



Myndigheten för
samhällsskydd
och beredskap

Förbättrad bekämpning av HIV resistens i Afrika och Sverige

Professor Anders Sönnernborg

FORSKNING

MSB:s kontaktpersoner:
Sara Brunberg 010-240 4087

Publikationsnummer: MSB1000 - april 2016

Förord

Humant immunbrist virus typ 1 (HIV-1) infektion orsakar obehandlad grav immunbrist (AIDS) och död hos alla infekterade efter i medeltal 10-12 år. Modern HIV behandling har kraftigt minskat dödlighet och sjuklighet i Sverige. Sedan mitten av 2000-talet har behandlingen även använts i Afrika med framgång men resistens-utveckling mot läkemedlen är ett hot. Läkemedelsresistens uppstår hos patienter som tar sina läkemedel på eftersträvat sätt men kan också överföras till nysmittade. Det aktuella projektet har haft som ambition att kartlägga resistens-situationen i Tanzania och Etiopien, att studera import av resistent virus till Sverige, att utbilda partners från Afrika samt implementera nya tekniker för att bättre kunna följa resistens-utvecklingen.

Innehållsförteckning

1.1 Hur behandlas patienterna i Östafrika?.....	6
1.2 Läkemedelsresistens vid HIV behandling	6
1.3 HIV situationen i Sverige	7
1.4 Metoder för att mäta HIV resistens	7
2.1 Patientmaterial som analyserats.....	8
2.2 Metoder som använts	8
3.1 Resultat och Diskussion	8

Sammanfattning

Bakgrund

Behandlingen mot humant immunbrist virus type 1 (HIV-1) har kraftigt minskat dödligheten. Sedan 2000-talet har HIV behandling introducerats i större skala i Afrika med stora framgångar. Läkemedelsresistensutveckling hotar dock framstegen, dels hos de behandlade dels genom smitta till nya personer. Metoderna att hitta resistens kräver avancerade laboratorier varför resistenstestning inte används i Afrika förutom vid vetenskapliga studier.

Målsättning

Att utveckla nya metoder för läkemedelsresistens mot HIV-1 och att analysera prover från HIV-1 infekterade patienter boende i Östafrika samt migranter till Sverige för att få en bättre uppfattning om situationen samt om läkemedelsresistens och nya virusstammar införs i Sverige från Östafrika.

Metoder

Partners i Östafrika utbildades i resistenstestning. Metodik etablerades så att de första stegen görs lokalt för att senare skickas vidare, s.k ”split procedure”. Även andra metoder för resistensbestämning utvecklades inklusive en förenklad och kostnadseffektiv men avancerad storskalig resistens-diagnostik baserad på ”next generation sequencing” (NGS).

Resultat

”Split procedure” är en framkomlig väg för att öka övervakningen av resistensituationen i Afrika. Ett stort framsteg är vår kostnads-effektiva metod som analyserar ett stort antal poolade prover med modern NGS. En ansevärd andel tanzaniska patienter som bedömdes ha behandlingsvikt i rutinvården hade inte detta och fick därmed felaktigt ny behandling. Hos de som verkligen hade behandlingsvikt förelåg en grav resistensbild. Vår analys med känsligare metoder visar att resistens återfinns hos migranter från Östafrika, liksom hos svenskar smittade i Sverige, trots att standard-metoder visar känsligt virus. Vi fann även att HIV-1 varianten subtyp B nu inte längre dominerar i Sverige utan har ersatts av andra subtyper och rekombinanter som är vanliga i Afrika.

Slutsats

Det är av allt större vikt att följa förekomsten av HIV läkemedelsresistens med nya känsligare metoder hos patienter som nydiagnostiseras för att få en mer korrekt bild av resistens-situationen både i Afrika och i Sverige. Dessa metoder bör också användas för att följa förändringen av sammansättningen av HIV varianter som cirkulerar i Sverige där en drastisk förändring har skett med ett helt nytt spektrum av HIV varianter.

1. HIV i Öst-afrika och i Sverige

1.1 Hur behandlas patienterna i Östafrika?

HIV behandlingen i Östafrika följer WHO guidelines från 2013 som är baserade på en standardiserad folkhälsostrategi snarare än en individualiserad behandling. Behandlingen startas med kombinationen två st nukleosidanaloger (NRTI) och 1 st non-nukleosidanalog (NNRTI). Effekten följs genom regelbundna besök där det kliniska förloppet studeras, enklare biokemiska blodprover tas och en mätning av en immunförsvars-cell benämnd CD4+ T-cell utförs. Dock utförs mätning av virusnivåer sällan då det är kostsamt och kräver speciell utrustning trots att WHO rekommenderar detta. Om antalet CD4+ T-celler sjunker så bedöms att en terapivikt föreligger och ett byte av behandling övervägs efter att följsamheten till behandlingen utvärderats. Då antalet läkemedel är begränsat sker bytet oftast till 2 st NRTI och en proteas-hämmare.

1.2 Läkemedelsresistens vid HIV behandling

Om HIV behandlingen fungerar väl uppstår inte resistens mot HIV läkemedel. Däremot finns det stor risk för att resistens uppstår om patienten inte tar läkemedlen som föreskrivet. Resistensen uppstår genom mutationer i virusets arvsmassa som kan hittas genom att kartlägga arvsmassan genom sekvensering eller andra molekylärbiologiska metoder, s.k. genotypiska metoder. Ett annat sätt att mäta resistens är s.k. fenotypiska metoder där viruset får växa på celler i närvaro av olika koncentrationer av läkemedlen. Denna metod är dock mycket dyr och arbetskrävande.

I höginkomstländer följs behandlingseffekten genom mätning av virusmängd i blodplasma förutom mätning av immunförsvaret. På detta vis upptäcks tidigt om viruset kommer tillbaka under behandling och åtgärder kan vidtagas. Därmed förhindras att resistens uppstår eller så blir resistensen inte sällan mer begränsad varvid andra HIV läkemedel oftast har effekt. I låg- och medelinkomstländer så följs oftast behandlingseffekten inte med virusmätning utan med mätning av antalet CD4+ T-celler. Detta innebär att terapivikt oftast upptäcks senare och en mer uttalad resistens kan ha uppträtt. I dessa länder så utförs inte resistenstestning då det är för dyrt och laboratorierna har inte den kapaciteten. Strategin är att istället utföra analyser på selekterade grupper av patienter för att få en uppfattning om resistenssituationen i ett land. Oftast har dock endast fåtal analyser utförts på patienter som sviktat på behandling. Inte heller utförs analyser i större skala av nysmittade individer och därmed minskas möjligheten att se om spridning av resistent virus förekommer.

I Östafrikanska länder såsom Tanzania och Etiopien finns mycket begränsad kunskap om hur resistenssituationen har utvecklats. Dock har WHO utfört mätning i Afrika och andra låg-medelinkomstländer och funnit att andelen patienter som utvecklar resistens ökar liksom spridningen av resistent virus till

nyinfekterade personer. Detta är en hotbild mot de framgångar som hittills nåtts.

1.3 HIV situationen i Sverige

Första fallet av HIV i Sverige diagnostiserades 1983 men vi vet att epidemin började 1979. Under de första 15 åren dominerade smitta mellan män som har sex med män och det fanns även ett större utbrott av HIV spridning bland intravenösa narkotikamissbrukare. Efterhand har andelen heterosexuellt smittade ökat och detta har till stor del skett via migration av HIV smittade personer till Sverige. För närvarande utgör andelen av migranter bland nydiagnostiserade över 50%. Denna globala migration innebär att HIV stammar som finns i vissa geografiska regioner kan överföras och blandas med stammar som finns i andra regioner i världen.

Behandlingseffekten i Sverige är mycket god där över 90% av patienterna når en optimal behandlingseffekt, d.v.s viruset kan inte upptäckas i blodet under behandlingen. Resistenssituationen som var allvarlig i Sverige under 1990-talet och början av 2000-talet har förbättrats markant och allvarlig resistens förekommer numera sällan bland HIV patienter som bor i Sverige. Då resistent HIV också kan smitta har forskare i Sverige följt denna utveckling sedan länge och förekomst av smitta hos nydiagnostiserade har konstant varit låg och legat mellan 0% upp till ca 4%, även om enstaka år haft högre siffror. Detta har varit lugnande då det annars finns risk att HIV behandlingen fungerar sämre hos de personer som smittats med resistent HIV.

1.4 Metoder för att mäta HIV resistens

Det vanligaste sättet att mäta resistens är genom sekvensering av delar av HIVs ner till 20% av hela viruspopulationen beskrivas. Denna metod omfattar flera steg. RNA formen av HIV ska först extraheras från blodplasma. RNA ska sedan omvandlas till HIV cDNA med hjälp av PCR varefter HIVs arvsmassa kartläggs med sekvenseringen. Man får då en sekvens av nukleotider som måste jämföras med ett prototypvirus för att se om det finns mutationer som är kända för att orsaka resistens. Denna jämförelse kräver en viss bioinformatisk kompetens. Direkt sekvenseringsmetoden är dyr och kräver specialiserade laboratorier. Dessutom kan resistent virus-varianter förekomma bland de som utgör mindre än 20% av viruspopulationen utan att de upptäcks.

Under de senaste åren har en mer känslig och tekniskt ännu mer avancerad metod för genotypisk resistensbestämning utvecklats – ”next generation sequencing” (NGS). Med denna metod kan resistent virus-varianter upptäckas som utgör endast någon enstaka procent av viruspopulationen. Metoden är dock mycket dyr om varje patientprov analyseras separat och därmed inte användbar för annat än specifika vetenskapliga studier.

2.1 Patientmaterial som analyserats

I den aktuella studien har blodprover från följande patienter analyserats: i) patienter från universitetssjukhuset Muhumbili, Dar-es-Salaam, Tanzania; ii) etiopiska patienter från sju st sjukhus associerade med etiopiska universitet, från alla delar av Etiopien; iii) nydiagnostiserade patienter vid Infektionskliniken, Karolinska Universitetssjukhuset, Stockholm. Dessa patienter har infekterats både i Sverige eller innan ankomst till Sverige i Östafrika.

2.2 Metoder som använts

- i) Mängden HIV RNA i blodplasma har bestämts med kvantitativ PCR
- ii) Antalet CD4+ T-celler i perifert blod har bestämts med flödescytometri.
- iii) Läkemedelsresistens har bestämts med direktsekvensering av HIVs pol-gen
- iv) Läkemedelsresistens har bestämts med NGS efter att ha poolat 24 patientprover för att öka kapaciteten.

3.1 Resultat och Diskussion

Vi har utvecklat och testat "split procedure". Denna procedur innebär att våra afrikanska partners har fått lära sig de första stegen av resistensbestämning, nämligen att extrahera HIV RNA från blodplasma, att konvertera detta till cDNA med hjälp av det s.k. omvända transkriptaset ("RT-reaktion) och därefter ökad mängden av HIV DNA med hjälp av metoden. På detta viset skapade stor mängd icke-infektiöst HIV DNA som skickades med post till Karolinska. Därefter sekvenserades virusets DNA. Den virussekvens som erhöles kan därefter skickas elektroniskt till Afrika där den afrikanska partners gör en bioinformatisk analys med hjälp av vanlig dator och gratis hjälpprogram. På detta viset kunde ett större antal prover sekvenseras utan att blodproverna behövde skickas. En initial utvärdering visade mycket god överensstämmelse mellan resultaten från denna procedur och när blodproverna hade skickats till Sverige.

Rutinvården i Tanzania använder klinisk bedömning och mätning av CD4+ T-celler för att avgöra om en patient har behandlingsvikt eller inte. Ett större antal patienter rekryterades till studien. Dock misslyckades vi att sekvensera en signifikant mängd prover. Vi sökte då kvantifiera HIV i blodplasma hos dessa patienter. Det visade sig att ett flertal patienter hade ingen virologisk behandlingsvikt och den tanzaniska sjukvården hade felaktigt tolkat situationen som sådan och därmed bytt behandling i onödan. Hos de patienter där vi lyckades sekvensera viruset förelåg en grav resistens mot de flesta tillgängliga läkemedel. Våra data visar sålunda dels att dagens metodik att identifiera behandlingsvikt i Afrika där virusmätning inte ingår rutinmässigt leder en stor mängd felaktiga behandlingsbyten dels att patienter som verkligen har behandlingsvikt upptäcks sent och har då en grav

läkemedelresistens. I vår studie kunde vi också upptäcka att ett fåtal patienter som för första gången skulle behandlas hade ett resistent virus. Detta kan tyda på att spridning av resistent virus håller på att ske i Tanzania.

Motsvarande analyser i Etiopien visade likaledes en begynnande spridning av resistent virus till nysmittade, 6% i vår studie. Efter 6 månaders behandling hade 72% av patienterna icke-detekterbart virus medan resten var döda, försvunna eller hade behandlingsvikt. Bland de som hade behandlingsvikt förelåg hos de flesta en multiresistens mot både NRTI och NNRTI preparat vilket gör att behandlingsalternativen vid ett byte av behandling är begränsade. Vid 12 månader hade endast 52% av patienterna behandlingsframgång mätt som icke-detekterbart virus. Resten var döda, försvunna eller hade behandlingsvikt. Även här var resistensmönstret avancerat hos de flesta patienterna.

Då migranter utgör mer än 50% av nydiagnostiserade i Sverige och migranter från Östafrika utgör en stor grupp analyserade vi nydiagnostiserade migranter med HIV och jämförde med personer som blivit smittade i Sverige. Vanlig rutinmässig direkt sekvenserig utförs idag hos alla patienter som nydiagnostiseras i Sverige. Med denna metod fann vi att knappt 5% av migranterna var smittade med resistent virus. Vi analyserade dock deras blod med känsligare metoder, både s.k. allele-specifik PCR och med NGS. Förekomsten av resistent virus ökade då markant upp till cirka knappt 10%. Våra data visar sålunda att en signifikant andel av migranter, cirka dubbel så stor grupp som personer smittade i Sverige, har resistent virus vid ankomst till Sverige. Detta innebär en uppenbar risk att den behandling som rekommenderas som första linjens behandling i Sverige inte kommer att fungera fullt ut och det finns därmed en risk att den goda behandlingsframgång vi har i Sverige kan minska.

För att kunna utföra större studier av smitta med resistent virus utvecklade vi en enkel och kostnadsfri metod för sekvensering med hjälp av NGS. Vår strategi var att poola 24 prover till kostnad av 1 prov. Vid jämförelse med allele-specifik PCR befanns metoden vara minst lika känslig. Vid jämförelse med den rutinmetod som används i Sverige befanns vår NGS metod vara avsevärt känsligare och fler patienter infekterade med resistent virus kunde på detta viset upptäckas. Vår bedömning är att vi kan komma att öka antalet prover som analyseras samtidigt till 48 varvid kostnaden kommer att minska ytterligare.

De data som erhålls genom resistensbestämning kan också användas för att studera vilka HIV-stammar som sprids i Sverige. Genom att vi analyserade ca 60% av alla patienter från 80-talet till 2013 kunde vi konstatera att den HIV stam som tidigare dominerat i Sverige, HIV-1 subtype B, inte längre dominerar. Istället dominerar nu andra HIV-1 subtyper och s.k. cirkulerande rekombinanta former och även unika rekombinanta former (d.v.s varianter av HIV som aldrig tidigare beskrivits) i Sverige. Den genetiska heterogeneiteten av HIV i Sverige idag ligger på samma nivå som i Afrika och Sverige är ett av de länder i världen som har flest varianter av HIV cirkulerande. Detta är av stor vikt att följa då det fortfarande är oklart om olika HIV varianter kan variera i smittsamhet och sjukdomsalstrande förmåga.

