

**HIV-1-Subtypisierung mittels
Multi-Region Hybridisation Assay
in Bevölkerungsgruppen
mit unterschiedlichem sexuellen
Risikoverhalten
in Mbeya Region, Tansania**

**Karl-Heinz Herbinger
2006**

Aus der

**Abteilung für Infektions- und Tropenmedizin
(Leiter: Prof. Dr. med. Thomas Löscher)**

**der Medizinischen Poliklinik, Klinikum Innenstadt,
(Direktor: Prof. Dr. med. Detlef Schlöndorff)**

der Ludwig-Maximilians-Universität München

**HIV-1-Subtypisierung mittels
Multi-Region Hybridisation Assay
in Bevölkerungsgruppen
mit unterschiedlichem sexuellen
Risikoverhalten
in Mbeya Region, Tansania**

**Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München**

**vorgelegt von
Karl-Heinz Herbinger
aus Neuburg an der Donau
2006**

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München**

Berichterstatter:

Prof. Dr. med. Th. Löscher

Mitberichterstatter:

Prof. Dr. med. F.-D. Goebel

Prof. Dr. med. G. Frösner

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter:

PD Dr. med. M. Hölscher

Dekan:

Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung:

30.11.2006

Die Anfertigung dieser Dissertation basiert auf Blutproben und soziologischen Daten von 1.734 Probanden, die ich während meiner 15-monatigen Forschungstätigkeit (August 2000 bis August 2001, April und Mai 2002) in Mbeya, Tansania, gewonnen habe.

Meine Auslandstätigkeit wurde mir ermöglicht durch die freundliche Unterstützung mittels eines 12-monatigen Doktorandenstipendiums des

DAAD (Deutscher Akademischer Austauschdienst, Bonn)

im Rahmen des gemeinsamen Hochschulsonderprogramms III von Bund und Ländern.

Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Arroyo MA, Hoelscher M, Sanders-Buell E, **Herbinger KH**, Samky E, Maboko L, Hoffmann O, Robb MR, Birx DL, McCutchan F. *HIV type 1 subtypes among blood donors in the Mbeya region of southwest Tanzania*. AIDS Research and Human Retroviruses, August 2004; 20(8): 895-901

Herbinger KH, Gerhardt M, Piyasirisilp S, Mloka D, Arroyo MA, Hoffmann O, Maboko L, Birx DL, Mmbando D, McCutchan FE, Hoelscher M. *Frequency of HIV type 1 dual infection and HIV diversity: analysis of low- and high-risk populations in Mbeya Region, Tanzania*. AIDS Research and Human Retroviruses, Juli 2006; 22(7): 599-606

Für meine tansanischen Freunde

*Chagua maisha yako –
uchaguzi ni wako ...*

(Altes tansanisches Sprichwort
aus dem Kiswahili)

*Wähle dein Leben –
die Wahl ist deine ...*

INHALTSVERZEICHNIS

1.	EINLEITUNG	1
1.1.	Geschichte und Nomenklatur von SIV, HIV und dessen Subtypen	1
1.1.1.	Das "neue Virus"	1
1.1.1.1.	Entdeckung von AIDS und HIV	1
1.1.1.2.	Taxonomie.....	3
1.1.1.2.1.	Familie: Retroviridae	3
1.1.1.2.2.	Gattung: Lentiviren	5
1.1.2.	Spezies: Simian Immunodeficiency Virus (SIV).....	6
1.1.2.1.	Primaten	6
1.1.2.2.	Einteilung und Nomenklatur	8
1.1.2.3.	Übertragung auf den Menschen	10
1.1.3.	Spezies: Human Immunodeficiency Virus (HIV).....	12
1.1.3.1.	Genom	12
1.1.3.1.1.	Gene	12
1.1.3.1.2.	Super- und Mehrfachinfektionen	13
1.1.3.1.3.	Rekombinationen	15
1.1.3.2.	Einteilung und Nomenklatur	17
1.1.3.2.1.	HIV-Typen: HIV-1 und HIV-2	17
1.1.3.2.2.	Gruppen von HIV-1	18
1.1.3.2.2.1.	Subtypen und Subsubtypen	19
1.1.3.2.2.2.	Circulating Recombinant Forms (CRF).....	23
1.1.3.2.3.	Gruppen von HIV-2	24
1.2.	Epidemiologie von HIV und dessen Subtypen	25
1.2.1.	Ursprung der Epidemie	25
1.2.2.	HIV-1	26
1.2.2.1.	Ausbreitung	26
1.2.2.1.1.	Ausbreitung in Afrika	26
1.2.2.1.2.	Weltweite Ausbreitung	27
1.2.2.1.3.	Ausbreitungsdynamik	29
1.2.2.2.	Verteilung der HIV-1-Subtypen.....	30
1.2.2.2.1.	Weltweite Verteilung	30
1.2.2.2.2.	Verteilung in Tansania	32
1.2.3.	HIV-2: Ausbreitung und Verteilung	33
1.3.	Molekularbiologischer Nachweis von HIV und dessen Subtypen	34
1.3.1.	Nachweis von HIV	34
1.3.2.	Nachweis von HIV-1-Subtypen	35
1.3.3.	Multi-Region Hybridisation Assay (MHA)	37
1.3.4.	Real-Time-PCR.....	38
1.3.5.	Hybridisierungssonden der Real-Time-PCR.....	38
2.	FRAGESTELLUNG UND ZIELSETZUNG.....	41

3.	MATERIAL UND METHODEN	43
3.1.	Studienbedingungen.....	43
3.1.1.	Studienort: Mbeya Region	43
3.1.2.	HIV Superinfection Study (HISIS)	44
3.1.3.	Studienpopulation	46
3.1.3.1.	High-Risk-Group (HRG)	47
3.1.3.2.	Non-High-Risk-Group (NRG)	49
3.1.3.2.1.	Antenatal Clinic Attendees (ACA).....	49
3.1.3.2.2.	Blutspender (BD)	50
3.2.	Gewinnung der PBMC-Proben.....	51
3.2.1.	Blutentnahme	51
3.2.1.1.	Material	51
3.2.1.2.	Durchführung	51
3.2.2.	PBMC-Isolation mit <i>Ficoll</i> TM	52
3.2.2.1.	Material	52
3.2.2.2.	Dichtegradientensubstanzen (<i>Ficoll</i> TM)	53
3.2.2.3.	Durchführung	54
3.2.3.	PBMC-Zählung	56
3.2.3.1.	Material	56
3.2.3.2.	Durchführung	56
3.2.3.3.	Yield und Viability.....	56
3.2.4.	Kryopreservation der PBMC	58
3.2.4.1.	Material	58
3.2.4.2.	Durchführung	58
3.3.	Multi-Region Hybridisation Assay (MHA)	60
3.3.1.	Extraktion.....	60
3.3.1.1.	Material	60
3.3.1.2.	Durchführung	60
3.3.2.	Amplifizierung mittels <i>nested</i> -PCR	61
3.3.2.1.	Material für 1. PCR	61
3.3.2.2.	Durchführung der 1. PCR	62
3.3.2.3.	Material für 2. PCR.....	64
3.3.2.4.	Durchführung der 2. PCR	65
3.3.3.	Detektion	67
3.3.3.1.	Material	67
3.3.3.2.	HIV-1-Subtypen-Bestimmung mittels <i>TaqMan</i> [®] -PCR.....	67
3.3.3.3.	Detektion mit dem <i>ABI Prism</i> [®] 7700	74
3.4.	Studiendesign und Datenverarbeitung.....	74
3.4.1.	Studiendesign	74
3.4.1.1.	Studientyp	74
3.4.1.2.	Studienverlauf	75
3.4.2.	Datenverarbeitung	76

4.	ERGEBNISSE	77
4.1.	Molekularbiologische HIV-Ergebnisse des MHA	77
4.1.1.	Interpretation der Ergebnisse	77
4.1.1.1.	Sensitivität.....	77
4.1.1.2.	Reine/Rekombinante Subtypen und Einfach-/Mehrfachinfektionen	80
4.1.1.3.	Übertragungswege bei reinen und rekombinanten Subtypen.....	82
4.1.2.	Molekularbiologische HIV-Ergebnisse der High-Risk-Group (HRG)	86
4.1.2.1.	Reine/Rekombinante Subtypen und Einfach-/Mehrfachinfektionen	86
4.1.2.2.	HIV-1-Subtypen-Verteilung	87
4.1.2.2.1.	Subtypen-Verteilung nach Proben-Ergebnissen	87
4.1.2.2.2.	Subtypen-Verteilung nach DNA-Regionen	89
4.1.3.	Molekularbiologische HIV-Ergebnisse der Non-High-Risk-Group (NRG)	91
4.1.3.1.	Reine/Rekombinante Subtypen und Einfach-/Mehrfachinfektionen	91
4.1.3.2.	HIV-1-Subtypen-Verteilung	93
4.1.3.2.1.	Subtypen-Verteilung nach Proben-Ergebnissen	93
4.1.3.2.2.	Subtypen-Verteilung nach DNA-Regionen	94
4.2.	Vergleich: Grundlegende soziologische Ergebnisse und molekular- biologische HIV-Ergebnisse des MHA	97
4.2.1.	Risikogruppen	97
4.2.1.1.	Vergleich: Risikogruppen und Einfach-/Mehrfachinfektionen.....	97
4.2.1.1.1.	Von allen Proben.....	98
4.2.1.1.2.	Von Proben mit rekombinanten Subtypen	99
4.2.1.2.	Vergleich: Risikogruppen und reine/rekombinante Subtypen).....	100
4.2.1.2.1.	Von allen Proben.....	100
4.2.1.2.2.	Von Proben mit Einfachinfektionen	101
4.2.1.3.	Vergleich: Risikogruppen und Subtypen-Verteilung.....	102
4.2.1.3.1.	Von Proben mit Einfachinfektion mit reinen Subtypen.....	103
4.2.1.3.2.	Von Proben mit Einfachinfektion mit rekombinanten Subtypen.....	103
4.2.1.3.3.	Von Proben mit Mehrfachinfektionen	104
4.2.2.	Geschlechterverteilung.....	105
4.2.2.1.	Vergleich: Geschlechterverteilung und Einfach-/Mehrfachinfektionen	106
4.2.2.2.	Vergleich: Geschlechterverteilung und reine/rekombinante Subtypen.....	107
4.2.2.3.	Vergleich: Geschlechterverteilung und Subtypen-Verteilung	108
4.2.3.	Altersverteilung	109
4.2.3.1.	High-Risk-Group (HRG)	110
4.2.3.1.1.	Vergleich: Altersverteilung und Einfach-/Mehrfachinfektionen	111
4.2.3.1.2.	Vergleich: Altersverteilung und reine/rekombinante Subtypen.....	112
4.2.3.2.	Non-High-Risk-Group (NRG)	113
4.2.3.2.1.	Vergleich: Altersverteilung und Einfach-/Mehrfachinfektionen	114
4.2.3.2.2.	Vergleich: Altersverteilung und reine/rekombinante Subtypen.....	115
4.3.	Vergleich: HIV-1-Subtypen-Bestimmung mittels MHA und mittels HIV-Gesamtgenom-Sequenzierung	116
4.3.1.	Ergebnisse der HIV-Gesamtgenom-Sequenzierung	116
4.3.2.	Ermittlung der Sensitivität	119

5.	DISKUSSION	120
5.1.	Molekularbiologische HIV-Ergebnisse des MHA	120
5.1.1.	Interpretation der wichtigsten Ergebnisse.....	120
5.1.2.	Vergleich mit anderen Studien.....	121
5.1.3.	Inferenz und Validität	123
5.2.	Vergleich: Grundlegende soziologische Ergebnisse und molekular- biologische HIV-Ergebnisse des MHA	124
5.2.1.	Interpretation der wichtigsten Ergebnisse.....	124
5.2.2.	Vergleich mit anderen Studien.....	126
5.2.3.	Inferenz und Validität	127
5.3.	Vergleich: HIV-1-Subtypen-Bestimmung mittels MHA und mittels HIV-Gesamtgenom-Sequenzierung.....	128
5.3.1.	Interpretation des Ergebnisses.....	128
5.3.2.	Vergleich mit anderen Studien.....	129
6.	ZUSAMMENFASSUNG	131
7.	LITERATURVERZEICHNIS	134
8.	ABKÜRZUNGEN	144
9.	ANHANG	146
10.	DANKSAGUNG	148
11.	LEBENS LAUF	150

1. EINLEITUNG

1.1. Geschichte und Nomenklatur von SIV, HIV und dessen Subtypen

1.1.1. Das "neue Virus"

1.1.1.1. Entdeckung von AIDS und HIV

Im Lauf des Jahres 1980 wurden in verschiedenen US-amerikanischen Großstädten Krankheiten beobachtet, die auffällig häufig bei bestimmten Personen gleichzeitig auftraten. Die durchwegs relativ jungen Patienten litten vor allem unter Pneumocystis-jirovecii-Pneumonien (PJP; zuvor Pneumocystis-carinii-Pneumonien, PCP) und am normalerweise sehr selten und meist im höheren Alter auftretenden Kaposi-Sarkom [57]. Des Weiteren wurde bei Blutuntersuchungen eine verminderte Konzentration der T-Helferzellen festgestellt, was auf eine bedeutende Schwächung der zellulären Immunität hinweist. Zwei Merkmale hatten diese Patienten gemeinsam: Sie waren männlich und homosexuell.

Der Wissenschaftler M. Gottlieb (University of California, Los Angeles) informierte als erster das *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC, Atlanta) über gehäufte Fälle von PJP und anderer Pilzinfektionen bei homosexuellen Männern in seinem Bericht vom Juni 1981 [13, 38]. Bis zu dieser Zeit wurden insgesamt 80 derartige Fälle erfasst. Ende 1981 bekam das neue Krankheitsbild seinen ersten Namen: Es wurde allgemein als *GRID* (*Gay Related Immune Deficiency*) bezeichnet [1].

Als 1982 GRID nun auch bei Drogenkonsumenten und heterosexuellen Frauen auftrat, wurde im August desselben Jahres ein neuer Name kreiert: *Acquired Immunodeficiency Syndrome* oder kurz *AIDS* [76]. Bis Ende 1982 wurden in den USA bereits 1.300 Fälle von AIDS und 460 durch AIDS verursachte Todesfälle bekannt. Wenig später wurde diese Krankheit auch in Miami bei heterosexuellen Haitianern [15] und in New York bei Neugeborenen und Hämophilen nachgewiesen [16].

Im Jahr 1982 wurde ebenso aus einigen europäischen Ländern über AIDS-Fälle berichtet: zuerst aus Frankreich [98] und Spanien [116], später auch aus der Schweiz [30]. Im Juli desselben Jahres wurde in der Universitätsklinik in Frankfurt am Main zum ersten Mal bei einem deutschen Patienten diese neue Krankheit diagnostiziert. Ähnliche Krankheitssymp-

tome wurden gleichfalls in Zentralafrika (s. Kapitel 1.2.2.1.1.) festgestellt. Es konnte später bewiesen werden, dass es sich auch hierbei um AIDS handelte [23]. Zu dieser Zeit wurde in 14 Ländern, die auf drei unterschiedlichen Kontinenten (Nordamerika, Europa, Afrika) liegen, AIDS zweifelsfrei nachgewiesen. Eine Epidemie ungeahnten Ausmaßes schien sich anzubahnen; ihre Ursache blieb jedoch weiterhin unbekannt.

Es verdichteten sich die Hinweise darauf, dass der Verursacher von AIDS über Blut und Spermien übertragen wird [27]. Im Februar 1982 ging R. Gallo (National Cancer Institute, Bethesda, USA) davon aus, dass AIDS durch ein humanes T-Zell-lymphotropes Retrovirus (Familie: Retroviridae, s. Kapitel 1.1.1.2.1.) hervorgerufen werden könnte [32].

Anfang 1983 konnte L. Montagnier (Institut Pasteur, Paris) Partikel eines Retrovirus aus dem Lymphknoten eines Patienten mit chronischer Lymphadenopathie nachweisen. Er nannte das Virus LAV (Lymphadenopathie assoziiertes Virus). Im Mai 1983 veröffentlicht er die erste elektronenmikroskopische Aufnahme des neu entdeckten Erregers in *Science* [7].

Die Forschergruppe um R. Gallo suchte den Verursacher von AIDS unter den humanen T-Zell-Leukämie-Viren (Gattung: Deltaretroviren, s. Tabelle 1, Kapitel 1.1.1.2.1.) und vermutete im Juli 1983 Typ 1 als möglichen Erreger: HTLV I (*human T-cell-leukaemia-virus*) [33]. Im April 1984 isolierten die Forscher ein Retrovirus aus Lymphozytenkulturen, das dem HTLV I ähnlich war. Gallo nannte das neu entdeckte Virus HTLV III [34, 77].

Im Mai 1986 einigte sich das *International Committee on the Taxonomy of Viruses* im Rahmen eines Kongresses in Paris auf einen gemeinsamen Namen für LAV und HTLV III: *Human Immunodeficiency Virus* oder kurz *HIV* [25].

Das Team um L. Montagnier entdeckte 1986 einen zweiten AIDS-Erreger [21, 22], den es aus Proben von zwei westafrikanischen AIDS-Patienten isoliert hatte. Er wurde als *HIV Typ 2* oder *HIV-2* bezeichnet. Das zuvor entdeckte HIV wurde in *HIV Typ 1* oder *HIV-1* umbenannt. Nach langem Streit zwischen L. Montagnier und R. Gallo um das Recht der Erstentdeckung von HIV-1 [87] einigte man sich 1987 mit einem Vergleich und das Patentrecht wurde zu gleichen Teilen beiden zugesprochen.

Die Erreger von AIDS waren entdeckt, aber ihr Ursprung war noch völlig ungeklärt. Die Abstammung des HIV von einem ähnlichen Virus, das bei Affen gefunden wurde, schien wahrscheinlich.

1.1.1.2. Taxonomie

1.1.1.2.1. Familie: Retroviridae

Taxonomisch werden alle bekannten Viren in Familien eingeteilt, von denen bereits über 50 definiert sind. 26 von diesen Virenfamilien sind als Verursacher menschlicher oder tierischer Erkrankungen bekannt. Davon liegt bei neun Familien das Virusgenom in Form von DNA, bei 17 Familien in Form von RNA vor [58]. Bei der Familie der *Retroviridae* (Retroviren) handelt es sich um RNA-Viren.

Die Retroviren haben einen Durchmesser von 80 bis 100 nm (Nanometer). Ihre RNA liegt in zwei identischen Einzelsträngen in Plus-Strang-Orientierung (positive Polarität) vor: +ssRNA. Bei diesen RNA-Viren kann das Genom direkt als Messenger-RNA wirken. Jedes Monomer besitzt eine Größe von 7 bis 11 kb (Kilobasen).

Die RNA dient als Vorlage für die Synthese viraler DNA. Hierbei kommt es zur Bildung eines RNA/DNA-Hybridmoleküls. Nach der *reversen Transkription* wird die RNA enzymatisch abgebaut und ein komplementärer DNA-Strang wird synthetisiert (dsDNA). Dieser wird anschließend zirkularisiert und in das Zellgenom der Zelle eingebaut (Provirus). In diesem vegetativen Stadium wird bei Zellteilungen das virale Genom auf die Tochterzellen übertragen [81].

Unter Retroviren versteht man die Vertreter der Familie der Retroviridae. Mit *retro* (lat.: rückwärts) ist die spezifische Eigenschaft der reversen Transkription (Retrotranskription) gemeint, bei der mittels des Enzyms *reverse Transkriptase* die rückwärtige Transkription von RNA in DNA erfolgt. Bis 1970 war man davon ausgegangen, dass die genetische Information immer von der DNA auf die RNA transkribiert würde und danach die Translation stattfände. Mit der Erforschung der Retroviren wurde diese Annahme widerlegt.

Typisch für alle Retroviren ist die Anordnung der *open reading frames* (ORF) *gag*, *pol* und *env*, die von den beiden Steuersequenzen *long terminal repeats* (LTR) flankiert werden (s. Abbildung 1, Kapitel 1.1.3.1.1.): *5'LTR-gag-pol-env-3'LTR*.

Onkoviren sind Viren, die tierische Zellen neoplastisch verändern können. Über 100 onkogene Virenspezies sind bekannt. Zu diesen zählen viele doppelsträngige DNA-Viren und als einzige RNA-Viren die Gattungen 1 bis 5 (s. Tabelle 1) der Retroviren. Sie können

Karzinome, Sarkome, Lymphome und Leukämien verursachen. Bestimmte onkogene Retroviren besitzen anstatt der *pol*-Region ein so genanntes *onc*-Gen. Aufgrund dieses genetischen Defekts benötigen diese Viren ein Helfer-Virus (Komplementierung). HIV und SIV sind keine Onkoviren.

Tabelle 1: Die Familie der Retroviridae wird in sieben Gattungen eingeteilt. Entnommen aus [92] und modifiziert nach [58].

Gattungen		Spezies (Beispiele)	Virusmorphologie	Genom
Subfamilie: <u>Orthoretrovirinae</u>				
1	<u>Alpha</u>-retroviren	Avian Leukosis Virus (ALV)	Zentral liegende, <u>sphärische</u> Kapside "C-Partikel"	einfach
2	<u>Beta</u>-retroviren	Mouse Mammary Tumor Virus (MMTV), Mason-Pfizer Monkey Virus (M-PMV)	Exzentrisch liegende, <u>sphärische</u> Kapside "B-Partikel" (MMTV) oder <u>zylindrische</u> Kapside "D-Partikel" (M-PMV)	einfach
3	<u>Gamma</u>-retroviren	Murine Leukaemia Virus (MLV)	Zentral liegende, <u>sphärische</u> Kapside "C-Partikel"	einfach
4	<u>Delta</u>-retroviren	Bovine Leukaemia Virus (BLV), Human T-Cell Leukaemia Virus (HTLV)	Zentral liegende, <u>sphärische</u> Kapside "C-Partikel"	komplex
5	<u>Epsilon</u>-retroviren	Walleye Dermal Sarcoma Virus (WDSV)	Zentral liegende, <u>sphärische</u> Kapside "C-Partikel"	komplex
6	Lentiviren	Human Immunodeficiency Virus 1 und 2 (HIV-1, HIV-2)	<u>Konische</u> Kapside	komplex
Subfamilie: <u>Spumaretrovirinae</u>				
7	Foamyviren = Spumaviren	Humanes Foamy Virus (HFV)	Zentral liegende, <u>sphärische</u> Kapside "C-Partikel"	komplex

Die meisten Retroviren besitzen ein Kapsid (Kernhülle) mit sphärischer Form. Einige Viren der Gattung der Betaretroviren sind durch zylindrische Kapside gekennzeichnet. Bei der Gattung der Lentiviren (s. Kapitel 1.1.1.2.2.) kommen typischerweise konische Kapside vor.

Die Unterscheidung zwischen einfachen und komplexen Retroviren erfolgt danach, ob sie Gene für die Hilfsproteine aufweisen. Lentiviren sind komplexe Retroviren. Bei HIV-1 und HIV-2 sind je vier solcher Hilfsproteine bekannt, wobei drei davon identisch sind.

1.1.1.2.2. Gattung: Lentiviren

Die Gattung der Lentiviren hat ihren Namen (lat.: *lentus*, lange dauernd) aufgrund sehr langer Inkubationszeiten, die Monate bis mehrere Jahre betragen können, und der oft über Jahre andauernden Erkrankungen (v.a. Immundefizienz, neurologische Krankheiten, Arthritis), die sie verursachen [79]. Lentiviren tragen keine Onkogene (s. Kapitel 1.1.1.2.1.).

Durch Lentiviren hervorgerufene Erkrankungen sind bei mehreren verschiedenen Säugetieren bekannt. Danach erfolgt die Einteilung der Gattung der Lentiviren in fünf Untergattungen.

Table 2: Einteilung der Gattung der Lentiviren. Modifiziert nach [58].

Untergattungen		Spezies		Abkürzung	Säugetier
1	Primate Immunodeficiency Virus (PIV), Primate Lentivirus Group	1	<u>Human</u> Immunodeficiency Virus	HIV	Mensch
		2	<u>Simian</u> Immunodeficiency Virus	SIV	Affe
2	<u>Bovine</u> Lentivirus Group	3	<u>Bovine</u> Immunodeficiency Virus	BIV	Rind
3	<u>Equine</u> Lentivirus Group	4	<u>Equine</u> Infectious Anaemia Virus	EIAV	Pferd
4	<u>Feline</u> Lentivirus Group	5	<u>Feline</u> Immunodeficiency Virus	FIV	Katze
		6	<u>Puma</u> Lentivirus	PLV-14	
5	<u>Ovine-caprine</u> Lentivirus Group	7	<u>Ovine</u> Lentivirus	-	Schaf
		8	<u>Caprine</u> Arthritis Encephalitis Virus	CAEV	Ziege
		9	Mead/Visna Virus	MVV	Schaf

Zur Untergattung Primate Immunodeficiency Virus (PIV) gehören nur zwei Spezies: das *Simian Immunodeficiency Virus* (SIV) des Affen (s. Kapitel 1.1.2.) und das *Human Immunodeficiency Virus* (HIV) des Menschen (s. Kapitel 1.1.3.).

1.1.2. Spezies: Simian Immunodeficiency Virus (SIV)

1.1.2.1. Primaten

Die Gattung der Lentiviren lässt sich in fünf Untergattungen einteilen (s. Tabelle 2, Kapitel 1.1.1.2.2.). Eine dieser Untergattungen entspricht der *Primate Lentivirus Group*, die auch als *Primate Immunodeficiency Virus* (PIV) bezeichnet wird. Zu dieser gehören zwei Spezies: das *Human Immunodeficiency Virus* (HIV), das vermutlich nur beim Menschen vorkommt, und das *Simian Immunodeficiency Virus* (SIV), das (bis dato) nur bei nicht-humanen Primaten (Affen) gefunden wurde.

Die Ordnung der Primaten (Herrentiere) gehört zur Klasse der *Mammalia* (Säugetiere), die eine von sieben Klassen des Unterstammes der *Vertebrata* (Wirbeltiere) darstellt. Die Primaten werden in sieben Familien eingeteilt. Vier dieser Familien werden zu den so genannten *Altweltaffen* (*Catarrhinige*) gezählt, drei davon zu den so genannten *Neuweltaffen* (*Platyrrhini*). Die vier Familien der Altweltaffen heißen *Hominidae* (Menschen), *Pongidae* (Menschenaffen), *Cercopithecidae* (Meerkatzenverwandte) und *Hylobatidae* (Gibbons), wobei ausschließlich bei den ersten drei genannten Familien Infektionen mit den Viren der *Primate Lentivirus Group* bekannt sind (s. Tabelle 3).

Die Familie der *Homonidae* (Menschen) besitzt nur eine Gattung (*Homo*) mit einer Spezies (*Homo sapiens*), die wiederum nur eine Subspezies (*Homo sapiens sapiens*) aufweist. Der Mensch kann sich mit HIV-1 und/oder mit HIV-2 infizieren, was nach Jahren zur Ausbildung von AIDS führt. Es wurden beim Menschen auch Antikörper gegen SIV nachgewiesen, wobei diese SIV-Infektionen bislang jedoch nicht zu Erkrankungen geführt haben [66].

Die Familie der *Pongidae* (Menschenaffen) wird in drei Gattungen eingeteilt, die dem Menschen – evolutionsgeschichtlich betrachtet – sehr ähnlich sind: *Pongo* (Orang-Utan), *Gorilla* und *Pan* (Schimpanse) (s. Tabelle 4, Kapitel 1.1.2.2.). Das Genom des Schimpansen stimmt in 98,7 % mit dem des Menschen überein. Er ist damit der nächste Verwandte des Menschen. Bei den beiden Gattungen *Pongo* und *Gorilla* sind keine Infektionen mit SIV bekannt. Die Gattung *Pan* besitzt zwei Spezies: *Pan troglodytes* (Gemeiner Schimpanse) und *Pan paniscus* (Bonobo). Auch bei *Pan paniscus* konnten keine SIV-Infektionen festgestellt werden. Die Spezies *Pan troglodytes* kann man in vier Subspezies unterteilen: *Pan troglodytes troglodytes* (Zentralafrika), *Pan troglodytes schweinfurthii* (Ostafrika), *Pan troglodytes verus* (Westafrika) und die erst 1997 entdeckte Subspezies *Pan troglodytes*

vellerosus (Nigeria, Kamerun) [86]. Nur bei den ersten beiden genannten Subspezies konnte man SIV nachweisen. Das SIV des Schimpansen wird als SIV-CPZ (*chimpanzee*) bezeichnet. Man geht davon aus, dass die Schimpansen-Subspezies *Pan troglodytes troglodytes* und *Pan troglodytes schweinfurthii* nicht länger als mehrere tausend Jahre mit SIV infiziert sein können. Die Infektion dieser Schimpansen muss nach der evolutionären Trennung von *Pan troglodytes verus* und *Pan troglodytes vellerosus* erfolgt sein, da bei diesen Schimpansen-Subspezies (bis dato) keine SIV-Infektionen entdeckt wurden (s. Tabelle 4, Kapitel 1.1.2.2.).

Tabelle 3: Übersicht über die Ordnung der Primaten (Herrentiere), Anzahl der Gattungen und Spezies mit nachgewiesenen HIV- bzw. SIV-Infektionen und Anzahl der bekannten HIV-Typen und SIV-Stämme. Nach [97].

Teil- ordnungen	Familien	Gattungen		Spezies	HIV-Typen und SIV- Stämme
		Gesamt- zahl	davon HIV- /SIV- Infektionen bekannt		
Catarrhinige = Altweltaffen	Hominidae = Menschen	1	1	1	2 HIV-Typen
	Pongidae = Menschenaffen	3	1	1	5 SIV- Stämme
	Cercopithecidae = Meerkatzenverwandte	14	7	14	22 SIV- Stämme
	Hylobatidae = Gibbons	1	-	-	-
Platyrrhini = Neuweltaffen	Cebidae = Kapuzinerartige	11	-	-	-
	Callimiconidae = Springtamarine	1	-	-	-
	Callithricidae = Krallenaffen	4	-	-	-

Die Familie der *Cercopithecidae* (Meerkatzenverwandte) wird in 14 Gattungen eingeteilt. Laut D. L. Robertson (University of Oxford) [97] sind bis zum Jahr 2000 bei 14 Spezies dieser Familie SIV-Infektionen festgestellt worden. Diese gehören sieben verschiedenen Gattungen an. Bei fünf weiteren Spezies der *Cercopithecidae* gelangen künstliche SIV-Infektionen mit SIV von anderen Affenspezies. Im Jahr 2000 waren insgesamt 22 verschiedene SIV-Stämme bei Spezies der *Cercopithecidae* bekannt. Nach neueren Angaben aus dem Jahr 2002 sollen bereits insgesamt 30 verschiedene SIV-Stämme bei afrikanischen Affen entdeckt worden sein [99]. In der Familie der *Hylobatidae* (Gibbons) sind keine SIV-Infektionen bekannt.

1.1.2.2. Einteilung und Nomenklatur

Simian Immunodefizienz Viren (SIV) wurden laut D. L. Robertson [97] bis zum Jahr 2000 bereits aus 15 nicht-humanen Spezies, die der Ordnung der Primaten angehören, isoliert: bei zwei Subspezies der Spezies *Pan troglodytes* (Familie: *Pongidae*) und bei 14 Spezies der Familie der *Cercopithecidae*. Diese Affenspezies sind ausschließlich in Afrika beheimatet, wo die Herkunft von SIV und HIV angenommen wird. Auf anderen Kontinenten konnten keine mit SIV infizierten Affen entdeckt werden.

Table 4: Einteilung der Familie der *Pongidae* (Menschenaffen) und die fünf bekannten SIV-Stämme bei den Schimpansen.

Gattungen	Spezies	Subspezies	SIV-Stämme
Pan = Schimpanse	Pan troglodytes = Gemeiner Schimpanse	Pan troglodytes <u>troglodytes</u> = Teschego	SIV-CPZ-US
			SIV-CPZ-CAM3
			SIV-CPZ-CAM5
			SIV-CPZ-GAB
		Pan troglodytes <u>schweinfurthii</u> = Schweinfurth-Schimpanse	SIV-CPZ-ANT
	Pan troglodytes <u>verus</u> = Echtschimpanse	-	
	Pan troglodytes <u>vellerosus</u>	-	
	Pan paniscus = Bonobo	-	-
Gorilla	Gorilla gorilla	3	-
Pongo = Orang-Utan	Pongo pygmaeus = Orang-Utan	2	-

Einige SIV spielen auch in der HIV-Forschung eine bedeutende Rolle. Die wichtigsten seien an dieser Stelle erwähnt:

Pan troglodytes (Gemeiner Schimpanse): Von der Subspezies *Pan troglodytes troglodytes* wurden die vier folgenden SIV-Stämme gewonnen: SIV-CPZ-US, SIV-CPZ-CAM3, SIV-CPZ-CAM5 und SIV-CPZ-GAB. Von der Subspezies *Pan troglodytes schweinfurthii* stammt das SIV-CPZ-ANT. CPZ ist die Abkürzung des englischen Begriffes für Schimpanse: *chimpanzee*.

Cercopithecus aethiops (Grüne Meerkatze): Das Genom SIV-AGM wurde 1994 bei vier verschiedenen Subspezies der Spezies *Cercopithecus aethiops* entdeckt, womit vier verschiedene Formen von SIV-AGM unterschieden werden: VERVET, TANTALUS, GRIVET, SABAEUS. Man geht davon aus, dass diese durch Rekombinationen entstanden sind (s. Kapitel 1.1.3.1.3.). AGM ist die Abkürzung des englischen Begriffes für Grüne Meerkatze: *African green monkey*. Es wurden auch wild lebende Paviane der Spezies *Pavian ursinus* entdeckt, die mit diesem SIV-AGM infiziert sind [63].

Cercocebus torquatus (Halsbandmangabe): Von dieser Spezies konnte das SIV-Genom SIV-SMM gewonnen werden. Im Tierexperiment konnten damit auch Affenspezies der Gattung *Macaca* (Makaken), wie z.B. Rhesusaffen, infiziert werden. SMM ist die Abkürzung des englischen Begriffes für Halsbandmangabe (*sooty mangabey*) und Makake (*macaque*).

Die Genome der SIV sind sehr verschieden. Die Sequenzen der Genome sind weit unterschiedlicher als die seiner Wirte. Es scheint so, dass jeder Primat, bei dem SIV entdeckt wurde, seinen eigenen SIV-Stamm besitzt. Übertragungen von SIV zwischen unterschiedlichen Affenspezies kommen – wie oben beschrieben – sowohl auf natürliche Weise als auch durch künstliche Infektionen vor. Dadurch kann das SIV seinen Phänotyp und seine Virulenz ändern [18]. Der ursprüngliche Wirt ist Virusträger, der in der Regel aber nicht erkrankt. Bei einer Infektion einer anderen Affenspezies mit diesem SIV kann die Ausbildung einer AIDS-ähnlichen Symptomatik die Folge sein.

Der klinische Verlauf ist je nach Affenspezies sehr unterschiedlich. Es wurden im Tierexperiment Schimpansen mit HIV infiziert, aber in keinem Fall konnten – unter Berücksichtigung der langen Inkubationszeit – AIDS-ähnliche Symptome sicher nachgewiesen werden. Bei diesen Affen kam es zur Bildung von spezifischen Antikörpern und zur Senkung der CD4-Lymphozyten. Schimpansen scheinen bei Infektion mit SIV oder HIV immer gesund zu bleiben. Eine wichtige Frage ist, warum die mit dem Menschen so nahe verwandten Schimpansen nicht an AIDS erkranken. Paviane reagieren je nach HIV-Typ sehr verschieden. Einerseits bleiben sie bei HIV-1-Infektionen gesund, andererseits weisen sie bei HIV-2-Infektionen eine AIDS-ähnliche Symptomatik auf. Rhesusaffen reagieren sehr sensibel. Zum Beispiel führt eine künstliche SIV-SMM-Infektion zum Tod des Rhesusaffen. Da die Jungtiere weitgehend frei von SIV sind, geht man im Allgemeinen davon aus, dass sich adulte Rhesusaffen über sexuelle Kontakte mit SIV anstecken können.

1.1.2.3. Übertragung auf den Menschen

Eine Ansteckung des Menschen mit dem SIV könnte durch das Essen von rohem Affenfleisch, was in vielen Teilen Schwarzafrikas durchaus üblich ist, durch einen Biss der Affen oder aufgrund von Hautwunden zum Zeitpunkt des Schlachtens der Affen geschehen sein.

Von den ca. 30 bekannten SIV-Stämmen scheint es zwei zu geben, die von ihren vorherigen Wirten, den Affen, auf Menschen übertragen wurden: SIV-CPZ von *Pan troglodytes troglodytes* und SIV-SMM von *Cercocebus torquatus* (s. Kapitel 1.1.2.2.). Man vermutet, dass es mindestens zehn dieser Transmissionen gab, die unabhängig voneinander abliefen: drei mit SIV-CPZ und sieben mit SIV-SMM. So versucht man die Herkunft der drei Gruppen von HIV-1 (M, N, O) und der sieben Gruppen von HIV-2 (A, B, C, D, E, F, G) zu erklären [97] (s. Tabelle 5, Kapitel 1.1.3.2.1.).

HIV-1: Der Ursprung von HIV-1 blieb zunächst lange unklar. Zuvor konnten Stämme von SIV-CPZ bei Schimpansen isoliert werden; sie wiesen aber keine große genetische Verwandtschaft mit HIV-1 auf.

Im Februar 1999 veröffentlichte die Gruppe um F. Gao [36] in *Nature*, dass sie das Genom eines neuen SIV-CPZ-Stammes sequenzierten, das SIV-CPZ-US. Dieser wurde von Schimpansen der Subspezies *Pan troglodytes troglodytes* gewonnen (s. Tabelle 4, Kapitel 1.1.2.2.). Diese Affen sind in Zentralafrika, insbesondere in Kamerun, Äquatorialguinea und Gabun, beheimatet. Die genetische Heterogenität zwischen SIV-CPZ-US und HIV-1 liegt bei ca. 50 bis 60 % und ist damit geringer als bei den vier anderen SIV-CPZ-Stämmen (CAM 3, CAM 5, GAB, ANT). HIV-1 und SIV-CPZ tragen als einzige PIV das Gen *vpu* (s. Kapitel 1.1.3.1.1.). Bei HIV-2 und alle anderen bekannten SIV kommt dieses Gen nicht vor. Im Gegensatz zu HIV-2 konnten nur relativ wenige HIV-1-verwandte SIV-Isolate von diesen Schimpansen gewonnen werden. Dies lässt Raum für die Hypothese, dass sich gegebenenfalls der Mensch als auch der Schimpanse von einem dritten Primaten angesteckt haben könnte, der (noch) nicht entdeckt ist [102].

HIV-2: Bereits 1989 wurde angenommen, dass das HIV-2 vom SIV-SMM abstammt, das bei der Spezies *Cercocebus torquatus* (Halsbandmangabe) identifiziert wurde. Diese Affen sind in West- und Zentralafrika beheimatet, also in Regionen, in denen das HIV-2 am häufigsten vorkommt (s. Kapitel 1.1.3.2.3.). Bei einer Vielzahl von Affen dieser Spezies konnte SIV-SMM isoliert werden, das eine große genetische Übereinstimmung zum HIV-2 aufweist. Die

genetische Heterogenität ist zwischen SIV-SMM und den HIV-2-Gruppen D und E mit 30 % am niedrigsten. Dementsprechend konnte gezeigt werden, dass diese beiden HIV-2-Gruppen eine größere phylogenetische Verwandtschaft zum Affenvirus SIV-SMM besitzen als zu HIV-1 [20]. Die genetische Heterogenität zwischen HIV-1 und HIV-2 beträgt mehr als 50 %. HIV-2, SIV-SMM und SIV-MAC tragen als einzige PIV das Gen *vpx* (s. Kapitel 1.1.3.1.1.). Bei HIV-1 und allen anderen bekannten SIV kommt dieses Gen nicht vor. Seit 1997 wird allgemein in der Fachwelt akzeptiert, dass das HIV-2 vom SIV-SMM abstammt.

Zusammenfassend wird heute von der Mehrzahl der Experten angenommen, dass sowohl HIV-1 als auch HIV-2 aus zwei verschiedenen SIV-Stämmen, die vom Affen auf den Menschen übertragen wurden, entstanden sind und somit ihren Ursprung in Zentralafrika haben. Die Tatsache, dass in den zentralafrikanischen Länder Kamerun, Gabun und D. R. Kongo weltweit die größte Anzahl verschiedener Subtypen vorkommt, verleitet zu der Annahme, dass HIV dort schon seit längerer Zeit als ursprünglich vermutet existiert (s.a. Kapitel 1.2.2.1.1.) [61].

Zu welchem Zeitpunkt diese Transmissionen vom Affen auf den Menschen stattgefunden haben könnten, wird in der Fachwelt kontrovers diskutiert. Am 09.06.2000 erschienen in *Science* zwei Artikel [47, 67], die das Alter von HIV zu bestimmen versuchten: *Ihre molekulare Zeitbestimmung ergab das Jahr 1931, zu 95 % jedenfalls zwischen 1915 und 1941*. Damals könnte sich der Mensch durch multiple zoonotische Infektionen von nicht-humanen Primaten, die mit SIV infiziert waren und ausschließlich in Afrika vorkommen, angesteckt haben. Einige Forscher behaupten, dass eine Übertragung auf den Menschen früher, bereits vor mehr als 100 Jahren, stattgefunden haben könnte, andere vermuten, dass diese später, in den 50er-Jahren des 20. Jahrhunderts, geschehen sei.

Im Jahr 1986 wurde von der ältesten Blutprobe berichtet, bei der virale RNA-Fragmente von HIV-1 nachgewiesen werden konnten. Sie wurde 1959 von einem Mann entnommen, der aus dem damaligen Léopoldville stammte, dem heutigen Kinshasa in der D. R. Kongo [84, 119].

Laut B. Hahn (University of Alabama) verlief die erste Übertragung des SIV-CPZ von der Subspezies *Pan troglodytes troglodytes* auf den Menschen im frühen 20. Jahrhundert, vermutlich in Kamerun [40]. Allerdings ist ein geringerer Teil der Schimpansen mit SIV infiziert, als zuvor angenommen wurde. Bei 58 wild lebenden Schimpansen (in Elfenbeinküste, Uganda und Tansania) konnte nur bei vier eine SIV-Infektion nachgewiesen

werden. Hingegen konnte bei kleineren Affenarten in manchen Regionen West- und Zentralafrikas eine SIV-Prävalenz von 5 bis 40 % festgestellt werden.

Eine völlige Akzeptanz der Annahme, dass sich das HIV vom SIV ableitet, findet sich in der Fachwelt bis heute nicht. Vor allem die “Perth Group” hat sich diesbezüglich hervorgetan. Diese Forschergruppe um E. Papadopulos-Eleopoulos bezweifelt die oben erwähnten Ansichten vehement [89].

1.1.3. Spezies: Human Immunodeficiency Virus (HIV)

1.1.3.1. Genom

1.1.3.1.1. Gene

HIV-1 und HIV-2 enthalten in ihrem Genom jeweils neun so genannte “offene Leserahmen” (*open reading frames*, ORF). Auf diesen befinden sich 15 Gene, auf denen wiederum die Kodierung von 15 Proteinen lokalisiert ist [31]. HIV-1 und HIV-2 unterscheiden sich nur in einem ORF mit einem Gen: HIV-1 besitzt das *vpu*-Gen, HIV-2 besitzt das *vpx*-Gen. Die Proteine werden je nach ihrer Funktion in drei Gruppen eingeteilt: Strukturproteine/virale Enzyme, Regulatorproteine und Hilfsproteine, zu denen auch *vpu* und *vpx* gehören.

Der Aufbau des RNA-Genoms von HIV-1 soll am *HIV-1 HXB2* verdeutlicht werden. Es wurde zum Referenzvirus ausgewählt, da es sehr genau erforscht war und bereits zuvor am häufigsten zitiert wurde. Es dient der Lokalisation von ORF und deren Gene von HIV-1. Als Referenzvirus von HIV-2 dient meist das *HIV-2 BEN*.

Das Genom von *HIV-1 HXB2* besitzt eine Länge von 9.719 Basen, die von *HIV-2 BEN* 10.359 Basen. Die neun ORF des HIV-1 heißen in Folge ihrer Anordnung auf dem Genom: *gag*, *pol*, *vif*, *vpr*, *tat*, *rev*, *vpu*, *env* und *nef*. Bei HIV-2 ist die Anordnung wie folgt: *gag*, *pol*, *vif*, *vpx*, *vpr*, *tat*, *rev*, *env* und *nef*.

Im Genom aller Retroviren kommen die dafür typischen ORF *gag*, *pol* und *env* vor (s. Kapitel 1.1.1.2.1.). Nur diese ORF besitzen mehr als ein Gen und kodieren damit mehr als ein Protein, wobei es sich ausschließlich um Strukturproteine handelt. Alle anderen ORF kodieren entweder ein Regulatorprotein oder ein Hilfsprotein.

An den beiden Enden des Genoms sind *long terminal repeats* (LTR) lokalisiert. Diese zwei Gene sind wesentlich am Einbau in das Genom der Wirtszelle beteiligt, indem LTR beidseitig an die zelluläre DNA gebunden wird (Integration) und damit für eine effiziente Transkription der genetischen Information des Provirus verantwortlich ist (Promotor/Enhancer-Funktion).

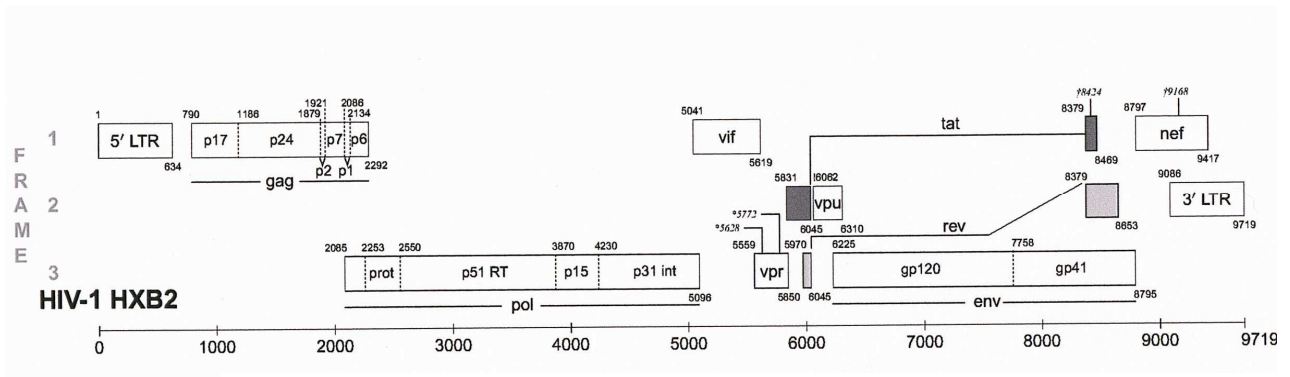


Abbildung 1: Beide Referenzviren *HIV-1 HXB2* und *HIV-2 BEN* besitzen jeweils 15 Gene. Da sich die Basensequenzen der ORF (*open reading frames*) überlappen, werden sie in drei unterschiedlichen Leseraster dargestellt. Entnommen aus [70].

1.1.3.1.2. Super- und Mehrfachinfektionen

Die meisten viralen Infektionen führen nur zu einer temporären Immunität. Bei einigen anderen kommt es zu einem lebenslangen Schutz gegen eine erneute Infektion mit demselben Virus, wie dies z.B. bei Hepatitis A, Mumps, Masern und Röteln in der Regel der Fall ist. Weitere Infektionen können nur in Form einer Superinfektion ablaufen, d.h., das Virus ist auf die Präsenz eines anderen Virus angewiesen. Das klassische Beispiel ist das Hepatitis-D-Virus, das die Hüllen des Hepatitis-B-Virus benötigt, um überhaupt seine Zielzellen, die Leberzellen, befallen zu können.

Unter einer HIV-Superinfektion versteht man die Infektion eines bereits HIV-infizierten Individuums mit einem weiteren HIV-Partikel. Das Resultat einer Superinfektion ist eine Mehrfachinfektion (s. Abbildung 2). Eine Superinfektion ist die Voraussetzung für eine Rekombination (s. Kapitel 1.1.3.1.3.). Für manche Forscher stellt das rekombinante HIV-Genom den Beweis dar, dass überhaupt HIV-Superinfektionen existieren [9]. Superinfektionen konnten 1996 zum ersten Mal in In-Vitro-Versuchen nachgewiesen werden [65].

Unter einer HIV-Mehrfachinfektion versteht man, dass ein Individuum gleichzeitig mit zwei (Zweifachinfektion; in diesem Beispiel Partikel X und Y genannt) oder mehr (in diesem

Beispiel liegt eine Infektion mit den Partikeln X, Y, Z usw. vor) unterschiedlichen HIV-Partikeln infiziert ist. Jede Zweifachinfektion ist auch eine Mehrfachinfektion. Die HIV-Partikel können bei einer Transmission oder bei mehreren Transmissionen übertragen worden sein. Wenn sich ein Individuum bei einer einzigen Transmission gleichzeitig mit zwei (oder mehr) unterschiedlichen HIV-Partikeln angesteckt hat, dann kommt es zu einer Mehrfachinfektion ohne eine vorherige Superinfektion. Einer Mehrfachinfektion muss also nicht zwangsläufig eine Superinfektion vorausgehen [52].

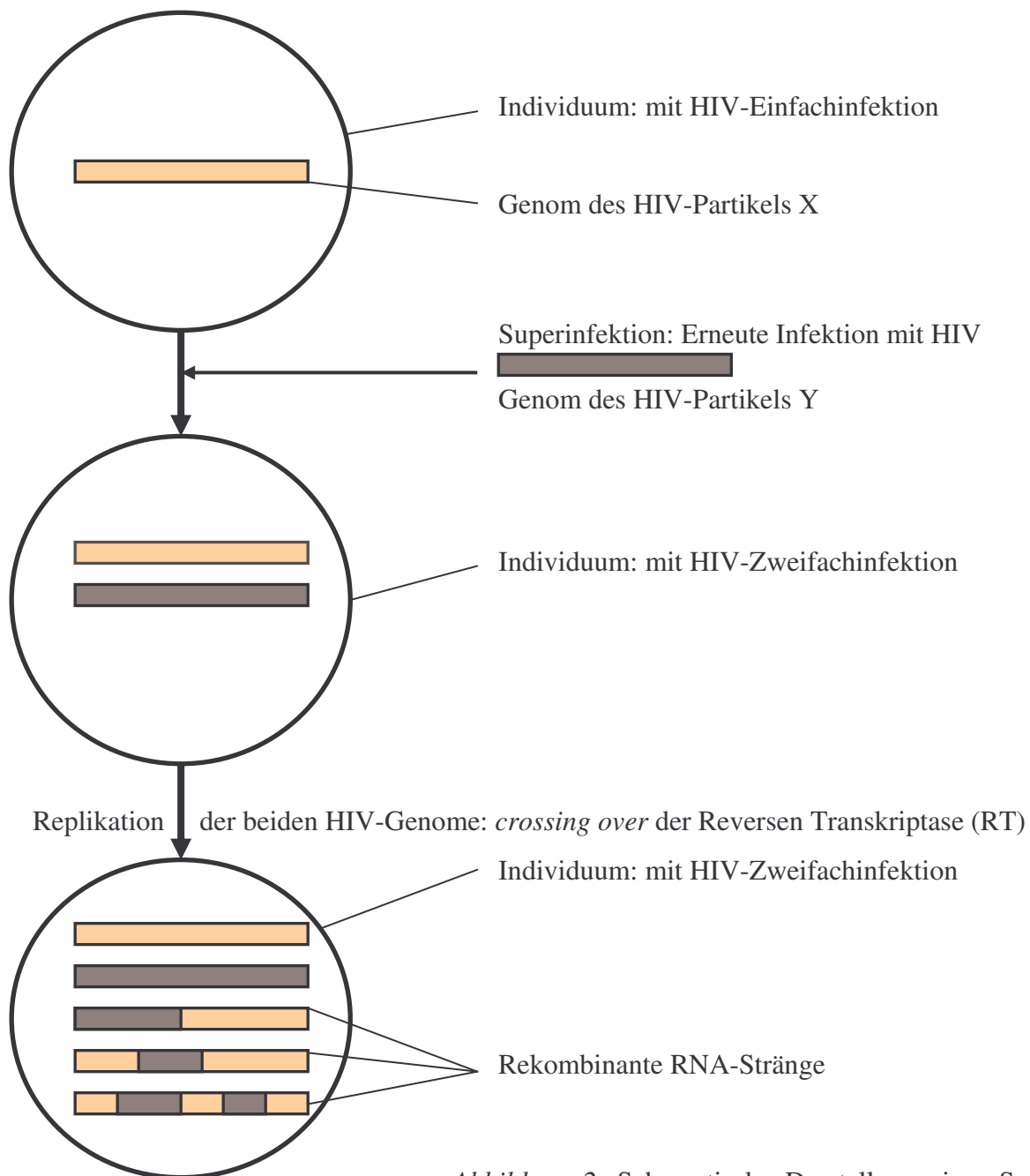


Abbildung 2: Schematische Darstellung einer Super- und Mehrfachinfektion sowie die Bildung einer Rekombinante. Modifiziert nach [52].

Super- und Mehrfachinfektionen sind die Voraussetzung für eine Rekombination. Wenn ein Individuum zweifach (z.B. mit den Partikeln X und Y) infiziert ist, können drei verschiedene HIV-Partikel in ihm vorliegen: die zwei ursprünglichen Formen (X und Y) und eine rekombinante Form (XY), die aus diesen beiden Formen hervorgegangen ist. Bei einer Dreifachinfektion (z.B. mit den Partikeln X, Y und Z) sind vier verschiedene rekombinante Formen möglich (XY, XZ, YZ und XYZ).

Diese verschiedenen HIV-Formen können in gleichen oder völlig unterschiedlichen Konzentrationen vorliegen. Auch die Zielzellen können differieren. Es gibt makrophagen-trope (*m-trop*) und t-zell-trope (*t-trop*) HIV-Partikel. Ein mehrfach HIV-Infizierter kann bei einer Ansteckung eine Form oder alle Formen übertragen.

Manche Forscher behaupten, dass sich ein HIV-positiver Mensch nur oder vor allem in bestimmten Zeiträumen (*window period*) superinfizieren könne. Dies wurde nach einem Versuch mit Makaken postuliert. Bei diesen konnten Superinfektionen nur nach zwei bis vier Wochen nach der Erstinfektion verzeichnet werden. Im Zeitraum von acht bis 72 Wochen nach der Erstinfektion fanden keine Superinfektionen mehr statt. Korrelationen zu Viruslast, Titer- oder CD4-Zell-Konzentrationen wurden hierbei nicht festgestellt [88].

1.1.3.1.3. Rekombinationen

Ein rekombinantes HIV-Genom entsteht durch *crossing over* der Reversen Transkriptase (RT) zwischen den beiden RNA-Strängen der HIV-Partikel während der Replikation (s. Abbildung 3). Hierbei wechselt die RT von einem RNA-Strang zu einem anderen, wobei Teile der Genome beider Partikel transkribiert werden. In-Vitro-Studien haben gezeigt, dass Rekombinationen von zwei verschiedenen retroviralen Partikeln zwei Wochen nach deren Infektion nachgewiesen werden können [117]. Es wird angenommen, dass bei HIV-1 ca. zwei bis drei Rekombinationen pro Genom und pro Replikationszyklus stattfinden [62]. Rekombinante können grundsätzlich nur in einem Individuum entstehen, das mit mindestens zwei verschiedenen Partikeln infiziert ist [8].

Diese beiden Partikel können unterschiedlichen Subtypen der M-Gruppe von HIV-1 angehören. In diesem Fall spricht man von einer Intersubtyp-Rekombination. Es können sich auch Rekombinationen zwischen zwei genetisch unterschiedlichen HIV-Partikeln ereignen,

wobei beide dem gleichen Subtyp angehören: Intrasubtyp-Rekombination. Auch die Rekombination aus einem schon rekombinant vorliegenden Genom mit einem nicht-rekombinanten Genom oder eine Rekombination aus zwei Rekombinationen ist möglich.

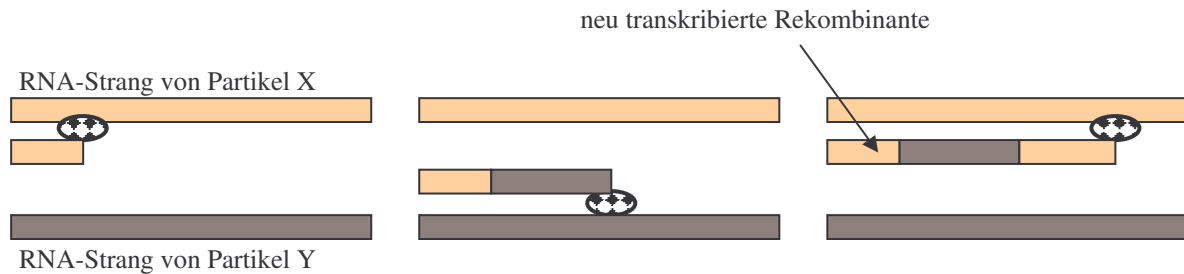


Abbildung 3: Während der HIV-Rekombination wechselt die Reverse Transkriptase (RT) vom RNA-Strang des einen HIV-Partikels zum RNA-Strang des anderen HIV-Partikels, wodurch Teile beider Stränge transkribiert werden: *crossing over*. Dadurch kommt es zur Bildung von rekombinanten RNA-Strängen. Reverse Transkriptase:

Im engeren Sinn werden unter Rekombinationen solche verstanden, die aus Partikeln der verschiedenen Subtypen der M-Gruppe von HIV-1 resultieren. Grundsätzlich können aber auch Rekombinationen außerhalb dieser Gruppe vorkommen. Sie sind aber extrem selten. Im August 1999 wurde zum ersten Mal von einer Rekombination mit HIV-Partikeln, die aus verschiedenen HIV-1-Gruppen stammten, berichtet [106]: Bei einer Frau aus Kamerun wurde der Subtyp D, eine Rekombinante AG und ein Partikel aus der O-Gruppe nachgewiesen. Die genetische Homologie zwischen den beiden Gruppen betrug 69 %, 76 %, 68 % und 55 % in der *gag*-, *pol*-, *vif/vpr*- und *env*-Region. Kurz danach wurde von einem zweiten Fall einer M/O-Rekombination aus Kamerun berichtet, wobei gezeigt wurde, dass die Rekombinante das dominante Virus des Infizierten war [90].

Hingegen konnte weltweit noch kein Fall einer Rekombination zwischen HIV-1 und HIV-2 entdeckt werden [9], obwohl Zweifachinfektionen mit HIV-1 und HIV-2 in Westafrika nicht selten sind [3, 100]. Ob oder inwieweit die beiden HIV-Typen bei gleichzeitiger Präsenz sich gegenseitig oder den Wirt beeinflussen, ist nicht sicher bekannt. Zum Beispiel konnte noch nicht geklärt werden, warum in Guinea-Bissau mit HIV-1 und HIV-2 doppelinfizierte Menschen eine geringere Viruslast aufwiesen als einfach infizierte [4]. Ob eine Erstinfektion einen Schutz gegen eine zweite HIV-Infektion darstellt, ist unklar. Bereits 1995 wurde ein gewisser Schutz gegen eine HIV-1-Infektion angenommen, wenn eine Person bereits mit HIV-2 angesteckt ist. Der genaue Mechanismus konnte nicht eruiert werden [111].

Von Rekombinationen von verschiedenen SIV wurde bereits 1994 bei *Cercopithecus aethiops* (Grüne Meerkatze) berichtet (s. Kapitel 1.1.2.2.) [63]. Auch SIV-RCM ist möglicherweise das Produkt einer Rekombination; es konnte bei *Cercocebus torquatus torquatus* (*red-capped mangabey*, RCM) nachgewiesen werden [37]. Rekombinationen zwischen HIV-1 und SIV-CPZ hält man prinzipiell für möglich. Es konnte aber bisher noch kein solcher Fall sicher nachgewiesen werden.

1.1.3.2. Einteilung und Nomenklatur

1.1.3.2.1. HIV-Typen: HIV-1 und HIV-2

Es gibt zwei Typen der Virusspezies *Human Immunodeficiency Virus*: Typ 1 (HIV-1) und Typ 2 (HIV-2). Beide HIV-Typen verursachen beim Menschen eine ähnliche Symptomatik, wobei das Endstadium (Stadium C) als *Acquired Immunodeficiency Syndrom* (AIDS) bezeichnet wird. Im Jahr 1993 wurde von der US-amerikanischen Bundesbehörde *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) eine Einteilung nach klinischen Gesichtspunkten in die Stadien A, B und C vorgenommen. Das Stadium C wurde früher auch "Vollbild AIDS" genannt.

Tabelle 5: Einteilung von HIV: Typen, Gruppen und Subtypen (mit Subsubtypen). Definitionen s. Kapitel 1.1.3.2.2.1.

Typen	Gruppen	Subtypen (mit Subsubtypen)
HIV-1	M	9 Subtypen: A (A1, A2), B, C, D, F (F1, F2), G, H, J, K
	N	keine Subtypen
	O	früher als Subtyp O bezeichnet
HIV-2	A	früher als Subtypen bezeichnet im September 2001 offiziell in Gruppen umbenannt
	B	
	C	
	D	
	E	
	F	
	G	

Beide Typen sind morphologisch nicht zu unterscheiden. Sie besitzen aber unterschiedliche virologische (unterschiedliche Virulenz) und molekulare (unterschiedliche Basensequenz) Eigenschaften. Die Infektiosität und Pathogenität ist bei HIV-1 größer als bei HIV-2. Bei HIV-1 kommt es ohne antiretrovirale Therapiemaßnahmen in der Regel bereits nach ca. fünf bis zwölf Jahren zum Erreichen des Stadiums C, bei HIV-2 deutlich später.

HIV-1 und HIV-2 unterscheiden sich relativ stark bezüglich ihrer genetischen Sequenzen. Die genetische Heterogenität zwischen beiden HIV-Typen liegt bei etwas mehr als 50 %. Des Weiteren besitzen HIV-1 (virales Protein U, *vpu*) und HIV-2 (virales Protein X, *vpx*) jeweils ein zusätzliches Protein. HIV-1 weist im Gegensatz zu HIV-2 eine viel höhere Mutationsrate auf, was sich an seiner großen genetischen Variabilität zeigt.

1.1.3.2.2. Gruppen von HIV-1

HIV-1 wird gemäß *HIV-1 Nomenclature Proposal* [97], erschienen im April 2000, nach phylogenetischen Verwandtschaftsgraden in Gruppen eingeteilt. Es besitzt derer drei, diese werden als M, N und O bezeichnet. Die genetische Heterogenität zwischen den Gruppen beträgt ca. 30 bis 35 %. Man vermutet, dass jede dieser drei Gruppen aus jeweils einer einzigen Transmission von SIV-CPZ des Schimpansen auf den Menschen entstanden ist (s. Kapitel 1.1.2.3.).

1. M-Gruppe: Da diese Gruppe die überwiegende Mehrzahl der weltweiten HIV-Infektionen darstellt, wurde sie *major group* oder *main group* genannt. Die M-Gruppe umfasst neun Subtypen (s. Kapitel 1.1.3.2.2.1.).
2. O-Gruppe: Im Jahr 1990 wurde ein neuer Subtyp von R. De Leys beschrieben [26]. Vier Jahre später berichtete L. G. Gürtler (Ludwig-Maximilians-Universität München) von in Kamerun gewonnenen DNA-Proben, die sich in ihrer Sequenz von bis dahin bekannten Subtypen der M-Gruppe stärker unterschieden [39]. Die gleiche Entdeckung machte zur selben Zeit eine belgische Arbeitsgruppe [115]. Um den Unterschied zur M-Gruppe zum Ausdruck zu bringen, wurde diese neue Gruppe im selben Jahr von P. Charneau (Institut Pasteur, Paris) *outlier group* (outlier: Ausreißer, Außenseiter) genannt [19]. Die Prävalenz dieser Gruppe ist sehr gering. Eine weitere Einteilung in Subtypen ist noch nicht genauer definiert.

3. N-Gruppe: Diese Gruppe wurde zuerst *non-M-non-O-group*, *new group* oder kurz N-group bezeichnet, da wenige in Kamerun gefundene Isolate nicht der M- oder O-Gruppe zugeordnet werden konnten. Die Entdeckung gelang F. Simon (Hôpital Bichat, Paris), der diese im September 1998 veröffentlichte [104]. Auch in dieser Gruppe gibt es keine weitere Einteilung in Subtypen.

1.1.3.2.2.1. Subtypen und Subsubtypen

Die M-Gruppe lässt sich gemäß ihrer phylogenetischen Verwandtschaftsgrade in neun Subtypen einteilen, wobei Subtyp A und F eine weitere Einteilung in jeweils zwei Subsubtypen erfahren. Häufig wird in der Literatur – wenn auch per definitionem nicht ganz korrekt – auch von elf Subtypen gesprochen. In den HIV-1-Gruppen N und O gibt es keine weitere Einteilung in Subtypen. Wird von HIV-1-Subtypen gesprochen, bezieht man sich immer auf die Gruppe M.

Man nimmt an, dass sich die Subtypen der M-Gruppe erst nach – womöglich einer einzigen – Ansteckung eines Menschen bei einem Schimpansen (s. Kapitel 1.1.2.3.) durch Mutationen auseinander entwickelt haben, d.h. dass die Subtypen im Menschen und nicht im Schimpansen entstanden sind. Die genetische Heterogenität zwischen den Subtypen innerhalb der M-Gruppe beträgt ca. 20 bis 30 %, wobei diese Subtypen unterschiedlich stark miteinander genetisch verwandt sind. Die DNA-Sequenzen von Proben innerhalb eines Subtyps gleichen sich mehr als jene von Proben, die von verschiedenen Subtypen stammen (s. Abbildung 5).

Im Jahr 1988 wurde erstmals versucht, eine Einteilung von HIV-1 vorzunehmen: *European/North American strain* und *African strain* [72, 82]. In den folgenden Jahren wurden Sequenzen von Proben aus anderen Regionen der Welt gefunden, sodass bereits 1992 eine neue Einteilung von HIV-1 in sechs Subtypen vorgenommen wurde [83]. Diese wurden mit A bis F (“Subtyp E” wurde zu dieser Zeit als Subtyp definiert) bezeichnet, wobei B dem früheren *European/North American strain* entsprach. 1994 und 1995 kamen die Subtypen G, H, I und J hinzu [60, 69, 71, 72].

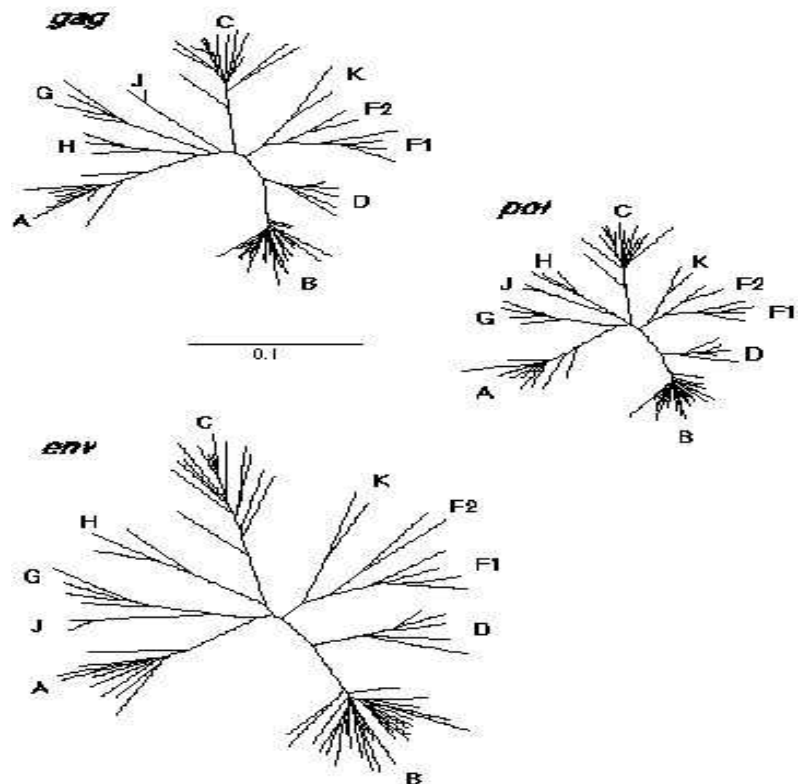
K. Triques (Institut de Recherche pour le Développement, Montpellier) berichtete 1999 [111], dass aufgrund von phylogenetischen Vergleichen der *gag*- und *env*-Regionen eine Unter-

teilung des Subtyps F in drei Subsubtypen, die er als F1, F2 und F3 bezeichnete, sinnvoll sei. Nach weiteren Sequenzierungen des kompletten HIV-Genoms wurde F3 als eigener Subtyp klassifiziert, der ein Jahr später von Triques als Subtyp K benannt wurde [112].

Je nachdem, in welchen DNA-Regionen man die Basensequenzen dieser Subtypen der Gruppe M miteinander vergleicht, bestehen zwischen ihnen leichte phylogenetische Unterschiede.

Abbildung 4:

Die phylogenetische Verwandtschaft zwischen den verschiedenen Subtypen der M-Gruppe ist unterschiedlich groß, je nachdem, von welchen DNA-Regionen man die Basensequenzen miteinander vergleicht. Hier sind schematisch die Verwandtschaftsgrade zwischen den Subtypen in den DNA-Regionen *gag*, *pol* und *env* dargestellt. Abbildung aus [97].



Die HIV-1-Subtypen repräsentieren verschiedene Abstammungslinien ihrer genetischen Weiterentwicklung, wobei diese sowohl unterschiedliche phylogenetische Verwandtschaftsgrade als auch geographische Übereinstimmungen (Ausbreitung und Verbreitung bestimmter Subtypen, s.a. Kapitel 1.2.2.1. und 1.2.2.2.) aufweisen.

Die Subtypen selbst sind in unterschiedlichem Maße miteinander verwandt. Das heißt, dass in bestimmten DNA-Regionen (z.B. in der DNA-Region *pol*, s. Abbildung 5) die Basensequenzen von Subtyp zu Subtyp mehr oder weniger übereinstimmen. Wie in Abbildung 5 dargestellt, liegt eine größere phylogenetische Verwandtschaft in der DNA-Region *pol* bei den Subtypen F und K, bei B und D, bei A und C und bei G und J vor. Diese besteht auch zwischen den Gruppen M und N. In der Abbildung sind nur Abstammungslinien eingezeichnet, bei denen die genetische Heterogenität unter 30 % liegt.

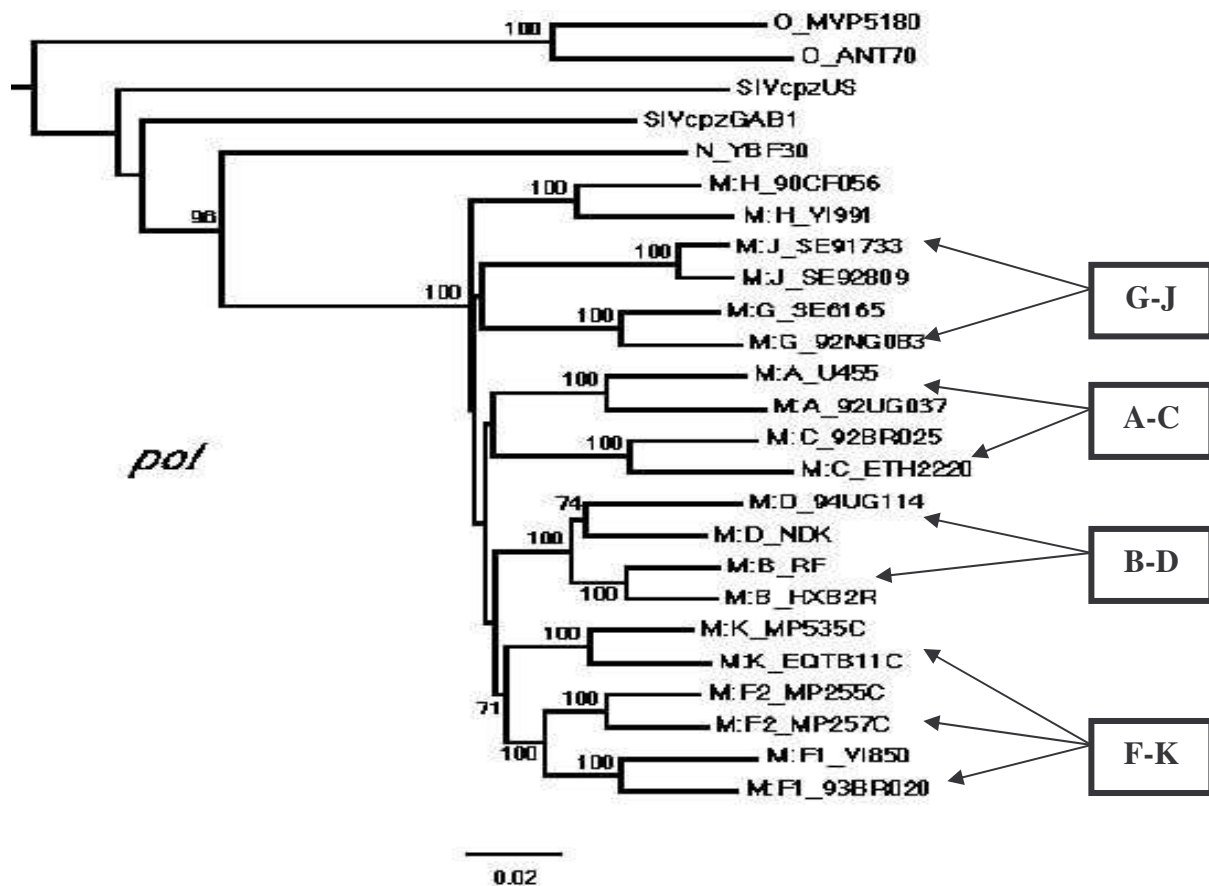


Abbildung 5: Schematische Zeichnung der phylogenetischen Verwandtschaftsgrade bei den HIV-1-Gruppen, HIV-1-Subtypen, SIV-CPZ-US und SIV-CPZ-GAB1 in der DNA-Region *pol*. Abbildung aus [97].

Bei einigen Subtypen wurde bzw. wird in Frage gestellt, ob es sich dabei überhaupt um ebensolche handelt. Die diesbezügliche Nomenklatur von HIV-1 wurde bereits geändert:

“Subtyp E”: F. McCutchan (Henry M. Jackson Foundation, Rockville) konnte 1992 beweisen, dass es sich bei “Subtyp E” gar nicht um einen Subtyp handelt, sondern um eine Rekombination [78]. Es wurde festgestellt, dass sich der Subtyp E nur in der *env*-Region von Subsubtyp A1 unterscheidet, die restlichen Gene aber weitgehend mit jenen vom Subsubtyp A1 übereinstimmen. Seit 1998 wird diese Rekombination CRF01_AE (s. Kapitel 1.1.3.2.2.2.) genannt. Obwohl noch nie der Nachweis des Subtyps E gelang, wird aus historischen Gründen weiterhin von einer AE-Rekombination gesprochen. Die Bezeichnung AU-Rekombination (“U” steht für *unclassified*) wäre laut definitionem die richtige. Besonders häufig kommt CRF01_AE in Südostasien vor. Im Jahr 1989 wurde in Thailand die erste Probe gewonnen. Die Herkunft dieser zirkulierenden rekombinanten Form liegt aber in Zentralafrika (s. Tabelle 6, Kapitel 1.1.3.2.2.2.).

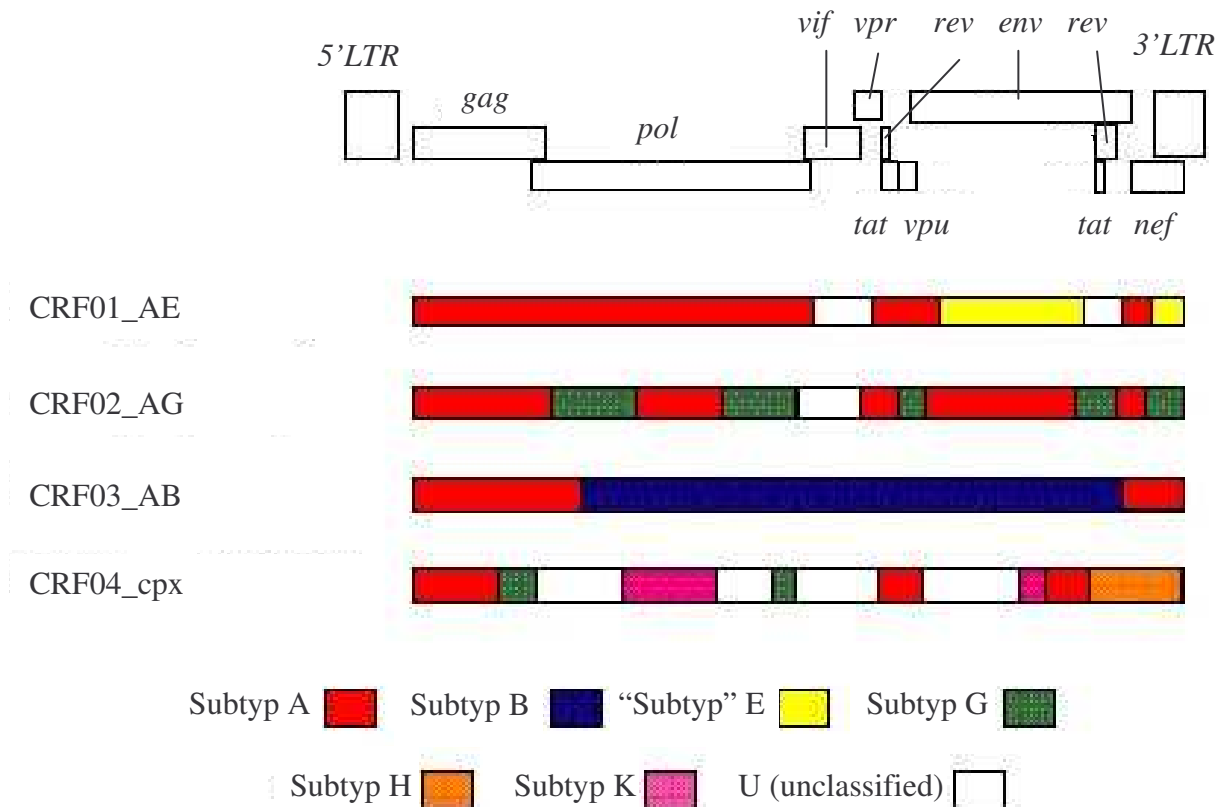


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Rekombinationen CRF01_AE (aus Subtyp A und aus "Subtyp E"), CRF02_AG (aus den Subtypen A und G), CRF03_AB (aus den Subtypen A und B) und CRF04_cpx (aus den Subtypen A, G, H, K und U), die dem früheren "Subtyp I" entspricht. Entnommen aus der Website:

<http://www.hiv-web.lanl.gov/content/hiv-db/REVIEWS/nomenclature/Nomen.html>

Subtyp G: Seine Existenz ist zweifelhaft. In der *vif/vpr*-Region ist dieser Subtyp sehr eng mit Subtyp A verwandt, aber in anderen Genom-Regionen unterscheidet er sich deutlich von allen anderen Subtypen. Die Frage, ob es sich hierbei eventuell um eine Anomalie oder um eine Rekombinante handelt, ist noch offen [12]. Subtyp G wird aber in der Nomenklatur weiterhin als Subtyp bezeichnet.

"Subtyp I": Auch bei "Subtyp I" (seit 1995, [69]) geht man seit 1998 [35] von einer Rekombinante aus, deren äußerst komplexes Genom aus Regionen der Subtypen A, G, H, K und weiteren, noch nicht sicher klassifizierten Regionen (als "U" abgekürzt, steht für *unclassified*) besteht. Sie wird seit 1999 als CRF04_cpx (s. Kapitel 1.1.3.2.2.2.) bezeichnet.

Es ist anzunehmen, dass man in der Zukunft weitere Subtypen entdecken wird, die durch Mutationen entstanden sind bzw. noch entstehen werden. Auch diese werden zur Diversität der globalen HIV-Epidemie beitragen.

1.1.3.2.2.2. Circulating Recombinant Forms (CRF)

Obwohl die große Mehrzahl der weltweit sequenzierten Proben gemäß der oben beschriebenen Nomenklatur der Subtypen eingeteilt werden konnte, gelang dies bei einigen anderen Proben nicht. Diese Tatsache beschrieb 1995 D. L. Robertson in *Recombination in HIV-1* [95] – eine nicht eben unerwartete Entdeckung, zumal bereits 1979 von J. M. Coffin [24] die Neigung von Retroviren zu Rekombinationen im Allgemeinen erforscht wurde und 1990 W. S. Hu und H. M. Temin [55, 56] diese auch als spezifisches Charakteristikum von HIV beschrieben. Seit 1998 wird allgemein in der Fachwelt vertreten, dass Rekombinationen bei HIV ein häufiges Ereignis darstellen [96].

Tabelle 6: Auflistung aller 15 bekannten *circulating recombinant forms* (CRF), deren Entstehung und geographischen Merkmale: Herkunft und Hauptverbreitungsgebiet der häufigen CRF. Das erste CRF wurde 1998 beschrieben. Neue CRF werden in chronologischer Reihenfolge ihrer Entdeckung nummeriert. Zum Beispiel würde der nächste CRF als CRF_16 bezeichnet werden. Modifiziert nach [96].

Name	Entstehung aus den Subtypen bzw. CRF	Hauptverbreitungsgebiet	Herkunft
CRF01_AE	A, E	Südostasien	Zentralafrika
CRF02_AG	A, G	West-, Zentralafrika	Elf.küste, Kamerun, USA
CRF03_AB	A, B	Russland, Ukraine	Russland
CRF04_cpx	A, G, H, K, U	-	Zypern, Griechenland
CRF05_DF	D, F	-	D. R. Kongo
CRF06_cpx	A, G, J, K	-	Senegal, Burkina F., Mali
CRF07_BC	B, C	-	China
CRF08_BC	B, C	-	China
CRF09_cpx	noch nicht publiziert	-	Senegal, USA
CRF10_CD	C, D	-	Ostafrika
CRF11_cpx	A, CRF01_AE, G, J	-	Griechenland
CRF12_BF	B, F	-	Argentinien, Bolivien
CRF13_cpx	A, CRF01_AE, G, J, U	-	Kamerun
CRF14_BG	B, G	-	Spanien
CRF15_01B	CRF01_AE, B	-	Thailand

Die *circulating recombinant forms* (CRF) sind Intersubtyp-Varianten der M-Gruppe von HIV-1. Sie entstanden durch Rekombination des Genoms von mindestens zwei unter-

schiedlichen reinen Subtypen oder durch Rekombination von einem oder mehreren unterschiedlichen Subtypen mit einer anderen CRF. Sie werden als CRF_cpx (cpx = *complex*) bezeichnet, wenn die Rekombinante aus mehr als zwei Subtypen bzw. CRF entstanden ist.

Rekombinante werden dann als CRF bezeichnet, wenn sie eine sehr wichtige epidemiologische Rolle bezüglich der HIV-1-Pandemie spielen und bei mindestens drei verschiedenen Individuen vorkommen, die in keiner epidemiologischen Verbindung stehen. Die DNA-Proben, die einer bestimmten CRF zugeordnet werden, haben eine Rekombination als gemeinsamen Ursprung. Deshalb weisen sie weitgehend identische genetische Sequenzen auf [78].

Im Allgemeinen wurde definiert, dass zur Beschreibung neuer Subtypen, Subsubtypen oder CRF bei mindestens drei verschiedenen Individuen DNA-Proben entdeckt worden sein müssen, die in keiner direkten epidemiologischen Verbindung standen. Neue Subtypen werden in alphabetischer Reihenfolge mit Großbuchstaben versehen. Zum Beispiel würde man den nächsten Subtyp "L" nennen. Bei neuen Subsubtypen werden die Großbuchstaben mit Zahlen versehen, wie es bei Subtyp A (A1 und A2) und Subtyp F (F1 und F2) geschehen ist.

Obwohl die große Mehrzahl von Rekombinationen aus verschiedenen Subtypen innerhalb der M-Gruppe entstanden ist, wurden bei Proben aus Kamerun auch Rekombinante zwischen der M-Gruppe und der O-Gruppe entdeckt (s. Kapitel 1.1.3.1.3.) [106].

1.1.3.2.3. Gruppen von HIV-2

Die HIV-Subtypen werden gemäß ihrer phylogenetischen Verwandtschaft in Gruppen eingeteilt. Analog zur Einteilung von HIV-1 werden seit September 1999 [97] die sieben Subtypen von HIV-2 als Gruppen bezeichnet: A, B, C, D, E, F und G. Diese Umbenennung wurde vollzogen, weil sich die genetischen Sequenzen dieser Gruppen ähnlich stark unterscheiden wie jene der drei Gruppen M, N und O von HIV-1. Die genetische Heterogenität zwischen den jeweiligen Gruppen beider HIV-Typen liegt bei ca. 30 bis 35 %. Die Annahme, dass jede Gruppe von HIV-1 und HIV-2 aus dem jeweiligen SIV-Stamm nach einer einzelnen Transmission vom Affen auf den Menschen entstanden sei (s. Kapitel 1.1.2.3.), war ein weiterer Grund für die Umbenennung [97].

1.2. Epidemiologie von HIV und dessen Subtypen

1.2.1. Ursprung der Epidemie

Wie bereits in Kapitel 1.1.2.3. erwähnt, geht man in der Regel davon aus, dass SIV während der ersten Hälfte des 20. Jahrhunderts in West- und/oder Zentralafrika auf den Menschen übertragen wurde. Warum dieser "Speziessprung" von SIV nicht viel früher oder später erfolgte, versucht man auch mit den einschneidenden politischen und sozialen Veränderungen Afrikas während der Kolonialisierung zu erklären.

Durch die medizinischen Fortschritte und durch die Verbesserung der gesundheitlichen Infrastruktur und der Lebensbedingungen im Allgemeinen kam es zu einem starken Anstieg der Bevölkerungszahl Afrikas, was einen anwachsenden Bedarf an Lebensraum, Brennmaterial und Lebensmitteln zur Folge hatte. Urwälder wurden systematisch abgeholzt, um Weide- oder Ackerland zu gewinnen und um Straßen zu bauen. Damit wurde der natürliche Lebensraum vieler Affenarten eingeschränkt und der Kontakt des Menschen mit Affen erhöhte sich. Das Risiko des Menschen, sich mit SIV zu infizieren, stieg sprunghaft an. Schätzungsweise werden pro Jahr etwa eine Million Tonnen Fleisch von wilden Tieren in Afrika konsumiert. Davon stammen ungefähr 10.000 Tonnen von Affen, insbesondere von Pavianen, Schimpansen, Gorillas und Mangaben.

Die Arbeitsgruppe von M. Peeters (Institut de Recherche pour le Développement, Montpellier) veröffentlichte 2002 die Ergebnisse einer Studie, bei der 788 Affen untersucht wurden, die in den Urwäldern Kameruns gejagt oder als Haustiere gehalten wurden [91]. Bei 13 von 16 Affenspezies konnten SIV-Infektionen serologisch nachgewiesen werden. 20 % der Tiere waren SIV-positiv, wobei 21 verschiedene SI-Viren isoliert wurden, von denen fünf noch nicht bekannt waren. Aufgrund der hohen Durchseuchung bleibt das Risiko von weiteren SIV-Transmissionen auf den Menschen und wahrscheinlich auch von SIV-HIV-Rekombinationen sehr hoch.

Von West- und/oder Zentralafrika ausgehend dürfte sich die HIV-1-Epidemie in den 50er- und 60er-Jahren des 20. Jahrhunderts in Afrika südlich der Sahara rasant ausgebreitet haben. Es war die Zeit, in der die Unabhängigkeit vieler afrikanischer Staaten in Kriegen erkämpft wurde, die später nicht selten in Form von Bürgerkriegen andauerten. Durch die Flüchtlinge

(Krieg, Vertreibung, Landflucht) und durch die erhöhte Mobilität im Allgemeinen wurde HIV zunächst in andere Teile Afrikas und später in andere Kontinente getragen. Man vermutet, dass sich HIV-1 zwischen 1970 und 1975 in weitgehend alle afrikanische Länder südlich der Sahara ausgebreitet hat.

1.2.2. HIV-1

1.2.2.1. Ausbreitung

1.2.2.1.1. Ausbreitung in Afrika

Wie in Kapitel 1.1.1. bereits geschildert, wurden die ersten AIDS-Fälle 1981 in den USA beschrieben, ein Jahr später auch in verschiedenen europäischen Ländern. Zu dieser Zeit wurden die gleichen Krankheitssymptome in Zentralafrika festgestellt [23]. Danach wurden AIDS-Fälle aus dem damaligen Zaire (seit 1997 D. R. Kongo), aus Ruanda und Sambia gemeldet. Bereits 1986 war es offensichtlich, dass sich HIV-1 bereits über die Mehrzahl der Länder Afrikas südlich der Sahara ausgebreitet hatte [94]. Nachdem man zuerst annahm, dass diese neue Erkrankung vor allem unter homosexuellen Männern auftreten würde, konnte dies in Afrika nicht beobachtet werden. Mitte der 1980er-Jahre fand ein Umdenken statt. Aufgrund der hohen Prävalenz in Afrika konnte man schlussfolgern, dass es global weit mehr heterosexuell übertragene HIV-Infektionen gab als vermutet wurde. Infektionen, die durch Bluttransfusionen oder infizierte Nadeln bedingt waren, fanden sich in Afrika nur in sehr wenigen Fällen [8].

Retrospektiv hat man nachgewiesen, dass AIDS-Fälle bereits 1978/79 relativ gehäuft vor allem im damaligen Zaire [23, 93] und in Uganda [101] auftraten. Die Tatsache, dass in den zentralafrikanischen Ländern Kamerun, Gabun und D. R. Kongo weltweit die meisten verschiedenen Subtypen vorkommen, führt zu der Annahme, dass HIV dort schon seit langem existiert [61]. Das entspricht der Theorie, dass die Mehrzahl der SIV-Transmissionen auf den Menschen in Zentralafrika stattgefunden hat. Dies wird dadurch untermauert, dass die Wirte von SIV-CPZ (wahrscheinliche Vorstufe von HIV-1) *Pan troglodytes troglodytes* (nur in Zentralafrika) und von SIV-SMM (wahrscheinliche Vorstufe von HIV-2) *Cercocebus torquatus* (nur in West- und Zentralafrika) sind, deren natürlicher Lebensraum sich dort befindet (s. Kapitel 1.1.2.3.).

Obwohl Mitte der 1980er-Jahre im damaligen Zaire und in Uganda weltweit die höchsten HIV-Prävalenzen festgestellt wurden [94], kam es dort in den darauffolgenden Jahren zu einer weitgehend moderaten Ausbreitung und zu einer geringeren Zunahme der HIV-Prävalenzen. Lagen im Jahr 1994 Uganda und Zaire (heute D. R. Kongo) im Ranking der Länder mit der höchsten HIV-Prävalenz noch an vierter bzw. neunter Stelle, waren sie im Jahr 2001 an 21. bzw. 25. Stelle [114].

Ab Mitte der 1980er-Jahre kam es hingegen vor allem in den ostafrikanischen Ländern, wie beispielsweise auch in Tansania, zu einer rasanten HIV-Epidemie. Einige Jahre später noch vehementer verlaufend im südlichen Afrika: in Sambia schon Ende der 1980er-Jahre, in Südafrika ab Mitte der 1990er-Jahre. Die acht Länder, die heute weltweit am stärksten von HIV betroffen sind, befinden sich ausschließlich im südlichen Afrika. Botswana liegt mit einer HIV-Durchseuchung von 38,8 % (2002, bei 15- bis 49-Jährigen) weltweit an der Spitze [114]. Warum das östliche und südliche Afrika die höchsten HIV-Prävalenzen aufweisen, kann mit dem Sexualverhalten allein nicht beantwortet werden [11].

1.2.2.1.2. Weltweite Ausbreitung

Von Zentral- und Westafrika ausgehend werden mehrere Ausbreitungswege beschrieben. Der epidemiologisch wichtigste dürfte die Verschleppung von HIV-1 nach Haiti sein. Nach der Unabhängigkeit Zaires 1960 halfen haitianische Fachkräfte, ein Verwaltungssystem aufzubauen. Mit ihrer Rückkehr wurde das Virus in Haiti verbreitet. Haiti galt in den 1970er-Jahren als ein beliebtes Ferienziel für US-amerikanische Touristen, auch für Homosexuelle, die das Virus in ihr Heimatland brachten. Die älteste HIV-positive Probe eines US-Amerikaners stammt aus dem Jahr 1968. Haiti ist das einzige nicht-afrikanische Land der Welt, das eine HIV-Prävalenz von über 5 % aufweist [114]. Dieser Verbreitungsweg ist allerdings wissenschaftlich nicht gesichert und wird von mehreren Seiten bezweifelt.

Nach der schnellen Ausbreitung von HIV in Afrika südlich der Sahara in den 1970er-Jahren kam es bereits Ende der 1970er- und Anfang der 1980er-Jahre zur Epidemie in der Karibik, in Nord- und in Südamerika, wenig später auch in Westeuropa und in Australien. Im Lauf der zweiten Hälfte der 1980er-Jahre waren auch Nordafrika, Asien und der pazifische Raum betroffen. Ab Anfang der 1990er-Jahre verbreitete sich das Virus auf rasante Weise in den Ländern des ehemaligen Ostblocks. Obwohl dort die Epidemie später begann, weist diese

Region nach Afrika südlich der Sahara (8,8 %) und der Karibik (2,4 %) mit 0,6 % die höchste HIV-Prävalenz bei Erwachsenen auf (s. Tabelle 7).

Tabelle 7: Beginn der HIV-Epidemie in den zehn Weltregionen. Nach UNAIDS [113].

Beginn der HIV-Epidemie	Afrika südlich der Sahara	Nordafrika/ Naher Osten	Süd- und Süd-ostasien	Ost-Asien/ Pazifik	Lateinamerika	Karibik	Ost-europa/ Nord-asien	West-europa	Nordamerika	Australien/ Neuseeland
späte 1970er										
frühe 1980er										
späte 1980er										
frühe 1990er										

Estimated adult HIV prevalence rate (15-49 years), end 1999

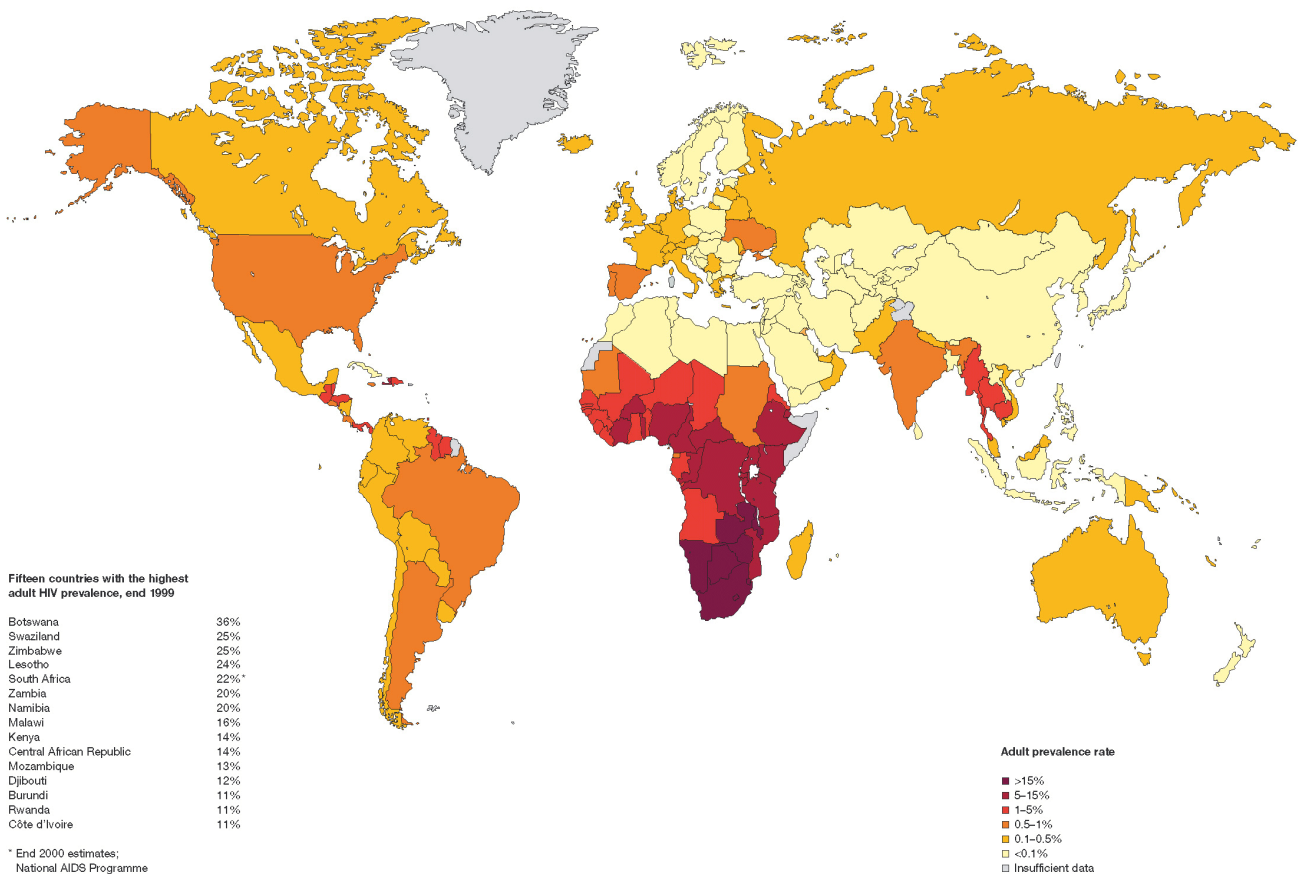


Abbildung 7: HIV-Prävalenz nach Ländern aufgeteilt. Entnommen aus der Website von UNAIDS (Stand 2001): http://www.unaids.org/UNGASS/leadership/English/Map1_2200-e.gif

1.2.2.1.3. Ausbreitungsdynamik

Es bleibt zu klären, warum HIV so spät entdeckt wurde, obwohl sich die Ansteckung des Menschen mit SIV bereits in der ersten Hälfte des 20. Jahrhunderts oder womöglich sogar früher ereignet hat (s. Kapitel 1.1.2.3. und 1.2.1.). Der Grund dürfte auf die anfangs sehr langsame Ausbreitung von HIV zurückzuführen sein.

Die Ausbreitung einer Infektionskrankheit ist von der Häufigkeit der Übertragungsmöglichkeiten und der Mobilität der Träger des Erregers abhängig. Letztere war in Afrika während der Zeit der Kolonialisierung gering, und damit fand eine Ansteckung mit HIV nur in einem begrenzten Umfeld statt.

Anfangs war die HIV-Ausbreitung relativ schleichend, weil sich nur sehr wenige Menschen mit SIV angesteckt hatten. Man vermutet, dass jede einzelne Gruppe von HIV-1 und HIV-2 auf eine einzelne Transmission von SIV zurückzuführen ist (s. Kapitel 1.1.2.3.), also auf mindestens zehn Transmissionen. Bei einer so geringen anfänglichen Prävalenz dauert es Jahrzehnte, bis eine auffällig große Zahl von Menschen infiziert ist. Beispielsweise würde es bei einer Verdoppelung der Prävalenz innerhalb drei Jahren ca. 30 Jahre dauern, bis eine Prävalenz von 0,001 % eine messbare Größe von ca. 1 % erreichen würde, aber nur drei Jahre, um von 10 % auf 20 % anzusteigen [2, 50].

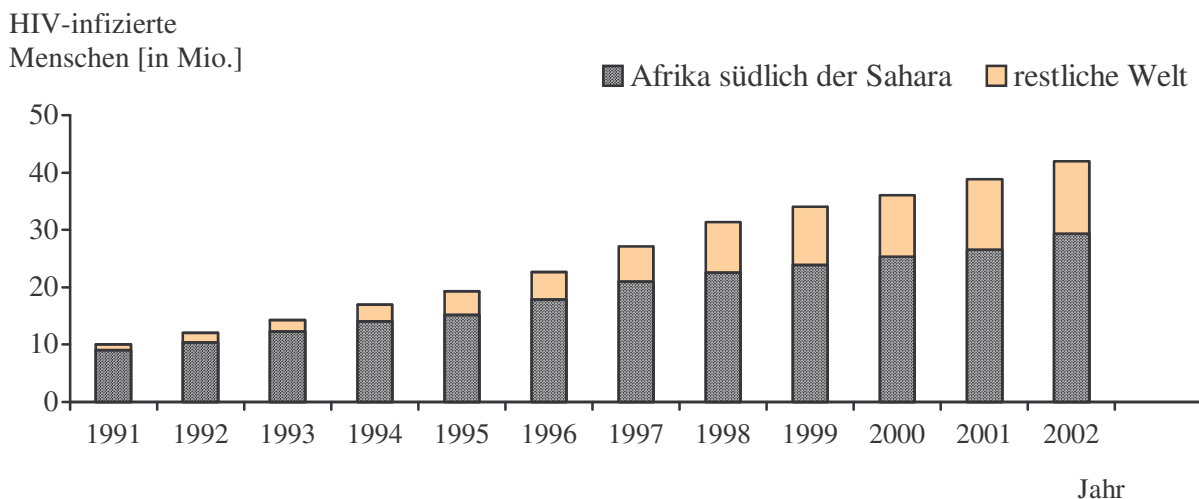


Diagramm 1: Zunahme der HIV-Prävalenz von 1991 bis 2002. Nach UNAIDS [113].

1.2.2.2. Verteilung der HIV-1-Subtypen

1.2.2.2.1. Weltweite Verteilung

HIV besitzt eine bemerkenswerte Fähigkeit, sich zu vermehren und sich zu ändern. Seine große Variabilität zeigt sich vor allem innerhalb der M-Gruppe von HIV-1: Neun Subtypen (s. Kapitel 1.1.3.2.2.1.) und 15 CRF (s. Kapitel 1.1.3.2.2.2.) konnten in dieser Gruppe bisher definiert werden. Die Häufigkeit und die geographische Verteilung von Subtypen und CRF sind sehr unregelmäßig.

Tabelle 8: Prozentualer Anteil der häufigsten HIV-1-Subtypen weltweit [28].

No.	Subtyp	Weltweites Vorkommen
1	Subtyp C	> 50 %
2	Subtyp A	> 20 %
3	Subtyp B	5 - 10 %
4	Subtyp D	< 5 %
5	“Subtyp E”	~ 5 %
6	alle anderen	~ 5 %

Der weltweit häufigste Subtyp C (> 50 %) kommt vor allem im südlichen Afrika, in Äthiopien und Somalia sowie in Indien vor. Subtyp A ist die zweithäufigste Variante von HIV. Sie ist in den Ländern Zentralafrikas, Westafrikas und Osteuropas die verbreitetste. Auffällig ist seine rasante Zunahme in Osteuropa. Der weltweit dritthäufigste Subtyp ist B, der die große Mehrzahl der HIV-Infektionen in Ländern der westlichen Welt verursacht.

CRF_01 wird vor allem in Südostasien vorgefunden. CRF_02 kommt zunehmend häufiger in Westafrika vor, wo die HIV-Prävalenz in den letzten Jahren nur gering anstieg. Dort werden in einigen Ländern bis 30 % aller HIV-Neuinfektionen durch CRF_02 verursacht (s. Tabelle 6, Kapitel 1.1.3.2.2.2.).

Man vermutet, dass weltweit fast 10 % aller HIV-Infektionen durch Rekombinante verursacht werden [95]. In einigen Ländern führen Rekombinante zu mehr HIV-Infektionen als die reinen Subtypen [85]. Einen Extremwert hat Kambodscha aufzuweisen, wo nahezu alle Infektionen durch die Rekombinante CRF01_AE bedingt werden. Aufgrund der ansteigenden

HIV-Prävalenzen in fast allen Teilen der Welt und der dadurch bedingten Zunahme an Superinfektionen wird auch der Anteil rekombinanter HIV anwachsen [95].

Die weltweite Verteilung der HIV-Rekombinanten ist nur annähernd bekannt. Sicher ist, dass Intersubtyp-Rekombinationen (s. Kapitel 1.1.3.1.3.) in Ländern, wo zwei oder mehrere Subtypen vorkommen (z.B. Tansania mit Subtyp A, C und D, s. Kapitel 1.2.2.2.2.), viel häufiger sind als in Ländern, wo ein Subtyp vorherrscht (z.B. die Länder in Nordamerika und in Westeuropa mit Subtyp B). Intrasubtyp-Rekombinationen sind schwer nachzuweisen (s. Kapitel 4.1.1.3.) und entziehen sich häufig epidemiologischer Berechnungen. Allerdings wurde in verschiedenen Publikationen darüber berichtet, dass aufgrund zunehmender Reisetätigkeit eine spürbare Zunahme von Inter-subtyp-Rekombinationen in der westlichen Welt, wo das engste HIV-Monitoring durchgeführt wird, festgestellt wurde [105, 108].

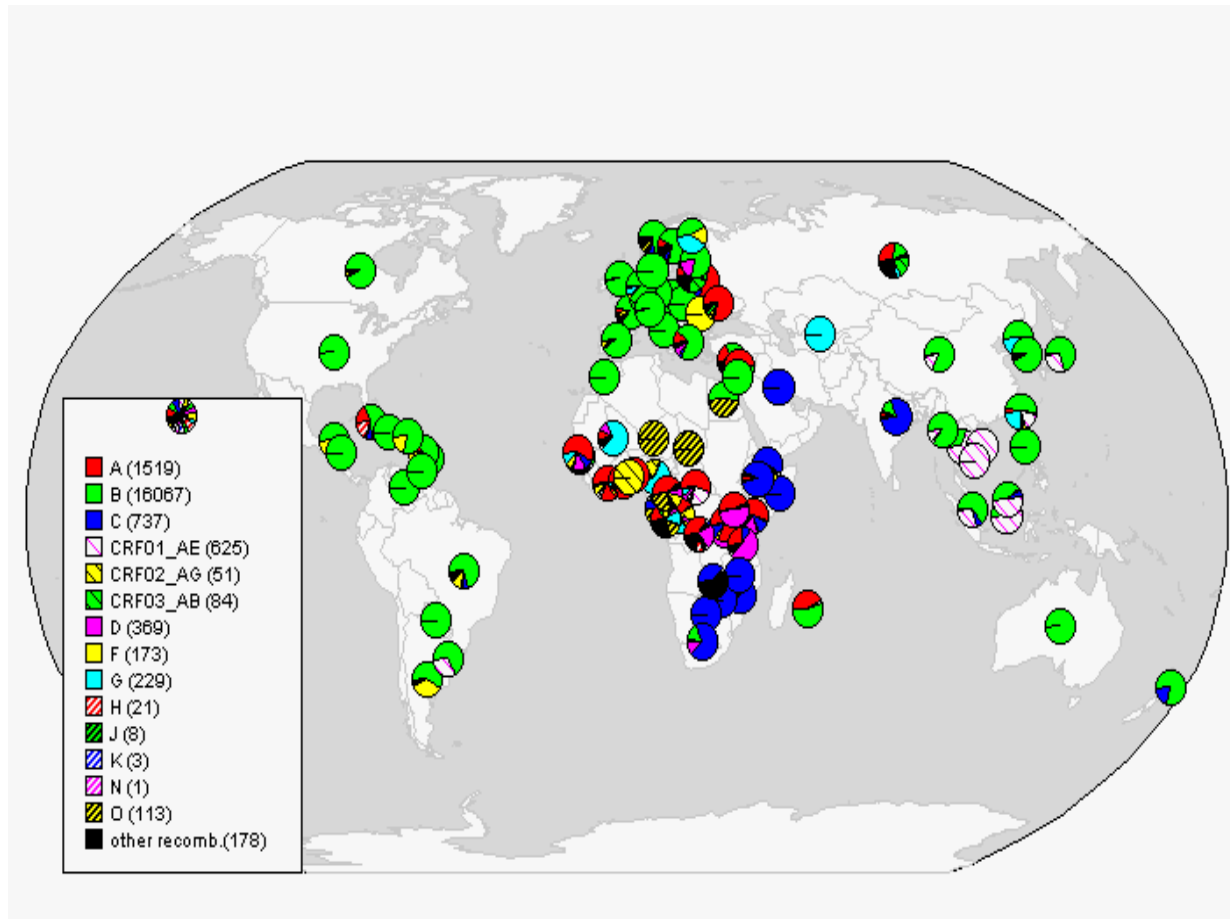


Abbildung 8: Weltweite Verteilung der HIV-Subtypen und der CRF. Entnommen aus [70].

In Afrika konnten fast alle Subtypen und die Mehrzahl der CRF nachgewiesen werden. Ihre geographische Verteilung liefert wichtige Hinweise bezüglich der Verbreitungswege von HIV und deren Subtypen.

1.2.2.2.2. Verteilung in Tansania

Die HIV-1-Subtypen-Verteilung in Tansania ist laut Datenbank von LANL (*Los Alamos National Laboratory*) [70] wie folgt: Subtyp D: 57 %, Subtyp A: 22 %, Subtyp C: 11 %, des Weiteren gibt es 10 % Rekombinante. Das sind nur ungefähre Durchschnittswerte für ganz Tansania. Wenn man die Verteilungen in den verschiedenen Regionen Tansanias betrachtet, weichen sie teilweise sehr voneinander ab. Das Land liegt an Schnittpunkten verschiedener Subtypen-Endemiegebieten, wie die Abbildung 9 zeigt.

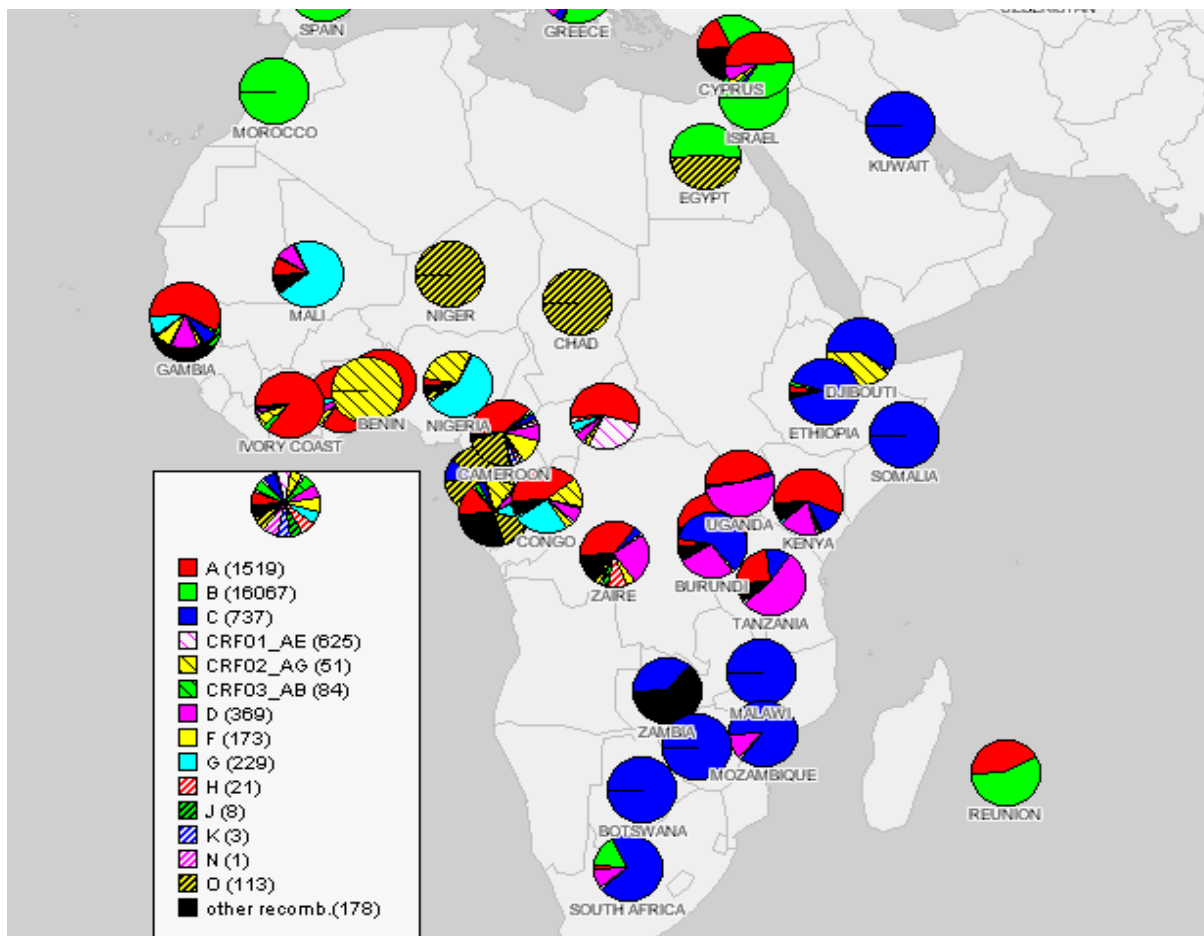


Abbildung 9: Die HIV-1-Subtypen-Verteilung in Afrika. Entnommen aus der Website: <http://www.hiv-web.lanl.gov/content/hiv-db/geography/pics/safrica.gif>

Im südlichen Afrika wie auch in Malawi und Mosambik, den südlichen Nachbarstaaten Tansanias, dominiert Subtyp C. In den südwestlichen Nachbarstaaten Sambia und Burundi kommt Subtyp C nur noch zu ca. 40 % bzw. 60 % vor. In den nordwestlichen Nachbarstaaten Ruanda und Uganda ist Subtyp D mit über 80 % bzw. mit über 50 % stark vertreten. In Uganda kommt aber auch Subtyp A mit ca. 40 bis 45 % häufig vor. Subtyp A ist im

nördlichen Nachbarstaat Kenia mit über 50 % der vorherrschende. Die Subtypen-Verteilung in den Nachbarstaaten lässt eine entsprechende Verteilung in den verschiedenen Regionen Tansanias erwarten: Im Nordwesten Tansanias überwiegt Subtyp D, im Nordosten Subtyp A und im Süden Subtyp C.

Im nordöstlich gelegenen wirtschaftlichen Zentrum des Landes, in Dar es Salaam, zeigt sich eine ausgeglichene Verteilung der HIV-1-Subtypen, die wahrscheinlich dadurch bedingt ist, dass viele Tansanier aus allen Teilen des Landes dort hinreisen. In Dar es Salaam wurden im Jahr 2000 bei 101 HIV-positiven Blutproben eine Subtypen-Bestimmung mittels *Heteroduplex Mobility Assay* (HMA, s. Kapitel 1.3.2.) durchgeführt [75]: Subtyp A: 47 %, Subtyp C: 30 %, Subtyp D: 20 %, bei 3 % war der Subtyp nicht sicher bestimmbar.

In einer 1997 an 86 AIDS-Patienten in Mbeya (im Südwesten Tansanias) von M. Hölscher, dem Mitbetreuer dieser Dissertation, durchgeführten Subtypen-Bestimmung mittels *V3-Serotyping* (s. Kapitel 1.3.2.) wurde erwartungsgemäß Subtyp C mit 55 % am häufigsten nachgewiesen, des Weiteren Subtyp A mit 29 %, Subtyp D mit 15 % und Subtyp G mit 1 %. Bei diesem Verfahren werden spezifische Antikörper angewandt, die gegen das V3-Peptid, das in der *env*-Region kodiert ist, gerichtet sind [51]. Das Ergebnis konnte bei weiteren Subtypen-Bestimmungen im Rahmen des *HIV Superinfection Study* (HISIS, s. Kapitel 3.1.2.) mehrfach bestätigt werden.

1.2.3. HIV-2: Ausbreitung und Verteilung

Weniger als 1 % aller weltweit diagnostizierten HIV-Infektionen werden durch HIV-2 hervorgerufen. Diese kommen vor allem in Westafrika vor. Nur in zehn afrikanischen Ländern konnte eine HIV-2-Prävalenz von über 1 % in der erwachsenen Bevölkerung (15 bis 49 Jahre) festgestellt werden: Elfenbeinküste, Gambia, Guinea-Bissau, Kapverdische Inseln, Mali, Mauretanien, Nigeria, Sierra Leone sowie in den im südlichen Afrika liegenden Ländern Angola und Mosambik.

Außerhalb Afrikas sind autochthone, nicht importierte HIV-2-Infektionen extrem selten. In den USA wurde der erste Fall im Jahr 1987 entdeckt. Bis 2003 wurden dort 79 HIV-2-Infektionen registriert, wobei 52 der betroffenen Personen aus Westafrika stammten und nur sieben in den USA geboren wurden [17].

1.3. Molekularbiologischer Nachweis von HIV und dessen Subtypen

1.3.1. Nachweis von HIV

Die Tests, die in der HIV-Diagnostik verwendet werden, können entweder spezifische Antikörper (indirekte HIV-Tests: serologische HIV-Antikörper-Tests) oder das Virus selbst bzw. Virusbestandteile (virale RNA, provirale DNA, p24-Antigen) nachweisen. Zu diesen direkten HIV-Tests zählt die Viruskultur, der p24-Antigen-Test und die molekularbiologischen HIV-Tests (Nukleinsäure-Nachweis-Techniken, Nukleinsäure-Amplifikations-Techniken, NAT). Die molekularbiologischen Tests sind den beiden anderen direkten Tests überlegen.

Bei Viruskulturen versucht man, ein Wachstum der HI-Viren in lebenden Zellen hervorzurufen. Der direkte Virusnachweis durch Anzucht der Viren, die in der Regel aus Lymphozyten des Infizierten gewonnen werden, ist möglich. Sie ist aber zeitlich aufwändig und gelingt nicht immer (Sensitivität nur 75-80 %). Sie ist daher für die Routinediagnostik nicht geeignet.

Der p24-Antigen-Test weist das virale Protein p24 im Serum des Patienten mittels enzymmarkierter Antikörper nach. Dies gelingt bereits ca. zehn bis 14 Tage nach der Infektion. Der Test hat eine Sensitivität von ca. 98 %. Nach Bildung spezifischer Antikörper ist der Nachweis wegen der Immunkomplex-Bildung (p24/anti-p24) aber nicht mehr möglich. Kombinationstests weisen Anti-HIV-1, Anti-HIV-2 und p24 nach. Sie können eine Infektion vier bis fünf Tage früher als p24-Tests detektieren und sind den NAT in der Diagnostik der O-Gruppe überlegen [68].

Zu den molekularbiologischen HIV-Nachweistechiken gehört die Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction* PCR), die *Nucleic Acid Sequence-Based Amplification* (NASBA® von *Organon Teknika*, isotherme quantitative RNA-Amplifizierung) und die *Branched DNA Signal Amplification* (bDNA; *Quantiplex*® von *Chiron*).

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde Mitte der 1980er-Jahre von K. B. Mullis entwickelt [80]. In der HIV-Diagnostik gibt es zwei PCR-Methoden: RNA-PCR und DNA-PCR. Diese Methoden beruhen wie die NASBA-Methode auf dem Prinzip der Amplifizierung von Nukleinsäuren. Die NASBA-Methode kann RNA und DNA amplifizieren, doch ihr wesentlicher Einsatz bleibt auf die Bestimmung von HIV-RNA beschränkt. Bei der bDNA-

Methode kommt es nur zur Signalamplifizierung. Eine Vermehrung von Nukleinsäuren findet hierbei nicht statt. Der bDNA-Test ist neben dem Nachweis von HIV-1 zum Nachweis von HBV (Hepatitis-B-Viren), HCV (Hepatitis-C-Viren) und CMV (Zytomegalie-Viren) entwickelt worden [48].

Die RNA-PCR misst wie die NASBA- und die bDNA-Methode quantitativ die virale HIV-1-RNA in Körperflüssigkeiten des Patienten: Viruslast, *viral load*. Diese Viruslast-Tests haben eine unterschiedliche Nachweisgrenze von 20 bis 500 HIV-1-RNA-Kopien pro ml Serum. Da die DNA-PCR die provirale DNA nachweist, sind hierbei – im Gegensatz zu den anderen Nukleinsäuren-Nachweis-Techniken – die infizierten Zellen des Patienten notwendig. Am besten sind hierfür die mononukleären Blutzellen (*peripheral blood mononuclear cells*, PBMC, s. Kapitel 3.2.2.2.) geeignet. Bei einem asymptomatischen HIV-positiven Menschen kann bei ungefähr jeder 6.000sten bis 80.000sten PBMC mittels PCR HIV-virale DNA nachgewiesen werden. Bei einem AIDS-Kranken gelingt dies bereits bei jeder 700sten bis 3.300sten PBMC [103]. Die PBMC werden mittels Dichtegradientensubstanzen aus dem Blut isoliert (s. Kapitel 3.2.2.2.). Für meine Querschnittstudie, auf deren Daten die vorliegende Dissertation basiert, habe ich zur HIV-1-Subtypen-Bestimmung die DNA-PCR angewandt.

1.3.2. Nachweis von HIV-1-Subtypen

Es gibt verschiedene Methoden, um die Bestimmung der HIV-1-Subtypen durchzuführen. Die neueste ist die Real-Time-DNA-PCR. Hierbei werden kurze (ca. 15 bis 30 Basen lange) DNA-Sonden verwendet, die spezifisch für einen bestimmten Subtyp sind. Sie hybridisieren an definierte Regionen der proviralen HIV-DNA, z.B. *gag*-Gen p24 oder *env*-Gen gp41. Diese Methode wird detailliert in Kapitel 3.3. *Multi-Region Hybridisation Assay (MHA)* erläutert. Dieser Assay stellt eine Weiterführung der Real-Time-DNA-PCR dar und ich habe ihn in meiner Studie für die HIV-1-Subtypisierung verwendet.

Der Goldstandard bei der HIV-1-Subtypen-Bestimmung ist die HIV-Gesamtgenom-Sequenzierung (*full-genome sequencing*). Die Bestimmung der DNA-Sequenz wird meist mittels gelgestützter Verfahren durchgeführt. Man produziert chemisch (Spaltung der DNA in einzelne Basen: Maxam-Gilbert-Verfahren) oder enzymatisch (die DNA wird in vitro derart synthetisiert, dass die Reaktion spezifisch an der Position einer bestimmten Base endet: Sanger-Verfahren) eine Reihe von DNA-Einzelstrangmolekülen, von denen jedes nur um eine

Base länger ist als das andere. Der Längenunterschied wird bei der Elektrophorese als Bande im Gel sichtbar gemacht. Obwohl das HIV-Genom mit ca. 10 kb relativ kurz ist, ist das *full-genome sequencing* von HIV mit großem Aufwand verbunden [73]. Für die vorliegende Dissertation habe ich die Ergebnisse der HIV-1-Subtypen-Bestimmung mittels MHA mit jenen des *full-genome sequencing* verglichen (s. Kapitel 4.3.).

Der *Heteroduplex Mobility Assay* (HMA) ist eine weitere genaue Methode zur Bestimmung von HIV-1-Subtypen. Unter Heteroduplex versteht man DNA- oder RNA-Doppelstränge, in denen ungepaarte Abschnitte (Fehlpaarungen, *mismatches*) vorhanden sind. Diese entstehen, wenn die Basensequenz in den beiden Ausgangs-DNA-Doppelhelices nicht identisch war. Zur HIV-1-Subtypen-Bestimmung werden nach der PCR-Amplifizierung in ausgewählten Regionen der viralen DNA die entsprechenden Standardsequenzen (spezifisch für einen bestimmten Subtyp) hybridisiert. Bei der anschließenden elektrophoretischen Auftrennung wandern die Hybride umso langsamer, je weniger homogen der Standard und die Probe sind, d.h., die unbekannte Probe läuft umso näher mit dem Subtypus-Standard, je ähnlicher sie ihm ist. Diese Methode ist relativ kostengünstig und rasch durchzuführen, weshalb der HMA für Entwicklungsländer empfohlen wird [27, 43, 107].

Die *Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismen* (*restriction fragment length polymorphism*, RFLP) beruhen auf DNA-Sequenzunterschieden in homologen Gen-Regionen, die dazu führen, dass beim Restriktionsverdau und der anschließenden Gelelektrophorese DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge entstehen. Hat man eine geeignete DNA-Probe aus dem betreffenden DNA-Bereich verfügbar, lassen sich RFLP in genomischer DNA durch *Southern Blot* leicht erkennen. RFLP kann auch zur HIV-1-Subtypen-Bestimmung verwendet werden. Hierbei werden bestimmte virale DNA-Regionen mittels *nested-PCR* amplifiziert, nachdem diese aus PBMC oder durch Viruskultur gewonnen wurden. Die Klassifizierung der HIV-1-Subtypen B, D, F und A/C erfolgt mittels Endonuklease-Restriktions-Analyse der *gag-p24*-Region. Bei Einfachinfektionen mit einem einzigen Subtyp ist bei der Gelelektrophorese eine Bande zu erwarten. Bei Mehrfachinfektionen müssten zwei oder mehr dieser Banden sichtbar sein [59]. Der Vorteil dieser Methode sind die geringen Kosten und der hohe Probendurchlauf.

Darüber hinaus existieren als weitere molekularbiologische Methoden der HIV-1-Subtypen-Bestimmung die *Oligonucleotide Probe Hybridisation* und der *Combinatorial DNA Melting Assay*.

Das *V3-Serotyping* ist ein Peptid-ELISA, der ebenfalls zur Bestimmung der HIV-1-Subtypen dient. Bei dieser Methode werden Antikörper gegen das *V3-loop-Peptid* auf gp120 (s. Kapitel 1.1.3.1.1.) oder auf dessen Vorläufer gp160 nachgewiesen. Sie sind auf dem *env*-ORF kodiert. Diese Methode hat den Vorteil, dass sie einfach und schnell durchzuführen ist, um eine vorläufige HIV-Subtypisierung vorzunehmen. Der Nachteil besteht darin, dass im Frühstadium keine HIV-1-Subtypisierung möglich ist, da noch keine Antikörper gegen das *V3-loop-Peptid* vorhanden sind. Für die Bestimmung von HIV-Superinfektionen ist diese Methode nicht geeignet.

Die erste HIV-1-Subtypisierung mittels *V3-Serotyping* mit Proben aus der Region Mbeya (im Südwesten Tansanias) wurde von M. Hölscher, dem Mitbetreuer der vorliegenden Dissertation, bereits 1997 durchgeführt. Diese Methode wurde bei 86 AIDS-Patienten angewandt [51]. Die Verteilung war wie folgt: Subtyp A: 29 %, Subtyp C: 55 %, Subtyp D: 15 %, Subtyp G: 1 % (s.a. Kapitel 1.2.2.2.2.).

1.3.3. Multi-Region Hybridisation Assay (MHA)

Das Prinzip des MHA beruht darauf, dass an fünf verschiedenen repräsentativen Regionen der proviralen DNA zweimal eine Real-Time-PCR (s. Kapitel 1.3.4.) durchgeführt wird. Die erste PCR findet mit *outer-primers*, die zweite PCR mit *inner-primers* statt: *nested-PCR* (s. Kapitel 1.3.5. und 3.3.2.). Zur HIV-1-Subtypen-Bestimmung werden Hybridisierungssonden (so genannte *probes*, s. Kapitel 3.3.3.2.) eingesetzt, die innerhalb dieser Regionen an bestimmten Stellen hybridisieren. Diese *probes* sind mit fluoreszierenden Farbstoffen markiert, womit eine subtypen-spezifische Detektion erfolgen kann (s. Kapitel 3.3.3.3.).

Im Vergleich zu bisherigen Verfahren – wie HMA, RFLP und Sequenzierung (s. Kapitel 1.3.2.) – erlaubt diese Methode bei schneller und kostengünstiger Durchführung eine relativ genaue Analyse. An einem Testpanel von 45 Proben aus Ostafrika (Uganda, Kenia, Tansania), deren gesamtes Genom zuvor sequenziert worden war, konnte eine Sensitivität von 86 % und eine Spezifität von 98 % ermittelt werden [54]. Der bisher nur für Ostafrika konzipierte Test (Subtypen A, C, D) wurde mittlerweile für Proben aus Südamerika [44] und Südostasien weiterentwickelt und soll später auch in Deutschland zur Verfügung stehen. Zusätzlich zur einfachen Subtypen-Bestimmung können mit diesem Test auch HIV-Mehrfachinfektionen mit großer Sensitivität nachgewiesen werden [54] (s. Kapitel 5.3.2.).

1.3.4. Real-Time-PCR

Grundsätzlich gibt es zwei unterschiedliche Methoden, die bei der PCR amplifizierte DNA nachweisen. Die Detektion kann *nach* oder auch *während* dieser PCR erfolgen. Bei der “klassischen PCR” mit Endpunktmessung wird nach der Amplifizierung eine Gelelektrophorese (meist Agarose-Gel oder Polyacrylamid-Gel) durchgeführt. Die DNA kann durch UV-Licht sichtbar gemacht werden.

Die Detektion kann ebenfalls mittels markierter Hybridisierungssonden (s. Kapitel 3.3.3.2.) erfolgen. Hierbei handelt es sich meist um kurze (ca. 15 bis 30 Basen lange) DNA-Sequenzen, die spezifisch an bestimmte Regionen des zu untersuchenden DNA-Stranges hybridisieren. Sie können enzymatisch, radioaktiv oder mit fluoreszierenden Substanzen markiert sein. Die bei der Real-Time-PCR (“Echtzeit-PCR”) verwendeten Hybridisierungssonden (s. Kapitel 1.3.5.) sind ausschließlich mit fluoreszierenden Substanzen markiert. Die Detektion der Fluoreszenz kann also bereits während der Amplifizierung erfolgen.

Im Jahr 1992 wurden die Grundlagen für die heute angewandte Real-Time-PCR durch R. Higuchi gelegt [45]. Hierbei wurden die PCR-Maschinen mit UV-Lampen und CCD-Kameras (*charge-coupled detector*) ausgestattet und der zu amplifizierenden DNA wurde Ethidiumbromid (EtBr) hinzugegeben. EtBr fluoresziert, wenn es in eine doppelsträngige DNA eingebaut ist und durch UV-Licht angeregt wird. Die Fluoreszenz konnte gemessen und die Konzentration der zu bestimmenden DNA noch während der PCR errechnet werden [46].

1.3.5. Hybridisierungssonden der Real-Time-PCR

Die bei der Real-Time-PCR verwendeten Hybridisierungssonden (*probes*) beruhen auf dem Prinzip des *Fluoreszenz Resonanz Energie Transfers* (FRET). Hierbei wird der ungefähre Abstand von zwei Fluoreszenzfarbstoffen (Chromophore) gemessen (*molecular ruler*). Die Hybridisierungssonden sind Oligonukleotide mit einer Länge von ca. 15 bis 30 Basen, die an beiden Enden je ein Fluorophor tragen. Das eine fluoreszierende Element ist der Donor (*reporter*), das andere sein “Unterdrücker” oder Akzeptor (*quencher*). Der Donor (Fluorescein oder Tetramethylrhodamin) sendet keine oder nur schwache Signale, wenn er sich in der Nähe des Akzeptors (Dabcyl, Methylorange, Tetramethylrhodamin, u.a.) befindet.

Die beiden Fluoreszenzfarbstoffe geben Licht ab, wobei die Frequenz des vom Akzeptor ausgestrahlten Lichtes größer bzw. seine Wellenlänge (ca. 350 nm) kürzer ist als das Licht des Donors mit einer Wellenlänge von ca. 500 nm. Es wird sozusagen vom energiereicheren Licht des Akzeptors unterdrückt oder “gequentscht”. Je geringer der Abstand des Donors zu seinem Akzeptor ist, desto größer ist der FRET und damit die Auslöschung des Lichtes vom Donor. Das zur Detektion gemessene Licht ist die des Donors.

Es gibt mehrere verschiedene FRET-Hybridisierungssonden. Die verbreitetste ist die *TaqMan®-Sonde* oder *TaqMan®-probe*. Diese hybridisiert spezifisch an die DNA-Region, die detektiert werden soll (DNA-Target). Diese DNA-Region wird bei der Real-Time-PCR gleichzeitig amplifiziert. Das heißt, die *probe* lagert sich zwischen den beiden *primers* an das DNA-Target, z.B. die provirale DNA, die innerhalb der zellulären DNA vorliegt. Bei jedem Amplifizierungszyklus hybridisieren demzufolge drei Oligonukleotide: zwei *primers* und eine *probe*.

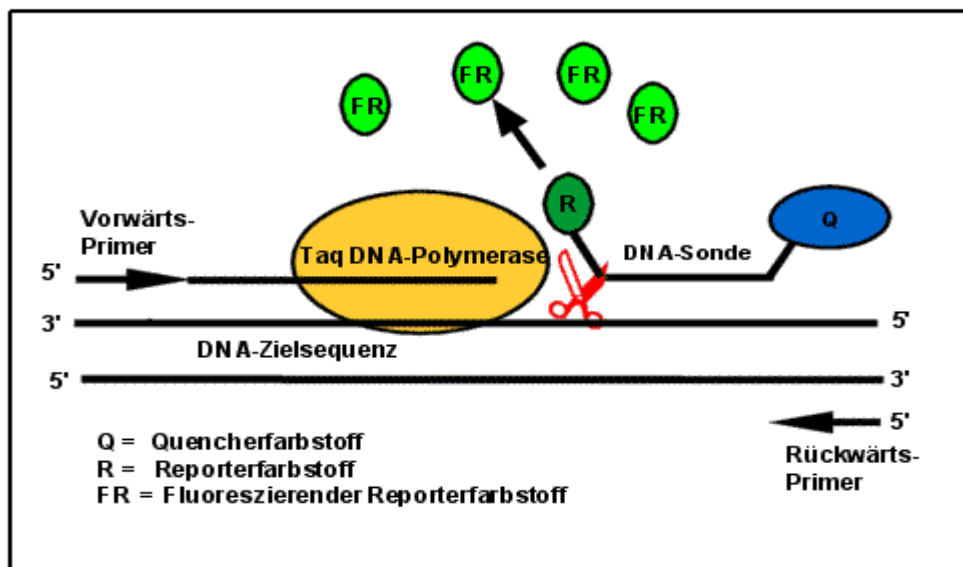


Abbildung 10: Am 5'-Ende der Sonde befindet sich der Donor (mit R abgekürzt, R = reporter), am 3'-Ende der Akzeptor (mit Q abgekürzt, Q = quencher). Schemazeichnung entnommen aus der Website:

http://www.bayern.de/lfu/gentec/genlab/genlab_meth_taqman.htm

Aufgrund der räumlichen Nähe “quentscht” der Akzeptor die Donorfluoreszenzemission. Bei der Transkription schneidet die Taq-Polymerase durch ihre 5'-3'-Exonukleaseaktivität die *probe* in kleine Fragmente, die innerhalb des flüssigen Milieus im Tube “davonschwimmen”.

Der FRET ist unterbrochen und die Donorfluoreszenz wird freigesetzt. Diese wird detektiert, womit gezeigt wird, dass der Zielstrang amplifiziert wurde.

Die Zunahme der Signale wird nach jedem Zyklus gemessen. Sie ist proportional der Konzentration der DNA im Tube. Die eingesetzten *probes* sind für einen bestimmten HIV-1-Subtyp spezifisch, da nur die Sonden zerschnitten werden können, die an das DNA-Target hybridisiert haben.

Der Nachteil des Verfahrens ist die hohe Hintergrund-Detektion, da bei längeren *probes* der Abstand zwischen den beiden Fluoreszenzfarbstoffen bereits so groß ist, dass die Donoren Licht senden noch bevor die Amplifizierung begonnen hat. Längere *probes* gewährleisten allerdings eine größere Spezifität.

Eine Sonderform der *TaqMan*[®]-*probes* sind die so genannten *MGB-probes* (*TaqMan*[®]-*minor-groove-binder* von *Applied Biosystems*), weil diese Sonden einen nicht detektierbaren nicht fluoreszierenden Akzeptor (z.B. Dabcyl, Methylorange) am 3'-Ende (*dark quencher*) besitzen. Mit diesen Sonden können bei der PCR die Emissionen noch genauer gemessen werden. Eine Weiterentwicklung der *TaqMan*[®]-*probes* sind die *Molecular Beacons*. Dies sind molekulare "Leuchtsignale", die die Anwesenheit bestimmter DNA-Sequenzen durch Fluoreszenzsignale markieren, ohne dabei enzymatisch zerstört zu werden. Daneben gibt es noch andere Hybridisierungssonden, wie *Hybridisation Probes* und *Amplifluor*[®]-Sonden, die an dieser Stelle aus Gründen der Vollständigkeit erwähnt werden sollen.

Für meine vorliegende Dissertation habe ich *TaqMan*[®]-*probes* verwendet, die 6-FAM (Fluorescein) als Donor und TAMRA (Tetramethylrhodamin) als Akzeptor besitzen (s. Kapitel 3.3.3.).

2. FRAGESTELLUNG UND ZIELSETZUNG

Die Ergebnisse der vorliegenden Dissertation entstammen den Daten meiner Feldforschung, die ich von August 2000 bis August 2001 in Mbeya Region im Südwesten Tansanias durchgeführt habe. Das **Hauptziel** meiner Querschnittsstudie war, weitgehend valide Daten zur Beantwortung der Kernfrage dieser Arbeit zu erheben. Diese bestand darin, die zu erwartende Assoziation zwischen der Variablen *erhöhtes Risiko hinsichtlich des sexuellen Verhaltens* einerseits und der Variablen *Prävalenz der HIV-1-Subtypen, deren Rekombinationen und Mehrfachinfektionen* andererseits in Mbeya Region nachzuweisen.

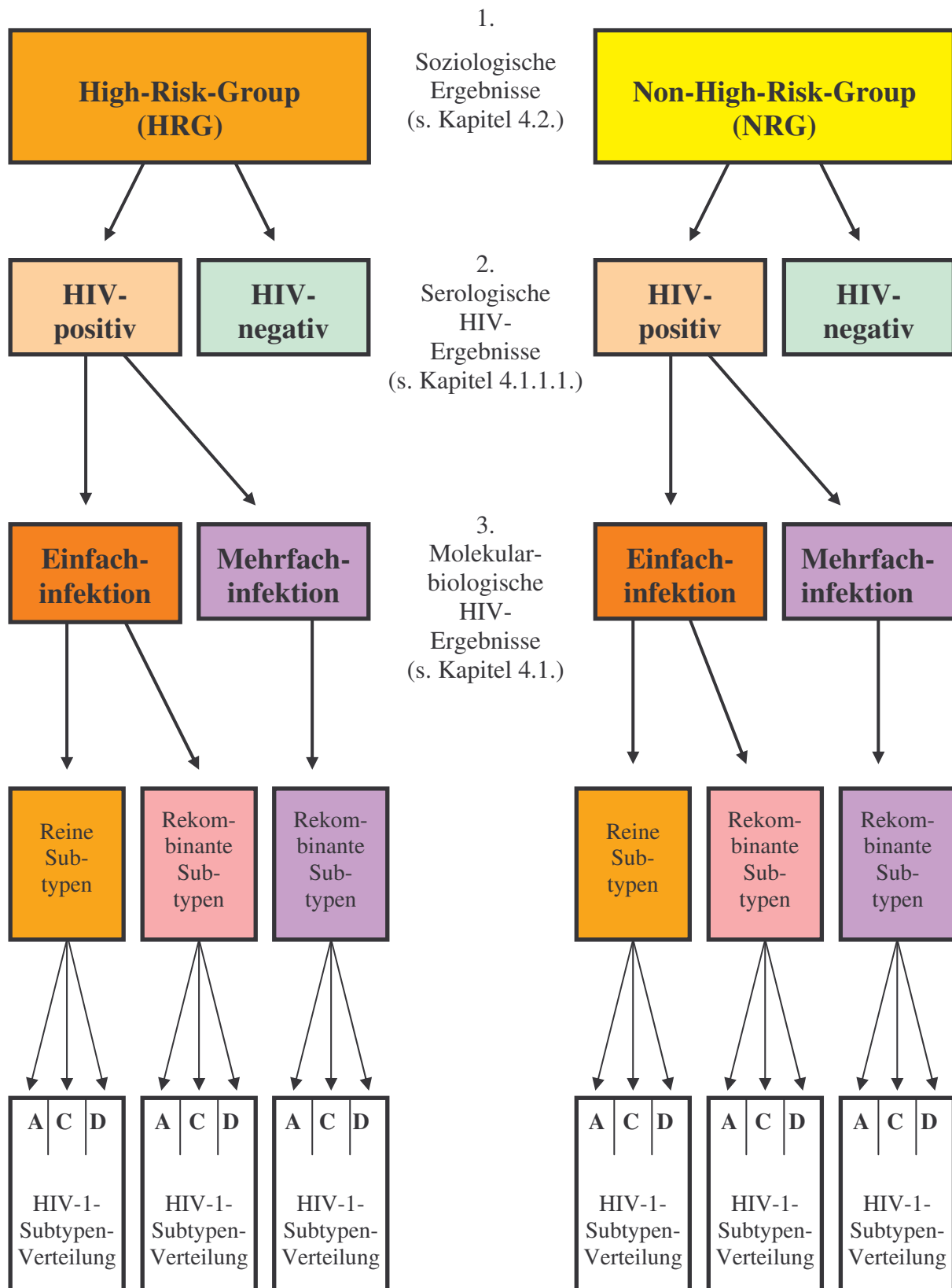
Das **erste Ziel** meiner Studie war die Rekrutierung von Studienteilnehmern aus zwei Studiengruppen, die sich in der Variablen *sexuelles Risikoverhalten (SRV)* deutlich unterschieden. Die lückenlose Rekrutierung und Gewinnung soziologischer Basisdaten sollte über einen längeren Zeitraum erfolgen, damit ein ausreichender Stichprobenumfang erreicht und die Studienteilnehmer für ihre Populationsgruppe weitgehend repräsentativ sein würden.

Die Gewinnung von möglichst vielen PBMC-Proben der serologisch positiv auf HIV getesteten Studienteilnehmer war das **zweite Ziel**. Als erster Koordinator der *Regional HIV-Laboratory of Mbeya* konnte ich alle serologischen HIV-Tests und die PBMC-Isolation in meinem Labor durchführen.

Die HIV-1-Subtypisierung sowie die Detektion der Rekombinationen und Mehrfachinfektionen dieser Proben mittels *Multi-Region Hybridisation Assay (MHA)* war das **dritte Ziel**. Hierbei sollte die Sensitivität dieser Methode bestimmt und verbessert werden.

Die statistische Auswertung und die Diskussion der Ergebnisse in beiden Studiengruppen und deren Vergleich mit den beiden wichtigsten potenziellen Confoundern *Geschlecht* und *Alter* war das **vierte Ziel**. Hierbei sollte versucht werden, basierend auf dem aktuellen wissenschaftlichen Kenntnisstand, die möglichen Entstehungsmodi von HIV-1-Subtypen, Mehrfachinfektionen und Rekombinationen zu verstehen.

Das **fünfte Ziel** war eine kurze kritische Bewertung meiner Querschnittsstudie, die hier in Form einer Diskussion ihrer Stärken und Schwächen hinsichtlich epidemiologischer Aspekte erfolgt und die auf meinen persönlichen Erfahrungen während meines 15-monatigen Aufenthalts (August 2000 bis August 2001 sowie April und Mai 2002) in Mbeya Region basiert.



Übersicht 1: Algorithmus bei der Auswertung von 1.734 Blutproben im Rahmen dieser Dissertation zur Bestimmung der Prävalenz der HIV-1-Subtypen A, C und D und deren Rekombinanten und Mehrfachinfektionen mittels *Multi-Region Hybridisation Assay* (MHA) in zwei Studiengruppen mit unterschiedlichem sexuellen Risikoverhalten (SRV).

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1. Studienbedingungen

3.1.1. Studienort: Mbeya Region

Im Jahr 1961 entließen die Briten ihre Kolonie *Tanganyika Territory* in die Unabhängigkeit. Zwei Jahre später folgten die ihr vorgelagerten Inseln, die zusammengefasst *Islands of Zanzibar* heißen. Am 26. April 1964 kam es zur Vereinigung beider Staaten unter dem Namen *United Republic of Tanzania*. Die offizielle Hauptstadt ist seit 1973 Dodoma. Das eindeutige Zentrum des Landes bildet aber die an der Ostküste gelegene 3-Millionen-Stadt Dar es Salaam.



Abbildung 11: Tansania. Im Südwesten des Landes liegt die Region Mbeya (rot gekennzeichnet). Entnommen aus der Website:

http://www.go.hrw.com/atlas/norm_hm/tanzania.htm

Tansania ist das größte Land Ostafrikas mit einer Fläche von 884.000 km² (zum Vergleich Deutschland: 357.000 km²), mit 34 Millionen Einwohnern und mit Grenzen zu acht Nachbarstaaten: Kenia und Uganda im Norden, Ruanda, Burundi, D. R. Kongo und Sambia im Westen, Malawi und Mosambik im Süden. Die Ostküste des Landes liegt am Indischen Ozean. Von Dar es Salaam ausgehend zieht je ein Highway gen Norden (nach Tanga bzw.

Arusha) bzw. gen Südwesten nach Mbeya, wo er sich in zwei weitere aufzweigt, die von dort nach Sambia (*Copper Belt*, Lusaka) und nach Malawi (Lilongwe) führen. Lusaka und Dar es Salaam sind mit der in den 1970er-Jahren erbauten Eisenbahnlinie verbunden, die auch über Mbeya verläuft. Die Binnenländer Sambia und Malawi sind auf diese Transportwege zur Hafenstadt Dar es Salaam in hohem Maß angewiesen.

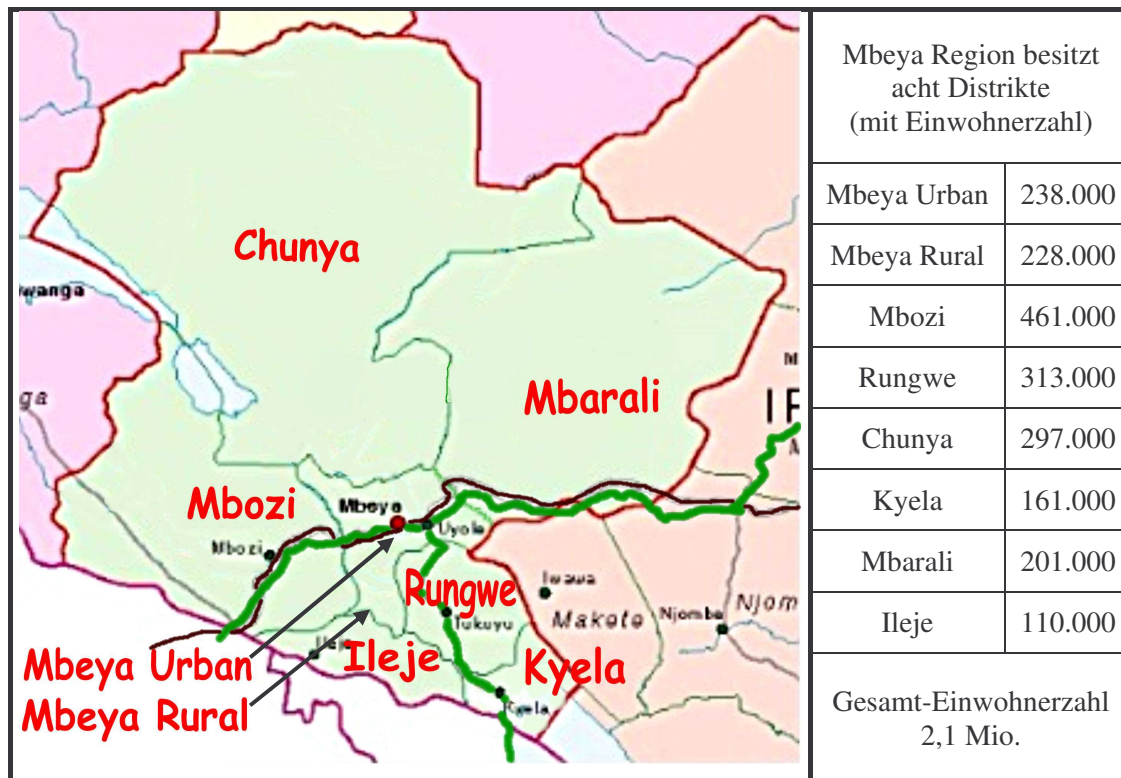


Abbildung 12: Mbeya Region besitzt acht Distrikte. Entnommen aus der Website: <http://www.mshand.geog.gla.ac.uk/ATLAS%20OF%20TANZANIA/SWadmin.gif>

Mbeya Region liegt auf einer Höhe von ca. 400 bis 1.700 m und grenzt an Sambia und Malawi im Südwesten von Tansania. Die Fläche beträgt 63.600 km² (zum Vergleich Bayern: 70.500 km²). Die Bevölkerung von 2,1 Millionen ergibt eine Bevölkerungsdichte von 33 Einwohnern/km². Sie ist sehr ungleichmäßig verteilt, mit höherer Bevölkerungsdichte um die regionale Hauptstadt Mbeya (offiziell: *Mbeya Town*, 238.000 Einwohner) und entlang der zwei Highways, die nach Sambia und nach Malawi ziehen.

3.1.2. HIV Superinfection Study (HISIS)

Die Abteilung für Infektions- und Tropenmedizin der Ludwig-Maximilians-Universität München war in Kooperation mit der Deutschen Gesellschaft für Technische Zusammenarbeit

(GTZ) ab 1987 in Mbeya Region im Rahmen des *Mbeya Regional AIDS Control Programme* (MRCP) tätig. In dieser Zeit fand eine sehr enge und produktive Zusammenarbeit mit den regionalen Stellen von Mbeya und dem *National AIDS Control Programme* (NACP) in Dar es Salaam, das dem *Ministry of Health* untersteht, statt.

Darauf aufbauend wurde in Kooperation mit der *Muhimbili University of Dar es Salaam* im September 2000 die *HIV Superinfection Study* (HISIS), die an über 700 weiblichen Prostituierten in Mbeya Region HIV-1-Mehrfachinfektionen erforscht, begonnen. Die Frauen wurden in der Zeit von März bis August 2000 an 17 verschiedenen so genannten *high transmission areas* (HTA) an ihren Arbeitsplätzen – Bars, *pombe shops*, Restaurants, *guesthouses* und *groceries* – rekrutiert (s. Kapitel 3.1.3.1.). Es wurden nur Frauen im Alter von 18 bis 35 Jahren in die Studie aufgenommen. Die HTA sind regionale Verkehrsknotenpunkte und Ballungszentren mit Märkten, kleinen Läden, Kleinhandwerk und den genannten Einrichtungen der Gastronomie, wo viele weibliche Bedienstete auch der Prostitution nachgehen. Die HTA liegen überwiegend an den Highways (s. Kapitel 3.1.1.).

Nach dem *enrollment* (September bis November 2000) wurden 600 Probandinnen alle drei Monate in den HTA aufgesucht. Hierbei wurden die Frauen interviewt, klinisch betreut und laborchemisch auf HIV und andere STI untersucht. Bei dieser Langzeitstudie, die im Juni 2005 beendet wurde, handelte es sich um eine offene Kohortenstudie. Der Schwerpunkt lag auf der Erforschung immunologischer, virologischer und soziologischer Einflussgrößen auf HIV-1-Super- und -Mehrfachinfektionen.

In den ersten 15 Monaten (von September 2000 bis Dezember 2001) ergab die *follow-up-rate* einen unerwartet guten Wert von 93 %. Die HIV-Prävalenz lag bei den 626 Teilnehmerinnen, deren soziologischen Daten und Blutproben ich in den ersten neun Monaten für meine Studie gewinnen konnte, bei 69,3 %. In den ersten zwölf Monaten konnte ich eine Inzidenz von 14 % ermitteln, obwohl eine intensive Interventionskampagne die Studie begleitete. Mittels *Multi-Region Hybridisation Assay* (MHA, s. Kapitel 3.3.) konnte ich HIV-1-Mehrfachinfektionen nachweisen. In weiteren Untersuchungen sollen die Bedingungen, unter denen eine Superinfektion abläuft, genauer erforscht werden [49].

Die international kooperierende *HIV Superinfection Study* (HISIS) wird gefördert von der Europäischen Kommission, dem INCO-DEV Programm, der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG), dem Walter Reed Army Institute (Rockville, MD, USA), UNAIDS und

der Friedrich-Baur-Stiftung (München). Der Koordinator dieser Studie ist der Tropenmediziner und Infektionsepidemiologe, M. Hölscher, der Mitbetreuer der vorliegenden Dissertation ist.

3.1.3. Studienpopulation

Um die Kernfrage meiner Dissertation zu beantworten (s. Kapitel 2.), benötigte ich zwei Risikogruppen, die sich im Merkmal *sexuelles Risikoverhalten* (SRV) eindeutig unterscheiden. Diese beiden Gruppen werden in der vorliegenden Arbeit **High-Risk-Group** (HRG, s. Kapitel 3.1.3.1.) und **Non-High-Risk-Group** (NRG, s. Kapitel 3.1.3.2.) genannt.

Tabelle 9: Einteilung der beiden Risikogruppen (HRG und NRG), die ihrerseits in je fünf Populationsgruppen gegliedert werden. Während die Studienteilnehmer der HRG im Rahmen von HISIS rekrutiert wurden, wurden die Studien mit der NRG (*antenatal clinic attendees*, ACA, s. Kapitel 3.1.3.2.1., und Blutspender, s. Kapitel 3.1.3.2.2.) im *Mbeya Consultant Hospital* und im *Meta Hospital Mbeya* speziell und ausschließlich für meine Forschungsarbeit durchgeführt.

Risiko- gruppen	Populationsgruppen	Ge- schlecht	Rekrutierung	Anzahl der Studienteilnehmer	
HRG	Guesthouse attendants	F	HISIS	44	626
	Bar workers	F	HISIS	300	
	Pombe sellers	F	HISIS	175	
	Grocery workers	F	HISIS	35	
	Hotel attendants	F	HISIS	72	
NRG	ACA	F	Meta Hospital	351	1.108
	Blutspender	F	Meta Hospital	45	
	Blutspender	M	Meta Hospital	239	
	Blutspender	F	Consultant Hospital	79	
	Blutspender	M	Consultant Hospital	394	
Total		F/M	-	1.734	
Total Frauen		F	-	1.101	
Total Männer		M	-	633	

3.1.3.1. High-Risk-Group (HRG)

Frauen, die sich prostituieren, unterliegen zweifelsfrei einem höheren Risiko, sich mit HIV zu infizieren. In verschiedenen Studien in Tansania und in anderen Ländern Afrikas südlich der Sahara konnte dies belegt werden. Für die Erforschung von Super- und Mehrfachinfektionen, wie sie z.B. bei HISIS (s. Kapitel 3.1.2.) erfolgt, ist eine Kohorte mit hoher HIV-Prävalenz und HIV-Inzidenz Voraussetzung. Prostituierte stellen eine Hochrisikogruppe dar. Diese wird in der vorliegenden Dissertation als High-Risk-Group (HRG) bezeichnet.

Zur HRG werden Frauen gerechnet, die in Bars, so genannten *pombe shops*, Restaurants, *guesthouses* und *groceries* arbeiten, welche sich in den HTA (*high transmission areas*, s. Kapitel 3.1.2.) befinden. Diese werden vor allem von Reisenden besucht. Es handelt sich hierbei insbesondere um Lastwagenfahrer und Geschäftstreibende, die in den HTA übernachten, um am nächsten Tag weiterzufahren oder um vor Ort ihren Geschäften nachzugehen. In Tansania herrscht Nachtfahrverbot für Lastwagen. Die HTA ziehen viele Mädchen und Frauen an, die auch mit Prostitution ihren Lebensunterhalt bestreiten. Professionelle Prostitution, wie man sie in Europa kennt, gibt es dort kaum. Die meisten Frauen arbeiten als "Gelegenheitsprostituierete", die für etwas Geld oder für kleine Geschenke Sex anbieten.

Für die Dissertation konnte ich soziologische Daten und HIV-Ergebnisse von insgesamt 626 Prostituierten der HRG gewinnen (s. Tabelle 9, Kapitel 3.1.3.). 600 Frauen wurden während des *enrollment* (September bis November 2000) im Rahmen der HISIS (s. Kapitel 3.1.2.) rekrutiert. Während des ersten (Dezember 2000 bis Februar 2001) und zweiten (März bis Mai 2001) *follow up* habe ich weitere 26 Frauen für die Studie zugelassen, da ebenso viele Probandinnen in diesem Zeitraum aus der Studie (wegen Krankheit, Tod oder aus unbekanntem Gründen) ausschieden (offene Kohortenstudie). Ihre soziologischen Daten und ihre HIV-Ergebnisse habe ich ebenfalls in die Datenbank der Dissertation aufgenommen.

Vom 12.09.2000 bis zum 31.05.2001 konnte ich die Blutproben von den 626 Probandinnen der HRG, die an der HISIS teilnahmen, mittels serologischer HIV-Antikörper-Tests untersuchen. 434 dieser Proben waren positiv: HIV-Prävalenz: 69,33 %. Von allen 434 HIV-positiven Proben der HRG konnten mittels Isolation mit *Ficoll*TM (s. Kapitel 3.2.2.) genügend PBMC für die HIV-1-Subtypen-Bestimmung mit der Real-Time-*TaqMan*[®]-PCR (s. Kapitel 1.3.4. und 3.3.3.2.) gewonnen werden. Von allen weiblichen Prostituierten, die in den nach-

folgend beschriebenen Orten arbeiten, konnte ich soziologische Daten erheben (s. Tabelle 9, Kapitel 3.1.3.).

Die Bars liegen vor allem an den Highways und in den Zentren der Städte. In den Bars wird überwiegend Limonade und Bier, aber auch Branntwein verkauft. Für die Dissertation konnte ich soziologische Daten und Blutproben zur HIV-Diagnostik von insgesamt 300 *bar workers* (BA) gewinnen.

Pombe ist im Kiswahili das Wort für Alkohol. Unter *pombe* versteht man ein durch alkoholische Gärung gewonnenes bierähnliches Getränk, das meist aus Mais oder Hirse hauseigen hergestellt wird. Pombe wird vorwiegend in Plastikbechern zu einem Liter für ca. 0,25 € verkauft und stellt auch für dortige Verhältnisse ein preisgünstiges Getränk dar. *Pombe shops* sind sehr einfache Behausungen aus Stein oder Lehm, in denen *pombe* verkauft und getrunken wird. Für die Dissertation konnte ich soziologische Daten und Blutproben zur HIV-Diagnostik von insgesamt 175 *pombe sellers* (PO) gewinnen.

Unter dem englischen Wort *hotel* wird in Tansania in der Regel ein Restaurant verstanden. In der vorliegenden Dissertation wurde der Begriff *hotel attendant*, wie er auch in der HISIS Verwendung findet, beibehalten. Unter *hotel attendants* sind Frauen oder Männer zu verstehen, die in Restaurants bedienen. Dort werden Speisen und meist nicht-alkoholische Getränke angeboten. Für die Dissertation konnte ich soziologische Daten und Blutproben zur HIV-Diagnostik von insgesamt 72 *hotel attendants* (HO) gewinnen.

Guesthouses sind wie Bars vor allem an den Highways und in den Zentren der Städte anzutreffen. Sie sind meist sehr einfach ausgestattet. Es gibt *guesthouses* mit wenigen, sehr einfachen Mehrbettzimmern, aber auch größere, die von Hotels nicht zu unterscheiden sind. Für die Dissertation konnte ich soziologische Daten und Blutproben zur HIV-Diagnostik von insgesamt 44 *guesthouse attendants* (GH) gewinnen.

Unter dem englischen Begriff *grocery* wird in Tansania eine Art Kiosk verstanden, in dem die wichtigsten Lebensmittel sowie Limonade und Bier verkauft werden. Meist ist der Verkaufsraum sehr einfach und klein, sodass nur wenige Verkäufer Platz finden. Für die Dissertation konnte ich soziologische Daten und Blutproben zur HIV-Diagnostik von insgesamt 35 *grocery workers* (GR) gewinnen.

3.1.3.2. Non-High-Risk-Group (NRG)

Um die Daten der HRG beurteilen zu können, muss eine Vergleichsgruppe vorliegen, die sich vor allem in einem Verhaltensmerkmal von den Prostituierten der HRG unterscheidet: Sie darf in der überwiegenden Mehrzahl kein hohes Risiko hinsichtlich ihres sexuellen Verhaltens (SRV) besitzen. Diese Vergleichsgruppe wird in der vorliegenden Dissertation als *Non-High-Risk-Group* (NRG) bezeichnet.

Ideal wäre eine NRG, die sich in vielen Merkmalen mit der HRG deckt (z.B. gleiches Geschlecht, ähnliche Altersverteilung, gleicher Wohnort etc.), außer dem Merkmal *sexuelles Risikoverhalten* (Matching). Dazu hätte man in diesem Fall Frauen ähnlichen Alters in den HTA aus der Durchschnittsbevölkerung rekrutieren müssen, was einen unverhältnismäßig hohen Aufwand dargestellt hätte.

Für die Dissertation konnte ich soziologische Daten und HIV-Ergebnisse von insgesamt 1.108 Personen der NRG gewinnen. Davon sind 351 schwangere Frauen, die das *Reproductive Health Unit* (RHU) des *Meta Hospital Mbeya* aufsuchten (*antenatal clinic attendees*, s. Kapitel 3.1.3.2.1.), und 757 Blutspender (s. Kapitel 3.1.3.2.2., s.a. Tabelle 9, Kapitel 3.1.3.).

3.1.3.2.1. Antenatal Clinic Attendees (ACA)

Das *Meta Hospital Mbeya* verfügt über ein *Reproductive Health Unit* (RHU), wo vier Hebammen arbeiten. In dieser Ambulanz werden nur schwangere Frauen untersucht und kontrolliert, bei denen keine klinischen oder laborchemischen Auffälligkeiten entdeckt wurden: *antenatal clinic attendees* (ACA). Andernfalls werden Schwangere direkt im *Meta Hospital Mbeya* von Ärzten betreut und behandelt.

Vom 26.02.2001 bis zum 13.08.2001 konnte ich Blutproben von allen 351 ACA, die in dieser Zeit die RHU des *Meta Hospital Mbeya* aufsuchten, mittels serologischer HIV-Antikörper-Tests untersuchen. 87 dieser Proben waren positiv: HIV-Prävalenz: 24,79 %.

Von 82 der insgesamt 87 HIV-positiven Schwangeren konnten mittels Isolation mit *Ficoll*TM (s. Kapitel 3.2.2.) genügend PBMC für die HIV-1-Subtypen-Bestimmung mit der *Real-Time-TaqMan*[®]-PCR (s. Kapitel 3.3.3.2.) gewonnen werden. Von 324 der 351 ACA konnten

soziologischen Daten erhoben werden. Fehlende Fragebögen: 27. Fehlende PBMC-Proben: fünf.

3.1.3.2.2. Blutspender (BD)

Seit 1990 unterliegen alle Blutkonserven Tansanias der Pflicht zur HIV-Testung im Rahmen des nationalen *sentinel surveillance*, der vom NACP koordiniert wird. Es gibt in Mbeya Region zwölf Krankenhäuser bzw. *health centres*, in denen bei Blutspendern (*blood donors*, BD) Blut abgenommen wird. In Mbeya Town gibt es hierfür zwei Krankenhäuser: das *Mbeya Consultant Hospital* und das ca. 2 km entfernte *Meta Hospital Mbeya*.

Für die Dissertation konnte ich soziologische Daten und HIV-Ergebnisse von insgesamt 757 BD gewinnen. Davon waren 473 Blutproben von BD des *Mbeya Consultant Hospital* und 284 Blutproben von BD des *Meta Hospital Mbeya*.

Vom 11.10.2000 bis zum 13.08.2001 konnte ich die Blutproben von allen 473 BD, die in dieser Zeit das *Mbeya Consultant Hospital* aufsuchten (BD A), mittels serologischer HIV-Antikörper-Tests untersuchen. 51 dieser Proben waren positiv: HIV-Prävalenz: 10,78 %.

Von allen 51 HIV-positiven BD wurden mittels Isolation mit *Ficoll*TM (s. Kapitel 3.2.2.) genügend PBMC für die HIV-1-Subtypen-Bestimmung mit der Real-Time-*TaqMan*[®]-PCR (s. Kapitel 3.3.3.2.) gewonnen. Von 471 BD liegen soziologische Daten in Form von Fragebögen vor. Bei zwei BD konnte kein Interview durchgeführt werden. Fehlende Fragebögen: zwei. Fehlende PBMC-Proben: null.

Vom 24.10.2000 bis zum 13.08.2001 konnte ich die Blutproben von allen 284 BD, die in dieser Zeit das *Meta Hospital Mbeya* aufsuchten (BD B), mittels serologischer HIV-Antikörper-Tests untersuchen. 48 dieser Proben waren positiv: HIV-Prävalenz: 16,90 %.

Von allen 48 HIV-positiven BD wurden mittels Isolation mit *Ficoll*TM (s. Kapitel 3.2.2.) genügend PBMC für die HIV-1-Subtypen-Bestimmung mit der Real-Time-*TaqMan*[®]-PCR (s. Kapitel 3.3.3.2.) gewonnen. Von allen 284 BD konnten für die Dissertation die soziologischen Daten erhoben werden. Fehlende Fragebögen: null. Fehlende PBMC-Proben: null.

3.2. Gewinnung der PBMC-Proben

3.2.1. Blutentnahme

3.2.1.1. Material

Für die Blutentnahme wurden in Mbeya folgende Materialien verwendet:

1. Butterfly, *winged infusion set*. Firma: *Diagonal*
2. *Multiadapter*. Firma: *Diagonal*
3. *S-Monovette, Vacutainer*, gelb: 8,5 ml, Stabilisator: CPDA. Firma: *Sarstedt*
4. *S-Monovette, Vacutainer*, rot: 2,7 ml, Stabilisator: EDTA. Firma: *Sarstedt*

3.2.1.2. Durchführung

Bei allen 1.734 Studienteilnehmern wurde Blut zur serologischen HIV-Diagnostik abgenommen. Bei den Prostituierten (HRG) waren es in der Regel 34 ml Vollblut, das entspricht vier CPDA-S-Monovetten à 8,5 ml. Bei den Prostituierten, die schwanger, anämisch oder leicht erkrankt waren, betrug das entnommene Blutvolumen 25,5 ml (drei CPDA-S-Monovetten).

Bei den Blutspendern des *Mbeya Consultant Hospitals* (BD A) wird zuerst eine Konserve à 500 ml Vollblut abgenommen und danach erfolgt die serologische Diagnostik mittels HIV-Antikörper-Tests. Das bedeutet, dass bei einem positiven HIV-Ergebnis ein sehr großes Volumen an Vollblut der Forschung zur Verfügung steht, das ansonsten nur verworfen würde. Für die Dissertation wurde pro HIV-positivem BD A ein Blutvolumen von 34 bis 60 ml für die PBMC-Isolation mit *Ficoll™* (s. Kapitel 3.2.2.) verwendet. Dieses Vollblut-Volumen enthält selbst bei einem BD, dessen CD4-Lymphozyten-Konzentration bereits unter 200/ μ l liegt, eine für weitere molekularbiologische Verfahren ausreichende Anzahl von ca. 7 bis 12 Mio. CD4-Lymphozyten. Als kritische Grenze wird eine Anzahl von ca. 0,5 Mio. CD4-Lymphozyten angesehen (s. Kapitel 3.2.3.).

Im *Meta Hospital Mbeya* wird bei den Blutspendern (BD B) nur ein Blutvolumen von ca. 2 bis 8 ml, in seltenen Fällen bis maximal 16 ml, abgenommen, das auf HIV und Syphilis getestet wird. Bei einem negativen HIV-Ergebnis erfolgt die Blutspende: Konserve à 500 ml. Bei einem positiven HIV-Testergebnis wird keine weitere Blutentnahme durchgeführt.

Für die Dissertation bedeutete dies, dass bei einem BD B die PMBC-Isolation mit *Ficoll*TM mit weit geringerem Blutvolumen (in der Regel 2 bis 8 ml, bis maximal 16 ml) durchgeführt werden musste, was eine geringere Ausbeute an PBMC (*yield*) zur Folge hatte. Die kritische Grenze von 0,5 Mio. CD4-Lymphozyten würde dann nur bei Personen unterschritten werden, deren CD4-Lymphozyten-Konzentration unter 250/ μ l liegt. Es ist allerdings relativ unwahrscheinlich, dass sich jemand in einem derart fortgeschrittenen HIV-Stadium zur Blutspende zur Verfügung stellen würde.

Im Rahmen des *sentinel surveillance* der ACA, die die RHU aufsuchten, wurden nur sehr geringe Blutvolumina von ca. 1 ml entnommen, da nur 100 μ l Serum für die serologische HIV-Testung (*Enzygnost*[®] *Anti-HIV 1/2 Plus* von *Dade Behring*) notwendig sind. Bei solch geringen Blutvolumina kann bei der PBMC-Isolation eine sehr geringe Ausbeute entstehen und eventuell sogar unter der kritischen Grenze von 0,5 Mio. CD4-Lymphozyten liegen, was eine bedeutend niedrigere Sensitivität der PCR zur Folge hat. Demzufolge wurden vor Beginn meiner Studie von Seiten des *superintendants* des *Mbeya Consultant Hospital* bei den ACA Blutabnahmen bis maximal 5 ml erlaubt. Damit kann eine bedeutend höherer *yield* erzielt werden.

3.2.2. PBMC-Isolation mit *Ficoll*TM

3.2.2.1. Material

Für die PBMC-Isolation mit *Ficoll*TM wurden in Mbeya folgende Materialien verwendet:

Geräte und Hilfsmittel:

- 1.1. Zentrifuge I (freischwingend, für 16 Reaktionsgefäße). Modell: *Universal 16 A*. Firma: *Hettich*
- 1.2. Zentrifuge II (freischwingend, für 32 Reaktionsgefäße). Modell: *GT 6D*. Firma: *Hitachi*
2. Sicherheitswerkbänke (Laminar Flows). Modell: *Microflow Biological Safetycabinet*. Firma: *Nunc*
3. Propangas-Sicherheitsbrenner, Fußtasterbetrieb. Model: *schütt flammy S*. Firma: *Schütt*
4. Reagenzglasschüttler. Modell: *VM 2*. Firma: *Karl Hecht*
5. Pipettierhelfer mit Akkumulator. Modell: *accu-jet*[®]. Firma: *Brand*

Einmalartikel:

1. 3 ml-Pasteur-Pipetten, graduiert, Kunststoff. Firmen: *Micro-Bio-Tec-Brand* und *Copan Innovation*
2. 15 ml-Zentrifugen-Röhrchen, Kunststoff. Firma: *Nunc*
3. 2 ml-, 5 ml-, 10 ml-, 25 ml-Pipetten, Kunststoff. Firma: *Costar*

Chemikalien:

1. PBS (*phosphate buffer saline solution*), pH 7,4. Firma: *Sigma Diagnostics*. Lagerung der Lösung: + 4 °C
2. Dichtegradientensubstanz: *Histopaque®-1077*, Lösung aus Polysaccharose und Natrium-diatrizoat. Firma: *Sigma Diagnostics*. Lagerung: + 4 °C

3.2.2.2. Dichtegradientensubstanzen (*Ficoll™*)

A. Bøyum beschrieb bereits 1968 verschiedene Methoden zur Isolation mononukleärer Zellen (Lymphozyten und Monozyten) aus dem zirkulierenden Blut [10]. Diese Zellen werden im Englischen als *peripheral blood mononuclear cells*, kurz *PBMC* bezeichnet. Bei diesen Methoden wurden Polysaccharid-Mischungen verwendet. Das erste übliche Trennmittel dieser Art hieß *Ficoll-Hypaque®* von der Firma *Pharmacia Biotech*. Das Folgeprodukt *Ficoll™* ist ein aus Polysaccharose und Epichlorhydrin zusammengesetztes, wasserlösliches 400 ku-Polymer. Die Polysaccharose verleiht den Dichtegradientensubstanzen eine definierte Viskosität und führt bei den Erythrozyten zur Geldrollenbildung (Rouleau-Bildung). *Ficoll™* erlaubt die Zellfraktionierung (z.B. Abtrennung lebender PBMC) mittels des Prinzips von Dichtegradienten (unterschiedliches spezifisches Gewicht) durch kurzes, relativ langsames Zentrifugieren.

Um 1970 wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen dem *Ficoll™* zusätzlich Natriummetrizoat hinzugesetzt. Bei gleichbleibendem spezifischen Gewicht und Osmolarität konnte hierbei eine bessere Trennung der PBMC erfolgen [41, 109, 110]. Eine noch bessere Zellfraktionierung gelang durch Zusatz von Natriumdiatrizoat [29, 118].

Das optimale spezifische Gewicht (Verhältnis der Dichte eines Körpers zur Dichte von Wasser bei + 4 °C) von zur PBMC-Isolation verwendeter Dichtegradientensubstanzen beträgt

bei Raumtemperatur 1,077. Damit ist es dichter als Plasma, Thrombozyten, Lymphozyten und Monozyten, aber weniger dicht als Granulozyten und Erythrozyten.

Tabelle 10: Das spezifische Gewicht der Dichtegradientensubstanzen, der Blutzellen und des Plasmas.

Rang	Blutbestandteile / <i>Ficoll</i> TM	Spezifisches Gewicht
1	Plasma	1,025 - 1,029
2	Thrombozyten	1,040
3	Lymphozyten, Monozyten	1,070
4	Dichtegradientensubstanz (<i>Ficoll</i> TM)	1,077
5	Granulozyten	1,087 - 1,092
6	Erythrozyten	1,093 - 1,096

In Mbeya wurde zur Isolation der PBMC als Dichtegradientensubstanz (*Ficoll*TM) das *Histopaque*[®]-1077, eine Lösung aus Polysaccharose und Natriumdiatrizoat, verwendet. Wie der Artikelname bereits angibt, besitzt es ein spezifisches Gewicht von 1,077.

3.2.2.3. Durchführung

Die PBMC-Isolation mit *Ficoll*TM konnte bei 615 der insgesamt 620 HIV-positiven Studienteilnehmer durchgeführt werden. Bei fünf ACA waren nach der serologischen HIV-Antikörper-Testung keine Blutproben mehr zu gewinnen, weshalb bei diesen fünf Probandinnen keine PBMC-Isolation erfolgen konnte.

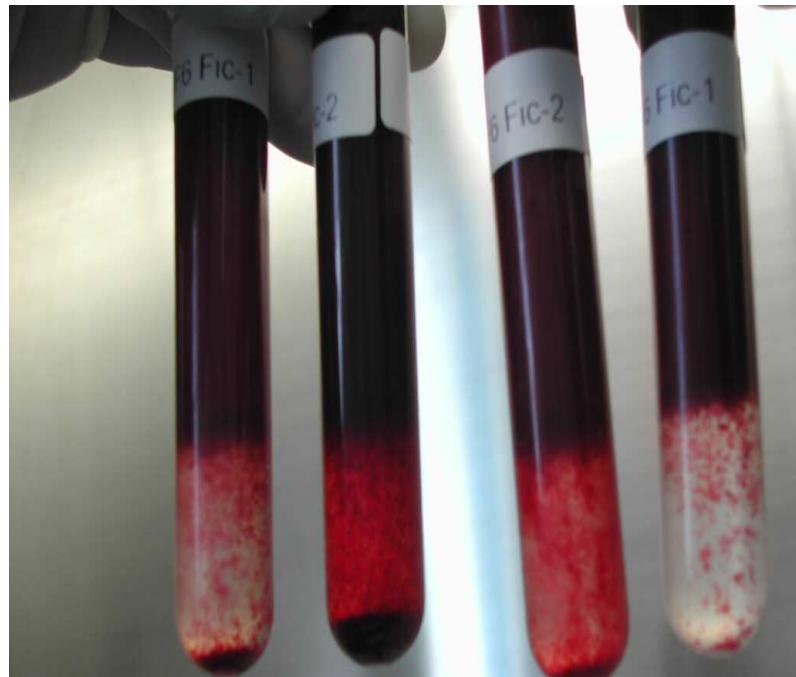


Abbildung 13: Overlay-Technik. Oben befindet sich das mit PBS verdünnte Blut, unten *Ficoll*TM.

Das Vollblut eines jeden HIV-positiven Studienteilnehmers wird zentrifugiert (erste Zentrifugation: 900 xg, 10 Minuten, brake 8). Danach wird der *buffy coat* (mit den PBMC) abpipettiert (ca. 4 ml) und mit etwa dem gleichen Volumen an PBS verdünnt. Dieses Gemisch wird vorsichtig auf das in einem Röhrchen befindliche *Ficoll*TM gegeben (*overlay*-Technik). Wie in Abbildung 13 dargestellt, befindet sich im Röhrchen oben das verdünnte Blut mit den PBMC und unten das *Ficoll*TM. Aufgrund der Schwerkraft sinken die Erythrozyten, die dichter sind als *Ficoll*TM, nach unten. Nach der zweiten Zentrifugation (400 xg, 30 Minuten, brake 0) können im Röhrchen vier Schichten unterschieden werden.

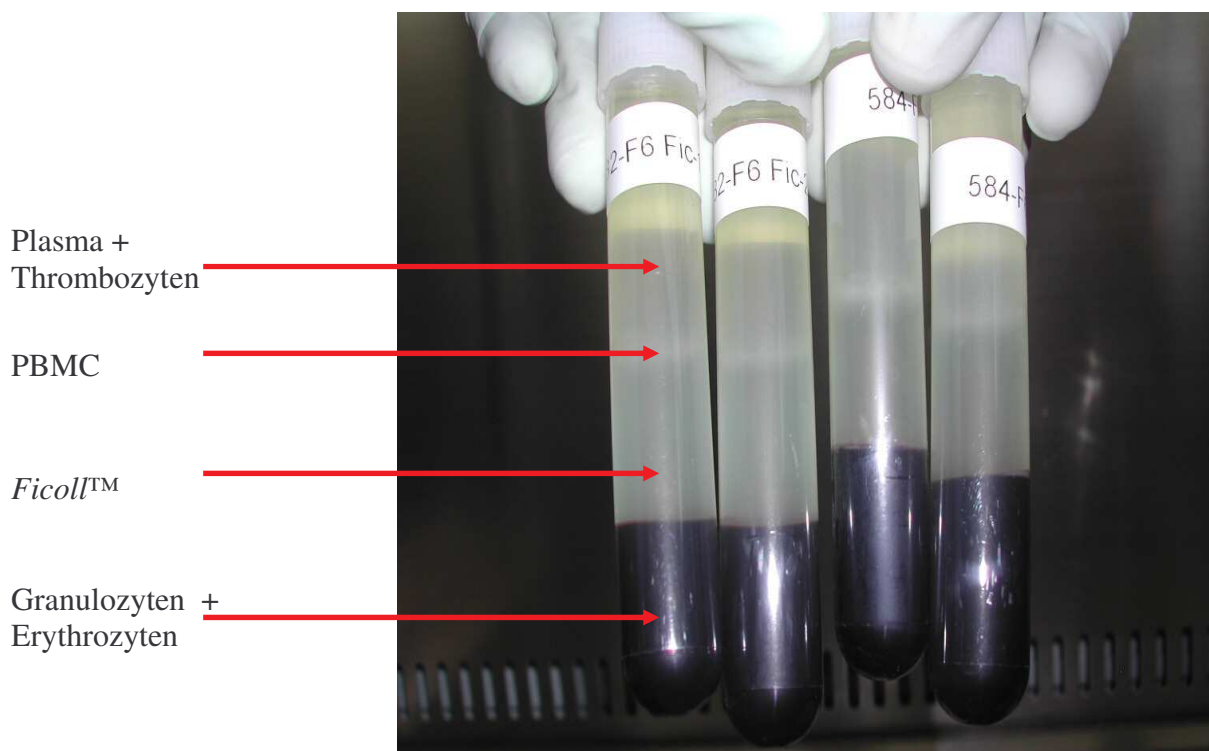


Abbildung 14: Aufgrund des unterschiedlichen spezifischen Gewichts (s. Tabelle 10, Kapitel 3.2.2.2.), können nach der Zentrifugation makroskopisch vier Schichten festgestellt werden.

Da das spezifische Gewicht der PBMC (Lymphozyten, Monozyten) geringer ist als die des *Ficoll*TM (s. Tabelle 10, Kapitel 3.2.2.2.), liegen diese Zellen als dünne milchige Schicht der Dichtegradientensubstanz auf. Da sich die PBMC zwischen dieser Schicht und der darüber liegenden Schicht mit dem Plasma (und den makroskopisch nicht erkennbaren Thrombozyten) befinden, spricht man auch von *Interphase*. Die PBMC werden abpipettiert und in zwei weiteren Zentrifugationen (dritte und vierte: je 300 xg, 15 Minuten, brake: 8) mit jeweils dem doppelten Volumen an PBS gewaschen.

3.2.3. PBMC-Zählung

3.2.3.1. Material

Für die PBMC-Zählung wurden in Mbeya folgende Materialien verwendet:

1. *Trypan-Blue*, 1 g in 100 ml Aqua dest. gelöst. Firma: *Sigma Diagnostics*
2. Zählkammer nach Neubauer, geschliffene Deckgläser. Firma: *Diagonal*
3. Mikroskope. Modell: *C 300*. Firma: *Hund*

3.2.3.2. Durchführung

Nach der zweiten Waschung (s. Kapitel 3.2.2.3.) liegen die PBMC als Pellet im Zentrifugen-Röhrchen vor. Dieses wird mit PBS genau auf 10 ml aufgefüllt. Nach vorsichtigem Schütteln (zur gleichmäßigen Verteilung der PBMC) werden 100 µl entnommen und mit 100 µl *Trypan-Blue* vermischt. Die Einwirkzeit darf 5 Minuten nicht unterschreiten. Nach erneutem Schütteln wird ein Teil des Gemisches entnommen und die PBMC werden mittels der Zählkammer ausgezählt.

Lebendige, intakte Zellen lassen sich mit *Trypan-Blue* nicht anfärben und erscheinen unter dem Mikroskop blass oder durchsichtig. Bei Zellen, deren Membran angebrochen ist, dringt *Trypan-Blue* ins Zellinnere ein und färbt diese blau. Die DNA dieser Zellen entweicht und lagert sich auf der Oberfläche der PBMC ab, wodurch es zur Verklumpung der PBMC kommen kann. Deshalb liegen blau gefärbte PBMC häufig verklumpt vor.

3.2.3.3. Yield und Viability

Die Zellzählung erfolgte bei 10- oder 20-facher Vergrößerung. Wie allgemein üblich, wurden alle vier Eckquadrate ausgezählt, wobei die PBMC, die auf dem oberen und linken Rand liegen, mitgezählt wurden. Zur Bestimmung des *yield* werden sowohl die lebendigen (nicht blau gefärbten) als auch die toten (blau gefärbten) PBMC gezählt. Die *ausgezählte Gesamtzahl der PBMC* (AG) entspricht damit allen Zellen, die sich bei der Zählung in den vier Eckquadraten befanden.

Die PBMC-Zählung erfolgt zur Bestimmung des *yield* und der *viability*. Der *yield* ist die Anzahl der PBMC pro Probe, die durch die oben beschriebene PBMC-Isolation mit *Ficoll*TM (s. Kapitel 3.2.2.) isoliert werden konnten. Er kann aus der AG wie folgt errechnet werden:

$$\text{Yield (pro 1 } \mu\text{l)} = \text{AG} \times 10 \times 0,25 \times 2$$

Die AG wird mit 10 multipliziert, weil der Abstand zwischen dem Deckblatt und der Zählkammer näherungsweise 0,1 mm entspricht. Die Fläche eines Eckquadrates der Zählkammer beträgt 1 mm² (1 mm x 1 mm). Um die Anzahl der PBMC in einem Volumen von 1 mm³ (= 1 μ l) zu erhalten, muss daher mit zehn multipliziert werden. Die AG ist die Gesamtzahl aller ausgezählten Zellen der vier Eckquadrate zusammen. Um die Anzahl eines Eckquadrates, nach der das Volumen von 1 μ l berechnet wird, zu erhalten, wird die AG durch vier geteilt: Multiplikation mit 0,25. Vor der Auszählung wurde die Konzentration der PBMC durch die Zugabe von *Trypan-Blue* (s. Kapitel 3.2.3.2.) halbiert, daher Multiplikation mit 2.

Das Ausgangsvolumen, in dem alle isolierten PBMC einer Probe vorlagen, war 10 ml (s. Kapitel 3.2.3.2.). Um den *yield* für das Ausgangsvolumen von 10 ml zu erhalten, muss mit 10.000 (1 μ l x 10.000 = 10 ml) multipliziert werden. Gesamt-*yield*: Gesamtzahl aller PBMC in einer Blutprobe eines Studienteilnehmers.

$$\text{Gesamt-yield} = \text{AG} \times 10 \times 0,25 \times 2 \times 10.000$$

$$\text{Gesamt-yield} = \text{AG} \times 50.000$$

Bei richtiger Durchführung der PBMC-Isolation liegen ca. 70 bis 98 % aller in der anfänglichen Blutprobe enthaltenen PBMC in der Interphase vor. Durch die Waschvorgänge gehen weitere 15 bis 25 % der PBMC verloren, weswegen man danach von einer Ausbeute von ca. 50 bis 80 % ausgehen kann. Kontaminationen mit anderen Zellen sind nicht sicher auszuschließen. Ca. 1 bis 5 % der im PBMC-Isolat vorhandenen Zellen sind Granulozyten und ca. 3 bis 7 % Erythrozyten.

Die *viability* ist der Anteil der lebenden PBMC an der Gesamtzahl der PBMC (lebende und tote Zellen), die mittels *Trypan-Blue* bei der Zellzählung bestimmt wird (s. Kapitel 3.2.3.2.). Eine *viability* von über 90 % ist anzustreben. Eine hohe *viability* ist wichtig für weiterführende Untersuchungen der Lymphozyten bezüglich der zellulären Immunantwort (Messung der Aktivität der zytotoxischen T-Lymphozyten) und zur Messung des CD4/CD8-Ratios. Diese Tests sind nicht Teil der vorliegenden Dissertation.

3.2.4. Kryopreservation der PBMC

3.2.4.1. Material

Für die Kryopreservation der PBMC, der Lagerung der PBMC-Proben in Mbeya und deren Transport nach München, wurden folgende Materialien verwendet:

Zur Herstellung der *freezing media*:

1. DMSO (Dimethylsulfoxid), 500 ml. Firma: *Sigma Diagnostics*
2. Gentamycin, 50 mg/ml, 10 ml. Firma: *Sigma Diagnostics*. Lagerung: + 4 °C
3. *RPMI 1640 with Glutamine®*. Firma: *Gibco*. Lagerung: + 4 °C
4. Fetales Rinderserum (*fetal bovine serum*, FBS), 500 ml. Firma: *Biochrom*. Lagerung: - 20 °C
5. *Penicillin-Streptomycin-Solution (PenStrep)*, 5.000 Einheiten Penicillin/ml, 5 mg Streptomycin/ml. Firma: *Sigma Diagnostics*. Lagerung: - 20 °C

Verpackung:

1. Kryo-Röhrchen. Modell: *Nunc Cryotubes®*, Innengewinde, 1,8 ml. Firma: *Nunc*
2. *Nunc CryoColorCode®*. Firma: *Nunc*
3. Kryo-Boxen. Modell: *cryo storage boxes®*. Firma: *Nunc*
4. Container mit flüssigem Stickstoff (LN-Container, *liquid nitrogen container*): Modell: *Arpege 170®*, *Arpege 110®*. Firma: *Air Liquide*

3.2.4.2. Durchführung

Zur Kryopreservation der PBMC wird ein so genanntes *freezing media* benötigt. Dieses muss stets täglich frisch zubereitet werden. Darin enthalten sind neben den Antibiotika Gentamycin, Penicillin und Streptomycin, die Nährmedien *RPMI* mit Glutamin und fetales Rinderserum (FBS) sowie Dimethylsulfoxid (DMSO). DMSO führt bei den Zellen zu einer mäßigen Dehydrierung und verhindert beim Einfrieren die Bildung von größeren Eiskristallen. Dies führt dazu, dass die PBMC-Membranen bei tiefen Temperaturen nicht zerstört werden.

Unter ständigem leichtem Schütteln wurden den isolierten PBMC (s. Kapitel 3.2.2.) pro Probe tropfenweise 2,5 ml *freezing media* hinzugegeben. Nach dem Homogenisieren wurden sie in fünf (bei den Proben der Prostituierten) bzw. in zwei (bei den Proben der ACA und der BD)

Kryo-Röhrchen à 1,8 ml aliquotiert. 100 Kryo-Röhrchen wurden in einer Kryo-Box aufbewahrt.

Tabelle 11: Ausschnitt aus der Übersichtstabelle zur Zubereitung der *freezing media*.

No.	Bestandteile	Lage- rungs- temp.	Volu- men- anteil [%]	Auf- tei- lung	für 27 Blut- proben [ml]	für 28 Blut- proben [ml]	für 29 Blut- proben [ml]	u.s.w.
1	DMSO (Dimethyl- sulfoxid)	Raum- -temp.	10	1	6,000	6,222	6,444	
				½	3,000	3,111	3,222	
				⅓	2,000	2,074	2,148	
2	Gentamycin (50 mg/ml)	+ 4 °C	0,25	1	0,150	0,156	0,161	
				½	0,075	0,078	0,081	
				⅓	0,050	0,052	0,054	
3	RPMI 1640® mit Glutamin	+ 4 °C	68,75	1	41,250	42,778	44,306	
				½	20,625	21,389	22,153	
				⅓	13,750	14,260	14,769	
4	FBS (fetal bovine serum)	- 20 °C	20	1	12,000	12,444	12,889	
				½	6,000	6,222	6,444	
				⅓	4,000	4,148	4,296	
5	PenStrep (Penicillin und Streptomycin)	- 20 °C	1	1	0,600	0,622	0,644	
				½	0,300	0,311	0,322	
				⅓	0,200	0,207	0,215	
Total			100	-	60,000	62,222	64,444	

DMSO Gentamycin RPMI 1640® PenStrep FBS

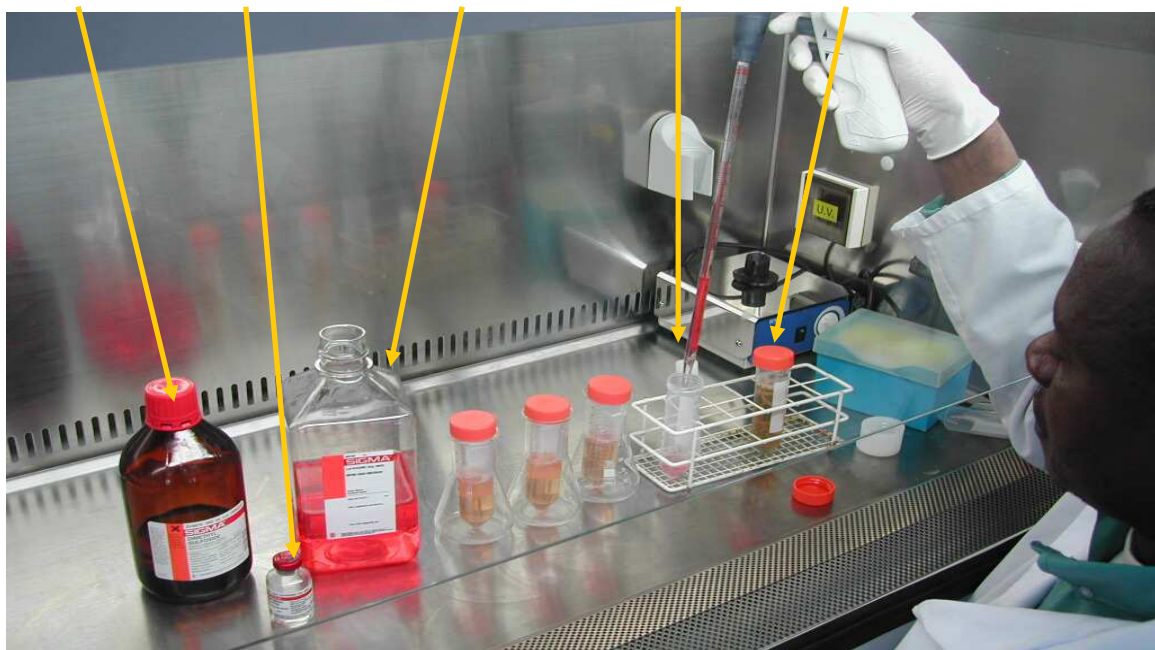


Abbildung 15: Zusammenstellung der *freezing media* in der Sicherheitswerkbank. Regional HIV-Laboratory am Mbeya Consultant Hospital.

Um ein langsames Abkühlen zu garantieren, wurden diese Kryo-Boxen in eine Styroporbox gegeben, die danach für eine Stunde bei + 4 °C im Kühlschrank aufbewahrt wurde. Über Nacht beließ man die gesamte Styroporbox in einer Gefriertruhe bei - 80 °C. Am nächsten Tag erfolgte die Umlagerung der Kryo-Boxen in einen LN-Container (*liquid nitrogen container*) mit 170 Liter Fassungsvermögen.

In Mbeya wurden die PBMC-Proben, die dieser Dissertation zugrunde liegen, zusammen mit jenen der HISIS in flüssigem Stickstoff, der eine konstante Kälte von - 192 °C garantiert, aufbewahrt. Alle drei Monate erfolgte der Transport der Proben in drei LN-Containern (110 Liter), die per Auto von Mbeya Town nach Dar es Salaam und von dort per Luftfracht nach München befördert wurden. In der Abteilung für Infektions- und Tropenmedizin der Ludwig-Maximilians-Universität werden sie in einem weiteren LN-Container (1.000 Liter) aufbewahrt. Die PBMC-Proben in München dienen insbesondere der HIV-1-Subtypisierung mittels MHA.

3.3. Multi-Region Hybridisation Assay (MHA)

3.3.1. Extraktion

3.3.1.1. Material

1. PBS (*phosphate buffer saline solution*), 500 ml, pH 7,4. Firma: *Gibco*. Lagerung der Lösung: + 4 °C
2. Extraktionskit: *High Pure Viral Nucleic Acid Kit*®. Firma: *Roche Molecular Biochemics*
3. Ethanol, absolut, zur Analyse, 500 ml. Firma: *Diagonal*
4. Isopropanol (2-Propanol), zur Analyse, 500 ml. Firma: *Diagonal*

3.3.1.2. Durchführung

Eine DNA-Extraktion aus Zellen kann mit verschiedenen Zelllysemethoden durchgeführt werden. Die häufigsten sind die alkalische Lyse (DNA ist sehr stabil bei hohen pH-Werten) und die enzymatische Lyse mit *Proteinase K*. Für meine Studie habe ich als Extraktionskit *High Pure Viral Nucleic Acid Kit*® verwendet. Er besteht aus Bindepuffer, poly-(A)-carrier RNA, *Proteinase K*, *inhibitor removal buffer*, Waschpuffer und Elutionspuffer.

Nach dem Auftauen der in flüssigem Stickstoff aufbewahrten PBMC-Proben (mit *freezing media*, s. Kapitel 3.2.4.) wurde die Extraktion der zellulären DNA (einschließlich ihrer proviralen DNA) mittels *Proteinase K* durchgeführt. Bei den Proben der BD und der Prostituierten wurde das empfohlene Volumen von 50 µl Elutionspuffer verwendet. Bei den Proben der ACA wurde das doppelte Volumen eingesetzt, da bei dieser Populationsgruppe sehr geringe Blutvolumina von teilweise nur 1 ml abgenommen wurden, womit weniger PBMC isoliert werden konnten (s. Kapitel 3.2.1.2.). Der Einsatz von mehr Elutionspuffer kann aber nur eine gering verbesserte Elution der PBMC aus dem Filter-Tube bewirken. Die extrahierte DNA wurde mittels der *nested-PCR* amplifiziert.

3.3.2. Amplifizierung mittels *nested-PCR*

Die MHA ist eine *nested-PCR*, bei der zwei *outer-primers* (*primer 1* und *2*) für die 1. PCR (mit 35 Vermehrungszyklen) und zwei *inner-primers* (*primer 3* und *4*) für die 2. PCR (mit 40 Vermehrungszyklen) zum Einsatz kommen. Bei der 1. PCR wurde mit *Biometra-PCR*-Geräten amplifiziert, bei der 2. PCR mittels *ABI Prism® 7700* im Sinn einer Real-Time-PCR.

3.3.2.1. Material für 1. PCR

1. Aqua injectabile, 500 ml. Firma: *Ampuwa*
2. MgCl₂ (aus Kit: *Twelve Paq AmpliTaq® Gold DNA Polymerase*, s. Nr. 6.): 25 mM
3. Puffer: *Gold-Buffer* (aus Kit: *Twelve Paq AmpliTaq® Gold DNA Polymerase*, s. Nr. 6.): 500 mM KCl, 150 mM Tris/HCl, pH 8,0
4. dNTP (*nukleotid-tri-phosphate*), 100 mM, 250 µl. Firma: *QBiogene*

Verdünnung:

Im Set (Lagerung - 20 °C): dATP, dCTP, dGTP, dTTP, je 100 mM, Volumen je 250 µl

Stock solution (Lagerung - 20 °C): Zusammenschütten aller dNTP; Konzentration je dNTP 25 mM, Volumen 1.000 µl

Working solution (Lagerung - 20 °C): je Tube Entnahme von 10 µl stock solution + 190 µl Aqua inject. → je Tube: Konzentration je dNTP 1,25 mM, Volumen 200 µl

Im Mastermix: 10 µl working solution zum Mastermix (48 µl) → Konzentration je dNTP 250 µM im Mastermix mit DNA-Probe (50 µl)

5. *Primer 1* und *2* (Sequenzen s. Kapitel 3.6.2.3.2.2.). Firma: *MWG-Biotech*
Verdünnung:
Stock solution (Lagerung - 20 °C): je *primer* unterschiedliches Lösungsvolumen (299 bis 1.234 µl) mit End-Konzentration 100 µM
Working solution (Lagerung - 20 °C): je Tube Entnahme von 100 µl aus der stock solution + 400 µl Aqua inject. → je Tube: Konzentration je *primer* 20 µM, Volumen 500 µl
Im Mastermix: je *primer* 2,5 µl working solution zum Mastermix (48 µl) → Konzentration je *primer* 1 µM im Mastermix mit DNA-Probe (50 µl)
6. Taq-Polymerase: *Twelve Paq AmpliTaq® Gold DNA Polymerase* (12 x 250 units, 5 u/µl) + *Gold Buffer* (s. Nr. 3.) + MgCl₂ (s. Nr. 2.). Firma: *Applied Biosystems*
7. 96-Mikrotiterplatte, Polypropylen. Firma: *Biozym Diagnostic*
8. Mehrkanalpipette, acht Kanäle. Modell: *Impact®*. Firma: *Matrix Technologies*
9. PCR-Geräte: *T-Gradient™*, *UNO II™*. Firma: *Biometra*

3.3.2.2. Durchführung der 1. PCR

Tabelle 12: Für die 1. PCR wurde der Mastermix wie folgt zusammengestellt:

No.	Bestandteile	Volumen [µl]	Konzentration in Total
1	Aqua injectabile	24,5	-
2	MgCl ₂	3,0	1,5 mM
No.	Bestandteile	Volumen [µl]	Konzentration in Total
3	Puffer	5,0	50 mM KCl 15 mM Tris-HCl
4	dNTP	10,0	250 µM
5.1	<i>primer 1</i>	2,5	1,0 µM
5.2	<i>primer 2</i>	2,5	1,0 µM
6	Taq-Polymerase	0,5	2,5 units
Mastermix		48,0	-
7	DNA-Probe* (extrahierte DNA)	2,0*	-
Total		50,0	-

* Um eine Signalverstärkung zu erreichen, wurden bei vielen Proben 4 oder 6 µl aus der extrahierten DNA-Probe entnommen.

Für die PCR wurden 96-Mikrotiterplatten verwendet. In jede der Vertiefungen wurden 48 µl Mastermix pipettiert. Danach wurden 2 µl (bzw. 4 oder 6 µl, s. Tabelle 12) Probe mit extra-hierter DNA hinzugegeben. Von den 96 Vertiefungen dienten sechs als Negativ-Kontrolle (NK). Bei einem PCR-Durchlauf konnte damit die DNA von 90 Teilnehmer-Proben amplifiziert werden. Das diesbezügliche Template sah wie folgt aus:

Tabelle 13: Als Beispiel sei hier das Template mit Proben von 82 ACA und acht BD gezeigt. NK steht für Negativ-Kontrolle.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	ACA 272	ACA 299	ACA 342	ACA 376	ACA 395	ACA 431	ACA 482	ACA 503	ACA 521	ACA 560	ACA 581	BD B 178
B	ACA 271	ACA 333	ACA 343	ACA 377	ACA 401	ACA 433	ACA 485	ACA 506	ACA 522	ACA 564	ACA 583	BD B 180
C	ACA 281	ACA 329	ACA 350	ACA 381	ACA 404	ACA 441	ACA 487	ACA 508	ACA 526	ACA 566	ACA 584	BD A 338
D	ACA 282	NK	ACA 356	ACA 386	ACA 406	NK	ACA 489	ACA 516	ACA 527	NK	ACA 594	BD A 339
E	ACA 306	ACA 326	ACA 365	NK	ACA 408	ACA 444	ACA 490	NK	ACA 529	ACA 570	ACA 596	NK
F	ACA 287	ACA 322	ACA 368	ACA 388	ACA 412	ACA 464	ACA 491	ACA 517	ACA 531	ACA 573	ACA 606	BD B 181
G	ACA 288	ACA 334	ACA 372	ACA 389	ACA 420	ACA 470	ACA 493	ACA 518	ACA 535	ACA 574	ACA 617	BD A 341
H	ACA 289	ACA 338	ACA 374	ACA 393	ACA 427	ACA 475	ACA 495	ACA 519	ACA 536	ACA 580	BD B 175	BD A 355

Tabelle 14: Bei jeder dieser fünf DNA-Abschnitte wurde mithilfe von zwei entsprechenden *outer-primers* (*primer 1* und *primer 2*) die 1. PCR durchgeführt (s. Kapitel 4.1.1.2.). Das bedeutet, dass von jeder Probe mit extrahierter DNA (s. Kapitel 3.3.1.2.) fünf PCR durchgeführt werden, für jeden DNA-Abschnitt mit einem spezifischen *outer-primer*-Paar.

No.	<i>outer-primer</i> -Paar
1	GAG 1 + GAG 2
2	POL 1 + POL 2
3	VPU 1 + VPU 2
4	ENV 1 + ENV 2
5	GP 1 + GP 2

Tabelle 15: Der Thermozyklus der PCR-Geräte (*T-Gradient™*, *UNO II™*, Firma: *Biometra*) für die 1. PCR war wie folgt:

No.	Temperatur [°C]	Zeit [Min.]	Zyklen
1	95	10:00	-
2	Denaturierung: 95	0:15	35 Zyklen
3	Annealing: 52	0:45	
4	Extension: 72	1:30	
5	72	10:00	-
6	20	-	-
Total		107:30	

3.3.2.3. Material für 2. PCR

1. Aqua injectabile, 500 ml. Firma: *Ampuwa*
2. Mastermix: *TaqMan® Universal PCR Master Mix No AmpErase®*. Firma: *Applied Biosystems*
 - 2.1. MgCl₂ (Konzentration wird von *Applied Biosystems* nicht veröffentlicht)
 - 2.2. Puffer: KCl, 150 mM Tris/HCl, pH 8,0. (Konzentration wird von *Applied Biosystems* nicht veröffentlicht)
 - 2.3. dNTP + dUTP (Konzentration wird von *Applied Biosystems* nicht veröffentlicht)
 - 2.4. Taq-Polymerase: *AmpliTaq® Gold DNA Polymerase* (Konzentration wird von *Applied Biosystems* nicht veröffentlicht)
3. *Primer 3* und *4* (Sequenzen s. Kapitel 3.3.3.2.). Firma: *MWG-Biotech*
Verdünnung:
Stock solution (Lagerung - 20 °C): je *primer* unterschiedliches Lösungsvolumen (299 bis 1.234 µl) mit End-Konzentration 100 µM

Working solution I, für alle *primer 3* und *4*, außer GP 4.1 und 4.2 (Lagerung - 20 °C): je Tube Entnahme von 100 µl aus der stock solution + 400 µl Aqua inject. → je Tube: Konzentration je *primer* 20 µM, Volumen 500 µl

Working solution II, für *primer 4.1.* und *4.2* (Lagerung - 20 °C): je Tube Entnahme von je 66,67 µl 4.1. und 4.2 aus der stock solution + 366,67 µl Aqua inject. → je Tube: Konzentration je *primer* 13,33 µM, Volumen 500 µl

Im Mastermix I für alle *primer 3* und *4*, außer 4.1. und 4.2.: je *primer* 0,5 µl working solution zum Mastermix (24 µl) → Konzentration je *primer* 0,4 µM im Mastermix mit DN-Probe (25 µl)

Im Mastermix II für *primer GP 4.1* und *4.2*: je *primer* 0,5 µl working solution zum Mastermix (24 µl) → Konzentration je *primer* 0,267 µM im Mastermix mit DNA-Probe (25 µl)

4. Hybridisierungssonden (*probes*, s. Kapitel 3.3.3.2.): working solution 5 µM. Firma: *Applied Biosystems*
5. 96-Mikrotiterplatte, Polypropylen. Firma: *Biozym Diagnostic*
6. Mehrkanalpipette, acht Kanäle. Modell: *Impact®*. Firma: *Matrix Technologies*
7. Thermocycler. Modell: *Sequence Detection Systems ABI Prism® 7700*. Firma: *Applied Biosystems*

3.3.2.4. Durchführung der 2. PCR

Tabelle 16: Für die 2. PCR wurde der Mastermix wie folgt zusammengestellt (Zeichenerklärung s. Folgende Seite):

No.	Bestandteile	Volumen [µl]	Konzentration in Total
1	Aqua injectabile	9,5	-
2.1	MgCl ₂ [#]	12,5	◦
2.2	Puffer [#]		◦
2.3	dNTP [#]		◦
2.4	Taq-Polymerase [#]		◦
3.1	<i>primer 3</i> ⁺	0,5	0,4 µM (0,267 µM ⁺)
3.2	<i>primer 4</i> ⁺	0,5	0,4 µM (0,267 µM ⁺)
4	<i>probe</i> (s. Kapitel 3.3.3.2.)	1,0	200 nM
Mastermix		24,0	-
5	DNA-Probe* (extrahierte DNA)	1,0*	-
Total		25,0	-

- # Diese Bestandteile waren im *TaqMan® Universal PCR Master Mix No AmpErase®* bereits enthalten
- Konzentration wird von *Applied Biosystems* nicht veröffentlicht
- * Um eine Signalverstärkung hervorzurufen, wurden bei vielen Proben 6 µl aus der Probe nach der 1. PCR entnommen
- + Bei *primer GP 4.1* und *4.2* (s. Kapitel 3.3.3.2.)

Tabelle 17: Für die 2. PCR wird das jeweilige *inner-primer*-Paar (*primer 3* und *primer 4*) für eine bestimmte der insgesamt fünf DNA-Regionen (s. Kapitel 4.1.1.2.) verwendet. Hierbei wurden von jeder Teilnehmer-Probe nach der 1. PCR weitere 15 PCR durchgeführt. Mit fünf verschiedenen *inner-primer*-Paaren und drei verschiedenen *probes* (s. Kapitel 3.3.3.2.), die jeweils für die HIV-1-Subtypen A, C und D spezifisch sind.

No.	<i>inner-primer</i> -Paar	<i>probe</i>
1	GAG 3 + GAG 4	GAGsAp
2	GAG 3 + GAG 4	GAGsCp
3	GAG 3 + GAG 4	GAGsDp
4	POL 3 + POL 4	POLsAp
5	POL 3 + POL 4	POLsCp
6	POL 3 + POL 4	POLsDp
7	VPU 3 + VPU 4	VPUsAp
8	VPU 3 + VPU 4	VPUsCp
9	VPU 3 + VPU 4	VPUsDp
10	ENV 3 + ENV 4	ENVsAp
11	ENV 3 + ENV 4	ENVsCp
12	ENV 3 + ENV 4	ENVsDp
13	GP 3 + GP 4.1/4.2	GPsAp
14	GP 3 + GP 4.1/4.2	GPsCp
15	GP 3 + GP 4.1/4.2	GPsDp

Nach der 1. PCR weisen die amplifizierte DNA-Abschnitte eine Länge von 412 bis 633 Basen auf. Nach der 2. PCR sind diese Abschnitte entsprechend kürzer: 148 bis 458 Basen (s. Abbildung 17, Kapitel 3.3.3.2.). Das Template bleibt für die 2. PCR unverändert (s. Tabelle 13, Kapitel 3.3.2.2.).

Tabelle 18: Der Thermozyklus des Thermocyclers für die 2. PCR war wie folgt:

No.	Temperatur [°C]	Zeit [Min.]	Zyklen
1	50	2:00	-
2	95	10:00	-
3	Denaturierung: 95	0:15	40 Zyklen
4	Annealing: 55	1:00	
5	Extension: 60	1:00	
Total		102:00	

3.3.3. Detektion

3.3.3.1. Material

1. Hybridisierungssonden (*probes*). Firma: *Applied Biosystems*
2. Thermocycler. Modell: *Sequence Detection Systems ABI Prism® 7700*. Firma: *Applied Biosystems*

3.3.3.2. HIV-1-Subtypen-Bestimmung mittels *TaqMan®*-PCR

Für meine Studie kam der MHA (s. Kapitel 1.3.3.) zum Einsatz, bei dem fünf verschiedene *probes* (s. Kapitel 1.3.5.) verwendet wurden. Ihre jeweiligen *probe*-Hybridisierungsstellen (*hybridisation sites*, in dieser Arbeit als HS abgekürzt) werden bezüglich ihrer Lokalisation in den jeweiligen ORF (s. Kapitel 1.1.3.1.1.) wie folgt benannt: **GAG**, **POL**, **VPU**, **ENV** und **GP** (s. Kapitel 4.1.1.2).

Die **GAG**-HS befindet sich auf dem *gag*-Gen p24. Die **POL**-HS liegt sowohl im *gag*-Gen p6 als auch im Anfangsteil des ORF *pol*. Hierbei handelt es sich um überlappende DNA-Abschnitte (*overlapping*). Auch die **VPU**-HS ist auf einem überlappenden DNA-Abschnitt lokalisiert: im ORF *vpu* und im Anfangsteil des *env*-Gens gp 120. Im *env*-Gen gp41 sind zwei HS. Sie werden **ENV** und **GP** genannt. Diese Bezeichnung kann irreführend sein, da sowohl die ENV-HS als auch die GP-HS im ORF *env* liegen, aber nur die erste HS wird ENV genannt. Beide HS liegen auch im gleichen *env*-Gen gp41, aber nur die zweite HS wird als GP bezeichnet. Bei der GP-HS liegt ebenfalls ein *overlapping* mit *rev* vor (s. Abbildung 1, Kapitel 1.1.3.1.1.).

Für die vorliegende Dissertation habe ich *TaqMan®-probes* verwendet, die am 5'-Ende 6-FAM (Fluorescein) als Reporter und am 3'-Ende TAMRA (Tetramethylrhodamin) als Akzeptor besitzen (s. Kapitel 1.3.5.). Sie wurden von *Applied Biosystems* hergestellt und haben eine Länge von 18 bis 27 Basen. Die Schmelztemperaturen betragen 60,79 bis 66,57 °C (s. Abbildung 17).

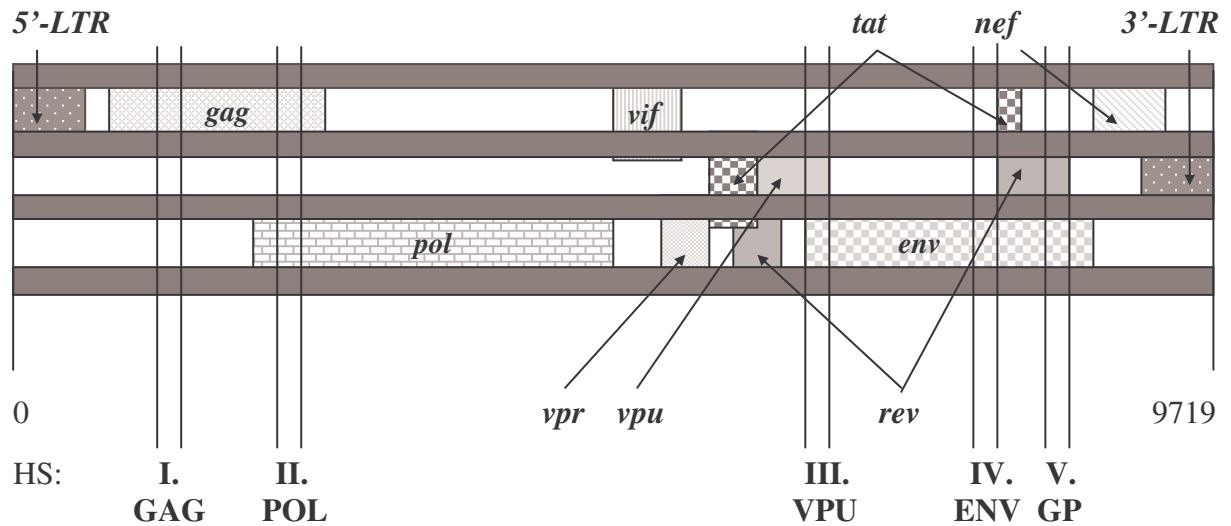
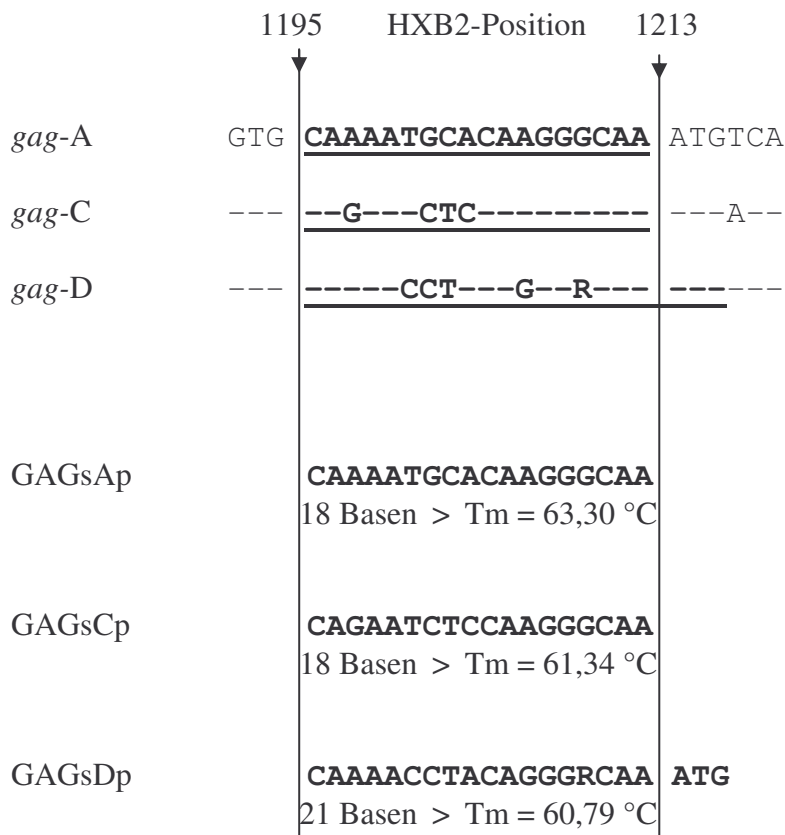


Abbildung 16: Die dargestellten Positionen der HS wurden am Referenzvirus *HIV-1 HXB2* beschrieben (s. Kapitel 1.1.3.1.1.).

Die *probes* besitzen eine spezifische DNA-Sequenz, die es ihnen erlaubt, an bestimmte Stellen zu hybridisieren: *probe*-Hybridisierungsstellen, *hybridisation sites*, HS. Da fünf verschiedene Regionen des HIV-1 amplifiziert wurden, die sich bei den drei zu untersuchenden HIV-1-Subtypen A, C und D unterscheiden, sind für die 2. PCR insgesamt 15 (5 x 3) *probes* mit der jeweiligen DNA-Sequenz vonnöten.

Abbildung 17 (auf den Seiten 69 bis 73): Alle *probe*-Hybridisierungsstellen (HS) mit den jeweiligen *probes* und *primers*. Die Sequenz jeder HS ist bei den HIV-1-Subtypen A, C und D unterstrichen dargestellt. An diese hybridisieren die spezifischen *probes*. Die Richtung der Hybridisierung wird bei den *probes* und *primers* mit den Zeichen < und > angezeigt. Die T_m (*melting temperature*) bei den *probes* und *primers* wurde angegeben.

I. HS: GAG-hybridisation site; im gag-Gen p24:

outer primers: MHGAG1 **AGTATGGGCAAGCAGGGA**
18 Basen > T_m = 62,45 °C

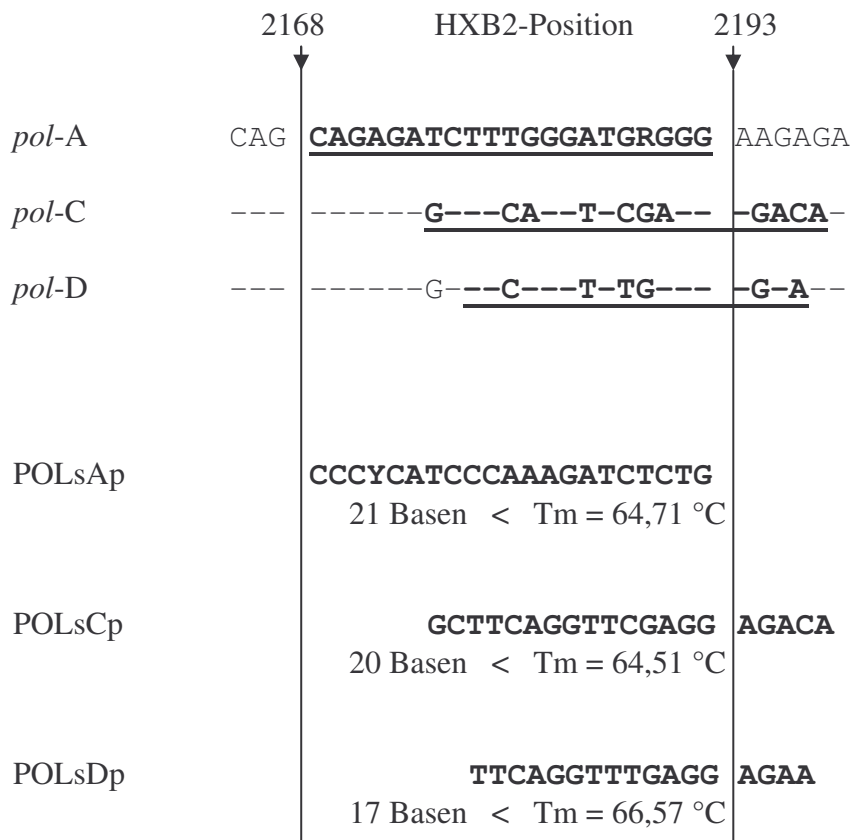
MHGAG2 **CTGCAGCYTCNTCATTGATGG**
21 Basen < T_m = 64,70 °C

Länge des amplifizierten DNA-Abschnitts nach der 1. PCR: **545 bp**

inner primers: MHGAG3 **GGTCAGYCAAAATTAYCCTATAG**
23 Basen > T_m = 55,15 °C

MHGAG4 **GGCTCCTTCTGATAATGCTG**
20 Basen < T_m = 61,32 °C

Länge des amplifizierten DNA-Abschnitts nach der 2. PCR: **148 bp**

II. HS: POL-hybridisation site; im gag-Gen p6 und im ORF pol:

outer primers: MHPOL1 **TTCAACTGTGGCAARGAAGG**
20 Basen > T_m = 63,65 °C

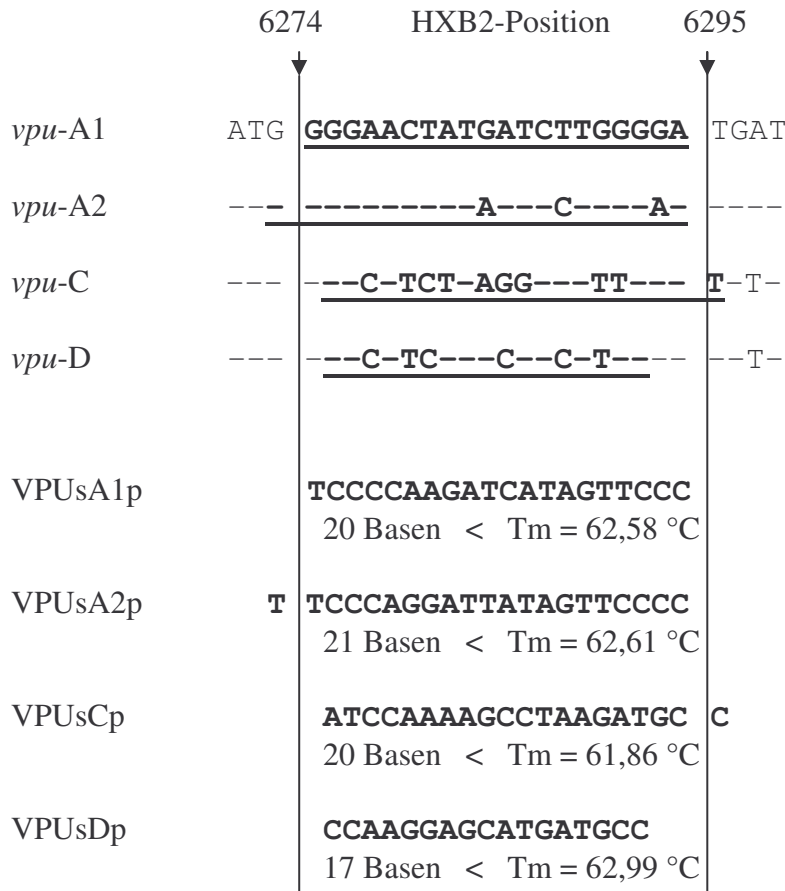
MHPOL2 **ACTGTATCATCTGCTCCTGT**
20 Basen < T_m = 56,15 °C

Länge des amplifizierten DNA-Abschnitts nach der 1. PCR: **465 bp**

inner primers: MHPOL3 **TTTAGGGAAAATTTGGCCTTC**
21 Basen > T_m = 63,33 °C

MHPOL4 **TGCCAAAGAGTGATTTGAGG**
20 Basen < T_m = 62,76 °C

Länge des amplifizierten DNA-Abschnitts nach der 2. PCR: **210 bp**

III. HS: VPU-hybridisation site; im ORF *vpu* und im *env*-Gen gp120:

Im ORF *vpu* liegen beim HIV-1-Subtyp A häufiger Sequenz-Variationen vor. Die zwei häufigsten sind oben dargestellt. Um eine höhere Rate an *probe*-Hybridisierungen zu erzielen, wurden diesbezüglich zwei *probes* konstruiert. Damit wird eine bessere Sensitivität erreicht.

outer primers: MHVPU1 **CCTATGGCAGGAAGAAGCGG**
20 Basen > T_m = 67,80 °C

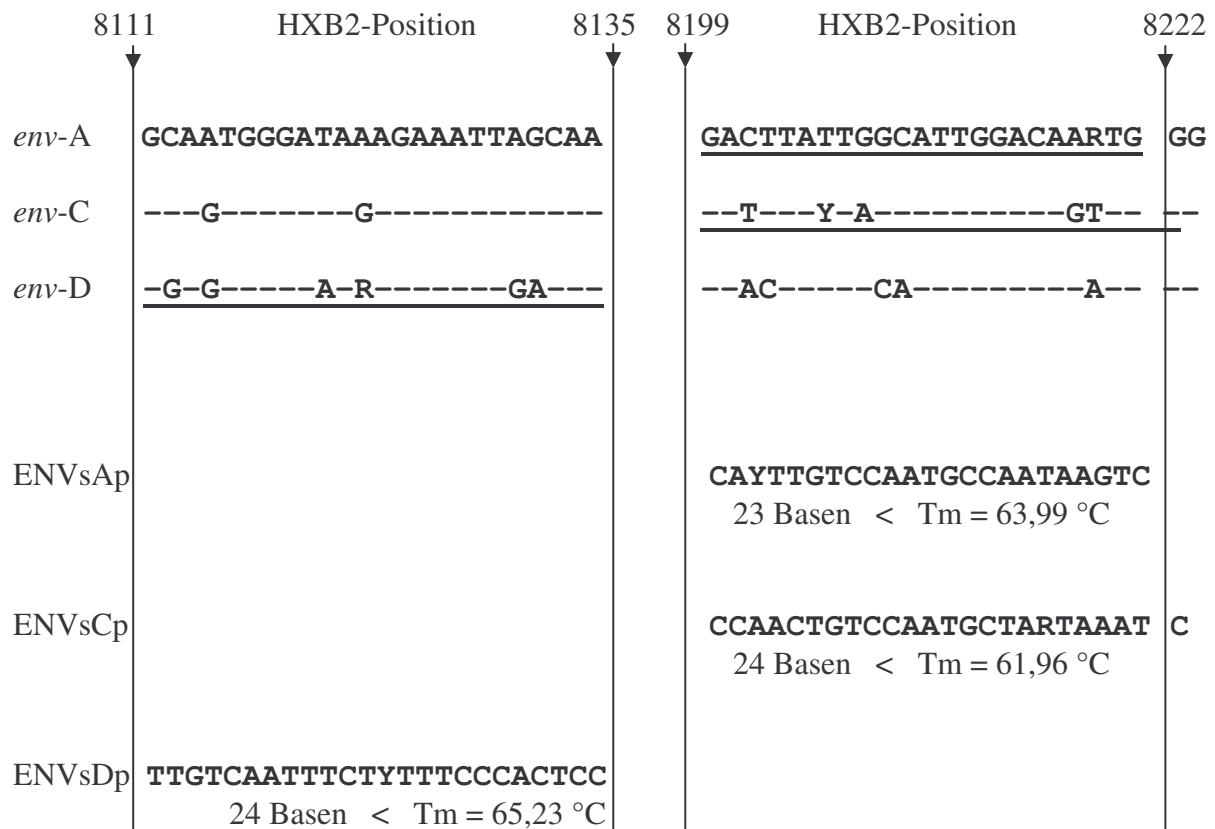
MHVPU2 **CTTGTGGGTTGGGGTCTG**
18 Basen < T_m = 64,20 °C

Länge des amplifizierten DNA-Abschnitts nach der 1. PCR: **563 bp**

inner primers: MHVPU3 **GCAGAAGAYAGTGGCAATGAG**
21 Basen > T_m = 61,40 °C

MHVPU4 **GGTACACAGGCATGTGTRGCC**
22 Basen < T_m = 70,60 °C

Länge des amplifizierten DNA-Abschnitts nach der 2. PCR: **240 bp**

IV. HS: ENV-hybridisation site; im env-Gen gp41:

outer primers: MHENV1 **ACGCTGACGGTACAGGCCAG**
20 Basen > T_m = 68,32 °C

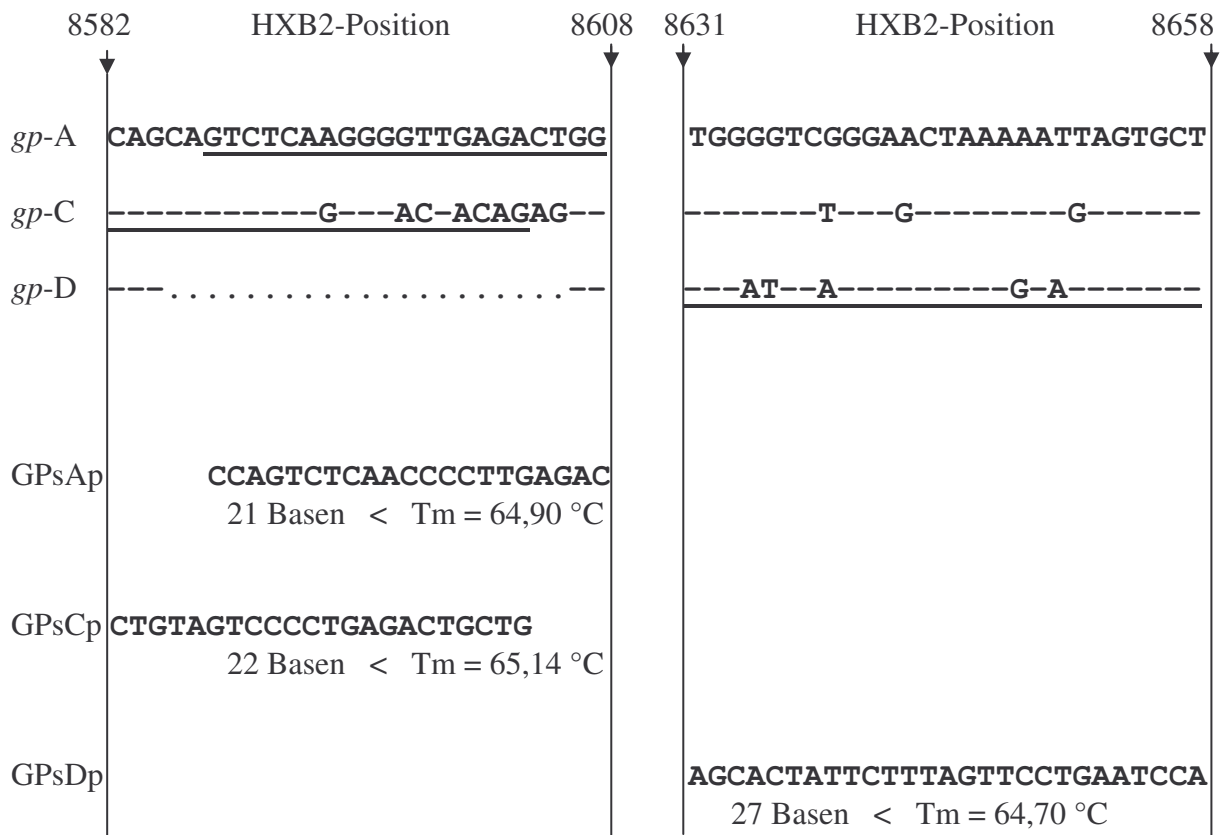
MHENV2 **CTTGCTCTCCACCTTCTTCTTC**
22 Basen < T_m = 63,21 °C

Länge des amplifizierten DNA-Abschnitts nach der 1. PCR: **633 bp**

inner primers: MHENV3 **GGATCAACAGCTCCTAGGRATTTGG**
25 Basen > T_m = 66,41 °C

MHENV4 **GGTGARTATCCCTGCCTAACTCTA**
24 Basen < T_m = 63,10 °C

Länge des amplifizierten DNA-Abschnitts nach der 2. PCR: **458 bp**

V. HS: GP-hybridisation site; im env-Gen gp41 und im ORF rev:

outer primers: MHGP1 **GAAGAAGAAGGTGGAGAGC**
19 Basen > Tm = 58,05 °C

MHGP2 **TTCNAAGCCCTGTCTKATTC**
20 Basen > Tm = 55,12 °C

Länge des amplifizierten DNA-Abschnitts nach der 1. PCR: **412 bp**

inner primers: MHGP3 **CCTGTGCCTCTTCTGCTACC**
20 Basen > Tm = 63,87 °C

MHGP4.1 **CAGCCAGCTACTRCTATTGCT**
21 Basen > Tm = 60,20 °C

MHGP4.2 **CCYTCAGCTACTRCTATTGCT**
21 Basen < Tm = 56,94 °C

Länge des amplifizierten DNA-Abschnitts nach der 2. PCR: **210 bp**

3.3.3.3. Detektion mit dem *ABI Prism*® 7700

Mithilfe des *Sequence Detection Systems ABI Prism*® 7700 von der Firma *Applied Biosystems* können quantitative DNA-Analysen während der PCR durchgeführt werden (Real-Time-PCR). Das bedeutet, dass hierbei auf eine anschließende Gelelektrophorese zur Auftrennung der amplifizierten DNA verzichtet werden kann (s. Kapitel 1.3.4.). Ein weiterer Vorteil dieser Methode besteht darin, dass eine Quantifizierung der DNA-Amplifikate möglich ist. Die gemessenen Fluoreszenzsignale (s. Kapitel 1.3.5.) sind proportional zur DNA-Menge der Probe. Diese Signale habe ich online am Computer mittels der *ABI Prism*® 7700 Software ausgewertet.

Die Detektion wurde bei dieser Arbeit nur während der 2. PCR durchgeführt, da die 1. PCR im Sinn einer *nested-PCR* nur zur gesteigerten Amplifizierung der spezifischen DNA diente, wodurch die Sensitivität des MHA verbessert wurde. Da während der Real-Time-PCR Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen verwendet wurden, konnten neben den sechs Negativ-Kontrollen in der Regel gleichzeitig die DNA-Proben von 90 Studienteilnehmern amplifiziert und detektiert werden (s. Tabelle 13, Kapitel 3.3.2.2.).

3.4. Studiendesign und Datenverarbeitung

3.4.1. Studiendesign

3.4.1.1. Studientyp

Bei dieser Studie handelt es sich um eine Querschnittsstudie. Sie ist rein observierend, d.h., es findet keine Intervention bezüglich der Studienteilnehmer statt. Sie ist transversal, d.h., die Exposition (angenommener Risikofaktor *sexuelles Risikoverhalten*, SRV) wird zur gleichen Zeit gemessen wie der Outcome (HIV-Status, Verteilung der HIV-1-Subtypen A, C und D, Anteil der reinen und rekombinanten Subtypen, Anteil von Einfach- und Mehrfachinfektionen).

Die wichtigste epidemiologische Maßzahl dieser Studie ist das Häufigkeitsmaß *Prävalenz*. Präzise formuliert wird hierbei die Prävalenz bezüglich des (angenommenen) Outcome

gemessen. Das Verhältnis der beiden Risikogruppen HRG und NRG wird durch die Anzahl der für die Studie gewonnenen Teilnehmer bestimmt, womit die *exposure prevalence* in diesem Studiendesign keine Rolle spielt. Eine fortlaufende Kontrolle der einzelnen Studienteilnehmer fand nicht statt (keine longitudinale Studie). Hierdurch können inzidente (neu auftretende) Fälle nicht registriert werden, weshalb das Häufigkeitsmaß *Inzidenz* in dieser Studie keine Anwendung finden kann.

Wie in jeder anderen Querschnittsstudie auch, kann bei der vorliegenden zwar eine Assoziation der beiden Variablen *SRV* und *HIV-1-Subtypen-Verteilung* analysiert werden, aber eine Unterscheidung in Ursache und Wirkung ist kaum möglich. Weil die *Kausalität* in transversalen Studien nicht überprüfbar ist, sind Aussagen darüber rein hypothetisch.

3.4.1.2. Studienverlauf

Die soziologischen Daten der 1.734 Teilnehmer wurden mittels Fragebogen in folgenden Zeitperioden erhoben: Prostituierte: September 2000 bis Mai 2001; ACA: Februar bis August 2001; BD des *Mbeya Consultant Hospital* (BD A) und des *Meta Hospital Mbeya* (BD B): Oktober 2000 bis August 2001.

Für das Thema der vorliegenden Dissertation sollen nur die grundlegenden soziologischen Daten der Kohorte beschrieben werden. Detailliertere Auswertungen dieser Ergebnisse in Relation zu den Labordaten werden in weiterführenden Arbeiten folgen.

Insgesamt war nur bei elf Proben (0,63 %) kein eindeutiges serologisches HIV-Ergebnis mittels der HIV-Antikörper-Tests bestimmbar. Bei sieben dieser elf Proben konnte auch bei der MHA kein positiver Befund erhoben werden. Bei drei Proben konnte keine PCR durchgeführt werden. Bei einer Probe gelang der Nachweis von proviraler DNA (s. Tabelle 19, Kapitel 4.1.1.1.).

Da bei diesen elf Proben kein eindeutiges positives HIV-Ergebnis festzustellen war, werden sie in den anschließenden Statistiken mit "HIV-negativ" gewertet.

3.4.2. Datenverarbeitung

Für sämtliche digitalen Arbeitsschritte dieser Dissertation habe ich das Notebook *Travel Mate 291LMi*® von *Acer* mit dem Prozessor *Pentium*® *M 1.4 GHz* von *Intel* und mit dem Betriebssystem *Windows XP Professional*® von *Microsoft* verwendet. Als Drucker, Kopierer und Scanner diente das All-in-one-Gerät *Office Jet G85*® von *Hewlett Packard*. Mit der Digitalkamera *Coolpix 885*® von *Nikon* wurden alle digitalen Bilder aufgenommen.

Von der Vorbereitung im Juli 2000 bis zur Abgabe der Dissertation im November 2005 wurden insbesondere *Microsoft*® *Office*-Programme benutzt. Zur Erstellung der Datenbank mit soziologischen- und laborspezifischen Daten aller 1.734 Teilnehmer diente das Programm *Microsoft*® *Access 2000*. Die Tabellenkalkulation dieser Daten erfolgte mit *Microsoft*® *Excel 2000*. Graphiken als auch bereits durchgeführte Präsentationen zu Themen dieser Arbeit wurden mit *Microsoft*® *Power Point* erstellt. Mit *Microsoft*® *Word 2000* wurden alle Texte dieser Arbeit geschrieben.

Zur statistischen Auswertung wurde das vom CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*, Atlanta, USA) speziell für epidemiologische Studien entwickelte Statistikprogramm *EpiInfo Version 6* verwendet. Es wurde im Rahmen des *Global Programme on AIDS* der WHO für diesbezügliche Bedürfnisse modifiziert.

4. ERGEBNISSE

4.1. Molekularbiologische HIV-Ergebnisse des MHA

4.1.1. Interpretation der Ergebnisse

4.1.1.1. Sensitivität

Während der Zeit der Probensammlung in Mbeya konnten im Rahmen von HISIS (s. Kapitel 3.1.2) von 626 Prostituierten serologische HIV-Tests durchgeführt werden, wobei von den Proben 434 (69,33 %) positiv waren. Für die vorliegende Querschnittsstudie habe ich bei 160 HRG-Proben eine HIV-1-Subtypen-Bestimmung mittels *Multi-Region Hybridisation Assay* (MHA) durchgeführt. Diese HRG-Proben wurden randomisiert ausgewählt.

Von den insgesamt 1.108 Blutproben in der NRG wurden mittels serologischem Antikörper-Suchtests insgesamt 186 Proben (16,77 %) positiv getestet. Von zehn Proben war das HIV-Ergebnis trotz wiederholter Testung nicht genau bestimmbar (engl.: *indeterminate* = unbestimmt; in Tabelle 19 und 20 mit "sero-ind." abgekürzt). Bei fünf positiven und zwei unbestimmten Blutproben der ACA konnte keine PBMC-Isolation stattfinden, da keine weiteren Blutentnahmen für deren Durchführung erfolgen konnten (s. Kapitel 3.1.3.2.1.). Die *TaqMan*®-PCR zur molekularen HIV-1-Subtypen-Bestimmung wurde mit insgesamt 181 sero-positiven und acht sero-unbestimmten Proben der NRG durchgeführt (s. Tabelle 19).

Wie bereits in Kapitel 3.3.3.2. dargestellt, werden beim MHA die HIV-1-Subtypen in fünf verschiedenen repräsentativen proviralen DNA-Regionen bestimmt. Der gleichzeitige Nachweis der Subtypen in allen fünf Regionen gelang bei dieser angewandten *nested*-PCR (s. Kapitel 3.3.2.) in der HRG in 16,25 % der Proben und in der NRG in nur 7,73 % der Proben (s. Tabelle 19). Die verschiedene Sensitivität der Hybridisierungssonden bei den Proben beider Studiengruppen ist auf die relativ stark unterschiedlichen Blutvolumina, die bei den Probanden entnommen wurden, zurückzuführen (s. Kapitel 3.2.1.2.).

Um aussagekräftige Ergebnisse für die HIV-1-Subtypen-Bestimmung zu bekommen, habe ich lediglich jene Proben in die Auswertung miteinbezogen, bei denen ich die HIV-1-Subtypen in mindestens drei der fünf DNA-Regionen eindeutig detektieren konnte. In der vorliegenden

Arbeit werden diese "harte" HIV-1-Subtypen-Ergebnisse genannt. Nach einer *nested*-PCR mittels MHA konnten bei 102 der 160 (63,75 %) sero-positiven HRG-Proben, die dieser Detektierung unterzogen wurden, der Subtyp sicher bestimmt werden. Dies gelang bei den NRG in nur 50,83 % (92 von 181 sero-positiven Proben).

Deshalb habe ich bei den NRG-Proben, bei denen ich den HIV-1-Subtyp in weniger als drei DNA-Regionen bestimmen konnte, eine Wiederholung durchgeführt. Hierbei wurde das ganze Verfahren der MHA einschließlich erneuter DNA-Extraktion aus PBMC-Proben wiederholt. Nach der Wiederholung konnte ich bei insgesamt 68,51 % dieser NRG-Proben in mindestens drei DNA-Regionen den HIV-1-Subtyp sicher nachweisen (s. Tabelle 20).

Tabelle 19: Anzahl der detektierten DNA-Regionen nach einer *nested*-PCR bei allen HRG- und NRG-Proben, bei denen der HIV-1-Subtyp mittels MHA bestimmt wurde.

Risikogruppen		HRG			NRG		
Anzahl aller Teilnehmer		626			1.108		
Ergebnisse der serologischen HIV-Antikörper-Suchtests		sero-positiv	sero-ind.	sero-negativ	sero-positiv	sero-ind.	sero-negativ
		434	1	191	186	10	912
Anzahl der Proben zur HIV-1-Subtypen-Bestimmung mittels MHA		160	100 %	0	181	100 %	8
Anzahl der detektierten DNA-Regionen	5	26	16,25 %	-	14	7,73 %	-
	4	37	23,13 %	-	28	15,47 %	-
	3	39	24,38 %	-	50	27,62 %	-
	Total: 3 - 5	102	63,75 %	-	92	50,83 %	-
	2	21	13,13 %	-	33	18,23 %	1
	1	28	17,50 %	-	27	14,92 %	0
	0	9	5,63 %	-	29	16,02 %	7
	Total: 0 - 2	58	36,25 %	-	89	49,17 %	8

Von den 102 harten HIV-1-Subtypen-Ergebnissen in der HRG konnten bei 26 Proben der Subtyp bzw. die Subtypen (bei Rekombinanten) in fünf DNA-Regionen, bei 37 Proben in vier

DNA-Regionen und bei 39 Proben in drei DNA-Regionen bestimmt werden (s. Tabelle 19). Damit wurden insgesamt 510 DNA-Regionen (102 Proben x 5 DNA-Regionen) bei den HRG-Proben mittels der MHA-Methode untersucht. Dabei konnte in 395 von 510 DNA-Regionen der Subtyp bzw. die Subtypen detektiert werden. Die Sensitivität bezüglich der HIV-1-Subtypen-Bestimmung mittels MHA in den 510 DNA-Regionen der 102 Proben beträgt hiernach 77,45 %.

Tabelle 20: Anzahl der DNA-Regionen, bei denen nach wiederholter nested-PCR aller NRG-Proben der HIV-1-Subtyp sicher bestimmt werden konnten. Die Wiederholung wurde nur bei jenen NRG-Proben durchgeführt, bei denen in weniger als drei DNA-Regionen der HIV-1-Subtyp mittels der ersten MHA bestimmt wurde (vgl. Tabelle 18).

Risikogruppen		NRG		
Anzahl aller Teilnehmer		1.108		
Ergebnisse der serologischen HIV-Antikörper-Suchtests		sero-positiv	sero-ind.	sero-neg.
		186	10	912
Anzahl der Proben zur HIV-1-Subtypen-Bestimmung mittels MHA		181	100 %	8
Anzahl der detektierten DNA-Regionen	5	15	8,29 %	-
	4	40	22,10 %	-
	3	69	38,12 %	-
	Total: 3 - 5	124	68,51 %	-
	2	18	9,94 %	1
	1	24	13,26 %	0
	0	15	8,29 %	7
	Total: 0 - 2	57	31,49 %	8

Von den 124 harten HIV-1-Subtypen-Ergebnissen in der NRG konnten bei 15 Proben der Subtyp bzw. die Subtypen (bei Rekombinanten) in fünf DNA-Regionen, bei 40 Proben in vier DNA-Regionen und bei 69 Proben in drei DNA-Regionen bestimmt werden (s. Tabelle 20). Damit wurden insgesamt 620 DNA-Regionen (124 Proben x 5 DNA-Regionen) bei den NRG-Proben mittels der MHA-Methode untersucht. Dabei konnte in 442 von 620 DNA-Regionen der Subtyp bzw. die Subtypen detektiert werden. Die Sensitivität bezüglich der HIV-1-Subtypen-Bestimmung mittels MHA in den 620 DNA-Regionen der 124 Proben beträgt hiernach 71,29 %.

4.1.1.2. Reine/Rekombinante Subtypen und Einfach-/Mehrfachinfektionen

Wie bereits in Kapitel 3.3.3.2. erläutert, werden beim *Multi-Region Hybridisation Assay* (MHA) die HIV-1-Subtypen in fünf verschiedenen repräsentativen proviralen DNA-Regionen bestimmt. Jede PCR wird mit einem für die DNA-Region spezifischen *primer*-Paar und mit einer für einen HIV-1-Subtypen spezifischen Hybridisierungssonde durchgeführt. Da die Subtypen A, C und D gemessen werden, werden demzufolge pro PBMC-Probe 15 PCR (5 DNA-Regionen x 3 Subtypen) durchgeführt.

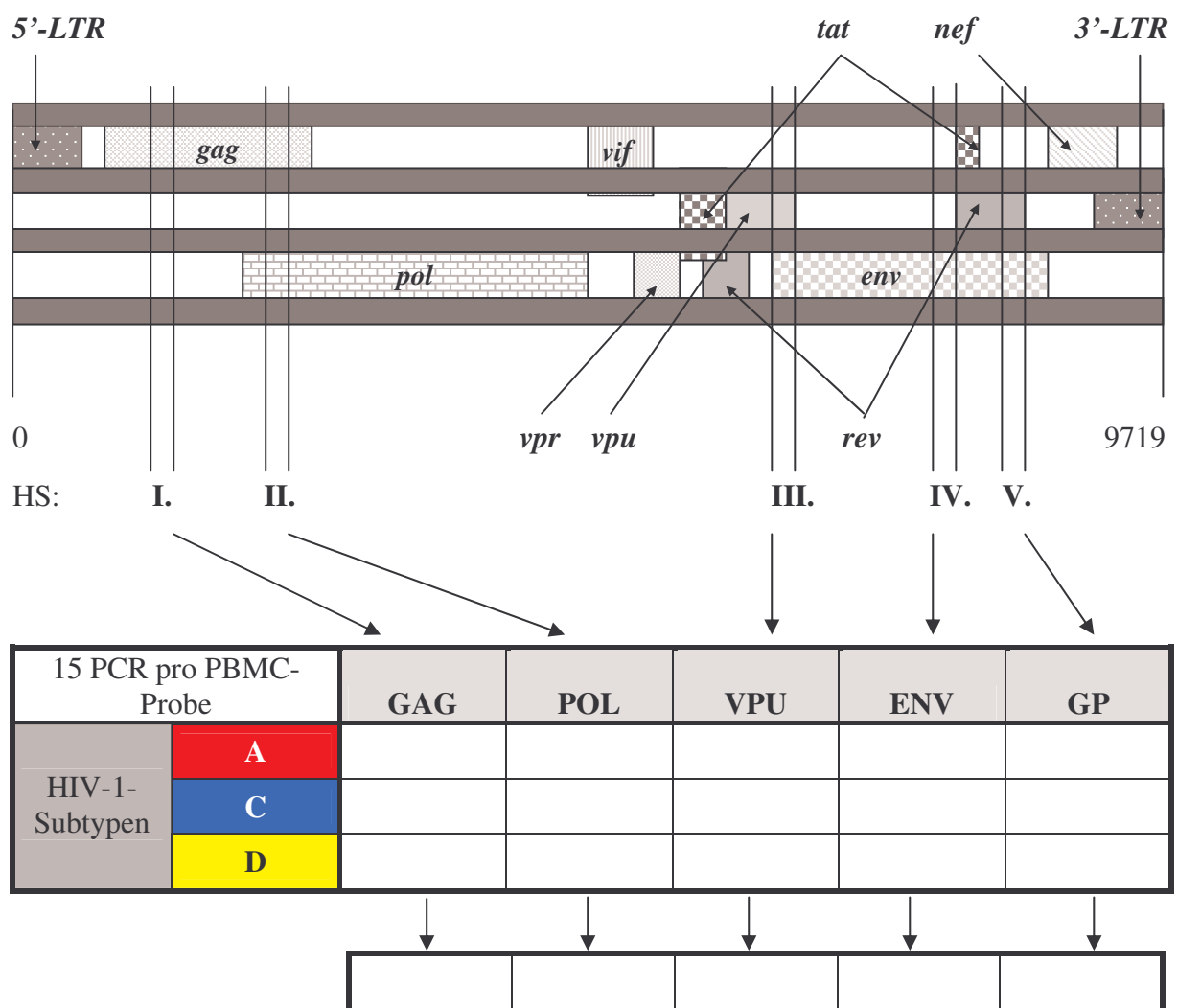
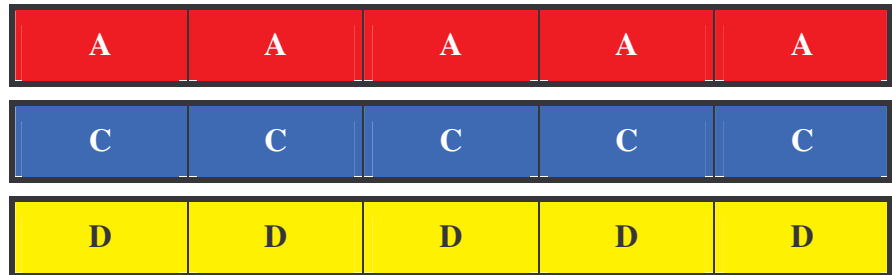


Abbildung 18: Die Ergebnisse dieser PCR werden in der vorliegenden Dissertation zur besseren Übersicht in eine horizontale Tabelle mit einer Zeile und fünf Spalten für die jeweiligen DNA-Regionen übertragen (s. Abbildung 1, Kapitel 1.1.3.1.1., und Abbildung 16, Kapitel 3.3.3.2.).

Von einer Einfachinfektion mit einem reinen Subtyp (ER) spricht man, wenn in allen fünf DNA-Regionen der gleiche Subtyp detektiert wurde. In dieser Arbeit können diesbezüglich drei verschiedene Ergebnisse erzielt werden: reiner Subtyp A, reiner Subtyp C, reiner Subtyp D.

Abbildung 19:



War die HIV-1-Subtypen-Bestimmung nur in drei oder vier DNA-Regionen erfolgreich, wird in dieser Arbeit ebenfalls von einem reinen Subtyp gesprochen, trotz der Unsicherheit, dass in der einen DNA-Region bzw. in den beiden DNA-Regionen, in denen kein Subtyp bestimmt werden konnte, ein anderer Subtyp vorliegen könnte. In diesem Beispiel konnte in den DNA-Regionen *pol* und *env* kein Subtyp bestimmt werden. *Abbildung 20:*



Eine Einfachinfektion mit einem rekombinanten Subtyp (EK) (s.a. Kapitel 1.1.3.1.2.) liegt dann vor, wenn mindestens zwei verschiedene HIV-1-Subtypen im gleichen proviralen DNA-Strang detektiert wurden. In dieser Arbeit können vier verschiedene Ergebnisse erzielt werden: Rekombinante AC, Rekombinante AD, Rekombinante CD, Rekombinante ACD.

Bei der Benennung ist nicht ausschlaggebend, in wie vielen DNA-Regionen ein bestimmter Subtyp gemessen wurde. In diesem Beispiel liegt die Rekombinante CD vor, obwohl Subtyp C in vier und Subtyp D nur in einer DNA-Region nachgewiesen wurde. *Abbildung 21:*



Auch hier gilt, dass die Bestimmung in drei oder vier DNA-Regionen ausreichend ist, damit ein weitgehend verlässliches Ergebnis vorliegt. Somit wurde dieses Ergebnis für die vorliegende Analyse verwertet. In diesem Beispiel handelt es sich ebenfalls um die Rekombinante CD.

Abbildung 22:



Bei einer Mehrfachinfektion (MK) (s.a. Kapitel 1.1.3.1.2.) wurden pro PBMC-Probe in mindestens einer DNA-Region mindestens zwei verschiedene Subtypen nachgewiesen: Intersubtyp-Rekombinationen (s. Kapitel 1.1.3.1.3.). Im Rahmen dieser Dissertation konnte ich alle drei möglichen Arten von Zweifachinfektionen detektieren: A/C, A/D, C/D. Der Nachweis der Dreifachinfektion A/C/D gelang nur in einer einzigen Probe. Bei einer Mehrfachinfektion muss zwangsläufig eine Rekombinante vorliegen.

Bei der Benennung ist nicht ausschlaggebend, in wie vielen DNA-Regionen ein bestimmter Subtyp gemessen wurde. In diesem Beispiel liegt die Zweifachinfektion in der *gag*-Region: A/AD. *Abbildung 23:*



Auch hier gilt, dass die Bestimmung in drei oder vier DNA-Regionen ausreichend ist, damit ein weitgehend verlässliches Ergebnis vorliegt, womit dieses in die statistische Auswertung dieser Arbeit eingeht. Zum Beispiel handelt es sich auch hier um die Zweifachinfektion A/AD, wobei in den DNA-Regionen *gag* und *vpu* jeweils zwei verschiedene HIV-1-Subtypen nachgewiesen wurden. *Abbildung 24:*



Mit dem MHA können Mehrfachinfektionen nur dann nachgewiesen werden, wenn in der gleichen DNA-Region mindestens zwei verschiedene Subtypen vorlagen. Intrasubtyp-Rekombinationen können nur mithilfe des *full-genome sequencing* (s. Kapitel 1.3.2.) gemessen werden. Hierbei kommt es zu einer Rekombination mit zwei DNA-Strängen, die dem gleichen Subtyp angehören.

4.1.1.3. Übertragungswege bei reinen und rekombinanten Subtypen

Wie in Kapitel 4.1.1.2. geschildert, können HIV-1-Infektionen in drei Gruppen eingeteilt werden.

1. **ER:** HIV-1-Einfachinfektionen mit reinen Subtypen
2. **EK:** HIV-1-Einfachinfektionen mit rekombinanten Subtypen
3. **MK:** HIV-1-Mehrfachinfektionen (hierbei liegt immer eine Rekombinante vor)

Die Übertragungsmöglichkeiten sollen in Form von Beispielen erläutert werden. Die Träger dieser HIV-1-Infektionen werden in dieser Arbeit als ER, EK und MK bezeichnet. Ein HIV-1-**negatives** Individuum wird mit NE abgekürzt.

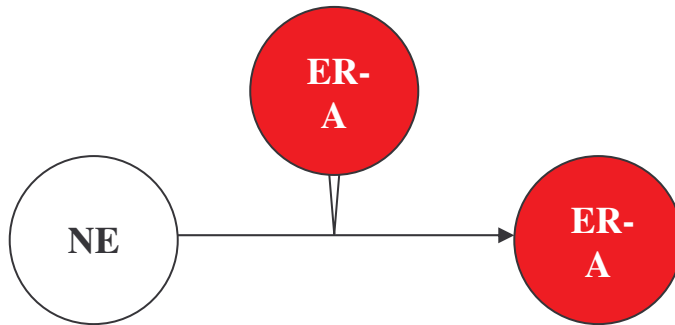


Abbildung 25: Beispiel 1: Wenn sich ein HIV-1-negatives Individuum NE bei einem anderen Individuum ER, das Träger eines reinen Subtyps (z.B. Subtyp A) ist, infiziert, so wird aus NE ebenfalls ein ER. Im Beispiel: Aus NE wird ER-A.

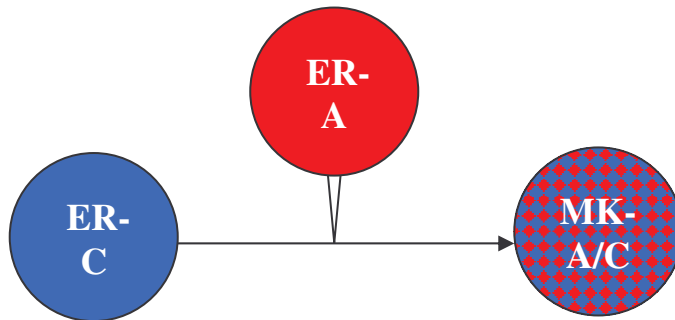


Abbildung 26: Beispiel 2: Infiziert sich ein Individuum ER (z.B. Träger des Subtyps C) bei einem anderen Individuum ER, der mit einem unterschiedlichen Subtyp infiziert ist (z.B. Träger des Subtyps A), so weist der erste ER danach eine Mehrfachinfektion (MK) mit einer Rekombinante (im Beispiel: Rekombinante A/C) auf. Im Beispiel: Aus ER-C wird MK-A/C.

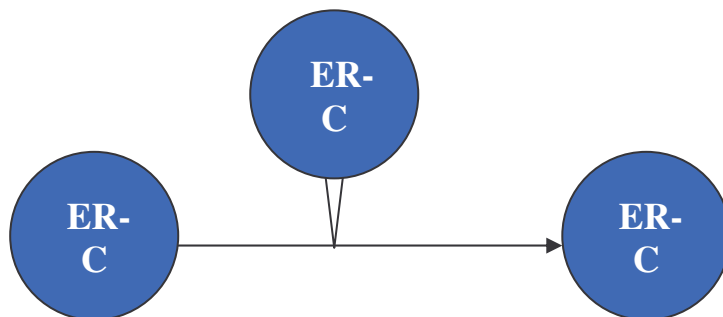


Abbildung 27: Beispiel 3: Handelt es sich bei dem anderen Individuum ER um einen Träger des gleichen Subtyps (im Beispiel: zweiter ER ist ebenfalls Träger des Subtyps C), so kommt es zwar zu einer Rekombination (im Beispiel: Rekombinante CC), aber diese kann mittels MHA nicht nachgewiesen werden. Man würde in diesem Beispiel eine HIV-Einfachinfektion mit Subtyp C detektieren: Intra**sub**typ-Rekombination. Im Beispiel "bleibt" das erste Individuum ER-C.

Beispiel 4: Infiziert sich ein HIV-1-negatives Individuum NE beim einem Träger einer HIV-1-Mehrfachinfektion (z.B. mit der Zweifachinfektion A/AC, s. Kapitel 4.1.1.2.), so kann daraufhin NE eine Einfachinfektion mit einem reinen Subtyp (im Beispiel: mit Subtyp A: ER-A), eine Einfachinfektion mit einer Rekombinante (im Beispiel: mit der Rekombinante AC: EK-AC) oder eine Mehrfachinfektion wie beim Überträger vorliegen (im Beispiel: A/AC: MK-A/AC).

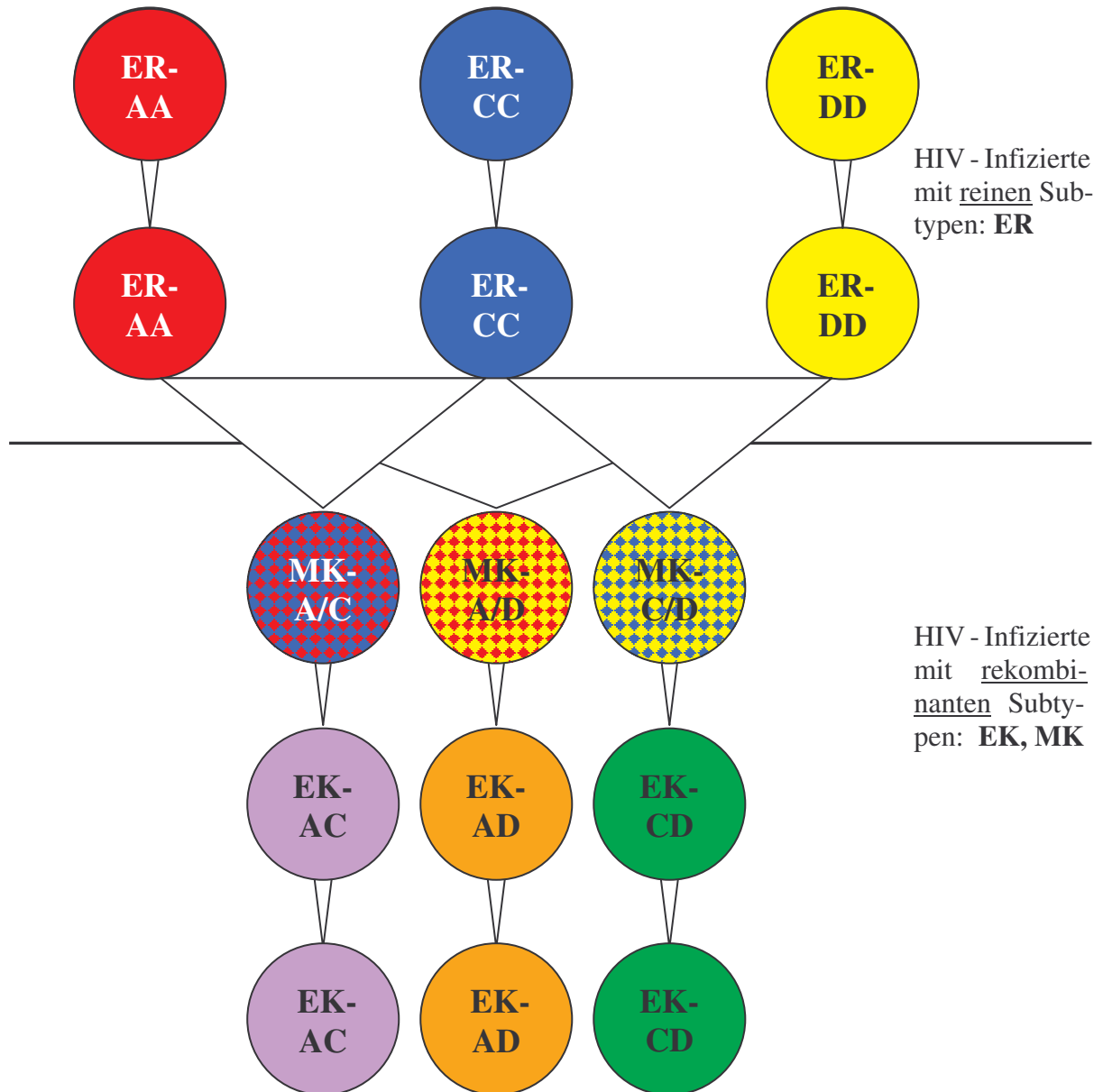


Abbildung 28: Darstellung der zwei HIV-1-Subtypen-Verteilungen: die Träger der reinen Subtypen (ER, in der Abbildung *oben*) und der rekombinanten Subtypen (EK und MK, in der Abbildung *unten*). Die HIV-1-Einfachinfizierten mit reinen Subtypen (ER) entstehen dadurch, dass sich HIV-Negative (NE) mit anderen ER infizieren.

Eine Rekombination kann nur dann in einem Individuum entstehen, wenn in diesem eine Mehrfachinfektion (MK) mit zwei unterschiedlichen HIV-Strängen vorhanden ist (s. Kapitel 1.1.3.1.2.). Liegt bei einem Individuum ausschließlich eine HIV-1-Einfachinfektion mit einer Rekombinante vor (EK), dann hat sich diese Person direkt oder indirekt bei einem Individuum infiziert, die MK-Träger ist. Es wurde in diesem Beispiel also nur eine Rekombinante weitergegeben. Da die Subtypen-Verteilung der Rekombinanten der EK-Träger von den MK-Trägern abhängig ist, dürfte zu erwarten sein, dass die HIV-1-Subtypen-Verteilung innerhalb der Populationen von Trägern EK und von Träger MK die gleiche ist.

Ein Träger ER (HIV-1-Einfachinfektion mit einem reinem HIV-1-Subtyp) kann nur entstehen, wenn sich ein HIV-1-negatives Individuum bei einem anderen Träger ER oder, was viel seltener ist, bei einem Träger MK (s. Beispiel 4) ansteckt.

In dieser Arbeit konnte ich nachweisen, dass ER-Träger in der HRG knapp zweieinhalbmal (s. Kapitel 4.1.2.1.) und bei der NRG knapp siebenmal (s. Kapitel 4.1.3.1.) häufiger vorkommen als MK-Träger. Ein ER-Träger überträgt nur reine Subtypen. Ein MK-Träger hingegen überträgt in der Mehrzahl rekombinante Formen, weil diese in ihm häufiger vorliegen. Ein MK-Träger kann aber auch reine Subtypen übertragen, was seltener ist. Demzufolge hat sich die große Mehrzahl der ER-Träger von einem anderen ER-Träger und seltener bei einem MK-Träger infiziert.

Man kann also rein rechnerisch davon ausgehen, dass zwei HIV-1-Subtypen-Verteilungen existent sind (s. Abbildung 28): die der HIV-Infizierten mit reinen Subtypen (ER-Trägern), da sich die Mehrzahl der ER-Träger bei anderen ER-Trägern infiziert hat, und die der HIV-Infizierten mit rekombinanten Subtypen (EK-Träger und MK-Träger), da alle Rekombinationen bei MK-Trägern entstanden sind.

Da man mittels der MHA die Rekombinanten mit zwei oder mehreren gleichen HIV-1-Subtypen nicht unterscheiden kann (z.B. Rekombinanten AA, CC, DD, AAA etc.: Intra-subtyp-Rekombinationen), werden diese statistisch als HIV-1-Einfachinfektionen mit reinen Subtypen bezeichnet (z.B. ER-A, ER-C, ER-D) und gehen somit als solche in diese Analyse ein. Es können MK-Träger nur dann als solche mittels MHA detektiert werden, wenn mindestens zwei verschiedene HIV-1-Subtypen in der gleichen DNA-Region ihrer Probe detektiert werden (Intersubtyp-Rekombinationen). Aus den HIV-1-Einfachinfektionen kann näherungsweise errechnet werden, wie groß die Wahrscheinlichkeit ist, dass in einer

bestimmten Bevölkerungsgruppe (hier: die der ER-Träger) Rekombinationen mit zwei verschiedenen HIV-1-Subtypen entstehen.

Vorrausgesetzt, die HIV-1-Subtypen werden auf gleiche Art und mit gleicher Wahrscheinlichkeit übertragen, würden in einer isolierten Bevölkerungsgruppe die HIV-1-Subtypen-Verteilung bei den ER-Trägern als auch bei den Trägern mit rekombinanter DNA (EK-Träger und MK-Träger) relativ konstant bleiben (s. Abbildung 28).

4.1.2. Molekularbiologische HIV-Ergebnisse der High-Risk-Group (HRG)

4.1.2.1. Reine/Rekombinante Subtypen und Einfach-/Mehrfachinfektionen

Insgesamt konnten bei 102 PBMC-Proben der HRG in mindestens drei DNA-Regionen die HIV-1-Subtypen bestimmt werden (s. Kapitel 4.1.1.1.). Bei 48 Proben (47,06 %) wurde eine Einfachinfektion mit einem reinen Subtyp (ER), bei 34 Proben (33,33 %) wurde eine Einfachinfektion mit einer Rekombinante (EK) und bei 20 Proben (19,61 %) wurde eine Mehrfachinfektion (MK) nachgewiesen. Das bedeutet, dass in 52,94 % aller HRG-Proben eine Rekombinante vorliegt (s. Tabelle 32, Kapitel 4.2.1.2.1.).

Diagramm 2: Anteil der HIV-1-Einfach- und -Mehrfachinfektionen und Anteil der reinen und rekombinanten HIV-1-Subtypen in der High-Risk-Group (HRG).

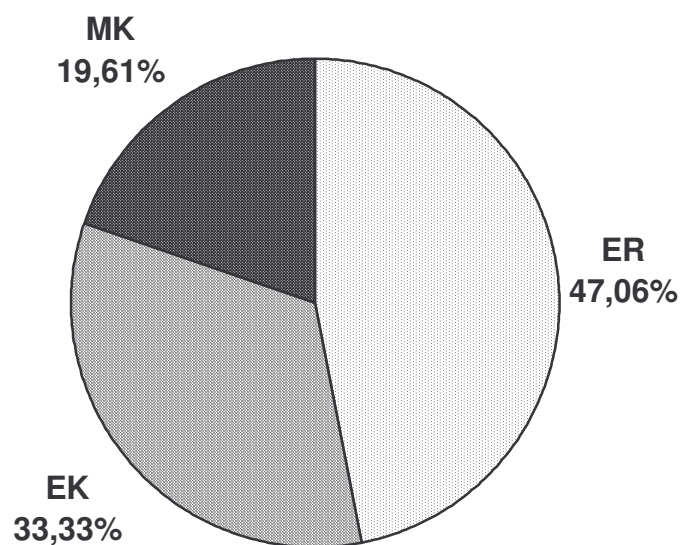


Tabelle 21: Anteil der HIV-1-Einfach- und -Mehrfachinfektionen und Anteil der reinen und rekombinanten HIV-1-Subtypen in den fünf Populationsgruppen der High-Risk-Group (HRG).

Populationsgruppen	Anzahl der Proben	ER	EK	MK
		Einfachinfektion		Mehrfachinf.
		reine Subtypen	rekombinante Subtypen	
GH	8	2	3	3
		-	-	-
BA	46	19	14	13
		41,30 %	30,43 %	28,26 %
PO	39	22	13	4
		56,41 %	33,33 %	10,26 %
GY	4	1	3	0
		-	-	-
HO	5	4	1	0
		-	-	-
HRG	102	48	34	20
		47,06 %	33,33 %	19,61 %

4.1.2.2. HIV-1-Subtypen-Verteilung

4.1.2.2.1. Subtypen-Verteilung nach Proben-Ergebnissen

In 48 HRG-Proben konnte eine Einfachinfektion mit einem reinen Subtyp (ER) bestimmt werden. Davon wurden bei zehn Proben (20,83 %) der Subtyp A, bei 36 Proben (75,00 %) der Subtyp C und bei zwei Proben (4,17 %) der Subtyp D nachgewiesen.

In 34 HRG-Proben konnte eine Einfachinfektion mit einem rekombinanten Subtyp (EK) bestimmt werden. Davon wurden bei 20 Proben (58,82 %) die Rekombinante AC, bei fünf Proben (14,71 %) die Rekombinante AD, bei drei Proben (8,82 %) die Rekombinante CD und bei sechs Proben (17,65 %) die Rekombinante ACD nachgewiesen.

In 20 HRG-Proben konnte eine Mehrfachinfektion (MK) bestimmt werden. Hierbei handelte es sich um 21 Zweifachinfektionen und eine Dreifachinfektion (A/C/D; 5,00 %), wobei bei zwei Proben jeweils zwei unterschiedliche Zweifachinfektionen detektiert wurden. Es wurden bei zwölf Proben (60,00 %) die Zweifachinfektion A/C und bei jeweils 3,5* Proben (17,50 %; Erklärung von *: siehe nächste Seite; 17,50 %) die Zweifachinfektion A/D und C/D nachgewiesen.

Table 22: HIV-1-Subtypen-Verteilung bei den HIV-1-Einfach- und -Mehrfachinfektionen und bei den reinen und rekombinanten HIV-1-Subtypen, aufgelistet nach den fünf Populationsgruppen der HRG.

Populationsgruppen	ER			EK				MK			
	Einfachinfektion							Mehrfachinfektion			
	reine Subtypen			rekombinante Subtypen							
	A	C	D	AC	AD	CD	ACD	A/C	A/D	C/D	A/C/D
GH	0	2	0	2	0	1	0	1	1	1	0
	2			3				3			
BA*	5	14	0	7	1	2	4	9*	1,5*	1,5*	1
	19			14				13			
PO	4	17	1	7	4	0	2	2	1	1	0
	22			13				4			
GY	0	1	0	3	0	0	0	0	0	0	0
	1			3				0			
HO	1	2	1	1	0	0	0	0	0	0	0
	4			1				0			
HRG	10	36	2	20	5	3	6	12*	3,5*	3,5*	1
	20,83 %	75,00 %	4,17 %	58,82 %	14,71 %	8,82 %	17,65 %	60,00 %	17,50 %	17,50 %	5,00 %
	48 (47,06 %)			34 (33,33 %)				20 (19,61 %)			
102 (100 %)											

* Bei zwei Proben von *bar workers* (BA) konnten jeweils zwei verschiedene Zweifachinfektionen mittels MHA nachgewiesen werden: A/C und A/D sowie A/C und C/D.

Table 23: Die 20 Mehrfachinfektionen der HRG-Proben setzen sich aus folgenden DNA-Einzelsträngen zusammen:

reine Subtypen			rekombinante Subtypen			
A	C	D	AC	AD	CD	ACD
3	10	2	14	3	5	4
20,00 %	66,67 %	13,33 %	53,85 %	11,54 %	19,23 %	15,38 %
15 (36,59 %)			26 (63,41 %)			
41 (100 %)						

4.1.2.2.2. Subtypen-Verteilung nach DNA-Regionen

In 48 HRG-Proben konnte eine Einfachinfektion mit einem reinen Subtyp (ER) bestimmt werden. Dabei gelang eine HIV-1-Subtypen-Bestimmung in 177 DNA-Regionen, was einer Sensitivität von 73,75 % (177 von 240 untersuchten DNA-Regionen) entspricht. Es wurde in 34 DNA-Regionen (19,21 %) der Subtyp A, in 137 DNA-Regionen (77,40 %) der Subtyp C und in sechs DNA-Regionen (3,39 %) der Subtyp D nachgewiesen.

Table 24: MHA bei 102 HRG-Proben. Anzahl der DNA-Regionen, in denen die HIV-1-Subtypen A, C und D detektiert wurden. Aufgeteilt nach Einfach-/Mehrfachinfektionen, nach reinen/rekombinanten Subtypen und nach Populationsgruppen.

Populationsgruppen	ER			EK			MK		
	Einfachinfektion						Mehrfachinfektion		
	reine Subtypen			rekombinante Subtypen					
	A	C	D	A	C	D	A	C	D
GH	0	9	0	5	7	1	4	8	2
	-	100 %	-	38,46 %	53,85 %	7,69 %	28,57 %	57,14 %	14,29 %
	9			13			14		
BA	19	52	0	18	33	12	24	40	11
	26,76 %	73,24 %	-	28,57 %	52,38 %	19,05 %	32,43 %	54,05 %	14,86 %
	71			63			75		
PO	12	65	3	18	18	9	4	10	4
	15,00 %	81,25 %	3,75 %	40,00 %	40,00 %	20,00 %	22,22 %	55,56 %	22,22 %
	80			45			18		
GY	0	5	0	4	9	0	0	0	0
	-	-	-	30,77 %	69,23 %	-	-	-	-
	5			13			0		
HO	3	6	3	2	1	0	0	0	0
	25,00 %	50,00 %	25,00 %	-	-	-	-	-	-
	12			3			0		

Fortsetzung von *Tabelle 24*

Populationsgruppen	ER			EK			MK		
	Einfachinfektion						Mehrfachinfektion		
	reine Subtypen			rekombinante Subtypen					
	A	C	D	A	C	D	A	C	D
HRG	34	137	6	47	68	22	32	58	17
	19,21 %	77,40 %	3,39 %	34,31 %	49,64 %	16,06 %	29,91 %	54,21 %	15,89 %
	177 (100 %)			137 (100 %)			107 (100 %)		

HRG	Subtyp A	113	Subtyp C	263	Subtyp D	45
		26,84 %		62,47 %		10,69 %
	421 (100 %)					

In 34 HRG-Proben konnte eine Einfachinfektion mit einer Rekombinante (EK) bestimmt werden. Dabei gelang eine HIV-1-Subtypen-Bestimmung in 137 DNA-Regionen, was einer Sensitivität von 80,59 % (137 von 170 untersuchten DNA-Regionen) entspricht. Es wurde in 47 DNA-Regionen (34,31 %) der Subtyp A, in 68 DNA-Regionen (49,64 %) der Subtyp C und in 22 DNA-Regionen (16,06 %) der Subtyp D nachgewiesen.

In 20 HRG-Proben konnte eine Mehrfachinfektion (MK) bestimmt werden, von denen in 15 Proben jeweils in nur einer DNA-Region eine Zweifachinfektion, in drei Proben jeweils in zwei DNA-Regionen eine Zweifachinfektion, in einer Probe in drei DNA-Regionen eine Zweifachinfektion und in einer Probe in einer DNA-Region eine Dreifachinfektion festgestellt werden konnte. Dabei gelang eine HIV-1-Subtypen-Bestimmung in 81 DNA-Regionen. Das entspricht einer Sensitivität von 81 % (81 von 100 untersuchten DNA-Regionen). Es wurde in 32 DNA-Regionen (29,91 %) der Subtyp A, in 58 DNA-Regionen (54,21 %) der Subtyp C und in 17 DNA-Regionen (15,89 %) der Subtyp D nachgewiesen.

Auffällig ist der unterschiedliche Anteil der HIV-1-Subtypen bei Einfachinfektionen mit reinen Subtypen (ER) und bei Einfachinfektionen mit rekombinanten Subtypen (EK). Bei den ER ist der Subtyp C mit 77,40 % der dominierende, während bei den EK der Anteil auf 49,64 % "sinkt". Der Anteil der Subtypen A und D ist dementsprechend "ansteigend". Liegt dieser bei den ER bei 19,21 % bzw. 3,39 %, "nehmen" die Anteile bei den EK auf 34,31 % bzw. 16,06 % "zu". Die HIV-1-Subtypen-Verteilung der Mehrfachinfektionen entspricht in etwa jener der EK. Vergleiche hierzu die Verteilung in der NRG (s. Kapitel 4.1.3.2.2.).

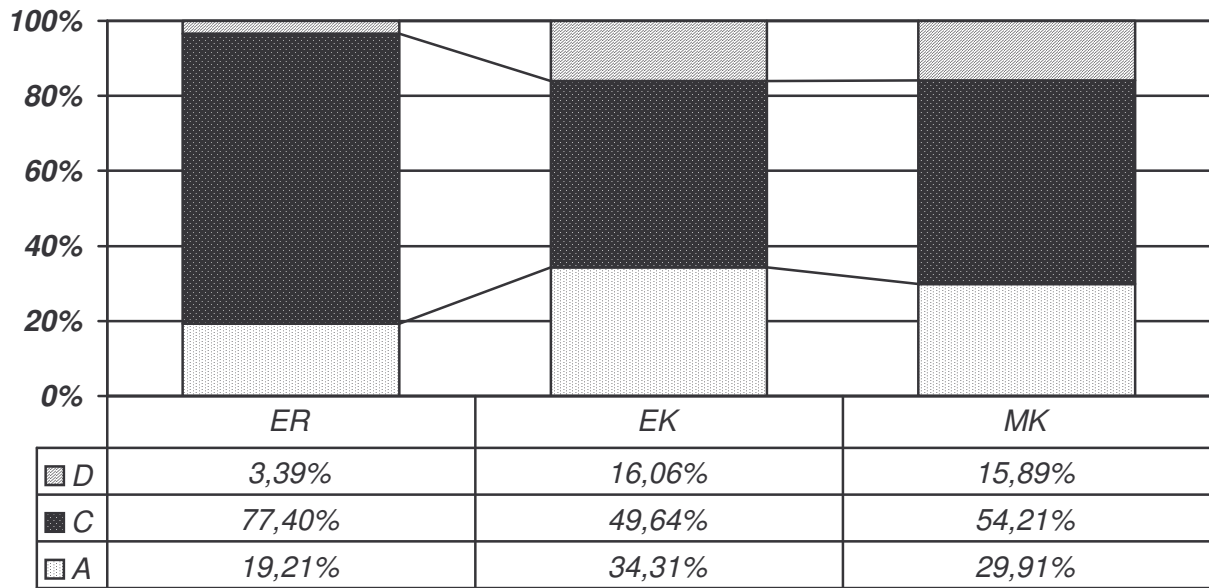
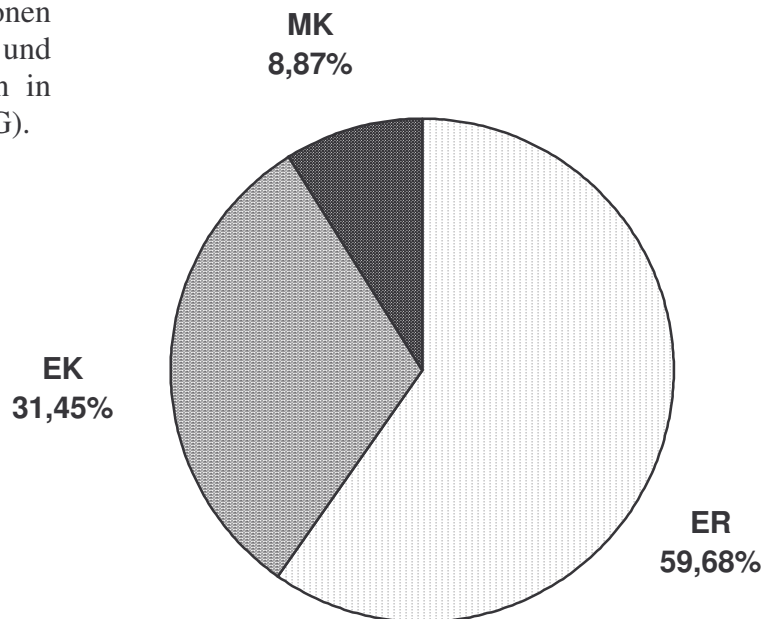


Diagramm 3: Anteil der Subtypen A, C und D bei Einfach-/Mehrfachinfektionen und bei reinen/rekombinanten Subtypen in der High-Risk-Group (HRG).

4.1.3. Molekularbiologische HIV-Ergebnisse der Non-High-Risk-Group (NRG)

4.1.3.1. Reine /Rekombinante Subtypen und Einfach- / Mehrfachinfektionen

Diagramm 4: Anteil der HIV-1-Einfach- und -Mehrfachinfektionen und Anteil der reinen und rekombinanten HIV-1-Subtypen in der Non-High-Risk-Group (NRG).



Insgesamt konnten bei 124 PBMC-Proben der NRG in mindestens drei DNA-Regionen die HIV-1-Subtypen bestimmt werden (s. Tabelle 20, Kapitel 4.1.1.1.). Bei 74 Proben (59,68 %) wurde eine Einfachinfektion mit einem reinen Subtyp (ER), bei 39 Proben (31,45 %) wurde eine Einfachinfektion mit einer Rekombinante (EK) und bei elf Proben (8,87 %) wurde eine Mehrfachinfektion (MK) nachgewiesen. Das bedeutet, dass in 40,32 % aller NRG-Proben eine Rekombinante vorliegt (s. Tabelle 32, Kapitel 4.2.1.2.1.).

Tabelle 25: Anteil der HIV-1-Einfach- und -Mehrfachinfektionen und Anteil der reinen und rekombinanten HIV-1-Subtypen in den fünf Populationsgruppen der Non-High-Risk-Group (NRG). Auffällig ist der Unterschied des Anteils an Mehrfachinfektionen bei den BD (12,50 %) und den ACA (3,85 %).

Populationsgruppe	Anzahl der Proben	ER	EK	MK
		Einfachinfektion		Mehrfachinf.
		reine Subtypen	rekombinante Subtypen	
ACA	52	34	16	2
		65,38 %	30,77 %	3,85 %
F-BD B	7	3	1	3
		-	-	-
M-BD B	21	13	7	1
		61,90 %	33,33 %	4,76 %
F-BD A	6	3	3	-
		-	-	-
M-BD A	38	21	12	5
		55,26 %	31,58 %	13,16 %
NRG	124	74	39	11
		59,68 %	31,45 %	8,87 %

F-BD	13	6	4	3
		46,15 %	30,77 %	23,08 %
M-BD	59	34	19	6
		57,63 %	32,20 %	10,17 %

BD	72	40	23	9
		55,56 %	31,94 %	12,50 %

Abkürzungen (s.a. Kapitel 3.1.3.2.2.):

F-BD A	weibliche Blutspender des <i>Mbeya Consultant Hospital</i>
M-BD A	männliche Blutspender des <i>Mbeya Consultant Hospital</i>
F-BD B	weibliche Blutspender des <i>Meta Hospital Mbeya</i>
M-BD B	männliche Blutspender des <i>Meta Hospital Mbeya</i>

4.1.3.2. HIV-1-Subtypen-Verteilung

4.1.3.2.1. Subtypen-Verteilung nach Proben-Ergebnissen

In 74 NRG-Proben konnte eine Einfachinfektion mit einem reinen Subtyp (ER) bestimmt werden. Davon wurden bei zehn Proben (13,51 %) der Subtyp A, bei 58 Proben (78,38 %) der Subtyp C und bei sechs Proben (8,11 %) der Subtyp D nachgewiesen.

Tabelle 26: HIV-1-Subtypen-Verteilung bei den HIV-1-Einfach- und -Mehrfachinfektionen und bei den reinen und rekombinanten HIV-1-Subtypen, aufgelistet nach den fünf Populationsgruppen der NRG.

Populationsgruppen	ER			EK				MK		
	Einfachinfektion							Mehrfachinfektion		
	reine Subtypen			rekombinante Subtypen						
	A	C	D	AC	AD	CD	ACD	A/C	A/D	C/D
ACA	6	24	4	7	1	5	3	1	-	1
	34			16				2		
F-BD B	-	2	1	-	1	-	-	-	2	1
	3			1				3		
M-BD B	2	10	1	5	-	2	-	1	-	-
	13			7				1		
F-BD A	1	2	-	1	-	1	1	-	-	-
	3			3				-		
M-BDA	1	20	-	8	1	3	-	1	2	2
	21			12				5		
NRG	10	58	6	21	3	11	4	3	4	4
	<i>13,51 %</i>	<i>78,38 %</i>	<i>8,11 %</i>	<i>53,85 %</i>	<i>7,69 %</i>	<i>28,21 %</i>	<i>10,26 %</i>	<i>27,27 %</i>	<i>36,36 %</i>	<i>36,36 %</i>
	74 (59,68 %)			39 (31,45 %)				11 (8,87 %)		
	124 (100 %)									
F-BD	1	4	1	1	1	1	1	-	2	1
	6			4				3		
M-BD	3	30	1	13	1	5	-	2	2	2
	34			19				6		

In 39 NRG-Proben konnte eine Einfachinfektion mit einem rekombinanten Subtyp (EK) bestimmt werden. Davon wurden bei 21 Proben (53,85 %) die Rekombinante AC, bei drei Proben (7,69 %) die Rekombinante AD, bei elf Proben (28,21 %) die Rekombinante CD und bei vier Proben (10,26 %) die Rekombinante ACD nachgewiesen.

In elf NRG-Proben konnte eine Mehrfachinfektion (MK) bestimmt werden. Hierbei handelte es sich durchwegs um Zweifachinfektionen. Eine Dreifachinfektion (A/C/D) wurde nicht detektiert. Davon wurden bei drei Proben (27,27 %) die Zweifachinfektion A/C, bei vier Proben (36,36 %) die Zweifachinfektion A/D und bei vier Proben (36,36 %) die Zweifachinfektion C/D nachgewiesen.

Table 27: Die elf Mehrfachinfektionen der NRG-Proben setzen sich aus folgenden DNA-Einzelsträngen zusammen:

reine Subtypen			rekombinante Subtypen			
A	C	D	AC	AD	CD	ACD
5	2	4	5	3	4	2
45,45 %	18,18 %	36,36 %	35,71 %	21,43 %	28,57 %	14,29 %
11 (44 %)			14 (56 %)			
25 (100 %)						

4.1.3.2.2. Subtypen-Verteilung nach DNA-Regionen

In 74 NRG-Proben konnte eine Einfachinfektion mit einem reinen Subtyp (ER) bestimmt werden. Dabei gelang eine HIV-1-Subtypen-Bestimmung in 264 DNA-Regionen, was einer Sensitivität von 71,35 % (264 von 370 untersuchten DNA-Regionen) entspricht. Es wurde in 31 DNA-Regionen (11,74 %) der Subtyp A, in 212 DNA-Regionen (80,30 %) der Subtyp C und in 21 DNA-Regionen (7,95 %) der Subtyp D nachgewiesen.

In 39 NRG-Proben konnte eine Einfachinfektion mit einer Rekombinante bestimmt werden. Dabei gelang eine HIV-1-Subtypen-Bestimmung in 138 DNA-Regionen, was einer Sensitivität von 70,74 % (138 von 195 untersuchten DNA-Regionen) entspricht. Es wurde in 47 DNA-Regionen (34,06 %) der Subtyp A, in 64 DNA-Regionen (46,38 %) der Subtyp C und in 27 DNA-Regionen (19,57 %) der Subtyp D nachgewiesen.

In elf NRG-Proben konnte eine Mehrfachinfektion bestimmt werden, von denen jeweils in nur einer DNA-Region eine Zweifachinfektion festgestellt werden konnte. Dabei gelang eine HIV-1-Subtypen-Bestimmung in 39 DNA-Regionen, was einer Sensitivität von 70,91 % (39 von 55 untersuchten DNA-Regionen) entspricht. Es wurde in 19 DNA-Regionen (38,00 %) der Subtyp A, in 13 DNA-Regionen (26,00 %) der Subtyp C und in 18 DNA-Regionen (36,00 %) der Subtyp D nachgewiesen.

Tabelle 28: MHA bei 124 NRG-Proben. Anzahl der DNA-Regionen, in denen die HIV-1-Subtypen A, C und D detektiert wurden. Aufgeteilt nach Einfach-/Mehrfachinfektionen, nach reinen/rekombinanten Subtypen und nach Populationsgruppen.

Populationsgruppen	ER			EK			MK		
	Einfachinfektion						Mehrfachinfektion		
	reine Subtypen			rekombinante Subtypen					
	A	C	D	A	C	D	A	C	D
ACA	19	82	14	21	20	14	6	1	2
	16,52 %	71,30 %	12,17 %	38,18 %	36,36 %	25,45 %	66,67 %	11,11 %	22,22 %
	115			55			9		
F-BD B	-	8	4	2	-	1	3	5	5
	-	66,67 %	33,33 %	-	-	-	23,08 %	38,46 %	38,46 %
	12			3			13		
M-BD B	6	38	3	10	14	2	3	2	-
	12,77 %	80,85 %	6,38 %	38,46 %	53,85 %	7,69 %	-	-	-
	47			26			-		
F-BD A	3	8	-	2	5	3	-	-	-
	27,27 %	72,73 %	-	20,00 %	50,00 %	30,00 %	-	-	-
	11			10			0		
M-BD A	3	76	-	12	25	7	7	5	11
	3,80 %	96,20 %	-	27,27 %	56,82 %	15,91 %	30,43 %	21,74 %	47,83 %
	79			44			23		
NRG	31	212	21	47	64	27	19	13	18
	11,74 %	80,30 %	7,95 %	34,06 %	46,38 %	19,57 %	38,00 %	26,00 %	36,00 %
	264 (58,41 %)			138 (30,53%)			50 (11,06 %)		

Fortsetzung von *Tabelle 28*

NRG	Subtyp A	97	Subtyp C	289	Subtyp D	66
		21,46 %		63,94 %		14,60 %
	452 (100 %)					

Populationsgruppen	ER			EK			MK		
	Einfachinfektion						Mehrfachinfektion		
	reine Subtypen			rekombinante Subtypen					
	A	C	D	A	C	D	A	C	D
F-BD	3	16	4	4	5	4	3	5	5
	13,04 %	69,57 %	17,39 %	30,77 %	38,46 %	30,77 %	23,08 %	38,46 %	38,46 %
	23			13			13		
M-BD	9	114	3	22	39	9	10	7	11
	7,14 %	90,48 %	2,38 %	31,43 %	55,71 %	12,86 %	35,71 %	25,00 %	39,29 %
	126			70			28		

ACA	19	82	14	21	20	14	6	1	2
	16,52 %	71,30 %	12,17 %	38,18 %	36,36 %	25,45 %	-	-	-
	115			55			9		
BD	12	130	7	26	44	13	13	12	16
	8,05 %	87,25 %	4,70 %	31,33 %	53,01 %	15,66 %	31,71 %	29,27 %	39,02 %
	149			83			41		

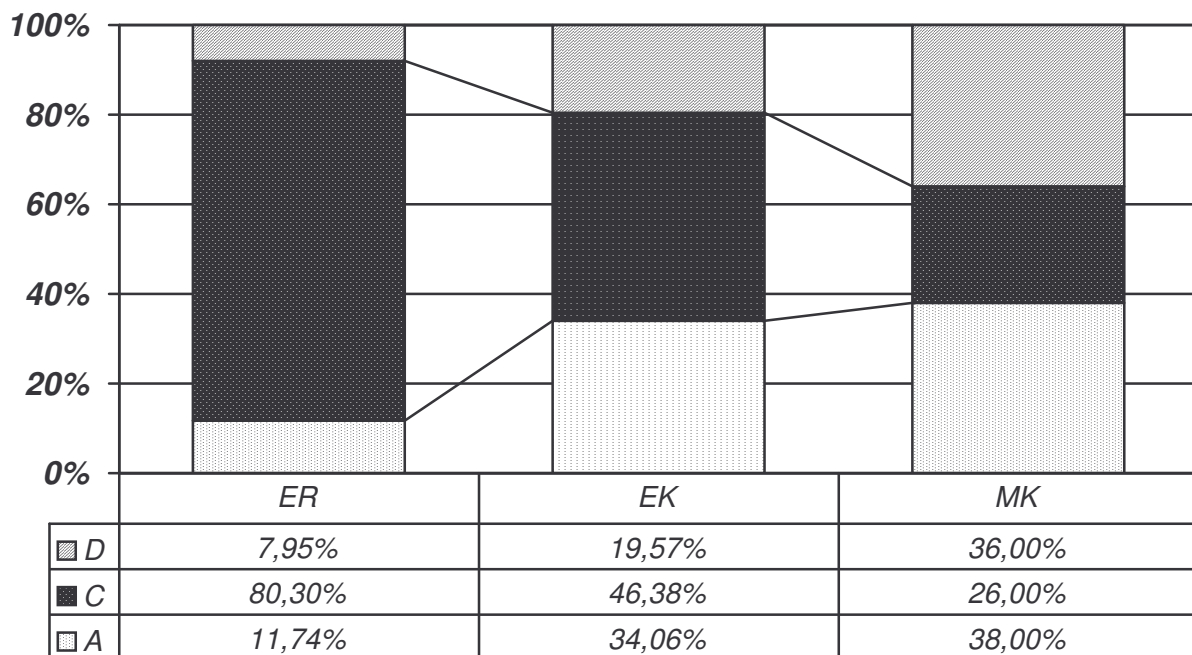


Diagramm 5: Anteil der Subtypen A, C und D bei Einfach-/Mehrfachinfektionen und bei reinen/rekombinanten Subtypen in der Non-High-Risk-Group (NRG).

Auffällig ist der unterschiedliche Anteil der HIV-1-Subtypen im Vergleich von Einfach- mit Mehrfachinfektionen und bei den Einfachinfektionen im Vergleich von reinen mit rekombinanten Subtypen. Bei den Einfachinfektionen mit reinen Subtypen (ER) ist der Subtyp C mit 80,30 % der dominierende, während bei den Einfachinfektionen mit rekombinanten Subtypen (EK) der Anteil auf 46,38 % und bei den Mehrfachinfektionen (MK) auf 26,00 % “sinkt”. Der Anteil der Subtypen A und D ist dementsprechend “ansteigend”. Liegt dieser bei den ER bei 11,74 % bzw. 7,95 %, “nehmen” die Anteile bei den EK auf 34,06 % bzw. 19,57 % und bei den MK auf 38,00 % bzw. 36,00 % “zu”.

4.2. Vergleich: Grundlegende soziologische Ergebnisse und molekularbiologische HIV-Ergebnisse des MHA

4.2.1. Risikogruppen

4.2.1.1. Vergleich: Risikogruppen und Einfach-/Mehrfachinfektionen

Von allen 341 HIV-positiven PBMC-Proben, die ich zwischen August 2000 und August 2001 für diese Dissertation in Mbeya Region gesammelt und bei denen ich eine Bestimmung des HIV-1-Subtyps mittels MHA durchgeführt habe, gelang die Bestimmung bei insgesamt 226 Proben in mindestens drei DNA-Regionen. Hierbei entfallen 102 Proben auf die HRG und 124 Proben auf die NRG (s. Kapitel 3.3. und 4.1.1.1.).

Tabelle 29: Vergleich der Anteile der Einfach-/Mehrfachinfektionen und der reinen/rekombinanten Subtypen in den verschiedenen Risikogruppen (s. Kapitel 4.1.2.1. und Kapitel 4.1.3.1.).

Risiko- gruppen	Anzahl der Proben	ER	EK	MK
		Einfachinfektion		Mehrfachinfekt.
		reine Subtypen	rekombinante Subtypen	
HRG	102	48	34	20
		47,06 %	33,33 %	19,61 %
NRG	124	74	39	11
		59,68 %	31,45 %	8,87 %
Total	226	122	73	31
		53,98 %	32,30 %	13,72 %

Hierbei konnte festgestellt werden, dass in der Mehrzahl dieser Proben (53,98 %) eine Einfachinfektionen mit einem reinen Subtyp (ER) vorliegt: in der HRG bei 47,06 %, in der NRG bei 59,68 %. Bei 32,30 % aller 226 Proben wurde eine Einfachinfektion mit einem rekombinanten Subtyp (EK) nachgewiesen, wobei die Unterschiede des relativen Anteils in der HRG (33,33 %) und der NRG (31,45 %) sehr gering waren. Bei 13,72 % dieser 226 Proben gelang die Bestimmung einer Mehrfachinfektion (MK), wobei ihre jeweilige Prävalenz bei der HRG (19,61 %) und bei der NRG (8,87 %) deutlich voneinander abwich.

4.2.1.1.1. Von allen Proben

Von allen 226 Proben konnte bei 195 eine Einfachinfektion nachgewiesen werden. Bei den restlichen 31 Proben (13,72 %) wurden Mehrfachinfektionen festgestellt, wobei der Anteil in der HRG (19,61 %) über doppelt so hoch war wie in der NRG (8,87 %).

Tabelle 30: Vierfeldertafel zum Vergleich der Risikogruppen und der Einfach-/Mehrfachinfektionen unter allen Proben. Die rote Markierung der Prozentangaben bedeutet, dass diese Werte signifikant über dem Mittelwert liegen.

Vierfeldertafel		MK	ER + EK
Risiko- gruppen	Anzahl der Proben	Mehrfachinfektion	Einfachinfektion
		rekombinante Subtypen	reine und rekombinante Subtypen
HRG	102	20 19,61 %	82 80,39 %
NRG	124	11 8,87 %	113 91,13 %
Total	226	31 13,72 %	195 86,28 %

Odds Ratio = OR = ω	2,51		<u>Ergebnis:</u> signifikant <u>Entscheidung:</u> Alternativhypothese wird angenommen
Cornfield 95% Konfidenz- Intervall für OR	1,07 < OR > 5,94		
Kritischer Wert ($\chi_{\text{krit.}}$) bei $f = 1$ und $\alpha = 5 \%$: 3,84146	Chi ² - Verteilung = χ^2	p-Wert = Irrtumswahr- scheinlichkeit	
Nicht korrigiert	5,45	0,0195552	
Mantel-Haenszel	5,43	0,0198271	

Die Irrtumswahrscheinlichkeit liegt deutlich unter 5 %. Der Konfidenzintervall beinhaltet nicht die Zahl 1. Damit kann die Nullhypothese verworfen werden. Die Alternativhypothese, die besagt, dass ein erhöhtes Risiko hinsichtlich des sexuellen Verhaltens (SRV) und ein erhöhtes Risiko für HIV-1-Mehrfachinfektion assoziiert sind, wird angenommen.

4.2.1.1.2. Von Proben mit rekombinanten Subtypen

Von den 226 Proben konnte bei 104 ein rekombinanter HIV-1-Subtyp nachgewiesen werden: 54 in der HRG und 50 in der NRG. Der Anteil der Mehrfachinfektionen beträgt 29,81 %, wobei dieser in der HRG mit 37,04 % deutlich höher ist als in der NRG mit 22,00 %. Die Alternativhypothese lautet, dass in der HRG die Träger mit rekombinanten HIV-1-Subtypen einen signifikant höheren Anteil an Mehrfachinfektionen aufweisen als in der NRG.

Tabelle 31: Vierfeldertafel zum Vergleich der Risikogruppen und der Einfach-/Mehrfachinfektionen unter allen Proben mit rekombinanten Subtypen. Die grüne Markierung der Prozentangaben bedeutet, dass diese Werte nicht signifikant über dem Mittelwert liegen.

Vierfeldertafel		MK	EK
Risiko- gruppen	Anzahl der Proben	Mehrfachinfektion	Einfachinfektion
		rekombinante Subtypen	
HRG	54	20	34
		37,04 %	62,96 %
NRG	50	11	39
		22,00 %	78,00 %
Total	104	31	73
		29,81 %	70,19 %

Odds Ratio = OR = ω	2,09		Ergebnis: nicht signifikant
Cornfield 95% Konfidenz- Intervall für OR	0,81 < OR > 5,45		
Kritischer Wert ($\chi_{\text{krit.}}$) bei $f = 1$ und $\alpha = 5 \%$: 3,84146	Chi ² - Verteilung = χ^2	p-Wert = Irrtumswahr- scheinlichkeit	Entscheidung: Nullhypothese kann nicht verworfen werden
Nicht korrigiert	2,81	0,0939314	
Mantel-Haenszel	2,78	0,0955259	

Die Irrtumswahrscheinlichkeit liegt deutlich über 5 %. Der Konfidenzintervall beinhaltet die Zahl 1. Damit kann die Nullhypothese nicht verworfen werden. Die Alternativhypothese wird nicht angenommen. Es konnte somit in dieser Studie nicht nachgewiesen werden, dass unter Trägern eines rekombinanten HIV-1-Subtyps ein erhöhtes SRV mit einem erhöhten Anteil an HIV-1-Mehrfachinfektion assoziiert ist.

4.2.1.2. Vergleich: Risikogruppen und reine/rekombinante Subtypen

4.2.1.2.1. Von allen Proben

Von den insgesamt 226 Proben konnten bei 104 Proben (46,02 %) rekombinante Subtypen detektiert werden, wobei der Anteil in der HRG (52,94 %) höher ist als in der NRG (40,32 %). Die Alternativhypothese lautet, dass die HRG einen signifikant höheren Anteil an Proben mit rekombinanten Subtypen aufweist als die NRG, d.h., ein erhöhtes SRV erhöht das Risiko, sich mit einem rekombinanten HI-Virus zu infizieren.

Table 32: Vierfeldertafel zum Vergleich der Risikogruppen und der reinen/rekombinanten Subtypen unter allen Proben. Die grüne Markierung der Prozentangaben bedeutet, dass diese Werte nicht signifikant über dem Mittelwert liegen.

Vierfeldertafel		EK + MK	ER
Risiko- gruppen	Anzahl der Proben	Einfach- und Mehrfachinfektion	Einfachinfektion
		rekombinante Subtypen	reine Subtypen
HRG	102	54 52,94 %	48 47,06 %
NRG	124	50 40,32 %	74 59,68 %
Total	226	104 46,02 %	122 53,98 %

Odds Ratio = OR = ω	1,67		<u>Ergebnis:</u> nicht signifikant <u>Entscheidung:</u> Nullhypothese kann nicht verworfen werden
Cornfield 95% Konfidenz- Intervall für OR	0,95 < OR > 2,93		
Kritischer Wert ($\chi_{\text{krit.}}$) bei $f = 1$ und $\alpha = 5\%$: 3,84146	Chi ² - Verteilung = χ^2	p-Wert = Irrtumswahr- scheinlichkeit	
Nicht korrigiert	3,59	0,0582252	
Mantel-Haenszel	3,57	0,0587843	

Die Irrtumswahrscheinlichkeit liegt über 5 %. Der Konfidenzintervall beinhaltet die Zahl 1. Damit kann die Nullhypothese nicht verworfen werden. Die Alternativhypothese wird nicht angenommen.

4.2.1.2.2. Von Proben mit Einfachinfektionen

Von den 226 Proben konnte bei 195 eine HIV-1-Einfachinfektion nachgewiesen werden: 82 in der HRG und 113 in der NRG. Der Anteil der rekombinanten Subtypen beträgt 37,44 %, wobei dieser in der HRG mit 41,46 % höher ist als in der NRG mit 34,51 %. Die Alternativhypothese lautet, dass die HRG einen signifikant höheren Anteil von rekombinanten Subtypen unter den Trägern von HIV-1-Einfachinfektionen aufweist als die NRG.

Tabelle 33: Vierfeldertafel zum Vergleich der Risikogruppen und der reinen/rekombinanten Subtypen unter allen Proben mit Einfachinfektionen. Die grüne Markierung der Prozentangaben bedeutet, dass diese Werte nicht signifikant über dem Mittelwert liegen.

Vierfeldertafel		EK	ER
Risiko- gruppen	Anzahl der Proben	Einfachinfektion	
		rekombinante Subtypen	reine Subtypen
HRG	82	34	48
		41,46 %	58,54 %
NRG	113	39	74
		34,51 %	65,49 %
Total	195	73	122
		37,44 %	62,56 %

Odds Ratio = OR = ω	1,34		<u>Ergebnis:</u> nicht signifikant <u>Entscheidung:</u> Nullhypothese kann nicht verworfen werden
Cornfield 95% Konfidenz- Intervall für OR	0,72 < OR > 2,52		
Kritischer Wert ($\chi_{\text{krit.}}$) bei $f = 1$ und $\alpha = 5\%$: 3,84146	Chi ² - Verteilung = χ^2	p-Wert = Irrtumswahr- scheinlichkeit	
Nicht korrigiert	0,98	0,3221959	
Mantel-Haenszel	0,97	0,3234398	

Die Irrtumswahrscheinlichkeit liegt deutlich über 5 %. Der Konfidenzintervall beinhaltet die Zahl 1. Damit kann die Nullhypothese nicht verworfen werden. Die Alternativhypothese wird nicht angenommen.

4.2.1.3. Vergleich: Risikogruppen und Subtypen-Verteilung

Von den 226 Proben, in denen die HIV-1-Subtypen in mindestens drei DNA-Regionen bestimmt werden konnten, zeigt sich folgende HIV-1-Subtypen-Verteilung bei den Einfach-/Mehrfachinfektionen und bei reinen/rekombinanten Subtypen in der HRG und in der NRG:

Tabelle 34 (s.a. Kapitel 4.1.2.2.1. und Kapitel 4.1.3.2.1.): Vergleich der Verteilung der HIV-1-Subtypen in beiden Risikogruppen. Die rote Markierung bedeutet einen signifikant höheren Anteil der MK in der HRG (s. Kapitel 4.2.1.1.1.). Die orangefarbene Markierung bedeutet einen grenzwertig signifikant erhöhten Anteil der Rekombinante A/C bei den MK in der HRG und einen grenzwertig signifikant erhöhten Anteil der Rekombinante CD bei den EK in der NRG. Irrtumswahrscheinlichkeit $\alpha = 5\%$.

Risiko- gruppen	ER			EK				MK			
	Einfachinfektion							Mehrfachinfektion			
	reine Subtypen			rekombinante Subtypen							
	A	C	D	AC	AD	CD	ACD	A/C	A/D	C/D	A/C/D
HRG	10	36	2	20	5	3	6	12*	3,5*	3,5*	1
	20,83 %	75,00 %	4,17 %	58,82 %	14,71 %	8,82 %	17,65 %	60,00 %	17,50 %	17,50 %	5,00 %
	48 (47,06 %)			34 (33,33 %)				20 (19,61 %)			
	102 (100 %)										
NRG	10	58	6	21	3	11	4	3	4	4	-
	13,51 %	78,38 %	8,11 %	53,85 %	7,69 %	28,21 %	10,26 %	27,27 %	36,36 %	36,36 %	-
	74 (59,68 %)			39 (31,45 %)				11 (8,87 %)			
	124 (100 %)										
Total	20	94	8	41	8	14	10	15	7,5*	7,5*	1
	16,39 %	77,05 %	6,56 %	56,16 %	10,96 %	19,18 %	13,70 %	48,39 %	24,19 %	24,19 %	3,23 %
	122 (53,98 %)			73 (32,30 %)				31 (13,72 %)			
	226 (100 %)										

* Bei zwei Proben von *bar workers* (BA) konnten jeweils zwei verschiedene Zweifachinfektionen mittels MHA nachgewiesen werden: A/C und A/D sowie A/C und C/D.

4.2.1.3.1. Von Proben mit Einfachinfektion mit reinen Subtypen

Wie in gegenüberliegender Tabelle 34 ersichtlich, wurden bei 122 (53,98 %) der insgesamt 226 Proben mittels MHA eine Einfachinfektion mit einem reinen Subtyp (ER) nachgewiesen. Aufgeteilt nach den drei Subtypen, ergeben sich relativ geringe unterschiedliche Prävalenzen zwischen der HRG und der NRG.

Die Prävalenz für Subtyp A ist bei den ER in der HRG mit 20,83 % höher als in der NRG mit 13,51 %. Der Unterschied ist nicht signifikant ($p = 0,286$).

Die Prävalenz für Subtyp C ist bei den ER in der NRG mit 78,38 % höher als in der HRG mit 75,00 %. Der Unterschied ist nicht signifikant ($p = 0,665$).

Die Prävalenz für Subtyp D ist bei den ER in der NRG mit 8,11 % höher als in der HRG mit 4,17 %. Der Unterschied ist nicht signifikant ($p = 0,390$).

Bei den 122 Proben mit einer HIV-1-Einfachinfektion mit einem reinen HIV-1-Subtyp konnte keine Korrelation zwischen dem sexuellen Risikoverhalten in beiden Risikogruppen (HRG, NRG) einerseits und der HIV-1-Subtypen-Verteilung (Subtypen A, C und D) andererseits nachgewiesen werden.

4.2.1.3.2. Von Proben mit Einfachinfektion mit rekombinanten Subtypen

Wie in gegenüberliegender Tabelle 34 ersichtlich, wurden bei 73 (32,30 %) der insgesamt 226 Proben mittels MHA eine Einfachinfektion mit einem rekombinanten Subtyp (EK) nachgewiesen. Aufgeteilt nach den vier möglichen Rekombinationen (AC, AD, CD, ACD), ergeben sich teilweise Unterschiede in den Prävalenzen der HRG und der NRG.

Die Prävalenz für die Rekombinante AC ist bei den EK in der HRG mit 58,82 % höher als in der NRG mit 53,85 %. In den 34 EK-Proben der HRG konnte der Subtyp D in 14 Proben (41,18 %) nachgewiesen werden. In den 39 EK-Proben der NRG konnte der Subtyp D in 18 Proben (46,15 %) nachgewiesen werden. Der Unterschied ist nicht signifikant ($p = 0,669$).

Die Prävalenz für die Rekombinante AD ist bei den EK in der HRG mit 14,71 % höher als in der NRG mit 7,69 %. In den 34 EK-Proben der HRG konnte der Subtyp C in 29 Proben (85,29 %) nachgewiesen werden. In den 39 EK-Proben der NRG konnte der Subtyp C in 36 Proben (92,31 %) nachgewiesen werden. Der Unterschied ist nicht signifikant ($p = 0,339$).

Die Prävalenz für die Rekombinante CD ist bei den EK in der NRG mit 28,21 % höher als in der HRG mit 8,82 %. In den 34 EK-Proben der HRG konnte der Subtyp A in 31 Proben (91,18 %) nachgewiesen werden. In den 39 EK-Proben der NRG konnte der Subtyp A in 28 Proben (71,79 %) nachgewiesen werden. Die Irrtumswahrscheinlichkeit liegt unter 5 % ($p = 0,03589$). Die OR beträgt 4,06, wobei das Konfidenzintervall (0,91-20,62) die Zahl 1 enthält. Der Unterschied ist grenzwertig signifikant.

Die Alternativhypothese lautet: Ein erhöhtes SRV erhöht die Wahrscheinlichkeit, sich mit einer HIV-1-Rekombination mit dem Subtyp A zu infizieren. Diese Alternativhypothese konnte nicht angenommen werden, da die Nullhypothese nicht verworfen werden kann.

Die Prävalenz für die Rekombinante ACD ist bei den EK in der HRG mit 17,65 % höher als in der NRG mit 10,26 %. Der Unterschied ist nicht signifikant ($p = 0,360$).

4.2.1.3.3. Von Proben mit Mehrfachinfektionen

Wie in Tabelle 34 (s. Kapitel 4.2.1.3.) ersichtlich, wurden bei 31 (13,72 %) der insgesamt 226 Proben mittels MHA eine Mehrfachinfektion (MK) nachgewiesen. Aufgeteilt nach den drei möglichen Zweifachinfektionen (A/C, A/D, C/D) und einer Dreifachinfektion (A/C/D), ergeben sich teilweise stark unterschiedliche Prävalenzen zwischen der HRG und der NRG.

Die Prävalenz für die Zweifachinfektion A/C ist bei den MK in der HRG mit 60,00 % höher als in der NRG mit 27,27 %. Die Irrtumswahrscheinlichkeit liegt unter 5 % ($p = 0,04431$). Die OR beträgt 4,95, wobei das Konfidenzintervall (0,79-34,90) die Zahl 1 enthält. Der Unterschied ist grenzwertig signifikant.

Die Prävalenz für die Zweifachinfektion A/D ist bei den MK in der NRG mit 36,36 % höher als in der HRG mit 17,50 %. Der Unterschied ist nicht signifikant ($p = 0,319$).

Die Prävalenz für die Zweifachinfektion C/D ist bei den MK in der NRG mit 36,36 % höher als in der HRG mit 17,50 %. Der Unterschied ist nicht signifikant ($p = 0,319$).

Die Prävalenz für die Dreifachinfektion A/C/D ist bei den MK in der HRG mit 5,00 % höher als in der NRG, in der keine Dreifachinfektion detektiert wurde. Der Unterschied ist nicht signifikant ($p = 0,451$).

Aufgeteilt nach den einzelnen Subtypen ergibt sich bei der Verteilung derselben bei den MK folgendes Bild:

In den 20 MK-Proben der HRG konnte der Subtyp A in 16,5 Proben (82,50 %) nachgewiesen werden. In den elf MK-Proben der NRG konnte der Subtyp A in sieben Proben (63,64 %) nachgewiesen werden. Der Unterschied ist nicht signifikant ($p = 0,408$).

In den 20 MK-Proben der HRG konnte der Subtyp C in 16,5 Proben (82,50 %) nachgewiesen werden. In den elf MK-Proben der NRG konnte der Subtyp C in sieben Proben (63,64 %) nachgewiesen werden. Der Unterschied ist nicht signifikant ($p = 0,064$).

In den 20 MK-Proben der HRG konnte der Subtyp D in acht Proben (40,00 %) nachgewiesen werden. In den elf MK-Proben der NRG konnte der Subtyp D in acht Proben (72,73 %) nachgewiesen werden. Der Unterschied ist nicht signifikant ($p = 0,138$).

4.2.2. Geschlechterverteilung

Ein geschlechtsspezifischer Unterschied bei den molekularbiologisch mittels MHA ermittelten HIV-Ergebnissen kann nur in der Populationsgruppe der Blutspender (*blood donor*, BD) erfolgen, da die Risikogruppe HRG (Prostituierte) und natürlicherweise auch die Populationsgruppe der ACA (*antenatal clinic attendees*) ausschließlich aus Frauen besteht. Dadurch ist der Stichprobenumfang relativ klein, sodass der Vergleich der molekularbiologischen HIV-Ergebnisse bei den männlichen und weiblichen Blutspendern (M-BD bzw. F-BD) begrenzt aussagekräftig ist.

In der Risikogruppe NRG konnten 124 PBMC-Proben gewonnen werden, bei denen der HIV-1-Subtyp in mindestens drei DNA-Regionen bestimmt werden konnte (s. Kapitel 4.1.3.1.). Davon waren 13 Proben von F-BD und 59 von M-BD. Hierbei handelte es sich bei 55,56 % um Einfachinfektionen mit reinem Subtyp (ER), bei 31,94 % um Einfachinfektionen mit rekombinanten Subtyp (EK) und bei 12,50 % um Mehrfachinfektionen (MK).

Tabelle 35: Anzahl der PBMC-Proben von weiblichen und männlichen Blutspendern (F-BD bzw. M-BD), bei denen mittels MHA in mindestens drei DNA-Regionen ein oder mehrere Subtypen bestimmt werden konnten, aufgeteilt nach Einfach-/Mehrfachinfektionen und nach reinen/rekombinanten Subtypen.

Risiko- gruppen	Anzahl der Proben	ER	EK	MK
		Einfachinfektion		Mehrfachinf.
		reine Subtypen	rekombinante Subtypen	
	13	6	4	3
		46,15 %	30,77 %	23,08 %
M-BD	59	34	19	6
		57,63 %	32,20 %	10,17 %
BD	72	40	23	9
		55,56 %	31,94 %	12,50 %

4.2.2.1. Vergleich: Geschlechterverteilung und Einfach-/Mehrfachinfektionen

Von den insgesamt 226 Proben konnten 72 von BD (13 von Frauen, 59 von Männern) gewonnen werden. Davon konnten bei neun Proben Mehrfachinfektionen (drei von Frauen, sechs von Männern) nachgewiesen werden. Die Prävalenz von Mehrfachinfektionen ist demzufolge bei den F-BD mit 23,08 % höher als bei den M-BD mit 10,17 %. Die daraus abgeleitete Alternativhypothese lautet: Unter den BD haben Frauen ein höheres Risiko als Männer, sich mehrfach mit HIV-1 zu infizieren.

Tabelle 36: Vierfeldertafel zum Vergleich der M-BD/F-BD und der Einfach-/Mehrfachinfektionen. Die grüne Markierung der Prozentangaben bedeutet, dass diese Werte nicht signifikant über dem Mittelwert liegen.

Vierfeldertafel		MK	ER + EK
Risiko- gruppen	Anzahl der Proben	Mehrfachinfektion	Einfachfachinfektion
		rekombinante Subtypen	reine und rekombinante Subtypen
F-BD	13	3	10
		23,08 %	76,92 %
M-BD	59	6	53
		10,17 %	89,83 %
BD	72	9	63
		12,50 %	87,50 %

Odds Ratio = OR = ω	2,65		<u>Ergebnis:</u> nicht signifikant <u>Entscheidung:</u> Nullhypothese kann nicht verworfen werden
Cornfield 95% Konfidenz- Intervall für OR	0,43 < OR > 15,23		
Kritischer Wert ($\chi_{\text{krit.}}$) bei $f = 1$ und $\alpha = 5\%$: 3,84146	Chi ² - Verteilung = χ^2	p-Wert = Irrtumswahr- scheinlichkeit	
Nicht korrigiert	1,62	0,2027229	
Mantel-Haenszel	1,60	0,2058874	

Die Irrtumswahrscheinlichkeit liegt deutlich über 5 %. Der Konfidenzintervall beinhaltet die Zahl 1. Damit kann die Nullhypothese nicht verworfen werden. Die Alternativhypothese wird nicht angenommen. Unter den BD haben Frauen kein höheres Risiko als Männer, sich mehrfach mit HIV-1 zu infizieren.

4.2.2.2. Vergleich: Geschlechterverteilung und reine/rekombinante Subtypen

Von allen 226 Proben konnten 72 von BD (13 von Frauen, 59 von Männern) gewonnen werden. Davon konnten bei 32 Proben (44,44 %) rekombinante Subtypen detektiert werden, wobei der Anteil in der HRG mit 53,85 % höher ist als in der NRG mit 42,37 %. Die Alternativhypothese lautet, dass unter den BD Frauen ein höheres Risiko als Männer haben, sich mit rekombinanten HIV-1 zu infizieren.

Tabelle 37: Vierfeldertafel zum Vergleich der M-BD/F-BD und der reinen/rekombinanten Subtypen. Die grüne Markierung der Prozentangaben bedeutet, dass diese Werte nicht signifikant über dem Mittelwert liegen.

Vierfeldertafel		EK + MK	ER
Risiko- gruppen	Anzahl der Proben	Einfach- und Mehrfachinfektion	Einfachinfektion
		rekombinante Subtypen	reine Subtypen
F-BD	13	7	6
		53,85 %	46,15 %
M-BD	59	25	34
		42,37 %	57,63 %
BD	72	32	40
		44,44 %	55,56 %

Odds Ratio = OR = ω	1,59		<u>Ergebnis:</u> nicht signifikant <u>Entscheidung:</u> Nullhypothese kann nicht verworfen werden
Cornfield 95% Konfidenz- Intervall für OR	0,41 < OR > 6,21		
Kritischer Wert ($\chi_{\text{krit.}}$) bei $f = 1$ und $\alpha = 5\%$: 3,84146	Chi ² - Verteilung = χ^2	p-Wert = Irrtumswahr- scheinlichkeit	
Nicht korrigiert	0,57	0,4510839	
Mantel-Haenszel	0,56	0,4542445	

Die Irrtumswahrscheinlichkeit liegt deutlich über 5 %. Der Konfidenzintervall beinhaltet die Zahl 1. Damit kann die Nullhypothese nicht verworfen werden. Die Alternativhypothese wird nicht angenommen. Unter den BD haben Frauen kein höheres Risiko als Männer, sich mit rekombinanten HIV-1 zu infizieren.

4.2.2.3. Vergleich: Geschlechterverteilung und Subtypen-Verteilung

In den 72 Proben der BD, bei denen die HIV-1-Subtypen in mindestens drei DNA-Regionen bestimmt werden konnten, zeigt sich folgende HIV-1-Subtypen-Verteilung bei den Einfach-/Mehrfachinfektionen und bei den reinen/rekombinanten Subtypen (s.a. Tabelle 38, Kapitel 4.1.3.1.). Die HIV-1-Subtypen-Verteilung ist zwischen den M-BD und F-BD teilweise sehr verschieden. Aufgrund des geringen Stichprobenumfanges sind die Resultate begrenzt aussagekräftig und wahrscheinlich dadurch bedingt konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

Tabelle 38: HIV-1-Subtypen-Verteilung unter den ER, EK und MK bei den M-BD und F-BD. Es konnten geschlechtsspezifisch keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

Risiko- gruppen	ER			EK				MK		
	Einfachinfektion							Mehrfachinfektion		
	reine Subtypen			rekombinante Subtypen						
	A	C	D	AC	AD	CD	ACD	A/C	A/D	C/D
F-BD	1	4	1	1	1	1	1	-	2	1
	16,67 %	66,67 %	16,67 %	25,00 %	25,00 %	25,00 %	25,00 %	-	66,67 %	33,33 %
	6 (46,15 %)			4 (30,77 %)				3 (23,08 %)		
	13 (100 %)									
M-BD	3	30	1	13	1	5	-	2	2	2
	8,82 %	88,24 %	2,94 %	68,42 %	5,26 %	26,32 %	-	33,33 %	33,33 %	33,33 %
	34 (57,63 %)			19 (32,20 %)				6 (10,17 %)		
	59 (100 %)									
BD	4	34	2	14	2	6	1	2	4	3
	10,00 %	85,00 %	5,00 %	60,87 %	8,70 %	26,09 %	4,35 %	22,22 %	44,44 %	33,33 %
	40 (55,56 %)			23 (31,94 %)				9 (12,50 %)		
	72 (100 %)									

4.2.3. Altersverteilung

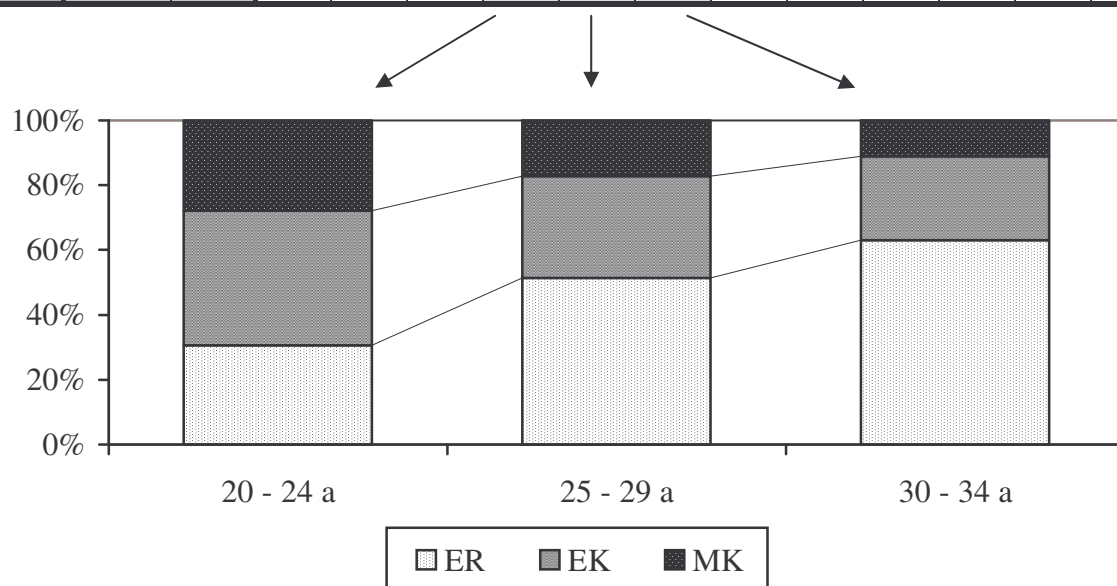
Auf den folgenden Seiten sind die Altersverteilungen aller 213 Teilnehmer aus beiden Risikogruppen (98 aus der HRG, 115 aus der NRG) dargestellt, von denen PBMC-Proben mit Einfachinfektionen mit reinen Subtypen (ER), mit Einfachinfektionen mit rekombinanten Subtypen (EK) und mit Mehrfachinfektionen (MK) gewonnen wurden. Hierbei wurden nur die PBMC-Proben berücksichtigt, in denen mindestens in drei DNA-Regionen die HIV-1-Subtypen mittels MHA bestimmt werden konnten.

4.2.3.1. High-Risk-Group (HRG)

Wie in der folgenden Tabelle dargestellt, ist der Anteil der HRG-Proben mit Einfachinfektionen mit reinen Subtypen (ER), mit Einfachinfektionen mit rekombinanten Subtypen (EK) und mit Mehrfachinfektionen (MK) in den verschiedenen Altersgruppen relativ unterschiedlich. Auffällig ist, dass mit ansteigendem Alter der Anteil an ER zu- und der Anteil an EK und MK abnimmt.

Tabelle 39 und Diagramm 6: Anzahl und Anteile [%] der HRG-Proben mit ER, EK und MK in verschiedenen Altersgruppen [a].

Risiko- gruppe	Art der Inf.	n	Altersgruppen [a]											
			un- bek.	<15	15 - 19	20 - 24	25 - 29	30 - 34	35 - 39	40 - 44	45 - 49	50 - 54	55 - 59	60 - 64
HRG	ER	48			1	11	18	17	1					
	EK	34				15	11	7	1					
	MK	20			1	10	6	3						
	Total	102			2	36	35	27	2					
	Total	100				100	100	100						
	ER	47,1				30,6	51,4	63,0						
	EK	33,3				41,7	31,4	25,9						
	MK	19,6				27,8	17,1	11,1						



4.2.3.1.1. Vergleich: Altersverteilung und Einfach-/Mehrfachinfektionen

In der HRG wurden 102 Proben gewonnen, bei denen in mindestens drei DNA-Regionen der HIV-1-Subtyp mittels MHA bestimmt werden konnte. 98 von diesen 102 Studienteilnehmern waren während der Blutentnahme im Alter zwischen 20 und 34 Jahren.

In dieser Altersspanne liegt der Anteil der HIV-1-Einfachinfektionen bei 80,61 % und jener der HIV-1-Mehrfachinfektionen bei 19,39 %. Der Anteil der Mehrfachinfektionen ist in der Altersgruppe der 20- bis 24-jährigen Prostituierten höher, in den Altersgruppen der 25- bis 29-jährigen und der 30- bis 34-jährigen niedriger als der Durchschnittswert. Alternativhypothese: Das Alter beeinflusst signifikant den Anteil von HIV-1-Einfach- und -Mehrfachinfektionen in der HRG.

Tabelle 40: Sechsfeldertafel zum Vergleich der drei Altersgruppen der HRG und der Einfach-/Mehrfachinfektionen. Die grüne Markierung der Prozentangaben bedeutet, dass diese Werte nicht signifikant über dem Mittelwert liegen.

Altersgruppen	ER + EK	MK	Total
20 - 24	26	10	36
	72,22 %	27,78 %	100 %
25 - 29	29	6	35
	82,86 %	17,14 %	100 %
30 - 34	24	3	27
	88,89 %	11,11 %	100 %
Total	79	19	98
	80,61 %	19,39 %	100 %

Kritischer Wert ($\chi_{\text{krit.}}$) bei $f = 2$ und $\alpha = 5 \%$: 5,99147	Chi ² - Verteilung = χ^2	p-Wert = Irrtumswahr- scheinlichkeit	<u>Ergebnis:</u> nicht signifikant
	2,92	0,23250014	<u>Entscheidung:</u> Nullhypothese kann nicht verworfen werden

Die Irrtumswahrscheinlichkeit liegt deutlich über 5 %. Damit kann die Nullhypothese nicht verworfen werden. Die Alternativhypothese wird nicht angenommen.

4.2.3.1.2. Vergleich: Altersverteilung und reine / rekombinante Subtypen

In der Altersspanne von 20 bis 34 Jahren liegt der Anteil der Proben mit reinen Subtypen bei 46,94 % und jener mit rekombinanten Subtypen bei 53,06 %. Der Anteil der Proben mit rekombinanten Subtypen ist in der Altersgruppe der 20- bis 24-jährigen Prostituierten höher, in den Altersgruppen der 25- bis 29-jährigen und der 30- bis 34-jährigen niedriger als der Durchschnittswert. Alternativhypothese: Das Alter beeinflusst signifikant den Anteil von reinen und rekombinanten Subtypen in der HRG.

Tabelle 41: Sechsfeldertafel zum Vergleich der drei Altersgruppen der HRG und der reinen/rekombinanten Subtypen. Die rote bzw. grüne Markierung der Prozentangaben bedeutet, dass diese Werte signifikant bzw. nicht signifikant über dem Mittelwert liegen.

Altersgruppen	ER	EK + MK	Total
20 - 24	11	25	36
	30,56 %	69,44 %	100 %
25 - 29	18	17	35
	51,43 %	48,57 %	100 %
30 - 34	17	10	27
	62,96 %	37,04 %	100 %
Total	46	52	98
	46,94 %	53,06 %	100 %

Kritischer Wert ($\chi_{\text{krit.}}$) bei $f = 2$ und $\alpha = 5 \%$: 5,99147	Chi ² - Verteilung = χ^2	p-Wert = Irrtumswahr- scheinlichkeit	<u>Ergebnis:</u> Signifikant
	6,95	0,03101572	<u>Entscheidung:</u> Alternativhypothese wird angenommen

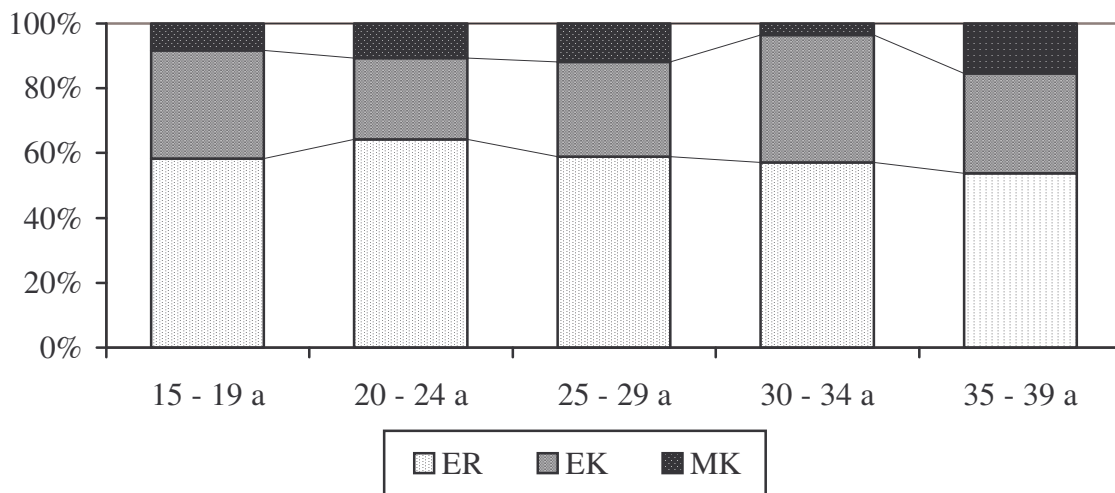
Die Irrtumswahrscheinlichkeit liegt unter 5 %. Damit kann die Nullhypothese verworfen werden. Die Alternativhypothese wird angenommen: Jüngere Prostituierte (im Alter von 20 bis 24 Jahren) haben einen signifikant höheren Anteil an rekombinanten HIV-1-Subtypen als ältere Prostituierte (im Alter von 25 bis 34 Jahren).

4.2.3.2. Non-High-Risk-Group (NRG)

Wie in den folgenden Tabellen dargestellt, sind die Anteile der NRG-Proben mit Einfachinfektionen mit reinen Subtypen (ER), mit Einfachinfektionen mit rekombinanten Subtypen (EK) und mit Mehrfachinfektionen (MK) in den verschiedenen Altersgruppen relativ ähnlich. Eine Tendenz bezüglich deren Anteile in Abhängigkeit vom Alter, wie sie in der HRG zu erkennen ist (s. Kapitel 4.2.3.1.), konnte in der NRG nicht festgestellt werden.

Tabelle 42 und Diagramm 7: Anzahl und Anteile [%] der NRG-Proben mit ER, EK und MK in verschiedenen Altersgruppen [a].

Risiko- gruppe	Art der Inf.	n	Altersgruppen [a]											
			un- bek.	<15	15 - 19	20 - 24	25 - 29	30 - 34	35 - 39	40 - 44	45 - 49	50 - 54	55 - 59	60 - 64
NRG	ER	74			7	18	20	16	7	4	1		1	
	EK	39	1		4	7	10	11	4	1	1			
	MK	11			1	3	4	1	2					
	Total	124	1		12	28	34	28	13	5	2		1	
	Total	100			100	100	100	100	100					
	ER	59,7			58,3	64,3	58,8	57,1	53,8					
	EK	31,5			33,3	25,0	29,4	39,3	30,8					
	MK	8,9			8,3	10,7	11,8	3,6	15,4					



4.2.3.2.1. Vergleich: Altersverteilung und Einfach-/Mehrfachinfektionen

In der NRG wurden 124 Proben gewonnen, bei denen in mindestens drei DNA-Regionen der HIV-1-Subtyp mittels MHA bestimmt werden konnte. Bei 115 von diesen 124 Studienteilnehmern wurde zum Zeitpunkt der Blutentnahme ein Alter von 15 bis 39 Jahren registriert. In dieser Altersspanne liegt der Anteil der HIV-1-Einfachinfektionen bei 90,43 % und jener der HIV-1-Mehrfachinfektionen bei 9,57 %. Der Anteil der Mehrfachinfektionen ist in der Altersgruppe der 20- bis 24-jährigen, 25- bis 29-jährigen und 35- bis 39-jährigen NRG-Studienteilnehmer höher, in den Altersgruppen der 15- bis 19-jährigen und der 30- bis 34-jährigen niedriger als der Durchschnittswert. Alternativhypothese: Das Alter beeinflusst signifikant den Anteil von HIV-1-Einfach- und -Mehrfachinfektionen in der NRG.

Tabelle 43: Zehnfeldertafel zum Vergleich der fünf Altersgruppen der NRG und der Einfach-/Mehrfachinfektionen. Die grüne Markierung der Prozentangaben bedeutet, dass diese Werte nicht signifikant über dem Mittelwert liegen.

Altersgruppen	ER + EK	MK	Total
15 - 19	11	1	12
	91,67 %	8,33 %	100 %
20 - 24	25	3	28
	89,29 %	10,71 %	100 %
25 - 29	30	4	34
	88,24 %	11,76 %	100 %
30 - 34	27	1	28
	96,43 %	3,57 %	100 %
35 - 39	11	2	13
	84,62 %	15,38 %	100 %
Total	104	11	115
	90,43 %	9,57 %	100 %

Kritischer Wert ($\chi_{\text{krit.}}$) bei $f = 4$ und $\alpha = 5$ %: 9,48773	Chi ² - Verteilung = χ^2	p-Wert = Irrtumswahr- scheinlichkeit	<u>Ergebnis:</u> nicht signifikant
	1,93	0,74941324	<u>Entscheidung:</u> Nullhypothese kann nicht verworfen werden

Die Irrtumswahrscheinlichkeit liegt deutlich über 5 %. Damit kann die Nullhypothese nicht verworfen werden: Es konnte nicht nachgewiesen werden, dass das Alter den Anteil von HIV-1-Einfach- und -Mehrfachinfektionen in der NRG beeinflusst. Die Alternativhypothese wird nicht angenommen.

4.2.3.2.2. Vergleich: Altersverteilung und reine / rekombinante Subtypen

In der Altersspanne von 15 bis 39 Jahren liegt der Anteil der Proben mit reinen Subtypen bei 59,13 % und jener mit rekombinanten Subtypen bei 40,87 %. Der Anteil der Proben mit rekombinanten Subtypen ist in der Altersgruppe der 20- bis 24-jährigen NRG-Studienteilnehmer niedriger, in allen anderen Altersgruppen höher als der Durchschnittswert. Alternativhypothese: Das Alter beeinflusst signifikant den Anteil von reinen und rekombinanten Subtypen in der NRG.

Tabelle 44: Zehnfeldertafel zum Vergleich der fünf Altersgruppen der NRG und der reinen/rekombinanten Subtypen. Die grüne Markierung der Prozentangaben bedeutet, dass diese Werte nicht signifikant über dem Mittelwert liegen.

Altersgruppen	ER	EK + MK	Total
15 - 19	7	5	12
	58,33 %	41,67 %	100 %
20 - 24	18	10	28
	64,29 %	35,71 %	100 %
25 - 29	20	14	34
	58,82 %	41,18 %	100 %
30 - 34	16	12	28
	57,14 %	42,86 %	100 %
35 - 39	7	6	13
	53,85 %	46,15 %	100 %
Total	68	47	115
	59,13 %	40,87 %	100 %

Kritischer Wert ($\chi_{\text{krit.}}$) bei $f = 4$ und $\alpha = 5 \%$: 9,48773	Chi ² - Verteilung = χ^2	p-Wert = Irrtumswahr- scheinlichkeit	<u>Ergebnis:</u> nicht signifikant
	0,51	0,97267879	<u>Entscheidung:</u> Nullhypothese kann nicht verworfen werden

Die Irrtumswahrscheinlichkeit liegt deutlich über 5 %. Damit kann die Nullhypothese nicht verworfen werden: Es konnte nicht nachgewiesen werden, dass das Alter den Anteil von reinen und rekombinanten HIV-1-Subtypen in der NRG signifikant beeinflusst. Die Alternativhypothese wird nicht angenommen.

4.3. Vergleich: HIV-1-Subtypen-Bestimmung mittels MHA und mittels HIV-Gesamtgenom-Sequenzierung

4.3.1. Ergebnisse der HIV-Gesamtgenom-Sequenzierung

Die HIV-Gesamtgenom-Sequenzierung gilt als Goldstandard bei der Bestimmung von HIV-1-Subtypen (s. Kapitel 1.3.2.). Unter einer Sequenzierung versteht man die Bestimmung der Primärstruktur (Reihenfolge der Basen der Nukleotide) der Nukleinsäuren DNA und RNA.

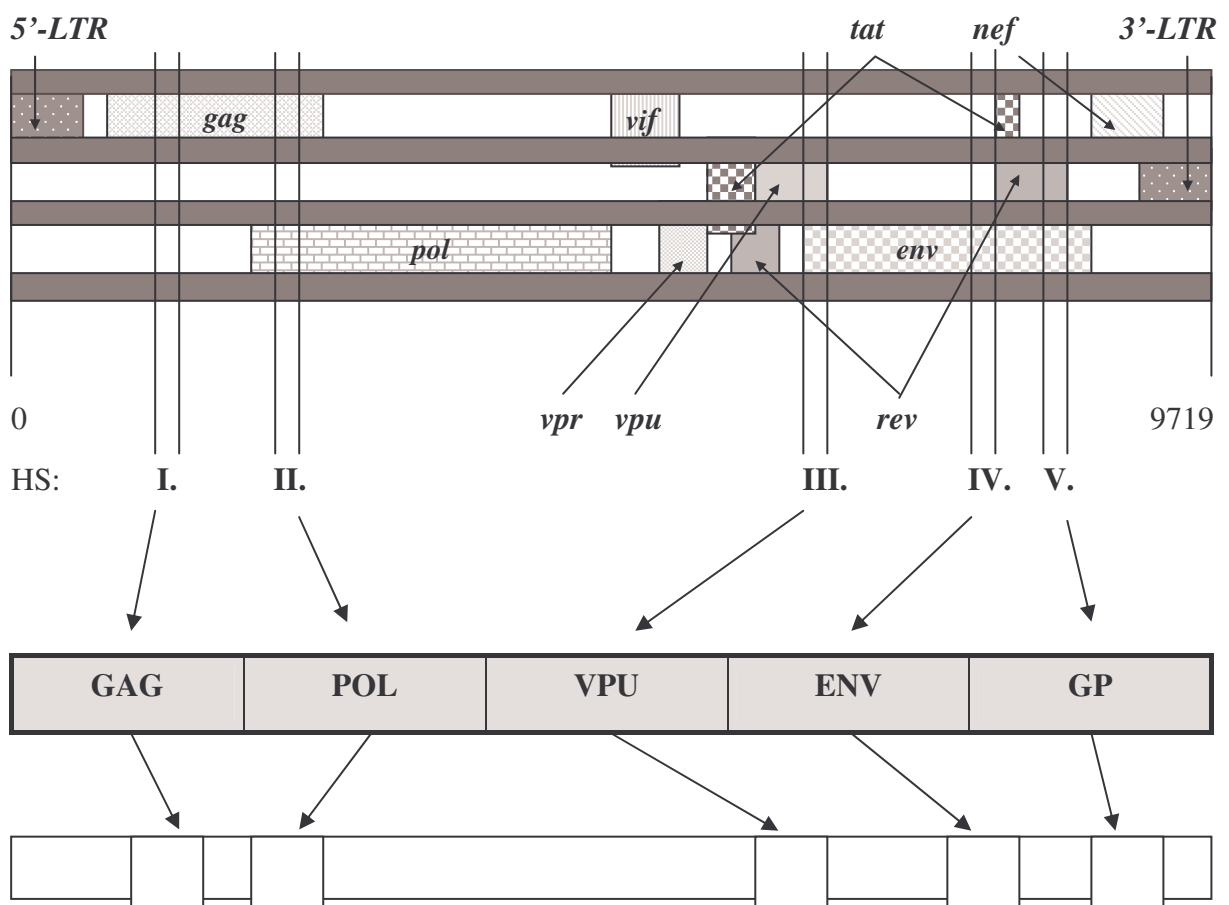
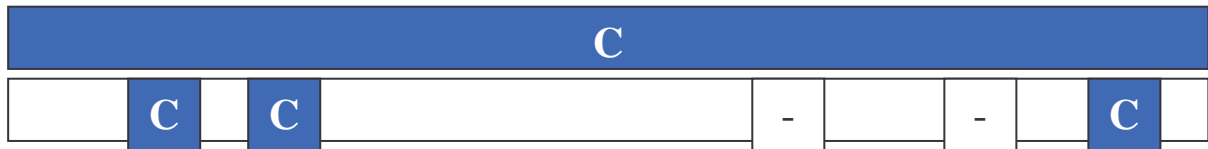


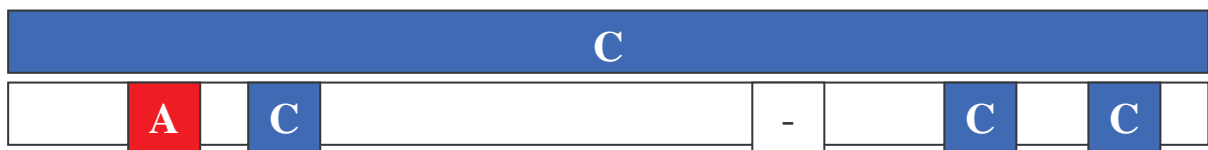
Abbildung 29: Vergleich der Ergebnisse der HIV-1-Subtypen-Bestimmung, die bei der HIV-Gesamtgenom-Sequenzierung und beim *Multi-Region Hybridisation Assay* (MHA) im Rahmen dieser Dissertation erhoben wurden. Bei den einzelnen Ergebnissen der 15 PBMC-Proben stellt der obere Balken schematisch das Ergebnis der HIV-Gesamtgenom-Sequenzierung dar. Im unteren Balken ist das Gesamtergebnis aller 15 MHA, die pro PBMC-Probe durchgeführt wurden, in den fünf Kästchen, die die fünf repräsentativen DNA-Regionen darstellen, zusammengetragen und schematisch aufbereitet. Zur Erklärung der Darstellung des HIV-Genoms siehe Abbildung 1, Kapitel 1.1.3.1.1., und Abbildung 18, Kapitel 4.1.1.2.

15 PBMC-Proben aus der Populationsgruppe der Blutspender des *Mbeya Consultant Hospitals* (BD A) wurden im Jahr 2000 randomisiert ausgewählt, um ihr Genom vollständig zu sequenzieren [5]. Dadurch konnte ich die Sensitivität des MHA ermitteln.

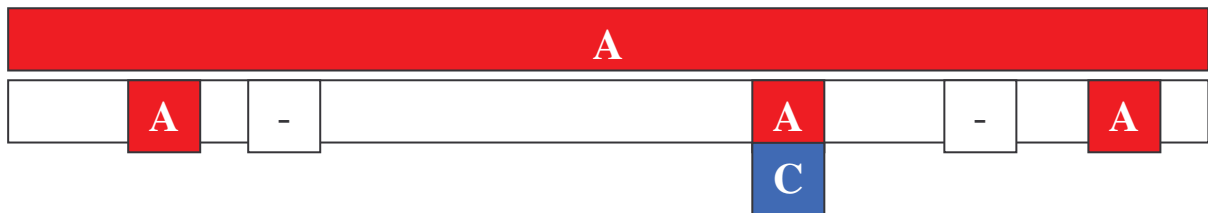
1. PBMC-Probe: A 93



2. PBMC-Probe: A 125



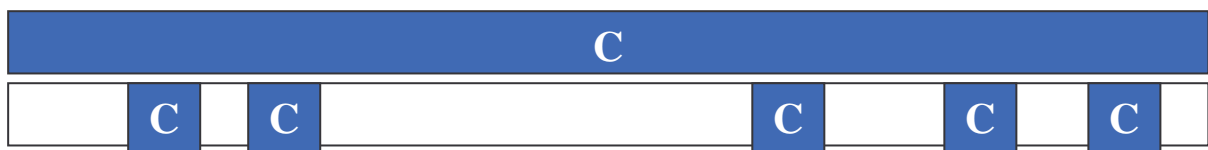
3. PBMC-Probe: A 173



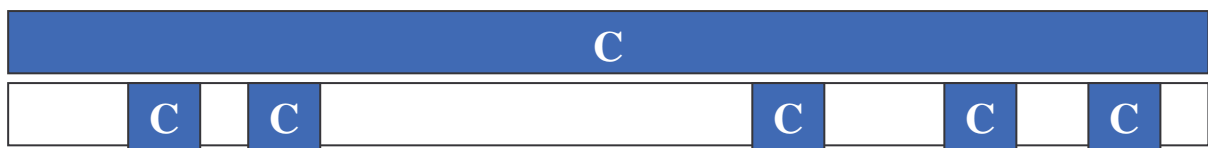
4. PBMC-Probe: A 195



5. PBMC-Probe: A 207



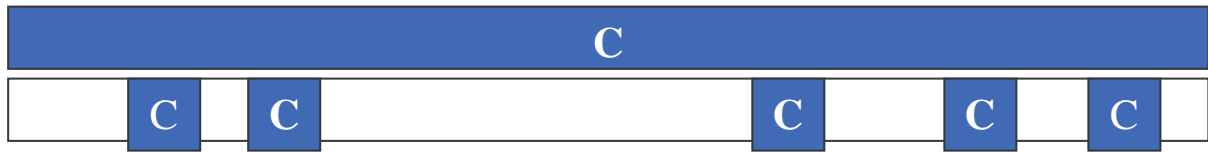
6. PBMC-Probe: A 246



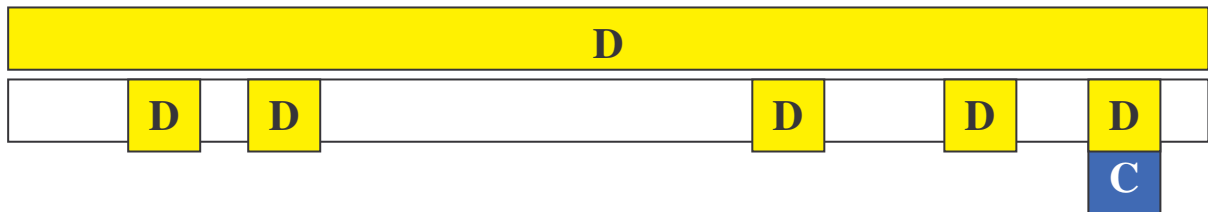
7. PBMC-Probe: A 247



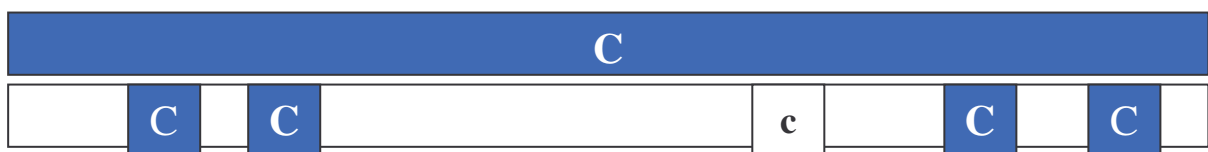
8. PBMC-Probe: A 260



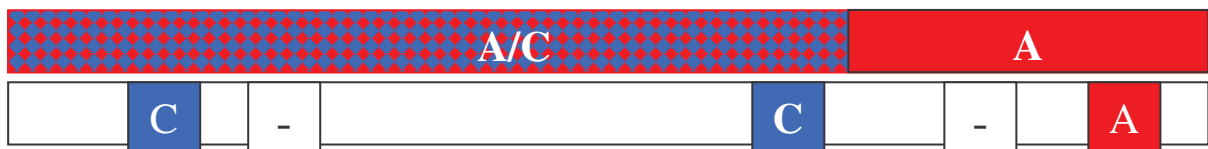
9. PBMC-Probe: A 280



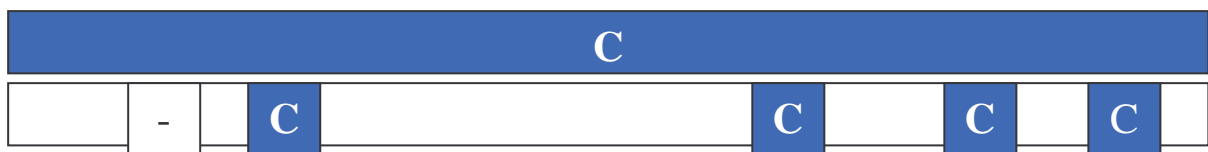
10. PBMC-Probe: A 301



11. PBMC-Probe: A 306



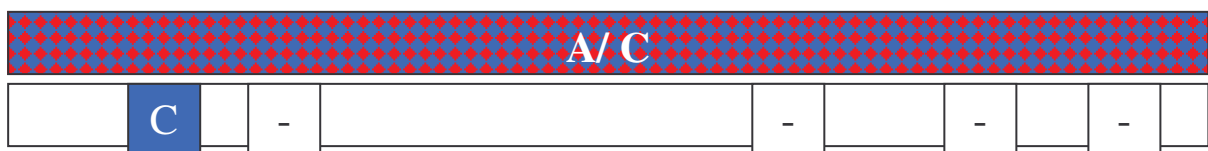
12. PBMC-Probe: A 339



13. PBMC-Probe: A 341



14. PBMC-Probe: A 355



15. PBMC-Probe: A 359



Abbildung 30 (Seiten 117 und 118): Vergleich der Ergebnisse der HIV-Gesamtgenom-Sequenzierung und der MHA-Ergebnisse bei 15 randomisiert ausgewählten PBMC-Proben der Populationsgruppe BD A. Die HIV-Gesamtgenom-Sequenzierung wurde im Jahr 2002 am Walter Reed Army Institute (Rockville, MD, USA) durchgeführt [5]. Das mit einem Kleinbuchstaben versehene MHA-Ergebnis "c" bedeutet, dass dieses nicht eindeutig bestimmt werden konnte.

4.3.2. Ermittlung der Sensitivität

Der Stichprobenumfang von 15 Proben ist zu gering, um genaue Aussagen über die Sensitivität des im Rahmen meiner Querschnittstudie angewandten MHA zur HIV-1-Subtypen-Bestimmung zu treffen. Sie kann aber zur groben Orientierung dienen. Bei einer Studie zur Bestimmung der Sensitivität des MHA konnte bei 45 PBMC-Proben festgestellt werden, dass von insgesamt 225 DNA-Regionen (45 Proben x 5 DNA-Regionen) in 194 DNA-Regionen die spezifische Sonde angelagert hat, womit der HIV-1-Subtyp ermittelt werden konnte. Sensitivität des MHA: 86,2 % [54].

Wie in *Abbildung 30* (s. Kapitel 4.3.1.) dargestellt, lagerten sich bei diesem MHA die spezifischen Hybridisierungssonden in 54 DNA-Regionen der insgesamt 75 DNA-Regionen (15 PBMC-Proben x 5 DNA-Regionen) der oben genannten 15 PBMC-Proben an. Damit konnte im Vergleich zu den Ergebnissen der Gesamtgenom-Sequenzierung für den MHA eine Sensitivität von 72,0 % ermittelt werden.

Da in der vorliegenden Arbeit für die statistische Auswertung nur MHA-Ergebnisse von PBMC-Proben verwendet wurden, in denen in mindestens drei DNA-Regionen der HIV-1-Subtyp bestimmt werden konnte (s. Kapitel 4.1.1.1.), würde das Ergebnis der Proben No. 4. und 14. in der Analyse nicht berücksichtigt werden. Demzufolge konnte ich in 51 der insgesamt 65 untersuchten DNA-Regionen (13 PBMC-Proben x 5 DNA-Regionen) den HIV-1-Subtyp feststellen. Sensitivität des MHA: 78,5 %.

5. DISKUSSION

5.1. Molekularbiologische HIV-Ergebnisse des MHA

5.1.1. Interpretation der wichtigsten Ergebnisse

Mit der vorliegenden Studie konnte ich nachweisen, dass es in Mbeya Region – mit einer Prävalenz von 14 % innerhalb der gesamten Studienpopulation (19,61 % in der HRG bzw. 8,87 % in der NRG) – sowohl HIV-1-Mehrfachinfektionen (MK) als auch – mit einer Prävalenz von 32 % innerhalb der gesamten Studienpopulation (33,33 % bzw. 31,45 %) – Einfachinfektionen mit rekombinanten Subtypen (EK) gibt (s. Diagramm 2, Kapitel 4.1.2.1., und s. Diagramm 4, Kapitel 4.1.3.1.). Dies bedeutet, dass bei 46 % aller untersuchten HIV-positiven Proben eine Intersubtyp-Rekombinante vorlag. Der Anteil der Einfachinfektionen mit den reinen Subtypen (ER) A, C und D lag demnach bei 54 % (47,06 % bzw. 59,68 %). Da Superinfektionen den Rekombinationen und Mehrfachinfektionen vorausgehen, darf vermutet werden, dass diese in Mbeya Region häufig vorkommen. Dies könnte u.a. durch die geographische Lage Mbeyas (gute Verkehrsanbindung, s. Kapitel 3.1.1.) mit einem hohen Anteil mobiler Menschen, die andere HIV-1-Subtypen in diese Region “einschleppen” (s. Kapitel 3.1.3.1. und 5.2.1.), die *high transmission areas* (HTA, s. Kapitel 3.1.2.) und der HIV-1-Verteilung in Tansania und ihren Nachbarstaaten (s. Kapitel 1.2.2.2.2.) begründet sein.

Unter den ER war der Subtyp C (77,40 % in der HRG bzw. 80,30 % in der NRG) der am häufigsten detektierte, vor A (19,21 % bzw. 11,74 %) und D (3,39 % bzw. 7,95 %) (s. Tabelle 24, Kapitel 4.1.2.2.2., und Tabelle 28, Kapitel 4.1.3.2.2.). Unter den EK war die Rekombinante AC mit 56,16 % die am häufigsten nachgewiesene (s. Tabelle 34, Kapitel 4.2.1.3.). Unter den MK kamen die Rekombinanten AC (53,85 % in der HRG bzw. 35,71 % in der NRG) und CD (19,23 % bzw. 28,57 %) öfter als die anderen vor (s. Tabelle 23, Kapitel 4.1.2.2.1., und Tabelle 27, Kapitel 4.1.3.2.1.). Bei den genannten Prävalenzen konnte ich zwischen der HRG und der NRG keine signifikanten Unterschiede feststellen.

Die Gesamtverteilung der HIV-1-Subtypen war wie folgt: Subtyp C: 63 % (62,47 % in der HRG bzw. 63,94 % in der NRG) , Subtyp A: 24 % (26,84 % bzw. 21,46 %), Subtyp D: 13 % (10,69 % bzw. 14,60 %). Auch diesbezüglich zeigten sich keine signifikanten Unterschiede

zwischen den beiden Risikogruppen (s. Tabelle 24, Kapitel 4.1.2.2.2., und Tabelle 28, Kapitel 4.1.3.2.2.).

Auffallend ist die unterschiedliche HIV-1-Subtypen-Verteilung bei den ER, EK und MK. Der unter den ER mit Abstand am häufigsten detektierte Subtyp war der Subtyp C (77,40 % in der HRG bzw. 80,30 % in der NRG). Sein Anteil ist unter den MK geringer (54,21 % bzw. 26,00 %). Im Gegensatz dazu ist der Anteil der Subtypen A (29,91 % bzw. 38,00 %) und D (15,89 % bzw. 36,00 %) unter den MK größer als unter den ER (für Subtyp A: 19,21 % bzw. 11,74 %; für Subtyp D: 3,39 % bzw. 7,95 %) (s. Diagramm 3, Kapitel 4.1.2.2.2., und s. Diagramm 5, Kapitel 4.1.3.2.2.).

Anhand meiner Dissertation können Hypothesen generiert werden, inwieweit virale (unterschiedliche Subtypen erhöhen oder vermindern das Risiko einer Infektion bzw. Superinfektion), immunologische (unterschiedliche Immunantwort des Wirts bei unterschiedlichen Subtypen) oder epidemiologische (Träger von rekombinanten Subtypen hatten eher Kontakt mit Menschen aus anderen Gebieten, wo andere Subtypen häufiger vorkommen) Ursachen für die oben genannten HIV-1-Subtypen-Verteilungen verantwortlich sind. Diese Frage kann aufgrund des Studiendesigns dieser Dissertation (transversale Studie) nicht hinreichend beantwortet werden. Hierzu können longitudinale Studien dienen.

Die Sensitivität der Hybridisierungssonden war im Vergleich zu den serologischen HIV-Ergebnissen in der HRG höher (63,75 %) als in der NRG (50,83 %) (s. Kapitel 4.1.1.1.), da in der HRG mehr sichere HIV-1-Ergebnisse erzielt werden konnten. Dies kann darauf zurückzuführen sein, dass in der HRG größere Blutvolumina abgenommen wurden als in der NRG (s. Kapitel 3.2.1.2.). Dadurch konnten größere *yields* bei der PBMC-Gewinnung erzielt werden, wodurch die Wahrscheinlichkeit steigt, provirale DNA zu extrahieren (s. Kapitel 3.2.3.3.).

5.1.2. Vergleich mit anderen Studien

Die erste Studie zur Eruiierung der Prävalenz der HIV-1-Subtypen in Mbeya Region wurde von M. Hölscher, dem Mitbetreuer dieser Dissertation, im Jahr 1997 durchgeführt [51]. Diese erfolgte mittels *V3-Serotyping* bei 86 Proben von AIDS-Patienten (s. Kapitel 1.3.2.). Hierbei

wurden folgende Prävalenzen gemessen: Subtyp C: 55 %, Subtyp A: 29 %, Subtyp D: 15 %, Subtyp G: 1%. Diese Werte stimmen mit jenen der vorliegenden Arbeit weitgehend überein.

Bei einer HIV-Gesamtgenom-Sequenzierung von neun Proben aus Mbeya Region wurden von M. Hölscher fünf Rekombinante detektiert: vier AC- und eine CD-Rekombinante. Bei den anderen Proben handelte es sich um je zwei Proben mit Subtyp A und C [53]. Trotz des sehr geringen Stichprobenumfangs darf man davon ausgehen, dass ungefähr die Hälfte aller HIV-Infizierten in Mbeya Region Träger einer HIV-1-Rekombinante sind. Auch diese Feststellung deckt sich mit der in dieser Dissertation eruierten Prävalenz von 46 % für Rekombinante.

M. Hölscher hatte die erste Subtypisierung mittels *Multi-Region Hybridisation Assay* (MHA) mit Proben aus Mbeya Region im Jahr 2000 durchgeführt [54]. Hierbei bewies er die Existenz von HIV-1-Rekombinationen und Mehrfachinfektionen. In der weiterführenden longitudinalen *HIV Superinfection Study* (HISIS, s. Kapitel 3.1.2.) konnten diese genannten Ergebnisse bestätigt werden. Die diesbezüglichen Publikationen sind in Vorbereitung.

Man vermutet, dass weltweit fast 10 % aller HIV-Infektionen durch Rekombinante verursacht werden [95]. Unter Rekombinanten versteht man im engeren Sinn das Ergebnis einer Intersubtyp-Rekombination (s. Kapitel 1.1.3.1.3.). In einigen Ländern führen Rekombinante zu mehr HIV-Infektionen als die reinen Subtypen [85]. Aufgrund der ansteigenden HIV-Prävalenzen in fast allen Teilen der Welt und der dadurch bedingten Zunahme an Superinfektionen wird auch der Anteil rekombinanter HIV anwachsen [95]. In verschiedenen Publikationen wurde darüber berichtet, dass aufgrund vermehrter Reisetätigkeit eine spürbare Zunahme von Rekombinanten in der westlichen Welt, wo das engste HIV-Monitoring durchgeführt wird, festgestellt wurde [105, 108] (s.a. Kapitel 1.2.2.2.1.).

Die weltweite Verteilung der HIV-Rekombinanten ist nur annähernd bekannt (s. Abbildung 8, Kapitel 1.2.2.2.1.). Sicher ist, dass Intersubtyp-Rekombinationen (s. Kapitel 1.1.3.1.3.) in Ländern, wo zwei oder mehrere Subtypen vorkommen, viel häufiger sind als in Ländern, wo ein Subtyp vorherrscht. In den Ländern Nordamerikas und Westeuropas dominiert mit einem Anteil von über 75 % Subtyp B. Somit konnte beispielsweise in HIV-Niedrigprävalenz-Ländern wie Großbritannien und Frankreich eine geringe Prävalenz für Rekombinanten von 1,86 % bzw. 2,61 % nachgewiesen werden [70].

In HIV-Hochprävalenz-Ländern Afrikas südlich der Sahara ist der Anteil an Rekombinanten sehr unterschiedlich. Beispielweise weisen Tansania (vorherrschende Subtypen A, C und D, s. Kapitel 1.2.2.2.2.) und Gabun (vorherrschende Subtypen A, D und G sowie die CRF02_AG) hohe Prävalenzen für Rekombinanten von ca. 10 % bzw. 15 % auf. In Botswana, wo mit 37,3 % [113] die höchste HIV-Prävalenz weltweit vorliegt, beträgt der Anteil von Subtyp C mehr als 99 %, weshalb dort Intersubtyp-Rekombinationen sehr selten sind.

Die Prävalenz der Intersubtyp-Rekombinationen von 46 %, die ich im Rahmen meiner Dissertation in Mbeya Region ermittelt habe, stellt sicher einen außergewöhnlich hohen Wert dar. Dieses Resultat kann mit der Existenz der drei verschiedenen Subtypen A, C und D (s. Kapitel 4.1.2.2. und 4.1.3.2.) und der guten Verkehrsanbindung Mbeyas bzw. der relativ hohen Mobilität der Bevölkerung erklärt werden (s. Kapitel 3.1.1. und 5.2.1.).

5.1.3. Inferenz und Validität

In dieser Dissertation konnte ich für den MHA eine Sensitivität von 77,45 % (bei den Proben der HRG, s. Kapitel 4.1.1.1.) bzw. von 72,0 % (bei 15 randomisiert ausgewählten Proben der BD, s. Kapitel 4.3.2. und 5.3.1.) ermitteln. Damit erfüllt diese molekularbiologische Untersuchungsmethode zur Bestimmung der HIV-1-Subtypen weitgehend die Voraussetzungen für eine diesbezügliche Querschnittsstudie. Der MHA ist ein geeignetes Mittel zur Bestimmung der Prävalenzen von HIV-1-Subtypen und deren Rekombinanten und Mehrfachinfektionen, weil er viel kostengünstiger und weniger aufwändig durchzuführen ist als der Goldstandard der HIV-1-Subtypen-Bestimmung: die Gesamtgenom-Sequenzierung (s. Kapitel 1.3.2., 4.3.1. und 5.3.). Die besondere Schwäche des MHA, nämlich dass keine Intrasubtyp-Rekombinationen bestimmt werden können, soll hier nochmals explizit erwähnt werden (s. Kapitel 4.1.1.3.).

Die Präzision und die Reliabilität des MHA darf als zufriedenstellend bezeichnet werden. Die Analyse der hier erwähnten Daten ist mittels Chi-Square-Test einfach und genau. Die statistische Inferenz dieser Arbeit ist somit ausreichend. Einschränkungen bestehen bezüglich der epidemiologischen Inferenz und der Validität. Die interne Validität wird durch einige Selektionsbias eingeschränkt. Alle drei Studienpopulationen (Prostituierte, *antenatal clinic attendees* und Blutspender) sind vorselektionierte Bevölkerungsgruppen (s. Kapitel 3.1.3.),

womit sie für die Allgemeinbevölkerung nicht repräsentativ sind. Bei den *antenatal clinic attendees* und Blutspendern konnte ich den Selektionsbias dadurch minimieren, dass ich ausnahmslos alle, die in dem Untersuchungszeitraum die beiden Krankenhäuser in Mbeya besuchten, für meine Querschnittsstudie gewinnen konnte. Bei der Rekrutierung der Prostituierten wurde eine randomisierte Auswahl bestimmter Bars in Mbeya Region vorgenommen, womit wir im Rahmen der HISIS versucht haben, systematische Fehler zu minimieren (s. Kapitel 3.1.3.1.).

Da ich die hier vorgestellten Resultate durch molekularbiologische Methoden erhoben habe, sind Missklassifikations- und Informationsbias kaum zu erwarten. Einschränkend muss bei der statistischen Auswertung erwähnt werden, dass ich außer den beiden wichtigsten potenziellen Confoundern *Alter* und *Geschlecht* keine weiteren berücksichtigt habe (s. Kapitel 5.2.3.), was bei dem niedrigen Stichprobenumfang und der sehr aufwändigen Proben-sammlung und Datenerhebung in Tansania nicht praktikierbar gewesen wäre.

Die molekularbiologischen Daten stammen ausnahmslos von Studienteilnehmern aus Mbeya Region und decken sich mit den Daten der vorherigen Studien (s. Kapitel 5.1.2.). Eine Verallgemeinerung auf andere Teile Tansanias oder sogar auf andere Regionen Afrikas südlich der Sahara ist bei der hohen Variabilität der Prävalenz bestimmter HIV-1-Subtypen in verschiedenen Ländern nicht möglich (s. Kapitel 1.2.2.2.). Entsprechend unterliegen auch die Prävalenzen ihrer Rekombinanten und Mehrfachinfektionen großer geographischer Abhängigkeit. Damit ist die externe Validität der Resultate sehr gering.

5.2. Vergleich: Grundlegende soziologische Ergebnisse und molekularbiologische HIV-Ergebnisse des MHA

5.2.1. Interpretation der wichtigsten Ergebnisse

Mit dieser Studie konnte gezeigt werden, dass die HRG (19,61 %) ein signifikant höheren Anteil an Mehrfachinfektionen aufweist als die NRG (8,87 %) (s. Kapitel 4.2.1.1.1.). Ob dieses Resultat vor allem durch die Variable *sexuelles Risikoverhalten* (SRV) bedingt ist, kann in dieser Querschnittsstudie nur vermutet werden. Die Assoziation zwischen beiden Variablen *SRV* und *Mehrfachinfektionen* scheint gegeben, es kann aber keine Aussage über

deren kausalen Zusammenhang gemacht werden (s. Kapitel 5.2.3.). Sicher ist davon auszugehen, dass sich die beiden Risikogruppen in der Variable *SRV* deutlich unterscheiden (s. Kapitel 3.1.3.).

Demgegenüber konnte unter den Trägern der rekombinanten Subtypen kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Risikogruppen festgestellt werden (s. Kapitel 4.2.1.1.2.). Das dürfte daran liegen, dass sich – wie in Kapitel 4.1.1.3. ausführlich erklärt – Träger einer EK fast ausschließlich bei Trägern einer MK infizieren, wodurch innerhalb von Populationen die Relationen von MK und EK unabhängig von ihrem *SRV* relativ konstant bleiben. Das bedeutet, dass Populationen mit einer hohen Prävalenz an MK in der Regel auch eine erhöhte Prävalenz an EK aufweisen.

Diese Annahme kann dadurch gestützt werden, dass sich die HIV-1-Subtypen-Verteilungen bei den Trägern der EK und MK sehr ähneln. Dies konnte insbesondere in der HRG (s. Diagramm 3, Kapitel 4.1.2.2.2.) gezeigt werden. Bei der Betrachtung der Subtypen-Verteilungen bei den ER, EK und MK war die Anzahl der Stichproben sehr gering (s. Kapitel 4.2.1.3.), wodurch keine eindeutigen Unterschiede zwischen beiden Risikogruppen nachgewiesen werden konnten. Konsekutiv können diesbezüglich keine Aussagen getroffen werden.

Beim Vergleich der weiblichen mit den männlichen Blutspendern konnten keine signifikant unterschiedlichen Verteilungen der Rekombinanten und der Mehrfachinfektionen festgestellt werden. Somit gelang es nicht, mit dieser Studie einen Nachweis zu erbringen, dass das Geschlecht einen Einfluss auf die Verteilung von Einzel-/Mehrfachinfektionen und/oder reinen/rekombinanten HIV-1-Subtypen hat (s. Kapitel 4.2.2.).

In der HRG zeigt sich, dass mit zunehmendem Alter der Anteil an ER erhöht, der der rekombinanten Subtypen aber vermindert ist (s. Kapitel 4.2.3.1.). Der Anteil der rekombinanten Subtypen ist bei den jüngeren Prostituierten (20 bis 24 Jahre) mit 69,5 % signifikant höher als bei den etwas älteren (30 bis 34 Jahre) mit 37,0 % (s. Kapitel 4.2.3.1.2.). Die Begründung dieses Resultates ist rein spekulativ, zumal Kausalzusammenhänge in dieser Querschnittsstudie nicht eruiert werden können. Es kann vermutet werden, dass es durch eine HIV-Infektion mit einer Rekombinante früher zum Tod von Infizierten kommt als bei jenen, die sich mit einem reinen Subtyp angesteckt haben. Diese Hypothese konnte jedoch bislang nicht bestätigt werden.

Ein weiterer Grund könnte darin liegen, dass sich prostituierende Frauen in Mbeya Region vor allem sexuelle Kontakte mit Männern eingehen, die auf der Durchreise sind bzw. sich nur vorübergehend dort aufhalten (s. Kapitel 3.1.1.). Aufgrund ihrer Mobilität haben diese Freier ein sehr hohes Risiko, sich multipel mit unterschiedlichen HIV-1-Subtypen zu infizieren, was die Entstehung von Rekombinanten fördert. Prostituierte infizieren sich damit deshalb häufiger bei Sexualpartnern mit Intersubtyp-Rekombinationen als Menschen mit nicht erhöhtem SRV, die sich vor allem bei der lokalen Bevölkerung anstecken, unter denen die Prävalenz an Rekombinanten niedriger ist (s. Kapitel 4.2.1.1.1.).

Mit meiner Querschnittsstudie konnte ich nachweisen, dass jüngere Prostituierte (20 bis 24 Jahre) ein signifikant höheres Risiko tragen, sich mit rekombinanten HIV-1-Subtypen zu infizieren (s. Tabelle 41, Kapitel 4.2.3.1.2.). Dies lässt vermuten, dass die zahlende mobile Kundschaft jüngere Prostituierte bevorzugt, womit diese ein höheres Risiko besitzen, sich mit einem anderen Subtyp zu infizieren, was zur Entstehung von Intersubtyp-Rekombinationen führt.

Diese Hypothese kann durch die Tatsache gestützt werden, dass bei den Prostituierten der HRG häufiger der Subtyp A nachgewiesen werden konnte als in der NRG (s. Kapitel 4.2.1.3.). Da die Prävalenz für diesen Subtyp in Dar es Salaam bzw. im Nordosten Tansanias deutlich höher als in Mbeya Region ist (s. Kapitel 1.2.2.2.2.), kann man davon ausgehen, dass die Prostituierten in Mbeya Region häufiger Kontakt mit Menschen aus diesen Gebieten haben.

Die genannten altersabhängigen Unterschiede zeigen sich nicht in der NRG (s. Kapitel 4.2.3.2.). Die Wahrscheinlichkeit, sich mit einem rekombinanten Subtyp zu infizieren, scheint bei nicht erhöhtem SRV nicht vom Alter abhängig zu sein. Dies könnte darin begründet sein, dass sich die Menschen der NRG eher bei der lokalen Bevölkerung infizieren, in der Intersubtyp-Rekombinationen seltener sind.

5.2.2. Vergleich mit anderen Studien

Diese Dissertation fasst die Ergebnisse der ersten Studie zusammen, die in Form einer Querschnittsstudie die Assoziation der Variablen *sexuelles Risikoverhalten* einerseits und der

Prävalenz von HIV-1-Subtypen, Mehrfachinfektionen und Rekombinanten andererseits in Mbeya Region untersucht. Vergleichsdaten aus anderen Studien aus Mbeya Region liegen somit nicht vor. Die wichtigsten Aussagen dieser Studie wurden bereits zur Publikation eingereicht [42].

Der mit Abstand häufigste HIV-Übertragungsmodus in Afrika südlich der Sahara ist der heterosexuelle Geschlechtsverkehr. Die Hauptrisikogruppe stellen die jungen Frauen dar. In nahezu allen afrikanischen Ländern südlich der Sahara liegt die HIV-Prävalenz bei jungen Frauen (15 bis 24 Jahre) über jener bei gleichaltrigen Männern. Frauen sind in Afrika südlich der Sahara bei weitem mehr gefährdet, sich mit HIV zu infizieren. Es ist die Weltregion, die mit 58 % die höchste Rate an weiblichen HIV-Infizierten aufweist, vor Nordafrika/Mittlerer Osten (55 %) und der Karibik (50 %). In allen anderen Regionen der Welt haben Männer eine höhere HIV-Prävalenz als Frauen [113, 114].

In vielen Studien, die in Afrika südlich der Sahara durchgeführt wurden, konnte nachgewiesen werden, dass Frauen, die der Prostitution nachgehen, einem größeren Risiko ausgesetzt sind, sich mit HIV zu infizieren bzw. zu reinfizieren, was die Bildung von Rekombinanten erhöht [95].

5.2.3. Inferenz und Validität

Die Präzision der soziologischen Daten ist hoch, da nur die beiden Variablen *Geschlecht* und *Alter*, die in der Regel sicher zu eruieren sind, berücksichtigt wurden. Ansonsten gelten die zur statistischen Inferenz und internen Validität der molekularbiologischen HIV-Ergebnisse gemachten Aussagen (s. Kapitel 5.1.3.).

Schwierig gestaltet sich der direkte Vergleich der beiden Risikogruppen. Insbesondere die NRG ist eine in sich relativ inhomogene Studiengruppe, da mit den *antenatal clinic attendees* und den Blutspendern zwei unterschiedliche Populationsgruppen zusammengefasst wurden (s. Kapitel 3.1.3.). Bei den Blutspendern handelt es sich in der Mehrzahl um Männer, während die beiden anderen Populationsgruppen ausschließlich aus Frauen bestehen. Des Weiteren ist die Altersspanne bei den Blutspendern größer (s. Kapitel 4.2.3.). Auf eine Aufspaltung der NRG in ihre einzelnen Populationsgruppen für die Analyse wurde aber wegen des niedrigen Stichprobenumfangs weitgehend verzichtet.

Über den kausalen Zusammenhang des SRV und der Prävalenz von HIV-1-Mehrfachinfektionen kann in dieser transversalen Studie keine eindeutige Aussage erfolgen, obwohl ihre Assoziation signifikant und logisch begründbar ist. Ein erhöhtes SRV führt zu einem erhöhten Risiko, sich mehrmals mit HIV zu infizieren. Der andere Kausalweg könnte aber ebenfalls möglich sein: Menschen, die sich bereits infiziert haben und sich darüber bewusst sind, gehen ein höheres Risiko hinsichtlich ihres sexuellen Verhaltens ein.

Die Assoziation der hier vorgestellten soziologischen und molekurbioologischen Daten können auch für andere Länder bzw. Kulturkreise oder für andere Bevölkerungsgruppen zutreffen, aber aufgrund des weitgehend unbekanntem kausalen Zusammenhangs und der in dieser Dissertation nicht untersuchten weiteren potenziellen Confoundern (wie z.B. Mobilität, sozialer Status, Wohnort u.v.a.) kann keine Generalisierung erfolgen. Die externe Validität bleibt somit sehr eingeschränkt.

Die beste Möglichkeit, die oben genannten Fragen zu beantworten, liegt darin, den Stichprobenumfang zu erhöhen, was aber – unter den gegebenen Umständen in Mbeya Region – einen sehr großen personellen und logistischen Aufwand zu Folge hätte. Dabei könnten Stratifizierungen erfolgen, die es erlauben, Confounder und Effektmodifikationen zu erkennen.

Zur Bestimmung des kausalen Zusammenhanges müssten darüber hinaus longitudinale Studien erfolgen, die inzidente HIV-1-Superinfektionen detektieren, wie dies im Rahmen der HISIS (s. Kapitel 3.1.2.) erfolgte.

5.3. Vergleich: HIV-1-Subtypen-Bestimmung mittels MHA und mittels HIV-Gesamtgenom-Sequenzierung

5.3.1. Interpretation des Ergebnisses

Der Goldstandard der HIV-Subtypen-Bestimmung ist die HIV-Gesamtgenom-Sequenzierung (s. Kapitel 1.3.2.). Um die Sensitivität des MHA zu ermitteln, wurden dessen Ergebnisse von einigen Proben mit jenen der Gesamtgenom-Sequenzierung verglichen. Es konnte eine Sensitivität von 72,0 % (s. Kapitel 4.3.2.) ermittelt werden. Hierbei war die Anzahl der

vollständig sequenzierten Proben mit 15 sehr gering, aber aufgrund der sehr aufwändigen und teuren Durchführung war es im Rahmen dieser Dissertation nicht möglich, mehr Proben einer Gesamtgenom-Sequenzierung zu unterziehen [5].

5.3.2. Vergleich mit anderen Studien

Wie bereits in Kapitel 5.1.2. erläutert, wurde die erste HIV-Gesamtgenom-Sequenzierung von Proben aus Mbeya Region im Jahr 2000 durchgeführt. Beim Vergleich von 45 Proben aus Uganda, Kenia und Tansania konnte für den MHA eine Sensitivität von 86,2 % festgestellt werden [42, 54], womit sie höher liegt als der in dieser Dissertation eruierte Wert von 72,0 % (s. Kapitel 4.3.2.). M. Arroyo gelang im Jahr 2003 die HIV-Gesamtgenom-Sequenzierung von 20 Proben aus Mbeya Region, wobei davon 15 im Rahmen dieser Dissertation durchgeführt wurden (s. Kapitel 4.3.) [5].

Die vorliegende Dissertation ist die erste größere Studie zur Bestimmung der HIV-1-Subtypen A, C und D und ihrer Rekombinationen mittels MHA in Tansania, weshalb außer den oben genannten keine direkten Vergleichsdaten aus anderen tansanischen Studien vorliegen [42]. Dieser zuvor nur für Ostafrika konzipierte Test (Subtypen A, C und D) wurde auch für Südostasien (Subtyp B sowie CRF01_AE) und Südamerika (Subtypen B und F sowie CRF12_BF) weiterentwickelt und soll später auch in Deutschland (Subtyp B) Verwendung finden. Zusätzlich zur einfachen Subtypen-Bestimmung können mit diesem Test auch HIV-Mehrfachinfektionen mit großer Sensitivität nachgewiesen werden.

An der Weiterentwicklung des MHA arbeitet vor allem die Arbeitsgruppe um F. McCutchan (Walter-Reed Institute, Rockville, USA). Sie versucht die Sensitivität und die Spezifität des MHA auch für andere Subtypen und CRF mittels unterschiedlicher Maßnahmen zu erhöhen: Verbesserung der Konstruktion der primers und probes, Subtypen-Bestimmung in mehr als fünf DNA-Regionen, Auswahl von probe-Hybridisierungsstellen, in denen eine größere Variabilität der Basensequenz zwischen den Subtypen vorliegt. Der Arbeitsgruppe gelang in mehreren Studien in Uganda (Subtypen A, C und D) [6] und in Thailand (Subtyp B und CRF01_AE) [64] eine Verbesserung der Sensitivität des MHA bis über 98 %. Dabei wurde festgestellt, dass die Sensitivität des MHA von der Viruslast abhängig ist [6].

Im Jahr 2002 wurde erstmals von der Anwendung des MHA innerhalb einer großen Studie zur Bestimmung der Subtypen B und F in Südamerika (Ecuador, Peru, Bolivien, Uruguay und Argentinien) berichtet. Hierbei wurde eine MHA-Sensitivität für die reinen Subtypen B und F von 90 % bzw. 85 % erreicht, für Rekombinante betrug diese 88 % [44].

An der Verbesserung des MHA waren auch M. Hölscher, der Mitbetreuer der vorliegenden Dissertation, und seine Arbeitsgruppe an der Abteilung für Infektions- und Tropenmedizin der Ludwig-Maximilians-Universität maßgeblich beteiligt.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Seit der Entdeckung der zwei Typen des *Human Immunodeficiency Virus* (HIV) in den Jahren 1983 und 1986 gibt es zahlreiche kontroverse Diskussionen über deren Ursprung. Erst die Erforschung des zweiten *Primate Immunodeficiency Virus* (PIV), des *Simian Immunodeficiency Virus* (SIV), ergab neue Erkenntnisse, die die Abstammung des HIV aus SIV weitgehend belegen konnten, obwohl noch heute diesbezügliche Zweifel bestehen. Aufgrund der großen genetischen Variabilität dieser Viren, wurden sie in verschiedene Stämme, Gruppen, Subtypen und Subsubtypen eingeteilt. Ihre Klassifikation und Nomenklatur wurde aufgrund der – vor allem in den 1990er-Jahren gemachten – neuen wissenschaftlichen Erkenntnisse über das HIV-Genom häufig geändert, bis im April 2000 ein *Overview of subtypes in the primate immunodeficiency viruses* publiziert wurde. Er dient seither als Grundlage für die Nomenklatur von HIV und SIV, wie sie auch in dieser Dissertation Verwendung findet.

Die Forschung mit HIV-Subtypen machte es möglich, die epidemiologischen Ausbreitungswege von HIV zu eruieren und neue Erkenntnisse zur HIV-Infektion, zu ihren Übertragungswegen, zur Prävention und schließlich zu geeigneten Public-Health-Maßnahmen zu erlangen. Die bis noch vor wenigen Jahren diskutierte Frage, ob HIV-Superinfektionen und -Mehrfachinfektionen überhaupt möglich sind und wie die Rekombinanten entstehen, konnte ebenfalls durch die Subtypenforschung beantwortet werden. Diesbezügliche Studien werden seit einigen Jahren auch in Mbeya Region im Südwesten Tansanias durchgeführt.

Die Daten dieser Dissertation basieren zum Teil auf jenen der fünfjährigen *HIV Superinfection Study* (HISIS), die im August 2000 in Mbeya Region begonnen wurde. HISIS befasst sich vor allem mit der Erforschung von HIV-Superinfektionen und deren Mehrfachinfektionen und Intersubtyp-Rekombinationen.

Hierzu bedarf es eines Studienortes, in dem unterschiedliche HIV-Subtypen prävalent sind. Dies ist in Mbeya Region mit den Subtypen A, C und D der Fall. Die zweite Voraussetzung ist eine Studienpopulation, die eine hohe Prävalenz dieser Subtypen aufweist. Hierfür wurde eine offene Kohorte von über 700 weiblichen Prostituierten gebildet, aus der ich von September 2000 bis Mai 2001 bei 626 Studienteilnehmerinnen Daten für die vorliegende Arbeit gewinnen konnte.

Um diese Populationsgruppe (so genannte High-Risk-Group, HRG) mit einem sehr hohen Risiko hinsichtlich des sexuellen Verhaltens studieren zu können, habe ich für meine Dissertation eine Vergleichspopulation untersucht, die sich in dieser Variable (*sexuelles Risikoverhalten*) von der HRG unterscheidet (so genannte Non-High-Risk-Group, NRG). Dafür konnte ich Blutproben und soziologische Daten von 757 Blutspendern (Oktober 2000 bis August 2001) und von 351 *antenatal clinic attendees* (Februar bis August 2001) gewinnen.

Um diese HIV-Subtypisierung mit hoher Qualität und relativ geringen Kosten durchführen zu können, wurde von M. Hölscher, dem Mitbetreuer dieser Dissertation, der *Multi-Region Hybridisation Assay* (MHA) entwickelt. Dieses molekularbiologische Verfahren konnte ich in der vorliegenden Studie zum ersten Mal bei einem größeren Stichprobenumfang einsetzen: 341 Proben aus Mbeya Region. Diese Dissertation konnte nachweisen, dass der MHA eine ausreichende Sensitivität besitzt, um ihn zur HIV-1-Subtypen-Bestimmung bei transversalen Studien einzusetzen, wobei die Sensitivität von der Anzahl der pro Blutprobe gewonnen mononukleären Zellen abhängig ist.

In meiner Arbeit hat sich bestätigt, dass in Mbeya Region HIV-1-Mehrfachinfektionen – mit einer Prävalenz von 14 % innerhalb der Studienpopulation – als auch Einfachinfektionen mit rekombinanten Subtypen – mit einer Prävalenz von 32 % innerhalb der Studienpopulation – vorkommen. Dies bedeutet, dass es sich nur bei etwas mehr als die Hälfte aller in Mbeya Region zirkulierenden HI-Viren um reine Subtypen handelt.

Die Prävalenz der HIV-1-Subtypen war wie folgt: Subtyp C: 63 %, Subtyp A: 24 %, Subtyp D: 13 %. Konsekutiv sind dadurch C-Rekombinanten (AC und CD) häufiger präsent als die anderen. Auffällig ist die Tatsache, dass unter den Rekombinanten der Subtyp C seltener und die Subtypen A und D häufiger vorkommen als unter den reinen Subtypen.

Ich konnte mit dieser Arbeit beweisen, dass mit einem erhöhten Risiko hinsichtlich des sexuellen Verhaltens die Gefahr von Mehrfachinfektionen steigt ($p = 0,0196$). Aufgrund der Datenlage darf vermutet werden, dass für die Entstehung von Rekombinationen HIV-1-Mehrfachinfektionen Voraussetzung sind.

Ein Einfluss des Geschlechts auf die Prävalenz von Mehrfachinfektionen und Rekombinanten konnte – unter Berücksichtigung des geringen Stichprobenumfangs bei den weiblichen und männlichen Blutspendern – in dieser Arbeit nicht festgestellt werden. Ein Einfluss des Alters auf die Prävalenz von Mehrfachinfektionen und Rekombinanten zeigte sich nur in der Risikogruppe der Prostituierten und nicht in den Populationsgruppen *antenatal clinic attendees* und Blutspender.

Die Dissertation basiert auf den Daten meiner Querschnittsstudie, die ich vom August 2000 bis zum August 2001 in Mbeya Region durchgeführt habe. Sie soll den Einfluss der Variablen *sexuelles Risikoverhalten* auf die Verteilung der HIV-1-Subtypen und deren Rekombinationen und Mehrfachinfektionen eruieren. Obwohl einige signifikante Assoziationen festzustellen waren, kann keine Aussage über deren kausaler Zusammenhang erfolgen, da es sich hierbei ausschließlich um eine transversale Studie handelt.

Zur Eruierung der kausalen Inferenz sind longitudinale Kohortenstudien geeignet, die mit Verlaufsdaten von Individuen arbeiten. Des Weiteren können diese Studien mittels Interventionen (Aufklärung, Kondombenutzung, medizinische Betreuung und Versorgung u.a.) eine Verminderung des Risikos hinsichtlich des sexuellen Verhaltens herbeiführen, was die Inzidenz für Neu- und Superinfektionen erfolgreich senken würde. Eine entsprechende Studie wurde in Mbeya Region von der Abteilung für Infektions- und Tropenmedizin der Ludwig-Maximilians-Universität München in Kooperation mit der Muhimbili University of Dar es Salaam an über 700 Prostituierten von August 2000 bis Juni 2005 durchgeführt.

7. LITERATURVERZEICHNIS

- 1 **Altman, LK.** *New Homosexual Disorder Worries Officials.* The New York Times, 11.05.1982
- 2 **Anderson RM, May RM.** *Understanding the AIDS Pandemic.* Scientific American, 1992; 266(5): 58
- 3 **Andersson S, Norrgren H, Dias F, Biberfeld G, Albert J.** *Molecular characterization of human immunodeficiency virus (HIV)-1 and -2 in individuals from Guinea-Bissau with single or dual infections: predominance of a distinct HIV-1 subtype A/G recombinant in West Africa.* Virology, 30.09.1999; 262(2): 312-20
- 4 **Andersson S, Norrgren H, da Silva Z, Biague A, Bamba S, Kwok S, Christopherson C, Biberfeld G, Albert J.** *Plasma viral load in HIV-1 and HIV-2 singly and dually infected individuals in Guinea-Bissau, West Africa: significantly lower plasma virus set point in HIV-2 infection than in HIV-1 infection.* Arch Intern Med, 27.11.2000; 160(21): 3286-93
- 5 **Arroyo MA, Hoelscher M, Sanders-Buell E, Herbinge KH, Samky E, Maboko L, Hoffmann O, Robb MR, Birx DL, McCutchan FE.** *HIV type 1 subtypes among blood donors in the Mbeya region of southwest Tanzania.* AIDS Res Hum Retroviruses, August 2004; 20(8): 895-901
- 6 **Arroyo MA, Robb MR, Jagodzinski L, Kiwanuka N, Kiddagavu M, Wabire F, Wawer M, Gray R, Birx DL, McCutchan FE.** *Surveillance of HIV-1 subtypes by Multi-region Hybridization Assay suggests the predominance of subtype D and a high frequency of dual-infection in Rakai District, Uganda.* Int Conf AIDS, 11.-16.07.2004; 15:(abstract no. MoPeC3441)
- 7 **Barre-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, Dautet C, Axler-Blin C, Brun-Vezinet F, Rouzioux C, Rozenbaum W, Montagnier L.** *Isolation of a T-Lymphotropic Retrovirus from a Patient at Risk for Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS).* Science, 20.05.1983; 220(4599): 868-71
- 8 **Berkley S.** *Parenteral transmission of HIV in Africa.* AIDS, 1991; 5(suppl 1): 87-92
- 9 **Blackard J, Cohen D, Mayer KH.** *Human Immunodeficiency Virus Superinfection and Recombination: Current State of Knowledge and Potential Clinical Consequences.* Clinical Infectious Diseases, 2002; 34: 1108-14
- 10 **Bøyum A.** *Separation of leukocytes from blood and bone marrow. Introduction.* Scand J Clin Lab Invest, 1968; 97: 7
- 11 **Buvé A, Caraël M, Hayes RJ, et al.** *Multicentre study on factors determining differences in rate of spread of HIV in sub-Saharan Africa: summary and conclusions.* AIDS, 2001; 15(suppl 14): 127-31

- 12 **Carr JK, Salminen M, Albert J, Sanders-Buell E, Gotte D, Birx DL, McCutchan FE.** *Full genome sequences of human immunodeficiency virus type 1 subtypes G and A/G intersubtype recombinants.* Virology, 1998; 247: 22-31
- 13 **CDC (Centers for Disease Control and Prevention).** *Pneumocystis Pneumonia - Los Angeles.* Morbidity and Mortality weekly Report (MMWR), 05.06.1981; 30: 250-2
- 14 **CDC (Centers for Disease Control and Prevention).** *A Cluster of Kaposi's Sarcoma and Pneumocystis carinii Pneumonia among Homosexual Male Residents of Los Angeles and Orange Counties, California.* Morbidity and Mortality weekly Report (MMWR), 18.06.1982; 31(23): 305-7
- 15 **CDC (Centers for Disease Control and Prevention).** *Opportunistic Infections and Kaposi's Sarcoma among Haitians in the United States.* Morbidity and Mortality weekly Report (MMWR), 09.07.1982; 31(26): 353-4, 360-1
- 16 **CDC (Centers for Disease Control and Prevention).** *Epidemiologic notes and Reports Pneumocystis carinii Pneumonia among Persons with Hemophilia A.* Morbidity and Mortality weekly Report (MMWR), 16.07.1982; 31(27): 365-7
- 17 **CDC (Centers for Disease Control and Prevention).** *Testing for Antibodies to Human Immunodeficiency Virus Type 2 in the United States.* Morbidity and Mortality weekly Report (MMWR), 07.17.1992; 41(12): 1-9
- 18 **Chapman LE, Folks TM, Salomon DR, Patterson AP, Eggerman TE, Noguchi PD.** *Sounding board: xenotransplantation and xenogeneic infections.* New England Journal of Medicine, 1995; 333: 1498-1501
- 19 **Charneau P, Borman AM, Quillent C, Guetard D, Chamaret S, Cohen J, Remy G, Montagnier L, Clavel F.** *Isolation and envelope sequence of a highly divergent HIV-1 isolate: definition of a new HIV-1 group.* Virology, 1994; 205(1): 247-53
- 20 **Chen Z, Luckay A, Sodora DL, Telfer P, Reed P, Gettie A, Kanu JM, Sadek RF, Yee J, Ho DD, Zhang L, Marx PA.** *Human immunodeficiency virus type 2 (HIV-2) seroprevalence and characterization of a distinct HIV-2 genetic subtype from the natural range of simian immunodeficiency virus-infected sooty mangabeys.* J Virol, Mai 1997; 71(5): 3953-60
- 21 **Clavel F, Guetard D, Brun-Vezinet F, Chamaret S, Rey MA, Santos-Ferreira O.** *Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS.* Science, 18.07.1986; 233(4761): 343-6
- 22 **Clavel F, Guyader M, Guetard D, Salle M, Montagnier L, Alizon M.** *Molecular cloning and polymorphism of the human immune deficiency virus type 2.* Nature, Dezember 1986; 324(6098): 691-5
- 23 **Clumeck N, Mascart-Lemone F, de Maubeuge J, Brenez D, Marcelis L.** *Acquired immune deficiency syndrome in Black Africans.* Lancet, 19.03.1983; 1(8325): 642

- 24 **Coffin JM.** *Structure, replication, and recombination of retrovirus genomes: some unifying hypotheses.* J Gen Virol, 1979; 42: 1-26
- 25 **Coffin J, Haase A, Levy JA, Montagnier L, Oroszlan S, Teich N, Temin H, Toyoshima K, Varmus H, Vogt P, Weiss RA.** *What to call the AIDS virus? (Letter).* Nature, 01.05.1986; 321(6065): 10
- 26 **De Leys R, Vanderborght B, Vanden Haesevelde M, Heyndrickx L, van Geel A, Wauters C, Bernaerts R, Saman E, Nijs P, Willems B, et al.** *Isolation and partial characterization of an unusual human immunodeficiency retrovirus from two persons of West-Central African origin.* J Virol, 1990; 64: 1207-16
- 27 **Delwart EL, Shpaer EG, Louwagie J, et al.** *Genetic relationships determined by a DNA heteroduplex mobility assay: analysis of HIV-1 env genes.* Science, 1993; 262(5137): 1257-61
- 28 **Essex M.** *Human immunodeficiency viruses in the developing world.* Adv Virus Res, 1999; 53: 71-3
- 29 **Fotino M, Merson EJ, Allen FH.** *Micromethod for rapid separation of lymphocytes from peripheral blood.* Ann Clin Lab Sci, 1971; 1: 131-3
- 30 **Francioli P, Vogt M, Schadelin J, Clement F, Russi E, Delacretaz F, Perret C, Glauser MP.** *Syndrome de déficience immunitaire acquise, infections opportunistes et homosexualité. Présentation de trios cas observés en Suisse.* Schweiz. Med. Wochenschrift, 20.11.1982; 112(47):1682-87
- 31 **Frankel AD, Young JA.** *FIV-1: fifteen proteins and an RNA.* Annu Rev Biochem, 1998; 67: 1-25
- 32 **Gallo RC, Reitz MS Jr.** *Human retroviruses and adult T-cell leukemia-lymphoma.* J Natl Cancer Inst, Dezember 1982; 69(6): 1209-14
- 33 **Gallo RC, Sarin PS, Gelmann EP, Robert-Guroff M, Richardson E, Kalyanaraman VS, Mann D, Sidhu GD, Stahl RE, Zolla-Pazner S, Leibowitch J, Popovic M.** *Isolation of human T cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS).* Science, 20.05.1983; 220(4599): 865-7
- 34 **Gallo RC.** *The AIDS virus. Part II of a two-part article on human retroviruses.* Scientific America, Januar 1987; 256: 47-56
- 35 **Gao F, Robertson DL, Carruthers CD, Li Y, Bailes E, Kostrikis LG, Salminen MO, Bibollet-Ruche F, Peeters M, Ho DD, Shaw GM, Sharp PM, Hahn BH.** *An isolate of human immunodeficiency virus type 1 originally classified as subtype I represents a complex mosaic comprising three different group M subtypes (A, G, and I).* J Virol, 1998; 72: 10234-41
- 36 **Gao F, Bailes E, Robertson DL, Chen Y, Rodenburg CM, Michael SF, Cummins LB, Arthur LO, Peeters M, Shaw GM, Sharp PM, Hahn BH.** *Origin of HIV-1 in the Chimpanzee Pan troglodytes troglodytes.* Nature, 04.02.1999; 397(6718): 436-41

- 37 **Georges-Courbot MC, Lu CY, Makuwa M, Telfer P, Onanga R, Dubreuil G, Chen Z, Smith SM, Georges A, Gao F, Hahn BH, Marx PA.** *Natural infection of a household pet red-capped mangabey (*Cercocebus torquatus torquatus*) with a new simian immunodeficiency virus.* J Virol, Januar 1998; 72(1): 600-8
- 38 **Gottlieb MS, Schroff R, Schanker HM, et al.** *Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously health homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency.* New England Journal of Medicine, 1981; 305: 1425-31
- 39 **Gürtler LG, Hauser PH, Eberle J, von Brunn A, Knapp S, Zekeng L, Tsague JM, Kaptue L.** *A new subtype of human immunodeficiency virus type 1 (MVP-5180) from Cameroon.* J Virol, 1994; 68(3): 1581-5
- 40 **Hahn BH, Shaw GM, De Cock KM, Sharp PM.** *AIDS as a zoonosis: scientific and public health implications.* Science, 28.01.2000; 287(5453): 607-14
- 41 **Harris R, Ukaejiofo EO.** *Tissue typing using a routine one-step lymphocyte separation technique.* Brit J Haematol, 1979; 18: 229-235
- 42 **Herbinger KH, Gerhardt M, Piyasirisilp S, Mloka D, Arroyo MA, Hoffmann O, Maboko L, Birx DL, Mmbando D, McCutchan FE, Hoelscher M.** *Frequency of HIV type 1 dual infection and HIV diversity: analysis of low- and high-risk populations in Mbeya Region, Tanzania.* AIDS Res Hum Retroviruses, Juli 2006; 22(7): 599-606
- 43 **Heyndrickx L, Janssens W, Zekeng L, Musonda R, Anagonou S, Van der Auwera G, Coppens S, Vereecken K, De Witte K, Van Rempelbergh R, Kahindo M, Morison L, McCutchan FE, Carr JK, Albert J, Essex M, Goudsmit J, Asjo B, Salminen M, Buve A, van der Groen G.** *Simplified strategy for detection of recombinant human immunodeficiency virus type 1 group M isolates by gag/env heteroduplex mobility assay.* Study Group on Heterogeneity of HIV Epidemics in African Cities. J Virol, Januar 2000; 74(1): 363-70
- 44 **Hierholzer J, Montano S, Hoelscher M, Negrete M, Hierholzer M, Avila MM, Carrillo MG, Russi JC, Vinales J, Alava A, Acosta ME, Gianella A, Andrade R, Sanchez JL, Carrion G, Sanchez JL, Russell K, Robb M, Birx D, McCutchan F, Carr JK.** *Molecular Epidemiology of HIV Type 1 in Ecuador, Peru, Bolivia, Uruguay, and Argentina.* AIDS Res Hum Retroviruses, 10.12.2002; 18(18): 1339-50
- 45 **Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R.** *Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences.* Biotechnology (NY), 1992; 10: 413-7
- 46 **Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R.** *Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions.* Biotechnology (NY), 1993; 11: 1026-30
- 47 **Hillis DM.** *Origins of HIV.* Science, 09.06.2000; 288(5472): 1757-9
- 48 **Hodinka RL.** *The clinical utility of viral quantitation using molecular methods.* Clin Diagn Virol, 1998; 10: 25-47

- 49 **Hoffmann O.** *Baseline survey of HISIS-Barworkers Health Project (March-August 2000)*. Unveröffentlichter Bericht, 2000; Barworkers Health Project, Mbeya, Tansania
- 50 **Hölscher M.** *Risiko von HIV-Übertragung durch Injektionen in der Mbeya Region, Tansania*. Dissertation, Februar 1996; Medizinische Fakultät, Ludwig-Maximilians-Universität München: 15
- 51 **Hölscher M, Hanker S, Barin F, Cheingsong-Popov R, Dietrich U, Jordan-Harder B, Olaleye D, Nägele E, Markuzzi A, Mwakagile D, Minja F, Weber J, Gürtler L, Von Sonnenburg F.** *HIV type 1 V3 serotyping of Tanzanian samples: probable reasons for mismatching with genetic subtyping*. AIDS Research and Human Retroviruses, 20.01.1998; 14(2): 139-49
- 52 **Hölscher M.** *HIV dual (multiple) infections*. Unveröffentlichtes Skript, 2000; Abteilung für Infektions- und Tropenmedizin, Ludwig-Maximilians-Universität München
- 53 **Hölscher M, Kim B, Maboko L, Mhalu F, Von Sonnenburg F, Birx DL, McCutchan FE.** *High proportion of unrelated HIV-1 intersubtype recombinants in the Mbeya region of southwest Tanzania*. AIDS, 17.08.2001; 15(12):1461-70
- 54 **Hölscher M, Dowling WE, Sanders-Buell E, Carr JK, Harris ME, Thomschke A, Robb ML, Birx DL, McCutchan FE.** *Detection of HIV-1 subtypes, recombinants, and dual infections in east Africa by a multi-region hybridisation assay*. AIDS, 18.10.2002; 16(15): 2055-64
- 55 **Hu WS, Temin HM.** *Genetic consequences of packaging two RNA genomes in one retroviral particle: Pseudodiploidy and high rate of genetic recombination*. PNAS, 1990; 87: 1556-60
- 56 **Hu WS, Temin HM.** *Retroviral recombination and reverse transcription*. Science, 1990; 250: 1227-33
- 57 **Hymes KB, Greene JB, Marcus A, et al.** *Kaposi's sarcoma in homosexual men: A report of eight cases*. Lancet, 1981; 2: 598-600
- 58 **ICTVdB.** *The Universal Virus Database of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. 19.12.2000. Aus der Website:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/Ictv/fr-index.htm>.
- 59 **Janini LM, Pieniazek D, Peralta JM, Schechter M, Tanuri A, Vicente AC, dela Torre N, Pieniazek NJ, Luo CC, Kalish ML, Schochetman G, Rayfield MA.** *Identification of single and dual infections with distinct subtypes of human immunodeficiency virus type 1 by using restriction fragment length polymorphism analysis*. Virus Genes, 1996; 13(1): 69-81
- 60 **Janssens W, Heyndrickx L, Franssen K, Motte J, Peeters M, Nkengasong JN, Ndumbe PM, Delaporte E, Perret JL, Atende C, Piot P, van der Groen G.** *Genetic and phylogenetic analysis of env subtypes G and H in central Africa*. ARHR, 1994; 10: 877-9

- 61 **Janssens W, Buvé A, Nkengasong J.** *The puzzle of HIV-1 subtypes in sub-Saharan Africa.* AIDS, 1997; 11: 705-12
- 62 **Jetzt AE, Yu H, Klarmann GJ, Ron Y, Preston BD, Dougherty JP.** *High rate of recombination throughout the human immunodeficiency virus type 1 genome.* J Virol, Februar 2000; 74(3): 1234-40
- 63 **Jin MJ, Hui H, Robertson DL, Muller MC, Barre-Sinoussi F, Hirsch VM, Allan JS, Shaw GM, Sharp PM, Hahn BH.** *Mosaic genome structure of simian immunodeficiency virus from West African green monkeys.* EMBO J, 15.06.1994; 13(12): 2935-47
- 64 **Kijak GH, Tovanabutra S, Sanders-Buell E, Watanaveeradej V, Kim R, de Souza M, Brown AE, Birx DL, McCutchan FE.** *New approaches for the design of multi-region hybridization assays (MHAs) for HIV-1 genotyping and a second-generation assay for Southeast Asia.* Int Conf AIDS, 11.-16.07.2004; 15:(abstract no. MoPeC3415)
- 65 **Kim JH, McLinden RJ, Mosca JD, Burke DS, Boswell RN, Birx DL, Redfield RR.** *Transcriptional effects of superinfection in HIV chronically infected T cells: studies in dually infected clones.* J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol, 01.08.1996; 12(4): 329-42
- 66 **Koechlin F.** *Die neuen Killerviren.* In: *Herz vom Schwein? Risiken der Xenotransplantation beim Menschen.* Basler Appell gegen Gentechnologie, 1996; 12-20
- 67 **Korber B, Muldoon M, Theiler J, Gao F, Gupta R, Lapedes A, Hahn BH, Wolinsky S, Bhattacharya T.** *Timing the ancestor of the HIV-1 pandemic strain.* Science, 09.06.2000; 289: 1789-96
- 68 **Korn K.** *Was bringen Kombinationstests zum Nachweis von HIV-Antigenen und -Antikörpern in der HIV-Diagnostik?* Retrovirus (Bulletin des Instituts für Klinische und Molekulare Virologie der Universität Erlangen), 2002; 1: 5
- 69 **Kostrikis LG, Bagdades E, Cao Y, Zhang L, Dimitriou D, Ho DD.** *Genetic analysis of human immunodeficiency virus type 1 strains from patients in Cyprus: identification of a new subtype designated subtype I.* J Virol, 1995; 69: 6122-30
- 70 **LANL.** *HIV-database.* Los Alamos National Laboratory, 2002; Los Alamos, USA. Aus der Website:
<http://www.hiv-web.lanl.gov/content/hiv-db/COMPENDIUM-/2001/Intro.pdf>
- 71 **Leitner T, Alaeus A, Marquina S, Lilja E, Lidman K, Albert J.** *Yet another subtype of HIV type 1?* ARHR, 1995; 11: 995-7
- 72 **Li WH, Tanimura M, Sharp PM.** *Rates and dates of divergence between AIDS virus nucleotide sequences.* Molecular Biology and Evolution, 1988; 5: 313-30

- 73 **Lole KS, Bollinger RC, Paranjape RS, Gadkari D, Kulkarni SS, Novak NG, Ingersoll R, Sheppard HW, Ray SC.** *Full-length human immunodeficiency virus type 1 genomes from subtype C-infected seroconverters in India, with evidence of intersubtype recombination.* J Virol, Januar 1999; 73(1): 152-60
- 74 **Louwagie J, Janssens W, Mascola J, Heyndrickx L, Hegerich P, van der Groen G, McCutchan FE, Burke DS.** *Genetic diversity of the envelope glycoprotein from human immunodeficiency virus type 1 isolates of African origin.* J Virol, 1995; 69: 263-71
- 75 **Lyamuya E, Olausson-Hansson E, Albert J, Mhalu F, Biberfeld G.** *Evaluation of a prototype Amplicor PCR assay for detection of human immunodeficiency virus type 1 DNA in blood samples from Tanzanian adults infected with HIV-1 subtypes A, C and D.* J Clin Virol, Juni 2000; 17(1): 57-63
- 76 **Marx JL.** *New Disease Baffles Medical Community.* Science, 13.08.1982; 217(4560): 618-21
- 77 **Marx JL.** *Strong New Candidate for AIDS Agent.* Science, 04.05.1984; 224(4648): 475-7
- 78 **McCutchan FE, Hegerich PA, Brennan TP, Phanuphak P, Singharaj P, Jugsudee A, Berman PW, Gray AM, Fowler AK, Burke DS.** *Genetic variants of HIV-1 in Thailand.* ARHR, 1992; 8: 1887-95
- 79 **Modrow S, Falke D.** *Molekulare Virologie.* Spektrum Akademischer Verlag, München, 1997
- 80 **Mullis KB, Faloona FA.** *Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction.* Methods Enzymol, 1987; 155: 335-50
- 81 **Murphy FA, et al.** *Virus Taxonomy.* 6th report of the ICTV, Springer Verlag, Wien, New York, 1995
- 82 **Myers G, Josephs SF, Rabson AB, Smith TF, Wong-Staal F.** *Human retroviruses and AIDS: a compilation and analysis of nucleic acid and amino acid sequences.* Los Alamos National Laboratory, 1988; Los Alamos, USA
- 83 **Myers G, MacInnes K, Korber B.** *The emergence of simian/human immunodeficiency viruses.* ARHR, 1992; 8: 373-86
- 84 **Nahmias AJ, Weiss J, Yao X, Lee F, Kodzi R, Schanfield M, Matthews T, Bolognesi D, Durack D, Motulsky A, et al.** *Evidence for human infection with an HTLV III/LAV-like virus in Central Africa, 1959.* Lancet, 31.05.1986; 1(8492): 1279-80
- 85 **Neilson JR, John GC, Carr JK, Lewis P, Kreiss JK, Jackson S, Nduati RW, Mbori-Ngacha D, Panteleeff DD, Bodrug S, Giachetti C, Bott MA, Richardson BA, Bwayo J, Ndinya-Achola J, Overbaugh J, et al.** *Subtypes of human immunodeficiency virus type 1 and disease stage among women in Nairobi, Kenya.* J Virol, 1999; 73: 4393-403

- 86 **Nelson B.** *Researchers Announce that a New Subspecies of Chimpanzee May Have Been Found in Africa.* Record (Columbia University), 26.09.1997; 23(4)
- 87 **Newsweek.** *The AIDS debate: Call it a Draw.* 13.04.1987
- 88 **Otten RA, Ellenberger DL, Adams DR, Fridlund CA, Jackson E, Pieniazek D, Rayfield MA.** *Identification of a window period for susceptibility to dual infection with two distinct human immunodeficiency virus type 2 isolates in a *Macaca nemestrina* (pig-tailed macaque) model.* J Infect Dis, September 1999; 180(3): 673-84
- 89 **Papadopulos-Eleopulos E, et al.** *Did Africans get HIV from chimps?* AIDS, 1999; 7(8): 1-4
- 90 **Peeters M, Liegeois F, Torimiro N, Bourgeois A, Mpoudi E, Vergne L, Saman E, Delaporte E, Saragosti S.** *Characterization of a highly replicative intergroup M/O human immunodeficiency virus type 1 recombinant isolated from a Cameroonian patient.* J Virol, September 1999; 73(9): 7368-75
- 91 **Peeters M, Courgnaud V, Abela B, Auzel P, Pourrut X, Bibollet-Ruche F, Loul S, Liegeois F, Butel C, Koulagna D, Mpoudi-Ngole E, Shaw GM, Hahn BH, Delaporte E.** *Risk to human health from a plethora of simian immunodeficiency viruses in primate bushmeat.* Emerg Infect Dis, Mai 2002; 8(5): 451-7
- 92 **Pietschmann T.** *Gentechnologische Methoden in der Virologie.* Einleitung der Dissertation, 2000; Institut für Virologie, Universität Würzburg
- 93 **Piot P, Quinn TC, Taelman H, et al.** *Acquired immunodeficiency syndrome in a heterosexual population in Zaire.* Lancet, 1984; 2: 65-9
- 94 **Quinn TC, Mann JM, Curran JW, Piot P.** *AIDS in Africa: an epidemiologic paradigm.* Science, 1986; 234: 955-63
- 95 **Robertson DL, Sharp PM, McCutchan FE, Hahn BH.** *Recombination in HIV-1.* Nature, 1995; 374: 124-6
- 96 **Robertson DL, Gao F.** *Recombination of HIV Genomes.* In: Saksena N, ed.: *Human Immunodeficiency Viruses*, Medical Systems SpA, Rome, 1998
- 97 **Robertson DL, Anderson JP, Bradac JA, Carr JK, Foley B, Funkhouser RK, Gao F, Hahn B, Kalish ML, Kuiken C, Learn GH, Leitner T, McCutchan F, Osmanov S, Peeters M, Pieniazek D, Salminen M, Sharp PM, Wolinsky S, Korber B.** *HIV-1 Nomenclature Proposal – A Reference Guide to HIV-1 Classification – Overview of subtypes in the primate immunodeficiency viruses.* Science, 07.04.2000; 288(5463): 55-56
- 98 **Rozenbaum W, Coulaud JP, Saimot AG, Klatzmann D, Mayaud C, Carette MF.** *Multiple opportunistic infection in a male homosexual in France.* Lancet, 06.03.1982; 1: 572-3
- 99 **Rubbert A.** *Nachrichten zur Übersicht Immunologie auf der CROI, 1. Teil.* 07.03.2002; Aus der Website: <http://www.hiv.net>

- 100 **Sarr AD, Sankale JL, Gueye-Ndiaye A, Essex M, Mboup S, Kanki PJ.** *Genetic analysis of HIV type 2 in monotypic and dual HIV infections.* AIDS Res Hum Retroviruses, 10.02.2000; 16(3): 295-8
- 101 **Serwadda D, Sewankambo NK, Lwegaba A, et al.** *Slim disease: a new disease in Uganda and its association with HTLV-III infection.* Lancet, 1985; 2: 849-52
- 102 **Sharp PM, Robertson DL, Gao F, Hahn B.** *Origins and diversity of human immunodeficiency viruses.* AIDS, 1994; 8(suppl 1): 27-42
- 103 **Simmonds P, Balfe P, Peutherer JF, Ludlam CA, Bishop JO, Brown AJ.** *Human immunodeficiency virus-infected individuals contain provirus in small numbers of peripheral mononuclear cells and at low copy numbers.* J Virol, Februar 1990; 64(2): 864-72
- 104 **Simon F, Mauclore P, Roques P, Loussert-Ajaka I, Muller-Trutwin MC, Saragosti S, Georges-Courbot MC, Barre-Sinoussi F, Brun-Vezinet F.** *Identification of a new human immunodeficiency virus type 1 distinct from group M and group O.* Nat Med, September 1998; 4:1032-7
- 105 **Sullivan PS, Do AN, Ellenberger D, Pau CP, Paul S, Robbins K, Kalish M, Storck C, Schable CA, Wise H, Tetteh C, Jones JL, McFarland J, Yang C, Lal RB, Ward JW.** *Human immunodeficiency virus (HIV) subtype surveillance of African-born persons at risk for group O and group N HIV infections in the United States.* J Infect Dis, Februar 2000; 181(2): 463-9
- 106 **Takehisa J, Zekeng L, Ido E, Yamaguchi-Kabata Y, Mboudjeka I, Harada Y, Miura T, Kaptu L, Hayami M.** *Human immunodeficiency virus type 1 intergroup (M/O) recombination in Cameroon.* J Virol, August 1999; 73(8): 6810-20
- 107 **Tatt ID, Barlow KL, Clewley JP.** *A gag gene heteroduplex mobility assay for subtyping HIV-1.* J Virol Methods, 2000; 87: 41-51
- 108 **Thomson MM, Najera R.** *Travel and the introduction of human immunodeficiency virus type 1 non-B subtype genetic forms into Western countries.* Clin Infect Dis, 15.06 2001; 32(12): 1732-7
- 109 **Thorsby E.** *Cell specific and common antigens on human granulocytes and lymphocytes demonstrated with cytotoxic hetero-antibodies.* Vox Sang, August 1967; 13(2): 194-206
- 110 **Ting A, Morris PJ.** *A technique for lymphocyte preparation from stored heparinized blood.* Vox Sang, 1971; 20: 561-3
- 111 **Triques K, Bourgeois A, Saragosti S, Vidal N, Mpoudi-Ngole E, Nzilambi N, Apetrei C, Ekwilanga M, Delaporte E, Peeters M.** *High diversity of HIV-1 subtype F strains in Central Africa.* Virology, 1999; 259: 99-109

-
- 112 **Triques K, Bourgeois A, Vidal N, Mpoudi-Ngole E, Mulanga-Kabeya C, Nzilambi N, Torimiro N, Saman E, Delaporte E, Peeters M.** *Near-full-length genome sequencing of divergent African HIV-1 subtype F viruses leads to the identification of a new HIV-1 subtype designated K.* ARHR, 2000; 16: 139-151
- 113 **UNAIDS.** *AIDS epidemic update.* Dezember 2002
- 114 **UNAIDS.** *Epi fact sheets by country – 2002 updates.* Dezember 2000
- 115 **Vanden Haesevelde M, Decourt JL, De Leys RJ, et al.** *Genomic cloning and complete sequence analysis of a highly divergent African human virus isolate.* J Virol, 1994; 68: 1586-96
- 116 **Vilaseca J, Arnau JM, Bacardi R, Mieras C, Serrano A, Navarro C.** *Kaposi's sarcoma and Toxoplasma gondi brain abscess in a Spanish homosexual.* Lancet, 06.03.1982; 1: 572
- 117 **Wooley DP, Smith RA, Czajak S, Desrosiers RC.** *Direct demonstration of retroviral recombination in a rhesus monkey.* J Virol, Dezember 1997; 71(12): 9650-3
- 118 **Wottawa A, Klein G, Altman H.** *A method for the isolation of human and animal lymphocytes with Ficoll-Urografin.* Wiener Klinische Wochenschrift, 1974; 86: 161-3
- 119 **Zhu T, Tuofu M, Korber B, Nahinias AJ.** *An African HIV-1 Sequence from 1959 and Implications for the Origin of the Epidemic.* Nature, 05.02.1998; 391: 594-7

8. ABKÜRZUNGEN

A	Adenin
ACA	antenatal clinic attendees
AGM	African green monkey (Grüne Meerkatze)
AIDS	acquired immunodeficiency syndrome
ANC	antenatal clinic
BA	bar workers
BD	blood donors (Blutspender)
bp	base pair
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
cpx	complex
CPZ	chimpanzee (Schimpanse)
CRF	circulating recombinant forms
C	Cytosin
DAAD	Deutscher Akademischer Austauschdienst
dATP	2'-Deoxyadenosin 5'-Triphosphat
dCTP	2'-Deoxycytidin 5'-Triphosphat
DFG	Deutsche Forschungsgemeinschaft
dGTP	2'-Deoxyguanosin 5'-Triphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Deoxynukleosid 5'-Triphosphate
dTTP	2'-Deoxythymidin 5'-Triphosphat
env	envelope (ORF der HIV-Hülle)
EK	Einfachinfektion mit einem rekombinanten Subtyp
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
ER	Einfachinfektion mit einem reinen Subtyp
F-BD A	weibliche Blutspender des Mbeya Consultant Hospital
F-BD B	weibliche Blutspender des Meta Hospital Mbeya
FBS	fetal bovine serum
FRET	Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer
G	Guanin
gag	ORF des gruppenspezifischen Antigens
GH	guesthouse attendants
GRID	gay related immune deficiency
GTZ	Gesellschaft für Technische Zusammenarbeit
GY	grocery workers
HISIS	HIV Superinfection Study
HIV	human immunodeficiency virus
HO	hotel attendants
HRG	High-Risk-Group
HS	hybridisation site (probe-Hybridisierungsstelle)
HTA	high transmission area

HTLV	human T-cell leukaemia virus
kb	Kilobasen
LANL	Los Alamos National Laboratory
LTR	long terminal repeat
MHA	Multi-Region Hybridisation Assay
M-BD A	männliche Blutspender des Mbeya Consultant Hospital
M-BD B	männliche Blutspender des Meta Hospital Mbeya
MK	Mehrfachinfektion
MMRP	Mbeya Medical Research Programme
MRACP	Mbeya Regional AIDS Control Programme
NACP	National AIDS Control Programme
NAT	Nukleinsäure-Amplifikations-Techniken
NE	HIV-1-negatives Individuum
nef	ORF des negativen Kontrollfaktors
NRG	Non-High-Risk-Group
OR	odds ratio
ORF	open reading frame (offene Leserahmen)
PBMC	peripheral blood mononuclear cells
PBS	phosphate buffer saline solution
PJP	Pneumocystis-jiroveci-Pneumonien (früher: Pneumocystis-carinii-Pneumonien, PCP)
PCR	polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PO	pombe sellers
pol	ORF der Polymerase
RCM	red-capped mangabey
rev	ORF des Expressionsregulators
RHU	reproductive health unit
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkriptase
SIV	simian immunodeficiency virus
SMM	sooty mangabey (Halsbandmangabe) und macaque (Makake)
SRV	sexuelles Risikoverhalten
STI	sexually transmitted infection
tat	ORF des Transkriptionsaktivators
T	Thymin
Tm	melting temperature
UNAIDS	The Joint United Nations Programme on HIV/AIDS
vif	ORF des Proteins für die Virusinfektiösität
vpr	ORF des viralen Proteins R
vpu	ORF des viralen Proteins U
vpx	ORF des viralen Proteins X

9. ANHANG



Abbildung 31: Blutentnahme bei Frauen der Kohorte der *HIV Superinfection Study* (HISIS). Diese umfasst über 700 Prostituierte, die von September 2000 bis Juni 2005 bezüglich HIV und anderen STI gescreent und bei denen verschiedene Maßnahmen (Aufklärung, Kondombenutzung, medizinische Beratung und Versorgung u.a.) im Kampf gegen HIV durchgeführt wurden.



Abbildung 32: In der Kohorte der HISIS wurden alle Frauen mit einer Identitätskarte ausgestattet und in dreimonatigen *follow-ups* untersucht.



Abbildung 33: Das *Regional HIV-Laboratory* in Mbeya Region wurde im August und September 2000 unter meiner Koordination aufgebaut und gehört heute zu einer der modernsten HIV- und STI-Labors in Afrika. Primär dient es der serologischen HIV-Testung von Patienten des *Mbeya Consultant Hospital*. Des Weiteren dient es als Forschungslabor für die *HIV Superinfection Study* (HISIS). In diesem Labor wurden in der Zeit von September 2000 bis August 2001 alle serologischen HIV-Tests für die vorliegende Querschnittsstudie durchgeführt.



Abbildung 34: Heute arbeiten im *Regional HIV-Laboratory* über 15 tansanische *laboratory technicians* und *laboratory assistants*. Die meisten Laborkräfte arbeiten sowohl für das *Mbeya Consultant Hospital* als auch für HISIS.

10. DANKSAGUNG

Im Jahr 2000 hatte ich die einmalige Gelegenheit, den Aufbau des Labors eines der heute größten HIV-Forschungsprojekte der Welt und dessen Koordination in der Zeit von August 2000 bis August 2001 zu übernehmen. Dieses Projekt, das heute den Namen *Mbeya Medical Research Programme (MMRP)* trägt, wird geleitet von Herrn PD Dr. med. **Michael Hölscher** von der Abteilung für Infektions- und Tropenmedizin der Ludwig-Maximilians-Universität München. Herrn Dr. med. Hölscher als auch dem Leiter der Abteilung und Berichterstatter der vorliegenden Dissertation, Herrn Prof. Dr. med. **Thomas Löscher**, sowie seinem Vertreter, Herrn Prof. Dr. med. **Franz-Josef Falkner von Sonnenburg**, danke ich sehr für das entgegengebrachte Vertrauen und für die Möglichkeit, an diesem Projekt in Mbeya als Labor-Koordinator, Technischer Manager und Projekt-Assistent mitarbeiten zu können. Des Weiteren möchte ich Herrn Dr. med. Hölscher großen Dank für die kompetente Betreuung während meiner Tätigkeit als wissenschaftlicher Assistent und Assistenzarzt an der Abteilung für Infektions- und Tropenmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München aussprechen. In dieser Zeit erfolgten molekularbiologische Untersuchungen von Blutproben und die wissenschaftliche Auswertung meiner Daten aus Mbeya. Aus meiner dortigen Arbeit gehen diese Doktorarbeit, zwei Master-Arbeiten und voraussichtlich fünf wissenschaftliche Publikationen hervor, die ohne die Unterstützung von Herrn Dr. med. Hölscher nicht möglich gewesen wären.

Durch meine wissenschaftliche Arbeit kam ich in Kontakt mit namhaften Persönlichkeiten der HIV-Forschung. Für die wertvollen Vorträge und Gespräche sowie für die Ratschläge bezüglich meiner Dissertation danke ich im Besonderen Frau Dr. **Francine McCutchan** (Walter-Reed Institute, Rockville, USA), Herrn Dr. **George Schmid** (CDC, Atlanta, und WHO, Genf) und Herrn Dr. **Jesús María Calleja** (WHO, Genf).

Meine Auslandstätigkeit in Tansania wurde mir ermöglicht durch ein zwölfmonatiges Doktorandenstipendium des **DAAD** (Deutscher Akademischer Austauschdienst, Bonn) im Rahmen des gemeinsamen Hochschulsonderprogramms III von Bund und Ländern. Dafür bin ich sehr dankbar.

Ein großer Dank geht auch an Herrn Dr. med. **Oliver Hoffmann** und seine tansanischen Mitarbeiter, die ab Januar 2000 die *HIV Superinfection Study (HISIS)* mit einer Kohorte von

über 700 Prostituierten aufgebaut und bis Juli 2003 koordiniert haben. Ihm und Frau Dr. med. **Gabriele Riedner** danke ich ebenso für die intensive und erfolgreiche Zusammenarbeit unserer drei Projekt-Arbeitsgruppen in der Zeit von August 2000 bis August 2001 in Mbeya.

Ein besonderes Dankeschön möchte ich meinen tansanischen Kollegen und Freunden für das fruchtbare und sehr sympathische Miteinander am *Regional HIV-Laboratory* in Mbeya aussprechen: den *laboratory technicians* Herrn **Frowin Nichombe**, Herrn **Yohana Fungo**, Herrn **Marcel Mlay** († 2004) und Frau **Josephine Kategela** sowie der *laboratory assistant* Frau **Caroline Edwards**. Ferner möchte ich allen weiteren Mitarbeitern und den Freunden der *HIV Superinfection Study* sowie den 1.734 Studienteilnehmern danken; sie waren am Erfolg dieser Studie maßgeblich beteiligt.

Des Weiteren danke ich dem *Regional Medical Officer*, Herrn Dr. **Donan Mmbando**, dem *Medical Superintendent*, Herrn Dr. **Titus Nkulila** († 2003), und dem damaligen *Regional AIDS-Control Coordinator*, Herrn Dr. **Leonard Maboko**, mit deren freundlicher Unterstützung ich die Möglichkeit hatte, im Rahmen des *National Sentinel Surveillance* Blutproben und Daten von *antenatal clinic attendees* und Blutspendern zu gewinnen.

Nicht unerwähnt bleiben darf die unschätzbar große Hilfe und Unterstützung zahlreicher tansanischer Freunde und Kollegen, die mir einen phantastischen Einblick in das dortige Leben und die Kultur ermöglichten und mir somit meinen Aufenthalt in Tansania zu einem meiner persönlich eindringlichsten und wertvollsten Monate meines Lebens machten. Erst diese Kenntnisse erlaubten mir die soziologischen Zusammenhänge und deren kulturelle Hintergründe hinsichtlich des hier vorgestellten Themas zu verstehen. Dafür danke ich sehr meinen Freunden **Weston Assisya**, **Mary Rusizoka**, **Ellen Mulinda**, **Oliver Kyando**, **Erica Sanga** und **Beatrice Faradji**.

Im Besonderen danke ich meinen Kolleginnen **Martina Gerhardt** und **Doreen Mloka**, die die HIV-1-Subtypisierung mittels MHA mit den hier vorgestellten Proben der HRG durchgeführt haben, für unsere gute Zusammenarbeit im Labor der Abteilung für Infektions- und Tropenmedizin der Ludwig-Maximilians-Universität München.

Zu guter Letzt ein herzliches Danke an meine Familie für ihr großes Interesse an meiner Arbeit und ihre vielfältige Unterstützung.

11. LEBENS LAUF

Nachname Herbinger
 Vorname Karl-Heinz Alois

Geburtstag 06.06.1966
 Geburtsort Neuburg an der Donau

Adresse Amalienstraße 49
 D – 80799 München

Telefon 0049 – (0)89 – 28779277
 E-Mail karl_heinz_herbinger@hotmail.com

Nationalität Deutsch
 Familienstand Unverheiratet
 Kinder Keine



Berufe

Arzt

- Technische Universität München, November 1998
- Studium der Humanmedizin (1988 – 1998) an der Universität Regensburg, an der Technischen Universität München, an der Universidad de Buenos Aires und an der Universidade de São Paulo

MTRA – Medizinisch-Technischer Radiologie-Assistent

- Klinikum Ingolstadt, Juli 1988
- Berufsausbildung an der Berufsfachschule für MTA des Klinikums Ingolstadt

Bereichsbezeichnung

Tropenmedizin

- Bayerische Landesärztekammer, München, Juni 2003

Klinische Erfahrung

Innere Medizin

- Tropenlinik Paul-Lechler Krankenhaus, Tübingen:
 18 Monate (Februar 1999 – Juli 2000)
 Stationsdienst, Ambulanz

Tropenmedizin

- Consultant Hospital Mbeya, Tansania:
 13 Monate (August 2000 – August 2001)
 Ambulanz, Labor, Projektmanagement
- Abteilung für Infektions- und Tropenmedizin der Ludwig-Maximilians-Universität München:
 21 Monate (Sept. 2001 – Dez. 2002, Juni – Dez. 2005)
 Ambulanz, Labor

-
- Erfahrungen in
Public Health
- HISIS (HIV Superinfection Study) und BHP (Barworker Health Project)**
- 15 Monate (August 2000 – August 2001, April – Mai 2002) in Mbeya, Tansania
 - Koordinator des *Regional HIV Laboratory* von Mbeya Region
 - Wissenschaftlicher Assistent und Technischer Manager der Studie (Forschung an HIV-1-Subtypen und HIV Superinfektionen) und des Projekts (HIV-Prävention und klinische Versorgung von Prostituierten, *HIV sentinel surveillance*)
- Erfahrungen in
Epidemiologie
- AMP (Agence de Médecine Préventive) à l'Institut Pasteur**
- 18 Monate (Dezember 2005 – Mai 2007) in Paris, Frankreich
 - *Médecin Épidémiologiste*: Koordination von Impfstudien in Lateinamerika und Afrika
- Postgraduierten-
Studiengänge
- MSc – Master of Science in International Health**
- troped / Institut für Tropenmedizin der Freien Universität Berlin und der Humboldt-Universität zu Berlin
 - Module: März 2003 – März 2004
 - Abschluss: November 2005
- MPH – Magister Public Health**
- Ludwig-Maximilians-Universität München
 - Module: April 2004 – Juli 2005
 - Abschluss: Februar 2006
- Diplom
- DTM&PH – Diploma in Tropical Medicine and Public Health**
- Institut für Tropenmedizin der Freien Universität Berlin und der Humboldt-Universität zu Berlin, Juni 2003