



UvA-DARE (Digital Academic Repository)

Towards virological monitoring of HIV-1 drug resistance in resource-limited settings

Aitken, S.C.

Publication date
2014

[Link to publication](#)

Citation for published version (APA):

Aitken, S. C. (2014). *Towards virological monitoring of HIV-1 drug resistance in resource-limited settings*.

General rights

It is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), other than for strictly personal, individual use, unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

Disclaimer/Complaints regulations

If you believe that digital publication of certain material infringes any of your rights or (privacy) interests, please let the Library know, stating your reasons. In case of a legitimate complaint, the Library will make the material inaccessible and/or remove it from the website. Please Ask the Library: <https://uba.uva.nl/en/contact>, or a letter to: Library of the University of Amsterdam, Secretariat, Singel 425, 1012 WP Amsterdam, The Netherlands. You will be contacted as soon as possible.

Nederlandse samenvatting

Het humane immunodeficiëntievirus (HIV) werd in het begin van de jaren 80 ontdekt als de veroorzaker van AIDS (Acquired Immuno-Deficiency Syndrome). HIV infecteert cellen van het immuunsysteem, in het bijzonder CD4⁺ T-lymfocyten en macrophagen. Dit leidt uiteindelijk tot een daling in de hoeveelheid T-cellen, resulterend in een verzwakt immuunsysteem en maakt het geïnfecteerde individu bevattelijk voor opportunistische infecties. Wereldwijd heeft de HIV epidemie inmiddels meer dan 35 miljoen doden veroorzaakt. Recente schattingen geven aan dat er wereldwijd ongeveer 34 miljoen volwassenen en kinderen leven die geïnfecteerd zijn met HIV. Het grootste deel (69%) van de geïnfecteerde individuen leeft in Afrika ten zuiden van de Sahara.

De behandeling van HIV bestaat uit antiretrovirale combinatie therapie (cART). De behandeling die als eerstelijns therapie wordt toegepast in ontwikkelingslanden, “resource-limited settings” (RLS), bestaat uit een combinatie van twee zogenaamde nucleoside reversetranscriptaseremmers (NRTIs) en een non-NRTI (NNRTI). Wanneer de eerstelijns therapie niet meer effectief blijkt te zijn, kan er worden overgegaan to behandeling met een tweedelijns regime, dat bestaat uit een zogenaamde boosted protease remmer (PI) in combinatie met twee NRTIs. De kosten en beschikbaarheid van eerstelijns-therapie in RLS is verbeterd na een sterke internationale lobby door HIV/AIDS activisten en aanpassingen in behandelprotocollen. Dit heeft er toe geleid dat er eind 2011 meer dan 6.6 miljoen geïnfecteerde worden behandeld met cART. De beschikbaarheid van tweedelijns regimes in RLS is in het algemeen zeer beperkt, met name als gevolg van de nog steeds hoge kosten hiervan.

De eerste tekenen van therapie falen bestaan uit een stijging van de virusconcentratie (viral load, VL) in het plasma van de patiënten de behandeling. Dit kan worden veroorzaakt door het optreden van antivirale resistentie. Resistentie is het gevolg van het optreden van mutaties in



de virale enzymen waartegen de antivirale middelen gericht zijn. Deze mutaties kunnen worden gedetecteerd met behulp van HIV drugresistentie (HIVDR) genotypering. Andere signalen voor het optreden van een falende behandeling bestaan uit een daling van het aantal CD4 cellen en klinische achteruitgang.

In westerse landen vormen de bepaling van de virale load, de CD4-concentratie en de bepaling van antivirale resistentie onderdeel van de reguliere patiëntenzorg. Vanwege de hoge kosten worden de bepaling van VL en antivirale resistentie nauwelijks toegepast in bij patiënten in ontwikkelingslanden. In dergelijke landen worden de patiënten vooral gemonitord op basis van klinische parameters. Bovendien is humaan plasma, de gouden standaard voor eerder genoemde laboratoriumbepalingen infectieus waardoor voor de verwerking en opslag special veiligheidsmaatregelen genomen moeten worden, hetgeen de kosten en complexiteit verder verhoogt. Het gebruik van “dried blood spots” (DBS) is een manier om hierin verbetering te brengen omdat dergelijke monsters eenvoudiger zijn in de afname, het transport en de opslag. Hoewel de kosten voor behandeling sterk zijn verlaagd, hebben de kosten voor de monitoring van de behandelingseffectiviteit hiermee geen gelijke tred gehouden.

Betaalbare resistentie testen voor Afrika: ART-A

Het ART-A project wordt sinds 2008 gevormd door een privaat-publiek consortium geleid door de stichting PharmAccess, een non-profit organisatie geaffilieerd met het “Center for Poverty-related Communicable Diseases” van het Academisch Medisch Centrum (AMC) in Amsterdam. De deelnemers aan het project zijn het Universitair Medisch Centrum Utrecht (UMCU) in Nederland, het Centre de Recherche Public de la Santé in Luxemburg, de Universiteit van Witwatersrand en Contract Laboratorium Services in Johannesburg, Zuid Afrika en Janssen Diagnostics BVBA (vroeger Virco BVBA) in België. Het doel van ART-A project is om betaalbare laboratoriumbepalingen te ontwikkelen voor de monitoring van HIV behandeling in ontwikkelingslanden.

Deze bepalingen zijn vooral gericht op de virale load (VL) en HIVDR door middel van genotypering.

Dit proefschrift

Wij hebben een eenvoudige screeningstest ontwikkeld en geëvalueerd voor de detectie van virologisch falen (VFA). De VFA is compatibel met het gebruik van DBS en bepaalt of de virale load boven of onder een drempel voor behandelingssucces ligt (**hoofdstuk 2**). De VFA is een laboratoriumbepaling met een interne controle en maakt gebruik van generieke real-time PCR technologie en apparatuur. In de evaluatie van plasma en DBS monsters werden een ondergrens van detectie van respectievelijk $1.00E+03$ en $5.00E+03$ HIV RNA kopieën/ml vastgesteld, waarmee wordt voldaan aan de huidige richtlijnen van de Wereld Gezondheidszorg Organisatie voor het detecteren van therapiefalen. Tevens werd de VFA bepaling succesvol geëvalueerd in regionale- en referentie laboratoria in Uganda (**hoofdstuk 2**) en Zuid Afrika (**hoofdstuk 4**).

Omdat de meerderheid van HIV geïnfecteerde individuen in RLS eerstelijns therapie krijgen, bestaande uit een combinatie van reverse transcriptase remmers, werd een eenvoudige en meer betaalbare HIVDR genotyperingstest ontwikkeld. Hierin wordt uitsluitend het gedeelte van reversetranscriptase geanalyseerd waarin alle belangrijke reverse-transcriptase-remmer resistentiemutaties zijn gelegen. Deze test is voor klinische doeleinden toegepast voor HIVDR bepaling bij patiënten die faalden op hun eerstelijns therapie (**hoofdstuk 3**). De test die louter reversetranscriptase analyseert is gebaseerd op een enkele RT-PCR met primers die in staat zijn om alle HIV-1 groep-M subtypes en circulerende recombinanten vormen (CRFs) te amplificeren. Na afloop van de amplificatie wordt het DNA gesequenced met slechts één voorwaartse- en één enkele 'reverse' primer uitgevoerd.. Het reduceren van het aantal reacties voor amplificatie en sequencing vermindert de reagentia kosten, de complexiteit van de test, de personele tijd- en kosten, het contaminatie risico en geeft



sneller resultaat. De test bleek een slagingspercentage te hebben van 95% en 84% respectievelijk bij een VL van $\geq 5.00E+03$ en $\geq 1.00E+03$ HIV RNA kopieën/ml. De bepaling werd tevens met succes overgedragen naar- en toegepast in referentie laboratoria in Uganda (**hoofdstuk 2**) en Zuid Afrika (**hoofdstuk 4**). De test is ook geschikt toepassing op DBS aangezien het kleine DNA fragment zeer efficiënt geamplificeerd wordt, zelfs voor monsters die gedurende 2 weken bij kamertemperatuur werden bewaard tijdens opslag en transport (**hoofdstuk 8**).

In **hoofdstuk 5** hebben wij de ontwikkeling en evaluatie van een genotyperingstest beschreven die protease en reversetranscriptase drugresistentie detecteert door gebruikte maken van een enkel fragment nested RT-PCR methode. Deze test wordt gebruikt voor meer diepgaande studies naar eerste- en tweedelijns drugresistentie, als alternatief voor commerciële PR-RT gebaseerde HIVDR genotypische testen. De beschreven test laat een gevoeligheid en specificiteit zien voor HIV-1 groep-M subtypes en CRFs van ~98%. Daarmee zijn de prestaties van deze bepaling vergelijkbaar met de beste alternatieve gepubliceerde testen. De test is universeel toepasbaar op groep M HIV-1 subtypes met een gevoeligheid van $1.00E+03$ HIV RNA kopieën/ml voor plasma en DBS monsters. Toepassing van de bepaling in studies in ontwikkelingslanden bleek zeer succesvol voor zowel plasma (**hoofdstuk 6**) en DBS monsters (**hoofdstuk 7**).

Naar virologische monitoring in ontwikkelingslanden: Het ART-A Algoritme

De verschillende componenten van het ART-A project welke beschreven zijn in dit proefschrift kunnen worden samengebracht in een algoritme dat gebruikt zou kunnen worden voor de virologische monitoring van HIV infecties en -behandeling in ontwikkelingslanden. Door gebruik te maken van DBS monsters en de pragmatische aanpak voor detectie van virologisch falen en HIVDR genotypering, zoals beschreven in dit proefschrift, kan er een aanzienlijke vooruitgang worden geboekt in het monitoren van de HIV behandeling in ontwikkelingslanden.