für das nördliche Tansania (Nyombi, Kristiansen et al. 2008).

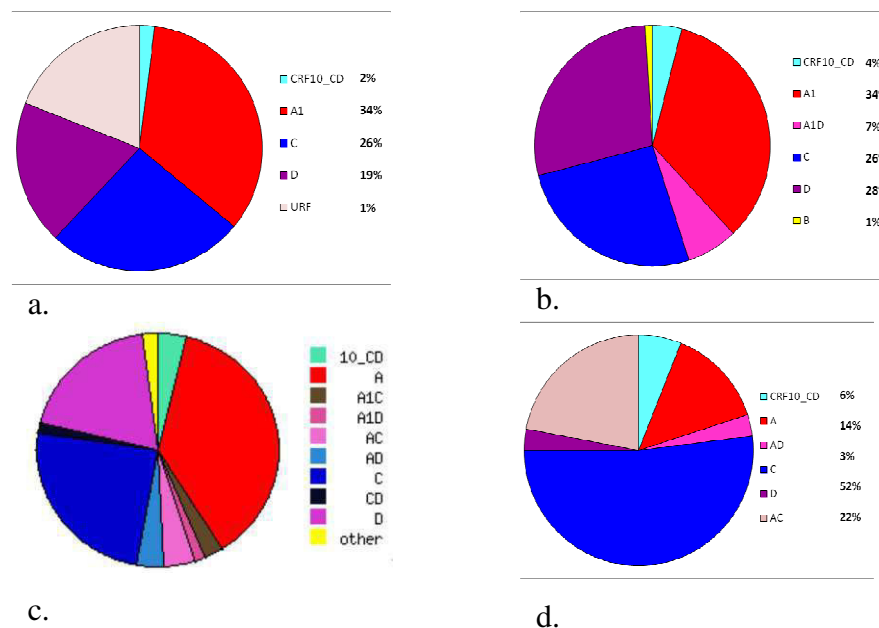


Abb. 19: a,b,c,d die HIV-1 Subtypenverteilung in Tansania verschiedener Regionen.

- a. Daten aus (Nyombi, Kristiansen et al. 2008)**
- b. Eigene Daten veröffentlicht in (Kasang, Kalluvya et al. 2011)**
- c. Daten aus (Alamos)**
- d. Daten aus (Arroyo, Hoelscher et al. 2004)**

Diese Zusammensetzung unterscheidet sich jedoch vollkommen von den Ergebnisse aus dem südlichen Tansania, welches eindeutig noch von der Subtyp C Dominanz des südlichen Teil Sub-Sahara Afrikas geprägt ist (Arroyo, Hoelscher et al. 2004) (s. Abb. 19). Unklar ist bis jetzt welche Auswirkungen diese Zusammensetzung aus verschiedenen HIV-1 Subtypen auf Resistenzverhalten, Progredienz und Infektiosität des HIV haben kann. Hier müssten weitere Untersuchungen folgen.

Die mangelhaften Möglichkeiten im Bereich der Labordiagnostik in tansanischen Behandlungszentren hat immer wieder zur Folge, dass die Behandlungen ineffektiv erfolgen (Jaka HM 2009). Es gibt aufgrund der fehlenden Viruslastmessungen und Bestimmungen des Resistenzprofiles keine Möglichkeit zu überprüfen, ob die Auswahl der antiretroviralen Medikamente tatsächlich wirkt oder bereits eine Resistenz vorliegt. Die Messungen der CD4+ T-Lymphozyten, die einigermaßen kontinuierlich durchgeführt werden (NACP 2012), bilden nur ein zeitverzögertes Bild über das Geschehen im Immunsystem ab und können damit die notwendigen Viruslast Messungen nicht ersetzen (Ferreya, Yun et al. 2012). Bei messbarer CD4+ T-Lymphozyten Abnahme besteht bereits über eine längere Zeit ein Therapieversagen (Kantor, Diero et al. 2009). Ähnlich sieht es auch mit der Konsequenz der Nachverfolgung von Patienten, die frisch HIV positiv nachgewiesen sind, aus. In den nationalen Guidelines ist eigentlich vorgesehen, dass diese Patienten mindestens zweimal im Jahr zu einer Nachuntersuchung in die CTC Zentren kommen und dort mithilfe eines klinischen Stagings und Messung der CD4+ T-Lymphozytenwerte die Notwendigkeit des Starts mit ART überprüft werden soll (NACP 2012). Tatsächlich ist jedoch der Verlust der Nachverfolgung der Patienten in dieser Phase sehr hoch (Hassan, Fielding et al. 2012) (lost to follow up 33,6%; 11,1 Personen pro 100 Monate). Viele Patienten kommen erst dann wieder in die behandelnden Zentren, wenn bereits Erkrankungen vorliegen und das Immunsystem schon erheblich geschwächt ist (Jaka HM 2009; Waters and Sabin 2011). Die Ergebnisse unserer Studie zeigten, dass bereits die Teilnahme an einer klinischen Studie von Patienten die Wahrnehmung von Nachuntersuchungen verbessern können. So war in unserer Studie eine Lost to Follow up Rate über zwei Jahre mit 23.6 % und 8,7 Personen pro 100 Monate (Kasang and Kalluvya 2013) für eine Studie immer noch relativ hoch, im Vergleich zu den regulären Patientenzahlen jedoch erheblich geringer.

Die Durchführung von klinischen Studien in Ländern mit begrenzten Ressourcen ist mit besonderen Herausforderungen verbunden. In der Vergangenheit war es üblich, dass mit den Finanzmitteln auch die Fragestellungen und Ergebnisverwertungen der Forschungsinitiativen von den Forschungsgruppen der Industrieländer dominiert wurden (Trouiller, Olliaro et al.

2002; Binka 2005) und das Personal vor Ort nur exekutive Aufgaben übernommen hat. Die ProCort Studie hingegen hatte einen partnerschaftlichen Ansatz, in dem Fragestellungen vor Ort aufgegriffen wurden, die Planung und Durchführung gemeinsam bewältigt wurden und im Rahmen der Durchführung vor Ort neue Kapazitäten entstanden sind. Durch die Durchführung dieser Studie wurde im Studienzentrum die strukturelle, inhaltliche und labortechnische Ausstattung um einiges verbessert. Dies betraf sowohl die weitere Ausbildung des medizinischen Personals, das an der Studie beteiligt war, als auch eine Einrichtung eines Studienzentrums mit Dokumentation, Datenbank und spezieller Patientenbetreuung und eines Studienlabors. Dieses Studienzentrum ist seit Beendigung der ProCort Studie bereits für weitere Forschungsaktivitäten genutzt worden, womit die Nachhaltigkeit dieses Projektes sichtbar geworden ist.

6 Anhang

6.1 Stadieneinteilung von HIV Krankheitsprogression nach WHO

HIV-associated symptoms WHO clinical stage	
Asymptomatic	1
Mild symptoms	2
Advanced symptoms	3
Severe symptoms	4
<p>Clinical Stage I</p> <p>1. Asymptomatic</p> <p>2. Generalised lymphadenopathy</p> <p>Performance scale: 1: asymptomatic, normal activity</p> <p>Clinical Stage II</p> <p>3. Weight loss, < 10% of body weight</p> <p>4. Minor mucocutaneous manifestations (seborrheic dermatitis, prurigo, fungal nail infections, recurrent oral ulcerations, angular cheilitis)</p> <p>5. Herpes zoster within the last five years</p> <p>6. Recurrent upper respiratory tract infections (i.e. bacterial sinusitis)</p> <p>And/or performance scale 2: symptomatic , normal activity</p> <p>Clinical Stage III</p> <p>7. Weight loss, < 10% of body weight</p> <p>8. Unexplained chronic diarrhoea, > 1 month</p> <p>9. Unexplained prolonged fever (intermittent or constant) , > 1 month</p> <p>10. Oral candidiasis (thrush)</p> <p>11. Oral hairy leucoplakia</p> <p>12. Pulmonary tuberculosis within the past year</p> <p>13. Severe bacterial infections (i.e. pneumonia, pyomyositis)</p> <p>And/or performance scale 3: bedridden < 50% of the day during last month.</p>	<p>Clinical Stage IV:</p> <p>14. HIV wasting syndrome (1)</p> <p>15. Pneumocystis carinii pneumonia</p> <p>16. Toxoplasmosis of the brain</p> <p>17. Cryptosporidiosis with diarrhoea > 1 month</p> <p>18. Cryptococcosis, extrapulmonary</p> <p>19. Cytomegalovirus disease of an organ other than liver, spleen or lymph node (ex: retinitis)</p> <p>20. Herpes simplex virus infection, mucocutaneous (>1month) or visceral</p> <p>21. Progressive multifocal leucoencephalopathy</p> <p>22. Any disseminated endemic mycosis</p> <p>23. Candidiasis of esophagus, trachea, bronchi</p> <p>24. Atypical mycobacteriosis, disseminated or lungs</p> <p>25. Non-typhoid Salmonella septicemia</p> <p>26. Extrapulmonary tuberculosis</p> <p>27. Lymphoma</p> <p>28. Kaposi's sarcoma</p> <p>29. HIV encephalopathy (2)</p> <p>And/or performance scale 4: bedridden > 50% of the day during last month.</p>
<p>Tabelle 1: Stadieneinteilung von HIV Krankheitsprogression für Jugendliche und Erwachsene nach WHO (WHO 2007).</p>	

6.2 Stadieneinteilung von HIV Krankheitsprogression für Jugendliche und Erwachsene nach CDC

Center for Disease Control and Prevention HIV Staging			
	Clinical Categories		
CD4 T-cell Categories	A Asymptomatic	B Symptomatic	C AIDS Indicator Conditions
>500/mm ³	A1	B1	C1
200-499/mm ³	A2	B2	C2
<200/mm ³	A3	B3	C3
1993 CDC Surveillance Case Definition			
Category A (Asymptomatic HIV)	<ul style="list-style-type: none"> - Asymptomatic HIV Infection - Persistent generalized lymphadenopathy (PGL) - Acute HIV Infection with accompanying illness or history of HIV infection 		
Category B (Symptomatic HIV)	<ul style="list-style-type: none"> - Bacillary angiomatosis - Candidiasis, oropharyngeal (thrush), vulvovaginal (>1month) - Cervical dysplasia - Constitutional symptoms (fever >38 C or diarrhea >1 month) - Hairy leukoplakia 	<ul style="list-style-type: none"> - Herpes zoster (shingles) involving at least 2 distinct episodes or more than 1 dermatome - Idiopathic thrombocytopenia purpura - Listeriosis - Pelvic Inflammatory Disease - Peripheral Neuropathy 	
Category C (AIDS Defining Infections)	<ul style="list-style-type: none"> - Candidiasis of bronchi, trachea, or lungs - Candidiasis, oesophageal - Cervical cancer, invasive - Coccidioidomycosis, disseminated or extrapulmonary - Cryptococcosis, extrapulmonary - Cryptosporidiosis, chronic (>1 month) - Cytomegalovirus disease or retinitis - Encephalopathy, HIV related - Herpes simplex virus (HSV) - Histoplasmosis, disseminated or extrapulmonary - HIV-associated dementia - Kaposi sarcoma 	<ul style="list-style-type: none"> - Lymphoid interstitial pneumonia - Lymphoma, Burkitt's, immunoblastic, primary of brain - Mycobacterium avium-intracellulare complex - Mycobacterium tuberculosis, pulmonary or extrapulmonary - Nocardiosis - Pneumocystis carinii pneumonia - Pneumonia, recurrent - Progressive multifocal leukoencephalopathy - Salmonella septicemia, recurrent - Toxoplasmosis of internal organs - Wasting syndrome due to HIV - Isosporiasis, chronic intestinal (>1 month) 	
Tabelle 2: Stadieneinteilung von HIV Krankheitsprogression für Jugendliche und Erwachsene nach CDC (CDC 1993).			

6.3 Übersicht über antiretrovirale Medikamente

Handelsname	Abk.	Substanzname	Hersteller	Euro / Jahr
Nukleos(t)idische Reverse-Transkriptase-Inhibitoren (NRTIs)				
Emtriva®	FTC	Emtricitabin	Gilead	3.732
Epivir®	3TC	Lamivudin	GSK	3.681
Retrovir®	AZT	Zidovudin	GSK	4.587
Videx®	DDI	Didanosin	BMS	3.269
Viread®	TDF	Tenofovir	Gilead	6.456
Zerit®	D4T	Stavudin	BMS	3.589
Ziagen®	ABC	Abacavir	GSK	5.468
Non-Nukleosidische Reverse-Transkriptase-Inhibitoren (NNRTIs)				
Sustiva® (Stocrin®)	EFV	Efavirenz	BMS/MSD	5.222
Viramune®	NVP	Nevirapin	Boehringer	5.362
Intelence®	ETV	Etravirin	Tibotec	7.846
Rescriptor®	DLV	Delavirdin	Pfizer	nur Import
Protease-Inhibitoren (PIs)				
Aptivus®	TPV	Tipranavir	Boehringer	14.810
Crixivan®	IDV	Indinavir	MSD	4.547
Invirase®	SQV	Saquinavir	Roche	9.477
Kaletra®	LPV	Lopinavir/Ritonavir	Abbott	10.665
Norvir® (als Booster)*	RTV	Ritonavir	Abbott	744
Prezista®	DRV	Darunavir	Tibotec	11.356
Reyataz®	ATV	Atazanavir	BMS	11.036
Telzir® (Lexiva®)	FPV	Fosamprenavir	GSK	9.539
Viracept®	NFV	Nelfinavir	Roche/Pfizer	7.006
Entryinhibitoren				
Celsentri® (Selzentry®)	MVC	Maraviroc	Pfizer	13.289
Fuzeon®	T-20	Enfuvirtide	Roche	28.845
Integraseinhibitoren				
Isentress®	RAL	Raltegravir	MSD	10.937
Kombinationspräparate				
Atripla®	ATP	TDF+FTC+EFV	Gilead+BMS+MSD	15.266
Combivir®	CBV	AZT+3TC	GSK	8.268
Kivexa® (Epzicom®)	KVX	3TC+ABC	GSK	8.912
Trizivir®	TZV	AZT+3TC+ABC	GSK	14.750
Truvada®	TVD	TDF+FTC	Gilead	10.038

Tabelle 3: Antiretrovirale Medikamente, Übersicht

Therapiekosten in Deutschland, Rote Liste, Stand März 2011. Einige Präparate haben je nach Land verschiedene Handelsnamen (außerhalb Deutschlands in Klammern). Angaben der PIs inklusive der empfohlenen Ritonavir-Boosterung (1-400 mg Norvir®). Die Preise wurden jeweils aus den Monatspackungen berechnet.*für 100 mg täglich Quelle:C. Hoffmann HIV Buch 2011

6.4 Prüfplan der ProCort Studie

Seiten unnummeriert

S. 121 - 158

Progression of HIV-Disease under Low Dose Corticosteroids

PROCORT I - STUDY

**A phase II clinical trial to assess risk and benefit
of oral low dose prednisolone for HIV infected people
prior to the commencement of antiretroviral treatment**

Principal Investigator	Dr. Samuel Kalluvya, Bugando Medical Center, Mwanza, Tanzania
Co-Principal Investigator	PD Dr. August Stich, MD MSc DTM&H Department of Tropical Medicine Medical Mission Institute, Würzburg, Germany
Co- Investigator	Prof. Gilbert W. M. Kongola, BUCHS, Mwanza, Tanzania Dr. Charles Mazinge, BMC, Mwanza, Tanzania <hr/>
Study Coordinator	Christa Kasang, Clinical Research Assistant, Würzburg, Email: comka@web.de
Address of Correspondence:	PD Dr. August Stich, Medical Mission Institute Salvatorstraße 7, 97067 Würzburg Phone: +49 (0)931 / 791 2821 Fax: +49 (0)931 / 791 2826 Email: stich@missioklinik.de
Date of version:	05.06.2007
Scientific Advisory Board:	Prof. Dr. Hartwig Klinker, Würzburg, Germany Prof. Dr. Klaus Fleischer, Würzburg, Germany Dr. Albrecht Ulmer, Stuttgart, Germany
Data Safety Monitoring Board :	Professor Zablón E. Masesa, BUCHS, Mwanza, Tanzania Dr. Koy Mheta, BMC, Mwanza, Tanzania Mr. John Pemba , BMC, Mwanza, Tanzania

TABLE OF CONTENTS

SYNOPSIS

STUDY SITE AND PARTICIPANTS

LIST OF ABBREVIATIONS AND DEFINITIONS OF TERMS

1. INTRODUCTION AND BACKGROUND

- 1.1 BACKGROUND
- 1.2 RATIONAL FOR THE STUDY
- 1.3. SITE DESCRIPTION

2. STUDY OBJECTIVES

- 2.1 PRIMARY
- 2.2 SECONDARY

3. PATIENT DEFINITION

- 3.1 INCLUSION CRITERIA
- 3.2 EXCLUSION CRITERIA

4. PLAN OF THE STUDY

- 4.1 STUDY DESIGN
- 4.2 STUDY TREATMENT
- 4.3 DOSE MODIFICATION AND DELAY
- 4.4 DISCONTINUATION
- 4.5 PRESTUDY SCREEN
- 4.6 RANDOMIZATION
- 4.7 EVALUATION DURING THE STUDY
 - 4.7.1 EVALUATION EVERY VISIT
 - 4.7.2 EVALUATION EVERY 3 MONTH
 - 4.7.3 EVALUATION EVERY 6 MONTH

5. STUDY ASSESSMENTS

- 5.1 EFFICACY ASSESSMENT
 - 5.1.1 TIME TO PROGRESSION
 - 5.1.2 AMOUNT OF CD 4-CELLS
 - 5.1.3 QUALITY OF LIFE

5.1.4 OVERALL SURVIVAL

5.2 SAFETY ASSESSMENT METHODS

5.2.1 SUSPECTED ADVERSE RESPONSE (SUSAR), ADVERSE EVENT AND TOXICITY

5.2.2 LABORATORY MEASUREMENTS

6. DATA ANALYSIS / STATISTICAL CONSIDERATIONS

7. SERIOUS ADVERSE EVENT MONITORING

7.1 DEFINITION OF A SERIOUS ADVERSE EVENT

7.2 CAUSALITY ASSESSMENT

7.3 REPORTING OF A SERIOUS ADVERSE EVENT

7.4 CLINICAL MANAGEMENT OF SERIOUS ADVERSE EVENTS

8. STUDY MEDICATION

8.1 PREDNISOLONE

8.2 PLACEBO

8.3 STORAGE

8.4 DRUG ACCOUNTABILITY

9. INVESTIGATOR OBLIGATIONS

9.1 MONITORING, AUDITING AND INSPECTIONS

9.2 PATIENT IDENTIFICATION

9.3 RECORDING OF DATA

9.4 RECORD RETENTION

9.5 CONFIDENTIAL FOLLOW-UP

9.6 PATIENT INFORMED CONSENT

9.7 ETHICAL COMMITTEE/INSTITUTIONAL REVIEW BOARD

9.8 DECLARATION OF HELSINKI

9.10 INSURANCE OF LIABILITIES

9.11 MODIFICATION OF THE PROTOCOL

9.12 USE OF INFORMATION AND PUBLICATION

9.13 ROLE OF ADVISING BOARD

9.14 INVESTIGATOR AGREEMENT

10. REFERENCES

APPENDICES

- APPENDIX Ia:** Flow chart
- APPENDIX Ib:** Study flow sheet
- APPENDIX II:** WHO Performance Status
- APPENDIX III:** NCI Common Toxicity criteria
- APPENDIX IV:** WHO Staging System for HIV Infection and Disease in Adults and Adolescents
- APPENDIX Va:** CDC Classification for HIV Staging
- APPENDIX Vb:** WHO Recommendations for initiating antiretroviral therapy in adults and adolescents with documented HIV infection
- APPENDIX VI:** Informed Consent Form (not yet done)
- APPENDIX VII:** Serious Adverse Event form (not yet done)
- APPENDIX VIII:** The Declaration of Helsinki
- APPENDIX IX:** WHO Guideline of Confirmation for HIV Tests

SYNOPSIS

Study Title	A phase II clinical trial to assess risk and benefit of oral low dose prednisolone for HIV infected patients prior to the commencement of antiretroviral treatment
Principal Investigators	Dr. Kalluvya, Bugando Medical Centre, Mwanza, Tanzania PD Dr. August Stich Medical Mission Institute Würzburg, Germany
Co-Investigators	Prof. Dr. Kongola, BUCHS, Mwanza, Tanzania Dr. Majinge, Bugando Medical Centre, Mwanza, Tanzania
Study Centre	Bugando Medical Centre, Mwanza, Tanzania
Study Period	QII 2007 – QII 2010
Objectives	Primary objective: to assess the effect of the low dose prednisolone on the time to progression of HIV disease; Secondary objectives: to evaluate in the same patient population 1) amount of CD4-cells 2) overall survival 3) safety profile 4) quality of life
Methodology	Mono-centred, double blinded, randomized, phase II placebo-controlled clinical trial of oral low dose prednisolone administration for HIV infected patients in clinical stage CDC A1,2 or B1,2 (see Appendix Va).
Number of patients	Maximum of 400 eligible patients in Tanzania, divided in: <ul style="list-style-type: none"> • 200 patients in study medication group • 200 patients in placebo group
Inclusion Criteria	<ul style="list-style-type: none"> - HIV positivity. The HIV infection has to be confirmed according to WHO guidelines (see Appendix IX). - Patients must have signed a consent form prior to beginning protocol specific procedures (Appendix VI). - Adult male and female patients, age ≥ 18 years. Female patients of childbearing potential must have a negative pregnancy test at study entry. - Patients must have a stage of HIV disease not yet requiring ARV therapy, defined by CDC stage A1, 2 or B1, 2 (see Appendix Va). - Patients must have a CD4 cell count ≥ 300 cells / μl. - No AIDS defining symptoms. - Patients must have a WHO performance status of 0,1,2 (see Appendix II).

Exclusion Criteria	<ul style="list-style-type: none"> - Prior ARV therapy. - Active tuberculosis. - Abnormal laboratory results especially glucose level >160 mg/dl, liver enzymes AST and/or ALT $\geq 1,5 \times$ ULN, bilirubin $\geq 4 \times$ ULN, alkaline phosphatase $\geq 5 \times$ ULN, creatinine ≥ 2 mg/dl (176,8 μmol) - Serious other diseases including psychiatric disorders.
Treatment Administration	Patients in the study group will get prednisolone 5 mg per os daily, patients in the placebo group will get 1 tablet of placebo per os daily.
Primary Evaluation Criteria	Effect of the low dose prednisolone therapy on the time to progression. The time to progression is defined as the time between the baseline and the change to CDC stage A3, B3 or C, which indicates the initiation of antiretroviral therapy or the time to death (see Appendix Va).
Secondary Evaluation Criteria	<ul style="list-style-type: none"> • The amount of the CD4 cells at baseline (= 100%) will be compared to the amount during the study. • The overall survival rate will be the time interval between the first dose of the study medication and the date of death. The overall survival will be evaluated in the prolonged follow up period of the study. • The safety profile will be evaluated by clinical examination, adverse events (toxicity), vital signs, haematological and biochemical monitoring. • The quality of life will be evaluated by a Quality of Life Report Form.
Statistical Methods	<ul style="list-style-type: none"> • NQuery 3.0 Test for Patient amount calculation

STUDY SITE AND PARTICIPANTS

Bugando Medical Centre
P.O.Box 1370
Mwanza, Tanzania

Participants see front page

LIST OF ABBREVIATIONS AND DEFINITIONS OF TERMS

AE	Adverse Event
ARV	Antiretroviral Drugs
CDC	Centres for Disease Control and Prevention, Atlanta, USA
CRF	Case report form
HAART	Highly active antiretroviral therapy
SAE	Serious adverse event
ULN	Upper laboratory normal
WHO	World Health Organisation

1. INTRODUCTION

1.1 BACKGROUND

For treatment in advanced HIV infection, combination therapy with antiretroviral drugs (ARVs) is the best option under current international standards. The benefit of ARVs is best, if they are used relatively late in the course of the disease, commonly after a progression of years. However, under a global perspective, more than 90% of those who need ARVs worldwide have no access to them.

ARVs are not used in early stages of infection without significant immunodeficiency. Although a variable degree of immunodeficiency may be present even in early HIV disease, there is no established treatment for this phase.

Immunodeficiency is associated with a decline of a certain population of lymphocytes, the CD4 cells or T-helper cells. It seems to be a useful concept to postulate that a treatment which slows down this loss of CD4 cells could also slow down the progression of HIV disease.

In vitro-findings and clinical studies showed a CD4 cell stabilizing effect of corticosteroids. First clinical studies were based on relatively high dosages (Andrieu JM 1995, LU W 1995, Andrieu JM 2004,). These are hardly justifiable for a longer time, because of numerous side effects, e.g. immunosuppression of the cellular immune system, the manifestation of diabetes or the Cushing syndrome.

In 2005 Ulmer et al. reported in a mono-centric open label study a CD4- stabilizing effect under the administration of low dose prednisolone (5 mg/d) (Ulmer A 2005). Patients with more than 300 CD4 cells/ μ l were included. After two years the 28 patients on treatment presented 176.1 more CD4 cells than those of 62 control patients in comparison to their baseline counts (p 0.0009) and after three years the 15 patients on treatment presented 236.2 more CD4 cells/ μ l than those of 33 control patients in comparison to their baseline counts (p = 0,0021). The initiation of treatment with the more expensive and toxic ARVs was delayed.

Based on this study and an increasing amount of experience by Ulmer and others, it seems to be justified to systematically investigate the effect of low dose prednisolone on the progression of HIV disease. The costs of 5 mg prednisolone per day is in a range of 3 US \$ per year (Action Medeor). If it turned out that low dose prednisolone prolongs the period until ARVs become indicated without imposing intolerable risks on the patient, this approach could be a very attractive future option for countries with health systems in resource-poor settings.

1.2 RATIONAL FOR THE STUDY

Until now, there are no prospective randomised studies on the use of corticosteroids in latent HIV disease. Furthermore, low dose prednisolone (5 mg/d) is not sufficient tested for the risks and benefit for HIV patients especially for those living in poor settings with a higher risk of infections. This study will assess the benefit and the safety profile for low dose prednisolone therapy for patients in a region with limited resources and high prevalence of infections.

1.3 SITE DESCRIPTION

The study will be conducted at the Bugando Medical Centre in Mwanza, Tanzania.

2. STUDY OBJECTIVES

2.1 PRIMARY

The primary objective of the study is to assess the effect of the low dose prednisolone therapy on the time to progression of HIV disease. The time to progression is defined as the time between the baseline and the change of staging to advanced disease (CDC stage A3, B3 or C) or death (see Appendix Va).

2.2 SECONDARY

The following secondary objectives will be evaluated in the same patient population:

- Amount of CD4 Cells
- Overall survival
- Safety profile
- Quality of life

3. PATIENT DEFINITION

This is a mono-centred trial involving 400 eligible patients.

3.1 INCLUSION CRITERIA

- Positive HIV antibody test. The HIV infection has to be confirmed according to the WHO Guidelines (see Appendix IX).
- Adult male or female patients, age ≥ 18 years.
- Patients must have given an informed consent and signed a consent form prior to beginning protocol specific procedures (Appendix VI).
- Patients in CDC Stage A 1, 2, B 1, 2 (see Appendix Va) not yet requiring ARVs.
- CD4 cell count ≥ 300 cells/ μ l (for inclusion 300 cells/ μ l for reason of security).
- No AIDS defining symptoms,
- WHO Performance Status of 0,1,2 (see Appendix II).

3.2 EXCLUSION CRITERIA

- No pregnancy. Female patients of childbearing potential must have a negative pregnancy test at study entry.
- Prior therapy with ARVs.
- Active tuberculosis.
- Abnormal laboratory results especially glucose level > 160 mg/dl, liver enzymes (AST, ALT) $\geq 1,5$ x ULN, bilirubin ≥ 4 x ULN, alkaline phosphatase ≥ 5 x ULN, creatinine $> 2,0$ mg/dL ($>176,8$ μ mol).
- Serious other diseases, including psychiatric disorders.

4. PLAN OF STUDY

4.1 STUDY DESIGN

This is a double blinded, randomized, phase II placebo-controlled clinical trial of oral low dose prednisolone therapy for HIV infected patients with CDC Stage A1,2 or B1,2 (see Appendix Va).

The trial is a mono-centred and involves 400 eligible patients in Tanzania, divided in:

- 200 Patients in Study medication group
- 200 Patients in Placebo group

The study enrolment period will last for 12 month (30 patients per month). A study period of 24 month will follow. After 12 months, the first intermediate analysis will be done. In case of no significant negative safety aspects, the study will continue for the next 12 month. A follow-up period for further evaluation can be added.

4.2 STUDY TREATMENT

The patients in the Treatment Group will get prednisolone 5 mg per os daily. The placebo group will get one tablet of placebo per os daily.

4.3 DOSE MODIFICATION AND DELAY

There is no dose modification planned in this study. Study drug related reactions like hypersensitivity reactions, fluid retention, hypertension, gastric ulcer, and diabetes will be treated according to local standards.

4.4 DISCONTINUATION

Patients will be removed from the study for the following reasons:

- disease progression: upgrading of clinical stage and/or CD4 cell count < 200/ μ l, both requiring the start of HAART (= primary study objective, study completed);
- development of unacceptable toxicity not manageable by symptomatic care;
- administration of antiretroviral treatment;
- significant protocol violation in the prednisolone group, e.g. interruption of taking the study medication for more than four weeks (compliance);
- pregnancy;
- consent withdrawn;
- investigator's decision.

Patients are always allowed to refuse the participation of study and will be withdrawn.

The reason for removal for all patients will be documented on the case report form. Patients who are not eligible or not valuables for the study analysis will be replaced.

4.5 PRE-STUDY SCREEN

The following data will be obtained within two weeks prior to randomization:

- informed consent and signed consent form (audio consent for illiterate persons);
- complete medical history including dates and description of initial diagnosis of HIV infection, concurrent illnesses and concomitant medication;
- physical examination including weight, height, WHO performance status (Appendix II);
- vital signs: blood pressure, pulse rate, oral temperature;
- HIV staging according to CDC: examination for AIDS defining signs and CD4 cell count;
- chest x-ray to exclude active tuberculosis;
- short quality of life score;
- clinical laboratory tests: full blood count, glucose, liver enzymes (AST and/or ALT), bilirubin, alkaline phosphatase, creatinine; pregnancy test for female patients.

4.6 RANDOMIZATION

After having checked the patient's eligibility, the investigator will request randomization. A Randomization list will be provided to the BMC. The randomization number will be given by the study nurse. The study medication is double blind. Block randomization may be used.

4.7 EVALUATION DURING THE STUDY

4.7.1 EVALUATION EVERY VISIT (MONTH 0,1,2,3,4,5,6,9,12,15,18,21,24)

The patient will be examined every month for the following parameters:

- medical history update, including documentation of concurrent conditions, hospitalization and concomitant medications;
- quality of life score;
- physical examination including weight and WHO performance status;
- vital signs: blood pressure, pulse rate and oral temperature;
- HIV staging according to CDC: examination for AIDS defining signs and CD4 cell count;
- full haematological blood count;
- serum chemistry: glucose level, liver enzymes (AST and/or ALT), bilirubin, alkaline phosphatase, creatinine;
- pregnancy test for female patients.
- toxicity evaluation: Toxicity is defined as a study drug related adverse event (AE) grade 3 (severe) or 4 (life threatening). Toxicity will be recorded as it occurs and graded according to the NCI Common Toxicity Criteria (see Appendix III). Toxicities that can not be graded using the NCI Common Toxicity Criteria will be recorded as mild (asymptomatic), moderate (symptomatic but not interfering significantly with function), severe (causing significant interference with function) or life-threatening.

4.7.2 EVALUATION EVERY 3 MONTH (IN ADDITION)

- Sputum test for Tuberculosis.

4.7.3 EVALUATION EVERY 6 MONTH (IN ADDITION)

- Chest x-ray for Tuberculosis.
- Sputum test for Tuberculosis.

5. STUDY ASSESSMENTS

5.1 EFFICACY ASSESSMENT

5.1.1 TIME TO PROGRESSION

The time to progression is defined as time period between the baseline and the change of staging(see appendix Va).

Progression is:

- CD4 cell count \leq 200 cells/ μ l; (Stage A3, B3)
- CDC clinical stage C; all counts;
- death.

5.1.2 AMOUNT OF CD4 CELLS

The number of the CD4 cells at baseline (= 100%) will be compared to the number during the study (> 100%: increase; < 100%: decrease).

5.1.3 QUALITY OF LIFE

Some Quality of life questions will be completed for each patient during the visits.

5.1.4 OVERALL SURVIVAL

The duration of survival will be determined by measuring the time interval between the initial dose of study medication and the date of death. The overall survival will be evaluated in the prolonged follow up period of the study.

5.2 SAFETY ASSESSMENT METHODS

5.2.1 SUSPECTED ADVERSE RESPONSE (SUSAR), ADVERSE EVENT AND TOXICITY

Toxicity is defined as a study drug related Suspected Adverse Response (SUSAR) and Adverse events (AE) Grade 3 (severe) or 4 (life threatening). It will be evaluated based on a graded scale of 0-4 using the NCI Common Toxicity Criteria (see Appendix III). Toxicities that can not be graded using the NCI Common Toxicity Criteria will be graded as mild (asymptomatic), moderate (symptomatic but not interfering significantly with function), severe (causing significant interference with function) or life-threatening.

The SUSAR's are:

Abdominal pain	Hypertension
Diabetes	Hyperglycaemia
Fluid retention	Pneumonia
Gastritis	Weight gain

The AEs are:

Abdominal Pain	Nausea
Candidiasis	Peptic ulcer
Diarrhoea	Pneumonia
Fever	Skin
Herpes simplex, zoster	Vomiting
Hepatitis (liver function)	Urinary tract infection

AEs and SUSARs will be monitored during every visit using a hard coded page in the case report form.

Additional AEs occurring can be added.

5.2.2 LABORATORY MEASUREMENTS

Biochemical and haematological tests will be conducted on blood samples once a month at every visit. If AEs occur additional tests have to be done according to local standards.

6. DATA ANALYSIS / STATISTICAL CONSIDERATIONS

Recruitment time	12 Month
Follow up period	24 Month
Drop-out Rate	10 %
Alpha	0.10
Beta	0.20
Two side test	
Rate of survive (without Progression)	0.791
Rate of survive (without Progression)	0.625

Calculation with NQuery 3.0 Test the result for N is 199 each group.

7. SERIOUS ADVERSE EVENT MONITORING

7.1 DEFINITION OF A SERIOUS ADVERSE EVENT

A serious AE is any adverse drug event occurring that results in any of the following outcomes:

- death
- life-threatening adverse drug experience or event
- in-patient hospitalization or prolongation of existing hospitalization
- a persistent or significant disability/ incapacity
- or a congenital anomaly/birth defect.

- “Life-threatening” means that the patient was at immediate risk of death from the event as it occurred. It does not include an event that, had it occurred in a more serious form, might have caused death.
- “Requires inpatient hospitalization” should be defined as hospital admission required for treatment of the adverse event. Hospital admission for scheduled elective surgery would not be a serious adverse event.
- Toxic deaths: Any death occurring during the active treatment part of the study and within 4 weeks following the last study drug intake must be reported to the principal investigator, regardless of any relationship to the study drug(s). Deaths occurring during the study follow-up period of 6 months, need only be reported as adverse events if it’s thought that there is a possible relationship to the study drug(s). Death report form in the CRF must be completed in any case.

7.2 CAUSALITY ASSESSMENT

The assessments to be used to record the causal association between the study drug and the adverse event are as follows:

- no: the adverse event is definitely unrelated to the test drug
- unlikely: the test drug does not have any reasonable association with the observed experienced; however, relationship cannot be definitely excluded
- possible: the connection with test drug administration appears feasible but cannot be concluded with certainty
- probable: the clinical experience appears related to the test drug with a high degree of certainty

For the purposes of regulatory reporting, events which are assessed by the investigator as possibly or probably related to the study drug will normally be considered as indicating a possible association.

7.3 REPORTING OF A SERIOUS ADVERSE EVENT

Any serious event occurring during the active treatment part of the study and within 30 days following the last study drug intake must be reported to the principal investigator within 24 hours, regardless of the relation to study drug(s). Serious adverse events (SAE) probably related to study drugs have to be reported with the yellow form. Study drug related SAE occurring 6 month after the stop of the study need also to be reported and managed without charge.

The study drug related SAE have to be reported to the data safety board every month.

The investigator and others responsible for patient care should institute further supplementary investigations. This may include seeking a further opinion from a specialist in the field of the adverse event. If a patient dies, any post-mortem findings must be recorded.

Withdrawal from the study and therapeutic measures shall be at the discretion of the investigator. A full explanation for the discontinuation from the study will be made at the appropriate case report form. Reporting to local regulatory authorities will take place according to local regulations.

All adverse events, regardless of severity, will be followed up by the investigator until satisfactory resolution.

All other minor adverse reactions will be recorded on the CRF during the study.

7.4 CLINICAL MANAGEMENT OF SERIOUS ADVERSE EVENTS

Study drug related serious adverse events occurring during the study have to be treated at low costs charge free for the patients.

8. STUDY MEDICATION

8.1 PREDNISOLONE

Prednisolone will be dispensed as a varnished tablet of 5 mg produced by Action Medeor, Germany.

8.2 PLACEBO

The placebo will be designed to the equal look like the study medication.

8.3 STORAGE

The storage will take place at room temperature in a dry compartment.

8.4 DRUG ACCOUNTABILITY

The person responsible for drug dispensing is required to maintain adequate records of all study drugs. The patients have to bring back the study medication every month for pill counting. The overall compliance has to be more than 80%.

9. INVESTIGATOR OBLIGATIONS

This study is to be conducted according to globally accepted standards of Good Clinical Practice (ICH, GCP guidelines, current version), in agreement with the latest revision of the Declaration of Helsinki and local regulations.

9.1 MONITORING, AUDITING AND INSPECTIONS

The study will be monitored externally by a study team, who is placed at the Bugando Medical College of Health Sciences in Mwanza, Tanzania, and Medical Mission Hospital in Würzburg, Germany.

During site visits, the monitoring team should review original patient records, drug accountability records and document retention (study file). Additionally, the monitors should observe study procedures and will discuss any problems with the investigator.

Adequate time for these visits should be allocated by the PI. The PI should also ensure that the monitors are given direct access (as per ICH GCP Guideline, Sections 4.9.7 and 6.10) to source documents (i.e. hospital or private charts, original laboratory and for ECG records, appointment books etc.) of the subject which support data entered in the case report forms, as defined in the ICH GCP Guideline, section 1.51 and 1.52.

Participation in this study also implies acceptance of potential inspection by national or foreign health authorities.

9.2 PATIENT IDENTIFICATION

All patients screened for the study will have their initials (first letter of the surname and first letter of first name) and their date of birth entered chronologically in the patient log at the initial visit. In the event a patient is excluded from study participation, the reason is to be documented in the space provided on the patient log.

Each patient will be assigned a Patient Allocation Number on registration. This number and the patient initials are to be entered on the Case Report Form.

9.3 RECORDING OF DATA

Case Report Forms will be supplied by the Study Coordinator at the Medical Mission Hospital. These forms must be PRINTED LEGIBLY using black ball pen.

The forms should be verified against all original records (and workbooks, if applicable) by the Clinical Monitor before submission. The bottom copy will be retained in the investigator's files. No case report forms are to be mailed without specific authorization. Case Report Forms and all original data should be readily available for review during scheduled monitoring visits.

9.4 RECORD RETENTION

Copies of all pertinent information will be retained by the investigator for a period of at least 15 years from study completion. Additional considerations must be made about complying with applicable local laws, guidelines, etc.

A study document binder will be provided by the sponsor for all required study documents.

9.5 CONFIDENTIAL FOLLOW-UP

The investigator will be responsible for retaining sufficient information about each patient (e.g. name, address, phone number, social security number, and identity in the study) so that regulatory agencies may access this information should the need to do so arise. These records should be retained in a confidential manner for as long as legally mandated according to local requirements.

9.6 PATIENT INFORMED CONSENT (Appendix VI)

Prior to the screening evaluation, the patient will be informed of the nature of the study drug and will be given pertinent information as to the intended purpose, possible benefits, and possible adverse experiences. The procedures and possible hazards to which the patient is exposed will be explained.

An approved informed consent statement will then be read and signed by the patient, and, when required, a witness, and the investigator. The patient will be provided with a copy of the signed informed consent statement. The patient may withdraw from the study at anytime without prejudicing future medical treatment. Verification of a signed informed consent statement will be noted on the patient's study case report form.

9.7 ETHICAL COMMITTEE/INSTITUTIONAL REVIEW BOARD

The final approved protocol and the informed consent statement will be reviewed by a properly constituted Ethics Committee/IRB in Bugando Hospital and the governmental Ethic Committee in Tanzania. The Ethics Committee's/Board's decision concerning the conduct of the study will be made in writing to the investigator.

The investigator will agree to make required progress reports to the Ethics committee/IRB, as well as report any serious adverse events, life-threatening problems or deaths. The Ethics Committee/IRB must be informed by the investigator of the termination of the study.

9.8 DECLARATION OF HELSINKI

This study is to be performed in accordance with the declaration of Helsinki (Somerset West Amendment, Republic of South Africa Amendment), as described in Appendix VIII.

9.10 INSURANCE OF LIABILITIES

If required, the investigator may forward the Ethics Committee/IRB a copy of the insurance that the sponsor has to take out covering his and any other participating parties liabilities.

9.11 MODIFICATION OF THE PROTOCOL

Any modifications to the protocol which may impact on the conduct of the study, potential benefit of the study, or may affect patient safety, including changes of study objectives, study design, patient population, sample sizes, study procedures, or significant administrative

aspects will require a formal amendment to the protocol. Such amendment will be agreed upon the investigator, and approved by the Ethics Committee/IRB prior to implementation and notified to the health authorities in accordance with local regulations.

Administrative changes of the protocol are minor corrections and/or clarifications that have no effect on the way the study is to be conducted. These administrative changes will be documented in a memorandum. The Ethics Committee/IRB may be notified of administrative changes at the discretion of the investigator.

9.12 USE OF INFORMATION AND PUBLICATION

The information developed during the conduct of this clinical study is considered confidential. This information may be disclosed as deemed necessary by the advisory board.

Should the investigators desire to publish or present the results of this study, a copy of the manuscript or abstract will be provided to the committee of all investigators. The authorship list will be agreed by all investigators prior to publication.

9.13 ROLE OF ADVISORY BOARD

The meeting of the Data Safety monitoring board (DSMB) will be conducted in regular intervals, preferably every six month. The medical advisors will have access to all study materials every time.

9.14 INVESTIGATOR'S AGREEMENT

I have read the preceding protocol dated 2007 and agree that it contains all necessary details for conducting this study. I will conduct the study as outlined therein and will attempt to complete the enrolments into the study. I will provide copies of the protocol and all drug information and prior clinical experience furnished to me, to all physicians responsible to me who participate in the study. I will discuss this material with them to assure that they are fully informed regarding the drug and the conduct of the study. I agree to keep records and all patient information (case report forms and patients' informed consent statement), drug shipment and return forms, and all other information collected during the study in accordance with legal regulations.

Investigator (PRINT NAME):

Investigator Signature

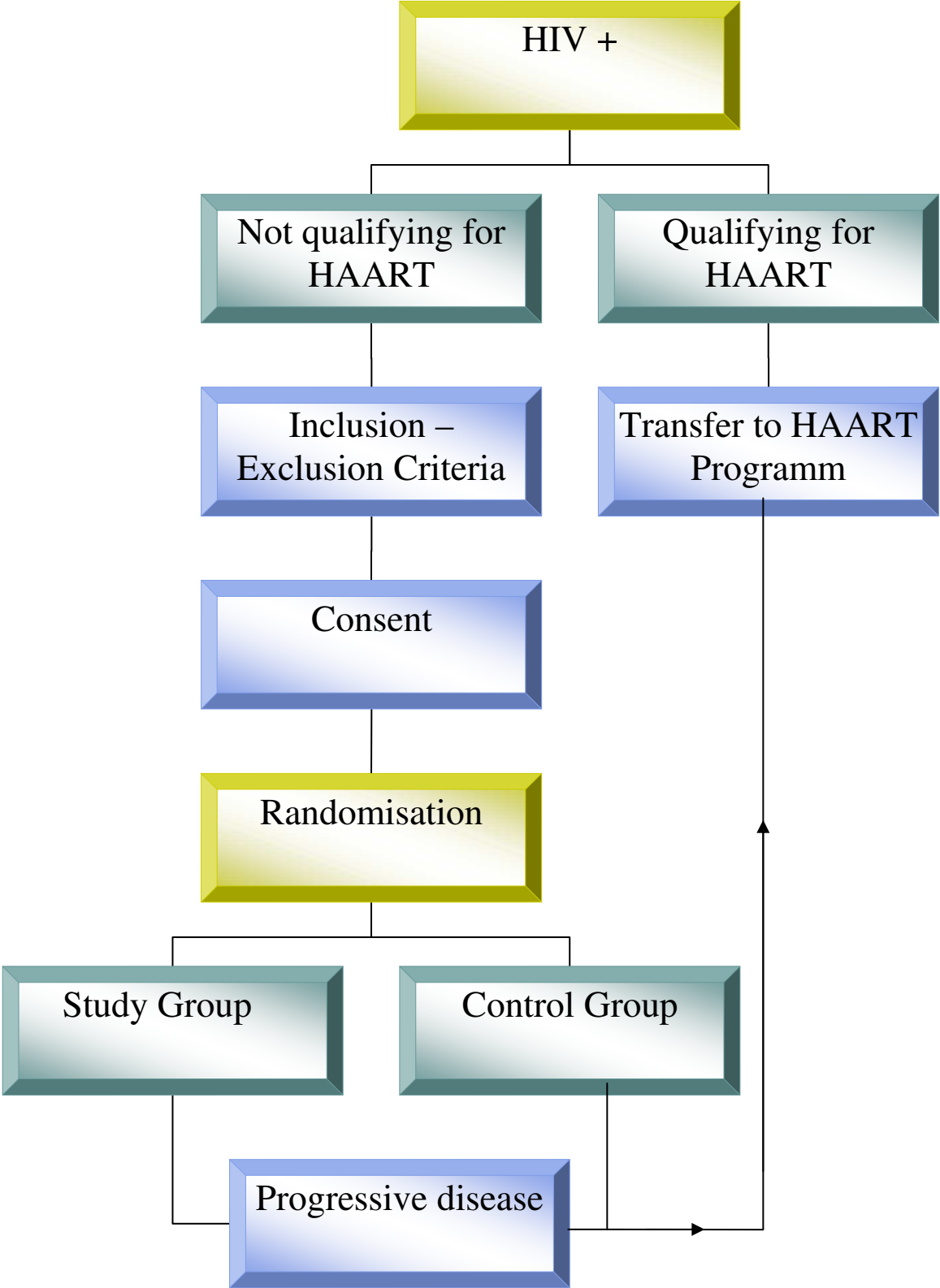
Date

10. REFERENCES

1. Andrieu JM, Lu W, Levy R (1995) Sustained increases in CD4 cell counts in asymptomatic human immunodeficiency virus type 1-seropositive patients treated with prednisolone for 1 year. *J Infect Dis* 171: 523-530
2. Andrieu JM, Lu W (2004) Long-term clinical, immunologic and virologic impact of glucocorticoids on the chronic phase of HIV infection. *BMC Medicine*: 2:17
3. CDC (1992) 1993 Revised Classification System for HIV Infection and Expanded Surveillance Case Definition for AIDS Among Adolescents and Adults. *MMWR*, December 18,1992 / 41 (RR-17)
4. Elliott,AM (2004) A randomized, double-blind, Placebo-controlled Trial of the use of prednisolone as an adjunct to treatment in HIV-1-associated pleural Tuberculosis. *JID* 190: 869-878;
5. Mayanja-Kizza,H (2005) Immunoadjuvant Prednisolone Therapy for HIV-Associated Tuberculosis: A Phase 2 Clinical Trial in Uganda. *JID* 191: 856-865
6. Ulmer A (2004) Niedrig dosiertes Prednisolon und viel weniger Angewiesenheit auf HAART – ein anderer Therapieansatz, in: Jäger, H.: *AIDS und HIV-Infektionen: Diagnostik, Klinik, Behandlung; Handbuch und Atlas für Klinik und Praxis*. ecomed-Verlag, Landsberg, 43.Erg.Lfg.3/04 VII-10.2, 1-7
7. Ulmer,A (2005) Low dose prednisolone Reduces CD4+ T-Cell loss in Therapy-naïve HIV-Patients without antiretroviral Therapy. *Eur. J..Med.Res.* 10:105-109
8. Wallis RS, Kalyjian R, Jacobsen JM, Fox L, Purdue L, Shikuma CM, Arakaki R, Snyder S, Coombs RW, Bosch RJ, Spritzler J, Chernoff M, Aga E, Myers L, Schock B, Ledermann MM (2003) A Study of the Immunology, Virology, and Safety of prednisolone in HIV-1-Infected Subjects with CD4 Cell Counts of 200 to 700mm³. *JAIDS* 32: 281-286
9. Wellcome Trust: Research involving people living in Developing Countries
10. Lu W, Salerno-Goncalves R, Yuan J, Sylvie D, Han DS, Andrieu JM. Glucocorticoids rescue CD4+ T lymphocytes from activation-induced apoptosis triggered by HIV-1: implications for pathogenesis and therapy. *AIDS*. 1995;**9**:35–42.
11. Wu AW, Hays, RD, Kelly S, Malitz F, Bozzette SA, (1997a) Applications of the Medical Outcomes Study: health-related quality of life measures in HIV/AIDS. *Quality of life research*, 6, 531-554.
12. Wu AW, Revicki DA, Jacobson D, Malitz F, (1997b) Evidence for reliability, validity and usefulness of the Medical Outcomes Study HIV Health survey (MOS-HIV). *Quality of life research*, 6, 481-493.
13. Wu AW, Rubin HR, Mathews WC, Ware JE, Brysk LT, Hardy WD, Bozzette SA, Spectors SA, Richman DD, (1991) A health status questionnaire using 30 items from the Medical Outcomes Study. Preliminary validation in persons with early HIV infection. *Medical care*, 29: 786-798.

Appendix Ia

FLOW CHART



Appendix Ib

STUDY FLOW SHEET

VISIT	Base-line	Study start	1	2		4	5	6	7	8	9	10	11	12
MONTH	- 1	0	1 st	2 nd	3 rd	4 th	5 th	6 th	9 th	12 th	15 th	18 th	21 st	24 th
Informed Consent	x													
Quality of life	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Physical Examination	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Vital signs	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Height Weight	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
WHO perf. Status	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Staging CDC	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Concomitant disease	x													
Concomitant medication	X	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Signs & Symptoms		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Glucose (Nurse)	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Pregnancy test (Doc. As)	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Chest x-ray (x-ray dep.)	x							x		x		x		x
TB sputum (TB Lab.)	x				x			x	x	x	x	x	x	x
Whole blood count & PLTs	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
CD4 count	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
HIV Confirmation	x													
Biochemistry examinations	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
CPT preparation		x	x		x			x		x				

Appendix II WHO Performance Status

- 0 Able to carry out all normal activity without restriction.
- 1 Restricted in physically strenuous activity but ambulatory and able to do light work.
- 2 Ambulatory and capable of all self-care but unable to carry out any work. Up and about more than 50 % of waking hours.
- 3 Capable of only limited self-care, confined to bed or chair more than 50 % of waking hours.
- 4 Completely disabled: Cannot carry on any self-care, totally confined to bed or chair.

Appendix III

NCI COMMON TOXICITY CRITERIA

TOXICITY	Grade				
	0	1	2	3	4
WBC (10 ⁹ /l)	≥ 4.0	3.0 - 3.9	2.0 - 2.9	1.0 - 1.9	< 1.0
PLT (10 ⁹ /l)	WNL	75.0 - normal	50.0 - 74.9	25.0 - 49.9	< 25.0
Hgb (g/dl)	WNL	10.0 - normal	8.0 - 9.9	6.5 - 7.9	< 6.5
Granulocytes/ Bands (10 ⁹ /l)	≥ 2.0	1.5 - 1.9	1.0 - 1.4	0.5 - 0.9	< 0.5
Lymphocytes (10 ⁹ /l)	≥ 2.0	1.5 - 1.9	1.0 - 1.4	0.5 - 0.9	< 0.5
Hemorrhage (clinical)	None	mild, no transfusion	gross, 1-2 units transfusion per episode	gross, 3-4 units transfusion per episode	massive > 4 units transfusion per episode
Infection	None	mild	moderate	severe	life-threatening
Nausea	None	able to eat reasonable intake	intake significantly decreased but can eat	no significant intake	--
Vomiting	None	1 episode in 24 hrs	2-5 episodes in 24 hrs	6-10 episodes in 24 hrs	> 10 episodes in 24 hrs or requiring parenteral support
Diarrhea	None	increase of 2-3 stools/day over pre-Rx	increase of 4-6 stools/day, or nocturnal stools, or moderate cramping	increase of 7-9 stools/day, or incontinence, or severe cramping	increase of ≥ 10 stools/day, or grossly bloody diarrhea or need parenteral support
Stomatitis	None	painless ulcers, erythema, or mild soreness	painful erythema, edema, or ulcers, but can eat	painful erythema, edema, or ulcers, and cannot eat	requires parenteral or enteral support
Bilirubin	WNL	--	< 1.5 x N	1.5 - 3.0 x N	> 3.0 x N
Transaminase (SGOT, SGPT)	WNL	≤ 2.5 x N	2.6 - 5.0 x N	5.1 - 20.0 x N	> 20.0 x N
Alk. Phos. or 5' nucleotidase	WNL	≤ 2.5 x N	2.6 - 5.0 x N	5.1 - 20.0 x N	> 20.0 x N
Liver - clinical	no change from baseline	--	--	precoma	hepatic coma
Creatinine	WNL	< 1.5 x N	1.5 - 3.0 x N	3.1 - 6.0 x N	> 6.0 x N
Proteinuria	no change	1+ or < 0.3 g% or < 3 g/1	2 - 3+ or 0.3 - 1.0 g% or 3 - 10 g/1	4+ or > 1.0 g% or > 10 g/1	nephrotic syndrome
Hematuria	Neg	micro only	gross, no clots	gross + clots	requires transfusion
Alopecia	no loss	mild hair loss	pronounced or total hair loss	--	--
Pulmonary	none or no change	asymptomatic, w. abnormality in PFT's	dyspnea on significant exertion	dyspnea at normal level of activity	dyspnea at rest

Cardiac dysrhythmias	None	asymptomatic, transient, requiring no therapy	recurrent or persistent, no therapy required	requires treatment	requires monitoring ; or hypotension, or ventricular tachycardia, or fibrillation
Cardiac function	None	asymptomatic decline of resting LVEF less than 20% of baseline value	asymptomatic decline of resting LVEF more than 20% of baseline value	mild CHF, responsive to therapy	severe or refractory CHF
Cardiac-Ischemia	None	non-specific T-wave flattening	asymptomatic, ST and T wave changes suggesting ischemia	angina without evidence for infarction	acute myocardial infarction
Cardiac-Pericardial	None	asymptomatic effusion, no intervention required	pericarditis (rub, chest pain ECG changes)	symptomatic effusion ; drainage required	tamponade ; drainage urgently required
Hypertension	none or no change	asymptomatic, transient increase by > 20 mmHg (D) or to > 150/100 if previously WNL. No treatment required	recurrent or persistent increase by > 20 mmHg (D) or to > 150/100 if previously WNL. No treatment required	requires therapy	hypertensive crisis
Hypotension	none or no change	changes requiring no therapy (incl. transient orthostatic hypotension)	requires fluid replacement or other therapy but not hospitalization	requires therapy and hospitalization resolves within 48 hrs of stopping the agent	requires therapy and hospitalization for > 48 hrs after stopping the agent
Neuro-sensory	none or no change	mild paresthesias loss of deep tendon reflexes	mild or moderate objective sensory loss moderate paresthesias	severe objective sensory loss or paresthesias that interfere with function	--
Neuro-motor	none or no change	subjective weakness: no objective findings	mild objective weakness without significant impairment of function	objective weakness with impairment of function	paralysis
Neuro-cortical	None	mild somnolence or agitation	moderate somnolence or agitation	severe somnolence, agitation, confusion, disorientation or hallucinations	coma, seizures, toxic psychosis
Neuro-cerebellar	None	slight, incoordination, dysdiadokinesis	intention tremor, dysmetria, slurred speech, nystagmus	locomotor ataxia	cerebellar necrosis
Neuro-mood	no change	mild anxiety or depression	moderate anxiety or depression	severe anxiety or depression	suicidal ideation
Neuro-headache	None	mild	moderate or severe but transient	unrelenting and severe	--
Neuro-constipation	none or no change	mild	moderate	severe	ileus > 96 hrs
Neuro-hearing	none or no change	asymptomatic, hearing loss on audiometry only	tinnitus	hearing loss interfering with function but correctable with hearing aid	deafness not correctable

Neuro-vision	none or no change	--	--	symptomatic subtotal loss of vision	blindness
Skin	none or no change	scattered macular or papular eruption or erythema that is asymptomatic	scattered macular or papular eruption or erythema with pruritus or other associated symptoms	generalized symptomatic macular, papular, or vesicular eruption	exfoliative dermatitis or ulcerating dermatitis
Allergy	None	transient rash drug fever < 38°C, 100.4°F	urticaria, drug fever = 38°C, 100.4°F mild bronchospasm	serum sickness bronchospasm, req. parenteral meds	anaphylaxis
Fever in absence Of infection	None	37.1 - 38.0°C 98.7 - 100.4°F	38.1 - 40.0°C 100.5 - 104.0°F	> 40.0°C > 104.0°F for less than 24 hrs	> 40.0°C (104.0°F) for more than 24 hrs or fever accompanied by hypotension
Local	None	pain	pain with swelling with inflammation or phlebitis	ulceration	plastic surgery indicated
Weight gain / Loss	< 5.0%	5.0 - 9.9%	10.0 - 19.9%	≥ 20.0%	--
Hyperglycemia (mg/dl)	< 116	116 - 160	161 - 250	251 - 500	> 500 or ketoacidosis
Hypoglycemia (mg/dl)	> 64	55 - 64	40 - 54	30 - 39	< 30
Amylase	WNL	< 1.5 x N	1.5 - 2.0 x N	2.1 - 5.0 x N	≥ 5.1 x N
Hypercalcemia (mg/dl)	< 10.6	10.6 - 11.5	11.6 - 12.5	12.6 - 13.5	≥ 13.5
Hypocalcemia (mg/dl)	> 8.4	8.4 - 7.8	7.7 - 7.0	6.9 - 6.1	≤ 6.0
Hypomagnesemia (meq/l)	> 1.4	1.4 - 1.2	1.1 - 0.9	0.8 - 0.6	≤ 0.5
Fibrinogen	WNL	0.99 - 0.75 x N	0.74 - 0.50 x N	0.49 - 0.25 x N	≤ 0.24 x N
Prothrombin time	WNL	1.01 - 1.25 x N	1.26 - 1.50 x N	1.51 - 2.00 x N	> 2.00 x N
Partial thromboplastin time	WNL	1.01 - 1.66 x N	1.67 - 2.33 x N	2.34 - 3.00 x N	> 3.00 x N

Appendix IV

WHO Recommendations for initiating antiretroviral therapy in adults and adolescents with documented HIV infection

If CD4 testing available:

- WHO Stage IV disease irrespective of CD4 cell count
- WHO Stage III disease (including but not restricted to HIV wasting, chronic diarrhoea of unknown aetiology, prolonged fever of unknown aetiology, active pulmonary tuberculosis, recurrent invasive Bacterial infections, or recurrent/persistent mucosal candidiasis) with consideration of using CD4 cell counts $< 350/\text{mm}^3$ to assist decision making
- WHO Stage I or II disease with CD4 cell counts $\leq 200/\text{mm}^3$

Appendix Va

1993 Revised Classification System for HIV Infection and the Expanded CDC Surveillance Case Definition of AIDS in Adults and Adolescents

Clinical Categories			
CD4 T-cell Categories	A Asymptomatic	B Symptomatic	C AIDS Indicator Conditions
>500/mm ³	A1	B1	C1
200-499/mm ³	A2	B2	C2
<200/mm ³	A3	B3	C3

1993 CDC Surveillance Case Definition		
Category A (Asymptomatic HIV)	<ul style="list-style-type: none"> - Asymptomatic HIV Infection - Persistent generalized lymphadenopathy (PGL) - Acute HIV Infection with accompanying illness or history of HIV infection 	
Category B (Symptomatic HIV)	<ul style="list-style-type: none"> - Bacillary angiomatosis - Candidiasis, oropharyngeal (thrush), vulvovaginal (>1month) - Cervical dysplasia - Constitutional symptoms (fever >38 C or diarrhea >1 month) - Hairy leukoplakia 	<ul style="list-style-type: none"> - Herpes zoster (shingles) involving at least 2 distinct episodes or more than 1 dermatome - Idiopathic thrombocytopenia purpura - Listeriosis - Pelvic Inflammatory Disease - Peripheral Neuropathy
Category C (AIDS Defining Infections)	<ul style="list-style-type: none"> - Candidiasis of bronchi, trachea, or lungs - Candidiasis, oesophageal - Cervical cancer, invasive - Coccidioidomycosis, disseminated or extrapulmonary - Cryptococcosis, extrapulmonary - Cryptosporidiosis, chronic (>1 month) - Cytomegalovirus disease or retinitis - Encephalopathy, HIV related - Herpes simplex virus (HSV) - Histoplasmosis, disseminated or extrapulmonary - HIV-associated dementia - Kaposi sarcoma 	<ul style="list-style-type: none"> - Lymphoid interstitial pneumonia - Lymphoma, Burkitt's, immunoblastic, primary of brain - Mycobacterium avium-intracellulare complex - Mycobacterium tuberculosis, pulmonary or extrapulmonary - Nocardiosis - Pneumocystis carinii pneumonia - Pneumonia, recurrent - Progressive multifocal leukoencephalopathy - Salmonella septicemia, recurrent - Toxoplasmosis of internal organs - Wasting syndrome due to HIV - Isosporiasis, chronic intestinal (>1 month)

Appendix Vb

WHO Staging System for HIV Infection and Disease in Adults and Adolescents

Clinical Stage I

1. Asymptomatic
2. Generalised lymphadenopathy

Performance scale: 1: asymptomatic, normal activity

Clinical Stage II

3. Weight loss, < 10% of body weight
4. Minor mucocutaneous manifestations (seborrheic dermatitis, prurigo, fungal nail infections, recurrent oral ulcerations, angular cheilitis)
5. Herpes zoster within the last five years
6. Recurrent upper respiratory tract infections (i.e. bacterial sinusitis)

And/or performance scale 2: symptomatic , normal activity

Clinical Stage III

7. Weight loss, < 10% of body weight
8. Unexplained chronic diarrhoea, > 1 month
9. Unexplained prolonged fever (intermittent or constant) , > 1 month
10. Oral candidiasis (thrush)
11. Oral hairy leucoplakia
12. Pulmonary tuberculosis within the past year

13. Severe bacterial infections (i.e. pneumonia, pyomyositis)

And/or performance scale 3: bedridden < 50% of the day during last month.

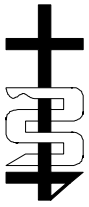
Clinical Stage IV:

14. HIV wasting syndrome (1)
15. Pneumocystic carinii pneumonia
16. Toxoplasmosis of the brain
17. Cryptosporidiosis with diarrhoea > 1 month
18. Cryptococcosis, extrapulmonary
19. Cytomegalovirus disease of an organ other than liver, spleen or lymph node (ex: retinitis)
20. Herpes simplex virus infection, mucocutaneous (>1month) or visceral
21. Progressive multifocal leucoencephalopathy
22. Any dissiminated endemic mycosis
23. Candidiasis of esophagus, trachea, bronchi
24. Atypical mycobacteriosis, disseminated or lungs
25. Non-typhoid Salmonella septicemia
26. Extrapulmonary tuberculosis
27. Lymphoma
28. Kaposi's sarcoma
29. HIV encephalopathy (2)

And/or performance scale 4: bedridden > 50% of the day during last month.

(1) HIV wasting syndrome: weight loss of > 10% of body weight, plus either unexplained chronic diarrhoea (> 1 month) or chronic weakness and unexplained prolonged fever (> 1 month).

(2) HIV encephalopathy: clinical findings of disabling cognitive and/or motor dysfunction interfering with activities of daily living, progressing over weeks to months, in the absence of a concurrent illness or condition other than HIV infection which could explain the findings.



Appendix VI

Informed Consent Form

PATIENT INFORMATION SHEET & CONSENT FORM

Study title

A phase II clinical trial to assess risk and benefit of oral low dose prednisolone for HIV infected people prior to the commencement of antiretroviral treatment.

Invitation paragraph

You are being invited to take part in a research study. Before you decide, it is important for you to understand why the research is being done and what it will involve. Please take time to read the following information carefully and discuss it with others if you wish. Ask us if there is anything that is not clear or if you would like more information. Take time to decide whether or not you wish to take part.

Thank you for reading this.

Why is this study being done?

The purpose of this study is to find out whether the study medication Prednisolone 5 mg is able to stabilize your condition. Prednisolone has been shown to protect the immune system from self-destruction, so we hope that this effect will prolong the time of health in your situation. Prednisolone is a well known medication for treating allergy. In prior studies with HIV-infected people prednisolone has been shown to have a stabilizing effect on health.

In this study we will compare the effects, good and/or bad, of prednisolone 5 mg with placebo.

This study is a double blind study with either placebo medication or with prednisolone 5mg per day. This means that only the registration centre knows if you get study medication (group 1) or placebo (group2). You will be "randomized" into one of the study groups described below. Randomization means that you are put into a group by chance. A computer program will place you in one of the study groups. Neither you nor your doctor can choose the group you will be in. You will have an equal chance of being placed in either group.

Do I have to take part?

It is up to you to decide whether or not to take part. If you do decide to take part you will be given this information sheet to keep and be asked to sign a consent form. If you decide to take part you are still free to withdraw at any time and without giving a reason. A decision to withdraw at any time, or a decision not to take part, will not affect the standard of care you receive.

How many people will take part in the study?

About 400 people will take part in this study.

What will happen if I take part in this research study?

Before you begin the study ...

You will need to have the following exams, tests or procedures to find out if you can be in the study. These exams, tests or procedures are part of regular diagnostic procedures and may be done even if you do not join the study. If you have had some of them recently, they may not need to be repeated. This will be up to your study doctor.

- *HIV Test*
- *Blood sample*
- *For female patients, Pregnancy test*
- *Chest x-ray for tuberculosis diagnostic*
- *Sputum test*

During the study ...

If the exams, tests and treatment medication show that you can be in the study, and you choose to take part, then you will need the following tests and procedures. They are part of regular care.

- *Monthly blood samples for six months then quarterly*
- *Chest x-ray every half year*
- *Sputum test every three months*
- *Pregnancy test every half year*

Additional Laboratory Analysis: For later additional laboratory analysis we will store a small amount of your blood samples at the National Institute for Medical Research. These blood samples will be analyzed in Germany (Medical Mission Institute) to help the doctors to understand how the drug is working on your cells.

How long will I be in the study?

You will be asked to take prednisolone for two years. After you are finished taking prednisolone, the study doctor will ask you to come for one further visit one month after you stop the study medication.

Can I stop being in the study?

Yes. You can decide to stop at any time. Tell the study doctor if you are thinking about stopping or decide to stop. He or she will tell you how to stop safely.

It is important to tell the study doctor if you are thinking about stopping so any risks from the study medication can be evaluated by your doctor. Another reason to tell your doctor that you are thinking about stopping is to discuss how to go onto another therapy, instead of prednisolone.

The study doctor may stop you from taking part in this study at any time if he/she believes it is in your best interest; if you do not follow the study rules; or if the study is stopped.

What side effects or risks can I expect from being in the study?

Prednisolone given in low dose is known as a medication with few side effects. It has been proven in several other studies to be safe in this dosage. But you may have side effects while on the study. Everyone taking part in the study will be watched carefully for any side effects. However, doctors don't know all the side effects that may happen. Side effects may be mild or very serious. Your health care team may give you medicines to help lessen side effects. Many side effects go away soon after you stop taking the study medication.

You should talk to your study doctor about any side effects that you have while taking part in the study.

Risks and side effects related to the prednisolone include those which are:

Likely

- Gastritis
- Abdominal pain
- Weight gain

Less Likely

- Hypertension
- Fluid retention
- Hyperglycaemia

Rare but serious

- Pneumonia
- Diabetes

Side effects reported by researchers but not proven to be caused by prednisolone

- Trigger the possibility to get a Kaposi sarcoma

Reproductive risks: You should not become pregnant or father a baby while on this study because the drugs in this study can affect an unborn baby.

For more information about risks and side effects, ask your study doctor.

Are there benefits to taking part in the study?

Taking part in this study may or may not make your health better. While doctors hope prednisolone therapy will be more useful to stabilize your health compared to the usual treatment, there is no proof of this yet. We do know that the information from this study will help doctors learn more about prednisolone as a treatment for HIV infected patients. This information could help future patients.

What other choices do I have if I do not take part in this study?

Your other choices may include:

- Getting treatment or care for your HIV Infection without being in a study
- Getting no treatment.

Talk to your physician about your choices and how to obtain care before you decide if you will take part in this study.

Will my medical information and my taking part in this study be kept confidential?

All information which is collected about you during the course of the research will be kept strictly confidential. Any information about you which leaves the hospital/surgery will have your name and address removed so that you cannot be recognized by a third party.

What are the costs of taking part in this study?

You will not need to pay for the study medication and for all laboratory tests and examinations which are study specific procedures.

You will not be paid for taking part in this study but you will get the bus transfer paid.

What happens if I am injured because I took part in this study?

It is important that you tell your study doctor if you feel that you have been injured because of taking part in this study. You can tell the doctor in person or call him/her at the Bugando hospital .

You will get medical treatment if you are injured as a result of taking part in this study.

What are my rights if I take part in this study?

Taking part in this study is your choice. You may choose either to take part or not to take part in the study. If you decide to take part in this study, you may leave the study at any time. No matter what decision you make, there will be no penalty to you and you will not lose any of your regular benefits. Leaving the study will not affect your medical care. You can still get your medical care from our institution.

We will tell you about new information or changes in the study that may affect your health or your willingness to continue in the study.

In the case of injury resulting from this study, you do not lose any of your legal rights to seek payment by signing this form.

Who can answer my questions about the study?

You can talk to your study doctor about any questions or concerns you have about this study. Contact your study doctor at Bugando hospital.

Please give your consent

Signature

I have been given a copy of all 6 pages of this form. I have read it or it has been read to me. I understand the information and have had my questions answered. I agree to take part in this study.

Participant: _____ Study No. _____

Date _____

Investigator: _____

Date _____

Appendix VII

Serious Adverse Event Form

The tansanian yellow form

Appendix VIII

The Declaration of Helsinki

Policy

WORLD MEDICAL ASSOCIATION DECLARATION OF HELSINKI Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects

Adopted by the 18th WMA General Assembly, Helsinki, Finland, June 1964, and amended by the
29th WMA General Assembly, Tokyo, Japan, October 1975
35th WMA General Assembly, Venice, Italy, October 1983
41st WMA General Assembly, Hong Kong, September 1989
48th WMA General Assembly, Somerset West, Republic of South Africa, October 1996
and the 52nd WMA General Assembly, Edinburgh, Scotland, October 2000
Note of Clarification on Paragraph 29 added by the WMA General Assembly, Washington 2002
Note of Clarification on Paragraph 30 added by the WMA General Assembly, Tokyo 2004

A. INTRODUCTION

1. The World Medical Association has developed the Declaration of Helsinki as a statement of ethical principles to provide guidance to physicians and other participants in medical research involving human subjects. Medical research involving human subjects includes research on identifiable human material or identifiable data.
2. It is the duty of the physician to promote and safeguard the health of the people. The physician's knowledge and conscience are dedicated to the fulfillment of this duty.
3. The Declaration of Geneva of the World Medical Association binds the physician with the words, "The health of my patient will be my first consideration," and the International Code of Medical Ethics declares that, "A physician shall act only in the patient's interest when providing medical care which might have the effect of weakening the physical and mental condition of the patient."
4. Medical progress is based on research which ultimately must rest in part on experimentation involving human subjects.
5. In medical research on human subjects, considerations related to the well-being of the human subject should take precedence over the interests of science and society.

6. The primary purpose of medical research involving human subjects is to improve prophylactic, diagnostic and therapeutic procedures and the understanding of the aetiology and pathogenesis of disease. Even the best proven prophylactic, diagnostic, and therapeutic methods must continuously be challenged through research for their effectiveness, efficiency, accessibility and quality.

7. In current medical practice and in medical research, most prophylactic, diagnostic and therapeutic procedures involve risks and burdens.

8. Medical research is subject to ethical standards that promote respect for all human beings and protect their health and rights. Some research populations are vulnerable and need special protection. The particular needs of the economically and medically disadvantaged must be recognized. Special attention is also required for those who cannot give or refuse consent for themselves, for those who may be subject to giving consent under duress, for those who will not benefit personally from the research and for those for whom the research is combined with care.

9. Research Investigators should be aware of the ethical, legal and regulatory requirements for research on human subjects in their own countries as well as applicable international requirements. No national ethical, legal or regulatory requirement should be allowed to reduce or eliminate any of the protections for human subjects set forth in this Declaration.

B. BASIC PRINCIPLES FOR ALL MEDICAL RESEARCH

10. It is the duty of the physician in medical research to protect the life, health, privacy, and dignity of the human subject.

11. Medical research involving human subjects must conform to generally accepted scientific principles, be based on a thorough knowledge of the scientific literature, other relevant sources of information, and on adequate laboratory and, where appropriate, animal experimentation.

12. Appropriate caution must be exercised in the conduct of research which may affect the environment, and the welfare of animals used for research must be respected.

13. The design and performance of each experimental procedure involving human subjects should be clearly formulated in an experimental protocol. This protocol should be submitted for consideration, comment, guidance, and where appropriate, approval to a specially appointed ethical review committee, which must be independent of the investigator, the sponsor or any other kind of undue influence. This independent committee should be in conformity with the laws and regulations of the country in which the research experiment is performed. The committee has the right to monitor ongoing trials. The researcher has the obligation to provide monitoring information to the committee, especially any serious adverse events. The researcher should also submit to the committee, for review, information regarding funding, sponsors, institutional affiliations, other potential conflicts of interest and incentives for subjects.

14. The research protocol should always contain a statement of the ethical considerations involved and should indicate that there is compliance with the principles enunciated in this Declaration.

15. Medical research involving human subjects should be conducted only by scientifically qualified persons and under the supervision of a clinically competent medical person. The responsibility for the human subject must always rest with a medically qualified person and never rest on the subject of the research, even though the subject has given consent.

16. Every medical research project involving human subjects should be preceded by careful assessment of predictable risks and burdens in comparison with foreseeable benefits to the subject or to others. This does not preclude the participation of healthy volunteers in medical research. The design of all studies should be publicly available.

17. Physicians should abstain from engaging in research projects involving human subjects unless they are confident that the risks involved have been adequately

assessed and can be satisfactorily managed. Physicians should cease any investigation if the risks are found to outweigh the potential benefits or if there is conclusive proof of positive and beneficial results.

18. Medical research involving human subjects should only be conducted if the importance of the objective outweighs the inherent risks and burdens to the subject. This is especially important when the human subjects are healthy volunteers.

19. Medical research is only justified if there is a reasonable likelihood that the populations in which the research is carried out stand to benefit from the results of the research.

20. The subjects must be volunteers and informed participants in the research project.

21. The right of research subjects to safeguard their integrity must always be respected. Every precaution should be taken to respect the privacy of the subject, the confidentiality of the patient's information and to minimize the impact of the study on the subject's physical and mental integrity and on the personality of the subject.

22. In any research on human beings, each potential subject must be adequately informed of the aims, methods, sources of funding, any possible conflicts of interest, institutional affiliations of the researcher, the anticipated benefits and potential risks of the study and the discomfort it may entail. The subject should be informed of the right to abstain from participation in the study or to withdraw consent to participate at any time without reprisal. After ensuring that the subject has understood the information, the physician should then obtain the subject's freely-given informed consent, preferably in writing. If the consent cannot be obtained in writing, the non-written consent must be formally documented and witnessed.

23. When obtaining informed consent for the research project the physician should be particularly cautious if the subject is in a dependent relationship with the physician or may consent under duress. In that case the informed consent should be obtained by a well-informed physician who is not engaged in the investigation and who is completely independent of this relationship.

24. For a research subject who is legally incompetent, physically or mentally incapable of giving consent or is a legally incompetent minor, the investigator must obtain informed consent from the legally authorized representative in accordance with applicable law. These groups should not be included in research unless the research is necessary to promote the health of the population represented and this research cannot instead be performed on legally competent persons.

25. When a subject deemed legally incompetent, such as a minor child, is able to give assent to decisions about participation in research, the investigator must obtain that assent in addition to the consent of the legally authorized representative.

26. Research on individuals from whom it is not possible to obtain consent, including proxy or advance consent, should be done only if the physical/mental condition that prevents obtaining informed consent is a necessary characteristic of the research population. The specific reasons for involving research subjects with a condition that renders them unable to give informed consent should be stated in the experimental protocol for consideration and approval of the review committee. The protocol should state that consent to remain in the research should be obtained as soon as possible from the individual or a legally authorized surrogate.

27. Both authors and publishers have ethical obligations. In publication of the results of research, the investigators are obliged to preserve the accuracy of the results. Negative as well as positive results should be published or otherwise publicly available. Sources of funding, institutional affiliations and any possible conflicts of interest should be declared in the publication. Reports of experimentation not in accordance with the principles laid down in this Declaration should not be accepted for publication.

C. ADDITIONAL PRINCIPLES FOR MEDICAL RESEARCH COMBINED WITH MEDICAL CARE

28. The physician may combine medical research with medical care, only to the extent that the research is justified by its potential prophylactic, diagnostic or therapeutic value. When medical research is combined with medical care, additional standards apply to protect the patients who are research subjects.

29. The benefits, risks, burdens and effectiveness of a new method should be tested against those of the best current prophylactic, diagnostic, and therapeutic methods. This does not exclude the use of placebo, or no treatment, in studies where no proven prophylactic, diagnostic or therapeutic method exists.¹

30. At the conclusion of the study, every patient entered into the study should be assured of access to the best proven prophylactic, diagnostic and therapeutic methods identified by the study.²

31. The physician should fully inform the patient which aspects of the care are related to the research. The refusal of a patient to participate in a study must never interfere with the patient-physician relationship.

32. In the treatment of a patient, where proven prophylactic, diagnostic and therapeutic methods do not exist or have been ineffective, the physician, with informed consent from the patient, must be free to use unproven or new prophylactic, diagnostic and therapeutic measures, if in the physician's judgement it offers hope of saving life, re-establishing health or alleviating suffering. Where possible, these measures should be made the object of research, designed to evaluate their safety and efficacy. In all cases, new information should be recorded and, where appropriate, published. The other relevant guidelines of this Declaration should be followed.

1 Note of clarification on paragraph 29 of the WMA Declaration of Helsinki

The WMA hereby reaffirms its position that extreme care must be taken in making use of a placebo-controlled trial and that in general this methodology should only be used in the absence of existing proven therapy. However, a placebo-controlled trial may be ethically acceptable, even if proven therapy is available, under the following circumstances:

- Where for compelling and scientifically sound methodological reasons its use is necessary to determine the efficacy or safety of a prophylactic, diagnostic or therapeutic method; or
- Where a prophylactic, diagnostic or therapeutic method is being investigated for a minor condition and the patients who receive placebo will not be subject to any additional risk of serious or irreversible harm.

All other provisions of the Declaration of Helsinki must be adhered to, especially the need for appropriate ethical and scientific review.

2 Note of clarification on paragraph 30 of the WMA Declaration of Helsinki

The WMA hereby reaffirms its position that it is necessary during the study planning process to identify post-trial access by study participants to prophylactic, diagnostic and therapeutic procedures identified as beneficial in the study or access to other appropriate care. Post-trial access arrangements or other care must be described in the study protocol so the ethical review committee may consider such arrangements during its review.

9.10.2004

Appendix IX

WHO Guideline of Confirmation for HIV Tests

TEST-STRATEGIE

WHO, UNAIDS (March 1997)

	Prevalence	Amount of Tests
Diagnosis with clinical Symptoms	$\geq 30\%$	1
	$< 30\%$	2
Diagnosis without clinical Symptoms	$> 10\%$	2
	$\leq 10\%$	3

7 Lebenslauf

Schulausbildung

- 1973-1977 Besuch der Grundschule Schloßbergschule Starnberg.
1977-1986 Besuch des Gymnasiums Landschulheim Kempfenhausen.
Abschluß: Abitur mit Note 1.7

Hochschulstudium

- 1988- 1994 Begabtenförderung während des Studiums durch das evangelische Studienwerk Villigst.
2008-2012 Begabtenförderung während der Doktorarbeit durch das evangelische Studienwerk Villigst.

Studium der Biologie

- 11/86-10/89 Universität Bayreuth
11/89-1/94 Eberhard-Karls Universität Tübingen
11/88-4/89 Auslandsaufenthalt in Kenia (Ostafrika) :
Praktikum an einem Projekt zur Kontrolle der Tsetse-Fliegen (GTZ und ICIPE).
Praktikum an einem Pflanzenökologischen Projekt zur Kartierung von Medizinal Pflanzen.
11/92 – 1/94 Diplomarbeit am Virologischen Lehrstuhl des Hygieneinstituts Tübingen: „Veränderungen in der Nukleotidsequenz der 5´nichttranslatierten Region des Hepatitis A Virus.“
Abschluß: Diplom mit der Gesamtnote "Sehr gut"

Studium der Humanmedizin

- 3/93-7/94 an der Universität Tübingen
8/94-10/98 Erziehungsurlaub

Schwerpunkte während des Studiums

Medizinische Parasitologie, Virologie, Genetik, medizinische Mikrobiologie und Hygiene.
Geographie (Anthropogeographie)

Berufstätigkeit

seit 11/98

Selbstständig tätig in der klinischen Forschung als Clinical Research Assistant (CRA).

Planung, Durchführung und Monitoring verschiedener klinischer Studien.

- | | |
|-----------------|--|
| 01/1999-05/2001 | Biologisches Chemotherapeutikum bei Blasenkarzinom nach transurethraler Resektion TUR. (Grünenthal) |
| 12/1998-11/1999 | Zulassungsstudie von Tamiflu, Influenza (Hoffmann La Roche). |
| 02/1999-03/2002 | Chemotherapie Studie bei Mesotheliom, Lungenkarzinom, (Lilly) |
| 12/1998-09/1999 | Growth factor Studie für Patienten nach Hoch Dosis Chemotherapie bei verschiedenen Arten von Karzinomen. (Aventis) |
| 11/2000-03/2003 | Zulassungsstudie für ein Neuroleptikum (Pfizer) bei Schizophrenieerkrankung. |
| 09/2002-12/2004 | Sicherheitsprofil für Lipidsenker bei KHK (Pfizer). |
| 10/2010-05/2012 | Zulassungsstudie von DP-b99 in akuten Schlaganfällen (D-Pharm). |
| 04/1999-ongoing | Chemotherapie Optimierungsstudien für nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom (NSCLC) im Rahmen einer Forschungsgruppe von Prof. Dr. Manegold (Mannheim) in Kooperation mit dem DKFZ Heidelberg. |
| 09/2004-ongoing | Mitarbeit im Missionsärztlichen Institut Würzburg.
Planung einer Studie in Tansania, Mwanza. |
| 06/2007-12/2012 | Doktorarbeit Dr. rer. nat. am Institut für Virologie der Universität Würzburg.
Mitglied im Graduiertenkolleg IRTG 1522. |

seit 02/2013

Referentin für die Koordination von klinischer Forschung im Missionsärztlichen Institut in Würzburg

Weiteres:

Sprachen: Deutsch (Muttersprache), Englisch (flüssig in Wort und Schrift), Kisuaheli (Fortgeschritten), Französisch (Basis), Spanisch (Basis).

Computer: Gute Kenntnisse in MS Word, MS Excel, MS Access Database; MS Power Point, Statistik Programme SPSS, Prism, Gen Alignments, Gen-Sequenzierprogramme.

8 Danksagung

Diese Arbeit ist im Rahmen einer Kooperation des Institutes für Virologie und Immunbiologie Würzburg, des Missionsärztlichen Institutes Würzburg, des Bugando Medical Centers Mwanza und der Catholic University of Health and Allied Science Mwanza Tansania entstanden.

Viele verschiedene Personen haben dank ihrer Unterstützung innerhalb der Kooperation zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen.

Bedanken möchte ich mich besonders bei Herrn PD Dr. Carsten Scheller vom Institut für Virologie und Immunbiologie Würzburg für die ausgezeichnete Betreuung dieser Arbeit, für die freundliche Hilfsbereitschaft sowohl während der experimentellen Phase als auch während dem Verfassen dieser Arbeit, die herzliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe und die Übernahme des Erstgutachtens der Arbeit.

Frau Prof. Dr. Ute Hentschel Humeida von der biologischen Fakultät der Universität Würzburg Fakultät danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Bedanken möchte ich mich ebenfalls bei Herrn Prof. Dr. Axel Rethwilm für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes im Institut für Virologie und Immunbiologie.

Weiterhin möchte ich mich bei den Arbeitsgruppen Scheller, Koutsilieri und Rethwilm für die Hilfsbereitschaft und das freundliche Arbeitsklima bedanken. Insbesondere bedanke ich mich bei Frau Inge Euler-König für ihre vielen praktischen Hilfestellungen. Mein Dank gilt auch Herrn Benedikt Weissbrich und dem Team der Diagnostik für die Unterstützung in speziellen Untersuchungen in der Diagnostik des Instituts für Virologie.

Darüber hinaus gilt mein besonderer Dank Herrn Professor Dr. August Stich vom Missionsärztlichen Institut, der als Principal Investigator die Verantwortung für die durchgeführte Studie (ProCort) übernommen hat und immer ansprechbar war.

Bedanken möchte ich mich ebenso beim gesamten Team des missionsärztlichen Instituts für seine Unterstützung, mein Dank gilt hier besonders dem Geschäftsführer Karl-Heinz Heino-Rothenbücher für finanzielle und organisatorische Hilfestellungen, Dr. Andreas Müller für die medizinische Fortbildung unserer Kollegen in Tansania, Silvia Miksch, Hanne Fleischmann und Andreas Fabricius für die praktischen Hilfestellungen in Würzburg und in Tansania.

Ein großer Dank gilt Herrn Dr. Albrecht Ulmer für die Bereitschaft seine Beobachtungen zum Einsatz von niedrig dosiertem Prednisolon in HIV Patienten mit mir zu teilen.

Bedanken möchte ich mich bei Prof. Dr. Hartwig Klinker Leiter der Infektiologie vom Zentrum für Innere Medizin der Universität Würzburg und seinem Team für die Unterstützung in der Bestimmung von Medikamentenspiegeln in den Blutproben der ProCort Patienten.

Weiterhin möchte ich mich bei Direktor Dr. Charles Majinge und dem Chefarzt der Inneren Medizin Dr. Samuel Kalluvya des Bugando Medical Centers in Mwanza, Tansania bedanken für ihren großen Einsatz innerhalb der Kooperation und der Möglichkeit die ProCort Studie im Bugando Medical Center durchzuführen. Ebenso ganz herzlich bedanken möchte ich mich bei MD Irene Massawe für die Übernahme der Leitungsfunktion des Studienteams und den Mitgliedern MD Neema Chami, MD Eliawema Mwitani, MD Rogartus Kabyemera, MD Hauli Kinyeti, MD Kinanga Magambo, MD Mohamed Jan Mubaraker, MD Mathias Mlewa, Studienschwester Lydia Makenge und Assistentin Theresia Gabriel Juma, ebenso wie den Labortechnikern, Omary Kapande, John Myombe und dem Apotheker John Pemba und dem Leiter des Nationalen medizinischen Forschungslabors in Mwanza für die Probenaufbewahrung Dr. John Changalucha. Mein Dank gilt auch an alle 404 Patienten der Studie für ihre Bereitschaft daran teilzunehmen.

Ein großer Dank gilt dem evangelischen Studienwerk e.V. für die finanzielle und ideelle Unterstützung, im Besonderen hierbei dem Studienleiter Herrn Prof. Dr. Eberhard Müller. Ebenso gilt mein Dank auch den finanziellen Sponsoren dieser Studie der Deutschen Lepra- und Tuberkulosehilfe (DAHW), Aktion Medeor, WuF-Zentrum Würzburg, und der Krick-Stiftung.

Nicht zuletzt bedanke ich mich von ganzem Herzen bei meiner Familie, meinen Mann Frank Hofmann-Kasang und meinen Kindern Maraike, Jan und Anna-Lena sowie Johannes Kimmel für ihre Unterstützung in vielfältigen Formen während meiner gesamten Arbeit, und meinen Eltern.

9 Literaturverzeichnis

- Abrams, D., Y. Levy, et al. (2009). "Interleukin-2 therapy in patients with HIV infection." N Engl J Med **361**(16): 1548-1559.
- Abrams, D. I., J. D. Bebchuk, et al. (2002). "Randomized, open-label study of the impact of two doses of subcutaneous recombinant interleukin-2 on viral burden in patients with HIV-1 infection and CD4+ cell counts of > or = 300/mm³: CPCRA 059." J Acquir Immune Defic Syndr **29**(3): 221-231.
- Adoga, M. P., G. R. Pennap, et al. (2012). "CD4- and CD3-T lymphocyte reference values of immunocompetent urban and rural subjects in an African nation." Scand J Immunol **76**(1): 33-38.
- Aghokeng, A. F., L. Vergne, et al. (2009). "Evaluation of transmitted HIV drug resistance among recently-infected antenatal clinic attendees in four Central African countries." Antivir Ther **14**(3): 401-411.
- Aiuti, F. and I. Mezzaroma (2006). "Failure to reconstitute CD4+ T-cells despite suppression of HIV replication under HAART." AIDS Rev **8**(2): 88-97.
- Alamos, D. I. Los Alamos Database. <http://www.hiv.lanl.gov/>, abgerufen am 24.11.2012.
- Andrieu, J. M. and W. Lu (2004). "Long-term clinical, immunologic and virologic impact of glucocorticoids on the chronic phase of HIV infection." BMC Med **2**: 17.
- Andrieu, J. M., W. Lu, et al. (1995). "Sustained increases in CD4 cell counts in asymptomatic human immunodeficiency virus type 1-seropositive patients treated with prednisolone for 1 year." J Infect Dis **171**(3): 523-530.
- Arduino, R. C., E. C. Nannini, et al. (2004). "CD4 cell response to 3 doses of subcutaneous interleukin 2: meta-analysis of 3 Vanguard studies." Clin Infect Dis **39**(1): 115-122.
- Arrive, E., M. L. Newell, et al. (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**(5): 1009-1021.
- Arroyo, M. A., M. Hoelscher, et al. (2004). "HIV type 1 subtypes among blood donors in the Mbeya region of southwest Tanzania." AIDS Res Hum Retroviruses **20**(8): 895-901.
- Ayouba, A., P. Maucclere, et al. (2001). "HIV-1 group O infection in Cameroon, 1986 to 1998." Emerg Infect Dis **7**(3): 466-467.
- Backes, Y., K. F. van der Sluijs, et al. (2012). "Usefulness of suPAR as a biological marker in patients with systemic inflammation or infection: a systematic review." Intensive Care Med **38**(9): 1418-1428.
- Baeten, J. M., B. Chohan, et al. (2007). "HIV-1 subtype D infection is associated with faster disease progression than subtype A in spite of similar plasma HIV-1 loads." J Infect Dis **195**(8): 1177-1180.
- Bailes, E., F. Gao, et al. (2003). "Hybrid origin of SIV in chimpanzees." Science **300**(5626): 1713.
- Barre-Sinoussi, F., J. C. Chermann, et al. (1983). "Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS)." Science **220**(4599): 868-871.
- Barth, R. E., J. T. van der Meer, et al. (2008). "Effectiveness of highly active antiretroviral therapy administered by general practitioners in rural South Africa." Eur J Clin Microbiol Infect Dis **27**(10): 977-984.
- Barth, R. E., A. M. Wensing, et al. (2008). "Rapid accumulation of nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor-associated resistance: evidence of transmitted resistance in rural South Africa." AIDS **22**(16): 2210-2212.

- Bedri, A., B. Gudetta, et al. (2008). "Extended-dose nevirapine to 6 weeks of age for infants to prevent HIV transmission via breastfeeding in Ethiopia, India, and Uganda: an analysis of three randomised controlled trials." *Lancet* **372**(9635): 300-313.
- Bennett, D. E., S. Bertagnolio, et al. (2008). "The World Health Organization's global strategy for prevention and assessment of HIV drug resistance." *Antivir Ther* **13 Suppl 2**: 1-13.
- Bennett, D. E., M. Myatt, et al. (2008). "Recommendations for surveillance of transmitted HIV drug resistance in countries scaling up antiretroviral treatment." *Antivir Ther* **13 Suppl 2**: 25-36.
- Bilimoria, N. F. (2012). "Lessons learned from a decade of partnership between PEPFAR and the Global Fund: a case study from Tanzania." *Health Aff (Millwood)* **31**(7): 1415-1421.
- Binka, F. (2005). "Editorial: north-south research collaborations: a move towards a true partnership?" *Trop Med Int Health* **10**(3): 207-209.
- Blackard, J. T., B. Renjifo, et al. (2001). "HIV-1 LTR subtype and perinatal transmission." *Virology* **287**(2): 261-265.
- Bobkov, A. F., E. V. Kazennova, et al. (2004). "Temporal trends in the HIV-1 epidemic in Russia: predominance of subtype A." *J Med Virol* **74**(2): 191-196.
- Borrow, P., H. Lewicki, et al. (1994). "Virus-specific CD8+ cytotoxic T-lymphocyte activity associated with control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 infection." *J Virol* **68**(9): 6103-6110.
- Brenchley, J. M., D. A. Price, et al. (2006). "Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection." *Nat Med* **12**(12): 1365-1371.
- Brenner, B. G., M. Oliveira, et al. (2006). "HIV-1 subtype C viruses rapidly develop K65R resistance to tenofovir in cell culture." *AIDS* **20**(9): F9-13.
- Briggs, J. A., T. Wilk, et al. (2003). "Structural organization of authentic, mature HIV-1 virions and cores." *EMBO J* **22**(7): 1707-1715.
- Buchacz, K., R. K. Baker, et al. (2010). "AIDS-defining opportunistic illnesses in US patients, 1994-2007: a cohort study." *AIDS* **24**(10): 1549-1559.
- Campbell-Yesufu, O. T. and R. T. Gandhi (2011). "Update on human immunodeficiency virus (HIV)-2 infection." *Clin Infect Dis* **52**(6): 780-787.
- Cao, W., B. D. Jamieson, et al. (2009). "Regulatory T cell expansion and immune activation during untreated HIV type 1 infection are associated with disease progression." *AIDS Res Hum Retroviruses* **25**(2): 183-191.
- Carr, J. K., M. O. Salminen, et al. (1996). "Full-length sequence and mosaic structure of a human immunodeficiency virus type 1 isolate from Thailand." *J Virol* **70**(9): 5935-5943.
- CDC (1993). 1993 revised classification system for HIV infection and expanded surveillance case definition for AIDS among adolescents and adults. *MMWR Recomm Rep.* **41**: 1-19.
- CDC (1999). "Guidelines for national human immunodeficiency virus case surveillance, including monitoring for human immunodeficiency virus infection and acquired immunodeficiency syndrome. Centers for Disease Control and Prevention." *MMWR Recomm Rep* **48**(RR-13): 1-27, 29-31.
- Chan, D. C. and P. S. Kim (1998). "HIV entry and its inhibition." *Cell* **93**(5): 681-684.
- Chun, T. W., L. Carruth, et al. (1997). "Quantification of latent tissue reservoirs and total body viral load in HIV-1 infection." *Nature* **387**(6629): 183-188.
- Clavel, F., D. Guetard, et al. (1986). "Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS." *Science* **233**(4761): 343-346.
- Clavel, F. and A. J. Hance (2004). "HIV drug resistance." *N Engl J Med* **350**(10): 1023-1035.
- Cohen, J. (2002). "The immunopathogenesis of sepsis." *Nature* **420**(6917): 885-891.

- Cooper, D. A., J. Gold, et al. (1985). "Acute AIDS retrovirus infection. Definition of a clinical illness associated with seroconversion." *Lancet* **1**(8428): 537-540.
- Cunningham, C. K., M. L. Chaix, et al. (2002). "Development of resistance mutations in women receiving standard antiretroviral therapy who received intrapartum nevirapine to prevent perinatal human immunodeficiency virus type 1 transmission: a substudy of pediatric AIDS clinical trials group protocol 316." *J Infect Dis* **186**(2): 181-188.
- Daar, E. S., S. Little, et al. (2001). "Diagnosis of primary HIV-1 infection. Los Angeles County Primary HIV Infection Recruitment Network." *Ann Intern Med* **134**(1): 25-29.
- DAIG (2005) " Antiretrovirale Therapie der HIV-Infektion. <http://www.uni-duesseldorf.de/AWMF/II/055-001.htm>, abgerufen am 06.11.2007.
- DAIG (2012). "Deutsch österreichische Leitlinien zur antiretroviralen Therapie der HIV Infektion". D. A. Gesellschaft. Bonn. <http://www.awmf.org/leitlinien/detail/II/055-001.html>, abgerufen am 11.12.2012.
- Dalgleish, A. G., P. C. Beverley, et al. (1984). "The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus." *Nature* **312**(5996): 763-767.
- Davey, R. T., Jr., R. L. Murphy, et al. (2000). "Immunologic and virologic effects of subcutaneous interleukin 2 in combination with antiretroviral therapy: A randomized controlled trial." *JAMA* **284**(2): 183-189.
- de Bock, C. E. and Y. Wang (2004). "Clinical significance of urokinase-type plasminogen activator receptor (uPAR) expression in cancer." *Med Res Rev* **24**(1): 13-39.
- Deeks, S. G. (2008). "Transmitted minority drug-resistant HIV variants: a new epidemic?" *PLoS Med* **5**(7): e164.
- Deeks, S. G., C. M. Kitchen, et al. (2004). "Immune activation set point during early HIV infection predicts subsequent CD4+ T-cell changes independent of viral load." *Blood* **104**(4): 942-947.
- Deng, H., R. Liu, et al. (1996). "Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1." *Nature* **381**(6584): 661-666.
- Douek, D. C., L. J. Picker, et al. (2003). "T cell dynamics in HIV-1 infection." *Annu Rev Immunol* **21**: 265-304.
- Dragic, T., V. Litwin, et al. (1996). "HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5." *Nature* **381**(6584): 667-673.
- Eggena, M. P., B. Barugahare, et al. (2005). "Depletion of regulatory T cells in HIV infection is associated with immune activation." *J Immunol* **174**(7): 4407-4414.
- Egger, M., M. May, et al. (2002). "Prognosis of HIV-1-infected patients starting highly active antiretroviral therapy: a collaborative analysis of prospective studies." *Lancet* **360**(9327): 119-129.
- El-Sadr, W. M., C. B. Holmes, et al. (2012). "Scale-up of HIV treatment through PEPFAR: a historic public health achievement." *J Acquir Immune Defic Syndr* **60** *Suppl 3*: S96-104.
- Eron, J. J., S. L. Benoit, et al. (1995). "Treatment with lamivudine, zidovudine, or both in HIV-positive patients with 200 to 500 CD4+ cells per cubic millimeter. North American HIV Working Party." *N Engl J Med* **333**(25): 1662-1669.
- Estreicher, A., J. Muhlhauser, et al. (1990). "The receptor for urokinase type plasminogen activator polarizes expression of the protease to the leading edge of migrating monocytes and promotes degradation of enzyme inhibitor complexes." *J Cell Biol* **111**(2): 783-792.
- Fatkenheuer, G., A. L. Pozniak, et al. (2005). "Efficacy of short-term monotherapy with maraviroc, a new CCR5 antagonist, in patients infected with HIV-1." *Nat Med* **11**(11): 1170-1172.
- Fauci, A. S., D. C. Dale, et al. (1976). "Glucocorticosteroid therapy: mechanisms of action and clinical considerations." *Ann Intern Med* **84**(3): 304-315.

- Feng, Y., C. C. Broder, et al. (1996). "HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor." *Science* **272**(5263): 872-877.
- Ferdman, R. M. and J. A. Church (1994). "Immunologic and virologic effects of glucocorticoids on human immunodeficiency virus infection in children: a preliminary study." *Pediatr Infect Dis J* **13**(3): 212-216.
- Ferreira, C., O. Yun, et al. (2012). "Evaluation of Clinical and Immunological Markers for Predicting Virological Failure in a HIV/AIDS Treatment Cohort in Busia, Kenya." *PLoS ONE* **7**(11): e49834.
- Fischl, M. A., D. D. Richman, et al. (1987). "The efficacy of azidothymidine (AZT) in the treatment of patients with AIDS and AIDS-related complex. A double-blind, placebo-controlled trial." *N Engl J Med* **317**(4): 185-191.
- Floyd, S., A. Molesworth, et al. (2010). "Population-level reduction in adult mortality after extension of free anti-retroviral therapy provision into rural areas in northern Malawi." *PLoS ONE* **5**(10): e13499.
- Fourie, C. M., J. M. Van Rooyen, et al. (2012). "Soluble urokinase plasminogen activator receptor (suPAR) is associated with metabolic changes in HIV-1-infected Africans: a prospective study." *Inflammation* **35**(1): 221-229.
- Frater, A. J., A. Beardall, et al. (2001). "Impact of baseline polymorphisms in RT and protease on outcome of highly active antiretroviral therapy in HIV-1-infected African patients." *AIDS* **15**(12): 1493-1502.
- Freeman, G. J., E. J. Wherry, et al. (2006). "Reinvigorating exhausted HIV-specific T cells via PD-1-PD-1 ligand blockade." *J Exp Med* **203**(10): 2223-2227.
- Galli, M., A. L. Ridolfo, et al. (2002). "Body habitus changes and metabolic alterations in protease inhibitor-naive HIV-1-infected patients treated with two nucleoside reverse transcriptase inhibitors." *J Acquir Immune Defic Syndr* **29**(1): 21-31.
- Gallo, R. C., P. S. Sarin, et al. (1983). "Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS)." *Science* **220**(4599): 865-867.
- Gao, F., D. L. Robertson, et al. (1998). "An isolate of human immunodeficiency virus type 1 originally classified as subtype I represents a complex mosaic comprising three different group M subtypes (A, G, and I)." *J Virol* **72**(12): 10234-10241.
- Gelderblom, H. R. (1991). "Assembly and morphology of HIV: potential effect of structure on viral function." *AIDS* **5**(6): 617-637.
- Gelderblom, H. R., E. H. Hausmann, et al. (1987). "Fine structure of human immunodeficiency virus (HIV) and immunolocalization of structural proteins." *Virology* **156**(1): 171-176.
- Geng, E. H., P. W. Hunt, et al. (2011). "Trends in the clinical characteristics of HIV-infected patients initiating antiretroviral therapy in Kenya, Uganda and Tanzania between 2002 and 2009." *J Int AIDS Soc* **14**: 46.
- Geretti, A. M. (2006). "HIV-1 subtypes: epidemiology and significance for HIV management." *Curr Opin Infect Dis* **19**(1): 1-7.
- Gilks, C. F., S. Crowley, et al. (2006). "The WHO public-health approach to antiretroviral treatment against HIV in resource-limited settings." *Lancet* **368**(9534): 505-510.
- Giorgi, J. V., L. E. Hultin, et al. (1999). "Shorter survival in advanced human immunodeficiency virus type 1 infection is more closely associated with T lymphocyte activation than with plasma virus burden or virus chemokine coreceptor usage." *J Infect Dis* **179**(4): 859-870.
- Giorgi, J. V., Z. Liu, et al. (1993). "Elevated levels of CD38+ CD8+ T cells in HIV infection add to the prognostic value of low CD4+ T cell levels: results of 6 years of follow-up. The Los Angeles Center, Multicenter AIDS Cohort Study." *J Acquir Immune Defic Syndr* **6**(8): 904-912.

- Gonzalez-Scarano, F. and J. Martin-Garcia (2005). "The neuropathogenesis of AIDS." Nat Rev Immunol **5**(1): 69-81.
- Goonetilleke, N., M. K. Liu, et al. (2009). "The first T cell response to transmitted/founder virus contributes to the control of acute viremia in HIV-1 infection." J Exp Med **206**(6): 1253-1272.
- Gottlieb, G. S., S. P. Eholie, et al. (2008). "A call for randomized controlled trials of antiretroviral therapy for HIV-2 infection in West Africa." AIDS **22**(16): 2069-2072; discussion 2073-2064.
- Granich, R. M., C. F. Gilks, et al. (2009). "Universal voluntary HIV testing with immediate antiretroviral therapy as a strategy for elimination of HIV transmission: a mathematical model." Lancet **373**(9657): 48-57.
- Grinsztejn, B., B. Y. Nguyen, et al. (2007). "Safety and efficacy of the HIV-1 integrase inhibitor raltegravir (MK-0518) in treatment-experienced patients with multidrug-resistant virus: a phase II randomised controlled trial." Lancet **369**(9569): 1261-1269.
- Grossman, Z., V. Istomin, et al. (2004). "Genetic variation at NNRTI resistance-associated positions in patients infected with HIV-1 subtype C." AIDS **18**(6): 909-915.
- Gupta, R. K., M. R. Jordan, et al. (2012). "Global trends in antiretroviral resistance in treatment-naïve individuals with HIV after rollout of antiretroviral treatment in resource-limited settings: a global collaborative study and meta-regression analysis." Lancet.
- Gupta, R. K., M. R. Jordan, et al. (2012). "Global trends in antiretroviral resistance in treatment-naïve individuals with HIV after rollout of antiretroviral treatment in resource-limited settings: a global collaborative study and meta-regression analysis." Lancet **380**(9849): 1250-1258.
- Guyader, M., M. Emerman, et al. (1987). "Genome organization and transactivation of the human immunodeficiency virus type 2." Nature **326**(6114): 662-669.
- Hahn, B. H., G. M. Shaw, et al. (2000). "AIDS as a zoonosis: scientific and public health implications." Science **287**(5453): 607-614.
- Hammer, S. M., F. Vaida, et al. (2002). "Dual vs single protease inhibitor therapy following antiretroviral treatment failure: a randomized trial." JAMA **288**(2): 169-180.
- Hanson, S., A. Thorson, et al. (2009). "Estimating the capacity for ART provision in Tanzania with the use of data on staff productivity and patient losses." PLoS ONE **4**(4): e5294.
- Harris, M., R. Joy, et al. (2006). "Enfuvirtide plasma levels and injection site reactions using a needle-free gas-powered injection system (Biojector)." AIDS **20**(5): 719-723.
- Hassan, A. S., K. L. Fielding, et al. (2012). "Early loss to follow-up of recently diagnosed HIV-infected adults from routine pre-ART care in a rural district hospital in Kenya: a cohort study." Trop Med Int Health **17**(1): 82-93.
- Havlir, D., S. H. Cheeseman, et al. (1995). "High-dose nevirapine: safety, pharmacokinetics, and antiviral effect in patients with human immunodeficiency virus infection." J Infect Dis **171**(3): 537-545.
- Hayden, E. C. (2012). "Cuts hamper bid to tackle AIDS." Nature **483**(7388): 131-132.
- Hazenbergh, M. D., S. A. Otto, et al. (2003). "Persistent immune activation in HIV-1 infection is associated with progression to AIDS." AIDS **17**(13): 1881-1888.
- Hemelaar, J. (2012). "The origin and diversity of the HIV-1 pandemic." Trends Mol Med **18**(3): 182-192.
- Hogg, R. (2008). "Life expectancy of individuals on combination antiretroviral therapy in high-income countries: a collaborative analysis of 14 cohort studies." Lancet **372**(9635): 293-299.
- Holmes, C. B., W. Coggin, et al. (2010). "Use of generic antiretroviral agents and cost savings in PEPFAR treatment programs." JAMA **304**(3): 313-320.

- Humphreys, E. H., L. B. Hernandez, et al. (2007). "Antiretroviral regimens for patients with HIV who fail first-line antiretroviral therapy." Cochrane Database Syst Rev(4): CD006517.
- Hunt, P. W., J. N. Martin, et al. (2003). "T cell activation is associated with lower CD4+ T cell gains in human immunodeficiency virus-infected patients with sustained viral suppression during antiretroviral therapy." J Infect Dis **187**(10): 1534-1543.
- Jaka HM, M. S., Liwa AC, Peck RN, Kalluvya S (2009). "Prevalence of Immunologic Failure and Durability of First Line Antiretroviral Therapy at Bugando Hospital in Mwanza, Tanzania." Tanzanian Medical Journal **24**:2: 4-8.
- Jiang, W., M. M. Lederman, et al. (2009). "Plasma Levels of Bacterial DNA Correlate with Immune Activation and the Magnitude of Immune Restoration in Persons with Antiretroviral-Treated HIV Infection." J Infect Dis.
- Johnson, J. A., J. F. Li, et al. (2005). "Emergence of drug-resistant HIV-1 after intrapartum administration of single-dose nevirapine is substantially underestimated." J Infect Dis **192**(1): 16-23.
- Kahn, J. O. and B. D. Walker (1998). "Acute human immunodeficiency virus type 1 infection." N Engl J Med **339**(1): 33-39.
- Kaiser, N., Ed. (1997). Cortisontherapie. Stuttgart, New York, Georg Thieme Verlag.
- Kaleebu, P., N. French, et al. (2002). "Effect of human immunodeficiency virus (HIV) type 1 envelope subtypes A and D on disease progression in a large cohort of HIV-1-positive persons in Uganda." J Infect Dis **185**(9): 1244-1250.
- Kanki, P. J., D. J. Hamel, et al. (1999). "Human immunodeficiency virus type 1 subtypes differ in disease progression." J Infect Dis **179**(1): 68-73.
- Kantor, R., L. Diero, et al. (2009). "Misclassification of first-line antiretroviral treatment failure based on immunological monitoring of HIV infection in resource-limited settings." Clin Infect Dis **49**(3): 454-462.
- Kantor, R. and D. Katzenstein (2003). "Polymorphism in HIV-1 non-subtype B protease and reverse transcriptase and its potential impact on drug susceptibility and drug resistance evolution." AIDS Rev **5**(1): 25-35.
- Kasang, C. and S. Kalluvya (2013). "Low-dose Prednisolone Increases CD4+ T Cell Counts and Reduces Occurrence of AIDS-Defining Conditions in HIV Patients in Africa." New England Journal of Medicine, submitted march 2013.
- Kasang, C., S. Kalluvya, et al. (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**(8): e23091.
- Kasang, C., A. Ulmer, et al. (2012). "HIV patients treated with low-dose prednisolone exhibit lower immune activation than untreated patients." BMC Infect Dis **12**: 14.
- Kaufmann, G. R., L. Elzi, et al. (2011). "Interruptions of cART limits CD4 T-cell recovery and increases the risk for opportunistic complications and death." AIDS **25**(4): 441-451.
- Keele, B. F., E. E. Giorgi, et al. (2008). "Identification and characterization of transmitted and early founder virus envelopes in primary HIV-1 infection." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(21): 7552-7557.
- Kempf, D. J., K. C. Marsh, et al. (1997). "Pharmacokinetic enhancement of inhibitors of the human immunodeficiency virus protease by coadministration with ritonavir." Antimicrob Agents Chemother **41**(3): 654-660.
- Kitahata, M. M., S. J. Gange, et al. (2009). "Effect of early versus deferred antiretroviral therapy for HIV on survival." N Engl J Med **360**(18): 1815-1826.
- Kitchens, R. L. and P. A. Thompson (2005). "Modulatory effects of sCD14 and LBP on LPS-host cell interactions." J Endotoxin Res **11**(4): 225-229.

- Kiwanuka, N., O. Laeyendecker, et al. (2008). "Effect of human immunodeficiency virus Type 1 (HIV-1) subtype on disease progression in persons from Rakai, Uganda, with incident HIV-1 infection." *J Infect Dis* **197**(5): 707-713.
- Klatt, N. R., N. T. Funderburg, et al. (2013). "Microbial translocation, immune activation, and HIV disease." *Trends Microbiol* **21**(1): 6-13.
- Klatzmann, D., E. Champagne, et al. (1984). "T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV." *Nature* **312**(5996): 767-768.
- Kohl, N. E., E. A. Emini, et al. (1988). "Active human immunodeficiency virus protease is required for viral infectivity." *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**(13): 4686-4690.
- Korber, B., B. Gaschen, et al. (2001). "Evolutionary and immunological implications of contemporary HIV-1 variation." *Br Med Bull* **58**: 19-42.
- Korber, B., M. Muldoon, et al. (2000). "Timing the ancestor of the HIV-1 pandemic strains." *Science* **288**(5472): 1789-1796.
- Kostense, S., G. S. Ogg, et al. (2001). "High viral burden in the presence of major HIV-specific CD8(+) T cell expansions: evidence for impaired CTL effector function." *Eur J Immunol* **31**(3): 677-686.
- Koulinska, I. N., T. Ndung'u, et al. (2001). "A new human immunodeficiency virus type 1 circulating recombinant form from Tanzania." *AIDS Res Hum Retroviruses* **17**(5): 423-431.
- Koup, R. A., J. T. Safrit, et al. (1994). "Temporal association of cellular immune responses with the initial control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 syndrome." *J Virol* **68**(7): 4650-4655.
- Kovacs, J. A., M. Baseler, et al. (1995). "Increases in CD4 T lymphocytes with intermittent courses of interleukin-2 in patients with human immunodeficiency virus infection. A preliminary study." *N Engl J Med* **332**(9): 567-575.
- Kovacs, J. A., S. Vogel, et al. (1996). "Controlled trial of interleukin-2 infusions in patients infected with the human immunodeficiency virus." *N Engl J Med* **335**(18): 1350-1356.
- Kuiken C, F. B., Leitner T, Apetrei C, Hahn B, Mizrahi I, Mullins J, Rambaut A, Wolinsky S, and Korber B, Eds. (2010). HIV Sequence Compendium - Los Alamos Database. <http://www.hiv.lanl.gov/>, abgerufen am 13.12.2012.
- Published by Theoretical Biology and Biophysics Group, Los Alamos National Laboratory, NM, LA-UR 10-03684.
- Lalezari, J. P., J. J. Eron, et al. (2003). "A phase II clinical study of the long-term safety and antiviral activity of enfuvirtide-based antiretroviral therapy." *AIDS* **17**(5): 691-698.
- Lambotte, O., F. Boufassa, et al. (2005). "HIV controllers: a homogeneous group of HIV-1-infected patients with spontaneous control of viral replication." *Clin Infect Dis* **41**(7): 1053-1056.
- Lange, J. M. (1997). "Current problems and the future of antiretroviral drug trials." *Science* **276**(5312): 548-550.
- Langmann, P., W. Heinz, et al. (2008). "High performance liquid chromatographic method for the determination of HIV-1 protease inhibitor tipranavir in plasma of patients during highly active antiretroviral therapy." *Eur J Med Res* **13**(2): 52-58.
- Langmann, P., B. Weissbrich, et al. (2002). "Efavirenz plasma levels for the prediction of treatment failure in heavily pretreated HIV-1 infected patients." *Eur J Med Res* **7**(7): 309-314.
- Larkin, M. A., G. Blackshields, et al. (2007). "Clustal W and Clustal X version 2.0." *Bioinformatics* **23**(21): 2947-2948.
- Lawn, S. D., M. O. Labeta, et al. (2000). "Elevated serum concentrations of soluble CD14 in HIV- and HIV+ patients with tuberculosis in Africa: prolonged elevation during anti-tuberculosis treatment." *Clin Exp Immunol* **120**(3): 483-487.

- Levy, Y., C. Capitant, et al. (1999). "Comparison of subcutaneous and intravenous interleukin-2 in asymptomatic HIV-1 infection: a randomised controlled trial. ANRS 048 study group." Lancet **353**(9168): 1923-1929.
- Levy, Y., C. Durier, et al. (2003). "Effects of interleukin-2 therapy combined with highly active antiretroviral therapy on immune restoration in HIV-1 infection: a randomized controlled trial." AIDS **17**(3): 343-351.
- Lifson, J. D., G. R. Reyes, et al. (1986). "AIDS retrovirus induced cytopathology: giant cell formation and involvement of CD4 antigen." Science **232**(4754): 1123-1127.
- Losso, M. H., W. H. Belloso, et al. (2000). "A randomized, controlled, phase II trial comparing escalating doses of subcutaneous interleukin-2 plus antiretrovirals versus antiretrovirals alone in human immunodeficiency virus-infected patients with CD4+ cell counts $\geq 350/\text{mm}^3$." J Infect Dis **181**(5): 1614-1621.
- Lozano, J. M., O. De la Rosa, et al. (2007). "Impaired response of HIV type 1-specific CD8(+) cells from antiretroviral-treated patients." AIDS Res Hum Retroviruses **23**(10): 1279-1282.
- Lu, W., R. Salerno-Goncalves, et al. (1995). "Glucocorticoids rescue CD4+ T lymphocytes from activation-induced apoptosis triggered by HIV-1: implications for pathogenesis and therapy." AIDS **9**(1): 35-42.
- Mallal, S. A., M. John, et al. (2000). "Contribution of nucleoside analogue reverse transcriptase inhibitors to subcutaneous fat wasting in patients with HIV infection." AIDS **14**(10): 1309-1316.
- Marchetti, G., F. Franzetti, et al. (2005). "Partial immune reconstitution following highly active antiretroviral therapy: can adjuvant interleukin-2 fill the gap?" J Antimicrob Chemother **55**(4): 401-409.
- Markowitz, M., J. O. Morales-Ramirez, et al. (2006). "Antiretroviral activity, pharmacokinetics, and tolerability of MK-0518, a novel inhibitor of HIV-1 integrase, dosed as monotherapy for 10 days in treatment-naive HIV-1-infected individuals." J Acquir Immune Defic Syndr **43**(5): 509-515.
- Marlink, R., P. Kanki, et al. (1994). "Reduced rate of disease development after HIV-2 infection as compared to HIV-1." Science **265**(5178): 1587-1590.
- Martinson, N. A., C. J. Hoffmann, et al. (2011). "Epidemiology of tuberculosis and HIV: recent advances in understanding and responses." Proc Am Thorac Soc **8**(3): 288-293.
- Marum, E., M. Taegtmeier, et al. (2012). "What took you so long?" The impact of PEPFAR on the expansion of HIV testing and counseling services in Africa." J Acquir Immune Defic Syndr **60** Suppl 3: S63-69.
- Massanella, M., E. Negredo, et al. (2010). "CD4 T-cell hyperactivation and susceptibility to cell death determine poor CD4 T-cell recovery during suppressive HAART." AIDS **24**(7): 959-968.
- McComsey, G. A., C. C. Whalen, et al. (2001). "Placebo-controlled trial of prednisone in advanced HIV-1 infection." AIDS **15**(3): 321-327.
- Mehandru, S., M. A. Poles, et al. (2004). "Primary HIV-1 infection is associated with preferential depletion of CD4+ T lymphocytes from effector sites in the gastrointestinal tract." J Exp Med **200**(6): 761-770.
- Mehandru, S., K. Tenner-Racz, et al. (2005). "The gastrointestinal tract is critical to the pathogenesis of acute HIV-1 infection." J Allergy Clin Immunol **116**(2): 419-422.
- Meisner, F., E. Neuen-Jacob, et al. (2008). "Disruption of excitatory amino acid transporters in brains of SIV-infected rhesus macaques is associated with microglia activation." J Neurochem **104**(1): 202-209.
- Meloni, S. T., B. Kim, et al. (2004). "Distinct human immunodeficiency virus type 1 subtype A virus circulating in West Africa: sub-subtype A3." J Virol **78**(22): 12438-12445.

- Menu, E., T. X. Truong, et al. (1996). "HIV type 1 Thai subtype E is predominant in South Vietnam." *AIDS Res Hum Retroviruses* **12**(7): 629-633.
- Merry, C., M. G. Barry, et al. (1998). "The pharmacokinetics of combination therapy with nelfinavir plus nevirapine." *AIDS* **12**(10): 1163-1167.
- Migueles, S. A., M. S. Sabbaghian, et al. (2000). "HLA B*5701 is highly associated with restriction of virus replication in a subgroup of HIV-infected long term nonprogressors." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(6): 2709-2714.
- Mohri, H., A. S. Perelson, et al. (2001). "Increased turnover of T lymphocytes in HIV-1 infection and its reduction by antiretroviral therapy." *J Exp Med* **194**(9): 1277-1287.
- Montefiori, D. C., G. Pantaleo, et al. (1996). "Neutralizing and infection-enhancing antibody responses to human immunodeficiency virus type 1 in long-term nonprogressors." *J Infect Dis* **173**(1): 60-67.
- Motomura, K., S. Kusagawa, et al. (2000). "Emergence of new forms of human immunodeficiency virus type 1 intersubtype recombinants in central Myanmar." *AIDS Res Hum Retroviruses* **16**(17): 1831-1843.
- Mullis, K., F. Faloona, et al. (1986). "Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction." *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **51 Pt 1**: 263-273.
- Mullis, K. B. and F. A. Faloona (1987). "Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction." *Methods Enzymol* **155**: 335-350.
- Murray, M. C., J. E. Embree, et al. (2000). "Effect of human immunodeficiency virus (HIV) type 1 viral genotype on mother-to-child transmission of HIV-1." *J Infect Dis* **181**(2): 746-749.
- NACP, (2008). National Guidelines for the management of HIV and AIDS, Government of Tanzania. <http://www.nacp.go.tz/publications/care-and-treatment>, abgerufen 24.10.2012.
- NACP, (2012). National guidelines for the management of HIV and AIDS. Dar es Salaam, Government of Tanzania Ministry of health, <http://www.nacp.go.tz/publications/care-and-treatment>, abgerufen 24.10.2012.
- Nagata, S. and P. Golstein (1995). "The Fas death factor." *Science* **267**(5203): 1449-1456.
- Ndembi, N., F. Lyagoba, et al. (2008). "Transmitted antiretroviral drug resistance surveillance among newly HIV type 1-diagnosed women attending an antenatal clinic in Entebbe, Uganda." *AIDS Res Hum Retroviruses* **24**(6): 889-895.
- Nelson, K. E., C. Costello, et al. (2007). "Survival of blood donors and their spouses with HIV-1 subtype E (CRF01_A_E) infection in northern Thailand, 1992-2007." *AIDS* **21 Suppl 6**: S47-54.
- Nelson, M., K. Arasteh, et al. (2005). "Durable efficacy of enfuvirtide over 48 weeks in heavily treatment-experienced HIV-1-infected patients in the T-20 versus optimized background regimen only 1 and 2 clinical trials." *J Acquir Immune Defic Syndr* **40**(4): 404-412.
- Nyombi, B. M., C. Holm-Hansen, et al. (2008). "Prevalence of reverse transcriptase and protease mutations associated with antiretroviral drug resistance among drug-naive HIV-1 infected pregnant women in Kagera and Kilimanjaro regions, Tanzania." *AIDS Res Ther* **5**: 13.
- Nyombi, B. M., K. I. Kristiansen, et al. (2008). "Diversity of human immunodeficiency virus type 1 subtypes in Kagera and Kilimanjaro regions, Tanzania." *AIDS Res Hum Retroviruses* **24**(6): 761-769.
- Ostrowski, M. A., T. W. Chun, et al. (1999). "Both memory and CD45RA+/CD62L+ naive CD4(+) T cells are infected in human immunodeficiency virus type 1-infected individuals." *J Virol* **73**(8): 6430-6435.

- Ostrowski, S. R., T. L. Katzenstein, et al. (2005). "Low-level viremia and proviral DNA impede immune reconstitution in HIV-1-infected patients receiving highly active antiretroviral therapy." *J Infect Dis* **191**(3): 348-357.
- Palella, F. J., Jr., M. Deloria-Knoll, et al. (2003). "Survival benefit of initiating antiretroviral therapy in HIV-infected persons in different CD4+ cell strata." *Ann Intern Med* **138**(8): 620-626.
- Perno, C. F., A. Cozzi-Lepri, et al. (2004). "Minor mutations in HIV protease at baseline and appearance of primary mutation 90M in patients for whom their first protease-inhibitor antiretroviral regimens failed." *J Infect Dis* **189**(11): 1983-1987.
- Piconi, S., D. Trabattoni, et al. (2010). "Immune activation, apoptosis, and Treg activity are associated with persistently reduced CD4+ T-cell counts during antiretroviral therapy." *AIDS* **24**(13): 1991-2000.
- Pinkerton, S. D. (2012). "HIV transmission rate modeling: a primer, review, and extension." *AIDS Behav* **16**(4): 791-796.
- Piyasirisilp, S., F. E. McCutchan, et al. (2000). "A recent outbreak of human immunodeficiency virus type 1 infection in southern China was initiated by two highly homogeneous, geographically separated strains, circulating recombinant form AE and a novel BC recombinant." *J Virol* **74**(23): 11286-11295.
- Plantier, J. C., R. Dachraoui, et al. (2005). "HIV-1 resistance genotyping on dried serum spots." *AIDS* **19**(4): 391-397.
- Plantier, J. C., M. Leoz, et al. (2009). "A new human immunodeficiency virus derived from gorillas." *Nat Med* **15**(8): 871-872.
- Porichis, F. and D. E. Kaufmann (2012). "Role of PD-1 in HIV pathogenesis and as target for therapy." *Curr HIV/AIDS Rep* **9**(1): 81-90.
- Pretorius, E., H. Klinker, et al. (2011). "The role of therapeutic drug monitoring in the management of patients with human immunodeficiency virus infection." *Ther Drug Monit* **33**(3): 265-274.
- Quinn, T. C., M. J. Wawer, et al. (2000). "Viral load and heterosexual transmission of human immunodeficiency virus type 1. Rakai Project Study Group." *N Engl J Med* **342**(13): 921-929.
- Rabna, P., A. Andersen, et al. (2012). "Utility of the plasma level of suPAR in monitoring risk of mortality during TB treatment." *PLoS ONE* **7**(8): e43933.
- Renjifo, B., P. Gilbert, et al. (2004). "Preferential in-utero transmission of HIV-1 subtype C as compared to HIV-1 subtype A or D." *AIDS* **18**(12): 1629-1636.
- Rhodes, D. I., L. Ashton, et al. (2000). "Characterization of three nef-defective human immunodeficiency virus type 1 strains associated with long-term nonprogression. Australian Long-Term Nonprogressor Study Group." *J Virol* **74**(22): 10581-10588.
- Ribaldo, H. J., D. W. Haas, et al. (2006). "Pharmacogenetics of plasma efavirenz exposure after treatment discontinuation: an Adult AIDS Clinical Trials Group Study." *Clin Infect Dis* **42**(3): 401-407.
- Roques, P., D. L. Robertson, et al. (2004). "Phylogenetic characteristics of three new HIV-1 N strains and implications for the origin of group N." *AIDS* **18**(10): 1371-1381.
- Roy, S. and M. A. Wainberg (1988). "Role of the mononuclear phagocyte system in the development of acquired immunodeficiency syndrome (AIDS)." *J Leukoc Biol* **43**(1): 91-97.
- Ruxrungtham, K., S. Suwanagool, et al. (2000). "A randomized, controlled 24-week study of intermittent subcutaneous interleukin-2 in HIV-1 infected patients in Thailand." *AIDS* **14**(16): 2509-2513.
- Ryan, L. A., J. Zheng, et al. (2001). "Plasma levels of soluble CD14 and tumor necrosis factor-alpha type II receptor correlate with cognitive dysfunction during human immunodeficiency virus type 1 infection." *J Infect Dis* **184**(6): 699-706.

- Sabeti, P. C., E. Walsh, et al. (2005). "The case for selection at CCR5-Delta32." *PLoS Biol* **3**(11): e378.
- Sachsenberg, N., A. S. Perelson, et al. (1998). "Turnover of CD4+ and CD8+ T lymphocytes in HIV-1 infection as measured by Ki-67 antigen." *J Exp Med* **187**(8): 1295-1303.
- Sanger, F., S. Nicklen, et al. (1977). "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors." *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**(12): 5463-5467.
- Santiago, M. L., F. Range, et al. (2005). "Simian immunodeficiency virus infection in free-ranging sooty mangabeys (*Cercocebus atys atys*) from the Tai Forest, Cote d'Ivoire: implications for the origin of epidemic human immunodeficiency virus type 2." *J Virol* **79**(19): 12515-12527.
- Sethi, A. K., D. D. Celentano, et al. (2003). "Association between adherence to antiretroviral therapy and human immunodeficiency virus drug resistance." *Clin Infect Dis* **37**(8): 1112-1118.
- Shafer, R. W., J. A. Eisen, et al. (1997). "Sequence and drug susceptibility of subtype C reverse transcriptase from human immunodeficiency virus type 1 seroconverters in Zimbabwe." *J Virol* **71**(7): 5441-5448.
- Silvestri, G., D. L. Sodora, et al. (2003). "Nonpathogenic SIV infection of sooty mangabeys is characterized by limited bystander immunopathology despite chronic high-level viremia." *Immunity* **18**(3): 441-452.
- Simon, V., D. D. Ho, et al. (2006). "HIV/AIDS epidemiology, pathogenesis, prevention, and treatment." *Lancet* **368**(9534): 489-504.
- Sodroski, J., W. C. Goh, et al. (1986). "Replicative and cytopathic potential of HTLV-III/LAV with sor gene deletions." *Science* **231**(4745): 1549-1553.
- Somi, G., M. Matee, et al. (2009). "Three years of HIV/AIDS care and treatment services in Tanzania: achievements and challenges." *Tanzan J Health Res* **11**(3): 136-143.
- Sonigo, P., M. Alizon, et al. (1985). "Nucleotide sequence of the visna lentivirus: relationship to the AIDS virus." *Cell* **42**(1): 369-382.
- Sousa, A. E., J. Carneiro, et al. (2002). "CD4 T cell depletion is linked directly to immune activation in the pathogenesis of HIV-1 and HIV-2 but only indirectly to the viral load." *J Immunol* **169**(6): 3400-3406.
- Steigbigel, R. T., D. A. Cooper, et al. (2010). "Long-term efficacy and safety of Raltegravir combined with optimized background therapy in treatment-experienced patients with drug-resistant HIV infection: week 96 results of the BENCHMRK 1 and 2 Phase III trials." *Clin Infect Dis* **50**(4): 605-612.
- Sterne, J. A., M. May, et al. (2009). "Timing of initiation of antiretroviral therapy in AIDS-free HIV-1-infected patients: a collaborative analysis of 18 HIV cohort studies." *Lancet* **373**(9672): 1352-1363.
- TACAIDS (2008). Annual report 2007. Dar es Salaam, Tanzania commission for AIDS, <http://www.tacaids.go.tz/reports/local-reports.html>, abgerufen 13.10.2012.
- TACAIDS (2009) "The History, Trends of Prevalence, and Efforts Towards Prevention and Control of HIV and AIDS in the last 25 Years in Tanzania Mainland from 1983-2009 September Prepared by Tanzania Commission for AIDS," <http://www.tacaids.go.tz>, abgerufen 13.10.2012
- TACAIDS (2012). Country Progress reporting. Part A Tanzania Mainland. Dar es Salaam, TACAIDS, <http://www.tacaids.go.tz>, abgerufen 13.10.2012.
- Tamura, K., J. Dudley, et al. (2007). "MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0." *Mol Biol Evol* **24**(8): 1596-1599.
- Tapia, N., S. Franco, et al. (2003). "Influence of human immunodeficiency virus type 1 subtype on mother-to-child transmission." *J Gen Virol* **84**(Pt 3): 607-613.
- Taylor, B. S. and S. M. Hammer (2008). "The challenge of HIV-1 subtype diversity." *N Engl J Med* **359**(18): 1965-1966.

- Thuno, M., B. Macho, et al. (2009). "suPAR: the molecular crystal ball." *Dis Markers* **27**(3): 157-172.
- Trkola, A., H. Kuster, et al. (2005). "Delay of HIV-1 rebound after cessation of antiretroviral therapy through passive transfer of human neutralizing antibodies." *Nat Med* **11**(6): 615-622.
- Trouiller, P., P. Olliaro, et al. (2002). "Drug development for neglected diseases: a deficient market and a public-health policy failure." *Lancet* **359**(9324): 2188-2194.
- Tuaille, E., M. Gueudin, et al. (2004). "Phenotypic susceptibility to nonnucleoside inhibitors of virion-associated reverse transcriptase from different HIV types and groups." *J Acquir Immune Defic Syndr* **37**(5): 1543-1549.
- Ulmer, A., M. Muller, et al. (2005). "Low-dose prednisolone has a CD4-stabilizing effect in pre-treated HIV-patients during structured therapy interruptions (STI)." *Eur J Med Res* **10**(6): 227-232.
- Ulmer, A., M. Muller, et al. (2005). "Low dose prednisolone reduces CD4+ T cell loss in therapy-naïve HIV-patients without antiretroviral therapy." *Eur J Med Res* **10**(3): 105-109.
- UN (2000) "United Nations Millennium Declaration Resolution 55/2," <http://www.un.org/millennium/declaration/ares552e.htm>, abgerufen 05.02.2013.
- UN (2010) "The Millennium Development Goal Report," <http://www.un.org/millenniumgoals/pdf/MDG%20Report%202010%20En%20r15%200-low%20res%2020100615%20-.pdf>, abgerufen 04.02.2013.
- UNAIDS (2004). REPORT ON THE GLOBAL AIDS EPIDEMIC | 2004. http://un.org.np/sites/default/files/report/tid_107/Global_Report_2004.pdf, abgerufen 14.10.2012.
- UNAIDS (2010). UNAIDS REPORT ON THE GLOBAL AIDS EPIDEMIC | 2010. http://www.unaids.org/globalreport/global_report.htm, abgerufen 04.02.2013.
- UNAIDS (2012). "UNAIDS Report on the global AIDS epidemic," http://www.unaids.org/en/media/unaids/contentassets/documents/epidemiology/2012/gr2012/20121120_UNAIDS_Global_Report_2012_en.pdf, abgerufen 04.02.2013.
- Vallari, A., V. Holzmayer, et al. (2011). "Confirmation of putative HIV-1 group P in Cameroon." *J Virol* **85**(3): 1403-1407.
- van Everdingen, A. A., J. W. Jacobs, et al. (2002). "Low-dose prednisone therapy for patients with early active rheumatoid arthritis: clinical efficacy, disease-modifying properties, and side effects: a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial." *Ann Intern Med* **136**(1): 1-12.
- van Sighem, A. I., L. A. Gras, et al. (2010). "Life expectancy of recently diagnosed asymptomatic HIV-infected patients approaches that of uninfected individuals." *AIDS* **24**(10): 1527-1535.
- Vogel, M., C. Schwarze-Zander, et al. (2010). "The treatment of patients with HIV." *Dtsch Arztebl Int* **107**(28-29): 507-515; quiz 516.
- Wallis, R. S., R. Kalayjian, et al. (2003). "A study of the immunology, virology, and safety of prednisone in HIV-1-infected subjects with CD4 cell counts of 200 to 700 mm⁻³." *J Acquir Immune Defic Syndr* **32**(3): 281-286.
- Waters, L. and C. A. Sabin (2011). "Late HIV presentation: epidemiology, clinical implications and management." *Expert Rev Anti Infect Ther* **9**(10): 877-889.
- Weissman, D., T. D. Barker, et al. (1996). "The efficiency of acute infection of CD4+ T cells is markedly enhanced in the setting of antigen-specific immune activation." *J Exp Med* **183**(2): 687-692.
- WHO (2006). "Patient monitoring Guidelines for HIV Care and Antiretroviral therapy," <http://www.who.int/3by5/capacity/ptmonguidelinesfinalv1.PDFGenf>, abgerufen am 21.10.2012.

- WHO (2007). "Case Definitions of HIV for Surveillance and Revised Clinical Staging and Immunological Classification of HIV-Related Disease in Adults and Children," <http://www.who.int/hiv/pub/guidelines/HIVstaging150307.pdf>, abgerufen am 21.10.2012.
- WHO (2008). "Task shifting. Global recommendations and guidelines. Genf Switzerland, WHO," <http://www.hciproject.org/communities/chw-central/resources/task-shifting-global-recommendations-and-guidelines>, abgerufen am 19.10.2012.
- WHO (2009). "Global tuberculosis control: epidemiology, strategy, financing", http://www.who.int/tb/publications/global_report/2009/en/, abgerufen am 29.09.2012.
- WHO (2010). Global Health Observatory Data Repository, Database, <http://apps.who.int/gho/data/node.main.618>, abgerufen 10.10.2012.
- WHO, (2010). "Antiretroviral therapy for HIV infection in adults and adolescents - Recommendations for a public health approach 2010 revision," http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241599764_eng.pdf, abgerufen 12.02.2013.
- WHO (2012). "WHO global strategy for the surveillance and monitoring of HIV drug resistance 2012," http://www.who.int/hiv/pub/drugresistance/drug_resistance_strategy/en/index.html Geneva, WHO, abgerufen 24.10.2012.
- Zack, J. A., S. J. Arrigo, et al. (1990). "HIV-1 entry into quiescent primary lymphocytes: molecular analysis reveals a labile, latent viral structure." *Cell* **61**(2): 213-222.
- Zeh, C., P. N. Amornkul, et al. (2011). "Population-based biochemistry, immunologic and hematological reference values for adolescents and young adults in a rural population in Western Kenya." *PLoS ONE* **6**(6): e21040.
- Zhang, M., B. Foley, et al. (2010). "The role of recombination in the emergence of a complex and dynamic HIV epidemic." *Retrovirology* **7**: 25.

10 Abkürzungsverzeichnis

3TC	Lamivudin
Abb.	Abbildung
ABC	abstain, be careful and use condoms
ABC	Abacavir
AIDS	Acquired immunodeficiency syndrome
APC	Allophycocyanin
ART	Antiretrovirale Therapie
ARV	Antiretrovirale Substanzen
AZT	Zidovudin
BD	Becton Dickinson
BMC	Bugando Medical Centre
BSA	Bovines Serumalbumin
CCR5	Chemokine Rezeptor Typ 5
CD	Cluster of differentiation
CDC	U.S. Center for Disease Control and Prevention
cDNA	komplementäre DNA
CPT	Cell Preparation Tube
CRF	Circulating recombinant form
CTC	Care and Treatment Center
CUHAS	Catholic University of Health and Allied Sciences
CXCR4	Chemokine Rezeptor Typ 4
d4T	Stavudine
ddI	Didanosine
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DSI	delaying sexual initiation
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EFV	Efavirenz
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
Env	Hüllproteine
et al.	und andere

FACS	fluorescent activated cell scanning
FCS	fetal calf serum
FITC	Fluoreszein-Isothiocyanat
FM	FACS-Färbungsmedium
FSC	forward scatter
g	Gramm
Gag	viralen Strukturproteine
GCP	Good Clinical Practice
gp	Glykoprotein
h	Stunde(n)
HAART	Hoch aktive antiretrovirale Therapie
HAART/PRED	Hoch aktive antiretrovirale Therapie / Prednisolon
HIV	Humane Immundefizienz-Virus
HIVDR	HIV Medikamenten-Resistenzen
HLA	Humane Leukozytenantigen
HLADR	Humane Leukozytenantigen DR
HPLC	Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie
INI	Integrase Inhibitoren
ITT	Intent to Treat
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
Kit	Reaktionskomplettausstattungen
l	Liter
LBP	LPS-Bindeprotein
LPS	Lipopolysaccharid
LPV/r	Liponavir/Ritonavir
Lsg.	Lösung
LTNR	Long-Term Non-Progressors
LTR	long terminal repeat, lange terminale repetitorische Sequenzen
MHC	Major Histocompatibility Complex, Haupthistokompatibilitätskomplex
mg	Milligramm
min	Minute(n)
mio.	Millionen
ml	Milliliter

M-trop	monozytotropen
MTP I	Medium Term Plan 1
NACP	National AIDS Control Program
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NNRTI	Nicht-nukleosidische Reverse Transkriptaseinhibitoren
NRTI	Nukleos(t)idische Reverse-Transkriptase-Inhibitoren (s)
NVP	Nevirapin
OD	optische Dichte
ORF	open reading frames, offene Leseraster
p	Protein
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cells
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PD-1	programmed death-1
PE	Phycoerythrin
PEPFAR	US President´s Emergency Plan for AIDS Relief
PerCP	peridinin chlorophyll protein
pg	Picogramm
PI	Protease-Inhibitoren
PMTCT	preventing mother to child transmission
Pol	virusspezifische Enzyme
PR	Protease
PRED	Prednisolon
ProCort	Progression of HIV-Disease under Low Dose Corticosteroids
PRSP	Poverty reduction strategy paper
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute
RPMI	Besonderes Zellkulturmedium
RT	Reverse Transkriptase
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion
sec.	Sekunde(n)
SIV	Simian Immunodeficiency Viren

SSC	Seitwärtsstreulicht
suPAR	soluble urokinase-type plasminogen activator receptor
SQV/r	Saquinavir/Ritonavir
TACAIDS	tansanische AIDS Kommission
Taq	thermus aquaticus
TDM	therapeutisches Drug Monitoring
TFDA	Tanzanian Food and Drug administration
TLR	Toll-Like Rezeptor
Treg	regulatorischen CD4+ T-Lymphozyten
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
T-trop	T-Zell-trop
UV	Ultraviolett
V	Visite
VCT	voluntary counselling and testing
WHO	Weltgesundheitsorganisation
z.B	zum Beispiel
ZNS	zentrale Nervensystem
µg	Microgramm
µl	Mikroliter

Publikationsliste Christa Kasang
Geb 24.11.1967:

Graff, J., Kasang, C., Normann, A., Pfisterer-Hunt, M., Feinstone, S. M. & Flehmig, B. 1994b. Mutational events in consecutive passages of hepatitis A virus strain GBM during cell culture adaptation. *Virology* 204, 60–68.

Kasang, C., Kalluvya, S., Majinge, C., Kongola, G., Stich, A., Scheller, C., Bodem, J., Weissbrich, B., 2009.
High prevalence of drug resistance mutations in HIV-1 infected patients in Mwanza, Lake Victoria region, Tanzania. Abstract EACS Conference Cologne November 2009

Kasang C., Kalluvya S., Majinge C., Stich A., Bodem J., Kongola G., Jacobs G. B., Mlewa M., Mildner M., Hensel I., Horn A., Preiser W., van Zyl G., Klinker H., Koutsilieri E., Rethwilm A., Scheller C., Weissbrich B., 2011. HIV drug resistance (HIVDR) in antiretroviral therapy-naive patients in Tanzania not eligible for WHO threshold HIVDR survey is dramatically high. *PLoS ONE* 6(8): e23091.

Kasang, C. and S. Kalluvya et al (2013). "Low-dose Prednisolone Increases CD4+ T Cell Counts and Reduces Occurrence of AIDS-Defining Conditions in HIV Patients in Africa." [New England Journal of Medicine](#), submitted march 2013.

Kalluvya S., Kasang C., Balasiu A., Stich A., Majinge C., Rethwilm A., Klinker H., Weissbrich B., 2011. Hepatitis B and C Co-infections in Tanzanian HIVinfected patients: Prevalence, HBV genotypes and management challenges in resource-limited settings. Abstract EASL Conference Berlin April 2011

Kasang C., Ulmer A., Donhauser N., Schmidt B., Stich A., Klinker, H., Kalluvya S., Koutsilieri E., Rethwilm A., Scheller C., 2012. HIV patients treated with low-dose prednisolone exhibit lower immune activation than untreated patients. *BMC Infect Dis.* 12(1):14.