

HIV-1-resistens mot antiretrovirale midler

På grunn av høy reproduksjons- og mutasjonsrate vil ulike varianter av humant immunsviktvirus 1 (HIV-1) hurtig kunne selekteres ved endringer i omgivelsene. Ved suboptimal terapi vil resistente virus selekteres, og resultatet blir da terapivikt.

Ved Haukeland Sykehus har vi utført genotypisk resistensbestemmelse av HIV-1 siden høsten 1998. I perioden august 1998 til april 2001 ble til sammen 183 prøver fra 152 pasienter undersøkt.

Resistensmutasjoner ble påvist hos 112 behandlede pasienter. Pasienter behandlet med enzymhemmere har hyppigst resistensmutasjoner i genet som koder for revers transkriptase, men mutasjoner forenlig med resistens mot proteasehemmere er også vanlig. Hos et flertall av pasientene med seponert behandling kunne det ikke påvises resistensrelaterte mutasjoner. Mutasjoner assosiert med nedsatt medikamentell følsomhet eller polymorfisme ble påvist hos 22 ubehandlede pasienter. Tre av åtte pasienter som var smittet de siste to år hadde mutasjoner assosiert med resistens mot anti-HIV-1-medisiner.

Ved behandlingssvikt utføres resistensundersøkelse for å vurdere endret medisiner, utelukke sviktende etterlevelse og for å avbryte en tøff og kostbar behandling med uttalte bivirkninger dersom behandlingssvikt er forårsaket av multiresistens og det ikke finnes alternative medisiner å bytte til. Det er også hensiktsmessig å utføre genotypisk resistensundersøkelse for å overvåke spredningen av resistente virus hos nylig smittede pasienter.

I 1983 ble det klart at humant immunsvikt-virus (HIV) var det etiologiske agens ved ervervet immunsviktsyndrom (AIDS), en sykdom som første gang ble beskrevet i 1981. Siden den gang har infeksjon med HIV-1 vokst til en pandemi, og i underkant av 40 millioner mennesker anslås nå å leve med HIV-1-infeksjon.

Resultater fra kliniske og molekylærepidemiologiske undersøkelser tyder på at HIV-1 har oppstått relativt sent i evolusjo-

Birgitta Åsjo
birgitta.asjo@vir.uib.no

Elling Ulvestad

Avdeling for mikrobiologi og immunologi,
Gades Institutt
Haukeland Sykehus
5021 Bergen

Åsjo B, Ulvestad E.

HIV-1 resistance to antiretroviral drugs.

Tidsskr Nor Lægeforen 2001; 121: 3421–4.

Background. Failure of antiretroviral drugs to completely suppress HIV-1 replication inevitably leads to selection of drug-resistant variants. Emergence of drug resistance plays a major role in limiting the long-term success of antiretroviral therapy.

Material and methods. From August 1998 until April 2001, a total of 183 samples from 152 patients were analysed for HIV-1 drug resistance using genotypic analysis.

Results. Mutations associated with resistance were found in virus from 112 patients who received antiretroviral therapy. Mutations were frequently identified in the reverse transcriptase gene and to a lesser extent in the protease gene. Mutations associated with reduced drug susceptibility or polymorphisms were identified in 22 treatment naive patients. In addition, resistance mutations were observed in three out of eight patients with a recent infection.

Interpretation. Genotypic resistance testing is a valuable tool for rational decision-making when the current therapy is failing. In addition, patients with a recent HIV-1 infection should be tested for the surveillance of transmission of drug-resistant genotypic variants.

☞ Se også side 3363

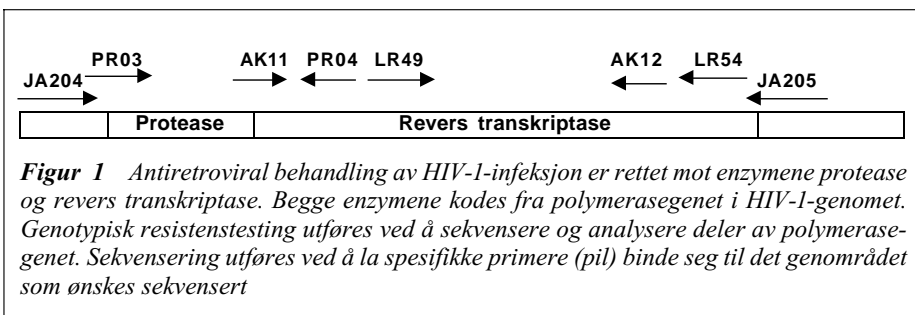
nen, sannsynligvis som følge av at et nærbeslektet apevirus (SIV) krysset artsbarrieren mellom sjimpanse og menneske en gang før 1930 (1). Det er sannsynlig at smitte av virus fra ape til menneske har skjedd ved en rekke anledninger, men siden virus ikke så lett krysser artsbarrierer, har trolig de fleste virusoverføringer resultert i abortive infeksjoner. Det er også mulig at infeksjoner i isolerte landsbyer «døde ut» på grunn av vel bevart familiestruktur med lite partnerbytte og dermed liten spredningsmulighet for virus. Fylogenetiske studier tyder på at vellykkede virusoverføringer fra ape til menneske har funnet sted ved minst tre anledninger, representert ved HIV-1-subgruppene M, O og N. HIV-1-epidemien er således å betrakte som en blanding av flere epidemier.

HIV-1-genomet består av to enkelttrådede RNA-molekyler på ca. 9,2 kilobaser. Det er stor genetisk variasjon i HIV-1-genomet, ikke bare fra pasient til pasient, men også hos den enkelte pasient. Denne genetiske variasjonen skyldes blant annet at enzymet revers transkriptase, som kopierer HIV-RNA til DNA, ikke korrigerer feil som oppstår under DNA-syntesen. Mutasjonsfrekvensen ved den reverse transkripsjonen er beregnet til ca. én substitusjon per virusgenom per replikasjonsyklus. Variasjonen forsterkes ved den hurtige produksjonen av nye viruspartikler. Det produseres opp mot 10^{10} viruspartikler per dag (2). Selv om ikke alle mutasjoner gir opphav til viable virus, vil det hos hver enkelt pasient utvikles en «underskog» av virusvarianter, kalt kvasispesies. Som hos andre arter er det genetisk variabilitet og påfølgende seleksjon for de best tilpassede variantene som fører til evolusjon av HIV-1. Immunsystemets cytotoksiske T-celler og spesifikke antistoffer vil være betydelige seleksjonsfaktorer for HIV-1-variabilitet hos den enkelte pasient.

Utvikling av resistens og behandlingssvikt

Prognosen for pasienter med ubehandlet HIV-1-infeksjon er dårlig, med høy sykkelighet og dødelighet. De første behandlingsforsøkene ved HIV-1-infeksjon, monoterapi med zidovudin, ble satt i gang allerede i slutten av 1980-årene, men terapien førte relativt raskt til oppkomst av resistente virus. Etter at en mer effektiv antiretroviral kombinasjonsbehandling ble innført for drøyt fem år siden, har livssituasjon og prognose bedret seg betraktelig, og antall AIDS-tilfeller og sykehusinnleggelses har vist en dramatisk reduksjon. Behandlingen eliminerer ikke virus, men kan effektivt redusere produksjonen av nye viruspartikler. Virusmengden i blodplasma synker dermed til ikke-påvisbare nivåer, immunsystemet blir delvis restituert, antall CD4-positive T-celler i blodet stiger og pasientens immunsvikt reverseres. Når behandlingen fungerer og pasientene tåler medisiner, kan de leve et nesten normalt liv.

I Norge er det mellom 1 600 og 1 700 personer som lever med HIV-1-infeksjon (3). Trolig har et flertall av disse pasientene fått tilbud om behandling. Behandling av HIV-1-infeksjon retter seg mot to av virusets essensielle enzymer, revers transkriptase og protease. Behandlingen betegnes som HAART, et engelsk akronym for «highly ac-



tive antiretroviral therapy», og består vanligvis av at pasienten tar en kombinasjon av tre til fire ulike medikamenter flere ganger daglig. Monoterapi favoriserer utvikling av resistente kvasispecies, mens kombinasjonsbehandling rettet mot både revers transkriptase og protease kan holde replikasjonen så lav at risikoen for å utvikle resistens minker.

Som følge av den høye mutasjons- og replikasjonsfrekvensen av HIV-1 skjer mutasjoner spontant og tilfeldig og uavhengig av medikamentell behandling, noe som betyr at det kan finnes resistente virusvarianter i individet allerede før behandlingen har begynt. De muterte enzymene i resistente virus har ofte dårligere enzymatisk funksjon enn enzym i villtypevirus. Skal resistente virus overleve, må det derfor finnes et miljø som fremmer resistente virus på bekostning av virus som er følsomme for medisinene. Resistente virus har oftest lavere potensial for overlevelse (fitness) og klarer seg dårligere i konkurransen med villtypevirus i fravær av det selektive trykket fra medikamentene. Det betyr at når behandlingen slutter, kommer det følsomme villtypeviruset tilbake. Man har da mulighet til å bytte til en annen medisinkombinasjon om man kjenner til hvilke mutasjoner som er oppstått.

Resistensbestemmelse

For å kunne tilby optimal behandling er det nødvendig å resistensbestemme HIV-1 ved behandlingssvikt. En ytterligere grunn til resistensundersøkelse er at behandlingssvikt hos pasientene ikke alltid skyldes at virus er blitt resistent. Medisineringen er svært krevende. Ofte innebærer HAART et stort antall tabletter som skal tas ved bestemte tidspunkter. På grunn av bivirkninger kan etterlevelse være et stort problem. Suboptimale medikamentkonsentrasjoner kan også skyldes nedsatt absorpsjon eller ulikheter i leverenzymaktivitet slik at medisinene metaboliseres raskere. Med resistensundersøkelse kan man relativt raskt få svar på om det som oppfattes som sviktende behandlingseffekt, skyldes forekomst av resistensmutasjoner hos pasientens virus.

For bestemmelse av HIV-1-resistens benyttes det to ulike teknikker. Ved fenotypisk resistensundersøkelse analyseres om pasientens virus har evnen til å formere seg i nærvær av ulike konsentrasjoner av anti-

HIV-1-medikamenter. Metoden er teknisk komplisert, foregår i cellekultur, krever sikkerhetslaboratorium, tar lang tid å utføre og er kostbar. Den utføres ennå ikke i Norge.

Ved genotypisk resistensundersøkelse isoleres først HIV-1-RNA fra pasientens plasma. HIV-1-RNA danner så utgangspunkt for tre ulike polymeriseringsreaksjoner. I den første reaksjonen foretas en revers transkripsjon der en stor del av virusets polymerasegenet kopieres fra RNA til DNA. Polymerasegenet undersøkes fordi det koder for enzymene protease og revers transkriptase. I den andre reaksjonen, en polymerasekjedereaksjon (PCR), amplifiseres polymerasegenets DNA. Til slutt utføres en eller flere sekvenserings-PCR-er med basis i produktet fra amplifikasjons-PCR, for å fastslå nukleotidsekvensen og aminosyreskvensen i polymerasegenet (fig 1). Aminosyreskvensen fra pasientens virus sammenliknes deretter med aminosyreskvensen fra et såkalt villtypevirus for å kunne identifisere eventuelle mutasjoner som er funnet å være assosiert med resistens mot bestemte antiretrovirale midler (fig 2).

Både fenotypisk og genotypisk testing av resistens er forbundet med store metodologiske problemer. Sensitiviteten kan være et problem ved for lavt nivå av virus i plasma eller når mutanten representerer for lav andel av pasientens kvasispecies. For å få et reelt bilde av virusets resistensmønster er det derfor viktig at pasientene tar den aktuelle medisineringen på undersøkelsestidspunktet.

En ulempe med den genotypiske analysen er at det er vanskelig å avgjøre om de identifiserte mutasjonene finnes i en og samme viruspartikkel eller om de er fordelt på ulike viruspartikler. I tillegg kan mange mutasjoner som ikke fører til resistens påvises. Det er kun mutasjoner som fører til aminosyre-substitusjon som kan bidra til medikamentell resistens. Enkelte aminosyre-substitusjoner har ingen relasjon til medikamentell seleksjon, og betegnes som naturlig polymorfisme. Disse kan likevel bidra til å øke resistensen ved samtidig tilstedeværelse av andre mutasjoner i samme enzym. Hvilken aminosyre som substitueres i forhold til villtypevirusets aminosyre, har stor betydning for grad og spesifisitet av medikamentell resistens.

Egne metodiske erfaringer

Siden høsten 1998 har Avdeling for mikrobiologi og immunologi, Gades Institutt, som eneste laboratorium i Norge rutinemessig analysert HIV-1 for mutasjoner assosiert med medikamentell resistens. Vi har brukt publiserte primere og PCR-analysebetingelser (4, 5), men har også hatt tilgang til primere som ennå ikke er publisert (fra Jan Albert og Anders Sønnerborg, Huddinge Sjukhus, Stockholm). Som grunnlag for karakterisering av resistensmutasjoner har vi laget en algoritme basert på databaser koblet opp mot Los Alamos og Stanford University (6, 7). I disse databasene er de viktigste mutasjoner assosiert med HIV-1-medikamentell resistens lagt inn.

Det faktum at HIV-1 finnes i mange varianter hos hvert enkelt individ, stiller store krav til de primere som anvendes i det første RT-PCR-oppsettet, der virus-RNA fra plasma anvendes som substrat. Vår erfaring er at ca. 20 % av prøvene ikke gir produkt ved første forsøk og at de dermed må reanalyseres. Det andre polymeriseringsstrinnet, der DNA amplifiseres, er relativt uproblematisk, men sekvenserings-PCR-trinnet er forbundet med problemer på grunn av virusets variabilitet. Nærmere 20 % av pasientprøvene har derfor måttet sekvenseres 2–5 ganger for å få lesbare sekvenser. Dette skyldes blant annet at vi i vår metode initialt analyserer to lange delvis overlappende sekvenser som derpå bearbeides manuelt. I motsetning til dette genererer de kommersielt tilgjengelige sekvenseringsmetodene 6–7 delvis overlappende sekvenser som analyseres i spesielle dataprogrammer. Dermed er det større sannsynlighet for å få gyldige sekvenser i første oppsett og man slipper resekvensering. For å øke servicen og for å effektivisere resistensanalysene har vi fra mai 2001 derfor valgt å bytte ut vår egenutviklede metode med ViroSeq1 fra Applied Biosystems. Dette er en standardisert og kvalitetssikret metode som også brukes i en rekke andre land.

Resultat og diskusjon

I perioden august 1998 til april 2001 analyserte vi til sammen 183 prøver fra 152 pasienter. Av disse var det 128 pasienter som fikk behandling eller som hadde avsluttet behandling av ulike grunner. Hos et flertall av pasientene med seponert behandling kunne det ikke påvises resistensrelaterte mutasjoner. Figur 3 viser fordelingen av de mutasjoner som er forenlige med høy og middels/medvirkende resistens overfor medikamenter mot revers transkriptase og protease. Mutasjoner som er forenlige med høygradig resistens mot proteasehemmere (posisjon 82 og 90) er relativt vanlig forekommende. Mutasjon 84, som er forenlig med kryssresistens mot de fleste proteasehemmere, er bare representert med sju tilfeller i vårt materiale. Fordelingen av resistensmutasjoner i revers transkriptase er forenlig med at mange pa-

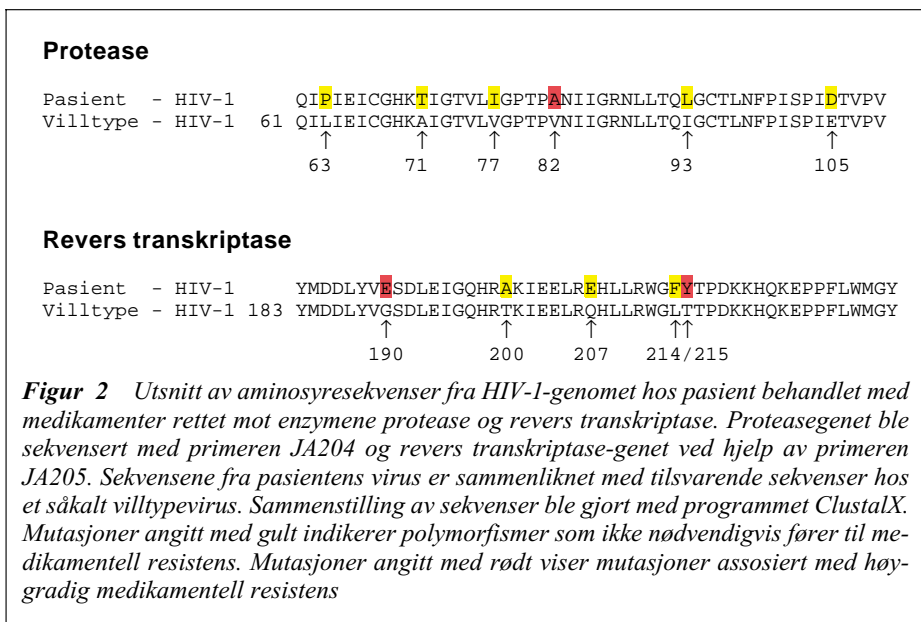
sienter har vært behandlet med nukleosid-analogene zidovudin og lamivudin (mutasjoner 69, 70, 184, 215), mens ikke-nukleosidanaloger som nevirapin og efavirenz ikke anvendes i like stor grad (mutasjoner 100, 103, 106, 181, 190).

I behandlingssammenheng er det viktig å vite om forekomsten av eventuelle resistensmutasjoner hos pasientens virus vil påvirke behandlingsresultatet, og eventuelt hvor hyppig slike mutasjoner forekommer. Det er også viktig å få informasjon om det er spredning av resistente virus blant nysmittede, med tanke på hvilke konsekvenser dette kan få for fremtidige behandlingsmuligheter. I vårt materiale ble det påvist resistensmutasjoner i virus fra tre nylig smittede pasienter, mens fem andre nylig infiserte og 22 ubehandlede pasienter med lengre tids infeksjon hadde villtypevirus eller mutasjoner som kan assosieres med nedsatt medikamentell følsomhet. Pasientene med nylig smitte hadde mutasjoner assosiert med resistens mot zidovudin og proteasehemmere og en mutasjon assosiert med bruk av ikke-nukleosidanaloger. Resistensmønsteret hos smittekil-dene er ikke kjent (Vidar Ormaasen og Dag Kvale, Ullevål sykehus, Oslo, personlig meddelelse). At tre av åtte pasienter som var smittet de siste to årene har virus med resistensassosierte mutasjoner, betyr ikke nødvendigvis utstrakt spredning av slike virus, men understreker betydningen av å undersøke for resistens hos nylig smittede pasienter. Hos virus fra enkelte pasienter forekom forandringer som ble oppfattet som naturlig polymorfisme, og for 14 pasienter med slike virusforandringer hadde dette ingen betydning for behandlingen, da samtlige pasienter fikk den forventede reduksjonen av virus i plasma (8).

Avslutning

Unnvikelse av immunsystemet og resistensutvikling er to sider av samme evolusjonære prosess, og skyldes den høye reproduksjons- og mutasjonsraten av HIV-1. Til tross for utvikling av nye antiretrovirale medikamenter kommer resistensproblematikken til å vedvare. Selv om behandlingsmålet er satt til HIV-RNA < 50 kopier/ml vil nok mange klinikere oppleve dette kravet som relativt strengt, all den tid mange pasienter med påvisbart HIV-1-RNA i plasma likevel vil respondere på HAART med økning av CD4-tall og bedring av immunstatus.

Erfaringer fra flere studier har vist at resistenstesting er kostnadseffektivt (9, 10). Resistenstesting gir behandlende lege bedre mulighet til å avgjøre hvilke medikamenter viruset har utviklet resistens mot og hvilke midler som sannsynligvis er virksomme. Man skal heller ikke utelukke at det er manglende etterlevelse og ikke resistens som er årsaken til pasientens høye HIV-1-RNA-verdier i plasma. Genotypisk resistensbestemmelse er også hensiktsmessig å utføre dersom pasienten på bakgrunn av kli-



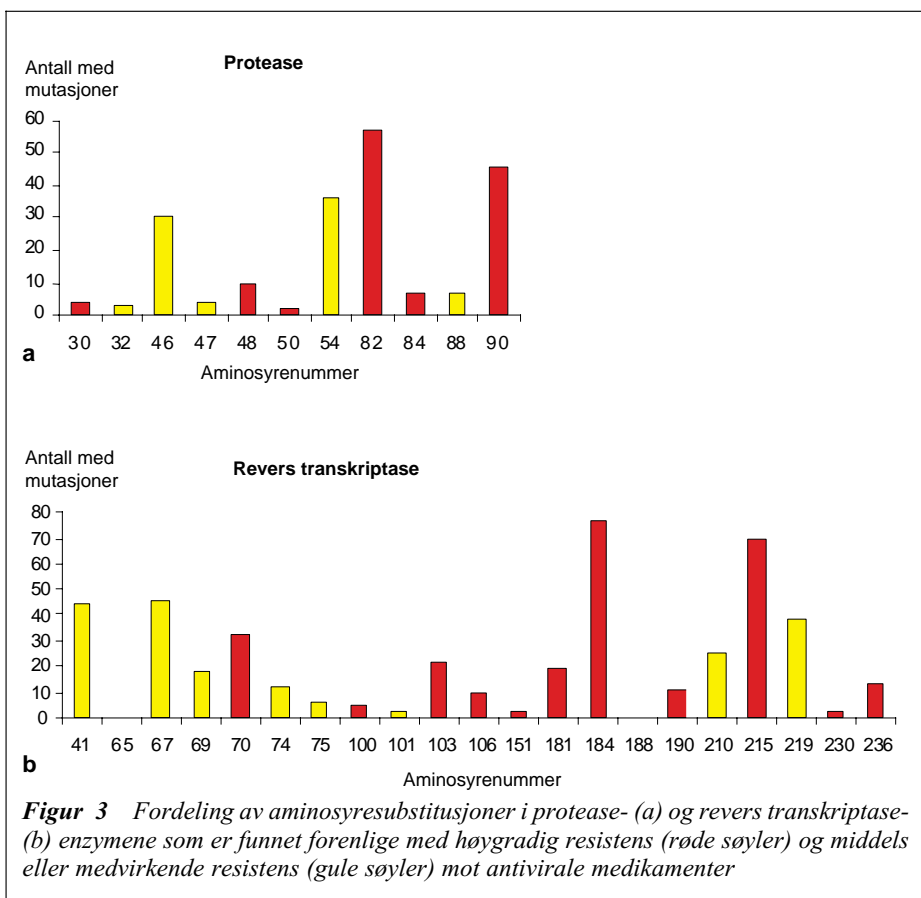
Figur 2 Utsnitt av aminosyresekvenser fra HIV-1-genomet hos pasient behandlet med medikamenter rettet mot enzymene protease og revers transkriptase. Proteasegenet ble sekvensert med primeren JA204 og revers transkriptase-genet ved hjelp av primeren JA205. Sekvensene fra pasientens virus er sammenliknet med tilsvarende sekvenser hos et såkalt villtypevirus. Sammenstilling av sekvenser ble gjort med programmet ClustalX. Mutasjoner angitt med gult indikerer polymorfismer som ikke nødvendigvis fører til medikamentell resistens. Mutasjoner angitt med rødt viser mutasjoner assosiert med høygradig medikamentell resistens

nisk observasjon antas å ha multiresistente virus. Dersom det ikke finnes passende medisiner å bytte til, kan det være aktuelt å avbryte en kostbar og plagsom behandling. Alternativt, dersom viruset er multiresistent, men pasienten tåler behandlingen, kan det være bedre å fortsette medisineringsen. Det er fordi et kraftig mutert virus som regel har lavere overlevelsespotensial enn villtype-

viruset har i fravær av medikament, slik at mengden virus i plasma dermed kan holde seg på moderate nivåer.

Vi takker Helge Myrnel, Vidar Ormaasen, Randi Monsen Nygaard, Eva Bernhoff, Christine Gjerdrum og Ole Gorm Berg for nyttig assistanse og diskusjon.

Litteratur →



Figur 3 Fordeling av aminosyresubstitusjoner i protease- (a) og revers transkriptase- (b) enzymene som er funnet forenlige med høygradig resistens (røde søyler) og middels eller medvirkende resistens (gule søyler) mot antivirale medikamenter

→

Litteratur

1. Korber B, Muldoon M, Theiler J, Gao F, Gupta R, Lapedes A et al. Timing the ancestor of the HIV-1 pandemic strains. *Science* 2000; 288: 1789–96.
2. Perelson AS, Neumann AU, Markowitz M, Leonard JM, Ho DD. HIV-1 dynamics in vivo: viron clearance rate, infected cell life-span, and viral generation time. *Science* 1996; 271: 1582–6.
3. Nilsen Ø, Aavitsland P. HIV-situasjonen i Norge per 31. desember 2000. MSIS-rapport 2001; 29: 10.
4. Birk M, Sönnnerborg A. Variations in HIV-1 pol gene associated with reduced sensitivity to antiretroviral drugs in treatment-naïve patients. *AIDS* 1998; 12: 2369–75.
5. Zazzi M, Riccio ML, Venturi G, Catucci M, Romano L, De Milito A et al. Long-read direct infrared sequencing of crude PCR products for prediction of resistance to HIV-1 reverse transcriptase and protease inhibitors. *Mol Biotechnol* 1998; 10: 1–8.
6. <http://hiv-web.lanl.gov/> (22.5.2001).
7. <http://hivdb.stanford.edu/hiv/Notes.pl> (22.5.2001).
8. Dyrhol-Riise AM, Voltersvik P, Berg OG, Olofsson J, Kleivbo S, Åsjö B. Residual human immunodeficiency virus type 1 infection in lymphoid tissue during highly active antiretroviral therapy: quantitation and virus characterization. *AIDS Res Hum Retrov* 2001; 17: 577–86.
9. Saag MS. HIV resistance testing in clinical practice: a QALY-fied success. *Ann Intern Med* 2001; 134: 475–77.
10. Weinstein MC, Goldie SJ, Losina E, Cohen CJ, Baxter JD, Zhang H et al. Use of genotypic resistance testing to guide HIV therapy: clinical impact and cost-effectiveness. *Ann Intern Med* 2001; 134: 440–50.

○

Annonse

Bokomtaler



3356 Kumar L
Djulaha!

3441 Balint M
**The doctor, his patient
and the illness**

3442 Frølich S
Kroniske smerter

3442 Larsen R, Larsen ÅMW
Mine oppskrifter

3442 Dudenhausen JW,
Pschyrembel W
**Praktische Geburtshilfe mit
geburtshilfflichen Operationen**

3390 Børli H
Samlede dikt

