

ROBERT KOCH INSTITUT



Monitoring von inzidenten HIV Infektionen in Deutschland (InzSurv-HIV) 01.2011-06.2014

Abschlussbericht März 2015

Robert Koch-Institut

Fachgebiet „HIV/AIDS und andere sexuell
oder durch Blut übertragbare Infektionen“, FG34 (Abteilung für Infektionsepidemiologie)
und
Fachgebiet „HIV und andere Retroviren“, FG18 (Abteilung für Infektionskrankheiten)

Die Studie zur Surveillance inzidenter HIV-Infektionen wird von zwei Arbeitsgruppen durchgeführt: Beteiligt sind das Fachgebiet „HIV und andere Retroviren“ (FG18, Dr. PD Dr. Bannert) sowie das Fachgebiet „HIV/AIDS und andere sexuell oder durch Blut übertragbare Infektionen“ (FG 34, Dr. V. Bremer). Der Bericht wurde von beiden Arbeitsgruppen gemeinsam erstellt.

Stand: 11.03.2015 (Berichtszeitraum 1.Januar 2011 - 30.Juni 2014)

Vorbemerkung

Aus Gründen der einfacheren Lesbarkeit wird auf geschlechtsspezifisch differenzierende Formulierungen verzichtet. Die in diesem Bericht verwendete Form gilt im Sinne der Gleichbehandlung grundsätzlich für Frauen und Männer gleichermaßen.

Inhaltsverzeichnis

VORBEMERKUNG	3
1. ZUSAMMENFASSUNG	5
2. EINLEITUNG	7
2.1. ZIELE DES PROJEKTS	9
2.2. PROJEKTSTRUKTUR.....	9
3. METHODEN	10
3.1. DURCHFÜHRUNG DER STUDIE	10
3.2. DATENERHEBUNG.....	13
3.3. DATENSCHUTZ / DATENSICHERHEIT	14
3.4. DATENAUSWERTUNG	15
4. ERGEBNISSE	15
4.1. PROZESSERGEBNISSE	15
4.2. ÜBERFÜHRUNG DES MONITORINGS IN DIE NATIONALE SURVEILLANCE	16
4.3. FORSCHUNGSERGEBNISSE.....	16
4.3.1. <i>Probensammlung</i>	16
4.3.2. <i>HIV-Meldungen mit Filterproben</i>	17
4.3.3 <i>HIV-Erstdiagnosen mit Filterproben</i>	19
4.3.4. <i>Zusatzmodul: Primärresistenztestung und Subtypisierung von inzidenten HIV-Erstdiagnosen</i>	25
4.4. KOOPERATION MIT ANDEREN INZIDENZPROJEKTEN	34
5. DISKUSSION DER ERGEBNISSE	36
6. PUBLIKATIONEN	38
6.1. PUBLIKATIONEN IN FACHZEITSCHRIFTEN	38
6.2. VORTRÄGE AUF FACHKONGRESSEN (2011-2014)	39
6.3. POSTER AUF FACHKONGRESSEN (2011-2014)	39
6.4. VORTRÄGE AUF WORKSHOPS UND SEMINAREN (2011-2014).....	41
7. LITERATURVERZEICHNIS	43

1. Zusammenfassung

Die Studie zum Monitoring von inzidenten HIV Infektionen in Deutschland (InzSurv-HIV) wurde vom Bundesministerium für Gesundheit (BMG) gefördert mit dem Ziel den Anteil von kürzlich erworbenen HIV-Infektionen (innerhalb der letzten 5 Monate) von 2011-2013 zu ermitteln und somit aktuelle Risikopopulationen zu erfassen. In einem Zusatzmodul sollte die Bestimmung von Primärresistenzen und HIV-Subtypen bei rezenten (kürzlich erworben) HIV-Diagnosen erprobt und durchgeführt werden.

Von teilnehmenden Laboren wurde aus vorhandenem Restblut, Blut auf ein Filterpapier getropft, getrocknet und ans RKI zusammen mit der HIV-Meldung geschickt. Nach der Dokumentation des Eingangs im Fachgebiet „HIV/AIDS und andere sexuell oder durch Blut übertragbare Infektionen“ (FG34) wurde im Labor des Fachgebiets „HIV und andere Retroviren“ (FG18) die Filterpapierprobe mit Hilfe des BED-ELISA auf eine kürzlich erworbene HIV-Infektion untersucht. Anschließend wurde von der inzidenten Probe die virale RNA isoliert, die Viruslast gemessen und eine Amplifikation vorgenommen, um die RNA zu sequenzieren.

Insgesamt wurden von 19.078 übermittelten HIV-Meldungen 11.232 (58,9%) Filterproben von 81 teilnehmenden Laboren ans RKI gesandt. Davon waren 6.555 (58,4%) Erstdiagnosen mit Filterproben. Insgesamt wurden von Januar 2011 - Juni 2014 2.142 (32,7%) der Erstdiagnosen mit Filterproben als kürzlich erworbene HIV-Infektion identifiziert. Der höchste inzidente Anteil innerhalb einer Altersgruppe wurde für die Altersgruppe der 18-29 Jährigen (40%, $p < 0,001$) ermittelt. Bei 36% aller Personen deutscher Herkunft mit einer HIV-Erstdiagnose konnte eine inzidente Infektion nachgewiesen werden. Etwa 75% ($n=1.601$) der inzidenten HIV-Infektionen wurden wahrscheinlich in Deutschland übertragen. Verglich man Personen aus Deutschland mit Migranten fiel auf, dass sowohl bei Deutschen als auch bei Migranten häufiger der Infektionsort Deutschland berichtet wurde (94% und 53%). Ein signifikanter Unterschied ($p < 0,001$) konnte bei Migranten bei der Angabe zum wahrscheinlichen Infektionsort festgestellt werden. Bei den Männern wurde der höchste Anteil (38%) inzidenter HIV-Infektionen innerhalb der Transmissionsgruppe der MSM (Männer die Sex mit Männern hatten) gefunden. Bei den Frauen lag der höchste inzidente Anteil (45%) innerhalb der Gruppe der intravenösen Drogenabhängigen (IVDA). Innerhalb des Studienzeitraums konnte ein leichter Anstieg des Anteils inzidenter Infektionen innerhalb eines Quartals von insgesamt 3% (von 28% im 1. Quartal 2013 auf 31% im 2. Quartal 2014) beobachtet werden.

Insgesamt wurden von 2.503 inzident getesteten Filterproben im Labor weitere Analysen durchgeführt. Nach Bereinigung durch Einschlusskriterien, nachweisbarer Viruslast und vollständiger Amplifikation konnte bei 699 inzidenten Filterpapierproben eine Genotypisierung durchgeführt werden und nach Ausschluss von doppelten Sequenzen, standen 692 Sequenzierungen für weitere Analysen zur Verfügung. Übertragene Resistenzen gegen Protease-Inhibitoren (PI), NRTI und/oder NNRTI in 2012-2014 lagen in 87 von 692 (13%;

95% KI 10%-19%) der untersuchten Proben vor. Im zeitlichen Verlauf vom 1. Halbjahr 2012 bis Ende des 1. Halbjahrs 2014 (5 Semester) ließ sich für die Übertragung von HIV-Resistenzen unter Neuinfektionen ein signifikant abfallender Trend erkennen ($p_{\text{Trend}} = 0,04$). Die Subtypbestimmung der HIV-Infektionen aus 2012-Juni 2014 ergab eine Verteilung von 79% Subtyp B-Infektionen und 21% (147/692; 95% KI 18%-25%) Non-B Infektionen. Die häufigsten „Non-B“ Subtypen in Deutschland sind die Subtypen A (5%) und C (3%), gefolgt von der Rekombinante CRF02_AG (3%), sowie den Subtypen C (3%), D (1%), F (2%) und der Rekombinante CRF01_AE (2%).

Insgesamt konnte somit bei einem Drittel der untersuchten Filterproben bei HIV-Erstdiagnosen eine kürzlich erworbene HIV-Infektion nachgewiesen werden. Aktuelle Risikopopulationen konnten erkannt werden. Durch das Zusatzmodul konnte sowohl ein neues Verfahren zur Bestimmung von Primärresistenzen und HIV-Subtypen bei rezenten (kürzlich erworben) HIV-Diagnosen erprobt werden und schon erste Ergebnisse liefern. Es konnte gezeigt werden, dass der Anteil von übertragenen Resistenzen leicht sank und dass der Anteil der non-B Subtypen höher ist als in anderen deutschen Studien. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Erfassung und Beobachtung von kürzlich erworbenen HIV-Infektionen ein wesentlicher Bestandteil der Surveillance von HIV-Infektionen sein sollte.

2. Einleitung

Ein wesentliches Ziel der epidemiologischen Überwachung (Surveillance) von Infektionskrankheiten ist das Erkennen von aktuellen Entwicklungen des Infektionsgeschehens. In Deutschland werden HIV-Infektionen seit 1988 durch die Meldepflicht von Neudiagnosen erfasst. Nach §7(3) des Infektionsschutzgesetzes (IfSG) sind Diagnostiklabore in Deutschland verpflichtet, bestätigte HIV-Erstdiagnosen nichtnamentlich direkt an das Robert Koch-Institut (RKI) zu melden, wodurch eine kontinuierliche epidemiologischen Überwachung der HIV-Epidemie ermöglicht wird.

Eine grundsätzliche Einschränkung dieser Surveillance von HIV-Erstdiagnosen ist jedoch, dass nicht exakt der aktuelle Stand der Epidemie widerspiegelt wird, da die Meldungen der HIV-Neudiagnosen

- durch Angebot und Inanspruchnahme von Testmöglichkeiten sowie durch das Meldeverhalten der Labore und überweisenden Ärzte schwanken kann (1),
- aufgrund des sehr langen Zeitraums zwischen HIV-Infektion und dem ersten Auftreten klinischer Symptome keine direkten Rückschlüsse auf den Infektionszeitpunkt zulassen.

Zur Unterscheidung kürzlich erworbener („rezenter“) HIV-Infektion (Neuinfektion) von länger bestehenden („chronischen“) Infektion, existieren jedoch seit einigen Jahren spezielle serologische Teste (HIV-Inzidenzteste), die auf dem Titer und/oder dem Reifungsgrad der Bindungseigenschaften HIV-spezifischer Antikörper beruhen. Der zeitliche Grenzwert zwischen inzidenten und prävalenten Infektionen variiert je nach eingesetztem Test bei ca. 4-6 Monaten Infektionsdauer.

Die Kenntnis um den Anteil der Neuinfektionen unter den Neudiagnosen im Rahmen epidemiologischer Querschnittsuntersuchungen dient dem allgemeinen Verständnis der Ausbreitungsdynamik von HIV-1, der Identifikation von Personengruppen, in denen HIV-Transmissionen gehäuft vorkommen (siehe Aktion 5 „Epidemiologie der Neuinfektionen“ im „Aktionsplan zur Umsetzung der HIV/AIDS-Bekämpfungsstrategie“ (2)) und liefert wertvolle Zusatzinformationen zur Bestimmung der HIV-Inzidenz zusätzlich zu der bisher in Deutschland angewendeten Methode der Rückrechnung aus Prävalenzdaten die anhand mathematischer Modelle gewonnen werden.

Serologische Inzidenzteste („Test for recency of infection“; TRI) werden schon in einigen europäischen Ländern (Frankreich, Großbritannien, Schweiz, Niederlande, Portugal und Spanien) zur HIV-Surveillance angewendet (3-9). In den Vereinigten Staaten von Amerika ist die Bestimmung der HIV-Inzidenz (als Anteil der inzidenten HIV-Infektionen unter den Neudiagnosen) mit dem BED-CEIA inzwischen in 32 Bundesstaaten und Territorien ein weiteres Standbein der nationalen Surveillance der HIV/AIDS-Epidemie (10).

Die Charakterisierung der zirkulierenden HIV-Varianten auf molekularbiologisch und virologischer Ebene über die Zeit ermöglicht, Trends in der Ausbreitung von HIV-Varianten in Verbindung mit epidemiologischen Daten zu analysieren (molekulare Surveillance) Dadurch kann z.B. die Übertragung medikamentenresistenter Varianten und die Verbreitung von HIV-Subtypen überwacht werden.

Das Vorliegen resistenter Virusvarianten ist eine der Hauptursachen für das virologische Versagen antiretroviraler Therapien. Resistenz kann unter einer Therapie mit suboptimalen Wirkstoffspiegeln im Patienten selektiert (erworbene HIV-Resistenz) und auf andere Individuen übertragen werden. Individuen, die sich mit bereits resistenten Viren infiziert haben (Primärresistenz, „transmitted drug resistance“, TDR) können durch Weiterübertragung der resistenten Viren (z.B. in der virämischen Phase) beitragen. Ab 10% TDR sind in Deutschland (wie auch in der EU) bei Neudiagnose bzw. spätestens vor Therapiebeginn genotypische Resistenzteste empfohlen, um den Therapieerfolg zu optimieren (11-13). Im Rahmen der Serokonverterstudie wurden in Deutschland zwischen 1996-2012 12,1% TDR beobachtet (14).

Wenn eine repräsentative Anzahl aller HIV Neudiagnosen für molekulare Analysen zur Verfügung stehen, können in phylogenetischen Untersuchungen Transmissionsnetzwerke und Transmissionscluster identifiziert werden. Das Auftreten phylogenetisch eng verwandter Viren (Transmissionscluster) in Verbindung mit soziodemographischen Daten lässt Rückschlüsse auf lokale Epidemien in bestimmten Gruppen zu. Unter Berücksichtigung der soziodemografischen Daten können daraus gezielte Präventionsmaßnahmen abgeleitet oder aktuell angepasst werden.

Ebenso ist die Kenntnis des Subtyps der HIV-Infektion wesentlich für Krankheitsverlauf, Therapieansprechen, Sicherheit der Diagnostik und Impfstoffentwicklung. Durch molekulare Surveillance können Trends in der Ausbreitungsdynamik von Subtypen in Risikopopulationen aufgedeckt werden. In Verbindung mit soziodemografischen Daten kann man wiederum aufklären, welche Varianten sich endemisch in welchen Risikopopulationen ausbreiten oder aus dem Ausland importiert werden.

In einer Pilotstudie zur „Inzidenz der HIV-Infektionen in Deutschland: Identifikation frischer HIV-Infektionen anhand von Aviditätsänderungen der HIV-Antikörper im Verlauf der Infektion“ von 2005 bis 2007 wurde die Untersuchung von filter-getrocknetem Plasma bzw. Serumproben (DPS/DSS) sowie die Verwendung des kommerziell erhältlichen BED-IgG capture ELISA (BED-CEIA) für Deutschland evaluiert (15). Demnach lassen sich Proben mit diesem Test mit einer Sensitivität von 80% und Spezifität von 86% in rezente (< 5 Monate Dauer der Infektion) oder chronische Infektionen (> 5 Monate) differenzieren (16). Anschließend erfolgte mit der bundesweiten HIV-Inzidenzstudie (Studie zur Bestimmung der Inzidenz von HIV-Infektionen in Deutschland) von März 2008 - Juni 2010 erstmals eine Bestimmung kürzlich erworbener HIV-Infektionen in Deutschland. Von bundesweit mehr als 200 Laboren, die HIV-Diagnostik durchführen und HIV-Meldungen an das RKI übermitteln, nahmen insgesamt 67 Labore teil. Die Erfahrungen und Erkenntnisse aus den

vorherigen Studien flossen in diese Studie mit ein, um diese effizient und unter Kosten-Nutzen-Aspekten optimal gestalten zu können.

2.1. Ziele des Projekts

Das Forschungsvorhaben verfolgte die folgenden Ziele:

1. Kontinuierliche Erfassung des Anteils rezenter (in den letzten 5 Monaten erworbener) HIV-Infektionen an der Gesamtzahl der HIV-Meldungen in Deutschland
2. Verbesserung der HIV-Inzidenzschätzungen und Berechnung von Inzidenzraten
3. Identifizierung von aktuellen Risikopopulationen und regionale Unterschiede zur Anpassung von Präventionsbotschaften und ggf. zur Evaluierung von Präventionsmaßnahmen
4. Erkennung von zeitlichen Trends in den verschiedenen Transmissionsgruppen
5. Vorbereitung einer dauerhaften Inzidenzbestimmung von allen gemeldeten HIV-Neudiagnosen als Teil der Routine-Surveillance
6. Pilotierung der Machbarkeit des Moduls „Primärresistenzanalyse und HIV-Subtypisierung von inzidenten HIV-Erstdiagnosen aus Filterproben“
7. Bestimmung von Primärresistenzen und HIV-Subtyp bei frisch erworbenen Neuinfektionen gruppenspezifisch ohne Selektionsverzerrung (Pilotierung)
8. Bestimmung der Prävalenz von Primärresistenzen und HIV-1 Subtypen sowie Aufdeckung aktueller Trends in der Ausbreitungsdynamik in Risikopopulationen (ohne Selektionsverzerrung)
9. Teilnahme an EU-weiten Studien zur HIV-Inzidenz, Einbringung der erworbenen Kompetenzen in multizentrische, multinationale Studien, Vergleich und Harmonisierung nationaler Daten mit europaweiten Daten zur HIV-Inzidenz

2.2. Projektstruktur

Die Studie wurde vom 01.01.2011 bis zum 31.12.2013 durchgeführt. Es gab eine kostenneutrale Verlängerung von einem halben Jahr, so dass die Studie am 30.06.2014 beendet wurde.

Das Projekt wurde von zwei verschiedenen Fachgebieten im Robert Koch-Institut gemeinsam (Fachgebiet 18 und 34) durchgeführt. Innerhalb der Fachgebiete waren jeweils eine wissenschaftliche Mitarbeiterin (100%) sowie eine Verwaltungsangestellte (50%) bzw. eine MTA (100%) für dieses Projekt tätig. Die beiden

wissenschaftlichen Mitarbeiterinnen waren auch die Projektkoordinatorinnen. Projektleiter waren die jeweiligen Fachgebietsleiter.

3. Methoden

3.1. Durchführung der Studie

Um eine aussagefähige Stichprobe der jährlich in Deutschland gemeldeten HIV-Erstdiagnosen zu erhalten, sollten von mind. 50% aller HIV-Meldungen Filterproben ans RKI durch die teilnehmenden Labore geschickt werden. Daher wurden Labore für die Studie aus dem in der HIV-Inzidenzstudie aufgebauten Labor-Sentinel rekrutiert und weitere Labore wurde aus den Laboren, die HIV-Meldungen ans RKI übermittelten nachrekrutiert. Labore, die innerhalb eines Jahres keine Proben eingeschendet hatten, wurden kontaktiert und zur Teilnahme motiviert. Bei dieser Gelegenheit wurden potentielle Fragen zum Studienverlauf geklärt und die logistischen Anforderungen erörtert. Ebenso wurden Labore mit Schwierigkeiten bzw. Unregelmäßigkeiten im Probenversand angerufen bzw. angeschrieben, um eventuelle Fragen zu klären und Unklarheiten zu beseitigen. Weiterhin wurde regelmäßig an alle teilnehmenden Labore Studienmaterialien und Newsletter mit Informationen aus der Studie verschickt.

Die teilnehmenden Labore erhielten für ihre Teilnahme an der Studie eine pauschale Aufwandsentschädigung. Dafür wurden vorbereitete Formulare an alle teilnehmenden Labore geschickt. Die Aufwandsentschädigungen sind gestaffelte Pauschalbeträge, deren Höhe sich nach der erwarteten Zahl der Einsendungen eines jeden Labors richtet. Die Eingruppierung der Labore in acht Kategorien erfolgte aufgrund der Zahl von HIV-Meldungen in den vorherigen Jahren. Im Studienverlauf fanden 2 Prozessevaluationen statt. Um abzuschätzen, wie die Studie in den Arbeitsalltag integrierbar war und um die Zufriedenheit der Labore mit der Teilnahme an der Studie zu evaluieren, wurde ein kurzer Fragebogen entwickelt. Dieser wurde im September 2011 an alle teilnehmenden Labore versandt. Eine ähnliche Befragung fand im Januar 2014 statt.

Teilnehmende Labore wurden gebeten, die Proben innerhalb einer Woche nach Blutentnahme auf das Filterpapier zu tropfen und an das RKI zu senden, damit sie im RKI umgehend bei -20°C gelagert werden konnten. Grund hierfür war, dass die virale RNA zur HIV Genotypisierung (Zusatzmodul zur Primärresistenzanalyse und HIV-Subtypisierung) mit zunehmender Lagerdauer degradiert. Für den Inzidenztest, in dem HIV-Antikörper nachgewiesen wurden, war dagegen eine Lagerung von maximal vier bis sechs Wochen bei Raumtemperatur ohne Qualitätsverlust möglich.

Von den in der HIV-Routinediagnostik bestätigten positiven Patientenproben wurde von den teilnehmenden Laboren verbleibendes Restmaterial auf die zur Verfügung gestellten Filterpapiere (Whatman # 903) getropft, getrocknet, mit der Nummer des entsprechenden HIV-Meldebogens versehen und umgehend mit dem HIV-Meldebogen an das RKI (FG34) geschickt. Im FG34 wurden die Filterpapiere dokumentarisch erfasst und an das HIV-Studienlabor des RKIs (FG18) übermittelt. Dieses Verfahren wurde bereits erfolgreich in der HIV-Inzidenzstudie (2008-2010) etabliert und durch ein vom RKI erstelltes Durchführungsmanual gefestigt.

Im HIV-Studienlabor von FG18 wurden die eingegangenen Filterpapiere mit einer eindeutigen Probennummer gekennzeichnet, die HIV-Antikörper wurden eluiert, serologisch getestet und anhand des Messwertes in Neuinfektion („inzident/rezent“) oder länger bestehende Infektion („prävalent/chronisch“) klassifiziert. In der HIV-Inzidenzstudie hat sich der BED-ELISA bewährt, da er kommerziell erhältlich, relativ preisgünstig und international anerkannt ist (16, 17). Der BED-ELISA lässt sich aus filter-getrockneten Blut-, Plasma- oder Serumproben durchführen. Er wird in Doppelbestimmung durchgeführt und sowohl die beiden Messwerte und deren Mittelwert (normalisierte optische Dichte; (ODn), als auch die resultierende Klassifikation in „Neuinfektion“ oder „länger bestehende Infektion“ wurden in der Labordatenbank von FG18 zur Probennummer gespeichert.

Anschließend wurden die serologischen Testergebnisse durch die Verknüpfung mit den über die HIV-Meldung erfassten Daten nach Transmissionsgruppen, Geschlecht, Altersgruppen und Regionen analysiert. Eine genaue Darstellung der Datenerfassung, -verknüpfung, sowie der Datenspeicherung findet sich in Kapitel 0 zu Datenerhebung.

Die Erhebung von „Nennerdaten“ zur Ermittlung der Anzahl durchgeführter HIV-Tests bei teilnehmenden Laboren im Rahmen dieser Studie sollte durchgeführt werden, wurde jedoch nicht realisiert, da im selben Zeitraum die RKI-Nennerstudie durchgeführt wurde. Die Ergebnisse der Erhebung sind im Epidemiologischen Bulletin nachzulesen (18).

Im Rahmen dieser Studie wurde ein Zusatzmodul zur Ermittlung von übertragenen HIV-Resistenzen (Primärresistenzen) und –Subtypen von inzident getesteten Filterproben bei HIV-Erstdiagnosen durchgeführt. Ziel dieses Zusatzmoduls war es, die notwendigen Schritte für eine HIV-Genotypisierung (Erstellung einer HIV-Sequenz) aus Filterproben zu etablieren. Die Schritte umfassten die Isolation der viralen RNA aus den Filterproben, eine quantitative Messung der viralen RNA (Viruslastmessung), und die Amplifikation des zu untersuchenden Genomabschnitts von HIV-1 (Region der Protease und Teile der Reverse Transkriptase) mit anschließender Sequenzierung und Sequenzauswertung. So sollten Resistenzmutationen identifiziert und anschließend die zu erwartende Resistenz gegen bestimmte Medikamentenklassen (Protease-, nukleosidische und nicht-nukleosidische Reverse Transkriptase-

Inhibitoren) mittels Mutationsliste der Stanford Database <http://hivdb.stanford.edu> bzw. der Mutationliste für die Surveillance von TDR (19) vorhergesagt werden. Daher wurde im Studienjahr 2011 mit einem kleinen Probenpanel die maximale Lagerbarkeit von Filterproben bei verschiedenen Temperaturen für Viruslast- und Resistenzbestimmungen untersucht. Anschließend wurde die Viruslast-Bestimmung und HIV-Genotypisierung bei einer Auswahl inzident bestimmter Filterproben von HIV-Diagnosen durchgeführt. Um nur Proben auszuwählen, die mit hoher Wahrscheinlichkeit von kürzlich erworbenen HIV-Infektionen stammten, wurde als Auswahlkriterium der Filterproben ein BED Cut off von ODn <0,65 statt 0,8 gewählt: es erhöhte sich so die Spezifität und der positive prädiktiver Wert des BED-CEIAs für inzidente Proben auf 97,6% und 93,6%, zu Lasten der Sensitivität, die auf 45% abfällt. Dadurch wurden zwar insgesamt weniger Proben als inzident klassifiziert, die dafür aber gesicherter inzident sind.

Für die HIV-Genotypisierung in 2012 wurden folgende Kriterien festgelegt:

- 1) inzident getestete Filterproben mit einer ODn <0,65
- 2) Proben aus verschiedenen Laboren stammend (regionale Verteilung)
- 3) nur trockene Filterproben
- 4) mindestens 2 Filterspots mit einem Tropfvolumen von 100µl

Die Viruslast sollte jährlich von etwa 300 inzidenten Filterproben quantifiziert werden, die Genotypisierung sollte bei ca. 200 Proben/Jahr erfolgen. Anschließend wurden diese inzident getesteten Proben hinsichtlich der Prävalenz von übertragenen Resistenzen und HIV-Subtypen analysiert.

Innerhalb der Studie sollte auch ein Vergleich mit anderen europäischen Inzidenzprojekten durchgeführt und die Überprüfung einer methodischen Anpassung an einen europäischen Standard erörtert werden. In Abhängigkeit der Vorgabe des ECDC für die nationale Erfassung der Inzidenz von HIV-Infektionen (ECDC Tender: „Developing a protocol for HIV incidence studies for Europe“) sollte zusätzlich zu dem BED-ELISA ein weiterer Test eingesetzt werden, um eine vergleichende Auswertung innerhalb verschiedener europäischer Inzidenzstudien zu ermöglichen.

Im Rahmen der Studie sollten in regelmäßigen Abständen Arbeitstreffen mit den teilnehmenden Laboren durchgeführt werden, die Ergebnisse auf Kongressen und Fachtagungen präsentiert und publiziert werden

Als letzter Punkt in dieser Studie sollte das Monitorings von inzidenten HIV-Erstdiagnosen in die nationale Surveillance übergeführt werden. So sollte in 2013 eine Überführung in die Routinesurveillance vorbereitet werden, die bei der nächsten Novellierung des Infektionsschutzgesetzes umgesetzt werden könnte. Geplant ist dabei die Kopplung der Inzidenzbestimmung aller HIV-Erstdiagnosen an die HIV-Meldung.

3.2. Datenerhebung

Auf den im FG34 eingehenden Filterproben wurden folgende Informationen angegeben: HIV-Meldebogennummer, RKI-Code, Labornummer, Datum der Blutentnahme, Datum des Tropfens. Nach Eingang der Filterprobe am FG34 wurden die Angaben mit den Angaben auf dem HIV-Meldebogen verglichen und in eine zugangsgeschützte Excel-Datei eingetragen. Die Filterprobe wurde ohne Meldebogen weiter ans HIV-Studienlabor des FG18 geschickt. Dort wurde die Filterprobe mit einer eindeutigen Probennummer versehen und getestet. Die eindeutige Probennummer wurde in die Excel-Tabelle eingetragen. Die Ergebnisse der serologischen Untersuchungen wurden in einer Access-Datenbank im HIV-Labor von FG18 anhand der Probennummer gespeichert. Wegen seiner geringen Spezifität ist der in der Studie verwendete Test nicht zur Individualdiagnostik, sondern nur für populationsbezogene Analysen zugelassen.

Soziodemographische und labortechnische Daten wie Angaben zu Geschlecht, Alter, Wohnregion und Herkunftsregion, zum Transmissionsweg, zu Viruslast und CD4-Zellzahl sowie zu etwaigen Vortests wurden über die pseudonymisierte HIV-Meldung nach IfSG im FG34 des RKI in einer eigenen Access-Datenbank (sog. „HIV-Reg-Datenbank“) gespeichert. Diese Daten wurden regelmäßig geprüft, Doppel- und Mehrfachmeldungen wurden identifiziert und von den weiteren Analysen ausgeschlossen.

Für dieses Projekt wurden die aus der HIV-Meldung erhobenen Daten mit Ausnahme des Pseudonyms über das Feld „Meldebogennummer“ mit Hilfe eines Computer-Algorithmus mit den BED-ELISA-Testergebnissen verknüpft. Die Zusammenführung der Daten fand nicht fortlaufend statt, sondern jeweils nach Bedarf, bzw. am ersten Werktag des Monats für die eingegangenen Daten des vorhergehenden Monats. Die im Ergebnis vorliegenden Daten enthielten weder die Meldebogennummer noch den RKI-Code. Somit wurden keine personenbezogenen Daten zur wissenschaftlichen Analyse verwendet.

Alle datenschutzrechtlichen Fragen wurden im Vorfeld mit dem Bundesbeauftragten für den Datenschutz abgestimmt. Die folgende Abbildung 1 veranschaulicht den Dateneingang und Datenfluss zwischen den Fachgebieten.

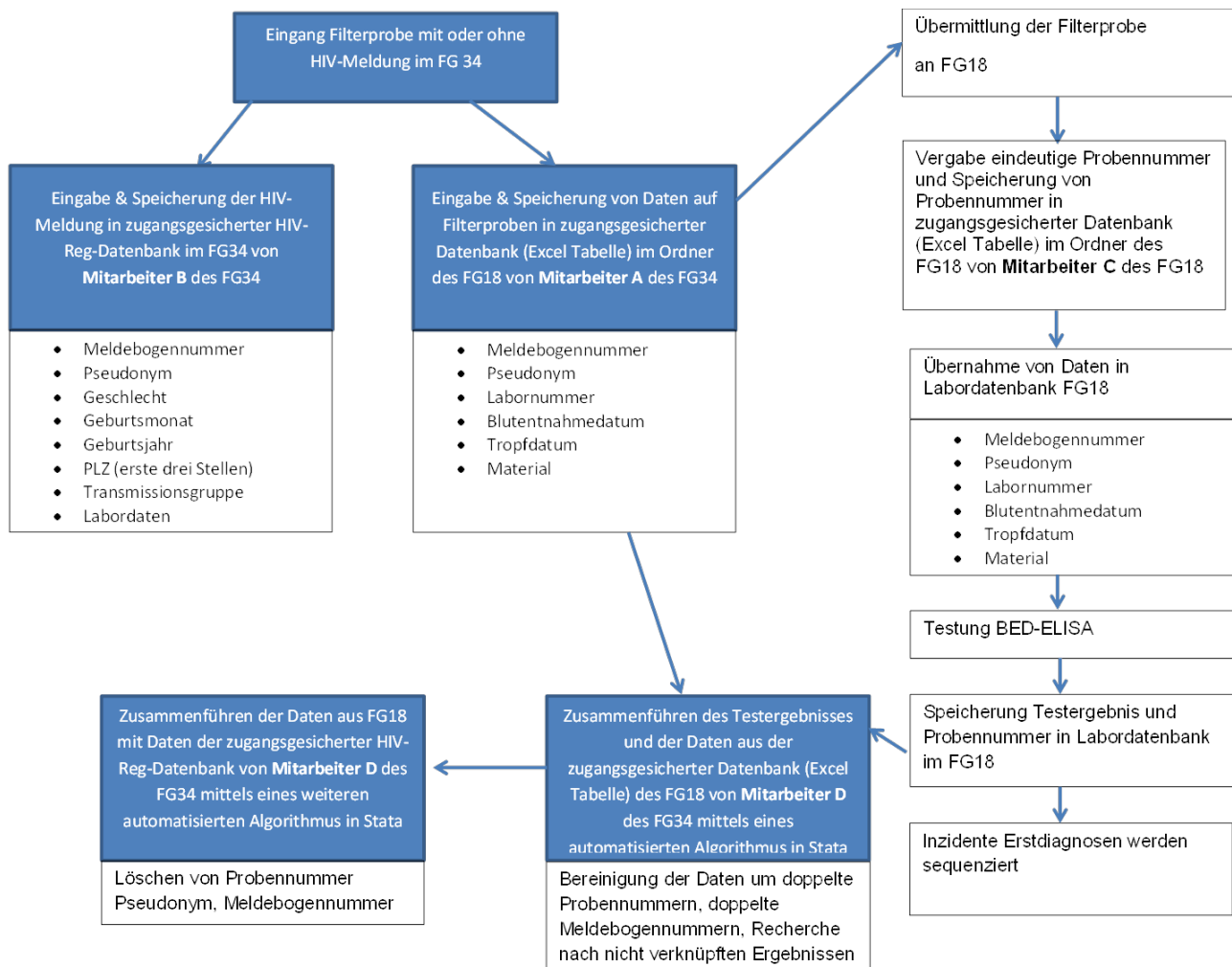


Abbildung 1: Dateneingang, Datenerfassung und Datenfluss in der Studie InzSurv-HIV 2011-2014

3.3. Datenschutz / Datensicherheit

Die Räumlichkeiten, die genutzten Computer und die MS-Access-Anwendungen (MySQL-Server) sind entsprechend der datenschutzrechtlichen Bestimmungen zugangsgesichert und nur autorisierten Personen zugänglich. Die Datenbanken von FG18 sind Mitarbeitern von anderen Fachgebieten, einschließlich FG34, nicht zugänglich. Die Tabelle mit der Dokumentation des Eingangs der Filterprobe liegt auf einem geschützten Bereich, auf den nur autorisierte Personen (Mitarbeiter der Studie und deren Stellvertreter) Zugang haben. Die HIV-Reg-Datenbank ist ebenfalls entsprechend der datenschutzrechtlichen Bestimmungen zugangsgesichert und nur autorisierten Personen im FG34 zugänglich.

3.4. Datenauswertung

Die Verknüpfung der verschiedenen Daten (Dokumentation des Eingangs, Labortestergebnis, Daten aus der HIV-Reg-Datenbank) wurde automatisch durchgeführt und bei jedem einzelnen Schritt wurden Plausibilitätskontrollen durchgeführt. Der vollständige Datensatz wurde mithilfe von Excel, SPSS bzw. Stata statistisch ausgewertet. Es wurden Anzahl sowie Anteile der inzidenten/rezenten Infektionen insgesamt und je Art von Meldung (Erstdiagnose, Mehrfachmeldung usw.) ermittelt. Es wurde deskriptiv verglichen, ob die prozentualen Anteile verschiedener Merkmale (z.B. Alter, Geschlecht, Transmissionsgruppe) in etwa denen aller HIV-Meldungen entsprechen. Die ermittelten inzidenten/rezenten Infektionen entsprechen dem im FG18 ermittelten Laborergebnissen. Unterschiede zwischen inzidenten und prävalenten Infektionen wurden mittels des Chi²-Test ($p < 0,05$) überprüft. Stratifizierte Analysen z.B. nach Alter, Geschlecht oder Transmissionsgruppe wurden mithilfe des Chi²-Test ($p < 0,05$) überprüft. Zeitliche Trends wurden mithilfe des Chi²-Test linearer Trend ($p_{\text{Trend}} < 0,05$) überprüft.

4. Ergebnisse

Die hier präsentierten Daten basieren auf der Erfassung von Proben aus der Projektlaufzeit (2011-2013). Zusätzlich wurden – im speziellen zur Darstellung von Trends - auch Daten aus dem Zeitraum der kostenneutralen Verlängerung von Januar bis Juni 2014 hinzugenommen. Es handelt sich hierbei jedoch um einen überlappenden Zeitraum mit dem BMG finanzierten MASTER HIV/HEP Projekt. Die Hinzunahme dieser Daten war daher nicht obligatorisch und lässt eine Präsentation der Daten im MASTER HIV/HEP Projekt ebenfalls zu.

4.1. Prozessergebnisse

Von den 67 Laboren die in der Inzidenzstudie (2008-2010) am Laborarm teilgenommen haben, konnten 56 (83,6%) reaktiviert werden. 25 Labore konnten für die InzSurv-HIV Studie neu hinzugewonnen werden, so dass 81 Labore an der Studie teilgenommen haben. Im Laufe der Zeit haben vier (4,9%) dieser Labore ihre Zusage zur Teilnahme an der Studie zurückgezogen. Um die teilnehmenden Labore über aktuelle Themen bezüglich der Studie zu informieren, wurden Projekt-Newsletter per E-Mail verschickt.

In der ersten Prozessevaluation erhielten wir bis Mitte Oktober 2011 32 Antworten; das waren 40% der zu diesem Zeitpunkt an der Studie teilnehmenden Labore. Von diesen hatten 91% ($n=30$) bereits Proben an das RKI geschickt. 85% der Befragten gaben an, dass die Teilnahme an der Studie gut oder sehr gut in Ihren Arbeitsalltag integrierbar sei. Von den 32 Einsendern hatten 23 schon bei der vorangegangenen HIV-Inzidenzstudie mitgemacht. Von diesen empfanden 91% den Arbeitsaufwand beim aktuellen Projekt

InzSurv-HIV als geringer. Eine langfristige Teilnahme an der Studie konnten sich 91% (n=30) aller TeilnehmerInnen vorstellen.

In der zweiten Prozessevaluation erhielten wir 49 Antworten bis Ende Mai 2014; das sind 81,7% der teilnehmenden Labore. Von diesen Laboren gaben 83% an, dass die Teilnahme an der Studie meistens gut oder sehr gut in den Arbeitsalltag integrierbar sei. Vier Labore gaben an, dass sie nicht mehr teilnehmen wollen, da sie entweder keine HIV-Diagnostik mehr durchführten (1 Labor), für sich keinen Mehrwert bei einer Teilnahme erkennen konnten (1 Labor), oder zu wenige HIV-Diagnosen stellten (2 Labore). Auf die Frage „Sollte es nur möglich sein, entweder die Aufwandsentschädigung oder ein jährliches Treffen der teilnehmenden Labore zu finanzieren, was würden Sie bevorzugen?“ gaben 25 (51%) Teilnehmer an, eine Aufwandsentschädigung einem gemeinsamen Treffen (33%, n=16 Teilnehmer) vorzuziehen. Acht (16%) Teilnehmer konnten sich weder für die eine noch die andere Alternative entscheiden.

4.2. Überführung des Monitorings in die nationale Surveillance

In 2013 wurde eine Überführung in die Routinesurveillance vorbereitet. Der Antrag auf Verstetigung der Inzidenztestung und somit die Implementierung in die Routinesurveillance wurde Anfang 2013 bewilligt. Eine routinemäßige Inzidenztestung findet seit dem 01.01.2014 statt.

Der Aufbau einer molekularen Surveillance zur Erfassung der HIV-Resistenzeigenschaften dem HIV Subtyp von rezenter HIV-Infektionen aus allen eingesendeten Filterproben ist im Nachfolgeprojekt „MASTER HIV_HEP“ vorgesehen. Das Nachfolgeprojekt wurde vom BMG bewilligt und startete am 1.10.2013 mit einer Laufzeit zum 30.09.2017. Ziel ist es, durch die Kopplung an das Meldeverfahren diese Informationen von einer repräsentativen Stichprobe zu erhalten.

4.3. Forschungsergebnisse

4.3.1. Probensammlung

Insgesamt schickten die teilnehmenden Labore für die letzten 3 ½ Jahren 11.886 Filterproben (Eingang bis 15. September 2014) an das RKI. Berücksichtigt man unter diesen alle Filterproben, deren Blutentnahmedatum vor dem 30. Juni 2014 (also mit einer Diagnose im Juni) lag, konnten für diesen Zeitraum 11.232 (94,5%) Filterproben in die Analyse eingeschlossen werden. Nicht alle eingegangenen Filterproben konnten für die epidemiologische Auswertung verwendet werden (siehe Tabelle 4). Im Schnitt wurden monatlich 267 Filterproben (Median 270) ans RKI übermittelt (Spannweite 172-346).

Tabelle 1: Ausschluss von Filterproben für den Zeitraum 1.1.2011 bis 30.6.2014 (Datenstand 15.9.2014)

	Anzahl Filterproben	% Anteil
ans RKI gesendete Filterproben	11.886	100
- Filterproben aus dem Jahr 2009/2010 bzw. Diagnose vor 2011	32	0,27
- mehrere Filterproben, die zu gleicher HIV-Meldung gehören	17	0,14
- Filterproben mit zu wenig Material für Laboruntersuchung	15	0,13
- Filterproben, die keiner HIV-Meldung / keinem Ergebnis zugeordnet werden konnten	35	0,29
- Filterproben, für die (noch) kein Ergebnis generiert werden konnte	555	4,7
Filterproben, die in Analyse einfließen	11.232	94,5

Die durchschnittliche Dauer zwischen Blutentnahme und Anfertigung des Filters lag bei ca. acht Tagen unter Einbeziehung aller Angaben (n=9.587) im Median bei 5 Tagen. Im Hinblick auf die Dauer zwischen Tropfdatum und Filtereingang betrug die Differenz zwischen Tropfdatum und Eingang im RKI im Schnitt fünf Tage. Die durchschnittliche Dauer zwischen Blutentnahme und Anfertigung des Filters stieg im Studienzeitraum von 6,9 Tagen in 2011 auf 10,2 Tagen in 2014 an. Die durchschnittliche Dauer der Übermittlung der Filterprobe an das RKI verkürzte sich im selben Zeitraum von 5,8 auf 4,1 Tage.

Von den 11.232 in dieser Analyse enthaltenen Filterproben wurden alle (100%) zweimal im Labor getestet (Doppelbestimmung). Bei einem Mittelwert der beiden ODN Werte <0,8 wurde die Probe als „inzident“ klassifiziert, bei Werten ≥0,8 als „prävalent“. Bei 109 (1%) Proben wich das erste Testergebnis zu mehr als 30% vom zweiten ab, bzw. die Einzelwerte führten zu unterschiedlichen Klassifizierungen, so dass der Test wiederholt wurde und der Mittelwert von allen ODN Werten zur Klassifizierung verwendet wurde. Von diesen 109 Filterproben wurden 65 (59,6%) als inzident und 44 (40,4%) als prävalent gewertet.

4.3.2. HIV-Meldungen mit Filterproben

Die folgenden Ergebnisse beziehen sich auf die Jahre Januar 2011 - Juni 2014 und beziehen sich auf Testergebnisse des BED-ELISA. Vom 1. Januar bis 30. Juni 2014 wurden insgesamt 19.078 HIV-Diagnosen an das RKI gemeldet (vor Ausschluss von Mehrfachmeldungen). Für 58,9% (n= 11.232) dieser Fälle wurden im Rahmen der Studie Filterproben an das RKI geschickt. Von den teilnehmenden Laboren wurden in diesem Zeitraum insgesamt 15.971 HIV-Meldungen und 11.232 (70,3%) HIV-Meldungen mit Filterproben übermittelt. Der Anteil der HIV-Meldungen mit Filterproben schwankte bei den teilnehmenden Laboren zwischen 4% (1 Labor) und 100% (4 Labore); im Median wurden 67% (Mittelwert 59%) aller HIV-Meldebögen aus diesen Laboren mit Filterproben übermittelt.

58% (11.115/19.078) der HIV-Meldungen waren Erstdiagnosen, 20% (n=3.722) waren Mehrfachmeldungen, bei knapp 16% (n=3.014) fehlten Angaben, um eine Doppelmeldung auszuschließen, und bei 6% (n=1.227) war der Status unbekannt. Der Anteil von Erstdiagnosen bei den Gesamtmeldungen, sowie bei den Meldungen mit Filterproben ist gleich verteilt (Tabelle 5).

Tabelle 2: Anteil und Anzahl der HIV-Meldungen (Januar 2011-Juni 2014) mit eingesandten Filterproben und ohne eingesandte Filterproben

HIV-Meldungen	Erstdiagnosen	Mehrfachdiagnosen	unbekannt	Fehlende Angaben, um Doppelmeldung auszuschließen	Gesamt
mit Filterproben	6.555 (58,4%)	2.068 (18,4%)	697 (6,2%)	1.912 (17,0%)	11.232 (58,9%)
ohne Filterproben	4.560 (58,1%)	1.654 (21,1%)	530 (6,8%)	1.102 (14,0%)	7.846 (41,1%)
Gesamt	11.115 (58,3%)	3.722 (19,5%)	1.227 (6,4%)	3.014 (15,8%)	19.078 (100,0%)

Vergleicht man die prozentualen Anteile aller HIV-Meldungen mit HIV-Meldungen, bei denen eine Filterprobe übermittelt wurde, ist beispielsweise zu erkennen, dass der prozentuale Anteil von Erstdiagnosen mit Filterproben dem prozentualen Anteil von Erstdiagnosen insgesamt entspricht (58,4% versus 58,3%). Bei den anderen Merkmalen in der Abbildung 2 ist der Unterschied zwischen den prozentualen Anteilen der HIV-Meldungen mit Filterproben und aller HIV-Meldungen minimal, er schwankt ja nach Merkmal zwischen 0,1% und 2%. Alle weiteren Analysen beziehen sich auf HIV-Erstmeldungen (n=11.115; 58,3% aller HIV-Meldungen).

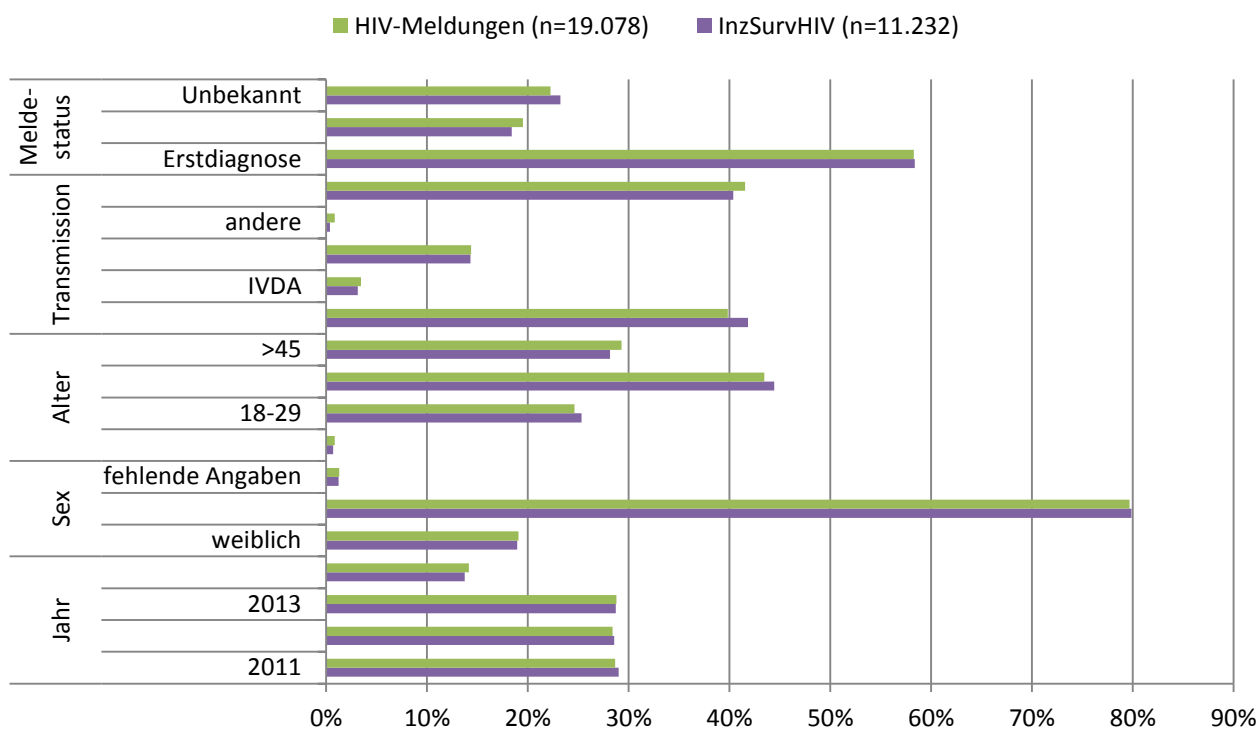


Abbildung 2: Prozentualer Vergleich zwischen HIV-Meldungen und HIV-Meldungen mit Filterproben 2011-2014

4.3.3 HIV-Erstdiagnosen mit Filterproben

Von den 11.115 gemeldeten Erstdiagnosen, wurden 6.555 (60%) mit Filterproben übermittelt. Davon wurden 2.142 (32,7%) als inzident (frische Infektion, die innerhalb der letzten 180 Tage erfolgte) identifiziert (siehe Abbildung 3).

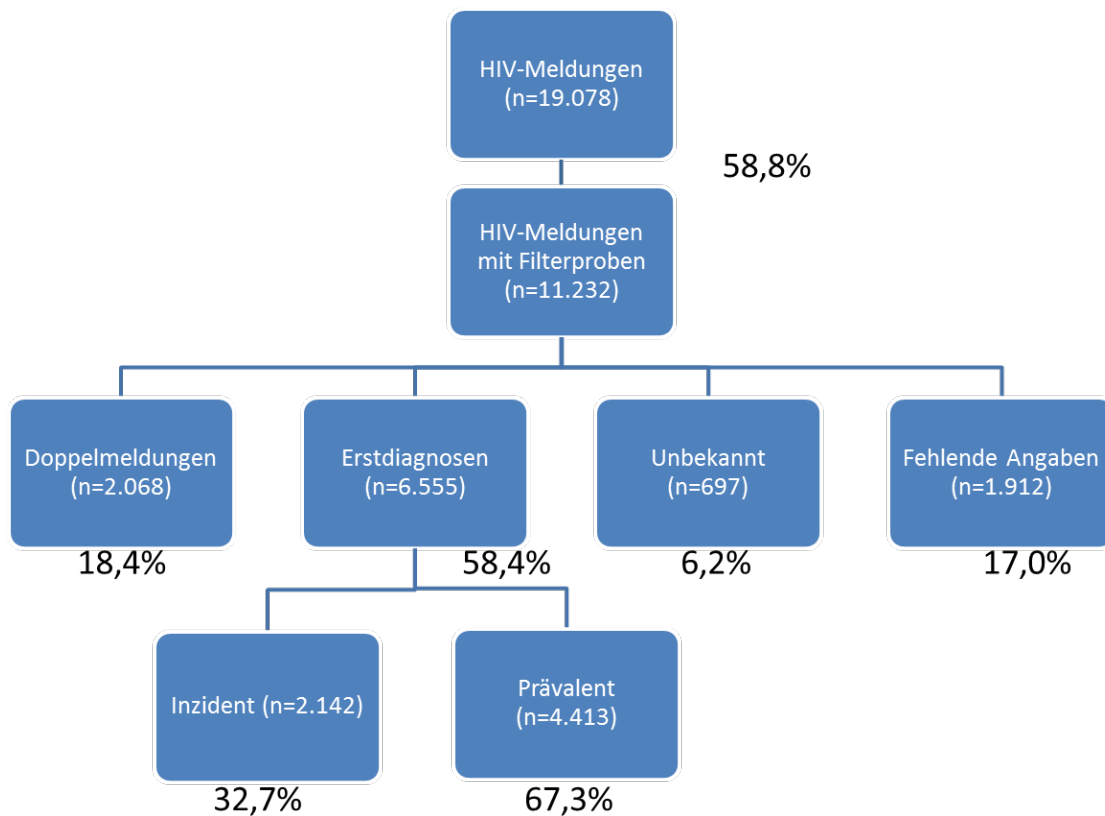


Abbildung 3: Flow-Chart der Auswahl von HIV-Meldungen mit Filterproben, 2011-2014

Die meisten HIV-Infektionen wurden bei Männern (83,3%; n=5.460) übermittelt, so wurden auch die meisten inzidenten Infektionen bei Männern gefunden (88,1%, n=1.421). Der prozentuale Anteil von inzidenten Infektionen bei Männern und Frauen ist in der Abbildung 4 zu finden.

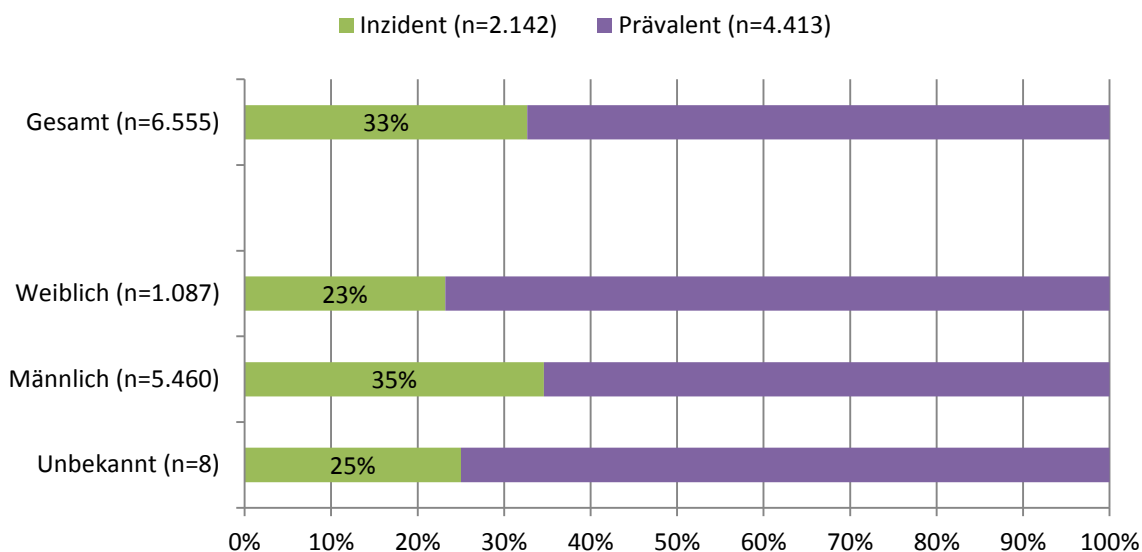


Abbildung 4: Prozentuale Verteilung der inzidenten Infektionen nach Geschlecht, 2011-2014

Die meisten inzidenten Infektionen (41%) wurden in der Altersgruppe der 30-45 Jährigen (Mittelwert 36; Median 34, IQR 18) ermittelt. Der höchste inzidente Anteil innerhalb einer Altersgruppe wurde für die Altersgruppe der 18-29 Jährigen (40%) ermittelt. Der Anteil inzidenter Infektionen innerhalb der Altersgruppen unterscheidet sich signifikant ($p < 0,001$). Eine stratifizierte Altersverteilung von Männern und Frauen ist der Abbildung 5 zu entnehmen. 58% aller inzidenten HIV-Infektionen bei Frauen als auch 53% bei den Männern sind in der Altersgruppe der 30-45 Jährigen zu finden. Unter den Frauen war der Anteil inzidenter HIV-Infektionen unter den 18-29 Jährigen am höchsten (26%); bei den Männern war er in der Gruppe der <18 Jährigen (58%) am höchsten. Dies betrifft jedoch insgesamt nur 24 Männer. Einen signifikanten Unterschied im Anteil inzidenter Infektionen innerhalb der Altersgruppen konnte bei den Männern gefunden werden ($p < 0,001$). Bei den Frauen wurde kein signifikanter Unterschied gefunden (siehe Abbildung 5).

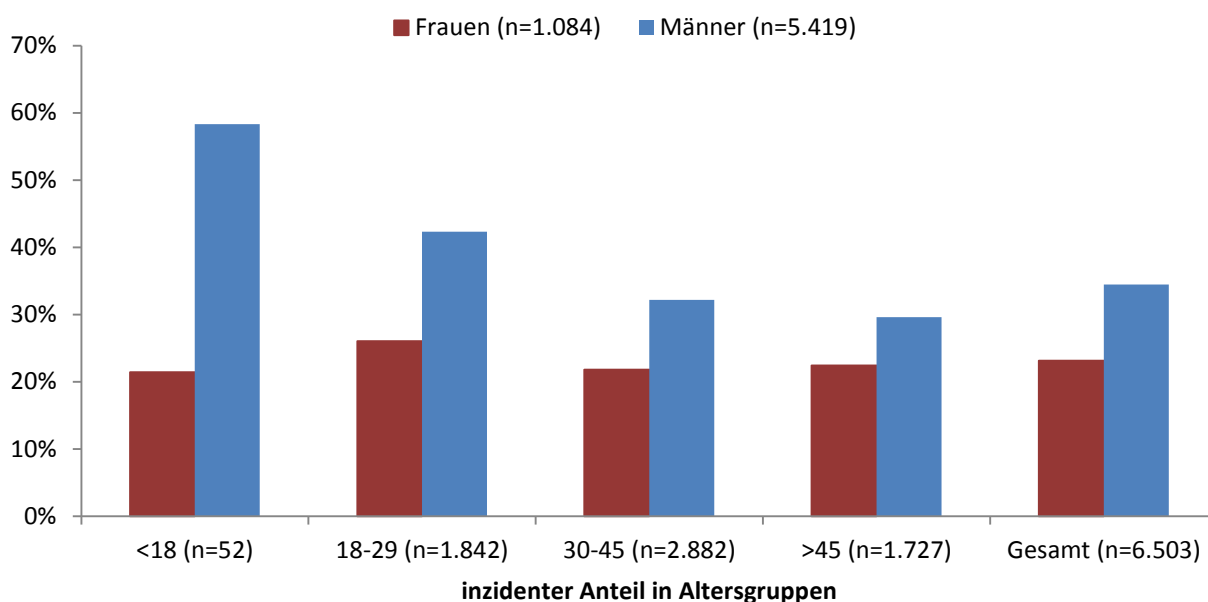


Abbildung 5: Prozentuale Verteilung des inzidenten Anteils nach Altersgruppen und Geschlecht, 2011-2014

Die meisten inzidenten HIV-Infektionen wurden bei Patienten aus Nordrhein-Westfalen ($n=547$, 25,5%), gefolgt von Berlin ($n=317$, 15%) sowie Bayern ($n=287$, 13%) gefunden. Der höchste Anteil inzidenter HIV-Infektionen innerhalb eines Bundeslandes wurde im Saarland ermittelt ($n=40$, 48%, siehe Abbildung 6).

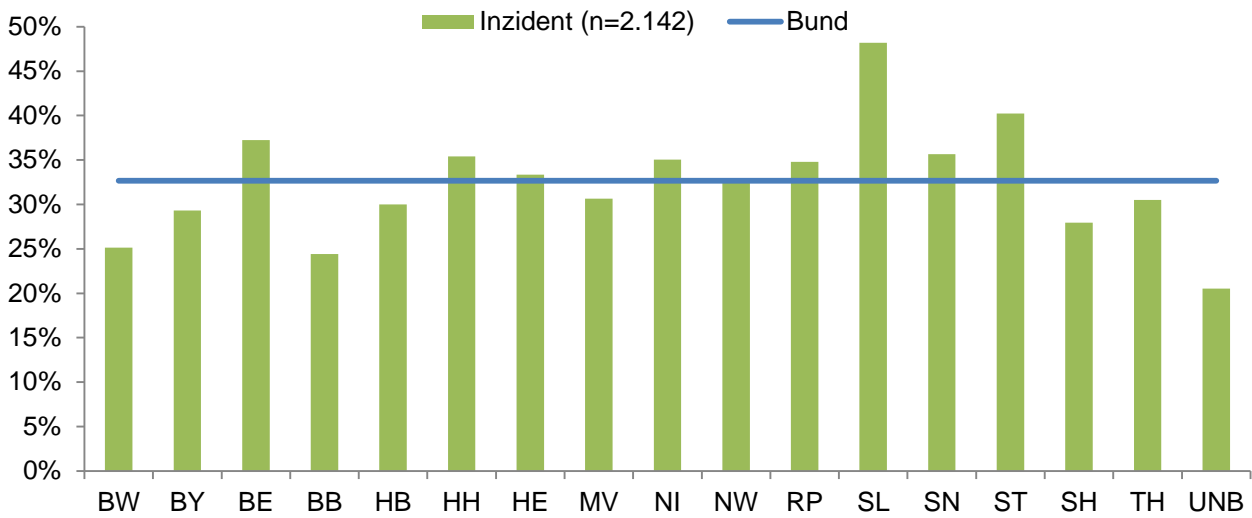


Abbildung 6: Prozentuale Verteilung der inzidenten Anteile nach Wohnort (Bundesland) des Patienten, 2011-2014

68% aller Personen mit inzidenten HIV-Infektionen stammen aus Deutschland, gefolgt von der Region Subsahara-Afrika (5,4%, n=115) bzw. Zentral- und Osteuropa (n=180, 8,4%). Bei 36% aller Personen deutscher Herkunft mit einer HIV-Erstdiagnose konnte eine inzidente Infektion nachgewiesen werden (Siehe Abbildung 7).

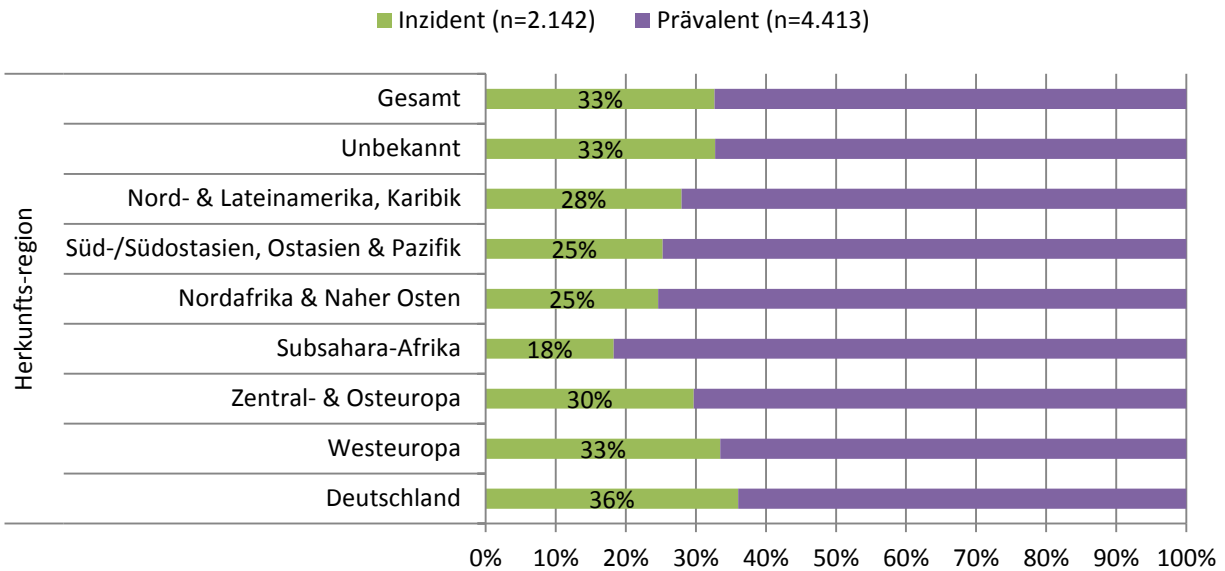


Abbildung 7: Prozentuale Verteilung inzidenter HIV-Infektionen nach Herkunftsregion, 2011-2014

Etwa 75% (n=1.601) der inzidenten HIV-Infektionen wurden wahrscheinlich in Deutschland übertragen, gefolgt von inzidenten Infektionen, die in der Region Subsahara-Afrika (4,5%, n=96) und Westeuropa (n=79,

2,3%) übertragen wurden. Der Anteil der inzidenten Infektionen innerhalb der Regionen, ist am höchsten in Deutschland mit 36%, gefolgt von Westeuropa mit 35% (siehe Abbildung 8).

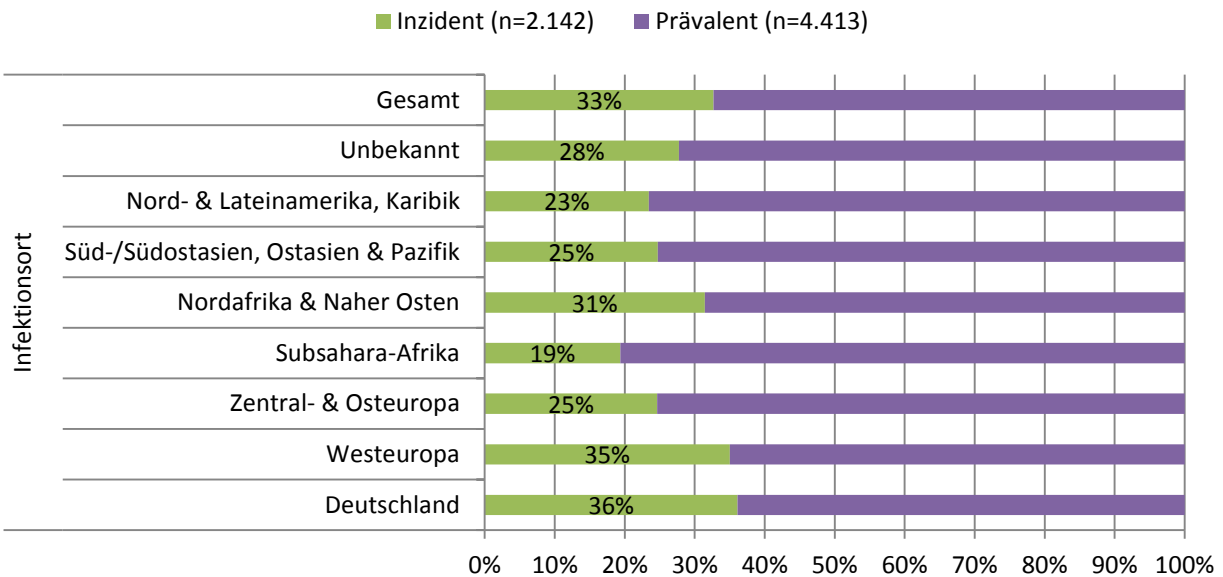


Abbildung 8: Prozentuale Verteilung inzidenten HIV-Infektionen nach vermutetem Infektionsort, 2011-2014

Vergleicht man Personen aus Deutschland mit Personen, die nicht aus Deutschland stammen, fällt auf, dass sowohl bei Deutschen als auch bei Personen mit Migrationshintergrund häufiger der Infektionsort Deutschland berichtet wurde (94% und 53%). Bei den Migranten ist ein signifikanter Unterschied ($p < 0,001$) zwischen dem Anteil der inzidenten Infektionen nach Infektionsort festzustellen (siehe Abbildung 9).

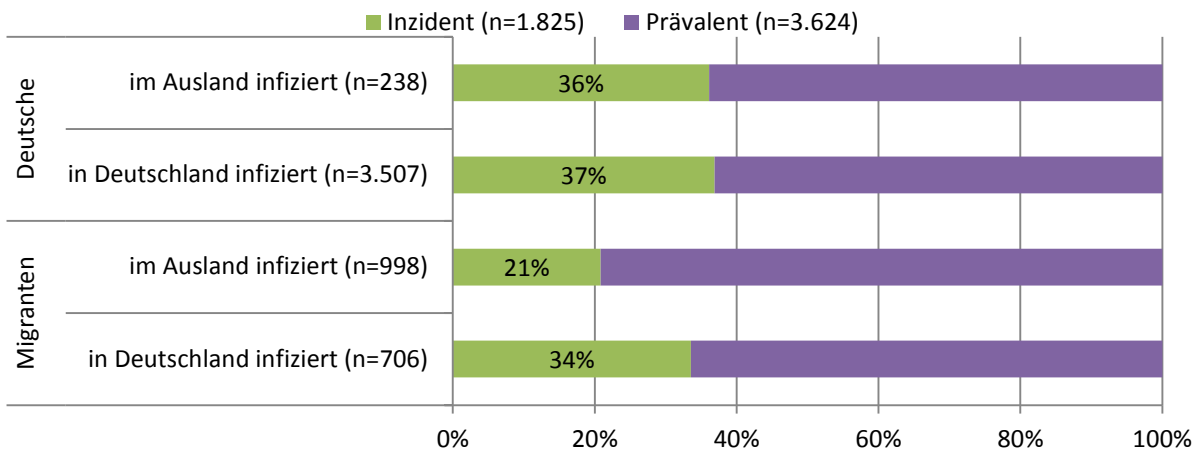


Abbildung 9: Anteil inzidenter Infektionen nach Herkunft und Infektionsort, 2011-2014

Bei den Männern wurde der höchste Anteil (38%) inzidenter HIV-Infektionen innerhalb der Transmissionsgruppe der MSM (Männer die Sex mit Männern hatten) gefunden. Bei den Frauen lag der höchste inzidente Anteil (45%) innerhalb der Gruppe der intravenösen Drogenabhängigen (IVDA) (siehe Tabelle 6).

Tabelle 3: Inzidente HIV-Infektionen verteilt nach Transmissionsgruppe und Geschlecht, 2011-2014

	Männer (n=4.304)		Frauen (n=840)		Gesamt	
	Inzident (%)	Prävalent (%)	Inzident (%)	Prävalent (%)	Inzident (%)	Prävalent (%)
MSM ¹	1.420 (37,6)	2.357 (62,4)	-	-	1.420 (37,6)	2.357 (62,4)
IVDA ²	42 (30,0)	98 (70,0)	17 (44,7)	21 (55,3)	59 (33,1)	119 (66,8)
Heterosexuelle Kontakte	90 (23,3)	297 (76,7)	176 (21,9)	626 (78,1)	266 (22,4)	923 (77,6)
Gesamt³	1.552 (36,1)	2.752 (63,9)	193 (23,0)	647(77,0)	1.745 (33,9)	3.399 (66,1)

1: Männer die Sex mit Männern hatten; 2: Intravenöse Drogenabhängige; 3: Fehlende Angaben zu Transmissionsgruppe und/oder Geschlecht wurden ausgeschlossen (n=1.411)

Betrachtet man die Altersverteilung getrennt nach Transmissionsgruppen, ist zu sehen, dass die höchsten Anteile inzidenter HIV-Infektionen in den jüngeren Altersgruppen zu finden sind, unabhängig von der Transmissionsgruppe. Betrachtet man lediglich die über 18-Jährigen, ist zu sehen, dass junge MSM (18-29 Jahre alt), den höchsten inzidenten Anteil von HIV-Infektionen hatten (44%,535/1.207), gefolgt von über 45 Jährigen Intravenösen Drogenabhängigen (42%, 14/33) (Abbildung 10).

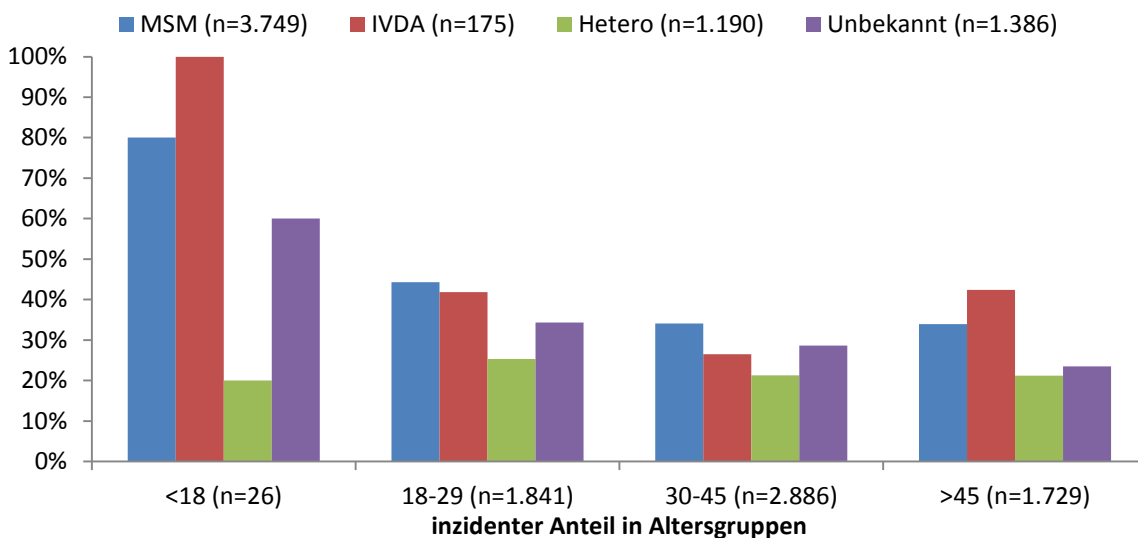


Abbildung 10: Prozentuale Verteilung des inzidenten Anteils nach Altersgruppen und Transmissionsgruppe, 2011-2014

Über die letzten 3 ½ Jahre konnte ein leichter Anstieg des Anteils inzidenter Infektionen innerhalb eines Quartals von insgesamt 3% (von 28% im 1. Quartal 2013 auf 31% im 2. Quartal 2014) beobachtet werden. Dieser Anstieg war insbesondere unter Männern, MSM und Personen mit deutscher Herkunft zu beobachten. In den anderen Gruppen (Frauen, Migranten, Personen mit heterosexuellem Transmissionsweg) schwankte der Anteil der inzidenten Infektionen innerhalb der einzelnen Quartale sehr stark und war teilweise rückläufig (siehe Abbildung 11).

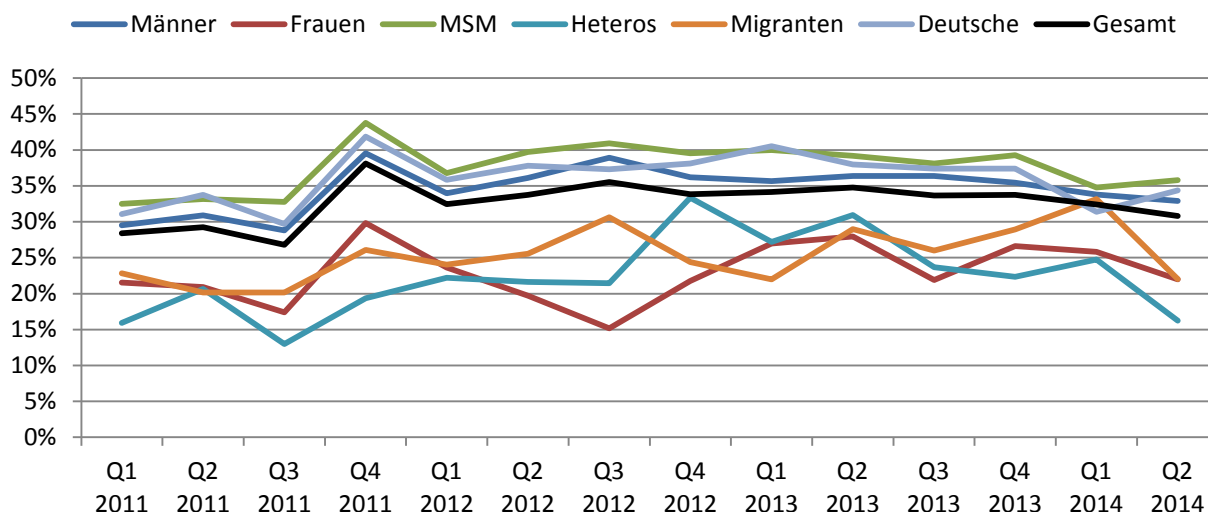


Abbildung 11: Anteil inzidenter Infektionen in verschiedenen Gruppen im zeitlichen Verlauf, 2011-2014

4.3.4. Zusatzmodul: Primärresistenztestung und Subtypisierung von inzidenten HIV-Erstdiagnosen

Die Durchführbarkeit der Resistenzanalyse und Subtypisierung aus filtergetrockneten Plasmaproben von frisch erworbenen HIV-Infektionen wurde ab Januar 2012 als zusätzlicher Baustein getestet und etabliert.

Zunächst wurde - um die Wiedergewinnung der viralen RNA aus den Filterpapier-Eluaten zu optimieren - neben der herkömmlich verwendeten RNA-Extraktionsmethode (QIAGEN Viral-RNA Mini-Kit) eine weitere RNA-Extraktionsmethode getestet (bioMérieux NucliSENS® miniMAG™) und anschließend die Nachweisgrenzen für DPS/DSS ermittelt. Das Verfahren von bioMérieux erbrachte eine 9-fach bessere Wiedergewinnungsrate (90%), so dass das Extraktionsverfahren im Laufe des zweiten Studienjahrs 2012 umgestellt wurde. Die RNA-Nachweisgrenze für den „inhouse“ Viruslastassay aus DPS („Taq-Man Real-Time LTR-RT-PCR“ 105 Bp Produkt in HIV-1 LTR-Region) lag bei diesem Verfahren bei 650 Kopien/ml und für die genotypische Resistenzbestimmung (inhouse *pol*-RT-PCR; Sequenzbereiche der Protease und Reversen

Transkriptase: Position 2001-3454 auf HXB2-Genom, 1454 Bp Fragment) bei 6500 Kopien/ml des Referenzvirus HTLV3B (20).

Im zweiten Studienjahr wurden die Lagerversuche abgeschlossen, aus denen Informationen zur Stabilität der viralen RNA in DPS bei unterschiedlichen Lagertemperaturen und Lagerdauern gewonnen werden konnten. Die maximale Lagerbarkeit von Filterproben bei verschiedenen Temperaturen für Viruslast- und Resistenzbestimmungen wurde in zwei Lagerversuchen ermittelt: aus Filterproben mit dem (A) QIAGEN RNA-Extraktionsverfahren in 2012 und nach der Umstellung des Extraktionsverfahrens in 2013 mit der (B) bioMerieux RNA-Extraktion (20, 21). In 2012 konnte die Viruslast des Referenzvirus (mit $6,5 \times 10^6$ Kopien/ml) zuverlässig über 6 Monate aus den DPS/DSS nachgewiesen werden, wenn die Proben sofort nach Trocknung bei -20°C gelagert wurden. Für die genotypische Resistenzbestimmung dagegen war die Filterlagerung nur über drei Monate bei -20°C und für höchstens eine Woche bei Raumtemperatur (RT) möglich, eine umgehende Lagerung bei -20°C war erforderlich. Für die Viruslastbestimmung könnten die Filterproben im Gegensatz zur Resistenzbestimmung ohne nennenswerte Sensitivitätsverluste auch bis zu drei Monate bei Raumtemperatur gelagert werden (20). In 2013 wurden die Filter mit dem HIV-Referenzstamm in drei Ausgangs-Konzentrationen ($6,5 \times 10^4$ Kop/ml, $6,5 \times 10^3$ Kop/ml, $6,5 \times 10^2$ Kop/ml) und dem ertragreicheren NucliSens Extraktionskit (bioMerieux) wiederholt. Mit dieser Methode ließ sich die virale RNA in der Viruslastbestimmung bei jeder Lagertemperatur (RT, 4°C , -20°C , -70°C) für nun 6 statt 3 Monaten quantitativ nachweisen. Für die *pol*-RT-PCR (genotypische Resistenzbestimmung) war eine Filterlagerung bei RT für geringe Ausgangs-Viruslasten ($6,5 \times 10^3$ Kop/ml; Nachweisgrenze der *pol*-RT-PCR aus DPS) nur über zwei Wochen möglich. Bei einer Lagerung der DPS/DSS bei 4°C zeigten sich ab Woche vier PCR-Ausfälle. Bei einer Lagerung bei -20°C und -70°C blieb die RNA bis zu 6 Monaten stabil (21).

Insgesamt kam es in 2012 mit dem ViroSeq HIV-1 Genotyping System zu vielen PCR-Versagern (kein spezifisches PCR-Produkt). Statistische Analysen zeigten, dass lange Lagerungszeiten von filtergetrockneten Serumproben bei Raumtemperatur zu PCR Versagen für lange PCR Amplifikate führt, welches vermutlich auf Strangbrüchen in dem viralen RNA-Genom zurückzuführen ist (21).

Als Konsequenz daraus wurden die Einschlusskriterien von Filterproben für die Primärresistenztestung und die Subtypisierungen in 2013 geändert und Filterproben mit einer Transportdauer >8 Tagen ausgeschlossen, da es hier zu signifikanten Verschlechterungen kam. Außerdem wurde im Zuge des Projekts: „Molekulare Surveillance und Analyse genetischer Faktoren zur Optimierung der Therapie und Prävention von HIV und viralen Hepatitiden in Deutschland: MASTER - HIV/HEP“ im Teilprojektes I (Okt.-Dez. 2013) ein PCR Verfahren etabliert, mit dem die Zielregion über zwei kürzere sich überlappende Amplifikate sequenziert werden konnte (siehe Kapitel 1.1.).

Die Auswahl der im Labor mit dem BED-EIA als inzident klassifizierten Filterproben zu weiteren Analysen ist in der Tabelle 7 dargestellt.

Tabelle 4: Anteil und Anzahl der inzident klassifizierten Filterproben zur Genotypisierung (Januar 2011-Juni 2014)

	2012 (n=3.207)	2013 (n=3.225)	2014 (n=1.541)	Gesamt (n=7.973)
Inzident getestete Filterproben	1.004 (31,3%)	1.027 (31,8%)	472 (30,6%)	2.503 (31,4%)
Anwendung der Einschlusskriterien	437 (43,5%)	672 (65,4%)	387 (82,0%)	1.496 (59,8%)
Viruslast nachweisbar	274 (62,7%)	510 (75,9%)	295 (76,2%)	1.079 (72,1%)
Amplifikation in <i>pol</i> -RT PCR	132 (48,2%)	436 (65%)	294 (99,7%)	862 (79,9%)
Ausschluss aufgrund von nicht auswertbarer Sequenz	8 (6,1%)	91 (20,9%)	64 (21,8%)	163 (18,9%)
Erfolgreiche Genotypisierung	124 (93,9%)	345 (79,1%)	230 (78,2%)	699 (81,1%)
Ausschluss von Doppelten	2 (1,6%)	5 (1,4%)	-	7 (1%)
Auswertbare HIV-Genotypen	122	340	230	692

Übertragene Resistenzen gegen Protease-Inhibitoren (PI), NRTI und/oder NNRTI in 2012-2014 lagen nach der Surveillance-Resistenzmutations-Liste für therapie-naive Patienten (22) in 87 von 692 (13%; 95% KI 10%-19%) der untersuchten Proben vor. Im Detail konnten Resistenzen gegen folgende Wirkstoffklassen identifiziert werden: PI-Resistenzen (3,2%), NRTI-Resistenzen (5,3%), NNRTI-Resistenzen (2,9%). Zu 0,9% wurden Dual-Resistenzen gegen NRTI/NNRTI, NNRTI/PI oder NRTI/PI ermittelt. Bei 0,3% lag eine Multiresistenz vor (NRTI/NNRTI/PI) (siehe Abbildung 12).

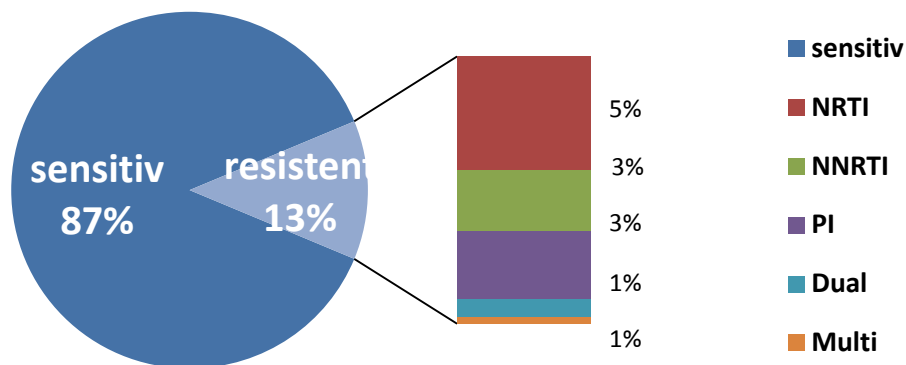


Abbildung 12: Anteil inzidenter HIV-Infektionen mit übertragenen Resistenzen (n=692) 2012-2014/I

Der Anteil inzidenten Infektionen mit übertragenen Resistenzen unterscheidet sich in den verschiedenen Transmissionsgruppen nicht signifikant (5-14%) und ist in der Gruppe der Männer (13%) ähnlich hoch wie in der Gruppe der Frauen (10%) (alle $p > 0,05$) (Abbildung 13).

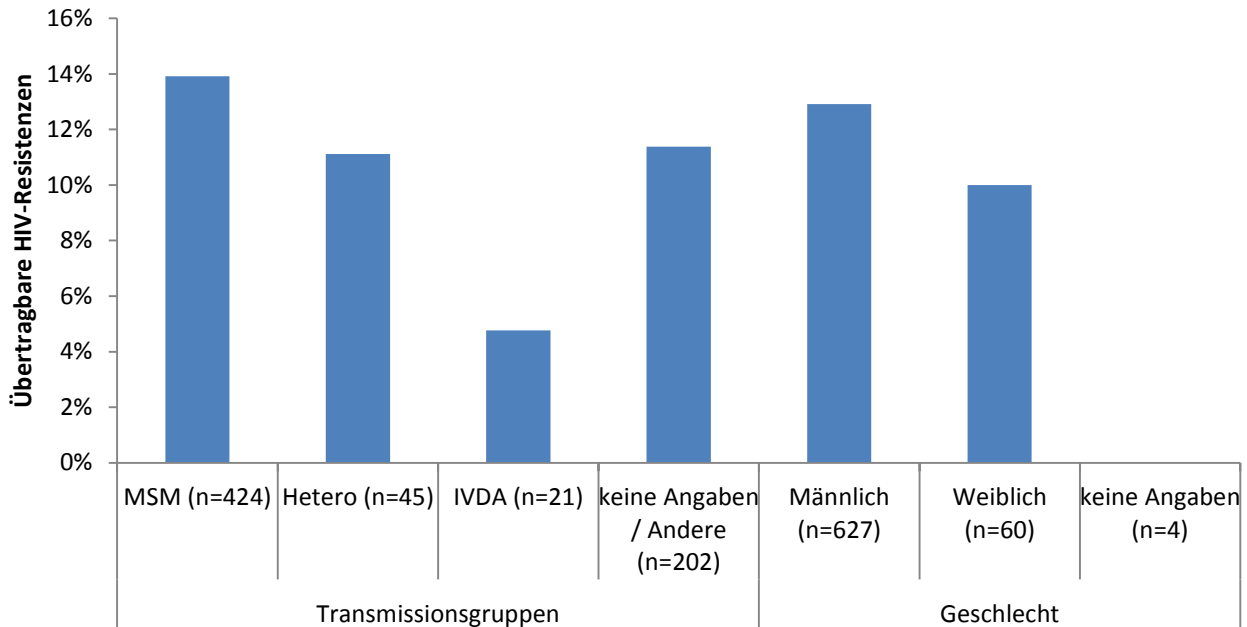


Abbildung 13: Anteil inzidenten Infektionen mit übertragenen Resistenzen innerhalb der Transmissionsgruppen und Geschlechter (n=692), 2012-2014/I; alle p -Werte $> 0,05$

Im zeitlichen Verlauf vom 1. Halbjahr 2012 bis Ende des 1. Halbjahrs 2014 (5 Semester) lässt sich für die Übertragung von HIV-Resistenzen unter Neuinfektionen ein signifikant abfallender Trend erkennen ($p_{\text{Trend}} = 0,04$) (Abbildung 14). Dieser beruht auf der Summe der deutlich abnehmenden Trends von NRTI- und PI-Resistenzen (kumulativ), die jedoch in der Einzelauswertung nicht signifikant verlaufen (beide $p = 0,2$). Indes ist unter den NNRTI-Resistenzen eher ein gleichbleibender bis sehr schwach abnehmender Trend zu verzeichnen ($p = 0,8$; Steigungsfaktor: $-0,08$) (

Abbildung 15, Tabelle 8: Kumulative Anzahl von NNRTI, NRTI und PI Resistenzen unter den inzident klassifizierten Filterproben im Zeitverlauf (2011- 2014/I)). Der abnehmende Trend der übertragenen Resistenzen deutet sich auch in den Risikogruppen der MSM ($p = 0,27$) und der Heterosexuellen ($p = 0,07$) an, ist jedoch nicht signifikant und beruht insgesamt noch auf sehr kleinen Fallzahlen (Tabelle 9).

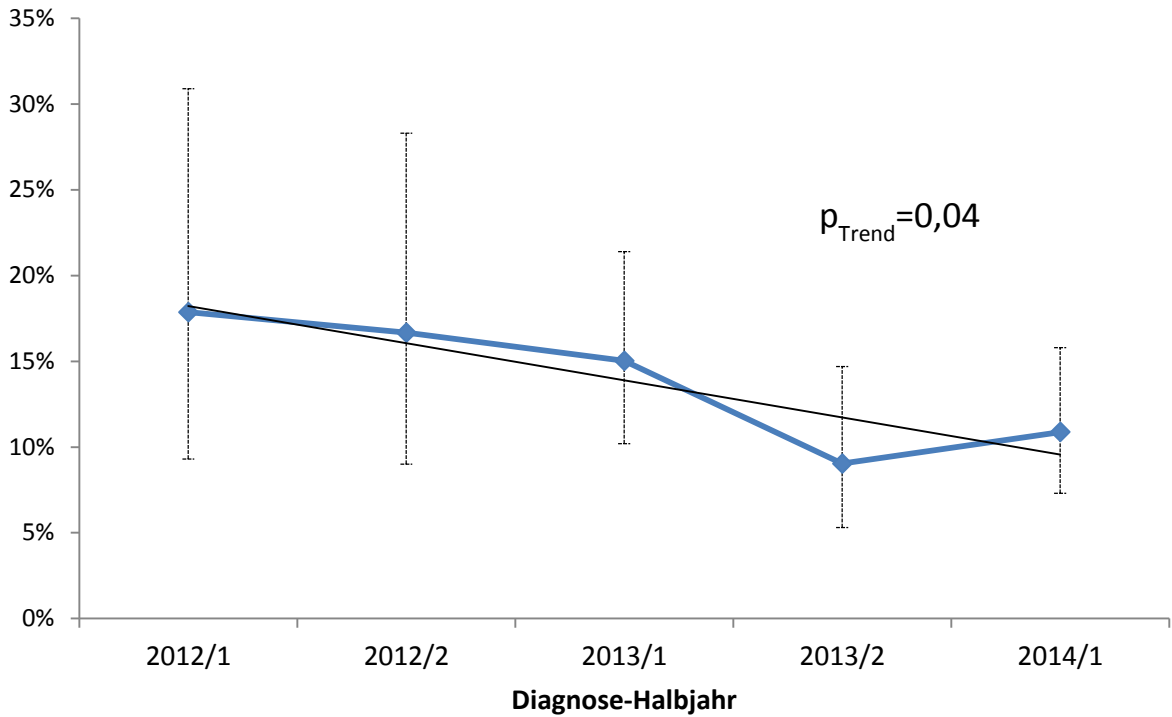


Abbildung 14: Trend der übertragenen Resistenzen bei inzidenten HIV-Infektionen im zeitlichen Verlauf 2012-2014/I

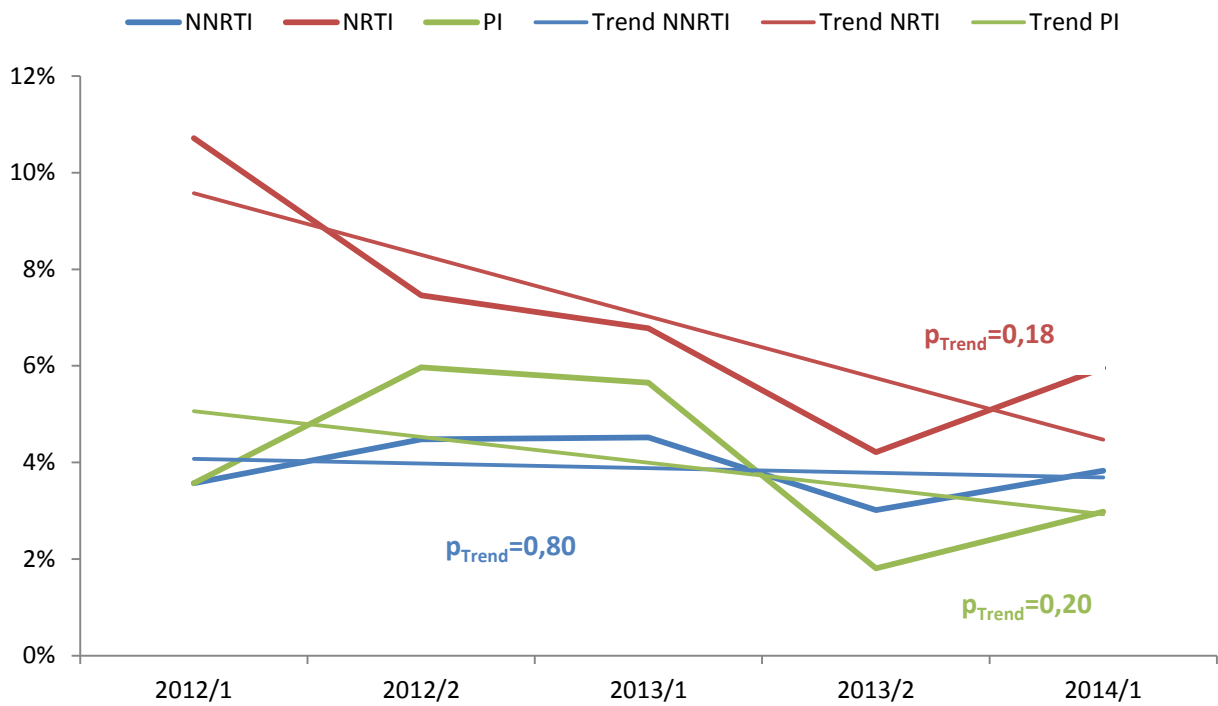


Abbildung 15: Trend der übertragenen Resistenzen gegenüber NNRTIs, NRTIs und PIs bei inzidenten Infektionen im zeitlichen Verlauf 2012-2014/I

Tabelle 5: Kumulative Anzahl von NNRTI, NRTI und PI Resistenzen unter den inzident klassifizierten Filterproben im Zeitverlauf (2011- 2014/I)

Resistenzen	2012/1	2012/2	2013/1	2013/2	2014/1	p _{Trend}
NNRTI	2	3	8	5	9	0,80
NRTI	6	5	12	7	14	0,18
PI	2	4	10	3	7	0,20
Keine Resistenzen	46	55	147	151	205	
Gesamt	56	67	177	166	235	

Tabelle 6: Anzahl und Anteil der übertragenen Resistenzen (TDRs) innerhalb der Transmissionswege „MSM“ und „heterosexuelle Kontakte“ im Zeitverlauf (2011- 2014/I)

	2012/1	2012/2	2013/1	2013/2	2014/1	p _{Trend}
MSM mit TDR / Gesamt	6/34 (17,6%)	7/42 (16,7%)	17/110 (15,5%)	12/102 (11,8%)	17/136 (12,5%)	0,27
Hetero mit TDR / Gesamt	1/3 (33,3%)	0/1 (0,0%)	3/17 (17,6%)	1/10 (10,0%)	0/14 (0,0%)	0,07

Die Subtypbestimmung der HIV-Infektionen aus 2012-Juni 2014 ergab eine Verteilung von 79% Subtyp B-Infektionen und 21% (147/692; 95% KI 18%-25%) Non-B Infektionen. Die häufigsten „Non-B“ Subtypen in Deutschland sind die Subtypen A (5%) und C (3%), gefolgt von der Rekombinante CRF02_AG (3%), sowie den Subtypen C (3%), D (1%), F (2%) und der Rekombinante CRF01_AE (2%) (siehe Abbildung 16).

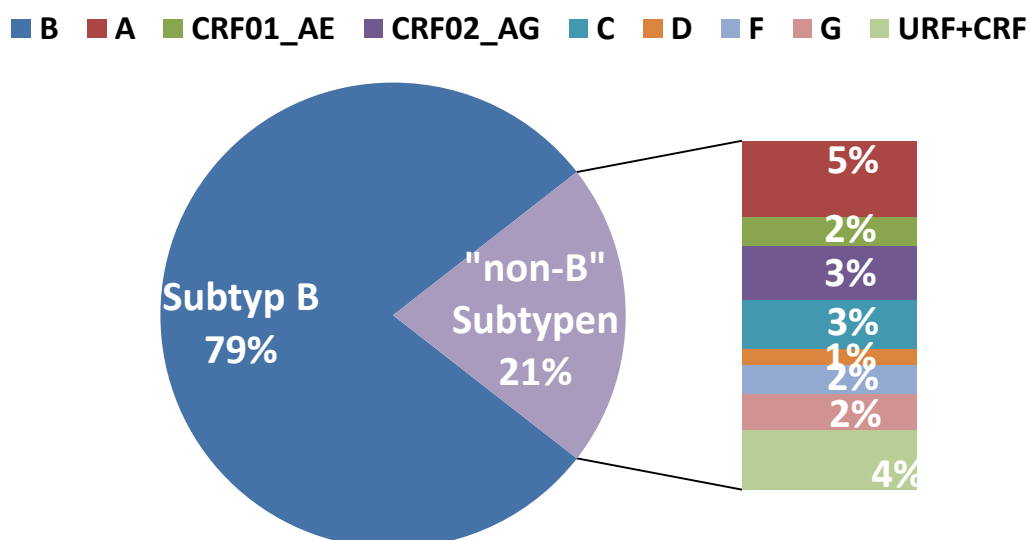


Abbildung 16: Anteile der HIV-1 Subtypen bei inzidenten Infektionen (n=692), 2012-2014/I

Der Anteil an Subtyp Non-B Infektionen ist in der Transmissionsgruppe der Heterosexuellen (37/45; 82%) signifikant höher als bei den MSM (42/424; 10%; $p < 0,0001$) und den IVDA (12/21, 57%; $p < 0,05$). In der Gruppe der Frauen (45/60; 75%) ist der Anteil an Subtyp non-B Infektionen ebenfalls signifikant höher als bei den Männern (99/627; 13%; $p > 0,0001$) (Abbildung 17).

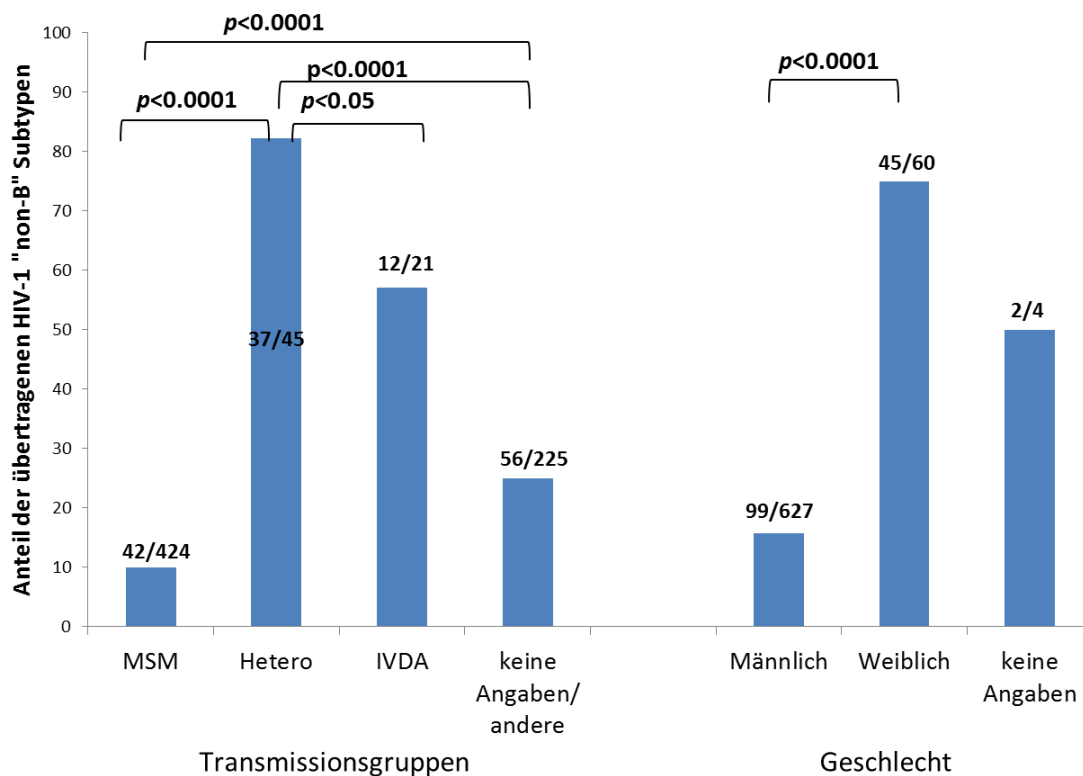


Abbildung 17: Anteil der HIV-1 Non-B Subtypen in den verschiedenen Transmissionsgruppen bei inzidenten HIV-Infektionen (n= 962) 2012-2014 (nur signifikante p-Werte ($\leq 0,05$) aus paarweisem Vergleich sind angezeigt)

Im zeitlichen Verlauf lässt sich für die HIV-1 Subtyp Non-B Infektionen unter den Neuinfektionen ein signifikant ansteigender Trend erkennen ($p_{Trend} = 0,01$) (Abbildung 18). Ein Trend innerhalb der einzelnen Non-B Subtypen wurde nicht berechnet, da die Fallzahlen innerhalb der einzelnen Subtypen zu klein sind (Tabelle 10). In der Risikogruppen der MSM erreicht dieser Trend eine nahezu signifikante Zunahme ($p_{Trend} = 0,08$) (

Abbildung 19), ist aber bei den Heterosexuellen nicht zu beobachten ($p_{Trend} = 0,61$). Die Berechnungen basieren insgesamt sehr kleinen Fallzahlen (Tabelle 11).

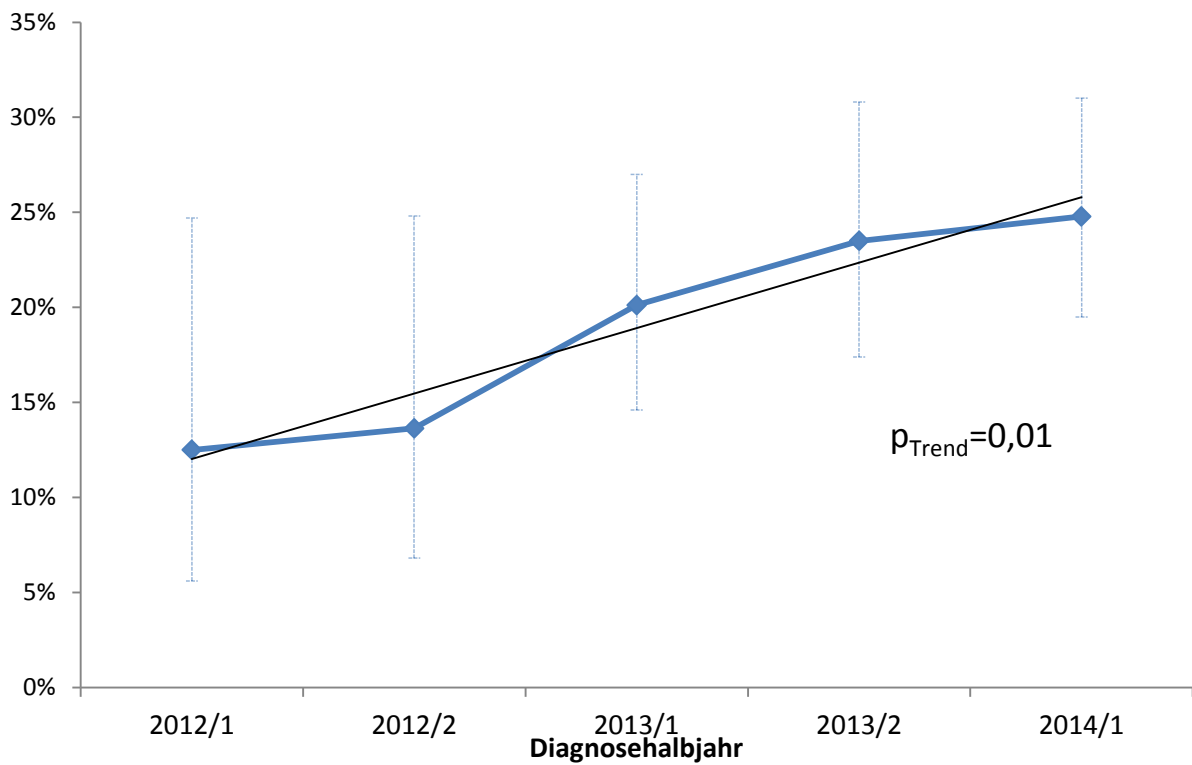


Abbildung 18: Trend der Non-B Subtypen bei inzidenten Infektionen im zeitlichen Verlauf 2012-2014/1

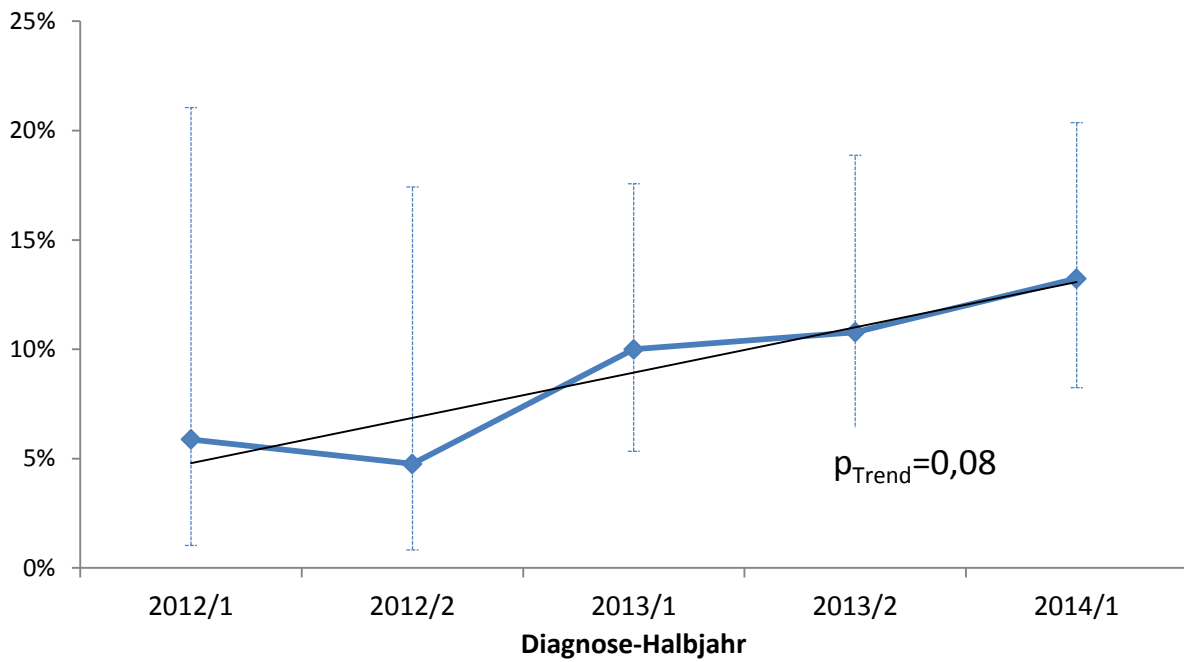


Abbildung 19: Trend der Non-B Subtypen in der Risikogruppe der MSM mit inzidenten Infektionen im zeitlichen Verlauf 2012-2014/1

Tabelle 7: Verteilung der als inzident klassifizierten Filterproben nach Subtyp im zeitlichen Verlauf (2011- 2014/I)

Subtyp	2012/1	2012/2	2013/1	2013/2	2014/1	Gesamt
B	49	57	139	127	173	545
A	-	-	6	11	15	32
C	1	-	3	7	9	20
CRF01_AE	-	2	3	1	6	12
CRF02_AG	4	3	3	5	8	23
CRF06_cpx	-	-	3	2	2	7
D	-	1	4	2	-	7
F	2	1	4	1	4	12
G	-	-	7	3	5	15
URF+CRF	-	2	2	7	7	18
Gesamt	56	66	174	166	229	691

Tabelle 8: Anzahl von Subtyp Non-B Infektionen innerhalb der beiden Risikogruppen „MSM“ und „heterosexueller Transmission“ (2011- 2014/I)

	2012/1	2012/2	2013/1	2013/2	2014/1	pTrend
Non-B in MSM / Gesamt	2/34 (5,9%)	2/42 (4,8%)	11/110 (10,0%)	11/102 (10,8%)	18/136 (13,2%)	0,08
Non-B in Hetero / Gesamt	3/3 (100,0%)	1/1 (100,0%)	13/17 (76,5%)	9/10 (90,0%)	11/14 (78,6%)	0,61

Der Anteil an übertragenen Resistenzen war signifikant höher in der Gruppe der Subtyp B-Infektionen (80/465; 15%) als in der Gruppe der Subtyp non-B Infektionen (8/139; 5%; $p=0,002$) (Abbildung 20).

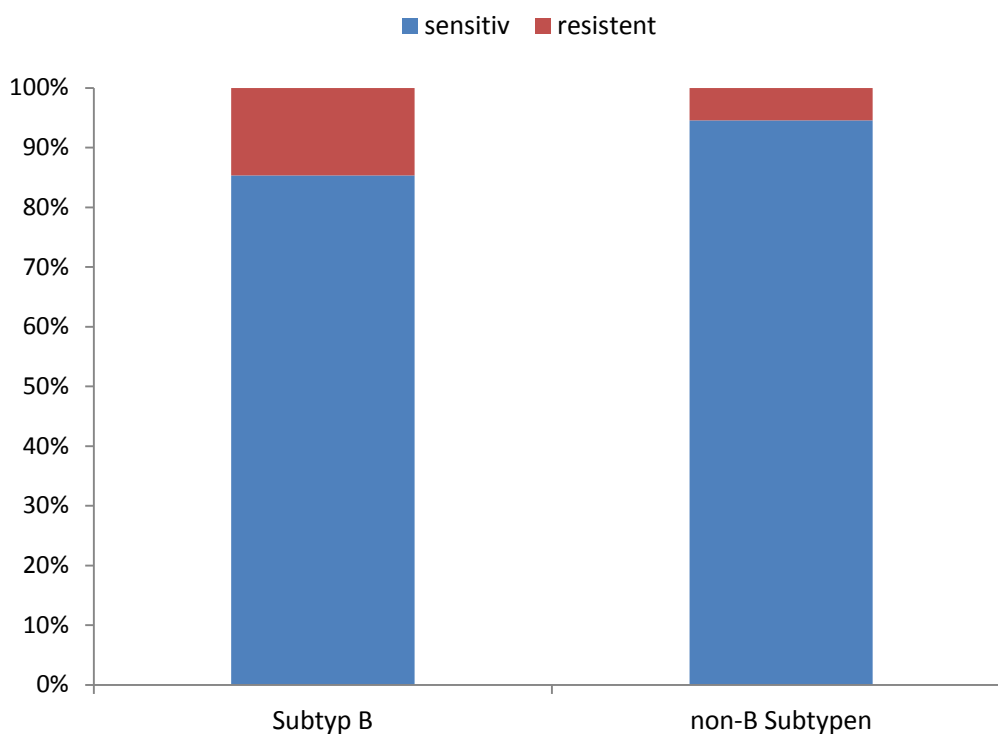


Abbildung 20: Verteilung der übertragenen Resistenzen in den Gruppen der Subtyp B-Infektionen und der Non-B Infektionen (Januar 2011-Juni 2014)

4.4. Kooperation mit anderen Inzidenzprojekten

Während der gesamten Projektlaufzeit wurde die Inzidenztestung mit Hilfe des BED-ELISA durchgeführt. An einer methodischen Verbesserung und Anpassung wurde während der gesamten Projektlaufzeit parallel gearbeitet.

Mit einem 2009 vom ECDC ausgeschriebenem Projekt sollte eine EU-weit anwendbare Vorgabe für die nationale Erfassung der Inzidenz von HIV-Infektionen geschaffen werden (ECDC Tender: „Developing a protocol for HIV incidence studies for Europe“). Das RKI als Repräsentant für Deutschland war in diesen Prozess mit eingebunden. Es fanden zwei Telefonkonferenzen statt (20.10.2011 und 08.12.2011). Im Juni 2013 entstand als Resultat dieses Tenders der Technical Report des ECDC: „Monitoring recently acquired HIV infections in the European context“ (23). Dieser Report stellte eine Leitlinie bei der Bewertung und Berechnung der Neuinfektionen unter den Neudiagnosen in Form von „Recent Infection Testing Algorithm“ (RITA) dar, gab aber keine Vorgaben zur Verwendung eines einheitlichen Inzidenztestes für Europa aus. Dieses Ziel wurde erst von einem internationalen Zusammenschluss „Consortium for Evaluation and Performance of HIV Incidence Assays (CEPHIA); 2011“ verfolgt. Diese arbeiteten seit 2013 an der Evaluierung von 6 verschiedenen „Kandidatentesten“: dem BED-EIA(24), dem seit 2012 kommerziell

erhältliche „Limiting Ag (LAg) Avidity“ Test (25), dem auf einer Modifikation des 4. Generations EIA (Architect HIV Ag/A Combo) beruhenden Aviditätstest (26), dem kommerziellen Vitros HIV-Automatentest modifiziert zu einem auf Titer bzw. Avidität basierenden Inzidenztest (25) und einem vom CDC entwickelten BioRad-Aviditätstest (26, 27). Im Rahmen einer seit März 2012 bestehenden Kollaboration mit dem „HIV Diagnostics and Incidence Team“ des Centers for Disease Control and Prevention (CDC) in Atlanta/USA, die der neue Methodenprotokolle zur serologischen Inzidenztestung ausgetauscht und gemeinsam evaluiert wurden, führte das RKI eine Vergleichsstudie für drei der sechs Teste durch. Die Ergebnisse wurden in einer Publikation veröffentlicht (28). Zur Beurteilung eines weiteren Kandidatentest von CEPHIA wurde der Automaten-basierte Aviditätstest von Suligoi (4.Generations-ELISA) ausgewählt. Ziel war es, ein manuelles Testformat mit gleicher Antigenbestückung zu etablieren. Der „Murex HIV Ag/Ab Combo Test (Diasoren)“, ein 4. Generations Platten-Elisa erfüllte diese Bedingung und wurde mit einem modifizierten und optimierten Methodenprotokoll hinsichtlich Machbarkeit und Richtigkeit (Sensitivität und Spezifität) evaluiert. Der optimierte Murex-Aviditätsassay wies eine Sensitivität von 82,7% und eine Spezifität von 83,3% auf. Im Vergleich zu den publizierten Daten vom Automaten-basierten Aviditätstest von Suligoi (29, 30), scheint er weniger geeignet zu sein. Verglichen mit dem BED-CEIA war die Fehlerrate der Probenklassifikation (inzident/prävalent) mit dem Murex-Aviditätsassay vergleichbar für therapie-naive Proben und sogar geringer für Proben von therapierten Patienten. Ergebnisse dieser Evaluation wurden auf der GfV 2013 (6.-10.3.2013) in Kiel, Deutschland auf einem Poster präsentiert (31). Vorläufige Ergebnisse der CEPHIA Evaluation verschiedener Inzidenzteste, die am 3. März 2013 in einem Expertenteam vorgestellt wurden, zeigten, dass keiner der Tests die Zielkriterien erfüllte. Es wird daher die Verwendung eines Algorithmus anvisiert, der die Ergebnisse von 2 serologischen Tests mit klinischen Daten verbindet.

Daher wurde für den BioRad Aviditätstest in der Kooperation mit dem CDC ein Protokoll für die Verwendung von Filterproben mit dem BioRad Aviditätstest erarbeitet. Anschließend wurde die Verwendung eines Algorithmus bestehend aus klinischen Daten (Viruslast, CD4 Zellzahl) und Ergebnissen des BED-CEIA und des BioRad Aviditätssays ausgetestet (Multy Analyte Algorithm; MAA nach Brookmeyer et al. (32) und Laeyendecker O et al. (33)). Das DPS-Evaluationspanel bestand aus 262 Proben des Serokonverter-Kollektivs mit kurzer Infektionsdauer (1-140 Tage), 53 Proben mit mittlerer Infektionsdauer (141-365 Tage) und 278 Proben lange bestehender Infektionsdauer (366-6000 Tage). Die Proben stammten zu 15% aus Subtypen non-B und 85% Subtypen B Infektionen. Die Ergebnisse des BED-CEIA, BioRad Avidität, MAA wurden verglichen hinsichtlich Sensitivität, Spezifität, Richtigkeit und FRR (siehe Abbildung 21). Die Ergebnisse wurde auf der GfV 2014 als Poster (34) und auf den Münchner AIDS-Tagen 2014 als Vortrag präsentiert (35).

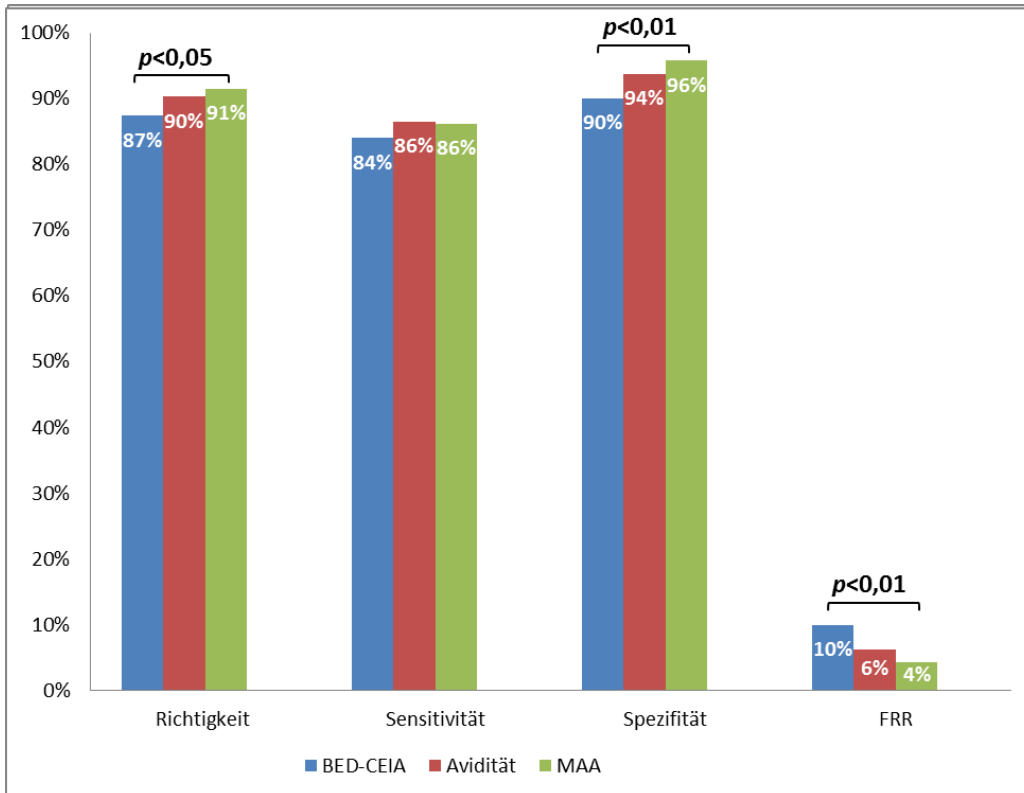


Abbildung 21: Testergebnisse eines DPS-Evaluationspanels von Filterproben aus kurz und mittellang bestehenden ($n=315$) und lang bestehenden Infektionen ($n=278$) mit HIV-1 Subtyp B und Non-B Infektionen. Die Ergebnisse des BED-CEIA, BioRad Aviditätstests und MAA wurden hinsichtlich Sensitivität, Spezifität, Richtigkeit und falsch-inkident Rate (false recent rate; FRR) verglichen. Nur signifikante p -Werte ($\leq 0,05$) paarweisen Vergleichs sind angezeigt.

5. Diskussion der Ergebnisse

Bei einem Drittel der untersuchten Filterproben bei HIV-Erstdiagnosen konnte eine kürzlich erworbene HIV-Infektion nachgewiesen werden. In anderen europäischen Ländern schwankt der Anteil der kürzlich erworbenen HIV-Infektionen in ähnlichen Studien zwischen 12,3% in Frankreich, 14,7% in England, Wales, Nordirland und 35% in Schweden (5, 36, 37). In diesen Studien war der Anteil der inzidenten HIV-Infektionen innerhalb der Transmissionsgruppe MSM am höchsten und schwankte zwischen 22,3% und 45%, was auch in Deutschland (38%) beobachtet werden konnte (4, 36-38). Der beobachtete hohe Anteil inzidenter Infektionen bei MSM, vor allem bei jungen MSM wurde ebenfalls in anderen Studien beobachtet (36, 38).

Obwohl regionale Unterschiede im Anteil inzidenter HIV-Infektionen innerhalb der Bundesländer beobachtet werden konnten, beruhen diese Unterschiede jedoch vermutlich eher auf dem

Einsendeverhalten der beteiligten Labore (und damit der entsprechenden Anzahl von Filterproben für das ganze Bundesland) als auf einem tatsächlichen Unterschied der inzidenten HIV-Infektionen in den Bundesländern. Die teilnehmenden Labore haben im Schnitt 70% ihrer HIV-Meldungen mit Filterproben ans RKI übermittelt, jedoch gab es große Schwankungen innerhalb der einzelnen Labore (4-100%). Dies könnte auch einen Einfluss auf regionale Verteilungen haben. Obwohl die Anzahl der teilnehmenden Labore im Vergleich zur vorherigen Studie erhöht werden konnte, liegt der Anteil von HIV-Meldungen mit Filterproben weiterhin bei knapp 60%. Für die zusätzlichen Laboranalysen zur Viruslastbestimmung und HIV-Subtypisierung und einer entsprechenden Aussage über alle HIV-Erstmeldungen ist jedoch ein höherer Anteil von HIV-Meldungen mit Filterproben notwendig, so dass neue Labore rekrutiert werden sollen.

Es konnte weiterhin beobachtet werden, dass der Anteil von inzidenten HIV-Infektionen bei HIV-Erstmeldungen über die Jahre insgesamt leicht angestiegen ist und der Trend sich je nach Transmissionsgruppe sehr unterscheidet. Für Beobachtungen über die Zeit in den einzelnen Transmissionsgruppen (um stat. signifikante Trends zu erkennen), können aufgrund der geringen Anzahl in den Gruppen zu diesem Zeitpunkt keine weiteren Aussagen getroffen werden. Eine weiterführende Trendanalyse in den einzelnen Transmissionsgruppen bzw. Altersgruppen über die Jahre wird im nächsten Jahr angestrebt.

Die Analysen zur Machbarkeit der HIV-Primärresistenz-Bestimmung und HIV-Subtypisierung von inzidenten HIV-Erstdiagnosen aus Filterproben ließen erkennen, dass es präanalytische Bedingungen gibt, die ein Ausschlusskriterium darstellen. Daraus folgten für die Performance im Labor zwei Konsequenzen: die Ausschlusskriterien wurden erweitert auf Proben, die lange Transportzeiten (>8 Tage) bei Raumtemperatur aufwiesen und es wurde eine neue 2-Fragmente PCR mit höheren PCR-Positivraten etabliert. Weiterhin wurden die teilnehmenden Labore in Newslettern und Workshops gebeten, eine Zusendung der Filterproben möglichst umgehend nach dem Tropfen zu gewährleisten (maximal innerhalb von einer Woche). Die Zeit, die zwischen dem Tropfen der Probe und dem Eingang der Probe am RKI konnte dadurch auf von 5 auf 4 Tage verkürzt werden.

Übertragene Protease-Inhibitoren (PI)-, NRTI- und/oder NNRTI-Resistenzen lagen nach der Surveillance-Resistenzmutations-Liste für therapie-naive Patienten (22) in 13% der Proben aus 2012-2014/I vor. Der Trend ist über die Dauer der Studienperiode 2012-2014/I in Semester-Auswertung signifikant abnehmend. Es handelt sich jedoch um kleine Fallzahlen. In der HIV-1 Serokonverterstudie wurde eine mittlere Prävalenz der TDR von 12,1% (Jahr der Serokonversion 1997-2013) mit sehr langsam abnehmenden Trend seit 1997 beobachtet (39). Der abnehmende Trend wird auch in anderen europäischen Ländern beobachtet und ist

mit einer über die Jahre optimierten Darreichungsform der ART zu begründen (Kombinationspräparate mit geringeren Nebenwirkungen) (40). Die Tatsache, dass Primärresistenzen weiterhin auf dem relativ hohen Niveau von >10% übertragen werden, könnte auf der beobachteten Persistenz einiger Resistenzmutationen beruhen, die aufgrund der vergleichbaren Fitness lange mit dem HIV-Wildtyp konkurrieren können (39).

Der mittlere Anteil von 21% Subtyp non-B-Infektionen in den getesteten inzidenten Filterproben von 2012-2014/I ist wesentlich höher als der mittlere Anteil von 8,8% in der HIV-1 Serokonverterstudie, die vor allem die Transmissionsgruppe der MSM repräsentativ erfasst (41). Allerdings umfasst die Beobachtungsdauer in der Serokonverterstudie einen langen Zeitraum, in dem der Anteil der non-B Infektionen im Serokonverter-Kollektiv signifikant von 5% in 1996 (Jahr der Serokonversion) bis auf 16,7% in 2013 anstieg (41). Der Anteil der HIV-1 non-B Infektionen unter den inzidenten HIV-Erstdiagnosen 2012-2014/I ist bei den heterosexuell übertragenen Infektionen signifikant höher als bei den MSM oder intravenösen Drogengebern, was den geringeren Anteil an non-B Infektionen in der Serokonverterstudie erklären würde.

Der BED-CEIA kam in den letzten Jahren wegen seiner erhöhten Anteile falsch-inzident klassifizierter Proben von therapierten Patienten, solchen in späten Infektionsstadien und bei Patienten mit Subtyp non-B Infektionen international in kritische Diskussion. Obwohl in Deutschland die Überschätzung des Anteils inzidenter HIV-Infektionen durch antiretrovirale Therapie bei der Untersuchung der Neudiagnosen nicht zutreffend (therapie-naiv bei Neudiagnose) ist, ist es im Hinblick auf die potentiellen non-B Subtypen und „late presenters“ doch angezeigt, den BED-CEIA als Einzeltest aufgrund dieser Limitierungen auf lange Sicht abzulösen. Durch die internationale Kooperation mit dem „HIV Diagnostics and Incidence Team“ des Centers for Disease Control and Prevention (CDC) in Atlanta/USA und den eigenen Validierungen von weiteren Inzidenztesten bzw. die Erstellung eines Algorithmus aus BED EIA, dem BioRad Avidity sowie CD4 Zellzahl und Viruslast ((32), (33), (42), (43)) mit deutlichen Verbesserungen in der Inzidenztestung wird im FG18 der Übergang zu neueren Test-Algorithmen geprüft und ggf. kontrolliert durchgeführt.

6. Publikationen

6.1. Publikationen in Fachzeitschriften

- Andrea Hauser, Claudia Santos-Hoeverer, Karolin Meixenberger, Ruth Zimmermann, Sybille Somogyi, Stefan Fiedler, Alexandra Hofmann, Barbara Bartmeyer, Klaus Jansen, Osamah Hamouda, Norbert Bannert, Claudia Kuecherer: *Improved testing of recent HIV-1 infections with the BioRad Avidity Assay compared to the Limiting Antigen Avidity Assay and BED Capture Enzyme Immunoassay: Evaluation using reference sample panels from the German Seroconverter Cohort.* PLoS ONE 2014, June 3. doi: 10.1371/journal.pone.0098038

- Claudia Santos-Hövenner, Ruth Zimmermann, Claudia Kücherer, Jörg Bätzing-Feigenbaum, Stefan Wildner, Osamah Hamouda, Ulrich Marcus: *Conversation about Serostatus decreases risk of acquiring HIV. Results from a case control study comparing MSM with recent HIV infection and HIV negative controls.* BMC Public Health 2014, 14:453. doi:10.1186/1471-2458-14-453

6.2. Vorträge auf Fachkongressen (2011-2014)

- Hauser A, Han O, Hofmann A, Meixenberger K, Zimmermann R, Somogyi S, Santos-Hoevenner C, Bartmeyer B, Jansen K, Hamouda O, Bannert N, Kücherer C. *Anwendung eines Algorithmus mit multiplen Analyten zur Ermittlung der Anzahl neuer HIV-Infektionen in Deutschland.* 15. Münchner AIDS- und Hepatitis-Tage. 21-23. März 2014
- Kuecherer C, Hauser A, Santos-Hoevenner C, Hofmann A, Zimmermann R, Hamouda O, Bannert N *Molecular surveillance of recently acquired HIV infections in Germany using dried serum spots.* 24th Annual Meeting of the GfV and the DVV, Alpbach, Österreich, 26- 29 March 2014
- Bannert, Norbert. *Molecular Surveillance of Recently Acquired HIV Infections in Germany Using Dried Serum Spots.* AREVIR-GenaFor – Meeting Verbundprojekt HIV-HEP-MASTER EuResist, Köln, Deutschland, 04.-05. April 2014, (<http://www.genafor.org/>)

6.3. Poster auf Fachkongressen (2011-2014)

- Zimmermann R, Santos-Hövenner C, Kücherer C, Fiedler S, Hamouda O, *Surveillance inzidenter HIV-Infektionen im Rahmen der HIV-Meldung: Pilotstudie mit filtergetrockneten Serumproben.* Poster. Deutsch-Österreichischer AIDS-Kongress, Hannover, 15.-18. Juni 2011
- Zimmermann R, Santos-Hövenner C, Kücherer C, Bätzing-Feigenbaum J, Loschen S, Hamouda O, *The German HIV Incidence Study 2008 - 2010: Recent Infections by Sociodemographic Factors and Mode of Transmission.* Poster presentation. Deutsch-Österreichischer AIDS-Kongress, Hannover, 15.-18. Juni 2011.
- Santos-Hövenner C, Zimmermann R, Seiffert I, Loschen S, Bätzing-Feigenbaum J, Kücherer C, Hamouda O, *Recent HIV Infections in Men having Sex with Men in Germany- Results from the German HIV Incidence Study.* Poster presentation. Deutsch-Österreichischer AIDS-Kongress, Hannover, 15.-18. Juni 2011.
- Santos-Hövenner C, Zimmermann R, Marcus U, Bätzing-Feigenbaum J, Kücherer C, Hamouda O, *Let's Talk about Sex! Differences in Reported Risk Behaviour between Recently HIV Infected Men Having Sex with Men and HIV Negative Controls.* Poster presentation. Deutsch-Österreichischer AIDS-Kongress, Hannover, 15.-18. Juni 2011.

- Santos-Hövenner C, Zimmermann R, Loschen S, Bätzing-Feigenbaum J, Kücherer C, Hamouda O, *Recently acquired HIV Infections in Persons from High Prevalence Countries - Results from the German HIV Incidence Study*. Poster presentation. Deutsch-Österreichischer AIDS-Kongress, Hannover, 15.-18. Juni 2011.
- Santos-Hövenner C, Zimmermann R, Seiffert I, Loschen S, Bätzing-Feigenbaum J, Kücherer C, Hamouda O, *Recent HIV-Infections in Men having Sex with Men in Germany- Results from the nation-wide HIV-incidence Study in Germany*. International AIDS Society (IAS) Conference on HIV Pathogenesis, Treatment and Prevention. Rome, 17-20 July 2011
- Santos-Hövenner C, Zimmermann R, Marcus U, Bätzing-Feigenbaum J, Kücherer C, Hamouda O, *Differences between Men having Sex with Men with recent and longstanding HIV-infection-First Results from a KABP Survey in Germany*. E-poster. International AIDS Society (IAS) Conference on HIV Pathogenesis, Treatment and Prevention, Rome, 17-20 July 2011
- Hauser A., Masciotra S., Fiedler S., Santos-Hoevenner C., Meixenberger K., Somogyi S., Bartmeyer B., Bannert N., Owen SM., Kücherer C.; *Comparison of Three HIV-1 Incidence Assays Performance with the German Seroconverter Cohort: BED-EIA, BioRad Avidity and Limiting Ag Avidity*; CROI 2013, Atlanta, USA; Poster #1054
- Hauser A., Kenfack Guepi E., Santos-Hoevenner C., Zimmermann R., Meixenberger K., Somogyi S., Bartmeyer B., Jansen K., Bannert N., Kücherer C.; *Evaluation of a manual avidity-assay using fourth-generation commercial enzyme immunoassay (EIA)*; 23th Annual Meeting of the GfV and the DVV, Kiel, Germany; 2013 Poster ID 65
- Santos-Hövenner C, Zimmermann R, an der Heiden M, Marcus U, Bätzing-Feigenbaum J, Kücherer C, Hauser A, Fiedler S, Tomschegg A, Hamouda O: *Trends in recent infections among HIV-diagnoses from 2008-2011. Results from two studies utilizing the BED-ELISA for incidence testing*. ID143, Deutsch-Österreichischer AIDS-Kongress 2013, Innsbruck
- Hauser A, Santos-Hoevenner C, Hofmann A, Zimmermann R, Hamouda O, Bannert N, Kuecherer C; *Analysis of transmitted drug resistance and HIV-subtypes from dried serum spots of newly diagnosed patients in Germany: results from the study "Surveillance of incident HIV infections" in 2012*; 14th European AIDS Conference - EACS, Brüssel, Belgien, Poster PE 21/11
- Hauser A, Han O, Hofmann A, Meixenberger K, Somogyi S, Santos-Hoevenner C, Zimmermann R, Bartmeyer B, Jansen K, Hamouda O, Bannert N, Kuecherer C. *Performance of Multiassay Algorithm in Comparison with Two Serological Tests for Recent HIV-Infections*, ID 103, 24th Annual Meeting of the GfV and the DVV, Alpbach, Österreich, 26- 29 March 2014
- Hauser A, Hofmann A, Santos-Hoevenner C, Zimmermann R, Hamouda O, Bannert N, Kuecherer C: *Analysis of transmitted drug resistance and HIV-1 subtypes using dried serum spots of recently HIV-*

infected individuals in 2013 in Germany; 11th International Congress on Drug Therapy in HIV Infection, Glasgow ; UK; 2-6 November 2014; Poster P138

6.4. Vorträge auf Workshops und Seminaren (2011-2014)

- Santos-Hövenner C, *HIV und Migration in Berlin und bundesweit. Auswertung der HIV-Meldedaten & der HIV-Inzidenzstudie (2008 – 2010)*. LABAS Treffen Netzwerkstelle HIV/AIDS und Migration, Berlin. 18.5.2011
- Santos-Hövenner C, Zimmermann R, *Ergebnisse des Laborarms der HIV-Inzidenzstudie*, Jahrestreffen der epidemiologischen HIV- und STI- Projekte des Robert Koch-Instituts. Berlin. 28. -29. Oktober 2011
- Santos-Hövenner C: *Let's talk about sex: Ergebnisse des ärztlichen Arms der HIV-Inzidenzstudie*, Jahrestreffen der epidemiologischen HIV- und STI- Projekte des Robert Koch-Instituts. Berlin. 28. - 29. Oktober 2011
- Santos-Hövenner C, Hauser A: *Ergebnisse der bundesweiten HIV-Inzidenzstudie 2008-2010. Risikoprofil von frisch HIV-Infizierten in Deutschland*. Internes Seminar am Robert Koch-Institut. 11.4.2012
- Santos-Hövenner C: *HIV-Meldedaten & Auswertung der HIV-Inzidenzstudie (2008 – 2010); Fokus Migration*. Deutsche AIDS-Hilfe, Berlin. 4. April 2012
- Santos-Hövenner C, Zimmermann R, Kücherer C, Loschen S, Bätzing-Feigenbaum J, Hamouda O, *Inzidenztestung und –berechnung in Deutschland*, LABAS Treffen Netzwerkstelle HIV/AIDS und Migration, 13. März 2013, Berlin
- Andrea Hauser „*Das Resistenzmodul der Inzidenzstudie: übertragene antiretrovirale Resistenzen und Subtypen bei inzidenten HIV-1 Neudiagnosen*“ beim Projekttreffen der epidemiologischen und molekularbiologische Surveillance von HIV in Deutschland, 5. -6. Dezember 2013, Berlin
- Andrea Hauser „*15 Jahre serologische Inzidenzteste - ein Rück- und Ausblick -*“ . beim Projekttreffen der epidemiologischen und molekularbiologische Surveillance von HIV in Deutschland, 5. - 6. Dezember 2013, Berlin
- Alexandra Hofmann „*Serologische Inzidenztestung bei HIV-Neudiagnosen: Ergebnisse der Inzidenzstudie von 2011-2013*“ beim Projekttreffen der epidemiologischen und molekularbiologische Surveillance von HIV in Deutschland, 5. - 6. Dezember 2013, Berlin
- Alexandra Hofmann: „*Die HIV-Nennerstudien: Studienstruktur und Ergebnisse der vorherigen Befragungen*“ beim Projekttreffen der epidemiologischen und molekularbiologische Surveillance von HIV in Deutschland, 5. - 6. Dezember 2013, Berlin

- Susanne Schink: *“Die HIV-Nennerstudie: Ergebnisse der aktuellen Befragung“* beim Projekttreffen der epidemiologischen und molekularbiologische Surveillance von HIV in Deutschland, 5. - 6. Dezember 2013, Berlin
- Santos-Hövenner C: *„Serotalking als Harm Reduction Strategie bei MSM Risiko- und Schutzfaktoren bezüglich HIV/AIDS bei MSM Ergebnisse aus dem klinischen Arm der Inzidenzstudie (2008-2010)“* beim Projekttreffen der epidemiologischen und molekularbiologische Surveillance von HIV in Deutschland, 5. - 6. Dezember 2013, Berlin
- Karolin Meixenberger, Claudia Kücherer: *„Zweideutige Nukleotidbestimmungen in der HIV Populationssequenz als Marker zur Abschätzung der Infektionsdauer Ambiguitätenmodell“* beim Projekttreffen der epidemiologischen und molekularbiologische Surveillance von HIV in Deutschland, 5. - 6. Dezember 2013, Berlin

7. Literaturverzeichnis

1. Robert Koch-Institut. HIV-Infektionen und AIDS-Erkrankungen in Deutschland. Jahresbericht zur Entwicklung im Jahr 2009 aus dem Robert Koch-Institut. Epidemiologisches Bulletin. 2010;22/2010:205-20.
2. Bundesministerium für Gesundheit. Aktionsplan zur Umsetzung der HIV/AIDS-Bekämpfungsstrategie der Bundesregierung. 2007.
3. Murphy G, Parry J. Assays for the detection of recent infections with human immunodeficiency virus type 1. Euro Surveill. 2008;13(36).
4. Semaille C, Cazein F, Pillonel J, Lot F, Le Vu S, Pinget R, et al. Four years of surveillance of recent HIV infections at country level, France, mid 2003 - 2006: experience and perspectives. Euro Surveill. 2008;13(36).
5. Le Vu S, Meyer L, Cazein F, Pillonel J, Semaille C, Barin F, et al. Performance of an immunoassay at detecting recent infection among reported HIV diagnoses in France, 2003-2007. AIDS (London, England). 2009;23(13):1773-9.
6. Schüpbach J, Gebhardt M, Tomasik Z, Niederhauser C, Yerly S, Bürgisser P, et al. Assessment of recent HIV-1 infection by a line immunoassay for HIV-1/2 confirmation. PLoS Med. 2007;4(12):343.
7. Dukers N, Fennema H, Snoek E, Krol A, Geskus R, Pospiech M, et al. HIV incidence and HIV testing behavior in men who have sex with men: using three incidence sources, The Netherlands, 1984-2005. AIDS (London, England). 2007;21(4):491-9.
8. Fernandes S, Martins H, Trigo H, Leitao E, Coutinho R, Paixao M. [Human Immunodeficiency Virus type 1 seroincidence estimate among a group of drug users: a new approach]. Acta Med Port. 2005;18(1):37-44.
9. Romero A, Gonzalez V, Granell M, Matas L, Esteve A, Martro E, et al. Recently acquired HIV infection in Spain (2003-2005): introduction of the serological testing algorithm for recent HIV seroconversion. Sex Transm Infect. 2009;85(2):106-10.
10. Hall H, Song R, Rhodes P, Prejean J, An Q, Lee L, et al. Estimation of HIV Incidence in the United States. Jama. 2008;300(5):520-9.
11. Deutsche AIDS-Gesellschaft e.V., Österreichische AIDS Gesellschaft. Deutsch-Österreichische Leitlinien zur Therapie der HIV-1-Infektion, konsentiert Version vom 4.3.2010. 2010.
12. Deutsche AIDS-Gesellschaft (DAIG), Österreichische AIDS-Gesellschaft (ÖAIG), Deutsche Gesellschaft für Innere Medizin (DGIM), Deutsche STI-Gesellschaft (DSTIG), Deutsche Gesellschaft für Infektiologie (DGI), Gesellschaft für Virologie (GfV), et al. Deutsch-Österreichische Leitlinien zur antiretroviralen Therapie der HIV-Infektion. 2014. p. 50.
13. European AIDS Clinical Society (EACS). Guidelines Version 7.1 November 2014. European Guidelines for treatment of HIV-infected adults in Europe 2014. p. 87.
14. Meixenberger K, Scheufele R, Somogyi S, Jansen K, Bartmeyer B, Dupke S, et al., editors. Pronounced potential of resistance mutations to persist in transmitted drug resistant HIV-1 strains. 12th European Workshop on HIV & Hepatitis - Treatment Strategies; 2014 2014; Barcelona 2014.
15. Parekh B, Kennedy M, Dobbs T, Pau C, Byers R, Green T, et al. Quantitative detection of increasing HIV type 1 antibodies after seroconversion: a simple assay for detecting recent HIV infection and estimating incidence. AIDS research and human retroviruses. 2002;18(4):295-307.
16. Loschen S, Baetzing-Feigenbaum J, Poggensee G, Cordes C, Hintsche B, Rausch M, et al. Comparison of the human immunodeficiency virus (HIV) type 1-specific immunoglobulin G capture enzyme-linked immunosorbent assay and the avidity index method for identification of recent HIV infections. J Clin Microbiol. 2008;46(1):341-5.

17. Calypte. AWARE™ BED™ EIA TEST 2005 [2010/5/11]. Available from: http://www.calypte.com/aware_BED.html.
18. Robert Koch-Institut. „HIV-Nennerstudie“: Online Laborbefragung zur Bestandsaufnahme der HIV-Diagnostik in Deutschland 2011. Epidemiologisches Bulletin. 2015;07(15):47-50.
19. Bennett D, Camacho R, Otelea D, Kuritzkes D, Fleury H, Kiuchi M, et al. Drug resistance mutations for surveillance of transmitted HIV-1 drug-resistance: 2009 update. PLoS One. 2009;4(3):e4724.
20. Fachgebiet HIV/AIDS und andere sexuell oder durch Blut übertragbare Infektionen (FG34), Zentrum für HIV und Retrovirologie (FG18). Surveillance inzidenter HIV Infektionen in Deutschland (InzSurv-HIV) - Zwischenbericht März 2012. Berlin: Robert Koch-Institut, 2012 15.3.2012. Report No.
21. Fachgebiet HIV/AIDS und andere sexuell oder durch Blut übertragbare Infektionen (FG34), Zentrum für HIV und Retrovirologie (FG18). Surveillance inzidenter HIV Infektionen in Deutschland (InzSurv-HIV) - Zwischenbericht März 2013. Berlin: Robert Koch-Institut, 2013 31.3.2013. Report No.
22. Bennett B, Branson B, Delaney K, Owen M, Pantella M, Werner B. HIV Testing Algorithms- A Status Report. The Association of Public Health Laboratories. 2009.
23. European Centre for Disease Prevention and Control. Monitoring recently acquired HIV infections in the European context [Technical Report]. Stockholm: European Centre for Disease Prevention and Control; 2013. Available from: <http://www.ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/monitoring-recently-acquired-HIV-infections-european-context.pdf>.
24. Hauser A, Santos-Hoeverer C, Hofmann A, Zimmermann R, Hamouda O, Bannert N, et al. Analysis of transmitted drug resistance and HIV-subtypes from dried serum spots of newly diagnosed patients in Germany: results from the study “Surveillance of incident HIV infections” in 2012. 2013.
25. Keating SM, Hanson D, Lebedeva M, Laeyendecker O, Ali-Napo NL, Owen SM, et al. Lower-sensitivity and avidity modifications of the vitros anti-HIV 1+2 assay for detection of recent HIV infections and incidence estimation. J Clin Microbiol. 2012;50(12):3968-76.
26. Masciotra S, McDougal JS, Feldman J, Sprinkle P, Wesolowski L, Owen SM. Evaluation of an alternative HIV diagnostic algorithm using specimens from seroconversion panels and persons with established HIV infections. J Clin Virol. 2011;52 Suppl 1:S17-22.
27. Masciotra S, Dobbs T, Candal D, Hanson D, Delaney K. Antibody avidity-based assay for identifying recent HIV-1 infections Based on Genetic Systems [TM] 1/2 Plus O EIA. 2010.
28. Hauser A, Santos-Hoeverer C, Meixenberger K, Zimmermann R, Somogyi S, Fiedler S, et al. Improved testing of recent HIV-1 infections with the BioRad avidity assay compared to the limiting antigen avidity assay and BED Capture enzyme immunoassay: evaluation using reference sample panels from the German Seroconverter Cohort. PLoS One. 2014;9(6):e98038.
29. Suligoi B, Rodella A, Raimondo M, Regine V, Terlenghi L, Manca N, et al. Avidity Index for anti-HIV antibodies: comparison between third- and fourth-generation automated immunoassays. J Clin Microbiol. 2011;49(7):2610-3.
30. V. Regine, M. Raimondo, A. Rodella, C. Galli, N. Manca, L. Camoni, et al. Comparison of the Avidity Index method with two 4th generation HIV assays. 2010.
31. Hauser A, Kenfack GE, Santos-Hoeverer C, Zimmermann R, Meixenberger K, Somogyi S, et al. Evaluation of a manual avidity-assay using fourth-generation commercial enzyme immunoassay (EIA). 2013.
32. Brookmeyer R, Laeyendecker O, Donnell D, Eshleman S. Cross-sectional HIV incidence estimation in HIV prevention research. J Acquir Immune Defic Syndr. 2013;63 Suppl 2:S233-9.
33. Laeyendecker O, Brookmeyer R, Cousins M, Mullis C, Konikoff J, Donnell D, et al. HIV incidence determination in the United States: a multiassay approach. J Infect Dis. 2013;207(2):232-9.

34. Hauser A, Han O, Santos-Hoevener C, Meixenberger K, Zimmermann R, Somogyi S, et al. Performance of a Multi-Assay Algorithm in Comparison with Two Serological Tests for Recent HIV-Infections. 24th Annual Meeting of the society for Virology; Alpbach, Austria 2014.
35. Hauser A, Han O, Hofmann A, Meixenberger K, Zimmermann R, Somogyi S, et al. Anwendung eines Algorithmus mit multiplen Analyten zur Ermittlung der Anzahl neuer HIV-Infektionen in Deutschland. 2014.
36. Aghaizu A, Murphy G, Tosswill J, DeAngelis D, Charlett A, Gill O, et al. Recent infection testing algorithm (RITA) applied to new HIV diagnoses in England, Wales and Northern Ireland, 2009 to 2011. *Euro Surveill.* 2014;19(2).
37. Widgren K, Skar H, Berglund T, Kling AM, Tegnell A, Albert J. Delayed HIV diagnosis common in Sweden, 2003-2010. *Scandinavian journal of infectious diseases.* 2014;46(12):862-7.
38. Semaille C, Cazein F, Lot F, Pillonel J, Le Vu S, Le Strat Y, et al. Recently acquired HIV infection in men who have sex with men (MSM) in France, 2003-2008. *Euro Surveill.* 2009;14(48).
39. K. Meixenberger, R. Scheufele, S. Somogyi, K. Jansen, B. Bartmeyer, S. Dupke, et al. Pronounced potential of resistance mutations to persist in transmitted drug resistant HIV-1 strains. 2014.
40. Parczewski M, Witak-Jedra M, Maciejewska K, Bociaga-Jasik M, Skwara P, Garlicki A, et al. Time trends in HIV-1 transmitted drug resistance mutation frequency in Poland. 2014.
41. S. Somogyi, K. Meixenberger, B. Bartmeyer, K. Jansen, R. Scheufele, S. Dupke, et al. Continued increase of the prevalence of HIV-1 non-B subtypes: Update from the German HIV 1 Seroconverter Study. 2014.
42. Mullis CE, Munshaw S, Grabowski MK, Eshleman SH, Serwadda D, Brookmeyer R, et al. Differential specificity of HIV incidence assays in HIV subtypes A and D-infected individuals from Rakai, Uganda. *AIDS research and human retroviruses.* 2013;29(8):1146-50.
43. Moyo S, LeCuyer T, Wang R, Gaseitsiwe S, Weng J, Musonda R, et al. Evaluation of the false recent classification rates of multiassay algorithms in estimating HIV type 1 subtype C incidence. *AIDS research and human retroviruses.* 2014;30(1):29-36.