

*Grzegorz Piotr Stańczak¹, Janusz Julian Stańczak¹, Ewa Firląg-Burkacka¹,
Alicja Wiercińska-Drapała², Magdalena Leszczyszyn-Pynka³, Ewa Jabłonowska⁴,
Ewa Małolepsza⁴, Andrzej Horban¹*

TRANSMISJA LEKOOPORNYCH SZCZEPÓW HIV-1 WŚRÓD OSÓB NOWO DIAGNOZOWANYCH W POLSCE

Wojewódzki Szpital Zakaźny, Pracownia Diagnostyki Molekularnej
Dyrektor: Andrzej Horban

¹Wojewódzki Szpital Zakaźny, Warszawa,

²Klinika Obserwacyjno-Zakaźna Akademii Medycznej w Białymstoku

Kierownik: Danuta Anna Prokopowicz

³Klinika Chorób Zakaźnych i Hepatologii Pomorskiej Akademii Medycznej w Szczecinie

Kierownik: Anna Boroń-Kaczmarska

⁴Katedra Chorób Zakaźnych Akademii Medycznej w Łodzi

Kierownik: Daniela Wiesława Dworniak

Celem pracy była ocena częstości zakażeń szczepami HIV-1 o obniżonej wrażliwości na leki antyretrowirusowe oraz identyfikacja wzorców oporności w Polsce. W badanej grupie chorych 14,7% zakażonych było szczepem opornym. Najczęściej identyfikowanym subtypem był HIV-1 B – 88,8%. Wysoki odsetek zakażeń szczepami opornymi w Polsce uzasadnia konieczność powszechnego stosowania oznaczeń lekooporności.

Słowa kluczowe: lekooporność HIV-1, mutacje, subtyp, Polska

Key words: HIV-1 drug resistance, mutations, subtype, Poland

WSTĘP

Oporność HIV-1 na leki jest coraz częstszą przyczyną niepowodzenia leczenia antyretrowirusowego (ART) oraz istotnym utrudnieniem w doborze opcji terapeutycznych (1). Główne czynniki wirusowe będące podstawą rozwoju lekooporności to niska wierność odwrotnej transkryptazy oraz intensywne replikacja HIV. Skutkiem tych dwóch zjawisk jest powstawanie szczepów zmutowanych, między innymi w obszarach kodujących odwrotną transkryptazę (RT) oraz proteazę (Pr) – enzymy, przeciwko którym skierowane są główne grupy stosowanych obecnie leków antyretrowirusowych (ARV).

Najczęściej stosowaną metodą oceny oporności na leki jest technika genotypowania – identyfikacji mutacji powiązanych z obserwowaną zmniejszoną podatnością na leki. W tym celu wykorzystuje się technikę sekwencjonowania wybranych regionów genomu HIV-1.

Celem pracy była ocena częstości zakażeń szczepami HIV-1 o obniżonej wrażliwości na leki ARV, identyfikacja dominujących wzorców oporności oraz ustalenie wzorców subtypów HIV-1 w Polsce. W przedstawianej analizie uwzględniono wyniki badania próbek otrzymanych w okresie od 1 kwietnia 2004 do 1 kwietnia 2006 roku. Liczba ośrodków uczestniczących w badaniu zapewniła wysoką reprezentatywność wyników.

MATERIAŁ I METODY

Próbki do badania pochodziły od pacjentów uczestniczących w programie SPREAD oraz tych, u których planowano rozpoczęcie leczenia antyretrowirusowego. Za czynniki kwalifikujące do badania uznano: poziom wirerii w osoczu powyżej 1000 kopii HIV-1 RNA /mL, okres poniżej 3 miesięcy od rozpoznania zakażenia oraz brak wcześniejszej historii ART.

Przeanalizowano wyniki badania 116 próbek krwi z dziewięciu ośrodków klinicznych oraz aresztów śledczych zajmujących się opieką nad osobami zakażonymi HIV, pobranych w okresie od 1 kwietnia 2004 do 1 kwietnia 2006 roku. Dane demograficzne i kliniczne przedstawiono w tabeli I.

U wszystkich pacjentów uczestniczących w badaniu oznaczono ilościowo wiramię (test Cobas Amplicor HIV-1 Monitor Test, Roche Diagnostics Systems, Branchburg, NJ, USA) oraz ilość limfocytów TCD4+ i stosunek ilościowy do limfocytów T CD8+ (test TriTest, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA).

Po otrzymaniu próbek pełnej krwi separowano osocze, które przechowywano w temperaturze -20°C do czasu dalszych analiz. Izolację RNA wykonywano przy użyciu buforu lizującego (Roche) i zmodyfikowanej metody Chomczynskiego.

Sekwencjonowanie wykonywano testem ViroSeq™ HIV-1 Genotyping System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) zgodnie z protokołem producenta. Deklarowany przez dostawcę dolny limit detekcji testu służącego do genotypowania wynosi 2000 kopii/mL; w praktyce otrzymywano wyniki dodatnie w próbkach o wirerii co najmniej 1000 kopii/mL. Wynik pierwotny (elektrogram sygnałów poszczególnych nukleotydów) poddawano ocenie eksperckiej, w której weryfikowano identyfikowane nukleotydy. Interpretacja oddziaływania wykrytych mutacji na podatność na leki była dokonywana przez program zintegrowany z systemem ViroSeq.

Dla identyfikacji subtypów HIV-1 sekwencje eksportowano do narzędzia internetowego HIVdb Program Genotypic Resistance Interpretation Algorithm.

WYNIKI

Mutacje warunkujące obniżoną podatność na leki Odsetek mutacji powiązanych z obniżoną wrażliwością na nukleozydowe inhibitory odwrotnej transkryptazy (NRTI) był najwyższy dla mutacji K70R/E, T69S/N oraz T215D/E i wynosił po 2,6% (3 przypadki). W 2 próbkach (1,7%) wykryto także mutację G333E. Pośród mutacji powodujących wzrost

oporności na nienukleozydowe inhibitory odwrotnej transkryptazy (NNRTI) zidentyfikowano: V108I, A98G, M230L, K101E oraz K103N, każdą z nich w 2 przypadkach (1,7%). W grupie mutacji warunkujących obniżenie wrażliwości na inhibitory proteazy (PI) najczęściej wykrywano mutację V77I – 6 przypadków (5,2%), następnie L10I i M36I – po 3 przypadki (2,6%) oraz N88D, F53L i M46I – po 2 przypadki (1,7%).

Interpretacja lekooporności W badanej grupie w 17 próbkach (14,7%) stwierdzono obecność szczepu opornego na co najmniej jeden lek. W dalszych 11 przypadkach (9,5%) wykryto mutanty definiowane jako „o możliwie obniżonej wrażliwości”. We wszystkich przypadkach identyfikowana oporność dotyczyła leków z pojedynczej klasy, nie wykryto mutantów opornych na więcej niż jedną klasę leków.

Częstość oporności na leki poszczególnych klas wynosiła: NRTI - 41,2 %, NNRTI oraz PI – po 29,4 %. W klasie NRTI najczęściej identyfikowano oporność na zydowudynę AZT i stawudynę d4T (odpowiednio 6,9% i 4,3%). Odsetki szczepów opornych na poszczególne leki z klasy NNRTI były prawie równe i wynosiły 5,2% dla newirapiny NVP oraz po 4,3% dla delawirdyny DLV i efawirenu EFV. W klasie PI najczęściej obserwowano oporność na nelfinawir NFV – 3 przypadki (2,6%).

Subtypy HIV-1 Uzyskane sekwencje nukleotydowe wykorzystano również do identyfikacji subtypu HIV-1. Stwierdzono dominację subtypu B, obecnego w 88,8% próbek. Nowe stwierdzone w Polsce subtypy to CRF03_AB (6%), CRF05_DF i D (po 1,7%) oraz C i CRF01_AE (po 0,9%).

DYSKUSJA

Lekooporność HIV staje się coraz częstszą przyczyną niepowodzenia HAART. Obecnie dostępne leki nie zapewniają eradykacji wirusa, zmniejszają jedynie tempo jego replikacji, muszą więc być przyjmowane do końca życia. Powstaje ciągła presja ewolucyjna prowadząca do selekcji i utrwalania w populacji mutantów lekoopornych. Drugim istotnym czynnikiem narastania lekooporności jest udowodniona licznymi badaniami transmisja wariantów lekoopornych (4,5). Istotnym czynnikiem sprzyjającym powstawaniu i propagacji lekooporności jest też często spotykane nieregularne przyjmowanie leków przez chorych (niska adherencja).

Większość powstających mutacji albo pozostaje bez wpływu na sekwencję kodowanych aminokwasów, więc na funkcjonowanie enzymów, albo prowadzi do powstania form tak defektywnych, że wirus traci zdolność replikacji. Niektóre mutacje powodują powstawanie wariantów lekoopornych o wydajności replikacji upośledzonej w stosunku do typu dzikiego, jednak, w obecności leku, mających nad nim wyraźną przewagę ewolucyjną.

Badania programu SPREAD wykazały, że wśród osób nowo diagnozowanych w Europie >10% jest zakażanych szczepem opornym, a zjawisko to w ciągu ostatnich lat nasila się (2). Obserwacje te spowodowały zmiany w europejskich zaleceniach dotyczących oznaczania lekooporności – obecnie zalecają one wykonywanie testów przed rozpoczęciem agresywnej ART (HAART), gdy częstość zakażeń szczepem lekoopornym przekracza w danym kraju 10% (3). Liczne badania udowodniły przydatność kliniczną i zasadność ekonomiczną testowania (6,7). Obecnie uważa się je za niezbędne w kompletnej diagnostyce osób zakażonych HIV.

W Polsce oznaczanie lekooporności HIV rozpoczęto w roku 2000. Początkowo stosowano testy odwrotnej hybrydyzacji, w 2002 roku wprowadzono technikę sekwencjonowania populacyjnego. Dzięki tej zmianie zaoferowano lekarzom kompletne informacje m.in. o wszystkich wykrytych mutacjach oraz ich interpretacji klinicznej.

Udział naszej Pracowni Diagnostyki Molekularnej w badaniach międzynarodowych oraz współpraca z firmami farmaceutycznymi umożliwia nieodpłatne oznaczanie lekooporności.

W przedstawianym badaniu uczestniczyło 9 ośrodków leczących pacjentów zakażonych HIV oraz aresztów śledczych, dzięki temu uzyskano wysoką reprezentatywność rezultatów. Uzyskane wyniki dowodzą, że 14,7% osób ze świeżo wykrytym zakażeniem HIV-1 w Polsce jest zakażonych szczepem opornym. Wartość ta jest wyższa niż średnia dla Europy wynosząca 10,9% (2). Według zaleceń europejskich częstość występowania szczepów opornych >10% uzasadnia oznaczanie oporności przed rozpoczęciem ART. Randomizowane badania

Tabela I. Charakterystyka grupy badanej (N=116)

Table I. Characteristics of analysed cohort (N=116)

Wiek	<ul style="list-style-type: none"> • Zakres: 18-65 lat • Średnia: 31 lat • 39 pacjentów (33,6%) < 25 lat • 52 pacjentów (44,8%) 25-40 lat • 25 pacjentów (21,6%) > 40 lat
Płeć	<ul style="list-style-type: none"> • 38 (32,8%) kobiet • 78 (67,2%) mężczyzn
Zamieszkanie	<ul style="list-style-type: none"> • 41 (35,3%) osób miasta > 500 tys mieszkańców • 20 (17,2%) osób miasta 100 tys - 500 tys mieszkańców • 54 (46,6%) osób miasta < 100 tys mieszkańców • 1 (0,9%) osoba brak danych
Przypuszczalna droga zakażenia – możliwa więcej niż jedna odpowiedź	<ul style="list-style-type: none"> • 46 (39,7%) osób – kontakt heteroseksualny • 44 (37,9%) osób – dożylnie stosowanie narkotyków • 17 (14,7%) osób – kontakt homo lub biseksualny • 7 (6%) osób – nieznaną • 2 (1,7%) osoby – nie udzieliło odpowiedzi
Liczba limfocytów CD4	<ul style="list-style-type: none"> • 24 (21%) osób - >500 komórek/mm³ • 28 (24,1%) osób – 350–500 komórek/mm³ • 23 (19,8%) osób – 200–350 komórek/mm³ • 38 (32,8%) osób - <200 komórek/mm³ • 3 (2,6%) osób – nie wykonano oznaczenia
Wiremia HIV-1 RNA	<ul style="list-style-type: none"> • 8 (6,9%) osób - <10 tys kopii/mL • 41 (35,3%) osób – 10 tys–100 tys kopii/mL • 42 (36,2) osób - >100 tys kopii/mL • 25 (21,6%) osób – nie wykonano oznaczenia
Rozpoznane subtypy HIV-1	<ul style="list-style-type: none"> • 103 (88,8%) przypadki – subtyp B • 7 (6%) przypadki – subtyp CRF03_AB • 2 (1,7%) przypadki – subtyp CRF05_DF • 2 (1,7%) przypadki – subtyp D • 1 (0,9%) przypadki – subtyp CRF01_AE • 1 (0,9%) przypadki – subtyp C

kliniczne udowodniły przewagę leczenia wykorzystującego oznaczenie lekooporności i opinię eksperta nad leczeniem standardowym (6,7). Czynnikiem utrudniającym miarodajne porównania danych pomiędzy poszczególnymi krajami lub badaniami jest używanie różnych algorytmów interpretacyjnych oraz różnice w definiowaniu oporności.

Ustalone sekwencje nukleotydowe regionów proteazy i odwrotnej transkryptazy mogą być także użyte w badaniach filogenetycznych: identyfikacja subtypu wirusa, badań epidemiologicznych lub ocena pokrewieństwa genetycznego. Analiza uzyskanych sekwencji wykazała zmiany wzorca subtypów HIV-1 w Polsce w latach 1996-2006. W badaniach przeprowadzonych w 1996 roku zidentyfikowano wyłącznie subtyp B (8). W obecnym badaniu wykryto także subtypy inne niż B, typowe dla pochodzących z Europy Wschodniej osób sprzedających seks oraz osób odurzających się przez wstrzykiwanie narkotyków (9).

Podobne tendencje stwierdzono oceniając zmiany wzorca genotypów HCV (10,11). Sądzimy, że jest to efekt między innymi wzmożonej migracji i że zróżnicowanie genetyczne badanych wirusów będzie wzrastać.

WNIOSKI

Uzyskane dane dokumentują wysoki odsetek zakażeń szczepami opornymi HIV-1 w Polsce; zjawisko to obserwowane jest też w innych krajach europejskich.

Uzasadnia to konieczność powszechnego stosowania oznaczeń lekooporności w Polsce.

GP Stańczak, JJ Stańczak, E Firląg-Burkacka, A Wiercińska-Drapało, M Leszczyszyn-Pynka, E Jabłonowska, E Malolepsza, A Horban

TRANSMISSION OF HIV-1 DRUG RESISTANCE AMONG NEWLY DIAGNOSED PATIENTS IN POLAND

SUMMARY

OBJECTIVE. HIV-1 drug resistance is becoming a growing concern. It is estimated that one out of ten newly diagnosed persons in Europe acquires HIV drug resistant strain. The aim of this study was to determine the transmission of drug resistance and identify the resistance patterns among naïve patients in Poland.

METHODS. The patients were asked to complete a brief questionnaire concerning demographic and epidemiological data. Viral load and CD4/CD8 counts were determined before drug resistance testing. The sequencing assay was performed according to manufacturer's protocol.

MAIN OBSERVATIONS. In the analysed cohort 14,7% of patients acquired HIV-1 drug resistant strains; further 9,5% were infected with strains with "possibly lowered susceptibility".

RESULTS. In all cases resistance to single class of antiretroviral drugs were identified. In the class of PIs resistance to NFV was the most common. The rates of drug resistance among NNRTIs were almost the same – about 5%. In the NRTI class the resistance to AZT and d4T was the most frequent. HIV-1 subtype B was identified in 88,8% of cases.

CONCLUSIONS. The results of this study document high transmission rate of drug resistance in Poland and justify the necessity of common DR testing in our country.

PIŚMIENNICTWO

1. Mocroft A, Phillips AN, Soriano V, i in. EuroSIDA Study Group. Reasons for stopping antiretrovirals used in an initial highly active antiretroviral regimen: increased incidence of stopping due to toxicity or patient/physician choice in patients with hepatitis C coinfection. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2005;21:527-36.
2. Wensing AM, van de Vijver DA, Angarano G, i in. SPREAD Programme. Prevalence of Drug-Resistant HIV-1 Variants in Untreated Individuals in Europe: Implications for Clinical Management. *J Infect Dis* 2005 ;192:958-66.
3. EACS Euroguidelines Group. European guidelines for the clinical management and treatment of HIV-infected adults in Europe. *AIDS* 2003; 17 (suppl 2): S3-26.
4. Derdelinckx I, Van Laethem K, Maes B, i in. Current Levels of Drug Resistance Among Therapy-Naive HIV-Infected Patients Have Significant Impact on Treatment Response. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2004;37:1664-1666.
5. Oette M, Kaiser R, Daumer M, i in. Primary drug-resistance in HIV-positive patients on initiation of first-line antiretroviral therapy in Germany. *Eur J Med Res.* 2004;9:273-8.
6. Durant J, Clevenbergh P, Halfon P, i in. Drug-resistance genotyping in HIV-1 therapy: the VIRADAPT randomised controlled trial. *Lancet* 1999; 26:2195-9.
7. Baxter JD, Mayers DL, Wentworth DN, i in. A randomized study of antiretroviral management based on plasma genotypic antiretroviral resistance testing in patients failing therapy. CPCRA 046 Study Team for the Terry Bein Community Programs for Clinical Research on AIDS. *AIDS* 2000;14:F83-93.
8. Lipniacki A, Sheppard HW, Dondero DV, i in. Determination of HIV-1 subtypes in Polish patients using HMA method. Preliminary data. Sixth European Conference on Clinical Aspects and Treatment of HIV, Hamburg, 1997.
9. Lukashov VV, Huismans R, Rakhmanova AG, i in. Circulation of subtype A and gagA/envB recombinant HIV type 1 strains among injecting drug users in St. Petersburg, Russia, correlates with geographical origin of infections. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1999 ; 15:1577-83.
10. Stańczak JJ, Opoka- Kegler J, Czerwionka-Szaflarska M, i in. Distribution of hepatitis C virus genotypes in Poland. *J Hepatol* 1999,31 :574.
11. Stańczak JJ, Tobolewska E, Przybylska-Stengiel K, i in. Changes in the pattern of Hepatitis c virus genotypes in Poland. International Congresson Viral Hepatitis and Liver Diseases, Sydney, 2003.

Otrzymano: 13.11.2006 r.

Adres Autora:

Grzegorz Stańczak, mgr biologii
Wojewódzki Szpital Zakaźny
Pracownia Diagnostyki Molekularnej
Ul. Wolska 37, 01-201 Warszawa
e-mail: gstanczak@zakazny.pl