

Aus der Tropenmedizinischen Abteilung der Missionsärztlichen Klinik  
Akademisches Lehrkrankenhaus der Universität Würzburg  
Chefarzt: Prof. Dr. August Stich

**Der Nutzen von Minipools, Dried Blood Spots und Dried Plasma Spots zur  
Kostenreduktion von HIV-1 RNA Viruslasttestung in ressourcenarmen  
Ländern am Beispiel Südafrika**

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg  
vorgelegt von  
Anna-Teresa Lundershausen  
aus Erfurt

Würzburg, Januar 2014

<b>Referent:</b>	Prof. Dr. August Stich
<b>Korreferent:</b>	Prof. Dr. Axel Rethwilm
<b>Dekan:</b>	Prof. Dr. Matthias Frosch

**Tag der mündlichen Prüfung: 30.06.2014**

Die Promovendin ist Ärztin.

# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Grundlagen der HIV-Infektion.....	1
1.1	Epidemiologie .....	1
1.2	Die HIV-Infektion.....	1
1.2.1	Pathogenese des HI-Virus.....	1
1.2.2	Übertragungswege .....	4
1.2.3	Verlauf der HIV-Infektion .....	4
1.2.4	Diagnostik.....	6
1.2.5	Antiretrovirale Therapie .....	7
1.3	HIV und dessen Folgen in Südafrika.....	11
1.3.1	Südafrikas gesundheitspolitische Lage .....	11
1.3.2	Epidemiologie, Ursachen und Verlauf der HIV-Infektion.....	12
1.3.3	Antiretrovirale Therapie .....	15
1.4	Therapie und Verlaufskontrolle in Schwellen- und Entwicklungsländern	17
1.4.1	Verlaufskontrolle der Antiretroviralen Therapie .....	17
1.4.2	Poolingmethode zur Bestimmung der Viruslast.....	18
1.4.3	Gebrauch von Dried Plasma Spots und Dried Blood Spots.....	19
1.5	Zielsetzung und Fragestellung der Arbeit.....	20
2	Material und Methoden.....	21
2.1	Aufbau der Studie .....	21
2.1.1	Studiendesign.....	21
2.1.2	Studienteilnehmer.....	22
2.2	Durchführung der Studie .....	22
2.2.1	Prinzip der Real-Time-Polymerasekettenreaktion zur Bestimmung der Viruslast .....	22
2.2.2	Prinzip des Poolings anhand der Minipool-Methode .....	25
2.2.3	Verwendung von Blutplasma.....	28

2.2.3.1	Studienpopulation.....	28
2.2.3.2	Technische Vorgehensweise.....	32
2.2.4	Verwendung von Dried Blood Spots.....	33
2.2.4.1	Studienpopulation.....	33
2.2.4.2	Technische Vorgehensweise.....	34
2.2.5	Verwendung von Dried Plasma Spots.....	35
2.2.5.1	Patientenpopulation.....	35
2.2.5.2	Technische Vorgehensweise.....	35
3	Ergebnisse .....	37
3.1	Auswertung der Minipoolmethode bei Verwendung von Blutplasma .....	37
3.1.1	Häufigkeit von HIV-Nachweis in der Studienpopulation.....	37
3.1.2	Studienteilnehmer.....	38
3.1.3	Zeitaufwand.....	38
3.1.4	Validität der Methode.....	38
3.2	Minipoolmethode mit und ohne Anwendung des Measurement Enhanced Pooling Assay Calculator (MEPAC) Algorithmus .....	40
3.2.1	Effizienz und Kosten ohne Anwendung des MEPAC Algorithmus..	40
3.2.2	Effizienz und Kosten unter Anwendung des MEPAC Algorithmus .	41
3.2.3	Vergleich der Minipoolmethode mit und ohne Anwendung von MEPAC.....	42
3.3	Auswertung der Minipoolmethode bei Verwendung von Dried Blood Spots und Dried Plasma Spots .....	44
3.3.1	Studienpopulation.....	44
3.3.2	Antiretrovirale Therapie und Viruslast der Studienteilnehmer.....	45
3.3.2.1	Dried Blood Spots .....	45
3.3.2.2	Dried Plasma Spots.....	45
3.3.3	Minipoolmethode mittels Dried Blood Spots .....	46
3.3.3.1	Ergebnisse der Vorexperimente .....	46
3.3.3.2	Effizienz der Methode.....	47

3.3.3.3	Validität der Methode .....	51
3.3.4	Minipoolmethode mittels Dried Plasma Spots .....	52
3.3.4.1	Effizienz und Kosten der Methode.....	52
3.3.4.2	Validität der Methode .....	54
4	Diskussion.....	56
4.1	Repräsentativität der Studienpopulation .....	56
4.2	Reflektion der Methodik und der Ergebnisse .....	57
4.2.1	Minipoolstrategie an Blutplasma.....	57
4.2.2	Vergleich der Minipoolstrategie mit der 10x10-Matrixmethode.....	59
4.2.3	Dried Blood Spots.....	60
4.2.4	Dried Plasma Spots.....	61
4.3	Vergleich der Ergebnisse von Dried Plasma Spots und Plasmapooling	62
4.4	Bewertung der Viruslastbestimmung als Marker zum Monitoring der ART.....	62
4.5	Schlussfolgerung.....	63
5	Zusammenfassung.....	66
6	Literaturverzeichnis .....	67
7	Abbildungsverzeichnis.....	80
8	Tabellenverzeichnis .....	81
9	Annex: Liste der Krankenhäuser .....	82
10	Annex: Vorexperimente zu den DBS.....	87

## **Abkürzungsverzeichnis**

µl	Mikroliter
3TC	Lamivudin
AIDS	erworbenes Immundefektsyndrom (engl. Acquired Immune Deficiency Syndrome)
ART	Antiretrovirale Therapie
AZT	Zidovudin
CD4	Erkennungsmolekül an der Oberfläche einiger Leukozyten (engl. Cluster of Differentiation)
cps/ml	RNA-Kopien pro Milliliter
d4T	Stavudin
Ddi	Didanosin
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. Deoxyribonucleic Acid)
EFV	Efavirenz
ELISA	engl. Enzyme-linked Immunosorbent Assay
env	engl. Envelope Glycoprotein
FN	falsch negativ (engl. false negative)
FP	falsch positiv (engl. false positive)
gag	engl. Group Specific Antigen
gp	Glykoprotein
HAART	hochaktive antiretrovirale Therapie (engl. Highly Active Antiretroviral Treatment)
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
LDC	Staaten, die im internationalen Vergleich, insbesondere gegenüber den Industrieländern, einen wesentlichen Entwicklungsrückstand aufweisen (engl. Less Developed Countries)

LDL	niedrigster nachweisbarer Wert (engl. Lowest Detectable Limit)
MEPAC	engl. Measurement Enhanced Pooling Assay Calculator
ml	Milliliter
NNRTI	nicht-nukleosidische Reverse-Transkriptase-Inhibitoren
NRTI	nukleosidische Reverse-Transkriptase-Inhibitoren
NtRTI	nukleotidische Reverse-Transkriptase-Inhibitoren
NVP	Nevirapin
OECD-Länder	Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung; Zusammenschluss von 34 Industrieländern (engl. Organisation for Economic Cooperation and Development)
PCR	Polymerasekettenreaktion (engl. Polymerase Chain Reaction)
PI	Protease-Inhibitoren
PMTCT	engl. Prevention of Mother-to-Child Transmission
pol	Polymerase
RNA	Ribonukleinsäure (engl. Ribonucleic Acid)
RT-PCR	Echtzeit-PCR (engl. Real-time-PCR)
SIV	Simianes Immundefizienz-Virus
TDF	Tenofovir Disoproxil-Fumarat
TDM	Medikamentenspiegelbestimmung (engl. Therapeutic Drug Monitoring)
TN	richtig negativ (engl. true negative)
TP	richtig positiv (engl. true positive)
U/min	Umdrehungen pro Minute

UNAIDS	Gemeinsames Programm der Vereinten Nationen, das sich mit HIV/AIDS beschäftigt (engl. Joint United Nations Programme on AIDS)
US\$	US Dollar
VL	Viruslast
WHO	Weltgesundheitsorganisation (engl. World Health Organisation)
WTO	Welthandelsorganisation (engl. World Trade Organisation)
ZAR	Südafrikanischer Rand (vom Niederländischen Zuid-Afrikaanse Rand)



# **1 Einleitung und Grundlagen der HIV-Infektion**

## **1.1 Epidemiologie**

Seit der Erstbeschreibung des HI-Virus im Jahr 1981 ist die ganze Welt von der Epidemie betroffen, die sich mit 2,5 Millionen Neuinfektionen pro Jahr immer weiter ausbreitet. Laut UNAIDS leben derzeit weltweit 34 Millionen Menschen mit HIV/AIDS, wovon 50% weiblich sind (1).

In den letzten Jahren ist es zu einem deutlichen Rückgang der AIDS-assoziierten Todesfälle gekommen. Auch die jährlichen Neuinfektionen sind zwischen 2001 und 2011 um 20% gesunken (2). Diese Erfolge sind nicht zuletzt dem breiten Zugang zur antiretroviralen Therapie zu verdanken. Weltweit am schwersten von der Epidemie betroffen ist die Region der Subsahara. Die größte Ausbreitungsgeschwindigkeit verzeichnen Estland, Lettland, Russland und die Ukraine, sowie Süd- und Südostasien (1).

Laut Robert Koch-Institut lebten in Deutschland Ende 2012 78.000 Menschen mit HIV/AIDS. Die Zahl der HIV-Neuinfektionen belief sich hier auf ca. 3.400 (3).

## **1.2 Die HIV-Infektion**

### **1.2.1 Pathogenese des HI-Virus**

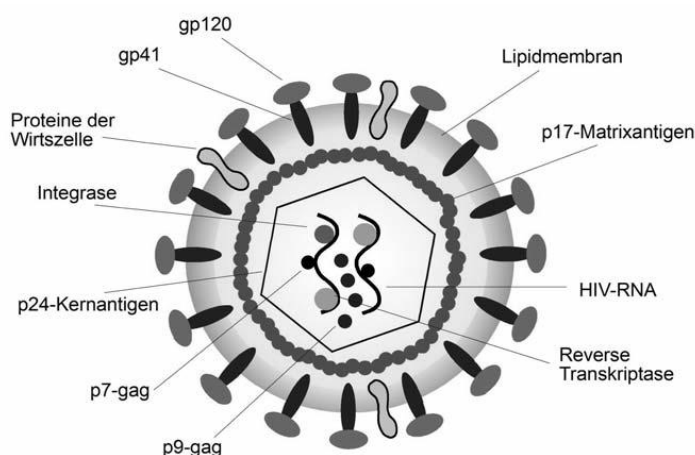
Das humane Immundefizienz- Virus gehört zur Familie der Retroviren und Gattung der Lentiviren.

Man unterscheidet bislang zwei verschiedene Arten von HIV, HIV-1 und HIV-2, die aus unterschiedlichen Typen des bei Affenarten bekannten SI-Virus entstanden sind (4). Grundsätzlich ähneln sich die beiden Arten in Bezug auf klinische Symptomatik und pathogene Eigenschaften, der Krankheitsverlauf bei Infektionen mit HIV-2 gestaltet sich in der Regel jedoch etwas langsamer.

HIV-1 mit seinen Subspezies ist für die Mehrzahl der Infektionen weltweit verantwortlich, während HIV-2 hauptsächlich im westlichen Afrika gefunden werden kann (5). Durch Koinfektionen können rekombinante Formen entstehen.

Das HI-Virion besteht aus einer Lipoproteinhülle, in die das Oberflächen-Glykoproteine gp120 und das Transmembranprotein gp41 eingebettet sind. Die Virushülle enthält außerdem wirtsspezifische Proteine wie HLA Klasse 1- und 2-Moleküle, die beim Abscheiden des Virus aus der infizierten Zelle („budding“) in die Virusmembran eingeschlossen werden. Mit der Innenseite der Membran sind Matrixproteine assoziiert. Im Inneren des Virus befindet sich das Viruskapsid, das aus p24-Kapsid-Antigenen aufgebaut ist. Neben dem Erbgut enthält es die für die Virusreplikation wichtigen Enzyme Reverse Transkriptase, Integrase und Protease. Die retroviralen Proteine werden durch die Gene gag („group specific antigen“), pol („polymerase“) und env („envelope glycoprotein“) kodiert. Gag enthält die Informationen zur Bildung von 50% des Viruspartikels (6). Durch pol wird ein Polyprotein, das die Vorläufer für die Enzyme Polymerase, Reverse Transkriptase und Integrase enthält, kodiert. Durch env werden die Glykoproteine an der Virusoberfläche verschlüsselt.

Zielrezeptor des Virus ist das Glykoprotein CD4, welches verschiedene Zellen im menschlichen Organismus tragen. Als hauptsächliches Reservoir konnten die T-Helferzellen identifiziert werden. Aber auch T-Zellvorläuferzellen im Knochenmark und Thymus, Eosinophile, Monozyten, Makrophagen und dendritische Zellen, sowie Mikrogliazellen des zentralen Nervensystems tragen den CD4-Rezeptor und bieten dem Virus somit einen Angriffspunkt (7, 8).



**Abb. 1:** Aufbau eines HIV-Virionpartikels. [aus: Hoffmann, Rockstroh, HIV 2013/2014, Medizin Fokus Verlag, 2013]

Zur Fusion des Viruspartikels mit der Wirtszelle kommt es durch die Bindung des Oberflächenproteins gp120 an den CD4-Rezeptor. Außerdem interagiert gp120 mit den Chemokinrezeptoren CCR5 oder CXCR4, die als Korezeptoren zu einer Aktivierung und somit Konformationsänderung von gp41 führen (9). Dadurch kommt es zur Verschmelzung von Virushülle und Zellmembran.

Das Virus wird internalisiert und das virale Genom ins Zytoplasma freigesetzt („uncoating“). Dort startet die virale Replikation durch das viruseigene Enzym Reverse Transkriptase, das die Virus-RNA in doppelsträngige provirale DNA umschreibt. Nach Translokation der DNA in den Zellkern wird die DNA über kovalente Bindungen und das Virus-Enzym Integrase in das Genom der Wirtszelle eingegliedert. Durch Transkription bzw. Transkription und Translation werden somit auch die virale RNA vervielfältigt und die viralen Proteine gebildet. Zunächst entstehen Vorläuferproteine, die sogenannte Präkursorproteine, die durch das Enzym Protease in ihre einzelnen Abschnitte gespalten werden. Durch verschiedene Interaktionen finden die einzelnen Virusbestandteile zusammen und bilden neue infektiöse Partikel.

Die entstandenen Viren werden aus der Zelle ausgeschleust („budding“). Dabei werden Anteile der Zellmembran der Wirtszelle als Bestandteile der Virushülle mitgenommen.

Die neu gebildeten Viren können nun andere Zellen infizieren.

Das Virus besitzt unterschiedliche Pathogenitätsfaktoren, unter anderen nef (negative regulatory factor), die effizient zur Apoptose von CD4-positiven und anderen Zellen führen und Abwehrmechanismen des Immunsystems verhindern (10-12). Das Immunsystem des Wirts ist in der Lage über eine gewisse Zeit den Verlust der CD4-positiven Zellen durch Neuproduktion auszugleichen. Die Infektion bleibt in dieser Zeit subklinisch. Sinkt die absolute Zahl der T-Helferzellen jedoch weiter kommt es zunehmend zur Schädigung des Immunsystems und damit zu opportunistischen Infektionen und Malignomen. Das führt schließlich zum Vollbild von AIDS, bis hin zum Tod.

### 1.2.2 Übertragungswege

Das HI-Virus ist im Wesentlichen über drei Wege übertragbar.

Zum einen sexuell, über ungeschützten analen, oralen oder vaginalen Geschlechtsverkehr mit einem infizierten Partner. Der Sexualkontakt stellt nach wie vor den häufigsten Infektionsweg dar.

Außerdem ist die Übertragung parenteral über Blut-zu-Blut-Kontakte möglich. Das sogenannte „needle sharing“, der gemeinsame Gebrauch von Nadeln und Spritzen unter Drogenabhängigen oder die Übertragung von infizierten Blutprodukten stellen hier mögliche Infektionswege dar. Die Wahrscheinlichkeit einer Infektion durch Blutprodukte ist deutlich gesunken, da seit Ende 1985 alle Blutspenden auf Antikörper gegen HIV getestet werden. Außerdem kann es akzidentell, zum Beispiel durch Nadelstichverletzungen mit HIV-infiziertem Material im medizinischen Bereich zu einer Infektion kommen. Das Risiko einer Übertragung liegt hier bei insgesamt 0,3 % (13).

Ein weiterer wichtiger Infektionsweg besteht durch die vertikale Übertragung von einer HIV-infizierten Mutter auf ihr Kind, entweder während der Schwangerschaft, unter der Geburt oder durch Stillen. Das Risiko einer Infektion des Kindes liegt bei 20% bis 40% (14). Durch perinatale Maßnahmen und die Anwendung von ART (PMTCT, engl. Prevention of Mother-to-Child Transmission) kann das Risiko der Übertragung auf unter 2% gesenkt werden (14).

### 1.2.3 Verlauf der HIV-Infektion

Der natürliche Verlauf einer HIV- Infektion, das heißt also ohne den Gebrauch von antiretroviralen Medikamenten, ist in Abbildung Abb. 2 dargestellt. Die Infektion kann in mehrere Stadien eingeteilt werden.

Das akute Infektionsstadium, kurz nach der Ansteckung mit dem HI-Virus, geht oft mit unspezifischen mononukleoseähnlichen Symptomen, wie Fieber, Myalgie, Lymphadenopathie oder Exanthem einher (15, 16).

Es folgt eine oft jahrelang andauernde klinisch asymptomatische Periode. Das Immunsystem ist in dieser Zeit zwar noch in der Lage, die Infektion zu

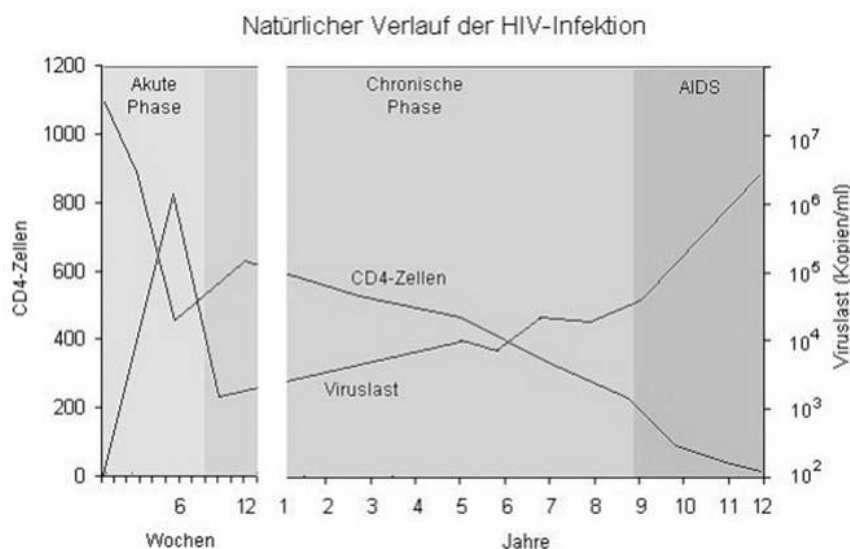
kontrollieren, das Virus vermehrt sich aber im lymphatischen Gewebe und der Patient ist somit infektiös.

Im weiteren Verlauf kommt es zur Immundefizienz mit Abfall der CD4-Zellen und Anstieg der Viruslast mit klinischen Erscheinungsbildern. Insbesondere zählen hierzu Herpes-Zoster-Infektionen, die orale Haarleukoplakie und die oropharyngeale Candida-Infektion. Diese Krankheitssymptome weisen auf eine Störung der zellulären Immunabwehr hin.

Mit fortschreitender Immundefizienz treten nach Jahren sogenannten AIDS-definierenden Erkrankungen auf. Hierzu zählen opportunistische Infektionen, Malignome, die HIV-bedingte Enzephalopathie oder das Wasting-Syndrom.

Nach individuell unterschiedlich langer Zeit führt die HIV-Infektion ohne antiretrovirale Medikamente zum Tod.

Das Zeitintervall zwischen der Infektion mit HIV und dem Auftreten AIDS-definierender Symptome ist unter anderem abhängig vom Immunstatus und Alter des Patienten, sowie der HI-Viruslast. Bei einer CD4-Zellzahl von unter  $200/\mu\text{l}$  muss zunehmend mit AIDS-definierenden Erkrankungen gerechnet werden (16).



**Abb. 2:** Natürlicher Verlauf der HIV-Infektion. [aus: Hoffmann, Rockstroh, HIV 2013/2014, Medizin Fokus Verlag, 2013]

### 1.2.4 Diagnostik

Die HIV-Diagnostik ist wichtig, um eine bestehende Infektion zu erkennen und therapieren zu können und um durch die Kenntnis des Infektionsstatus die Transmission einzudämmen. Für den Nachweis von HIV gibt es verschiedene Möglichkeiten. Prinzipiell unterscheidet man sogenannte Suchtests von Bestätigungstests. Die Suchtests müssen eine hohe Sensitivität aufweisen, damit keine Infektionen übersehen werden. Fällt der Suchtest positiv aus folgt nach dem Prinzip der Stufendiagnostik der Bestätigungstest, der durch seine hohe Spezifität falsch positive Ergebnisse verhindern soll. Jedem positiven Erstbefund muss ein Wiederholungstest folgen.

Als Standardsuchtest wird der ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) verwendet. Die HIV-Tests der 4. Generation basieren auf dem Nachweis von HIV-spezifischen Antikörpern und dem HIV-1-Antigen p24 (17-19). Als Reaktionsgefäß dient eine Kunststoffplatte, an die HIV-Antigene bzw. HIV-p24-Antikörper gekoppelt sind. Enthält die Testsubstanz HIV-Antikörper oder p24-Antigene werden diese gebunden. Zum Nachweis des Antigen-Antikörper-Komplexes wird ein Enzym-markierter Antikörper, der wiederum die humanen Antikörper bzw. das p24-Antigen bindet, und ein entsprechendes Substrat hinzugefügt. Bei Vorliegen der gesuchten Antikörper kommt es zu einem Farbumschlag der photometrisch gemessen werden kann.

Zur Bestätigung folgt bei einem positiven Testergebnis ein zweiter Antikörper-Test. Hierzu dienen in der Regel der Western- oder der Line-Blot. Die Virusproteine werden entsprechend ihres Molekulargewichts aufgetrennt und auf eine Membran übertragen. Dieser Teststreifen wird dann mit dem Patientenserum bzw. -plasma inkubiert. Bei Vorliegen von HIV-spezifischen Antikörpern binden diese am Teststreifen und können wie oben beschrieben mittels Enzym-markierten Antikörpern nachgewiesen werden. Anhand dieser Vorgehensweise wird nicht nur ein virales Protein nachgewiesen, für ein positives Testergebnis ist immer ein spezifisches Bandenmuster erforderlich (16, 20).

Neben den serologischen Nachweismethoden, gibt es weitere molekulare Möglichkeit des Virusnachweises, wie die Polymerase-Kettenreaktion (PCR),

anhand derer die virale RNA direkt nachgewiesen werden kann (siehe „Material und Methoden“ Abschnitt 2.2.1). Die PCR wird hauptsächlich zum Therapiemonitoring genutzt.

Weiterhin existieren Schnelltests denen Techniken wie die Immunchromatographie, die Partikel-Agglutination oder die Immunfiltration zugrunde liegen (21, 22). Als Untersuchungsmaterialien können Serum und Plasma, aber auch Voll- bzw. Kapillarblut oder Speichel eingesetzt werden (23).

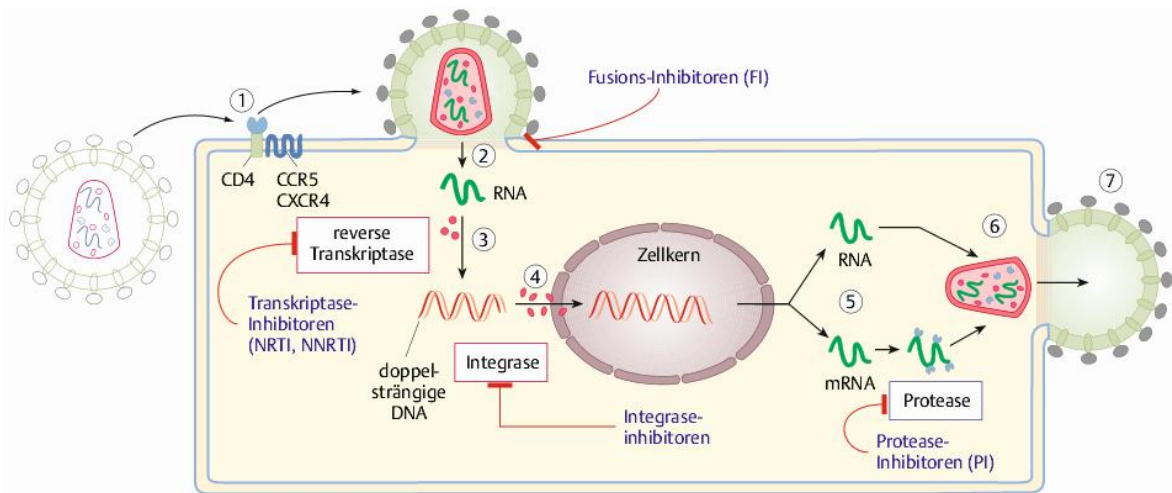
### **1.2.5 Antiretrovirale Therapie**

Die antiretrovirale Therapie verhindert die Virusreplikation und minimiert somit die Viruslast oft auf Werte unterhalb der Nachweisgrenze. Daraus folgt eine Verbesserung der immunologischen und klinischen Situation der Patienten. Die medikamentöse Therapie der HIV-Infektion hat zu einer signifikanten Senkung der HIV-assoziierten Morbidität und Mortalität geführt (24, 25). Darüber hinaus verbessert sich die Lebensqualität deutlich (26).

Die ersten antiretroviralen Medikamente sind seit 1987 erhältlich. Durch die in der Anfangszeit angewandte Monotherapie konnten nur geringe Erfolge erzielt werden (27, 28). In darauf folgenden Studien wurde gezeigt, dass die Kombination von antiretroviralen Medikamenten der Monotherapie in Bezug auf Überlebenszeit und Krankheitsprogression deutlich überlegen ist (28-30).

Zur Therapie der HIV-Infektion stehen fünf unterschiedliche Wirkstoffklassen zur Verfügung. Sie greifen an unterschiedlichen Punkten des Eintritts- und Replikationszyklus des HI-Virus an (siehe Abb. 3).

- NRTI/NtRTI: nukleosidische bzw. nukleotidische Reverse-Transkriptase-Inhibitoren
- NNRTI: nicht-nukleosidische Reverse-Transkriptase-Inhibitoren
- PI: Protease-Inhibitoren
- Entry-Inhibitoren
- Integrase-Inhibitoren



**Abb. 3:** Angriffspunkte antiretroviraler Wirkstoffe. [aus: Baenker et al., Duale Reihe Innere Medizin, Thieme, 2009]

Die NRTIs bzw. NtRTIs inhibieren kompetitiv die Reverse Transkriptase. Sie werden als falscher Baustein in die virale DNA eingebaut, was zu einem Kettenabbruch führt.

Auch die NNRTIs greifen an dem viralen Enzym Reverse Transkriptase an. Sie hemmen es nichtkompetitiv in dem sie mit hoher Affinität in der Nähe des aktiven Zentrums des Enzyms binden. Dadurch kommt es zur Aktivitätsminderung und das Wachstum des DNA-Stranges wird verlangsamt.

PIs binden kompetitiv an das aktive Zentrum der Protease und blockieren das Enzym, so dass die neu entstandenen Präkursorproteine nicht zerschnitten werden können. Dadurch wird die Virusreifung gehemmt.

Die virale Integrase katalysiert die Translokation der viralen DNA in das Genom der Wirtszelle. Dieser Prozess wird von den Integrase-Inhibitoren unterdrückt, so dass die Virusreplikation aufgehalten wird.

Unter den Entry-Inhibitoren unterscheidet man wiederum zwei Gruppen. Der Korezeptorinhibitor Maraviroc ist ein CCR5-Rezeptor-Antagonist. Er inhibiert den Eintritt von HI-Viren die den CCR5-Rezeptor zur Fusion von Virushülle und Zellmembran nutzen. Der Fusionsinhibitor Enfuvirtid bindet an das Hüllprotein gp41 und verhindert somit ebenfalls das Einschleusen des Virusgenoms in die Zielzelle.



Jede symptomatische Infektion stellt eine Indikation zur Behandlung dar. Die Indikationsstellung bei asymptomatischen HIV-infizierten Patienten orientiert sich hauptsächlich an der CD4-Zellzahl und muss eine individuelle Risikoabschätzung einbeziehen (31). In den 2013 von der WHO veröffentlichten Richtlinien zur antiretroviralen Therapie wird empfohlen die ART bereits bei einer CD4-Zellzahl von 500 pro Mikroliter Blut einzuleiten (32).

Unter HAART (engl. Highly Active Antiretroviral Therapie) versteht man die Kombination von mindestens drei antiretroviralen Medikamenten. Üblicherweise wird in der Initialtherapie der HIV-Infektion eine Kombination aus zwei NRTI/NtRTI mit einem NNRTI, einem PI oder einem Integrase-Inhibitor verwendet. Dieses Therapiekonzept hat sich als wirksam und verträglich erwiesen (33, 34).

Das Virus kann durch die Medikamente zwar nicht eradiziert werden, da einige Zellen latent infiziert bleiben, was zu einem lebenslangen Reservoir führt (35). Die Virusreplikation wird jedoch so weit gehemmt, dass eine klinische Symptomatik verhindert und die Krankheitsprogression verzögert werden kann (36-38).

Man unterscheidet den virologischen Therapieerfolg, gemessen an dem Abfall der Viruslast, den immunologischen Therapieerfolg, der sich auf den Anstieg der CD4-Zellzahl bezieht und den klinischen Therapieerfolg, der mit der Symptomfreiheit des Patienten einher geht (16). Die Viruslast sollte unter einen Wert von 20 bis 50 Kopien/ml, also unter die Nachweisgrenze hochsensitiver Tests, gesenkt werden. Dadurch wird das Risiko der Resistenzentwicklung des Virus für die eingesetzte HAART gesenkt. Die Infektiosität der Patienten nimmt ab, wodurch die Transmissionsrate deutlich gemindert werden kann (39-42).

Ein Problem der antiretroviralen Therapie stellen die Nebenwirkungen der Medikamente dar. Sie können die Behandlung der Patienten erheblich erschweren. Studien zufolge sind unerwünschte Wirkungen der HIV-Therapie Hauptgrund für die Therapieumstellung (43).

Zu den häufigsten Nebenwirkungen gehören gastrointestinale Komplikationen, wie Übelkeit, Erbrechen oder Völlegefühl, außerdem Hepatotoxizität und Komplikationen, die die Niere betreffen (44-47). Außerdem kann es zu

neurologische Störungen im peripheren und zentralen Nervensystems kommen, wie beispielsweise der Polyneuropathie, Schwindel oder Depressionen (48-50). Beeinflussung des Knochenstoffwechsels, allergische Reaktionen oder hämatologische Veränderungen wie die Panzytopenie durch Myelosuppression oder erhöhte Blutungsneigungen sind ebenfalls schwerwiegende Komplikationen der antiretroviralen Therapie (51-54).

Eine weitere mögliche Nebenwirkung der Medikamente ist das Lipodystrophie-Syndrom. Hierunter versteht man einen Symptomenkomplex bestehend aus Fettverteilungsstörungen und metabolischen Veränderungen wie Insulinresistenz, Glukosetoleranzstörungen, Diabetes mellitus, Hypertriglyzeridämie oder Hypercholesterinämie (55, 56). Hierdurch erhöht sich das kardiovaskuläre Risiko der Patienten, sodass bei Langzeitüberleben der HIV-Infektion kardiovaskuläre Todesursachen gehäuft vorkommen können.

Nichtbeachtung der Nebenwirkungen seitens der Verordner oder individuelle Probleme des Patienten können zu Adhärenzproblemen führen. Eine nur partielle Virussuppression ist die Folge, die gleichzeitig mit niedrigen Medikamentenspiegeln die Entstehung von Resistenzen und Therapieversagen begünstigt (57). Deshalb ist eine konsequente Kontrolle der Therapie, das Therapie-Monitoring, von entscheidender Bedeutung um Therapieversagen und Resistenzentwicklung rechtzeitig erkennen und durch Umstellen der medikamentösen Therapie darauf reagieren zu können. Hierzu stehen die Viruslastbestimmung und die Ermittlung der CD4-Zellzahl zur Verfügung. Im Falle eines virologischen oder immunologischen Therapieversagens ist die genotypische Resistenzanalyse, besonders vor Therapieumstellung, sinnvoll (31, 58). Außerdem kann die Bestimmung der Medikamentenspiegel (TDM, engl. Therapeutic Drug Monitoring) zur Therapieüberwachung und Begleitung eingesetzt werden, da ausreichend hohe Plasmaspiegel, besonders bei der Anwendung von Protease-Inhibitoren und NNRTI, für den virologischen Therapieerfolg wichtig sind (59-62).

Die HAART ist eine lebenslange Therapie und erfordert eine konsequente Medikamenteneinnahme. Um die notwendige Compliance der Patienten besser

zu gewährleisten existieren Kombinationspräparate, die die Einnahme erleichtern.

Die Lebenserwartung von Patienten unter HAART ist, bei ansonsten gesunder Lebensweise, heute nahezu normal (63).

## **1.3 HIV und dessen Folgen in Südafrika**

### **1.3.1 Südafrikas gesundheitspolitische Lage**

Südafrika ist ein Land mit ca. 50 Millionen Einwohnern und einem Bruttoinlandsprodukt von US\$ 384 Milliarden im Jahr 2012 (64). Unter den Afrikanischen Ländern zählt es damit zu den reichsten. Von Südafrikas relativer wirtschaftlicher Stärke profitiert allerdings nur ein kleiner Teil der Bevölkerung. Über die Hälfte der Einwohner muss von einem Einkommen unterhalb der nationalen Armutsgrenze leben (65). Während Südafrika aus ökonomischer Sicht zwar eine Vorreiterstellung im Süden Afrikas innehat, sind die Gesundheitsresultate schlechter als in vielen anderen Ländern mit niedrigerem Einkommen (66). Denn die Kosten für das Gesundheitssystem können oft nicht vollständig gedeckt werden (67). Dies ist unter anderem mit der hohen HIV-Prävalenz und den damit verbundenen Ausgaben für das Gesundheitssystem zu begründen, denn seit 2004 werden die Kosten für die antiretrovirale Therapie HIV-Infizierter in Südafrika von der Regierung übernommen (68). Im Vergleich zu westlichen Ländern sind dabei in Südafrika jedoch immer noch deutlich weniger Medikamente zur Behandlung von HIV verfügbar.

Obwohl Südafrika nach ökonomischen und sozialen Kriterien nicht unter die „Least Developed Countries“ (LDC) fällt, wird es in dieser Studie stellvertretend für Länder mit limitierter medizinischer Versorgung herangezogen (69).

Die wirtschaftlich niedrige Stellung eines Landes ist oft mit einer nicht zureichenden basismedizinischen Versorgung assoziiert, woraus sich ein nur schwer zu durchbrechender Teufelskreis ergibt: Strukturelle Armut führt unter anderem zur gesundheitlichen Vulnerabilität großer Teile der Bevölkerung, deren ökonomische Situation dadurch weiter verschlechtert wird und somit auch die Chance auf volkswirtschaftliche Prosperität mindert.

In Südafrika spielt die HIV-Infektion eine maßgebliche Rolle für die Gesundheit der Bevölkerung. Suffiziente Medikamente sind zwar prinzipiell verfügbar, es fehlt jedoch nach wie vor an der Einsicht und Aufklärung der Betroffenen, sowie an einer effizienten Überwachung der begonnenen Therapie. Außerdem muss die Patienten-Compliance in Bezug auf die regelmäßige Medikamenten Einnahme kontrolliert werden, damit optimale Ergebnisse der antiretroviralen Therapie erreicht werden können. Die Ergebnisse dieser Arbeit sollen helfen, den flächendeckenden Zugang zur effektiven Therapiebeurteilung und kontinuierlichen Überwachung durch einfache und kostengünstige Methoden zu ermöglichen.

### **1.3.2 Epidemiologie, Ursachen und Verlauf der HIV-Infektion**

Weltweit sind derzeit rund 34 Millionen Menschen mit dem HI-Virus infiziert. AIDS und dessen Folgen betreffen Menschen in allen Regionen der Erde (1, 70). Das südlich der Sahara gelegene Afrika ist hiervon im internationalen Vergleich am stärksten betroffen. Laut UNAIDS wurde die Zahl der HIV-Infizierten im Jahr 2011 dort auf 23,5 Millionen geschätzt, was 69% der weltweiten Infektionen entspricht (1). Obwohl die Neuinfektionen, nicht zuletzt durch die Erfolge der antiretroviralen Therapie, um ein Fünftel im Vergleich zum Jahr 1999 gesunken sind, wurden laut Angaben der WHO 2009 immer noch 1,8 Millionen Menschen im südlich der Sahara gelegenen Afrika neu infiziert. In Südafrika leben rund 5,6 Millionen Menschen mit dem HI-Virus. Mit fast 17% der Erwachsenen zwischen dem 15. und 49. Lebensjahr hat das Land damit die höchste Prävalenz in dieser Region (71).

Der Ursprung des Humanen Immundefizienz-Virus liegt bei einem verwandten Virusstamm, dem sogenannten SIV (Simianes Immundefizienz-Virus), als dessen Wirt verschiedenen afrikanischen Affenarten, darunter auch Schimpansen, angesehen werden. 2006 konnte ein Forschungsteam diesen Zusammenhang beweisen (72). Phylogenetisch nahm das Virus seinen Ursprung also in Afrika, was zu dessen geographischer Ausbreitung passt. Es wird vermutet, dass die Übertragung des Virus vom Affen auf den Menschen

durch die Jagd und den Verzehr der Tiere stattfand, bewiesen ist dieser Zusammenhang allerdings nicht.

Im Gegensatz zu Europa und Amerika, wo vor allem homosexuelle Männer, Personen mit intravenösem Drogenabusus und Prostituierte betroffen sind, überwiegt im südlichen Afrika die heterosexuelle Transmission. Mit etwa 50 % stellt der heterosexuelle Geschlechtsverkehr in Afrika den häufigsten Übertragungsweg dar. Außerdem spielt die Übertragung des Virus von HIV-positiven schwangeren Frauen auf ihre Kinder während der Schwangerschaft und unter der Geburt sowie in der Stillzeit eine große Rolle (73). Der erste AIDS-Fall, der einen Südafrikaner betraf, wurde 1987 diagnostiziert (74). Innerhalb der nächsten Jahre, als das Land die Veränderung von der Apartheid hin zur Demokratie durchlief, begann sich die Infektion rapide auszuweiten (75). Dieser Verlauf und die Ausmaße der Epidemie sind mit keinem anderen Land zu vergleichen. Die Ursachen und Gründe dafür, dass die HIV-Epidemie gerade in Südafrika ein solch historisches Ausmaß annehmen konnte, sind nur schwer zu überblicken.

Auch mit dem Wechsel der Regierung in den neunziger Jahren wurde die Epidemie nicht mit der notwendigen Dringlichkeit bekämpft. Dadurch blieben zentrale Probleme, wie die hohe Rate an HIV-Infizierten und AIDS-Kranken, unbeachtet und ungelöst. Südafrika ist das Land, das bezüglich seiner Wirtschaftskraft unter den Ländern mit den höchsten HIV-Prävalenzraten am besten für den Kampf gegen die Epidemie gerüstet gewesen wäre. Aber gerade die Regierung Südafrikas hat lange die HIV-Problematik negiert:

Als Thabo Mbeki 1999 das Amt des Präsidenten Südafrikas von Nelson Mandela übernahm, verbreitete er seine zweifelhafte Haltung zu HIV und AIDS. Eine seiner Aussagen bestand darin, nicht das HI-Virus, sondern die Armut sei der Grund für AIDS, außerdem bezweifelte er öffentlich die Wirkung von antiretroviralen Medikamenten (76). Auch die damalige Gesundheitsministerin, Manto Tshabalala-Msimang, postulierte als Therapie von HIV und AIDS die Einnahme von Olivenöl, Zitronensaft, Knoblauch und Roter Beete anstelle von ART (77). Wegen verspäteter Präventionskampagnen blieben große Teile der Bevölkerung über die Übertragungswege und die Prävention lange uninformiert,

sodass sich das Virus ungehindert ausbreiten konnte. Auch heute noch ist HIV und AIDS in vielen Teilen Afrikas ein Tabuthema (78). Die Diskriminierung und Ausgrenzung von Infizierten senkt die Bereitschaft den eigenen Infektionsstatus überprüfen zu lassen. Entsprechende präventive Maßnahmen, wie der Gebrauch von Kondomen gelten zudem als unmännlich.

Auch Prostitution und sexuelle Gewalt gegen Frauen erhöhen das Risiko einer Infektion. Überlappende Sexualnetzwerke sind ein weiterer Risikofaktor, denn in polygamen Partnerschaften kann sich das Virus schneller ausbreiten als in monogamen Beziehungen.

Problematisch sind weiterhin die gesellschaftlich hoch angesehenen, aber aus wissenschaftlicher Sicht fragwürdigen Therapieansätze traditioneller Heiler. Ein Großteil der südafrikanischen Bevölkerung konsultiert die sogenannten „Sangomas“ und vertraut auf deren Künste. Hilfsorganisationen, wie HOPE Cape Town haben sich diesen Umstand zum Vorteil gemacht und eine Kooperation zwischen Ärzten und traditionellen Heilern initiiert (79).

Sicher ist, dass die Ausbreitung von HIV multifaktorielle Ursachen hat: Aberglaube, Analphabetismus, Armut, Desinformation, Isolation, Korruption, Migration, Prostitution, Promiskuität, Polygamie, kulturelle Umstände, Tabuisierung, Alkoholismus, das Leben in informellen Siedlungen. All das spielt eine Rolle. Deshalb kann HIV und dessen Folgen nicht an einer Front bekämpft werden, die Präventionsmaßnahmen müssen an vielen Stellen greifen.

HIV hat die Sterberaten in Südafrika drastisch erhöht. Für 2011 wurden die durch HIV verursachten Todesfälle auf 270000 geschätzt (80). Betroffen sind vor allem junge Erwachsene im Alter von 15 bis 49 Jahren (2). Das heißt besonders die arbeitende Bevölkerungsschicht ist von der Epidemie betroffen, was drastische Einflüsse auf die Wirtschaftskraft des Landes hat. Außerdem sind die Menschen dieser Generation häufig Eltern. Es kommt nicht selten vor, dass die Mütter oder Väter vor ihren Kindern sterben und damit Waisen zurück lassen. Die Zahl der AIDS-Waisen, von denen entweder ein oder gar beide Eltern an HIV/AIDS gestorben sind, wird in Südafrika auf 1,9 Millionen geschätzt (1). Der Verlust der Eltern bedeutet nicht nur eine gewaltige

emotionale Belastung für die Kinder. Häufig werden die Familien zerrissen, Kinder müssen bei Großeltern, die aus gesundheitlichen Gründen nicht mehr angemessen für sie sorgen können oder bei unbekanntem Nachbarn aufwachsen. Oft können die Kinder aus finanziellen Gründen keine Schule mehr besuchen. Sind die Waisen selbst HIV infiziert wird deren Therapie nicht selten vernachlässigt.

Die Epidemie hat also nicht nur Einfluss auf die erkrankten Individuen selbst, sondern auf das gesamte Land, sowohl aus sozialer und ökonomischer als auch aus demographischer Sicht.

### 1.3.3 Antiretrovirale Therapie

Eine der größten Errungenschaften des Gesundheitswesens im südlich der Sahara gelegenen Afrika war die Versorgung von mehr als 6,2 Millionen Menschen mit kombinierten antiretroviralen Medikamenten (81).

Der Zugang zu wirksamen Medikamenten wurde in ressourcenarmen und gesundheitspolitisch wenig entwickelten Ländern im Vergleich zu den OECD-Ländern erst viel später gewährleistet (82). In vielen Regionen der Erde sind antiretrovirale Medikamente bis heute nicht ausreichend verfügbar. Die Kosten für Medikamente und Laboruntersuchungen im Rahmen der Verlaufskontrolle der ART überfordern dort die Gesundheitssysteme. Die flächendeckende Einführung von ART wird durch Defizite in der medizinischen Infrastruktur und der Basisversorgung eingeschränkt.

„We are angry. Our People are dying. We can no longer accept millions of needless AIDS deaths simply because we are poor Africans. We know antiretroviral treatment is feasible in our countries”

- *“Wir sind wütend. Unsere Mitmenschen sterben. Wir können nicht länger Millionen unnötiger AIDS-Todesfälle akzeptieren, nur weil wir arme Afrikaner sind. Wir wissen, dass antiretrovirale Therapie in unseren Ländern machbar ist“*<sup>1</sup>(83).

---

<sup>1</sup> Milly Katana aus der “Health Rights Action Group”, Uganda, ist eines der Gründungsmitglieder von Pan-African HIV/AIDS Treatment Access Movement (PHATAM), gegründet im August 2002 auf “World Summit for Sustainable Development”, Johannesburg, South Africa. Dieses Zitat stammt aus der PHATAM's Pressemitteilung bei der Gründung.

Mittlerweile hat sich die 2002 von Milly Katana geschilderte Situation verbessert. Bereits seit 1996 sind wirksame antiretrovirale Medikamentenkombinationen verfügbar. In den letzten Jahren hat die Anzahl der HIV-infizierten Menschen, die eine antiretrovirale Medikation erhalten, besonders in den Schwellen- und Entwicklungsländern deutlich zugenommen. Im Vergleich zum Jahr 2008 ist die Zahl der mit antiretroviralen Medikamenten behandelten HIV-Infizierten in diesen Ländern um 30% gestiegen (1). Das ist sicherlich dem Umstand zu verdanken, dass die Weltöffentlichkeit ihr Augenmerk immer mehr auf den flächendeckenden Zugang zu Behandlungsmöglichkeiten der Epidemie gelegt hat (84). Mit Programmen wie der „3 by 5-Initiative“ der Weltgesundheitsorganisation oder dem Beschluss der Welthandelsorganisation, das internationale Patentrecht zu lockern, so dass Entwicklungsländer billigere Generika der antiretroviralen Medikamente legal importieren können, konnte ein besserer Zugang zur antiretroviralen Therapie (ART) ermöglicht werden (85, 86). Inzwischen konnte durch Studien gezeigt werden, dass die antiretrovirale Therapie auch für niedrig entwickelte Regionen eine wirksame Option ist die HIV-Inzidenz zu senken, was ein Umdenken initialisierte (87). Das südliche Afrika ist dabei die Region der Welt, in der hierdurch die Rate der Neuinfektionen am stärksten gesenkt werden konnte (88, 89). Dieser Erfolg wurde erreicht, seit 2004 die Kosten für die ART in Südafrika vom Staat übernommen werden (68). Dennoch ist die flächendeckende Versorgung inklusive umfassender Betreuung während der Therapie nach wie vor nicht vollständig gesichert. Mit der Einführung der ART ist die Behandlung der HIV-infizierten Patienten nicht abgeschlossen. Die kontinuierliche Therapieüberwachung stellt ein noch nicht gelöstes Problem dar, das den langfristigen Behandlungserfolg gefährdet.



## **1.4 Therapie und Verlaufskontrolle in Schwellen- und Entwicklungsländern**

### **1.4.1 Verlaufskontrolle der Antiretroviralen Therapie**

Ziel einer optimalen ART ist die Suppression der Virusreplikation, die durch regelmäßige Verlaufskontrollen immer wieder überprüft und bestätigt werden muss. Eine virale Replikation in Anwesenheit von antiretroviralen Medikamenten fördert die Selektion von Mutationen in Resistenzgenen und somit das therapeutische Versagen (90, 91). Vermehren sich diese resistenten Viren und werden weitergegeben, so sind die Optionen der medikamentösen Behandlung gerade in ressourcenarmen Ländern schnell erschöpft. Die Umstellung auf ein möglicherweise komplexeres Therapieschema wird notwendig. Die neue Medikamentenkombination ist eventuell noch unübersichtlicher für den Patienten als die initiale, was die Adhärenz der Patienten verringert. Ohne regelmäßige Medikamenteneinnahme wird die Entstehung weiterer Resistenzen gefördert. Wenn die Medikamente nicht mehr wirken, kann sich das Virus ungehindert vermehren und die Viruslast steigt. Deshalb ist es wichtig, den Therapieerfolg wie auch die Compliance der Patienten regelmäßig zu kontrollieren.

Die WHO empfiehlt als Verlaufskontrolle der Therapie die Bestimmung der CD4-Helferzellzahl und der Viruslast in mindestens sechsmonatigen Abständen (92). Dabei gilt die Viruslast als effektiver Marker und deren Anstieg als frühestes Zeichen eines Therapieversagens (93). Im Vergleich zur CD4-Zellzahl und zu klinischen Parametern erwies sich die Viruslast bei der Diagnostik von Therapieversagen als wesentlich genauer (91).

Ist die Bestimmung der Viruslast zur Therapiekontrolle der Patienten nicht verfügbar, werden notwendige Umstellungen auf Second-Line-Therapeutika bei Medikamentenresistenz häufig versäumt, und das Virus vermehrt sich ungehindert. Kostengünstige Monitoring-Verfahren sind daher von großer medizinischer und gesundheitsökonomischer Bedeutung. Deshalb beinhaltet die vorliegende Studie einen Kostenvergleich zwischen dem Poolen von Blutproben und herkömmlichen Methoden zur HIV-1 RNA-Bestimmung.

### **1.4.2 Poolingmethode zur Bestimmung der Viruslast**

Eine Strategie, mit der das Therapie-Monitoring HIV-infizierter Patienten unter ART kostengünstiger werden könnte, ist das gepoolte Testen von Blutproben. Es bildet die Grundlage der vorliegenden Studie. Bei Anwendung der Poolingmethode werden die Blutseren verschiedener Patienten in einem einzigen Testansatz getestet. Da der finanzielle Aufwand pro Viruslast-Test derzeit sehr hoch ist (30 US\$ - 120 US\$, abhängig von Herstellerfirma und Region), könnten durch Reduktion der Anzahl der Tests die Kosten deutlich gesenkt werden (94, 95). Das Pooling-Verfahren hat sich bereits beim HIV-Screening von Blutspenden und in der Diagnostik von HIV-Infektionen bewährt (96, 97).

Die eigentliche Idee der Pooling-Strategie reicht weit zurück. Bereits 1943 entwickelte Dorfman diese Methode, um mit Syphilis infizierte Personen aus einer Kohorte von hauptsächlich nicht infizierten Soldaten herauszufiltern (98). Dafür mischte er die Blutproben von fünf Probanden zu einem Pool. Wenn keine der Proben Syphilis-spezifisches Antigen enthielt, war auch im Pool kein Antigen enthalten und das Ergebnis fiel somit für alle Proben negativ aus. Wenn aber einer der zu testenden Individuen mit Syphilis infiziert war und sein Blut somit Antigen enthielt, war es auch im gesamten Pool nachzuweisen. Nur bei positivem Testergebnis im Pool mussten die Einzelproben nachgetestet werden.

Eine Dorfmans Vorgehen ähnliche Methodik haben Smith et al. 2009 in San Diego auf die Viruslastbestimmung angewandt. Die Pooling-Strategie hat sich hier als kosteneffiziente Alternative zur Kontrolle des Therapieerfolgs von Patienten unter ART mittels Viruslastbestimmung erwiesen (99). Ob das Poolen von Proben zur Bestimmung der Viruslast auch in ressourcenarmen Teilen der Erde kosteneffizient ist, wurde bisher nicht untersucht und ist Bestandteil der vorliegenden Studie. Die Beantwortung der Frage zur Praktikabilität und zur tatsächlichen Kostenreduktion des Pooling-Verfahrens ist für LDC und Länder mit einem limitierten Gesundheitssystem, und damit auch für die Entwicklungshilfe, von großer Bedeutung. Sollte sich die Methode als effizient gegenüber der herkömmlichen Viruslastbestimmung erweisen, ist dies ein

entscheidender Schritt hin zum flächendeckenden Zugang zur HIV-Viruslastbestimmung. Wie bereits erläutert, gilt die Viruslast als der beste Parameter zur Beurteilung des Erfolgs einer antiretroviraler Therapie und stellt damit einen wichtigen Labortest zur Vermeidung der Entwicklung von Medikamentenresistenzen dar.

### **1.4.3 Gebrauch von Dried Plasma Spots und Dried Blood Spots**

Der Einsatz der Poolingstrategie in niedrig entwickelten Ländern stößt aber auch an Grenzen: fehlende Infrastruktur, mangelhafte Ausstattung der Laboratorien, unzureichende Fachkenntnisse des Personals, beschränkte Verfügbarkeit von Wasser und Elektrizität (1, 94).

In den meisten abgelegenen medizinischen Versorgungsstationen und kleinen Krankenhäusern Afrikas besteht keine Möglichkeit eine Viruslastbestimmung durchzuführen. Um die quantitative Realtime-PCR (siehe „Material und Methoden“ Abschnitt 2.2.1) zu ermöglichen, müssten die Tests in zentralen Krankenhäusern mit entsprechenden technischen Möglichkeiten durchgeführt werden. Das setzt jedoch den fachgerechten Transport der Blutproben voraus: Ohne intakte Straßenverhältnisse und geschlossene Kühlkette kann ein sicherer Transport und der ordnungsgemäße Umgang mit den Proben, und damit ein valides Ergebnis, jedoch nicht garantiert werden (94, 100).

Um infrastrukturelle Defizite, Einflüsse hoher Temperaturen oder Lagerungsprobleme auszugleichen, wurde in einigen Studien der Nutzen von Blutstropfen, die auf Filterpapier getrocknet wurden, den so genannten Dried Blood Spots (DBS), zur Bestimmung der Viruslast untersucht (94, 101-105). In Form von DBS oder Dried Plasma Spots (DPS) könnten Blutproben zu zentralen Laboratorien, die über die geeignete technische Ausstattung und geübtes Personal verfügen, transportiert werden. Diese logistische Vorgehensweise wäre für Entwicklungsländer eine Chance valide Labordaten zu erhalten. Weiterer Bestandteil dieser Studie war somit die Untersuchung der Poolingmethode anhand DBS und DPS, um den Transport zu ermöglichen.

## 1.5 Zielsetzung und Fragestellung der Arbeit

Die vorliegende Arbeit entstand im Rahmen des IRTG 1522 (International Research Group 1522) als Zusammenarbeit zwischen dem Missionsärztlichen Institut Würzburg und dem Tygerberg-Hospital der Universität Stellenbosch und wurde in Kapstadt, Südafrika, durchgeführt.

Den beschränkten gesundheitsökonomischen Ressourcen in Entwicklungs- und Schwellenländern Rechnung tragend wurde die Untersuchung mit der Frage durchgeführt, wie die Kosten für die Viruslastbestimmung bei HIV-infizierten Patienten unter ART gesenkt werden können.

Die Anwendung von Poolingstrategien bildete dafür die Grundlage.

In dieser Studie sollte herausgefunden werden, ob das Poolen einzelner Proben zur regelmäßigen Therapiekontrolle der antiretroviralen Therapie von HIV-Infizierten Patienten praktikabel und kostengünstiger ist als die herkömmliche Methode zur Viruslastbestimmung. Ziel war es dabei alle Patienten mit hoher Viruslast (über 1000 cps/ml), bei der ein Therapieversagen wahrscheinlich ist, zu erkennen.

In der vorliegenden Arbeit wurden folgende Fragestellungen untersucht:

- Ist die Pooling-Methode bei einer Patientenpopulation mit einer hohen Rate an Therapieversagern einsetzbar?
- Gibt es Möglichkeiten, die Population so zu präselektieren, dass die Therapieversagerquote möglichst gering ist?
- Wie hoch sind Effizienz, Sensitivität und Spezifität der angewandten Methode?
- Kann durch dieses Verfahren Zeit gespart werden oder ist der zeitliche Aufwand höher als bei der herkömmlichen Viruslastbestimmung?
- Kann das Poolen auch von technisch unerfahrenem Personal durchgeführt werden?
- Wie hoch sind die Kosten, die durch Anwendung des Poolings eingespart werden?
- Liefern die DPS und DBS vergleichbare Resultate?

## 2 Material und Methoden

### 2.1 **Aufbau der Studie**

#### 2.1.1 **Studiendesign**

Die Studie wurde im Department of Clinical Virology des Tygerberg Hospitals in Kapstadt, Südafrika, durchgeführt und vom Stellenbosch University Committee for Human Research genehmigt. Die Untersuchungen wurden in der Zeit von Oktober 2009 bis Februar 2010 vorgenommen. Das Projekt entstand in einer Kooperation zwischen dem IRTG (International Research Training Group) 1522 (Sprecher: Prof. Dr. A. Rethwilm auf deutscher Seite und Prof. Dr. W. Preiser auf südafrikanischer Seite), dem Missionärztlichen Institut Würzburg und der Universität Stellenbosch.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit dem Poolen von Blutplasma und DBS bzw. DPS anhand der Minipool-Methode. Die Studie wurde in drei unterschiedliche Teile gegliedert:

Der erste Teil umfasste eine retrospektive Analyse. Hierbei wurden die Antragsformulare des Labors für das Testen der Viruslast von 2456 Patienten des Tygerberg Hospitals, Kapstadt, ausgewertet. Das Ziel war es, bestimmte Präselektionskriterien zu ermitteln, anhand derer eine Studienpopulation gefunden werden kann, bei welcher die Wahrscheinlichkeit eines virologischen Versagens unter antiretroviraler Therapie möglichst gering ist. Ergebnisse zu dieser retrospektiven Analyse sind Gegenstand der Promotionsarbeit von Susanne Potschka.

Der zweite Teil der Studie beinhaltete den Vergleich zwischen Pools aus Blutplasma verschiedener Patienten und individuell getesteten Blutproben im Hinblick auf Effektivität und Genauigkeit, Kostenersparnis und Arbeitsaufwand. Hierzu wurden zwei unterschiedliche Pooling-Strategien angewandt: die Minipool- und die Matrix-Methode. Bei der Minipool-Strategie werden fünf Einzelproben gemeinsam getestet. Bei der Matrix-Strategie werden 100

Einzelproben in einer 10x10- Matrix zusammengestellt und jeweils in Reihen und Spalten „gepoolt“. Das heißt, jede Probe findet sich in zwei verschiedenen Pools wieder. Umgekehrt haben jeweils zwei Pools nur eine Einzelprobe gemeinsam. In der vorliegenden Arbeit wird speziell auf die Minipool-Methode eingegangen. Im dritten Teil wurden statt Blutplasma getrocknete Blutropfen (Dried Blood Spots, DBS) bzw. Plasmatrophen (Dried Plasma Spots, DPS) verwendet und mit der Minipool-Methode untersucht.

In der vorliegenden Arbeit soll auf das Poolen von Blutplasma anhand der Minipool-Methode eingegangen werden. Weiterhin wird das Testen der Viruslast an Blut- und Plasmatrophen ebenfalls mittels Minipools beschrieben. Ergänzende Untersuchungen finden sich in der Doktorarbeit von Susanne Potschka, die sich näher mit der Durchführung der Matrix-Methode beschäftigt hat.

### **2.1.2 Studienteilnehmer**

Die in der Studie verwendeten Blutproben stammen von Patienten der Provinz Western Cape in Südafrika. Primär wurden die Proben zur Bestimmung der Viruslast und der CD4-Zell-Zahl im Rahmen der Therapiekontrolle entnommen. Ausschließlich Patienten, deren Blutproben in das Labor des Department of Cincial Virology an der NHLS Tygerberg, Faculty of Health Sciences der University of Stellenbosch, zur routinemäßigen HIV-1 Viruslast Testung eingegangen sind, wurden in die Studie einbezogen.

## **2.2 Durchführung der Studie**

### **2.2.1 Prinzip der Real-Time-Polymerasekettenreaktion zur Bestimmung der Viruslast**

Um die Viruslast einer Blutprobe bestimmen zu können, muss zunächst die Isolation der im Plasma enthaltenen Nukleinsäuren der Viren erfolgen. Dazu wurde in dieser Studie die semimanuelle Extraktionsplattform NucliSENS® easyMAG (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Frankreich) verwendet. Zu dem zu

testenden EDTA-Plasma der Probanden wird NucliSENS® Lysis Buffer hinzugegeben, damit alle zellulären Bestandteile und viralen Partikel, die sich im Plasma befinden, zerstört werden. Außerdem inaktiviert der Buffer RNAsen und DNAsen. Um den Isolationsprozess zu initialisieren werden magnetische Silica-Dioxid-Partikel zu der Plasmalösung gegeben, an welche die in der Lösung enthaltenen Nukleinsäuren binden. Während mehrerer aufeinanderfolgender Waschvorgänge werden die Silica-Dioxid-Partikel abgespült und die Nukleinsäuren somit aus der Flüssigkeitsphase herausgelöst. Anschließend liegen die Nukleinsäuren isoliert vor und sind somit verfügbar für den Amplifikations- und Detektionsschritt der NucliSENS EasyQ® HIV-1 Real-Time-PCR.

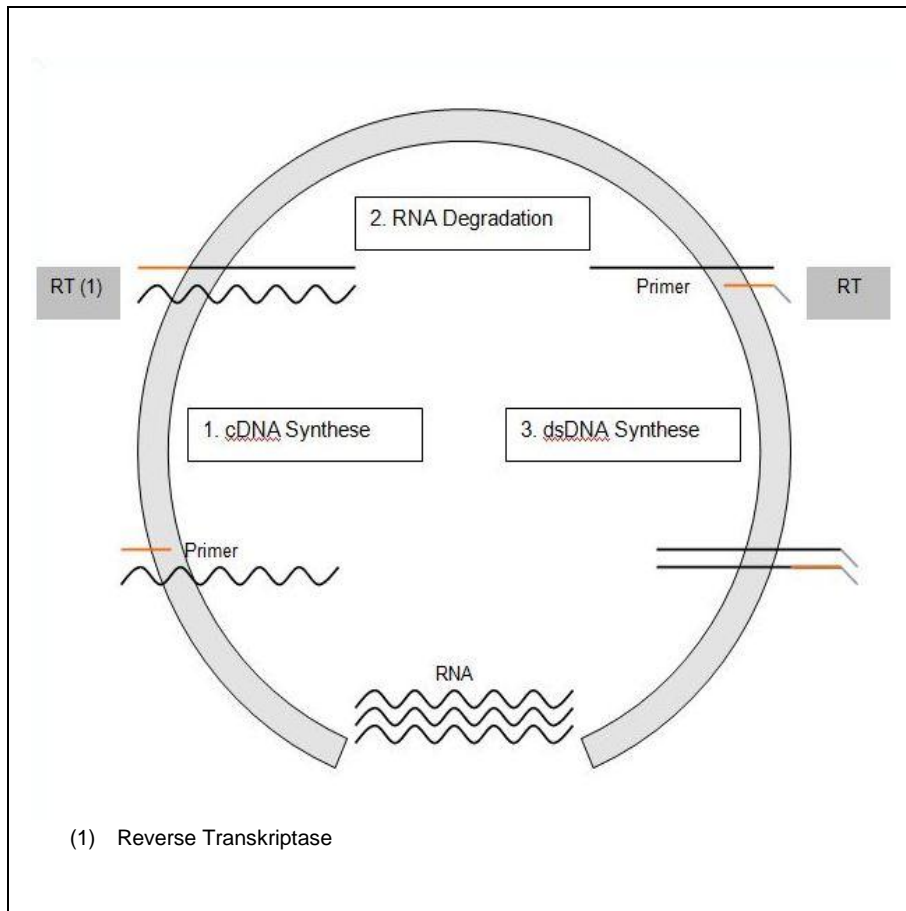
Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist ein in vitro durchgeführtes molekularbiologisches Verfahren zur Amplifizierung spezifischer DNA-Sequenzen durch DNA-Replikation. Im Unterschied zu der herkömmlichen PCR bezeichnet die Real-Time-PCR (RT-PCR) eine Polymerasekettenreaktion mit zusätzlicher Quantifizierung der DNA. Da die Vervielfältigung exponentiell verläuft, lassen sich mittels der RT-PCR nicht nur die gesuchte DNA nachweisen, sondern auch Aussagen über die ursprüngliche Viruskonzentration in der Blutprobe treffen. Bei dem HI-Virus handelt es sich um einen RNA-Virus. Daher muss, um die HIV-1 RNA nachweisen zu können und die Viruslast zu bestimmen, die RNA zunächst mittels Reverser Transkriptase in komplementäre DNA umgeschrieben werden (siehe Abb. 4). Zunächst wird zu der gereinigten Virus-RNA ein Primer hinzugegeben. Dieser bindet an den komplementären RNA-Abschnitt und wird dann durch die Reverse Transkriptase verlängert. Bei NucliSENS EasyQ® HIV-1 Real-Time-PCR handelt es sich dabei um die Reverse Transkriptase des Avian Myeloblastosis Virus. Der duplizierte DNA-Strang wird dann mittels RNase H von der RNA getrennt, was die Bindung eines zweiten Primers an den entstandenen DNA-Strang erlaubt. Nach Verlängerung dieses Primers entsteht Doppelstrang-DNA. Diese wird dann amplifiziert.

Die PCR wird dabei in folgenden drei Schritten durchgeführt:

- (1) Denaturierung: Durch Erhitzen auf etwa 95°C wird die DNA-Matrize in Einzelstränge aufgeteilt.
- (2) Annealing: Die Primer werden bei einer Temperatur von 40°C bis 70°C am jeweils komplementären Teil der DNA-Matrize angelagert.
- (3) DNA-Synthese: Eine hitzestabile DNA-Polymerase wird als Katalysator verwendet, um den Primer am freien 3'-OH-Ende zu verlängern. So entsteht durch Einbau von Desoxynukleotiden (dNTPs) ein neuer DNA-Doppelstrang. Dieser Arbeitsschritt verläuft bei ca. 70°C.

Das Aufeinanderfolgen dieser drei Schritte wird als Zyklus bezeichnet. In der Regel besteht eine PCR aus 20-40 Zyklen, was zur Amplifizierung der DNA führt. Mit Hilfe einer Fluoreszenzmessung - die Fluoreszenz nimmt proportional mit der Menge der PCR-Produkte zu - kann die DNA dann quantifiziert werden. Diese Quantifizierung verläuft in der exponentiellen Phase nach Durchlaufen mehrerer Zyklen, da nur in dieser Phase optimale Reaktionsbedingungen herrschen.





**Abb. 4:** Ablauf der RT-PCR.

### 2.2.2 Prinzip des Poolings anhand der Minipool-Methode

In der vorliegenden Studie wurde die Viruslast mittels RT-PCR bestimmt. Entgegen dem normalen Vorgehen wurde nicht eine Probe einzeln, sondern ein ganzer Pool aus Proben getestet. Dabei wurde folgendermaßen vorgegangen: Basierend auf Erkenntnissen vorausgegangener Studien wurden fünf individuelle Blutproben zu einem Minipool zusammengefügt und die Viruslast eines Pools in Kopien pro Milliliter bestimmt (siehe Abb. 5) (99). Das Prinzip ähnelt dem Dorfman's, wie er es in seiner Studie zum Screening auf Syphilis bereits beschrieb (siehe „Einleitung und Grundlagen der HIV-Infektion“ Abschnitt 1.4.2). Fällt das Ergebnis des Pools negativ aus, ist also keine HIV-1 RNA nachweisbar, kann davon ausgegangen werden, dass alle fünf Patienten, deren Blut gepoolt wurde, eine Viruslast unter der Nachweisgrenze haben. Bei positivem Testergebnis hat mindestens einer der Patienten eine nachweisbare

Viruslast, also Virus-RNA im Blut. Ist das der Fall muss jede Blutprobe des Minipools noch einmal individuell getestet werden, so dass herausgefunden werden kann, welches oder welche Sample den positiven Pool verursacht hat bzw. haben. Das Detektionslevel für einen Milliliter Blutplasma wird vom Hersteller von NucliSENS EasyQ® Version 2 als 25 cps/ml angegeben (106). Durch das Poolen wird jede einzelne Probe verdünnt, was die Sensitivität verringert, da theoretisch die Viruslast einer Probe in einem Pool aus fünf unterschiedlichen Blutproben erst dann detektiert wird, wenn in dieser Probe mehr als 125 cps/ml vorliegen. Das Poolen der Proben soll jedoch als eine Art Screening verwendet werden, wobei Proben mit einer Viruslast über 1000 cps/ml herausgefiltert werden sollen. Dieser Schwellenwert orientiert sich daran, dass die Grenze für virologischen Versagen in Südafrika bei 1000 cps/ml angesetzt ist (107). Viruslasten unterhalb dieser Schwelle sollen nicht genauer bestimmt werden. Daher kann der Verdünnungseffekt in dieser Hinsicht weitestgehend vernachlässigt werden.



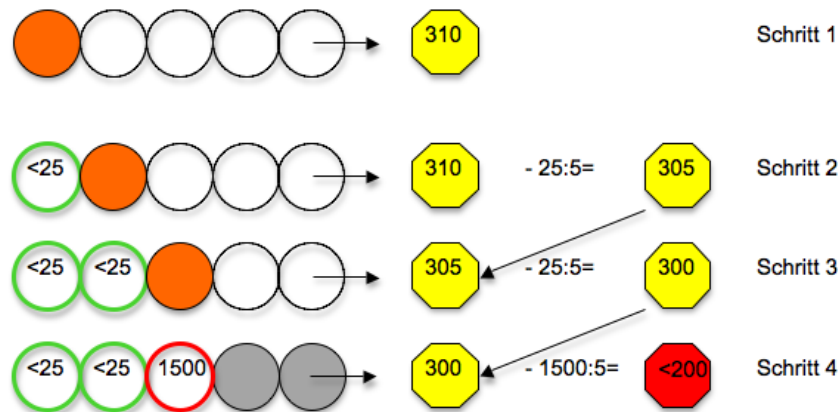
**Abb. 5:** Minipool-Strategie.

5 individuelle Proben (weiße Kreise) werden zu einem Pool zusammengemischt (gelbes Hexagon) und dann getestet.

Um das Nachtesten jeder einzelnen Probe zu umgehen, kann alternativ bei den als positiv getesteten Pools ein spezieller Algorithmus zur Anwendung kommen. Zunächst wird dazu nur die Blutprobe des ersten Patienten wiederholt getestet. Das Ergebnis (angegeben in Viruskopien pro Milliliter, cps/ml) wird durch die Anzahl der Einzelproben, in diesem Beispiel also 5, dividiert und anschließend vom Gesamtpoolergebnis abgezogen. Ist das Resultat immer noch ein positiver Gesamtpool wird das Nachtesten auch mit der zweiten Blutprobe, die in den Pool eingegangen ist, wiederholt. Diese Vorgehensweise ist in Abb. 6 dargestellt: Zunächst muss bestimmt werden, ab welcher Viruslast ein Pool als positiv gilt. Im vorliegenden Beispiel wurde ein Grenzwert von 200 cps/ml festgelegt. Dann wird die Viruslast des Gesamtpools bestimmt (Schritt 1). Da der Wert im Beispiel über der Schwelle liegt ( $> 200$  cps/ml), und der Pool damit

positiv ist, wird nun der Algorithmus angewandt. In Schritt 2 wird die erste Probe individuell getestet und der ermittelte Wert durch fünf dividiert, um dann vom Gesamtpoolergebnis subtrahiert zu werden. Diese Abfolge wird solange durchgeführt, bis die entsprechende Blutprobe, die für das positive Testergebnis des Pools verantwortlich ist, gefunden werden kann. Im Beispiel hat die Probe mit einer Viruslast über 1000 cps/ml den positiven Pool verursacht. Sie ist in der Abb. 6 rot dargestellt. Bei den übrigen Proben (graue Kreise) kann nun angenommen werden, dass deren individuelle Viruslast kleiner als 1000 cps/ml ist, ohne dass sie individuell getestet werden müssen.

Um die Anwendung eines solchen Algorithmus auch für die praktische Routinearbeit nutzbar zu machen, wurde ein spezielles Programm entwickelt und veröffentlicht: der Measurement Enhanced Pooling Assay Calculator (MEPAC) der University of California, San Diego. Mit dessen Hilfe wird die Detektion der Blutproben eines positiven Pools, die über dem Schwellenwert liegen, vereinfacht. Er ist online verfügbar (99). Dazu muss allein das Gesamtergebnis des Pools eingegeben werden. Anschließend erfragt das Programm die Ergebnisse bestimmter Einzelproben. Deren Test muss dann wiederholt werden, um die Viruslast der entsprechenden Probe zu ermitteln. Das Prinzip ähnelt dem vorher geschilderten Vorgehen, ist aber dahingehend vereinfacht, dass die Berechnungen automatisch über MEPAC erfolgen. Somit wird die manuelle Dekonvolution des Pools erspart.



**Abb. 6** Minipoolstrategie mit Anwendung des Algorithmus.

Jeder Kreis repräsentiert eine Blutprobe. Jedes gelbe Hexagon repräsentiert einen Pool aus fünf individuellen Proben. Bei den Zahlen in den Kreisen handelt es sich um die Viruslast der individuellen Proben, angegeben in cps/ml Blut. Die orangefarbenen Kreise stellen die Proben dar, deren individuelle Viruslast im nächsten Schritt ermittelt werden muss, um die positiven Proben zu identifizieren.

## 2.2.3 Verwendung von Blutplasma

### 2.2.3.1 Studienpopulation

Bei der retrospektiv durchgeführte Analyse, die den Experimenten voraus ging, konnten Variablen ermittelt werden, die die Vorauswahl der Patienten ermöglichen (siehe Tab. 1). Nähere Informationen hierüber sind in der Dissertation von Susanne Potschka zu finden. Durch die Anwendung der Vorauswahlkriterien sollte erreicht werden, dass die Wahrscheinlichkeit für ein virales Versagen unter ART bei der Studienpopulation möglichst gering ist. Denn die Effizienz der Minipool-Strategie hängt entscheidend von der Prävalenz der Therapieversager innerhalb der Studienpopulation ab. Je mehr Blutproben mit einer hohen Viruslast in einen Pool eingehen, desto mehr Tests werden benötigt (108).

**Tab. 1:** Variablen zur Vorauswahl der Patienten.

Vorauswahlkriterium	Bemerkung
Regimen der antiretroviralen Therapie	Voraussetzung war, dass die Patienten HIV positiv waren und eine First-Line Therapie bekamen; das heißt, dass es sich um eine NNRTI (Efavirenz oder Nevirapin) basierte Medikation handelte.
Alter des Patienten	Nur Patienten mit einem Alter über 15 Jahren wurden in die Studie aufgenommen.
Volumen der Blutprobe	Das Volumen musste über 500 µl betragen, um zu vermeiden, dass später eventuell zu wenig Plasma zur Verfügung stand.
Teilnahme an anderen Studien	Keiner der in diese Studie einbezogenen Patienten war in eine andere Studie eingeschlossen.

Das Schema in Abb. 7 zeigt die Vorgehensweise zur Identifizierung demographischer Informationen, anhand derer Patienten, bei denen eine hohe Viruslast, definiert als über 1000 cps/ml, zu erwarten war, vorab ausgeschlossen werden konnten. Die Informationen wurden aus den Anforderungsbögen für das Testen der Viruslast entnommen. Patienten, die keine Informationen zu einer Basistherapie hatten oder die in Tab. 1 geschilderten Vorauswahlkriterien nicht erfüllten, wurden von der Studie ausgeschlossen.

Als Probenmaterial diente bereits im Rahmen der routinemäßigen Kontrollen getestetes Blutplasma. Somit konnten die Ergebnisse der bereits durchgeführten individuellen Tests als Vergleichswert für die Viruslastresultate der einzelnen Pools dienen. Die venösen Blutentnahmen wurden an den einzelnen Community-Krankenhäusern, die mit dem Tygerberg Hospital vernetzt sind, von ausgebildetem, medizinischem Personal vorgenommen. Dann wurden die Proben an das Labor der Abteilung für klinische Virologie der NHLS Tygerberg versandt und dort nach der routinemäßigen Viruslastbestimmung zunächst gefroren gelagert. Für die vorliegende Studie

wurden sie dann aufgetaut und anschließend zur Viruslastbestimmung verwendet. Eine Liste der einzelnen Krankenhäusern der Region Western Cape, die in die Studie einbezogen wurden, findet sich im Anhang (siehe Anhang, Liste der Krankenhäuser).

Insgesamt ergab sich eine Studienpopulation aus 1753 Patienten, die die Einschlusskriterien erfüllten.

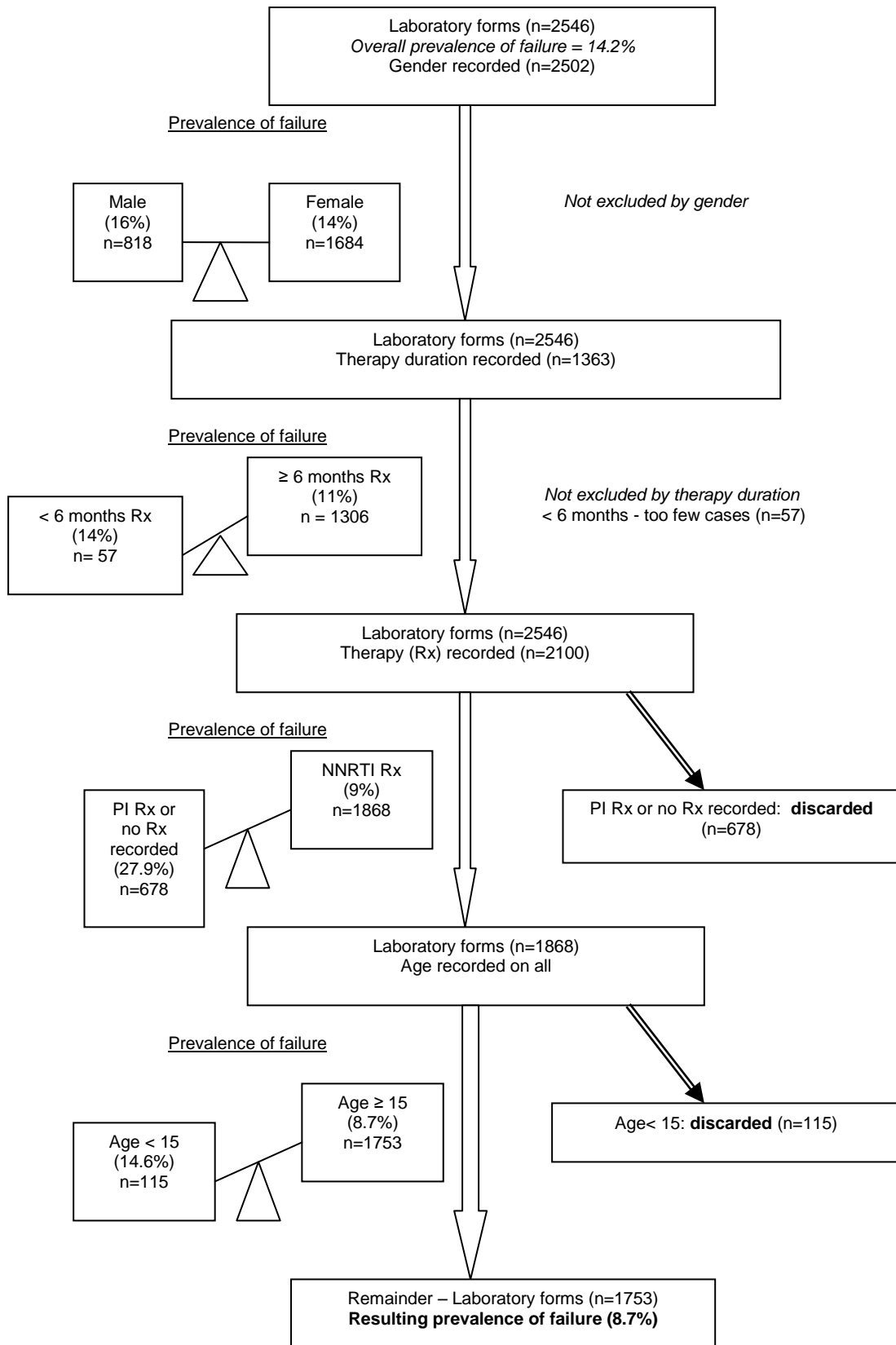


Abb. 7: retrospektive Analyse.

### 2.2.3.2 Technische Vorgehensweise

Nachdem die Studienpopulation selektiert war, wurden die Effizienz und die Genauigkeit, sowie der Arbeitsaufwand von Minipool- und Matrixmethode im Vergleich zu individueller Plasmatestung ermittelt.

Zunächst wurde eine Viruslast-Grenze in cps/ml definiert, die abgrenzen lässt, ob die ART erfolgreich ist oder ob es sich um ein Therapieversagen handelt. Die Schwelle bei 1000 cps/ml Blut anzusetzen wurde für die vorliegende Studie als angemessen betrachtet. Denn in Südafrika wird momentan eine Viruslast von über 1000 HIV-1 RNA cps/ml bei einem HIV-positiven Patienten unter antiretroviraler Therapie als Therapieversagen angesehen (107). Ist dies der Fall, wird das Virus durch die Medikation nicht suffizient supprimiert, was eine Umstellung des Medikationsschemas erfordert. Bei einer Poolgröße von fünf Proben und einem Poolvolumen von 1 ml entspricht der Wert von 1000 cps/ml in einer nicht-gepoolten Einzelprobe durch die Verdünnung, die das Poolen zur Folge hat, 200 cps/ml in jeder Probe des Pools. Das heißt ein Pool wurde dann als positiv definiert, wenn mehr als 200 HIV-1 RNA cps/ml Blut nachgewiesen werden konnten. Lag das Ergebnis unter 200 cps/ml wurde der Pool als negativ definiert. In solch einem Fall kann davon ausgegangen werden, dass die Viruslasten der Blutproben aller fünf Probanden, die sich in einem Pool vereinen, jeweils unter 1000 cps/ml liegen. Die Blutproben der Studienteilnehmer ergaben 80 Minipools, die in zwei Testdurchläufen mit je 40 Minipools mittels RT-PCR erfolgten.

Basierend auf den Angaben aus vorangegangenen Studien wurden fünf Samples jeweils zu einem Minipool vermischt (99). Das bei -80 C° gelagerte Plasma aus Routineuntersuchungen des Labors wurde bei Raumtemperatur aufgetaut. Von jeder Teilprobe wurden 205 µl entnommen und in ein Eppendorf Gefäß zusammengefügt. Anschließend wurde der Inhalt drei Sekunden auf einem Vortex-Mixer vermischt. Alle Tests zur Bestimmung der Viruslast wurden an der NucliSENS® EasyQ HIV-1 Version 2.0 Maschine (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Frankreich) durchgeführt, deren Nachweisgrenze bei einem Füllvolumen von 1 ml Plasma bei 25 HIV-1 RNA cps/ml liegt (109).



Bei der Auswertung der Effizienz der Methode wurde die Anwendung von MEPAC im Vergleich zur Nachtestung aller Blutproben eines positiven Pools beurteilt. Die Validität wurde für die Pooling-Strategie ohne und mit Nachtestungen bestimmt. Die Berechnungen wurden mittels Microsoft® Excel 2010 durchgeführt.

Um den zeitlichen Arbeitsaufwand der Minipoolmethode mit dem der Matrixmethode vergleichen zu können, wurde bei jedem Testdurchlauf die Zeit, welche benötigt wurde, um fünf individuelle Blutproben zu einem Pool mit einer Größe von fünf Samples zu mischen mittels einer Stoppuhr gemessen.

## 2.2.4 Verwendung von Dried Blood Spots

### 2.2.4.1 Studienpopulation

Für diesen Studienteil wurden alle Blutproben, die in das virologische Labor (NHLS, Tygerberg) in dem Zeitraum vom 8. bis zum 10. Dezember 2009 zur Viruslastbestimmung eingesendet wurden, gesammelt. Nur Samples mit einem Volumen von mindestens 4 ml wurden eingeschlossen, um zu gewährleisten, dass noch genügend überbleibendes Volumen für die Routinediagnostik zur Verfügung steht. Von 453 in das Labor eingegangenen Blutproben wurden 349 Samples auf Filterpapier getropft. Jeweils 10 Tropfen pro Patient konnten mit einer 50 µl Pasteurpipette angefertigt werden.



**Abb. 8:** Dried Blood Spots.

Die Blutropfen wurden über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet. Anschließend wurden sie in wieder verschließbare Plastik-Tüten zusammen mit Antikondensationsperlen verpackt und für mindestens einen Monat gelagert. Die Filterpapierkarten wurden mit Hilfe der dazugehörigen Anforderungsformulare nach den oben genannten Auswahlkriterien selektiert. Die ersten 200 Patienten, deren Informationen auf dem Anforderungsbogen den Kriterien entsprachen, wurden in die Testserie einbezogen.

### 2.2.4.2 Technische Vorgehensweise

Unter dem Begriff Dried Blood Spot (DBS) versteht man einen auf Filterpapier getropften, getrockneten Tropfen Blut mit der definierten Menge von 50µl. Als Vorbereitung auf die Viruslast-Tests wurden die Dried Blood Spots manuell unter Benutzung desinfizierter Scheren aus den Filterpapieren ausgeschnitten und anschließend in unterschiedlichen Volumina des NucliSENS® Lysis Buffers (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Frankreich) eluiert. Die Röhrchen wurden bei Raumtemperatur für 30 Minuten auf einem Roller Mixer geschüttelt, um die HIV-1 RNA von den Filterpapieren zu lösen. Anschließend wurden sie bei 3000 U/min für 30 Sekunden zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues sauberes Röhrchen transferiert und nochmals bei 3000 U/min 30 Sekunden lang zentrifugiert, damit sich die übergebliebenen Papierfasern am Boden des Röhrchens absetzen. Vom Residualvolumen wurden 2 ml in die Plattform des NucliSENS® easyMAG™ (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Frankreich) gefüllt. Im „off-board“ Programm wurde weiter nach den Instruktionen des Herstellers verfahren. Unter „off-board“ versteht man das Überspringen des lysierenden Schrittes, der durch das Hinzufügen des Lysis Buffers bereits manuell durchgeführt wurde.

Den Tests an Dried Blood Spots gingen einige Experimente voraus: Hier wurde zunächst getestet, wie sich der Wert für die Viruslast eines DBS im Vergleich zum Ergebnis der Real-Time-PCR am Plasma eines einzigen Patienten verhält. Außerdem wurden unterschiedlich viele DBS, je 50 µl Blut enthaltend, in verschiedenen Volumina NucliSENS® Lysis Buffer (NucliSENS EasyQ® Basic Kit, bioMérieux, Marcy l'Etoile, Frankreich) eluiert und unterschiedliche Schwellenwerte als Definition für „Therapieversagen“ untersucht. Mit diesen

Vorexperimenten sollte die Anzahl an DBS pro Patient sowie die Lysis Buffer Menge herausgefunden werden, mit der die Viruslastergebnisse der DBS am ehesten denen des Plasmas entsprechen (siehe Anhang, Vorexperimente zu den DBS).

Folgende Spotmengen und Schwellenwerte wurden dabei probeweise getestet: Ein DBS pro Patient wurde in 3 ml NucliSENS® Lysis Buffer eluiert und die Viruslast-Ergebnisse der Minipools anschließend anhand der einen positiven Pool definierenden Schwellen von 133, 200, 400 und 1000 HIV-1 RNA cps/ml beurteilt. Die Schwellenwerte wurden nach folgenden Überlegungen gewählt: Bei einer Poolgröße von 5 Proben entsprechen 200 cps/ml insgesamt einer positiven Einzelprobe mit 1000 cps/ml. Bei dem Schwellenwert von 133 cps/ml wurde der Aspekt miteinbezogen, dass eine Teilmenge des Eluens vom Filterpapier wieder absorbiert wurde (schätzungsweise ein Drittel der hinzugegebenen 3 ml NucliSENS® Lysis Buffer). Die anderen Schwellen entsprechen einem Vielfachen von 200.

Außerdem wurden zwei DBS pro Patient in 10 ml NucliSENS® Lysis Buffer eluiert und bei einer Schwelle von 200 und 300 cps/ml getestet. Im Falle eines nicht eindeutigen Poolergebnisses wurden alle fünf darin enthaltenen Einzelproben noch einmal wiederholt getestet. Diese Pools gingen also ebenfalls in die Auswertung mit ein.

## **2.2.5 Verwendung von Dried Plasma Spots**

### **2.2.5.1 Patientenpopulation**

Zur Viruslasttestung an Dried Plasma Spots (getrockneten Tropfen aus Blutplasma, DPS) wurde dieselbe Patientenpopulation, wie bei den zuvor beschriebenen DBS, herangezogen. Somit konnte die Effizienz und die Genauigkeit von gepoolten DBS und DPS sowohl miteinander, als auch mit den Ergebnissen der individuellen Viruslasttestung verglichen werden.

### **2.2.5.2 Technische Vorgehensweise**

Von den Proben, die bereits in den DBS-Studien-Teil einbezogen waren, wurden parallel zu den DBS jeweils fünf DPS angefertigt. Für das Pooling

wurde je ein Spot von jedem der fünf Patienten in 3 ml NucliSENS® Lysis Buffer eluiert. Nach der Inkubation der Reagenzien für 30 Minuten auf einem Roller Mixer wurden sie für weitere 30 Sekunden bei 3000 U/min zentrifugiert. 2 ml des Residualvolumens wurden aspiriert und die Flüssigkeit in die NucliSENS® EasyMAG™ Maschine eingefügt. Der die Proben lysierende Schritt wurde unter Benutzung des „off-board“ Programms übersprungen. Die Ergebnisse der aus DPS angefertigten Minipools wurden anhand unterschiedlicher Schwellen, die einen Pool als positiv definieren, beurteilt. Sowohl die Ergebnisse bei einer Schwelle von 133 cps/ml als auch bei 200 cps/ml wurden untersucht und beurteilt.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Auswertung der Minipoolmethode bei Verwendung von Blutplasma

##### 3.1.1 Häufigkeit von HIV-Nachweis in der Studienpopulation

In die Testreihe der Minipoolmethode wurden insgesamt 400 Patienten einbezogen. Die Population ist nach den in Tab. 1 aufgeführten Auswahlkriterien bestimmt worden. Die Blutproben der Studienteilnehmer wurden zu 80 Minipools gemischt, die in zwei Testdurchläufen zu jeweils 40 Pools getestet wurden. Die hier genannten Ergebnisse beziehen sich auf die Gesamtheit der Studienteilnehmer, also 400 Personen.

23,75% der Teilnehmer hatten eine Viruslast höher als 50 cps/ml Blut. Darunter hatten 14,25% der Teilnehmer eine Viruslast zwischen 50 und 1000 cps/ml Blutplasma und bei 9,50% der Teilnehmer wurde eine Viruslast von mehr als 1000 cps/ml Blut nachgewiesen. Die Spanne der Viruslastergebnisse bewegte sich zwischen 50 cps/ml und 470000 cps/ml. 76,25% der Viruslastergebnisse lagen unter der Nachweisgrenze von 25 cps/ml.

**Tab. 2:** Charakteristik der Proben, die in die Minipools einbezogen wurden sind.

Parameter	Ergebnis
HIV RNA Viruslast	Plasma Minipool (n=400)
Mittlere log <sub>10</sub> VL	2.88
VL Bereich (cps/ml)	50-470000
VL > 1000 (cps/ml)	9.50%
50<VL<1000 (cps/ml)	14.25%
VL>50 (cps/ml)	23.75%

### 3.1.2 Studienteilnehmer

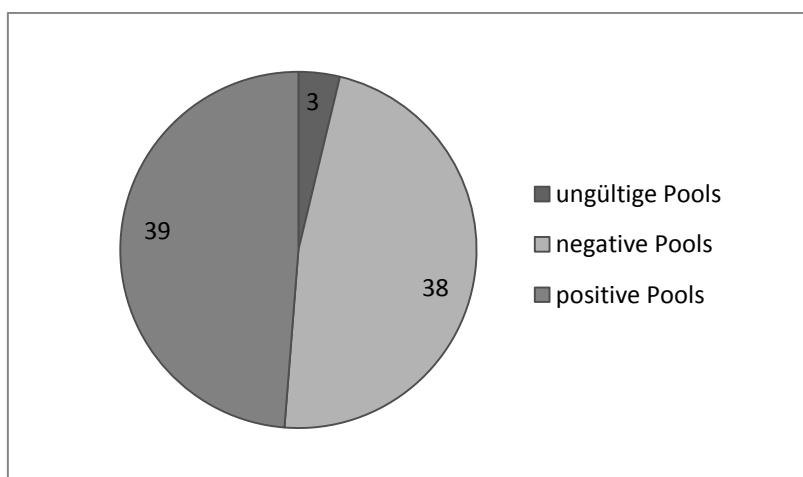
Für drei Pools der insgesamt 80 getesteten konnte aus technischen Gründen mittels RT-PCR kein eindeutiges Viruslastergebnis ermittelt werden. Die genaue Ursache dafür ist unbekannt. Die 15 Proben, die in diese Pools eingeflossen sind, wurden nicht in die Ergebnisse einbezogen. Somit konnten insgesamt aus der Studienpopulation von 400 Patienten 385 Teilnehmer-Blutproben, die in 77 Minipools getestet wurden, ausgewertet werden.

### 3.1.3 Zeitaufwand

Durchschnittlich wurden 54 Sekunden benötigt, um einen Pool fertig zu stellen. Um die NucliSENS® EasyQ Maschine voll zu beladen, sollten 20 Proben vorhanden sein, denn nur so kann vermieden werden, dass „freie Plätze“ in der Maschine die Effizienz der Methode senken. Für die Fertigstellung von 20 Minipools, also 100 Blutproben, war durchschnittlich eine Zeit von 35,5 Minuten erforderlich.

### 3.1.4 Validität der Methode

Insgesamt waren 39 Pools positiv, 38 hatten ein negatives Ergebnis und in 3 Fällen konnte die Viruslast nicht eindeutig bestimmt werden, da ein nicht näher bezeichneter Fehler im Testdurchlauf des Geräts auftrat.



**Abb. 9:** Anzahl der negativen, positiven und ungültigen Pools.

Von den 39 positiven Pools ergaben sich 13 als falsch positiv (FP). Der Viruslastwert dieser Pools wurde jeweils als über 200 cps/ml (die Spanne reichte von 240 cps/ml bis 1800 cps/ml) angegeben, womit der Pool definitionsgemäß als positiv galt. Jedoch hatte keine der einzelnen Proben, die in diesen Pools getestet wurden, eine Viruslast von über 1000 cps/ml, weshalb die Pools als falsch positiv betrachtet werden müssen. Unter den negativen Pools fanden sich zwei falsch negative (110).

Durch das Nachtesten mittels erneuter Viruslastbestimmung jeder einzelnen Probe des entsprechenden Pools würden die als falsch positiv gewerteten Pools aufgedeckt werden. Die falsch negativen würden bei einem realen Durchlauf des Testverfahrens ohne Vergleichswerte jedoch unentdeckt bleiben.

Der positive Vorhersagewert der Minipooltestmethode unter Einbezug der notwendigen Nachtestungen betrug also 100%. Ohne diese würde er einen Wert von 65% erreichen. Als jeweils 95% wurde der negative Vorhersagewert kalkuliert. Spezifität und Sensitivität betrug jeweils 100% und 93% mit Wiederholungstests; ohne ergaben sich Werte von jeweils 72% und 93%. Um die Validität der Minipoolstrategie zu beurteilen, sind letztendlich die Werte ausschlaggebend, die sowohl die einzelnen Tests der Pools, wie auch die Kontrolltestungen der Pools mit positivem Ergebnis miteinbeziehen.

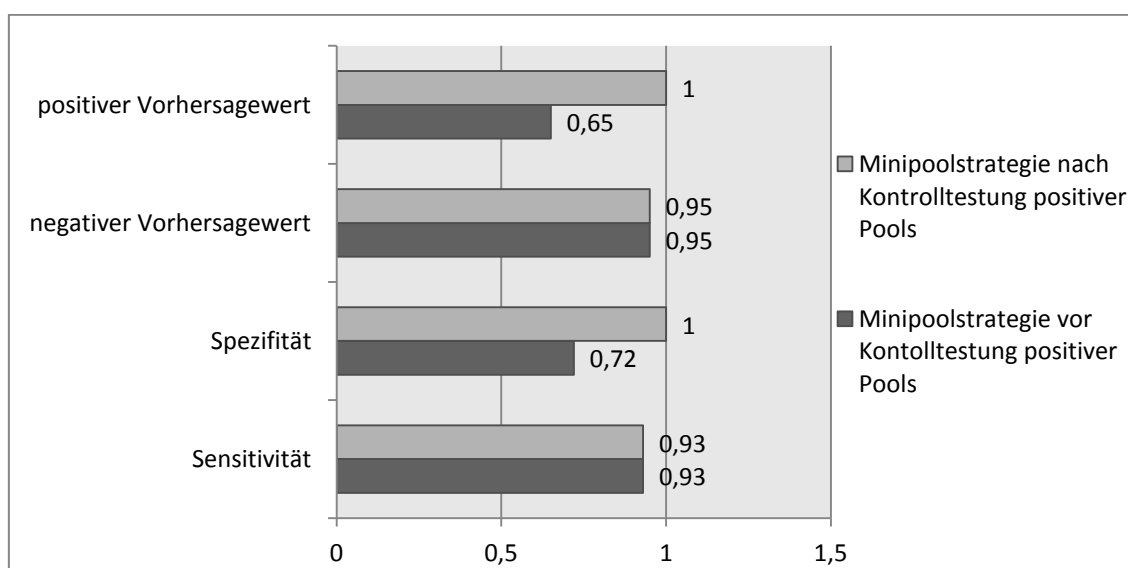


Abb. 10: Auswertung der Poolingstrategie.

**Tab. 3:** Auswertung der Pools. Vergleich der Ergebnisse ohne Durchführung der Kontrolltest und mit Durchführung der Kontrolltests aller positiven Pools.

	Ergebnisse vor Kontrolltestung	Ergebnisse nach Kontrolltestung
FN	2	2
FP	13	0
ungültig	3	3
TN	36	36
TP	26	39
Gesamtergebnis	80	80

## 3.2 Minipoolmethode mit und ohne Anwendung des Measurement Enhanced Pooling Assay Calculator (MEPAC) Algorithmus

### 3.2.1 Effizienz und Kosten ohne Anwendung des MEPAC Algorithmus

Bei der folgenden Auswertung wurde die Viruslast aller im Pool beinhalteten Einzelproben noch einmal bestimmt, wenn der entsprechende Pool ein positives Ergebnis aufwies.

Von den insgesamt 80 angefertigten Minipools war die Viruslast von drei Pools nicht auswertbar (siehe „Ergebnisse“ Abschnitt 3.1.2), diese Tests wurden aus der Wertung ausgeschlossen. 38 Pools hatten ein negatives Ergebnis, das heißt die Viruslast des gesamten Pools war kleiner als 200 cps/ml Blut. Bei 39 Pools war eine Viruslast über 1000 cps/ml nachweisbar. Der Wert lag damit also deutlich über der festgelegten Schwelle von 200 cps/ml pro Pool. Alle Einzelproben dieser 39 Pools wurden nochmals getestet, um die einzelnen Probanden mit einer Viruslast oberhalb von 1000 cps/ml zu ermitteln. Das führte zu einer Anzahl von 195 Wiederholungstests. Insgesamt wurden also 272 Tests durchgeführt und damit im Vergleich zur Viruslastbestimmung von jeder individuellen Proben im Einzeldurchgang 113 Tests eingespart. Das heißt



nur 70,65% der 385 Test, die beim individuellen Testverfahren hätten durchgeführt werden müssen, wurden unter Anwendung der Minipoolstrategie benötigt. Die Anzahl der Tests konnte also um 29,35% reduziert werden.

**Tab. 4:** Auflistung der Anzahl der Tests.

	Anzahl
Ungültige Pools	3
Negative Pools	38
Positive Pools	39
Wiederholungstests	195
Tests insgesamt	272
Eingesparte Tests	113
Effizienz	29,35%

Pro Test wurden Kosten von US\$ 40, welche während des Zeitpunktes der Studie ca. ZAR 300 entsprachen, einkalkuliert. Die Anwendung der Minipoolstrategie bei den 385 Blutproben würde sich also auf einen Preis von US\$ 10880 belaufen, statt der US\$ 15400, die bei der üblichen Viruslasttestung jeder Blutprobe im Einzelnen hätten aufgewendet werden müssen. Bei der Effizienz von 29,35% entspricht die Summe, die pro 100 Tests gespart werden konnte US \$ 1174.

### **3.2.2 Effizienz und Kosten unter Anwendung des MEPAC Algorithmus**

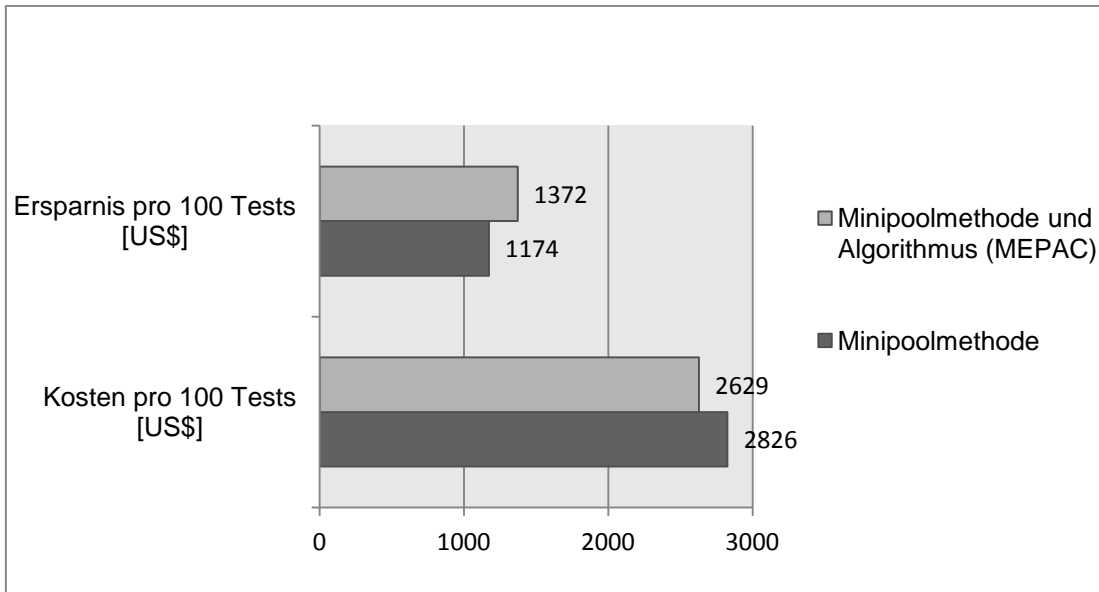
Bei der Auswertung wurde in diesem Teil der Studie, wie unter Punkt 2.3 des „Material und Methoden“ Kapitels beschrieben, der Measurement Enhanced Pooling Assay Calculator (MEPAC) der University of California, San Diego benutzt.

Bei der Anwendung dieses Programmes mit Befolgen des vorgegeben Algorithmus wurden statt der 385 Tests bei der herkömmlichen Testmethode nur 253 Tests benötigt. Unter Anwendung von MEPAC konnte also eine

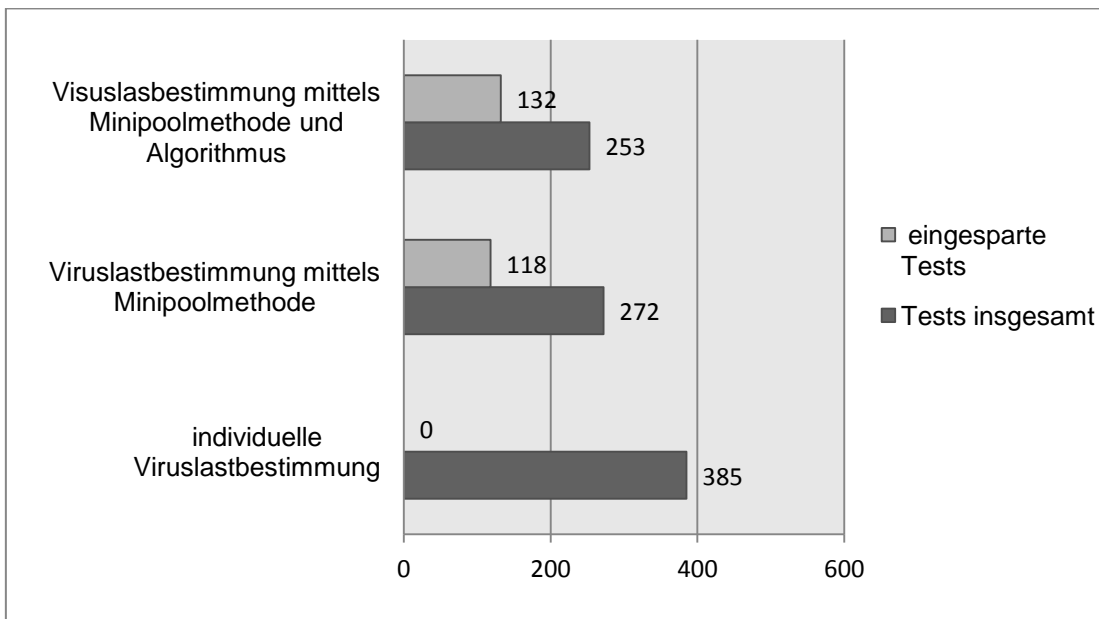
Effizienz von 34,29% erzielt werden. Bei einer Kostenbemessung von US\$ 40 pro Test beträgt der Preis für die Durchführung US\$ 10120, im Vergleich zu US\$ 15400 für die 385 Proben bei der gängigen Vorgehensweise, bei der jede Blutprobe individuell getestet wird. Dies entspricht einer Kostenersparnis von insgesamt US\$ 1372 für 100 Tests.

### **3.2.3 Vergleich der Minipoolmethode mit und ohne Anwendung von MEPAC**

Unter Anwendung des Algorithmus konnte eine höhere Effizienz der Methode erreicht werden. Sie belief sich auf 34,29% im Vergleich zu 29,35% bei der Minipoolmethode mit Aufschlüsselung des gesamten positiven Pools. Bei der Verwendung des Algorithmus wurden lediglich 253 Tests statt der 272 bei dem alleinigen Gebrauch der Minipoolstrategie benötigt. Die herkömmliche Viruslastbestimmung hätte 385 Tests erfordert. Mit einem Kostenpunkt von US\$ 2628 für je 100 Tests war die Anwendung des Algorithmus im Vergleich überlegen. Der preisliche Aufwand der Tests zur Bestimmung der Viruslast mit Hilfe der Pools, jedoch ohne MEPAC belief sich auf US\$ 2826. Die Ersparnisse für 100 Tests im Vergleich zur Viruslastbestimmung jeder Patientenprobe individuell betragen unter Anwendung der Minipools und mit MEPAC US\$ 1372. Mit der Minipoolstrategie, ohne Gebrauch vom Algorithmus des MEPAC zu machen, konnten US\$ 1174 für je 100 Tests gespart werden.



**Abb. 11:** Kostenbemessung der Minipoolmethode. Verglichen werden in dieser Abbildung die Anwendung von MEPAC und die Vorgehensweise, in der jede Blutprobe eines positiven Pools erneut einzeln getestet wird.

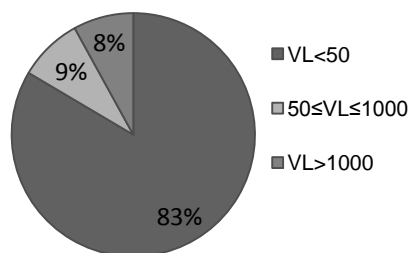


**Abb. 12:** Vergleich der Anzahl der Tests.

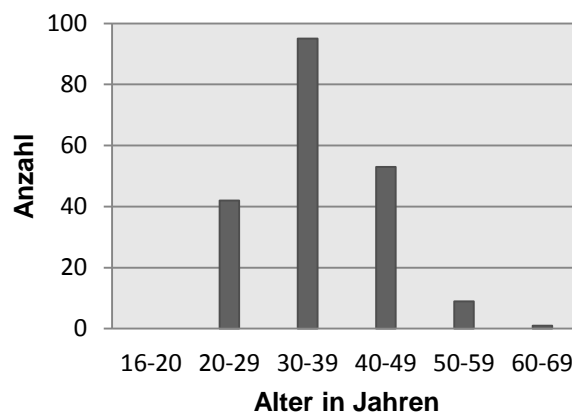
### 3.3 Auswertung der Minipoolmethode bei Verwendung von Dried Blood Spots und Dried Plasma Spots

#### 3.3.1 Studienpopulation

Von den Blutproben, die im Zeitraum vom 08. Dezember 2009 bis zum 10. Dezember 2009 in das virologische Labor der NHLS Tygerberg eingegangen sind, wurden die ersten 200 Proben, die den Auswahlkriterien entsprachen (siehe Tab. 1), in die Studie aufgenommen. Die Patienten hatten ein Durchschnittsalter von 36 Jahren und standen bis zur Blutentnahme durchschnittlich 10,9 Monate unter antiretroviraler Therapie. Die HIV-1-Viruslast lag bei 83% der Population unter der Nachweisgrenze, bei 9% zwischen 50 und 1000 cps/ml und 8% der Patienten hatten eine Viruslast von über 1000 Virus RNA-Kopien pro Milliliter Blut.



**Abb. 13:** Viruslastprävalenz der Studienpopulation.



**Abb. 14:** Altersverteilung der Studienpopulation.

Bei der Auswertung der Therapieschemata ergab sich folgende Verteilung:

75 der 200 Patienten bekamen eine Medikamentenkombination aus Stavudin, Lamivudin und Efavirenz (d4T, 3TC, EFV), 61 Patienten erhielten Stavudin, Lamivudin und Nevirapin (d4T, 3TC, NVP), 30 Zidovudin, Lamivudin und Nevirapin (AZT, 3TC, NVP), 23 Patienten standen unter antiretroviraler Medikation mit Zidovudin, Lamivudin und Efavirenz (AZT, 3TC, EFV), sechs Patienten nahmen Tenofovir Disoproxil Fumarat kombiniert mit Lamivudin und Efavirenz (TDF, 3TC, EFV) ein. Tenofovir Disoproxil Fumarat, Lamivudin und

Nevirapin (TDF, 3TC, NVP) erhielten zwei der 200 Probanden. Jeweils ein Patient erhielt eine Kombination aus Zidovudin, Didanosin und Efavirenz (AZT, ddi, EFV), Stavudin, Lamivudin, Efavirenz und Zidovudin (d4T, 3TC, EFV, AZT) bzw., Stavudin und Nevirapin (TDF, d4T, NFP).

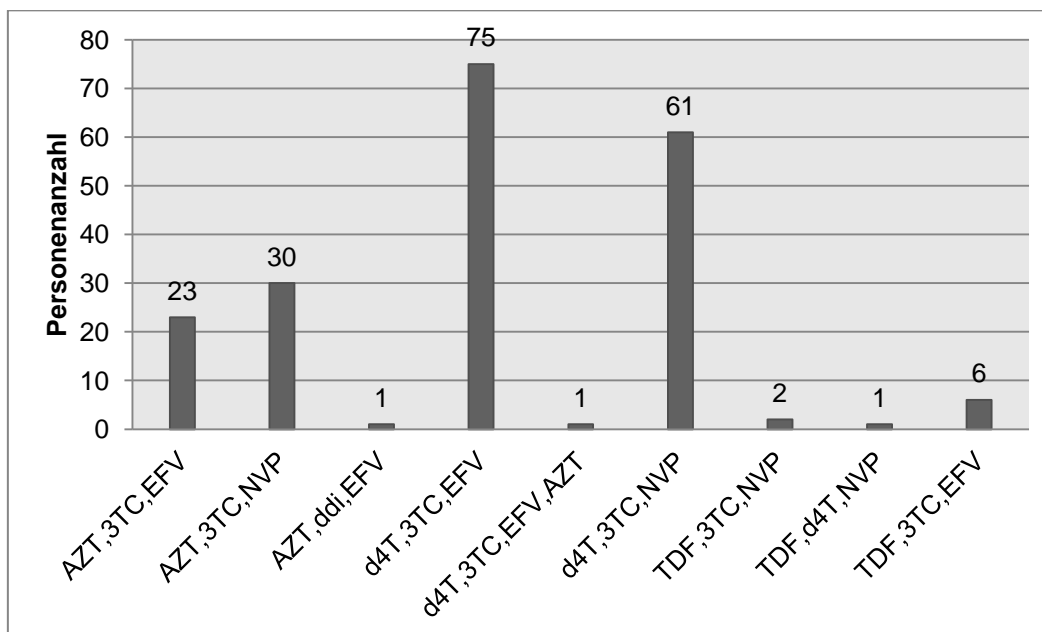


Abb. 15: Anzahl der Patienten, die die jeweilige Medikamentenkombination erhielten.

### 3.3.2 Antiretrovirale Therapie und Viruslast der Studienteilnehmer

#### 3.3.2.1 Dried Blood Spots

Von der ausgewählten Studienpopulation wurden 100 Patienten in den Teil der Studie einbezogen, in dem die Minipoolstrategie an DBS untersucht wurde. Die Viruslastergebnisse dieser Teilnehmer erstreckten sich über einen Bereich von 53 bis 94000 cps/ml Blut. Bei 80% der Patienten war keine HIV-1 RNA im Blut nachweisbar. Das heißt 20 % der Studienteilnehmer hatten eine Viruslast über 50 cps/ml. Davon befanden sich die Werte von 11% der Patienten in einem Bereich von 50 bis 1000 cps/ml Blut. 9% hatten eine Viruslast mit einem Wert über 1000 cps/ml (siehe Tab. 5).

#### 3.3.2.2 Dried Plasma Spots

Alle 200 Patienten der ausgewählten Studienpopulation sollten ursprünglich in diesen Teil der Studie einbezogen werden.

Nachdem sowohl die DBS als auch die individuellen Routinetests an denselben Blutproben durchgeführt wurden, blieb von drei Proben zu wenig Plasma übrig, als dass noch die DPS hätten angefertigt werden können. Deshalb mussten die drei Patienten von denen das Blut stammte, aus der Studie zu den DPS ausgeschlossen werden. Ein Auffinden der Personen und erneutes Blutabnehmen war aus logistischen Gründen nicht möglich. Da diese drei Plasmaproben in drei unterschiedlichen Minipools, mit je einer Größe von fünf Samples, repräsentiert waren, mussten insgesamt drei Minipools, also 15 individuelle Proben ausgeschlossen werden. Daher konnten anstatt von 200 Proben nur 185 in die Studie aufgenommen werden.

Der Bereich der Viruslastwerte der verwendeten Blutproben erstreckte sich von 51 cps/ml bis 260000 cps/ml Blut. Insgesamt 16,22% der Probanden hatten über 50 HIV-1 RNA cps/ml in ihrem Blut. Davon befanden sich 8,65% der Werte im Bereich von 50 bis 1000 cps/ml. 7,57% der Studienteilnehmer hatten eine Viruslast von über 1000 cps/ml Blut. Bei 83,79% lag die Viruslast unterhalb der Nachweisgrenze.

**Tab. 5:** Übersicht über die Viruslast der Studienteilnehmer.

HIV RNA Last (75)	DBS Minipool (n=100)	DPS Minipool (n=200)
Mittlere log <sub>10</sub> VL	2.94	2.39
VL Bereich (cps/ml)	53-94000	51 -260000
VL > 1000	9.00%	7.57%
50<VL<1000	11.00%	8.65%
VL>50	20.00%	16.22%

### 3.3.3 Minipoolmethode mittels Dried Blood Spots

#### 3.3.3.1 Ergebnisse der Vorexperimente

Bei den Vorexperimenten ergab sich zunächst, dass die PCR an DBS und am Plasma derselben Probe zwar nicht exakt die gleichen Werte lieferten. Die

Viruslast lag aber im gleichen Größenbereich. Beispielsweise hatten alle Proben, deren Viruslast im Plasma als LDL bestimmt wurde, auch bei der Verwendung von DBS eine sehr niedrige Viruslast (siehe Anhang). Die DBS wiederum, für deren Plasmaproben sich eine Viruslast deutlich über 1000 cps/ml ergab, zeigten ebenfalls Werte, die für ein Therapieversagen sprechen würde (>1000 cps/ml). Die Viruslastbestimmung an DBS war jedoch nur dann aussagekräftig, wenn die Spotmenge pro Patient nicht größer war als fünf DBS. Je mehr DBS verwendet wurden, desto häufiger konnte durch NucliSENS® EasyQ kein eindeutiges Viruslastergebnis ermittelt werden. Die Vorexperimente zeigten, dass eine Anzahl von zwei DBS pro Patient aufgelöst in 2 ml NucliSENS® Lysis Buffer die praktikabelste Konstellation darstellte.

Die Viruslastwerte, die beim Poolen ermittelt wurden, lagen nicht im Größenbereich der individuellen Einzelergebnisse. Dennoch konnten sowohl bei einer Poolgröße von fünf Proben mit je einem DBS pro Patient, aufgelöst in 3 ml NucliSENS® Lysis Buffer, als auch bei einer Poolgröße von fünf Proben mit je zwei DBS pro Patient, aufgelöst in 10 ml NucliSENS® Lysis Buffer, einige Parallelen zu der konventionellen Viruslastbestimmung erkannt werden. Die Viruslastwerte der Pools, deren kalkuliertes Gesamtergebnis, ermittelt durch Addition der Einzelergebnisse aus den individuellen Viruslasttests, positiv ausgefallen war, ergaben auch bei der realen Durchführung des Test am Pool einen Wert von mehr als 1000 cps/ml (siehe Anhang). Deshalb wurden diese beiden Poolkonstellationen a und b genauer untersucht.

#### 3.3.3.2 Effizienz der Methode

##### *Poolkonstellation a: Ein DBS pro Patient in 3 ml NucliSENS® Lysis Buffer*

Die Minipools mit einer Größe von fünf DBS, mit je einem DBS pro Patient, wurden zunächst in 3 ml NucliSENS® Lysis Buffer eluiert, um anschließend das Testverfahren zu durchlaufen. Insgesamt gingen 100 Patientenproben in diesen Teil der Studie ein, daraus resultierten 20 Minipools. Zur Auswertung der Ergebnisse wurden unterschiedliche Schwellenwerte benutzt. Die Effizienz der Methode betrug, je nach Schwelle (133, 200, 400 bzw. 1000 HIV-1 RNA

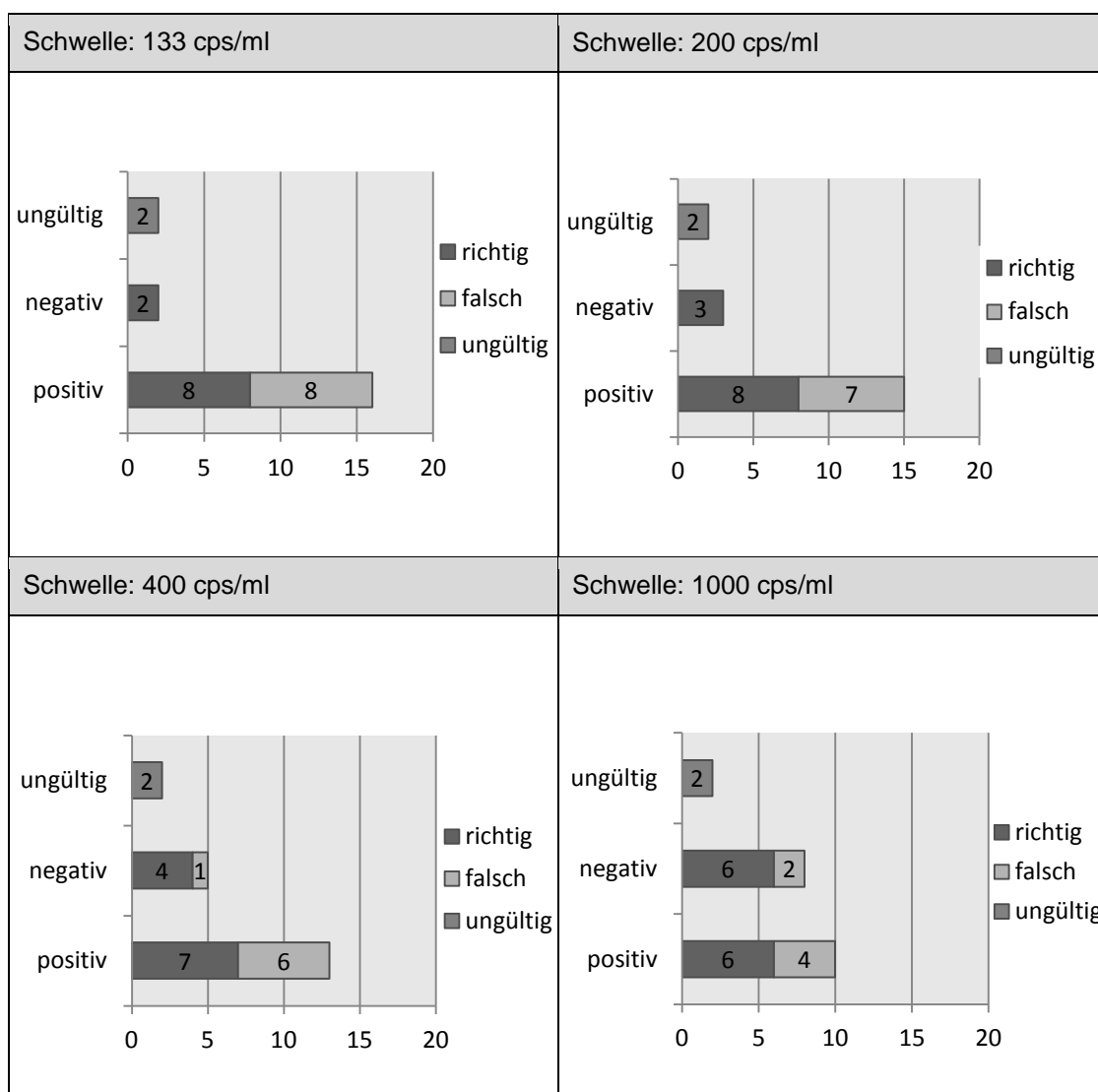
cps/ml), zwischen -10% und 20% (zur Erläuterung der einzelnen Schwellenwerte siehe „Material und Methoden“ Abschnitt 2.2.4.2).

Bei der 133 cps/ml-Schwelle, oberhalb derer ein Pool als positiv zu werten war, ergab sich die niedrigste Effizienz von -10%. Insgesamt waren 16 Pools positiv, davon acht falsch positiv. Bei zwei Minipools wurde ein Viruslastwert unter 133 cps/ml gemessen, sie waren also als negativ zu werten. Die Viruslast von ebenfalls zwei Pools konnte nicht eindeutig detektiert werden. Statt 100 Tests, die man unter Anwendung der herkömmlichen Methode gebraucht hätte, mussten so also 110 Tests durchgeführt werden. Hier sind die Wiederholungstests für sowohl die positiven, als auch für die Pools ohne eindeutiges Ergebnis mit einbezogen (siehe Tab. 6).

Bei der Schwelle von 200 cps/ml Blut, lag die Effizienz bei -5%. Auch hier wurden also mehr Tests benötigt, als bei der herkömmlichen Bestimmung der Viruslast an einzelnen Proben. Es wurden 15 Pools als positiv definiert, davon ergaben sieben Pools nach der Kontrolltestung ein falsch positives Ergebnis. Drei der Pools waren negativ und für zwei Pools konnte kein eindeutiges Ergebnis ermittelt werden. Die Anzahl der Wiederholungstests betrug bei dieser Schwelle also 85 Tests. Insgesamt wurden somit 105 statt der 100 Tests durchgeführt (siehe Tab. 6).



**Tab. 6:** Poolergebnisse der Poolkonstellation a bei unterschiedlichen Schwellenwerten.



Eine Zunahme der Effizienz wurde bei der Schwelle von 400 cps/ml ermittelt. Insgesamt waren 13 Pools positiv, fünf negativ und für zwei Pools konnte das Viruslastergebnis nicht eindeutig bestimmt werden. Bei diesem Schwellenwert trat erstmals ein falsch negativer Pool auf. Sechs Pools waren falsch positiv. Bei einer Anzahl von insgesamt 95 Tests lag die Effizienz also bei 5% (siehe Tab. 8). Außerdem wurde der Trennwert für die Unterscheidung von positiven und negativen Pools auf 1000 cps/ml Blut festgelegt. Hierbei konnte eine Effizienz von 20% erreicht werden. Nur 80 Tests, im Vergleich zu 100 bei der herkömmlichen Bestimmung der Viruslast, wurden benötigt. 10 Pools zeigten ein positives Ergebnis, wovon sich vier als falsch positiv herausstellten.

Acht der Pools hatten einen Viruslastwert unterhalb der Schwelle von 1000 cps/ml und wurden daher als negativ definiert. Dabei handelte es sich bei zwei Pools um falsch negative Ergebnisse. Bei zwei weiteren Pools konnte die Anzahl der RNA-Kopien pro Milliliter nicht eindeutig ermittelt werden.

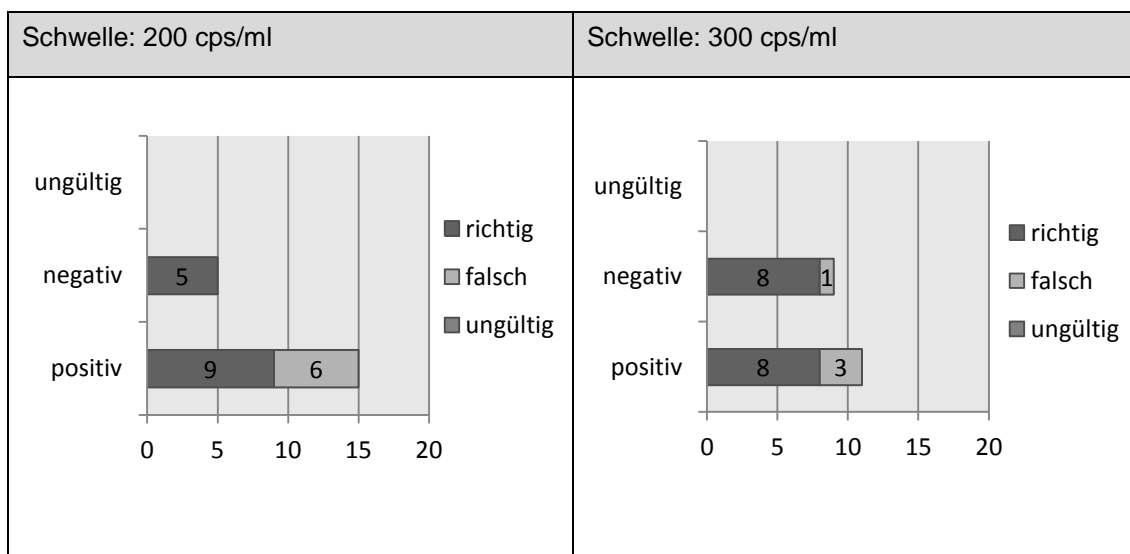
*Poolkonstellation b: Zwei DBS pro Patient in 10 ml NucliSENS® Lysis Buffer*

Bei einer Poolgröße von fünf Proben wurden zwei DBS pro Patient in 10 ml NucliSENS® Lysis Buffer eluiert. Es wurden zwei unterschiedliche Schwellen, oberhalb derer ein Pool als positiv gewertet wurde, definiert. Der erste Schwellenwert wurde bei 200 cps/ml angesetzt, der andere bei 300 HIV-1 RNA cps/ml Blut.

Bei der Schwelle von 200 cps/ml betrug die Effizienz der Methode 5%. Es hatten 15 der 20 Pools ein positives Ergebnis, wobei sich dieses in sechs Fällen nach der Kontrolltestung als falsch positiv herausstellte. Fünf Pools waren negativ. Insgesamt mussten also 95 Tests durchgeführt werden.

Für eine Poolschwelle von 300 cps/ml lag die Effizienz bei 25%, das heißt 75 Tests mussten durchgeführt werden. Bei diesem Durchlauf waren 11 Pools positiv, wovon sich drei als falsch positiv herausstellten. Neun Pools hatten ein negatives Ergebnis, wovon ein Pool falsch negativ war.

**Tab. 7:** Poolergebnisse der Poolkonstellation b bei unterschiedlichen Schwellenwerten.



3.3.3.3 Validität der Methode*Poolkonstellation a*

Die Validität der Minipoolstrategie unter Verwendung von DBS war gering. Mit den Pools aus fünf DBS (je ein DBS pro Patient), aufgelöst in 3 ml NucliSENS® Lysis Buffer, wurde eine Sensitivität von 75,00% bis 100% und eine Spezifität im Bereich von 20% bis 60% erreicht, je nachdem welcher Schwellenwert für die Pools gewählt wurde. Eine Sensitivität von je 100% wurde für die Schwellenwerte von 133 und 200 cps/ml ermittelt. Die Spezifität dieser Schwellen lag bei 20% bzw. bei 30%. Für den Schwellenwert von 400 cps/ml ergab sich eine Sensitivität von 87,50% und eine Spezifität von 40%. Diese Werte lagen jeweils bei 75% bzw. 60%, wenn der Schwellenwert eines Pools als 1000 cps/ml definiert wurde. Der positive Vorhersagewert betrug für die Schwellen von 133, 200, 400 und 1000 cps/ml jeweils 50%, 50,33%, 53,85% und 60%; der negative Vorhersagewert hingegen jeweils 100%, 100%, 80% und 75%.

**Tab. 8:** Effizienz, Validität und Genauigkeit der Viruslastbestimmung an gepoolten Proben unter Verwendung von Dried Blood Spots bei Poolkonstellation a.

Zusammenfassung der DBS Ergebnisse	Poolchwelle (HIV RNA cps/ml)			
	133	200	400	1000
1 DBS pro Patient in 3 ml (20 Minipools aus jeweils 5 Proben)				
Effizienz	-10,00%	-5,00%	5,00%	20,00%
Sensitivität	100,00%	100,00%	87,50%	75,00%
Spezifität	20,00%	30,00%	40,00%	60,00%
Positiver Vorhersagewert	50,00%	50,33%	53,85%	60,00%
Negativer Vorhersagewert	100,00%	100,00%	80,00%	75,00%

*Poolkonstellation b*

Bei Poolkonstellation b, bei der zehn DBS (jeweils zwei pro Patient) in 10 ml NucliSENS® Lysis Buffer aufgelöst wurden, konnte eine Sensitivität von 100% bei einem Schwellenwert von 200 cps/ml Blut bzw. von 88,89% bei einer Schwelle von 300 cps/ml Blut erreicht werden. Die Spezifität lag bei 45,45% für 200 cps/ml Blut als Schwelle und bei 72,73%, wenn der Schwellenwert eines Pools als 300 cps/ml definiert war. Der positive Vorhersagewert betrug für die Schwellen von 200 cps/ml bzw. 300 cps/ml 60% bzw. 72,73%, der negative Vorhersagewert jeweils 100%, bzw. 88,89%.

**Tab. 9:** Effizienz, Validität und Genauigkeit der Viruslastbestimmung an gepoolten Proben unter Verwendung von Dried Blood Spots bei Poolkonstellation b.

Zusammenfassung der DBS Ergebnisse	Poolchwelle (HIV RNA cps/ml)	
	200	300
2 DBS pro Patient in 10ml (20 Minipools aus jeweils 5 Proben)	200	300
Effizienz	5,00%	25,00%
Sensitivität	100,00%	88,89%
Spezifität	45,45%	72,73%
Positiver Vorhersagewert	60,00%	72,73%
Negativer Vorhersagewert	100,00%	88,89%

### 3.3.4 Minipoolmethode mittels Dried Plasma Spots

#### 3.3.4.1 Effizienz und Kosten der Methode

Die Effizienz der Minipoolmethode, angewandt an DPS, betrug 44,87% für den Schwellenwert bei 133 cps/ml und 47,57% für den Schwellenwert von 200 cps/ml.

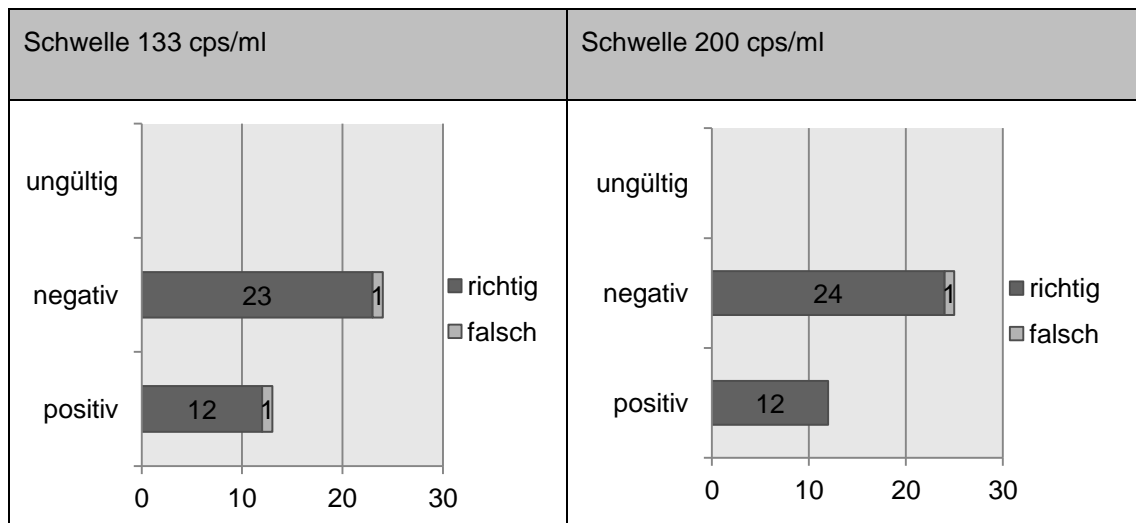
Von den insgesamt 37 Minipools aus 185 einzelnen Blutproben hatten bei einer Schwelle von 133 cps/ml 24 Pools ein negatives und 13 Pools ein positives Ergebnis. Nur einer der als negativ zu wertenden Pools hatte ein falsch negatives Ergebnis. Dieser Pool enthielt eine Probe mit einer Viruslast von 1200 cps/ml, also nur knapp oberhalb der festgelegten Schwelle von 1000 cps/ml pro Einzelprobe.

Das Viruslastergebnis eines anderen Pools betrug 190 Kopien cps/ml. Bei der Schwelle von 133 cps/ml war dieser Pool positiv. Alle Blutproben dieses Pools wiesen jedoch eine Viruslast von unter 1000 HIV-1 RNA cps/ml auf; das Ergebnis war somit falsch positiv. Ging man hingegen von einem Schwellenwert von 200 cps/ml aus, war der Pool mit einer Viruslast von 190 cps/ml als negativ zu werten, womit das Ergebnis dann richtig ausfiel (im Gegensatz zum Wert bei der 133 cps/ml-Schwelle). Es ergaben sich also 25 negative und 12 positive Pools für die 200 cps/ml-Schwelle. Der falsch negative Pool mit 1200 cps/ml fiel auch bei der 200 cps/ml-Schwelle falsch negativ aus.

Bei einem Schwellenwert von 133 cps/ml wurden mittels der Minipoolmethode, unter Einbeziehung der Kontrolltests aller positiven Pools nur 102 Tests statt der 185 Tests bei üblicher Viruslastbestimmung benötigt, um alle Blutproben zu testen. Daraus folgt bei einer Kostenbemessung von US\$ 40 pro Assay, eine Kostenersparnis von US\$ 1795 für 100 Tests. Statt der US\$ 7400, die bei herkömmlicher individueller Viruslastbestimmung für die 185 Blutproben hätten aufgewendet werden müssen, kostete das Minipooltestverfahren bei der gleichen Patientenanzahl US\$ 4080.

Für die Effizienz von 47,57% bei einem Schwellenwert definiert als 200 cps/ml Blut ergibt sich eine Ersparnis von US\$ 1903 für 100 Tests. Insgesamt mussten hierbei statt 185 Tests nur 97 durchgeführt werden. Der Kostenpunkt beläuft sich also statt der US\$ 7400 auf US\$ 3880, das heißt die Kosten pro Test konnten so von 40 US\$ auf 21 US\$ reduziert werden.

**Tab. 10:** Poolergebnisse der DBS bei unterschiedlichen Schwellenwerten.



### 3.3.4.2 Validität der Methode

Die Sensitivität betrug sowohl für einen Schwellenwert von 133 cps/ml, als auch für 200 cps/ml 92,31%, da jeweils ein falsch negativer Pool zu finden war. Für die Schwelle von 133 cps/ml lag die Spezifität der Methode bei 95,83%, bedingt durch einen falsch positiven Pool. Dieser entfiel bei der Schwelle von 200 cps/ml Blut (siehe „Ergebnisse“ Abschnitt 3.3.4.1). Die Spezifität betrug in diesem Fall 100%. Der positive Vorhersagewert ergab für einen Schwellenwert von 133 cps/ml 92,31% und für die Schwelle bei 200 cps/ml 100%. Der negative Vorhersagewert lag, je nachdem bei welchem Wert die Schwelle zur Beurteilung des Poolergebnisses angesetzt wurde, bei 95,83% (Schwellenwert 133 cps/ml) bzw. bei 96% (Schwellenwert 200 cps/ml).

**Tab. 11:** Effizienz, Validität und Genauigkeit der Viruslastbestimmung an gepoolten Proben unter Verwendung von Dried Plasma Spots.

Zusammenfassung der DPS Ergebnisse	Poolchwelle (HIV RNA cps/ml)	
	133	200
1 DPS pro Patient in 3ml (37 Minipools aus jeweils 5 Proben)	133	200
Effizienz	44,87%	47,57%
Sensitivität	92,31%	92,31%
Spezifität	95,83%	100,00%
Positiver Vorhersagewert	92,31%	100,00%
Negativer Vorhersagewert	95,83%	96,00%

## 4 Diskussion

Der langfristige klinische Erfolg einer antiretroviralen Therapie (ART) ist abhängig von der regelmäßigen Kontrolle der Viruslast der Patienten, um rechtzeitig ein Therapieversagen detektieren und intervenieren zu können. In ressourcenarmen Ländern werden mit steigender Anzahl der Patienten, die eine ART erhalten, die Kosten für die Verlaufskontrolle zum limitierenden Faktor für eine optimale Behandlung (93). Kostengünstige Alternativen zur herkömmlichen Bestimmung der Viruslast sind deshalb dringend notwendig (91, 111). In der vorliegenden Studie konnte das Poolen von Plasma mittels der Minipoolstrategie unter Einbeziehung von Vorauswahlkriterien, wie auch das Poolen von DPS als effektive Maßnahme zur Kostensenkung der Viruslastbestimmung von Patienten unter ART herausgestellt werden.

### 4.1 Repräsentativität der Studienpopulation

Für alle drei Testserien (Plasmapooling, DBS, DPS) wurden verschiedene Studienteilnehmer gewählt. Während für das Plasmapooling auf schon gefroren gelagerte Blutproben des Labors zurückgegriffen wurde, wurden für die DBS und DPS frische Blutproben selektiert. Im Hinblick auf die HIV-1 RNA Prävalenz der einzelnen Populationen erwiesen sich die ausgewählten Teilnehmer als vergleichbar und repräsentativ für die HIV-infizierte Population unter antiretroviraler Therapie der Provinz Western Cape. Susanne Potschka beschreibt in Ihrer Dissertation die Ergebnisse der retrospektiven Studie, anhand derer die Einschlusskriterien für die Studienteilnehmer ausgewählt wurden. Dabei wurden 2456 Antragsformulare für die Viruslastbestimmung HIV-positiver Patienten unter ART der Provinz Western Cape untersucht. Die Prävalenz der Therapieversager lag bei 14,2%. Nach Ausschluss der Patienten, die die ermittelten Einschlusskriterien nicht erfüllten, konnte die Therapieversagerquote auf 8,7% gesenkt werden. Im Vergleich lagen die Viruslastergebnisse der Studienteilnehmer für die Minipoolstrategie mittels Plasma, DBS und DPS nach Berücksichtigung der Einschlusskriterien, bei 9,50%, 9,00% und 7,57%. Damit befinden sich die einzelnen Werte untereinander und in Bezug auf die gesamte Provinz in vergleichbaren Bereichen.



## 4.2 Reflektion der Methodik und der Ergebnisse

### 4.2.1 Minipoolstrategie an Blutplasma

Die Methodik der vorliegenden Studie orientierte sich an zwei vorangegangenen Studien, die sich ebenfalls mit dem Poolen von Blutproben HIV-positiver Patienten unter antiretroviraler Medikation beschäftigten (99, 108).

Die Effektivität und damit auch die Kostenreduktion, die durch die Anwendung des Poolings erreicht werden kann, ist maßgeblich abhängig von der Prävalenz der Therapieversager in der ausgewählten Population (99, 108, 112). Die Zahl der eingesparten Tests ist umgekehrt proportional zu der Anzahl der Blutseren mit einer hohen Viruslast. Die Studie von Smith et al. 2009 wurde in San Diego, USA, also in einem Land, in dem ein hoher medizinischer Standard verfügbar ist, durchgeführt. Hier ist die Häufigkeit des viralen Versagens unter ART gering (99). Aber besonders in Teilen der Erde mit weniger gesundheitsökonomischen Ressourcen muss mit einer hohen HIV-Prävalenz und einem häufigen Auftreten von Therapieversagen gerechnet werden, was die Effektivität der Pooling-Strategie unter Umständen drastisch senkt.

In der vorliegenden Studie wurde die von Smith et al. beschriebene Methodik auf eine Bevölkerung mit hoher HIV-1 RNA Prävalenz angewandt. Damit sollte der Nutzen der Poolingstrategie in einem ressourcenarmen Land geprüft werden. Bei der Anfertigung der Minipools in der hier beschriebenen Studie wurde sich also stark an der Studie von Smith et al. 2009 orientiert und bis auf geringe Mengenunterschiede in den verwendeten Plasmavolumina methodisch ähnlich vorgegangen. Es wurde ebenfalls eine Poolgröße von fünf Proben gewählt. Während in der Vergleichsstudie 100 µl pro Probe in einen Pool eingingen, wurden bei vorliegender Studie 205 µl gewählt. Hier wurde der Verlust minimaler Mengen an Plasma während der einzelnen Pipettiervorgänge beachtet (deshalb 5 µl zusätzlich). Außerdem wurden aus Rücksicht auf die Routinearbeit des Labors die Einstellungen des NucliSENS® EasyQ nicht verändert. Deshalb wurden 1 ml Volumen pro Pool, also 200 µl pro Patient, anstatt der 100 µl in der Vergleichsstudie verwendet. In der Studie von Smith et al. 2009 wurde die Viruslast mit COBAS® AMPLICOR HIV-1 Monitor Test der Firma Roche bestimmt, während in der vorliegenden Studie NucliSENS® EasyQ verwendet wurde. Die Resultate sind mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit

trotzdem vergleichbar. Denn Studien zufolge entsprechen sich die Viruslastwerte einer Probe näherungsweise, die durch die beiden unterschiedlichen Systemen ermittelt wurden (113-116). Die Effizienz der Minipoolmethode in der vorliegenden Studie betrug 34,29%. In der Studie von Smith et al. 2009 ergaben die Untersuchungen eine Effizienz von 41,00 %. Der Unterschied der beiden Arbeiten besteht zum einen in den differierenden HIV-1 RNA Prävalenzen und den im Durchschnitt höheren Viruslastwerte der Proben in der hier vorliegenden Studie ( $\log_{10}VL$  von 2.88 im Vergleich zu 2.33 cps/ml bei Smith et al. 2009). Aber auch die verschiedenen Schwellen (in der Vergleichsstudie lag die Schwelle bei 250 cps/ml, in vorliegender Studie bei 200 cps/ml) könnten dabei eine Rolle gespielt haben. Nichtsdestotrotz erwies sich in beiden Studien die Minipoolmethode zur Bestimmung der Viruslast als sehr effizient.

Laut WHO Richtlinien zur antiretroviralen Therapie konnte bis heute keine optimale Schwelle der Viruskopien im Blut bestimmt werden, die eindeutig auf ein Versagen der ART schließen lässt. Jedoch sind Werte über 5000 cps/ml assoziiert mit der Progression klinischer Symptome und einem Abfall der CD4-Zellanzahl (92). In den südafrikanischen Leitlinien wird momentan ein Grenzwert von 1000 cps/ml zum Wechsel der Therapie angegeben (107, 117). Im Falle des Überschreitens dieser Schwelle wird über einen Wechsel der Medikamente von „First-Line“ zu „Second-Line“ beraten. In Deutschland wird allerdings schon bei einer Viruslast oberhalb der Nachweisgrenze eine genotypische Resistenztestung erwogen und der Wechsel der Medikamente gegebenenfalls empfohlen (31). Den eingeschränkten Bedingungen zur Medikamentenumstellung in ressourcenarmen Ländern Rechnung tragend wurde in der vorliegenden Studie ein Schwellenwert von 1000 cps/ml gewählt. Damit lag das Detektionslevel dieser Studie noch unterhalb des empfohlenen Viruslastwertes der WHO.

Für drei Pools konnte kein eindeutiges Ergebnis mittels PCR bestimmt werden. Deshalb mussten insgesamt 15 Proben ausgeschlossen werden, sodass sich die Teilnehmerzahl von 400 auf 385 reduzierte. Auch in den routinemäßig im Labor der NHLS Tygerberg durchgeführten Viruslastbestimmungen fanden sich mitunter Proben mit nicht eindeutigem Testergebnis. Hier wurde, wie bei den Pools auch, eine zu schwache Amplifikation („Poor amplification; none of the curves sufficiently reached its plateau level.“) angezeigt (109). Deshalb kann davon ausgegangen

werden, dass diese Fehler nicht unmittelbar auf das Poolen der Proben zurückzuführen sind. Aufgrund des zu geringen Volumens der gefrorenen Blutproben konnten die drei Pools nicht nochmals angefertigt und die Tests somit nicht wiederholt werden, das Auffinden der Patienten zur erneuten Blutabnahme war aus logistischen Gründen nicht möglich.

Die Ergebnisse aus gepoolten Viruslastbestimmungen von gefroren aufbewahrten Blutproben wurden mit den Testergebnissen der entsprechenden Proben aus der individuellen Routinetestung des Labors verglichen. Zwischen diesen beiden Testserien lag ein Zyklus aus Einfrieren und wieder Auftauen der Proben. Laut derzeitigen Studien ist eine signifikante Reduktion der Viruslast aber erst nach fünf Zyklen des Einfrierens und wieder Auftauens festzustellen, die Werte dürften dadurch also nicht beeinflusst worden sein (118).

#### **4.2.2 Vergleich der Minipoolstrategie mit der 10x10-Matrixmethode**

Im gleichen Rahmen, in dem der hier beschriebene Teil der Studie stattfand, konnte das Plasmapooling auch als 10x10-Matrix durchgeführt werden. Susanne Potschka beschreibt in ihrer Dissertation diese Methode. Die Effizienz der Minipoolstrategie von 34,29% ist niedriger als die, die mittels der Matrixmethode erzielt werden konnte. Diese lag bei 41,00%. Im Vergleich sind die Minipooltests aus fünf Blutproben jedoch leichter durchzuführen. Die Matrices hingegen können ohne ausgebildetes Personal nur schwer pipettiert werden, was deren Nutzen in Schwellen- und Entwicklungsländern erheblich reduzieren könnte. Außerdem wurde weniger Zeit zum Anfertigen der Minipools benötigt. Für 20 Minipools aus 100 Plasmaproben wurde durchschnittlich eine Zeit von 35,5 Minuten aufgewendet, wohingegen das Pipettieren einer 10x10-Matrix rund 45 Minuten dauerte. Des Weiteren ist die Dekonvolution der Matrices wesentlich umfangreicher und komplizierter als das Auflösen der Minipools mittels des MEPAC Algorithmus. Die Mindestprobenanzahl der Minipools beläuft sich auf fünf Plasmaproben, im Vergleich werden zur Durchführung einer 10x10-Matrix mindestens 100 Proben benötigt, bevor die Viruslast einer Probe bestimmt werden kann. Dadurch ist mit der Anwendung der Matrix eine längere Wartezeit bis zum Erlangen der Ergebnisse im Vergleich zu der Minipoolstrategie verbunden. Eine schnelle Durchführung der Viruslastbestimmung

ist jedoch im Hinblick auf Arbeitsaufwand und die zügige klinische Entscheidungsfindung zum Wohl des Patienten wichtig.

Ähnliche Ergebnisse, die im Vergleich der Matrixmethode mit der in dieser Studie durchgeführten Minipoolstrategie ermittelt wurden, lassen sich auch in anderen Studien zum Thema finden (99, 108).

#### **4.2.3 Dried Blood Spots**

In der vorliegenden Studie wurden neben dem Poolen von flüssigem Plasma auch der Nutzen der Minipoolstrategie an DBS untersucht. Es wurde festgestellt, dass gepoolte DBS im Vergleich zu flüssigem Plasma derselben Blutprobe eine höhere Viruslast aufweisen (siehe Anhang). Dieses Ergebnis wird durch eine Studie, die sich mit der Viruslastbestimmung an nicht-gepoolten DBS beschäftigt, bestätigt und ist eventuell auf die zusätzliche Zell-assoziierte HIV-1 RNA zurückzuführen, die im flüssigen Plasma nicht mehr vorhanden ist (119). In anderen Studien zum Thema, die an der gleichen Testplattform wie die vorliegende Studie durchgeführt wurde, konnte hingegen eine signifikante Korrelation zwischen den Viruslastwerten der Plasmaproben und den Ergebnissen der entsprechenden DBS aufgezeigt werden (104, 120). Zu hohe Ergebnisse in den Viruslastwerten der DBS wurden im Unterschied zur vorliegenden Studie nicht festgestellt. Möglicherweise ist wegen des höheren Blutvolumens der Pools im Vergleich zu einzelnen DBS die Bestimmung der Viruslast relativ ungenau. Des Weiteren befinden sich in den verschiedenen Pools aufgrund der differierende Hämatokritwerte der einzelnen Patienten verschiedene Plasmafraktionen. Das könnte die hohe Variabilität unter den einzelnen DBS-Pools in der Korrelation zu den herkömmlich bestimmten Viruslastwerten erklären.

In der 2013 erschienenen Studie von Pannus et al. beschäftigte sich die Arbeitsgruppe ebenfalls mit dem Poolen von DBS, DPS und Blutplasma (120). Die Autoren berichten im Unterschied zur vorliegenden Studie von einer Übereinstimmung sowohl der Effizienz als auch des negativen Vorhersagewerts, unabhängig davon ob DBS oder DPS bzw. Blutplasma verwendet wurde. In dieser Studie wurden neben DBS und DPS aus venösem Blut ebenso Spots aus kapillärem Blut der Fingerbeere angefertigt. Auch hiermit konnten gleichwertige Ergebnisse erreicht werden.

#### 4.2.4 Dried Plasma Spots

Die Viruslastbestimmung mittels gepoolter DPS zeigte im Vergleich zu den DBS weniger Variabilität, eine höhere Effizienz und eine höhere Genauigkeit sowohl bei einer Poolschwelle von 133 cps/ml, als auch bei 200 cps/ml. Mit den Unterschieden in der Prävalenz der Therapieversager (7,6% bei den DPS versus 9% bei den DBS) kann nur ein geringer Unterschied der Ergebnisse zwischen DBS und DPS erklärt werden. Die bessere Effizienz der DPS ist eher auf die Abwesenheit von zellulärer RNA zurückzuführen. Außerdem finden sich in den Plasmaspots keine inhibierenden Substanzen wie Hämoglobin oder Eisen.

Im Vergleich der beiden Schwellenwerte, die bei den DPS untersucht wurden, zeigte sich eine Abweichung bei der Spezifität. Dieser Unterschied ergibt sich durch das Ergebnis eines Pools. Bei diesem Pool wurde eine Viruslast von 190 cps/ml nachgewiesen. Bei der Schwelle von 133 cps/ml war er also als falsch positiv zu werten, bei 200 cps/ml als richtig negativ. Daher bewegt sich die Spezifität dieser Methode zwischen 95,83% (bei einer Schwelle von 133 cps/ml) und 100% (bei 200 cps/ml).

Ein anderer Pool dieser Testreihe wurde falsch negativ bestimmt. Eine Probe mit einer Viruslast von 1200 cps/ml verursachte diese Fehlbestimmung. Durch das Poolen muss an Genauigkeit bei der Bestimmung der Viruslast eingebüßt werden. Besitzen alle Einzelproben klar zu definierende Viruslastwerte, also stark erhöht und somit definierend für ein Therapieversagen (weit über 1000 cps/ml) oder kaum nachweisbar, hat der geringe Verlust der Genauigkeit keine Folge. Bei dicht an der Grenze (1000 cps/ml) gelegenen Werten verliert die Poolingmethode jedoch etwas an Spezifität und Sensitivität im Vergleich zur konventionellen Viruslastbestimmung, wie es bei dem Beispiel der Fall ist. Die Southern African HIV Clinicians Society gibt an, dass bei einem Wert von 1000 cps/ml das ART-Regimen gewechselt werden soll (117). Damit liegt der Grenzwert von 1000 cps/ml, der in dieser Studie gewählt wurde innerhalb des Referenzbereichs. Die Genauigkeitsverluste können also zu Gunsten der Kostenreduktion in Kauf genommen werden, ohne dabei Abstriche in Bezug auf die Qualität der Behandlung des Patienten machen zu müssen.

Eine Einschränkung dieser Studie ist, dass die DBS und DPS nicht mit gepoolten Proben aus flüssigem Blutplasma verglichen wurden. Zur Beurteilung wurde das Mischen der fünf Plasmaproben eines Pools nur theoretisch durchgeführt. Dazu

wurden die zuvor im Einzelnen bestimmten Viruslastwerte der fünf Proben addiert und in Relation zum Plasmavolumen gesetzt. Ein praktisch durchgeführter Vergleich von gepoolten DPS/DBS und Pools aus flüssigem Plasma derselben Proben sollte Bestandteil weiterführender Studien sein.

### **4.3 Vergleich der Ergebnisse von Dried Plasma Spots und Plasmapooling**

Die Effizienz der DPS lag bei bis zu 47,57% und damit deutlich höher als die Effizienz von 34,29%, die bei der Verwendung von flüssigem Blutplasma erzielt werden konnte. Die niedrigere HIV-1 Prävalenz der Population, an der die DPS getestet wurden (7,6% mit Viruslastwerten über 1000 cps/ml im Vergleich zu 9,5% bei dem Poolen von Blutplasma), trug sicher zu den besseren Ergebnissen bei, ist jedoch allein nicht erklärend für die großen Effizienzunterschiede. Eine mögliche Erklärung liegt in dem geringeren Inputvolumen bei dem Gebrauch von DPS. Damit ist eine höhere Detektionsrate verbunden, die zu einer niedrigeren Anzahl an falsch positiven Pools geführt haben könnte (0-2,7% für DPS Minipools versus 16,25% für Minipools mit flüssigem Plasma). Sind weniger falsch positive Pools vorhanden, werden auch weniger Nachtestungen benötigt, was die höhere Effizienz der DPS verglichen mit den Minipools, bei denen flüssiges Plasma benutzt worden ist, erklärt.

### **4.4 Bewertung der Viruslastbestimmung als Marker zum Monitoring der ART**

In verschiedenen Studien wurde gezeigt, dass das Testen der Viruslast als Marker zum Detektieren von Therapieversagen der CD4-Zellzahl und dem klinischen Monitoring überlegen ist (121-125). Während Studien zufolge bei Benutzung der CD4-Zellzahl und bzw. oder der Klinik der Patienten eine höhere Anzahl an Therapieversagern verborgen blieb, konnte bei Verwendung der Viruslast ein besseres Ergebnis erreicht werden (126, 127). Beispielsweise konnte gezeigt werden, dass bei Patienten, deren Medikation nach immunologischen Gesichtspunkten, also bei der Beurteilung der CD4-Zellzahl, als nicht erfolgreich erschien, eine Virussuppression mittels Bestimmung der VL durchaus nachgewiesen

werden konnte (128, 129). Zudem haben häufigere Kontrollen des HIV-1 RNA Levels ein besseres Therapiemanagement zur Folge, als es bei weniger häufigen Kontrollen der Fall ist. Das liegt daran, dass ein Therapieversagen schneller detektiert werden kann und damit die Anpassung der Medikation frühzeitiger erfolgt (130).

Die Verbesserung des Monitorings würde folglich große gesundheitliche Vorteile und damit eine Kostenreduktion in Bezug auf die Hospitalisationsdauer bedeuten. Durch eine Reduktion der Kosten für die Bestimmung der Viruslast wiederum könnte ein flächendeckender Zugang zu der Kontrolle des Therapieerfolgs ermöglicht werden. Die hier untersuchte Poolingmethode stellt einen Weg dar, der die Viruslastbestimmung finanziell erschwinglich, einfach und unkompliziert nutzbar machen könnte - auch für ressourcenarme Länder.

Während bei der herkömmlichen Viruslastbestimmung zum Therapiemonitoring die genaue Anzahl der HIV-1 RNA Kopien des Patienten bestimmt werden, erfolgt durch die Poolingmethode eine Art Screening. Werte über 5000 cps/ml sind assoziiert mit der Progression klinischer Symptome, deshalb sollte laut WHO bei einer persistierenden Viruslast von über 5000 cps/ml von einem Therapieversagen ausgegangen werden (92). Durch das Poolen können also jene Patienten, bei denen der Therapieerfolg genauer untersucht werden sollte und eventuell therapeutisch interveniert werden muss, herausgefiltert werden. Geht man von einem Schwellenwert von 200 cps/ml aus, oberhalb dessen der Pool nachgetestet wird, werden jene Patienten gefunden, deren Viruslast über dem Wert von 1000 cps/ml liegt. Damit ergibt sich, ausgehend von den Empfehlungen der WHO, ein Puffer, der verhindert, dass Blutproben mit einer VL über 5000 cps/ml beim Poolen nicht entdeckt werden. Ob der Schwellenwert zugunsten der Effizienz der Methode ohne Verlust von Sensitivität und Spezifität noch weiter angehoben werden kann, sollte in weiterführenden Studien untersucht werden.

## **4.5 Schlussfolgerung**

Wie sich in ressourcenarmen Ländern gezeigt hat, erfolgt der Wechsel auf eine Second-Line Therapie oder auf Reservemedikamente oftmals viel zu spät, wenn die Möglichkeit der virologischen Kontrolle mittels Bestimmung der HIV-1 RNA Viruslast limitiert ist (92). Das führt zu einer Verschlechterung der klinischen Situation der

Patienten und zu einer Akkumulation von Resistenzen. Mutationen des Virus reduzieren wiederum den Erfolg der Second-Line Therapie (131). Ohne adäquate Kontrolle des Therapieerfolgs besteht also ein hohes Risiko für die Entwicklung eines nur schwer zu unterbrechenden Teufelskreises. Gerade in Ländern, in denen der Zugriff auf Reservemedikamente eingeschränkt ist, ist die Anwendung wirkungsloser Medikamente im Fall einer unerkannten Resistenzentwicklung besonders folgenreich.

Es konnte gezeigt werden, dass die virale Replikation in Anwesenheit von antiretroviral wirksamen Medikamenten die Selektion von Mutationen in Resistenzgenen fördert und daher mit therapeutischem Versagen korreliert (90, 91). Um dem entgegenzuwirken und den Erfolg der Therapie zu kontrollieren, ist eine regelmäßige Untersuchung der Patienten, bei der neben der Beurteilung der Klinik auch laboratorische Tests eingeschlossen sein sollten, erforderlich.

In dieser Studie wurde gezeigt, dass in niedrig entwickelten Regionen durch die Kombination aus Vorauswahlkriterien von Patienten gefolgt von der Viruslastbestimmung gepoolter Blutproben die Kosten für eine regelmäßige Therapiekontrolle gesenkt werden können, ohne dass ein erheblicher Abfall in der Genauigkeit der Ergebnisse zu verzeichnen ist. Das Poolen von DPS erwies sich dabei als die effektivste Methode.

Die handelsüblichen Tests zur Viruslastbestimmung erfordern sehr gut ausgestattete Labore und geübtes Personal. Deshalb sind diese Tests in niedrig entwickelten Regionen nur in wenigen zentralen Laboratorien durchführbar. Diese könnten als zentrale Anlaufstellen zur Durchführung der Viruslastbestimmung genutzt werden. Dabei wäre die Anwendung von gepoolten DPS bzw. DBS optimal. Neben der guten Effizienz, der Kostenreduktion und der vergleichsweise einfachen Durchführbarkeit liegt ein weiterer Vorteil der zu Minipools gemischten DPS in der einfachen Transportierbarkeit. Wie in vorausgegangen Studien festgestellt worden ist, können die DPS ohne Änderung der Viruslastergebnisse in den einzelnen Plasmatropfen lange gelagert und auch bei Temperaturen bis 37°C unbedenklich transportiert werden (100, 132).

Die zentralen Laboratorien könnten mit automatischen Systemen zur Anfertigung der Pools und Softwares zur Vereinfachung der Dekonvolution von positiven Pools ausgestattet werden. So könnten flächendeckend wesentlich mehr Patienten getestet



werden, ohne mehr Tests oder neue Apparaturen zu benötigen. Eine weitere Möglichkeit das Procedere zu vereinfachen wäre außerdem die Anfertigung der DBS aus Kapillarblut der Fingerbeere. In einer Studie konnte gezeigt werden, dass die Ergebnisse hinsichtlich Effizienz und Genauigkeit von DBS-Pools aus venös gewonnenem Blut mit denen aus Blut der Fingerbeere vergleichbar sind (120). Diese Vorgehensweise könnte zusätzlich zu einer vereinfachten und damit flächendeckenderen Anwendung der DBS führen. Die Praktikabilität, sowie die reale Durchführbarkeit auch in Bezug auf Infrastruktur und Management sollten Bestandteil weiterer Studien werden.

Die vorliegende Studie wurde im Journal of Clinical Infectious Diseases im Januar 2011 unter dem Titel "Pooling strategies to reduce the cost of HIV-1 RNA load monitoring in a resource-limited setting." veröffentlicht und auf der International AIDS Conference im Juli 2012 in Wien in Form eines Posters vorgestellt.

## **5 Zusammenfassung**

**Hintergrund:** Um den Erfolg einer antiretroviralen HIV-Therapie zu kontrollieren und Therapieversagen suffizient aufzudecken ist die quantitative Messung der HIV-1 RNA der Bestimmung der CD4-Zellzahl sowie der Beurteilung anhand der Klinik des Patienten überlegen. Die Viruslastbestimmung ist jedoch ein sehr teures Verfahren, sodass Kosten und Infrastruktur häufig die begrenzende Komponente für die Anwendung darstellen. Das gilt besonders für arme Länder, in denen die technische Entwicklung des Gesundheitssystems wenig fortgeschritten ist. In aktuellen Studien konnte gezeigt werden, dass das Poolen von Blutproben, bei einer an die klinische Relevanz angepassten Schwelle, ein effizientes Verfahren ist, um die ART mittels Viruslastbestimmung zu überwachen. Dies gilt, wenn die Therapieversagerquote niedrig ist. In Ländern, in denen der Kostenreduktion der Viruslastbestimmung eine besondere Wichtigkeit zukommt, sind die Durchseuchungsrate und die Therapieversagerquote jedoch oft hoch.

**Methoden:** Es wurde das Poolen von Blutplasmaproben, DBS und DPS bei einer Population mit hoher Therapieversagerquote untersucht. Ein Pool wurde jeweils aus fünf Einzelproben angefertigt. Zur Auswertung der Pools aus flüssigen Plasmaproben wurde ein Algorithmus zur Vereinfachung der Dekonvolution angewandt.

**Ergebnisse:** Die Effizienz der Methode bei DPS (n=185) und flüssigem Plasma (n=385) lag zwischen 34,29% und 47,57%. Die Anwendung des Poolingsystems an DBS (n=100) erwies sich als wenig rentabel. Die Effizienz beim Gebrauch von DPS war am höchsten. Die Kosten pro Test konnten hier bei einem negativen Vorhersagewert von 95% und minimalem technischen Aufwand auf fast die Hälfte (21 US\$, statt 40 US\$ pro Assay) reduziert werden.

**Schlussfolgerung:** Durch die Kombination von Vorauswahlkriterien und Minipoolmethode können die Kosten für das virologische Monitoring der antiretroviralen Therapie auch in Entwicklungsländern gesenkt werden, ohne wesentliche Verluste in Genauigkeit und Validität der Methode verzeichnen zu müssen. DPS stellen eine erfolgsversprechende Möglichkeit dar, die Viruslastbestimmung auch in abgelegenen Regionen ohne entsprechenden Laboratorien zu ermöglichen.

## 6 Literaturverzeichnis

1. UNAIDS. *UNAIDS Report on the global AIDS epidemic*. 2012 [Zugriff am 06.12.2013].<http://www.unaids.org>
2. UNAIDS. *Global AIDS Response Progress Report 2012*. 2012 [Zugriff am 06.07.2013].[http://www.unaids.org/en/dataanalysis/knowyourresponse/countryprogressreports/2012countries/ce\\_ZA\\_Narrative\\_Report.pdf](http://www.unaids.org/en/dataanalysis/knowyourresponse/countryprogressreports/2012countries/ce_ZA_Narrative_Report.pdf)
3. RKI. *HIV/AIDS in Deutschland – Eckdaten der Schätzung 2012* [Zugriff am 06.12.2013].<http://www.rki.de>
4. Gao F, Bailes E, Robertson DL, Chen Y, Rodenburg CM, Michael SF, et al. *Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes troglodytes**. Nature. 1999;397(6718):436-41.
5. Hahn BH, Shaw GM, De Cock KM, Sharp PM. *AIDS as a zoonosis: scientific and public health implications*. Science. 2000;287(5453):607-14.
6. Bell NM, Lever AM. *HIV Gag polyprotein: processing and early viral particle assembly*. Trends in microbiology. 2013;21(3):136-44.
7. Dalgleish AG, Beverley PC, Clapham PR, Crawford DH, Greaves MF, Weiss RA. *The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus*. Nature. 1984;312(5996):763-7.
8. Klatzmann D, Champagne E, Chamaret S, Gruest J, Guetard D, Hercend T, et al. *T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV*. Nature. 1984;312(5996):767-8.
9. Briggs JA, Wilk T, Welker R, Krausslich HG, Fuller SD. *Structural organization of authentic, mature HIV-1 virions and cores*. The EMBO journal. 2003;22(7):1707-15.
10. Xu XN, Laffert B, Screaton GR, Kraft M, Wolf D, Kolanus W, et al. *Induction of Fas ligand expression by HIV involves the interaction of Nef with the T cell receptor zeta chain*. J Exp Med. 1999;189(9):1489-96.
11. Said EA, Dupuy FP, Trautmann L, Zhang Y, Shi Y, El-Far M, et al. *Programmed death-1-induced interleukin-10 production by monocytes impairs CD4+ T cell activation during HIV infection*. Nature medicine. 2010;16(4):452-9.

12. Trautmann L, Janbazian L, Chomont N, Said EA, Gimmig S, Bessette B, et al. *Upregulation of PD-1 expression on HIV-specific CD8+ T cells leads to reversible immune dysfunction.* Nature medicine. 2006;12(10):1198-202.
13. Sarrazin U, Brodt R, Sarrazin C, Zeuzem S. *[Postexposure prophylaxis after occupational exposure to HBV, HCV and HIV].* Der Radiologe. 2004;44(2):181-94.
14. WHO. *PMTCT strategic vision 2010–2015 : preventing mother-to-child transmission of HIV to reach the UNGASS and Millennium Development Goals.* 2010 [Zugriff am 15.12.2013]. [http://www.who.int/hiv/pub/mtct/strategic\\_vision.pdf](http://www.who.int/hiv/pub/mtct/strategic_vision.pdf)
15. Kahn JO, Walker BD. *Acute human immunodeficiency virus type 1 infection.* N Engl J Med. 1998;339(1):33-9.
16. Rockstroh JK, Hoffmann C. *HIV 2013/2014.* 2013 [Zugriff am 03.12.2013].<http://hivbuch.de/>
17. Brust S, Duttman H, Feldner J, Gurtler L, Thorstensson R, Simon F. *Shortening of the diagnostic window with a new combined HIV p24 antigen and anti-HIV-1/2/O screening test.* J Virol Methods. 2000;90(2):153-65.
18. Schupbach J. *Measurement of HIV-1 p24 antigen by signal-amplification-boostered ELISA of heat-denatured plasma is a simple and inexpensive alternative to tests for viral RNA.* AIDS Rev. 2002;4(2):83-92.
19. Meier T, Knoll E, Henkes M, Enders G, Braun R. *Evidence for a diagnostic window in fourth generation assays for HIV.* J Clin Virol. 2001;23(1-2):113-6.
20. RKI. *HIV/AIDS RKI-Ratgeber für Ärzte.* Robert Koch-Institut 2013 [Zugriff am 03.12.2013]. <http://edoc.rki.de/series/rki-ratgeber-fuer-arzte/2011/PDF/hiv/aids.pdf>
21. Delaney KP, Branson BM, Uniyal A, Phillips S, Candal D, Owen SM, et al. *Evaluation of the performance characteristics of 6 rapid HIV antibody tests.* Clin Infect Dis. 2011;52(2):257-63.
22. Greenwald JL, Burstein GR, Pincus J, Branson B. *A rapid review of rapid HIV antibody tests.* Curr Infect Dis Rep. 2006;8(2):125-31.

23. Desikan P. *Oral fluid-based rapid HIV 1/2 antibody test.* The National medical journal of India. 2007;20(3):138-9.
24. Palella FJ, Jr., Delaney KM, Moorman AC, Loveless MO, Fuhrer J, Satten GA, et al. *Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. HIV Outpatient Study Investigators.* N Engl J Med. 1998;338(13):853-60.
25. Yamashita TE, Phair JP, Munoz A, Margolick JB, Detels R, O'Brien SJ, et al. *Immunologic and virologic response to highly active antiretroviral therapy in the Multicenter AIDS Cohort Study.* AIDS. 2001;15(6):735-46.
26. Freedberg KA, Losina E, Weinstein MC, Paltiel AD, Cohen CJ, Seage GR, et al. *The Cost Effectiveness of Combination Antiretroviral Therapy for HIV Disease.* New England Journal of Medicine. 2001;344(11):824-31.
27. Volberding PA, Lagakos SW, Koch MA, Pettinelli C, Myers MW, Booth DK, et al. *Zidovudine in asymptomatic human immunodeficiency virus infection. A controlled trial in persons with fewer than 500 CD4-positive cells per cubic millimeter. The AIDS Clinical Trials Group of the National Institute of Allergy and Infectious Diseases.* N Engl J Med. 1990;322(14):941-9.
28. *Concorde: MRC/ANRS randomised double-blind controlled trial of immediate and deferred zidovudine in symptom-free HIV infection. Concorde Coordinating Committee.* Lancet. 1994;343(8902):871-81.
29. Hammer SM, Katzenstein DA, Hughes MD, Gundacker H, Schooley RT, Haubrich RH, et al. *A trial comparing nucleoside monotherapy with combination therapy in HIV-infected adults with CD4 cell counts from 200 to 500 per cubic millimeter. AIDS Clinical Trials Group Study 175 Study Team.* N Engl J Med. 1996;335(15):1081-90.
30. *Delta: a randomised double-blind controlled trial comparing combinations of zidovudine plus didanosine or zalcitabine with zidovudine alone in HIV-infected individuals. Delta Coordinating Committee.* Lancet. 1996;348(9023):283-91.
31. DAIG. *Deutsch-Österreichische Leitlinien zur antiretroviralen Therapie der HIV-Infektion.* 2012 [Zugriff am 23.07.2013]. [www.daignet.de/site-content/hiv-therapie/leitlinien-1.pdf](http://www.daignet.de/site-content/hiv-therapie/leitlinien-1.pdf)
32. WHO. *Consolidated guidelines on the use of ARV drugs for treating and preventing HIV infection.* 2013 [Zugriff am

05.12.2013].[http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/85321/1/9789241505727\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/85321/1/9789241505727_eng.pdf)

33. Riddler SA, Haubrich R, DiRienzo AG, Peeples L, Powderly WG, Klingman KL, et al. *Class-sparing regimens for initial treatment of HIV-1 infection.* N Engl J Med. 2008;358(20):2095-106.
34. Gulick RM, Ribaud HJ, Shikuma CM, Lalama C, Schackman BR, Meyer WA, 3rd, et al. *Three- vs four-drug antiretroviral regimens for the initial treatment of HIV-1 infection: a randomized controlled trial.* JAMA. 2006;296(7):769-81.
35. Saksena NK, Potter SJ. *Reservoirs of HIV-1 in vivo: implications for antiretroviral therapy.* AIDS Rev. 2003;5(1):3-18.
36. Nieuwkerk PT, Gisolf EH, Reijers MH, Lange JM, Danner SA, Sprangers MA, et al. *Long-term quality of life outcomes in three antiretroviral treatment strategies for HIV-1 infection.* AIDS. 2001;15(15):1985-91.
37. Zolopa A, Andersen J, Powderly W, Sanchez A, Sanne I, Suckow C, et al. *Early antiretroviral therapy reduces AIDS progression/death in individuals with acute opportunistic infections: a multicenter randomized strategy trial.* PLoS One. 2009;4(5):e5575.
38. Sterne JA, Hernan MA, Ledergerber B, Tilling K, Weber R, Sendi P, et al. *Long-term effectiveness of potent antiretroviral therapy in preventing AIDS and death: a prospective cohort study.* Lancet. 2005;366(9483):378-84.
39. Attia S, Egger M, Muller M, Zwahlen M, Low N. *Sexual transmission of HIV according to viral load and antiretroviral therapy: systematic review and meta-analysis.* AIDS. 2009;23(11):1397-404.
40. Hughes JP, Baeten JM, Lingappa JR, Margaret AS, Wald A, de Bruyn G, et al. *Determinants of per-coital-act HIV-1 infectivity among African HIV-1-serodiscordant couples.* J Infect Dis. 2012;205(3):358-65.
41. de Mendoza C, Soriano V, Perez-Olmeda M, Rodes B, Casas E, Gonzalez-Lahoz J. *Different outcomes in patients achieving complete or partial viral load suppression on antiretroviral therapy.* Journal of human virology. 1999;2(6):344-9.
42. Garnett GP, Bartley L, Grassly NC, Anderson RM. *Antiretroviral therapy to treat and prevent HIV/AIDS in resource-poor settings.* Nature medicine. 2002;8(7):651-4.

43. Smit M, Smit C, Cremin I, Garnett GP, Hallett T, de Wolf F. *Could better tolerated HIV drug regimens improve patient outcome?* AIDS. 2012;26(15):1953-9.
44. Johnson MO, Stallworth T, Neilands TB. *The drugs or the disease? Causal attributions of symptoms held by HIV-positive adults on HAART.* AIDS Behav. 2003;7(2):109-17.
45. Robison LS, Westfall AO, Mugavero MJ, Kempf MC, Cole SR, Allison JJ, et al. *Short-term discontinuation of HAART regimens more common in vulnerable patient populations.* AIDS Res Hum Retroviruses. 2008;24(11):1347-55.
46. Chubineh S, McGowan J. *Nausea and vomiting in HIV: a symptom review.* Int J STD AIDS. 2008;19(11):723-8.
47. Chu KM, Manzi M, Zuniga I, Biot M, Ford NP, Rasschaert F, et al. *Nevirapine- and efavirenz-associated hepatotoxicity under programmatic conditions in Kenya and Mozambique.* Int J STD AIDS. 2012;23(6):403-7.
48. Lochet P, Peyriere H, Lotthe A, Mauboussin JM, Delmas B, Reynes J. *Long-term assessment of neuropsychiatric adverse reactions associated with efavirenz.* HIV Med. 2003;4(1):62-6.
49. Lawler K, Jeremiah K, Mosepele M, Ratcliffe SJ, Cherry C, Seloilwe E, et al. *Neurobehavioral effects in HIV-positive individuals receiving highly active antiretroviral therapy (HAART) in Gaborone, Botswana.* PLoS One. 2011;6(2):e17233.
50. Shurie JS, Deribew A. *Assessment of the prevalence of distal symmetrical polyneuropathy and its risk factors among HAART-treated and untreated HIV infected individuals.* Ethiopian medical journal. 2010;48(2):85-93.
51. Mehta P, Nelson M, Brand A, Boag F. *Avascular necrosis in HIV.* Rheumatology international. 2013;33(1):235-8.
52. Martin AM, Krueger R, Almeida CA, Nolan D, Phillips E, Mallal S. *A sensitive and rapid alternative to HLA typing as a genetic screening test for abacavir hypersensitivity syndrome.* Pharmacogenetics and genomics. 2006;16(5):353-7.
53. DeJesus E, Herrera G, Teofilo E, Gerstoff J, Buendia CB, Brand JD, et al. *Abacavir versus zidovudine combined with lamivudine and efavirenz, for the treatment of antiretroviral-naive HIV-infected adults.* Clin Infect Dis. 2004;39(7):1038-46.

54. Marcos Bravo MC, Ocampo Hermida A, Martinez Vilela J, Perez Rodriguez MT, Gavilan Montenegro MJ, Arenas Villarroel LJ, et al. *Hypersensitivity reaction to darunavir and desensitization protocol.* Journal of investigational allergology & clinical immunology. 2009;19(3):250-1.
55. Carr A, Samaras K, Burton S, Law M, Freund J, Chisholm DJ, et al. *A syndrome of peripheral lipodystrophy, hyperlipidaemia and insulin resistance in patients receiving HIV protease inhibitors.* AIDS. 1998;12(7):F51-8.
56. Behrens GM, Stoll M, Schmidt RE. *Lipodystrophy syndrome in HIV infection: what is it, what causes it and how can it be managed?* Drug safety : an international journal of medical toxicology and drug experience. 2000;23(1):57-76.
57. Turner BJ. *Adherence to antiretroviral therapy by human immunodeficiency virus-infected patients.* J Infect Dis. 2002;185 Suppl 2:S143-51.
58. Durant J, Clevenbergh P, Halfon P, Delgiudice P, Porsin S, Simonet P, et al. *Drug-resistance genotyping in HIV-1 therapy: the VIRADAPT randomised controlled trial.* Lancet. 1999;353(9171):2195-9.
59. Back D, Gatti G, Fletcher C, Garaffo R, Haubrich R, Hoetelmans R, et al. *Therapeutic drug monitoring in HIV infection: current status and future directions.* AIDS. 2002;16 Suppl 1:S5-37.
60. Duong M, Golzi A, Peytavin G, Piroth L, Froidure M, Grappin M, et al. *Usefulness of therapeutic drug monitoring of antiretrovirals in routine clinical practice.* HIV Clin Trials. 2004;5(4):216-23.
61. Fletcher CV, Anderson PL, Kakuda TN, Schacker TW, Henry K, Gross CR, et al. *Concentration-controlled compared with conventional antiretroviral therapy for HIV infection.* AIDS. 2002;16(4):551-60.
62. Durant J, Clevenbergh P, Garraffo R, Halfon P, Icard S, Del Giudice P, et al. *Importance of protease inhibitor plasma levels in HIV-infected patients treated with genotypic-guided therapy: pharmacological data from the Viradapt Study.* AIDS. 2000;14(10):1333-9.
63. Mills EJ, Bakanda C, Birungi J, Chan K, Ford N, Cooper CL, et al. *Life expectancy of persons receiving combination antiretroviral therapy in low-income countries: a cohort analysis from Uganda.* Ann Intern Med. 2011;155(4):209-16.



64. Muratorio C, Meunier M, Sonigo C, Massart P, Boitrelle F, Hugues JN. *[Varicocele and infertility: Where do we stand in 2013?]*. Gynecologie, obstetrique & fertilité. 2013;41(11):660-6.
65. Andersen U. *Entwicklungsländer - Gemeinsamkeiten und Unterschiede* Informationen zur politischen Bildung. 2005;286.
66. Coovadia H, Jewkes R, Barron P, Sanders D, McIntyre D. *The health and health system of South Africa: historical roots of current public health challenges*. Lancet. 2009;374(9692):817-34.
67. Benatar SR. *Health care reform and the crisis of HIV and AIDS in South Africa*. N Engl J Med. 2004;351(1):81-92.
68. Ruud KW, Toverud E-L, Radloff S, Srinivas SC. *Antiretroviral Treatment and Follow-up of HIV-Infected Patients by Health Care Providers in South African Public Primary Health Care*. Journal of the Association of Nurses in AIDS care.21(5):417-28.
69. UN-OHRLLS. *The Least Developed Countries*. 2009 [Zugriff am 05.09.2019].[www.unohrlls.org/en/ldc/](http://www.unohrlls.org/en/ldc/)
70. Schooley RT. *Viral load testing in resource-limited settings*. Clinical Infectious Diseases. 2007;44(1):139-40.
71. Goldie SJ, Yazdanpanah Y, Losina E, Weinstein MC, Anglaret X, Walensky RP, et al. *Cost-effectiveness of HIV treatment in resource-poor settings - The case of Cote d'Ivoire*. New England Journal of Medicine. 2006;355(11):1141-53.
72. Van Heuverswyn F, Li Y, Neel C, Bailes E, Keele BF, Liu W, et al. *Human immunodeficiency viruses: SIV infection in wild gorillas*. Nature. 2006;444(7116):164-.
73. Shisana O, Rehle T, Simba L, Zuma K, Jooste S, Van Wyk V, et al. *South African National Prevalence, Incidence, Behaviour and Communication Survey 2008: A turning tide among teenagers?* SRC Press. 2008.
74. *Aids and South Africa*. Palgrave Macmillan. 2003 [Zugriff am 03.07.2013].<http://dx.doi.org/10.1057/9780230523517>
75. Van der Vliet V. *South Africa Divided Against AIDS: a Crisis of Leadership*. 2004.

76. Anabwani G, Navario P. *Nutrition and HIV/AIDS in sub-Saharan Africa: An overview.* Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif). 2005;21(1):96-9.
77. Kapp C. *South African Health Minister must go, say scientists.* The Lancet. 2006;368(9542):1141-2.
78. Evers M. *Seuche der Ignoranz.* Spiegel Spezial Geschichte 2007;2:123-5.
79. Mannioui A, Schiffer C, Felix N, Nelson E, Brussel A, Sonigo P, et al. *Cell cycle regulation of human immunodeficiency virus type 1 integration in T cells: antagonistic effects of nuclear envelope breakdown and chromatin condensation.* Virology. 2004;329(1):77-88.
80. Brussel A, Sonigo P. *Evidence for gene expression by unintegrated human immunodeficiency virus type 1 DNA species.* J Virol. 2004;78(20):11263-71.
81. UNAIDS. *Together we will end AIDS.* 2012 [Zugriff am 03.12.2013].[http://www.unaids.org/en/media/unaids/contentassets/documents/epidemiology/2012/jc296\\_unaids\\_togetherreport\\_\\_en.pdf](http://www.unaids.org/en/media/unaids/contentassets/documents/epidemiology/2012/jc296_unaids_togetherreport__en.pdf)
82. Katzenstein D, Laga M, Moatti JP. *The evaluation of the HIV/AIDS drug access initiatives in Cote d'Ivoire, Senegal and Uganda: how access to antiretroviral treatment can become feasible in Africa.* AIDS. 2003;17 Suppl 3:S1-4.
83. UNAIDS. *Stepping back from the edge : the pursuit of antiretroviral therapy in Botswana, South Africa and Uganda.* 2004 [Zugriff am 05.09.2012].[data.unaids.org/Publications/IRC-pub6/JC1012-SteppingBack\\_en.pdf](http://data.unaids.org/Publications/IRC-pub6/JC1012-SteppingBack_en.pdf)
84. Singler J, Farmer P. *MSJAMA. Treating HIV in resource-poor settings.* JAMA. 2002;288(13):1652-3.
85. WHO. *Treat 3 Million by 2005.* 2003 [Zugriff am 05.09.2012].[www.who.int/3by5/publications/documents/en/3by5StrategyMakingItHappen.pdf](http://www.who.int/3by5/publications/documents/en/3by5StrategyMakingItHappen.pdf)
86. Shantharam Y. *The Cost of Life: Patent laws, the WTO and the HIV/AIDS pandemic.* Canadian Undergraduate Journal of Development Studies. 2009.
87. Coetzee D, Hildebrand K, Boulle A, Maartens G, Louis F, Labatala V, et al. *Outcomes after two years of providing antiretroviral treatment in Khayelitsha, South Africa.* AIDS. 2004;18(6):887-95.

88. Uebel KE, Timmerman V, Ingle SM, van Rensburg DHCJ, Mollentze WF. *Towards universal ARV access: achievements and challenges in Free State province, South Africa.* SAMJ: South African Medical Journal. 2010;100:589-93.
89. WHO, UNAIDS, UNICEF. *Towards universal access: scaling up priority HIV/AIDS interventions in the health sector.* Progress Report. 2010.
90. Condra JH. *Virological and clinical implications of resistance to HIV-1 protease inhibitors.* Drug Resist Updat. 1998;1(5):292-9.
91. Calmy A, Ford N, Hirschel B, Reynolds SJ, Lynen L, Goemaere E, et al. *HIV viral load monitoring in resource-limited regions: optional or necessary?* Clin Infect Dis. 2007;44(1):128-34.
92. WHO. *Antiretroviral therapy for HIV infection in adults and adolescent: Recommendations for a public health approach*. 2010.
93. Bendavid E, Young SD, Katzenstein DA, Bayoumi AM, Sanders GD, Owens DK. *Cost-effectiveness of HIV monitoring strategies in resource-limited settings: a southern African analysis.* Arch Intern Med. 2008;168(17):1910-8.
94. Fiscus S, Cheng B, Crowe S, Demeter LM, Jennings C, Miller V, et al. *HIV-1 Viral Load Assays for Resource-Limited Settings* PLoS Med. 2006;3(10):e417.
95. Gerlach J, Sequeira M, Alvarado V, Cerpas C, Balmaseda A, Gonzalez A, et al. *Cost analysis of centralized viral load testing for antiretroviral therapy monitoring in Nicaragua, a low-HIV prevalence, low-resource setting.* Journal of the International AIDS Society. 2010;13:43.
96. Stramer SL, Glynn SA, Kleinman SH, Strong DM, Caglioti S, Wright DJ, et al. *Detection of HIV-1 and HCV infections among antibody-negative blood donors by nucleic acid-amplification testing.* New England Journal of Medicine. 2004;351(8):760-8.
97. Quinn TC, Brookmeyer R, Kline R, Shepherd M, Paranjape R, Mehendale S, et al. *Feasibility of pooling sera for HIV-1 viral RNA to diagnose acute primary HIV-1 infection and estimate HIV incidence.* AIDS. 2000;14(17):2751-7.
98. Dorfman. *The Detection of Defective Members of Large Populations.* Ann Math Stat. 1943;14.

99. Smith DM, May SJ, Perez-Santiago J, Strain MC, Ignacio CC, Haubrich RH, et al. *The use of pooled viral load testing to identify antiretroviral treatment failure.* AIDS. 2009;23(16):2151-8.
100. Alvarez-Munoz MT, Zaragoza-Rodriguez S, Rojas-Montes O, Palacios-Saucedo G, Vazquez-Rosales G, Gomez-Delgado A, et al. *High correlation of human immunodeficiency virus type-1 viral load measured in dried-blood spot samples and in plasma under different storage conditions.* Arch Med Res. 2005;36(4):382-6.
101. Aebischer ML, Martorana MC, Costa F, Battaglia C, Madera A, Destito D, et al. *Evaluation of the sensitivity of microfilter paper assays in an anthropological study: results of samples from Cameroon and Tanzania.* Anthropol Anz. 1990;48(1):15-23.
102. Kane CT, Ndiaye HD, Diallo S, Ndiaye I, Wade AS, Diaw PA, et al. *Quantitation of HIV-1 RNA in dried blood spots by the real-time NucliSENS EasyQ HIV-1 assay in Senegal.* Journal of Virological Methods. 2008;148(1-2):291-5.
103. Monleau M, Montavon C, Laurent C, Segondy M, Montes B, Delaporte E, et al. *Evaluation of Different RNA Extraction Methods and Storage Conditions of Dried Plasma or Blood Spots for Human Immunodeficiency Virus Type 1 RNA Quantification and PCR Amplification for Drug Resistance Testing.* Journal of Clinical Microbiology. 2009;47(4):1107-18.
104. van Deursen P, Oosterlaken T, Andre P, Verhoeven A, Ligeon V, de Jong J. *Measuring human immunodeficiency virus type 1 RNA loads in dried blood spots specimens using NucliSENS easyQ HIV-1 v2.0.* Journal of Clinical Virology. 2009;46:S28-S.
105. Garrido C, Zahonero N, Corral A, Arredondo M, Soriano V, de Mendoza C. *Correlation between Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) RNA Measurements Obtained with Dried Blood Spots and Those Obtained with Plasma by Use of Nuclisens EasyQ HIV-1 and Abbott RealTime HIV Load Tests.* Journal of Clinical Microbiology. 2009;47(4):1031-6.
106. bioMérieux. [Zugriff am 20.03.2012]. [http://www.biomerieux-diagnostics.com/upload/Schema\\_HIV12.jpg](http://www.biomerieux-diagnostics.com/upload/Schema_HIV12.jpg)
107. National Department of Health SA. Clinical guidelines for the management of HIV and AIDS in adults and adolescents 2010. Zugriff am 17.07.2013; [[http://www.sahivsoc.org/upload/documents/Clinical\\_Guidelines\\_for\\_the\\_Management\\_of\\_HIV\\_AIDS\\_in\\_Adults\\_Adolescents\\_2010.pdf](http://www.sahivsoc.org/upload/documents/Clinical_Guidelines_for_the_Management_of_HIV_AIDS_in_Adults_Adolescents_2010.pdf) p.].

108. May S, Gamst A, Haubrich R, Benson C, Smith DM. *Pooled nucleic acid testing to identify antiretroviral treatment failure during HIV infection.* Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes. 2010;53(2):194-201.
109. bioMérieux. *NucliSens EasyQ Version 2.0 Operator Manual*. 2005 [Zugriff am 20.05.2010].www.techlib.biomerieux.com
110. Julander I, Hoffner S, Kallenius G, Ostlund L, Petrini B. *Prospective 7-year monitoring of MAC bacteremia in HIV-positive Swedish patients.* Clin Microbiol Infect. 1998;4(5):271-4.
111. Drosten C, Panning M, Drexler JF, Hansel F, Pedroso C, Yeats J, et al. *Ultrasensitive monitoring of HIV-1 viral load by a low-cost real-time reverse transcription-PCR assay with internal control for the 5' long terminal repeat domain.* Clin Chem. 2006;52(7):1258-66.
112. Violari A, Cotton MF, Gibb DM, Babiker AG, Steyn J, Madhi SA, et al. *Early Antiretroviral Therapy and Mortality among HIV-Infected Infants.* New England Journal of Medicine. 2008;359(21):2233-44.
113. Berger A, Scherzed L, Stürmer M, Preiser W, Doerr HW, Rabenau HF. *Comparative evaluation of the Cobas Amplicor HIV-1 Monitor™ Ultrasensitive Test, the new Cobas AmpliPrep/Cobas Amplicor HIV-1 Monitor™ Ultrasensitive Test and the Versant HIV RNA 3.0 assays for quantitation of HIV-1 RNA in plasma samples.* Journal of Clinical Virology. 2005;33(1):43-51.
114. Gottesman BS, Grossman Z, Lorber M, Levi I, Shitrit P, Katzir M, et al. *Comparative performance of the Amplicor HIV-1 monitor assay versus NucliSens EasyQ in HIV subtype C-infected patients.* Journal of Medical Virology. 2006;78(7):883-7.
115. Rouet F, Foulongne V, Viljoen J, Steegen K, Becquart P, Valea D, et al. *Comparison of the Generic HIV Viral Load assay with the Amplicor HIV-1 monitor v1.5 and Nuclisens HIV-1 EasyQ v1.2 techniques for plasma HIV-1 RNA quantitation of non-B subtypes: the Kesho Bora preparatory study.* J Virol Methods. 2010;163(2):253-7.
116. Xu S, Song A, Nie J, Li X, Wang Y. *Performance of NucliSens HIV-1 EasyQ Version 2.0 compared with six commercially available quantitative nucleic acid assays for detection of HIV-1 in China.* Molecular diagnosis & therapy. 2010;14(5):305-16.
117. Meintjes G, Maartens G, Boulle A, Conradie F. *Guidelines for antiretroviral therapy in adults.* the Southern African HIV Clinicians Society. 2012.

118. Gessoni G, Barin P, Valverde S, Giacomini A, Di Natale C, Orlandini E, et al. *Biological qualification of blood units: considerations about the effects of sample's handling and storage on stability of nucleic acids.* Transfus Apher Sci. 2004;30(3):197-203.
119. Waters L, Kambugu A, Tibenderana H, Meya D, John L, Mandalia S, et al. *Evaluation of filter paper transfer of whole-blood and plasma samples for quantifying HIV RNA in subjects on antiretroviral therapy in Uganda.* J Acquir Immune Defic Syndr. 2007;46(5):590-3.
120. Pannus P, Fajardo E, Metcalf C, Coulborn RM, Duran LT, Bygrave H, et al. *Pooled HIV-1 Viral Load Testing Using Dried Blood Spots to Reduce the Cost of Monitoring Antiretroviral Treatment in a Resource-Limited Setting.* J Acquir Immune Defic Syndr. 2013;64(2):134-7.
121. Kantor R, Diero L, Delong A, Kamle L, Muyonga S, Mambo F, et al. *Misclassification of first-line antiretroviral treatment failure based on immunological monitoring of HIV infection in resource-limited settings.* Clin Infect Dis. 2009;49(3):454-62.
122. Mee P, Fielding KL, Charalambous S, Churchyard GJ, Grant AD. *Evaluation of the WHO criteria for antiretroviral treatment failure among adults in South Africa.* AIDS. 2008;22(15):1971-7.
123. Badri M, Lawn SD, Wood R. *Utility of CD4 cell counts for early prediction of virological failure during antiretroviral therapy in a resource-limited setting.* BMC Infectious Diseases. 2008;8(89):(04 July 2008).
124. Sawe FK, McIntyre JA. *Monitoring HIV antiretroviral therapy in resource-limited settings: time to avoid costly outcomes.* Clin Infect Dis. 2009;49(3):463-5.
125. Keiser O, MacPhail P, Boulle A, Wood R, Schechter M, Dabis F, et al. *Accuracy of WHO CD4 cell count criteria for virological failure of antiretroviral therapy.* Tropical Medicine & International Health. 2009;14(10):1220-5.
126. Marconi VC, Sunpath H, Lu Z, Gordon M, Koranteng-Apeagyei K, Hampton J, et al. *Prevalence of HIV-1 drug resistance after failure of a first highly active antiretroviral therapy regimen in KwaZulu Natal, South Africa.* Clin Infect Dis. 2008;46(10):1589-97.
127. Barth RE, Wensing AM, H.A T. *Rapid accumulation of nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor-associated resistance: evidence of transmitted resistance in rural South Africa.* AIDS. 2008;22:2210-2.

128. Hosseinipour MC, van Oosterhout JJG, Weigel R, Phiri S, Kamwendo D, Parkin N, et al. *The public health approach to identify antiretroviral therapy failure: high-level nucleoside reverse transcriptase inhibitor resistance among Malawians failing first-line antiretroviral therapy.* AIDS. 2009;23(9):1127-34.
129. Oosterhout JJGv, Brown L, Weigel R, Kumwenda JJ, Mzinganjira D, Saukila N, et al. *Diagnosis of antiretroviral therapy failure in Malawi: poor performance of clinical and immunological WHO criteria.* Tropical Medicine and International Health. 2009;14(8):856-61.
130. Haubrich R, Currier JS, Forthal DN, Beall G, Kemper CA, Johnson D, et al. *A Randomized Study of the Utility of Human Immunodeficiency Virus RNA Measurement for the Management of Antiretroviral Therapy* Clinical Infectious Diseases. 2001;33:1060-8.
131. Phillips AN, Pillay D, Miners AH, Bennett DE, Gilks CF, Lundgren JD. *Outcomes from monitoring of patients on antiretroviral therapy in resource-limited settings with viral load, CD4 cell count, or clinical observation alone: a computer simulation model.* Lancet. 2008;371(9622):1443-51.
132. Monleau M, Butel C, Delaporte E, Boillot F, Peeters M. *Effect of storage conditions of dried plasma and blood spots on HIV-1 RNA quantification and PCR amplification for drug resistance genotyping.* J Antimicrob Chemother. 2010;65(8):1562-6.
133. Bates I, Maitland K. *Are laboratory services coming of age in sub-Saharan Africa?* Clinical Infectious Diseases. 2006;42(3):383-4.

## 7 Abbildungsverzeichnis

<b>Abb. 1:</b>	Aufbau eines HIV-Virionpartikels. [aus: Hoffmann, Rockstroh, HIV 2013/2014, Medizin Fokus Verlag, 2013] .....	2
<b>Abb. 2:</b>	Natürlicher Verlauf der HIV-Infektion. [aus: Hoffmann, Rockstroh, HIV 2013/2014, .....	5
<b>Abb. 3:</b>	Angriffspunkte antiretroviraler Wirkstoffe. [aus: Baenker et al., Duale Reihe Innere Medizin, Thieme, 2009].....	8
<b>Abb. 4:</b>	Ablauf der RT-PCR.....	25
<b>Abb. 5:</b>	Minipool-Strategie.....	26
<b>Abb. 6:</b>	Minipoolstrategie mit Anwendung des Algorithmus. ....	28
<b>Abb. 7:</b>	retrospektive Analyse. ....	31
<b>Abb. 8:</b>	Dried Blood Spots.....	33
<b>Abb. 9:</b>	Anzahl der negativen, positiven und ungültigen Pools. ....	38
<b>Abb. 10:</b>	Auswertung der Poolingstrategie.....	39
<b>Abb. 11:</b>	Kostenbemessung der Minipoolmethode. ....	43
<b>Abb. 12:</b>	Vergleich der Anzahl der Tests.....	43
<b>Abb. 13:</b>	Viruslastprävalenz der Studienpopulation. ....	44
<b>Abb. 14:</b>	Altersverteilung der Studienpopulation. ....	44
<b>Abb. 15:</b>	Anzahl der Patienten, die die jeweilige Medikamentenkombination erhielten.....	45



## 8 Tabellenverzeichnis

<b>Tab. 1:</b>	Variablen zur Vorauswahl der Patienten. ....	29
<b>Tab. 2:</b>	Charakteristik der Proben, die in die Minipools einbezogen wurden sind.....	37
<b>Tab. 3:</b>	Auswertung der Pools. Vergleich der Ergebnisse ohne Durchführung der Kontrolltest und mit Durchführung der Kontrolltests aller positiven Pools. ....	40
<b>Tab. 4:</b>	Auflistung der Anzahl der Tests.....	41
<b>Tab. 5:</b>	Übersicht über die Viruslast der Studienteilnehmer.....	46
<b>Tab. 6:</b>	Poolergebnisse der Poolkonstellation a bei unterschiedlichen Schwellenwerten .....	49
<b>Tab. 7:</b>	Poolergebnisse der Poolkonstellation b bei unterschiedlichen Schwellenwerten .....	50
<b>Tab. 8:</b>	Effizienz, Validität und Genauigkeit der Viruslastbestimmung an gepoolten Proben unter Verwendung von Dried Blood Spots bei Poolkonstellation a. ....	51
<b>Tab. 9:</b>	Effizienz, Validität und Genauigkeit der Viruslastbestimmung an gepoolten Proben unter Verwendung von Dried Blood Spots bei Poolkonstellation b. ....	52
<b>Tab. 10:</b>	Poolergebnisse der DBS bei unterschiedlichen Schwellenwerten...	54
<b>Tab. 11:</b>	Effizienz, Validität und Genauigkeit der Viruslastbestimmung an gepoolten Proben unter Verwendung von Dried Plasma Spots.....	55

## 9 Annex: Liste der Krankenhäuser

<p> Aan Het Pad Phc Clinic  Abbots Dale Phc Clinic  Abbotsdale Phc Clinic  Adriaanse Clinic  Albertinia Municipal Clinic  Albertinia Phc Clinic  Albow Gardens Clinic  Alma Clinic  Alphen Clinic Anniebrown Clinic  Ashton Phc Clinic  Ashton Psychiatric Services  Aurora Municipal Clinic  Aurora Phc Clinic  Barrydale Municipal Clinic  Barrydale Phc Clinic  Beaufort West Municipal Clinic  Beaufortwest Hospital  Beaufortwest Mobile 1 Clinic  Beaufortwest Mobile 2 Clinic  Beaufortwest Phc Clinic  Belhar Day Hospital  Bellavista Clinic  Bellville Day Hospital  Bellville South Chc  Bergrivier/Soetendal Clinics  Bergsig Phc Clinic  Bird Street Clinic  Bishop Lavis Clinic  Bishop Lavis Day Hospital  Bitterfontein Phc Clinic  Blanco Clinic  Bloekombos Clinic  Bluedowns Clinic  Bongulethu Phc Clinic  Bonnievale Mobile Clinic  Bonnievale Municipal Clinic  Bonnievale Phc  Bossieveld Phc Clinic  Bothasiq Clinic  Botrivier Phc Clinic  Brackenfell Clinic  Brandwacht Clinic  Bredasdorp Hospital  Bredasdorp Municipal Clinic  Bredasdorp Phc Clinic  Bredasdorp Psychiatric Service  Breede Valley Municipal Clinic  Breede Valley Rsc  Briahton Clinic  Bridgton Commhealth Centre  Bridgton Commhealth Centre  Browns Farm Day Hospital  Buffeljags Rivier Phc Clinic  Caldeon Mobile2 Clinic </p>	<p> Kylemore Phc Clinic  Ladismith Municipal Clinic  Ladismith Phc Clinic  Lady Michaelis Day Hospital  Laingsburg Hospital  Laingsburg Mobile Clinic  Laingsburgmunicipal Clinic  Laingsburgphc Clinic  Laingville Phc Clinic  Lalie Cleophas Clinic  Lambert's Bay Municipal Clinic  Langa Day Hospital  Langebaan Municipal Clinic  Lanqa Clinic  Lansdowne Clinic Aanhet'pad Phc Clinic  Lavender Hill Clinic  Lawaaikampclinic  Leeu Gamkaphc Clinic  Leeukloof Phc Clinic  Lente Eur Clinic  Liesbeeck Mou  Lotus River Clinic  Lotus River Day Hospital  Louwvillephc Clinic  Lutzville Municipal Clinic  Lutzvillemobile Clinic  Lutzvillephc Clinic  Luvuyo Clinic  Macassar Clinic  Macassar Day Hospital  Maitland Clinic  Maitland Day Hospital  Malmesbury Hospital  Malmesbury Municipal Clinic  Malmesburyphc Clinic  Mamre Communityhealthcentre  Mamre Day Hospital  Manenber Clinic  Mariapieterse Clinic  Masi Humelele Clinic  Masinedane Clinic  Matjiesfontein Phc Clinic  Matthew Goniwe Clinic  Mbekweni Phc Clinic  Mccain Clinic  Mccgregor Municipal Clinic  Mccgregor Phc Clinic  Melkbos Clinic  Melkhoutfontein Phc Clinic  Merweville Phc Clinic  Mfuleni Day Hospital  Michael Mpongwana Day Hospital  Minniephc Clinic  Mitchells Plain Day Hospital </p>
---	--

Caledon Hospital	Mitchell's Plain Mou
Caledon Mobile 3 Clinic	Mitchells Plainyouth Health
Caledon Municipal Clinic	Mobile Durbanville
Caledon Psychiatric Services	Mobile Macassar
Caledon Rsc Aan Het Pad Phc Clinic	Mobile Melkbos
Caledonmobile 1 Clinic	Molsvlei Clinic
Calltzdorp Clinic	Montagu Mobile Clinic
Calltzdorp Mobile Clinic	Montagu Phc Clinic
Capetown Station Family Plan	Montagu Psychiatric Services
Ceres Hospital	Montagu Rsc Clinic
Ceres Mobile Clinic	Montanaphc Clinic
Ceres Phc Clinic	Mooreesburg Phc Clinic
Ceres Psychiatric Services	Mooreesburg Phc Clinic
Chadel Street Clinic	Moorreesburg Municipal Clinic
Chatsworth Phc Clinic	Moorreesburg Phc Clinic
Chc Worcester	Mossel Bay Hospital
Citrusdal Hospital	Mossel Bay Municipal Clinic
Citrusdal Municipal Clinic	Mount Pleasant Phc Clinic
Citrusdal Phc Clinic	Mowbray Maternity Hospital
Clanwilliam Municipal Clinic	N'duli Phc Clinic
Clanwilliam Phc Clinic	Nelspoort Phc Clinic
Clanwilliam Psych Services	Netreo Clinic
Claremont Clinic	New Horisons Clinic
Cogmanskloof Phc Clinic	Newton Phc Clinic
Constitution Street Clinic	Newtown Phc Clinic
Conville Clinic	Nieuveldpark Clinic
Cross Roads Day Hospital	Nieuwedrift Phc Clinic
Crossroads 1 Clinic	Nieuwedrift Tb Clinic
Crossroads 2 Clinic	Nkoubela Phc Clinic
Dali E De Waal Clinics	Nolungile Day Hospital
D'almeida Clinic	Nolunoile Clinic
Dalvale Phc Clinic	Nolunoile Youth Centre
Dana Bay Mobile Clinic	Noordhoek Phc Clinic
Dana Bay Mobile Clinic	Northoine Clinic
Darling Municipal Clinic	Nuwerus Clinic
Darling Phc Clinic	Nyanga Day Hospital
De Doornsmunicipal Clinic	Nyanqa Clinic
De Doornspkc Clinic	Ocean View Clinic
De Rust Phc Clinic	Ocean View Day Hospital
De Wet Phc Clinic	Onrus River Clinic
Delft Day Hospital	Onrusrivier Municipal Clinic
Delft South Clinic	Oudtshoom Hospital
Devon Valley Phc Clinic-Area 3	Oudtshoom Civic Centre Clinic
Diazville Phc Clinic	Oudtshoom Mobile Clinics
Died River	Overhex Phc Clinic
Dirkie Uys Clinic	Paarl East Tc Newman Hospital
Don & Pat Bilton Phc Clinic	Paarl Hospital
Doringbaai Phc Clinic	Paarl Municipal Clinic
Dr Abdurahman Day Hospital	Pacaltsdorp Day Hospital
Dr Aj De Win	Pacaltsdorp Municipal Clinic
Dr Ivan Toms Clinic	Pacaltsdorpclinic
Dr Jc Venter	Parkdene Clinic
Dr Jdj Le Grange	Parkwood Clinic
Dr Lj Lerm	Parow Clinic
Dr P Du Preez	Parow Day Hospital
Dr Pj Kotze	Pater Noster Phc Clinic
Dr Wp Nel	Patriotplein Phc Clinic
Du Noon Clinic	Phillipi Clinic

Durbanville Clinic	Phola Park Phc Clinic
Durbanville Day Hospital	Phumlani Clinic
Dysseldorp Chc Clinic	Piketberg Municipal Clinic
Eastridge Clinic	Piketberg Phc Clinic
Ebenhaezer Phc Clinic	Plettenberg Bay Chc
Eden District Municipal Clinic	Plettenberg Bay Mobile Clinic
Eersterivier Hospital	Porterville Municipal Clinic
Elandsbaai Clinic	Porterville Phc Clinic
Elim Phc Clinic	Prince Albert Hospital
Elsies River Clinic	Prince Albert Municipal Clinic
Elsies River Day Hospital	Prince Albert Phc Clinic
Eyethu Clinic	Prince Alfred Hamlet Phc Clin
Factreton Clinic	Princealfred Hamlet Clinic
False Bay Hospital	Princealfred Hamlet Mobile
Fish Hoek Clinic	Princealfred Hamlet Mun Clin
Franschhoek North Clinic	Protea Park Clinic
Franschhoek South Clinic	Railton Clinic
Friemersheim Phc Clinic	Ravensmead Clinic
Gansbaai Phc Clinic	Ravensmead Day Hospital
Genadendal Municipal Clinic	Rawsonville Municipal Clinic
Genadendal Phc Clinic	Rawsonville Phc Clinic
Genetic Services South Cape	Red Cross Children's Hospital
George Civic Centre Clinic	Reed Street Day Hospital
George Hospital	Reproductive Health
George Road Clinic	Reproductive Health Mannenberg
Gf Jooste Hospital	Reproductivehealth - Dorp Str
Good Hope Day Hospital	Reproductivehealth - Mitchell
Goodwood Day Hospital	Reproductivehealth -Bellville
Gordons Bavclinic	Reproductivehealth Clinic
Gouda Municipal Clinic	Retreat Clinic
Gouda Phc Clinic	Retreat Day Hospital
Graafwater Municipal Clinic	Retreat Mou
Graafwater Phc Clinic	Riebeeck Kasteel Mun Clinic
Grabouw Day Hospital	Riebeeck Kasteel Phc Clinic
Grabouw Mobile 1 Clinic	Riebeeck West Municipal Clinic
Grabouw Mobile 2 Clinic	Riebeeck Kasteel Phc Clinic
Grabouw Mobile 3 Clinic	Rietpoort Clinic
Grabouw Municipal Clinic	Riverlands Phc Clinic
Grabouw Phc Clinic	Riversdal Mobile Clinic
Grassv Park Civic Clinic	Riversdale Hospital
Grassy Park Day Hospital	Riversdale Municipal Clinic
Green Point Complex Day Hosp	Riversdale Phc Clinic
Greyton Municipal Clinic	Riviersonderend Phc Clinic
Greyton Phc Clinic	Robbie Nurock Day Hospital
Grootbrakrivier Mun Clinic	Robertson Hospital
Grootdrakenstein Phc Clinic	Robertson Mobile Clinic
Groote Schuur Hospital	Robertson Mobile Clinic 1
Guguletu Clinic	Robertson Mobile Clinic 2
Guguletu Day Hospital	Robertson Municipal Clinic
Guguletu Mou	Robertson Phc Clinic
Haarlem Phc Clinic	Robertson Psychiatric Services
Hanna Coetlee Phc Clinic	Rocklands Clinic
Hanover Park Clinic	Rosemoor Clinic
Hanover Park Day Hospital	Russels Rest Clinic
Hanover Park Mou	Rusthof Day Hospital
Happy Valley Phc Clinic	Ruyterweg Day Hospital
Harmonie Clinic	Saldanha Municipal Clinic
Hartenbos Clinic	Sandy Point Phc Clinic

Hartenbos Municipal Clinic	Sarepta Clinic
Hawston Phc Clinic	Saron Municipal Clinic
Heidelberg Municipal Clinic	Saron Phc Clinic
Heidelberg Phc Clinic	Satellite Hazendal (Silvertown)
Heideveld Antenatal Clinic	Satellite Chestnut (St Vincent)
Heideveld Clinic	Satellite Driftsands ( <i>Dr Ivan Toms</i> )
Heideveld Day Hospital	Satellite Fagan St Clinic (Gordons Bay)
Herbertsdale Phc Clinic	Satellite Fisantekraal (Durbanville)
Hermanus Hospital	Satellite Groenvallei (Kasselsvlei)
Hermanus Phc	Satellite Honevside (Lansdowne)
Hermanus Psychiatric Services	Satellite Leonsdale (Elsies River)
Herold Phc Clinic	Satellite Mandalav(Crossroads 1)
Hexberg/Blouville Phc Clinic	Satellite Matroosfontein (Adriaanse)
Hillcrest Clinic	Satellite Newfields (Hanover Park)
Hiv Clinic Worcester	Satellite Pelikan Park (Lotus River)
Hopefield Municipal Clinic	Satellite Pella (Saxon Sea)
Hopefield Rsc Clinic	Satellite Pinelands (133)
Hornlee Phc Clinic	Satellite Red Hill (Muizenbero)
Hottentots Holland Hospital	Satellite Schotschekloof (Chaoel Str)
Hout Bav Main Road Clinic	Satellite Simonstown (Fish Hoek)
Hout Bay Day Hospital	Satellite Table View Clinic (Du Noon) Cape
Huis Tomlinson Old Age Home	Clothing
Idasvallei Phc Clinic	Saxon Sea Clinic
Ikhwezi Day Hospital	Scottsdene Clinic
Ikwezi Chc	Scottsdene Day Hospital
Infectious Diseases Hospital	Seawinds Clinic
Inzame Zabantu Day Hospital	Sedgefield Municipal Clinic
J R Phc Clinic	Sedgefield Phc Clinic
Jj Du Preez Phc Clinic	Sidesaviwa Clinic
Kalbaskraal Phc Clinic	Silvertown Clinic
Karl Bremer Hospital	Simondium/S-A Paarl Clinics
Kasselsvlei Chc	Swellendam Phc Clinic
Kasselsvlei Day Hospital	Tygerberg Hospital
Kayamandi Clinic	Vredendal Municipal Clinic
Kensington Day Hospital	Vredendal Phc Clinic
Keurhoek Phc Clinic	Vredendal Phc Clinic
Khayelitsha Day Hospital	Vredendal Psychiatric
Khayelitsha Mou	Vredendal Psychiatric services
Klaarstroomphc Clinic	Vuvani Clinic
Klapmuts Phc Clinic	Waenhuiskrans Phc Clinic
Klawer Municipal Clinic	Wallacedene Clinic
Klawer Phc Clinic	Warm Bokkeveld Phc Clinic
Klein Drakenstein Phc Clinic	Wellington Municipal
Klein Karoo-Operative Ltd	Weltevreden Vallev Clinic
Klein Nederburgphc Clinic	Wesbank Clinic
Kleinbrak Motelphc Clinic	Wesbank Phc Clinic
Kleinmond Municipal Clinic	Wesfleur Hospital
Kleinmond Phc Clinic	Westlake Clinic
Kleinville Day Hospital	Westridae Clinic
Klio Road Clinic	Willa Phc Clinic
Kliprand Clinic	Windmeul/Paardeberg Clinics
Knysna Eden Municipal Mobile	Wit Lokasie Clinic
Knysna Hospital Knysna Town Clinic	Wolseley Municipal Clinic
Koekenaap Phc Clinic	Wolseley Phc Clinic
Koelenhof Phc Clinic	Woodstock Day Hospital
Koringberg Municipal Clinic	Worcester Hospital
Koue Bokkeveld Phc Clinic	Worcester Mobile Clinic
Kraaifontein Day Hospital	Worcester Municipal Clinic

Kranshoek Phc Clinic Kuils River Clinic Kuvasa Clinic Kwamandlenkosi Phc Clinic Kwanokathula Clinic Kyaletu Clinic	Worcester Phc Clinic Worcester Psychiatric Wvnbera Clinic Wynberg Day Hospital Zakhele Clinic Zoar Phc Clinic Zolani Phc Clinic Zwellhle Clinic
---	--

## **10 Annex: Vorexperimente zu den DBS**

### **First run:**

prescription	added volume of lysis buffer	insert volume <sup>1</sup> of plasma [ml]	plasma result [cps/ml]	DBS result [cps/ml]
1 spot of patient 1	2 ml	0.050	37.000	97.000
1 spot of patient 2	2 ml	0.050	40.000	85.000
1 spot of patient 3	2 ml	0.050	LDL	LDL
2 spots of patient 1	2 ml	0.100	37.000	45.000
2 spots of patient 2	2 ml	0.100	40.000	13.000
2 spots of patient 3	2 ml	0.100	LDL	<100
5 spots of patient 1	2 ml	0.250	37.000	invalid <sup>2</sup>
5 spots of patient 2	2 ml	0.250	40.000	13000
5 spots of patient 3	2 ml	0.250	LDL	LDL
10 spots of patient 4	2 ml	0.500	12.000	LDL
10 spots of patient 5	2 ml	0.500	170.000	14.000
10 spots of patient 6	2 ml	0.500	LDL	LDL
10 spots of patient 7	4 ml	0.500	22.000	invalid <sup>2</sup>
10 spots of patient 8	4 ml	0.500	410.000	79.000
10 spots of patient 9	4 ml	0.500	LDL	LDL
2 spots of patient 10	2 ml	0.050	LDL	LDL
20 spots (10 of pt 12, 10 of pt 13)	2 ml	1.000	12 = LDL 13 = 27.000	invalid <sup>2</sup>
20 spots (10 of pt 14, 10 of pt 15)	2 ml	1.000	14 = LDL 15 = 1.200	LDL
20 spots (10 of pt 16, 10 of pt 17)	4 ml	1.000	16 = LDL 17 = 390.000	290.000
20 spots (10 of pt 18, 10 of pt 19)	4 ml	1.000	18 = LDL 19 = 35.000	1.400
pt 20, square cuts	2 ml	0.050	15.000	42.000
pt 20, round cuts	2 ml	0.050	15.000	56.000
pos control	1 ml	1.000	23000	23000
neg control	1 ml	1.000	LDL	LDL

1) Inserted in the EasyMag off-board program, 1 spot = 50 µl

2) Reason for invalidity: Poor amplification; none of the curves sufficiently reached its plateau level

**Second Run:**

→ First 4 patients = VL range between 1.000 and 10.000 cps/ml

prescription	added vol. of lysis buffer	insert volume <sup>3</sup> of plasma [ml]	plasma result [cps/ml]	DBS result [cps/ml]
1a: 2 spots of pt 1	2 ml	0.050	1.400	invalid <sup>4</sup>
1b: 2 spots of pt 1	2 ml	0.050	1.400	560
2a: 2 spots of pt 2	2 ml	0.050	8.400	4.400
2b: 2 spots of pt 2	2 ml	0.050	8.400	3.200
3a: 2 spots of pt 3	2 ml	0.050	5.700	4.200
3b: 2 spots of pt 3	2 ml	0.050	5.700	11.000
4a: 2 spots of pt 4	2 ml	0.050	3.400	11.000
4b: 2 spots of pt 4	2 ml	0.050	3.400	5.100
Mi 1a	3 ml	0.250	all patients had a VL < 1.000 cps/ml, in total pool < 1.000 cps/ml	LDL
Mi 1b	3 ml	0.250		250 <sup>6</sup>
Mi 2a	3 ml	0.250	1 patient > 1.000 cps/ml, all others LDL	61
Mi 2b	3 ml	0.250		490
Mi 3a	3 ml	0.250	1 patient >> 1.000 cps/ml, others LDL	invalid <sup>4</sup>
Mi 3b	3 ml	0.250		32.000
Mi 4a	3 ml	0.250	all patients < 1.000 cps/ml, but in total pool > 1.000 cps/ml	72
Mi 4b	3 ml	0.250		invalid <sup>4</sup>
Ma 1a	4 ml	0.500	patients of Mi 1 + 2	invalid <sup>4</sup>
Ma 1b	4 ml	0.500		invalid <sup>4</sup>
Ma 2a	4 ml	0.500	patients of Mi 3 + 4	invalid <sup>5</sup>
Ma 2b	4 ml	0.500		invalid <sup>4</sup>
circle (2 spots)	2 ml	0.050	890.000	1.300.000
square (2 spots)	2 ml	0.050	890.000	820.000
pos control	1 ml	1.000	22.000	22.000
neg control	1 ml	1.000	LDL	LDL

- 3) This time: inserted volume → one spot counts as 50 µl of blood => 25 µl of Plasma
- 4) No amplification
- 5) None of the curves sufficiently reached its plateau level
- 6) Cut-off should be <50 cps/ml, so this pool was false positive



## Curriculum Vitae

### Personalien:

Name: Anna-Teresa Lundershausen  
Geburtsdatum: 10 Juli 1987  
Geburtsort: Erfurt

### Schulbildung:

1994 – 1998 Grundschole Barfüßerschule, Erfurt  
1998 – 2006 Evangelisches Ratsgymnasium, Erfurt  
2006 Abitur am Evangelischen Ratsgymnasium, Erfurt

### Studium:

10/2006 – 05/2013 Studium der Humanmedizin an der Julius-Maximilians-Universität, Würzburg  
08/2008 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
02/2012 – 01/2013 Praktisches Jahr  
Chirurgie: Triemlispital, Zürich, Schweiz  
Innere Medizin: Klinikum Coburg  
HNO: Universitätsklinikum Würzburg  
05/2013 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

### Praktika und berufliche Tätigkeiten:

04/2008 – 04/2009 Studentische Hilfskraft ( Institut für Anatomie und Zellbiologie und Institut der Physiologie) an der Julius-Maximilians-Universität, Würzburg  
02/2009 Famulatur an der Rotkreuzklinik, Würzburg  
10/2009 Famulatur bei "HOPE Cape Town" auf der Infektionsstation „Ithemba“, Tygerberg Hospital, Kapstadt, Südafrika  
11/2009 Mitglied IRTG 1522  
09/2009 – 03/2010 Promotion am Department für klinische Virologie am Tygerberg Hospital, Kapstadt, Südafrika  
03/2011 Famulatur in einer allgemein- und handchirurgische Praxis, Würzburg  
04/2011 Famulatur in einer HNO-Praxis, Erfurt  
09/2011 Famulatur am Bugando Medical Center, Mwanza, Tansania  
seit 10/2013 Assistenzarzt in der Hals-Nasen-Ohrenheilkunde, Universitätsklinikum Würzburg

## **Danksagung**

Mein herzlicher Dank gilt Prof. Dr. August Stich für die gute Betreuung, sowie die kritische Durchsicht der Manuskripte.

Bei Prof. Dr. Wolfgang Preiser bedanke ich mich besonders für die Überlassung des Themas dieser Doktorarbeit, die freundliche Aufnahme in seiner Abteilung und die tatkräftige Unterstützung bei der Veröffentlichung unserer Studie. Danken möchte ich auch Dr. Gert van Zyl für die sympathische Unterstützung, dauernde Ansprechbarkeit und die vielen flexiblen Problemlösungen.

Besonderer Dank gilt außerdem allen Mitarbeitern des IRTG 1522, speziell den Schirmherren Prof. Dr. Wolfgang Preiser und Prof. Dr. Rethwilm, da ohne das Graduiertenkolleg und dessen finanzielle Unterstützung diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Prof. Dr. Rethwilm danke ich für die Übernahme des Koreferates.

Mein Dank gilt Marna Blomerus und Lindsay Watermeyer für die geduldige Anleitung beim Erlernen der PCR-Methodik sowie den Hilfestellungen bei der praktischen Durchführung der Versuche. Bedanken möchte ich mich an dieser Stelle bei dem gesamten Team der virologischen Abteilung des Tygerberg-Hospitals der Universität Stellenbosch für die freundliche Aufnahme und Einarbeitung sowie die Bereitstellung der Blutseren.

Danken möchte ich außerdem Thore Belz für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung.

Ein besonderer Dank gilt Susanne Potschka für die konstruktive und herzliche Zusammenarbeit in Südafrika.

Mein ganz persönlicher Dank geht an meine liebe Familie für die Unterstützung während des gesamten Studiums und die fürsorgliche Begleitung in angespannten Situationen.