

Hiv-type 1 (hiv-1) provirale reservoirs hebben een continu verval bij aanhoudende virologische onderdrukking in hiv-1-geïnfecteerde kinderen die vroeg met behandeling starten

HIV type 1 (HIV-1) Proviral Reservoirs Decay continuously Under Sustained Virologic Control in HIV-1-Infected Children Who Received Early Treatment

C.S. Hakkers

Dit artikel is een Nederlandse bewerking van:

Luzuriaga K, Tabak B, Garber M et al. HIV type 1 (HIV-1) Proviral Reservoirs Decay continuously Under Sustained Virologic Control in HIV-1-Infected Children Who Received Early Treatment. JID 2014;210:1529-38

Samenvatting

Het starten van vroege effectieve combinatie antiretrovirale therapie tijdens de jeugd beperkt significant de circulerende waardes van proviraal en replicatiecompetent hiv-1 en bevordert het doorlopende verval van virale reservoirs. Voortgezette combinatie antiretrovirale therapie met afname van hiv-1-reservoirs in verloop van tijd zou hiv-1-eradicatiestrategieën kunnen vergemakkelijken.

(Tijdschr Infect 2015;10(3):60-4)

Summary

Initiation of early effective combination antiretroviral therapy during infancy significantly limits circulating levels of proviral and replication-competent HIV-1 and promotes continuous decay of viral reservoirs. Continued combination antiretroviral therapy with reduction in HIV-1 reservoirs over time may facilitate HIV-1 eradication strategies.

Inleiding

De primaire transmissiewijze voor hiv-1-infecties bij kinderen blijft verticale transmissie. Door het gebruik van antiretrovirale profylaxe en maternale antiretrovirale therapie is verticale transmissie weliswaar teruggedrongen, maar over de hele wereld doen zich nog meer dan 260.000 nieuwe infecties bij kinderen voor.¹ Omdat een vroege start van combinatie antiretrovirale

therapie (cART) binnen de eerste maanden van het leven de hiv-1-replicatie onderdrukt, de immunofunctie in stand houdt en de hiv-1-gerelateerde mortaliteit vermindert, wordt wereldwijd bij kinderen een vroege diagnose met tijdige start van cART geadviseerd.²⁻⁸ Desondanks wordt nog bij 80% van de kinderen na vijf jaar latent geïnfecteerde, rustende CD4+-T-cellen gevonden die replicatiecompetent hiv-1 bij zich dragen.⁹

Correspondentie richten aan: mw. C.S. Hakkers, AIOS interne geneeskunde, Divisie Interne Geneeskunde en Dermatologie (DIGD), sectie Infectieziekten, Universitair Medisch Centrum Utrecht, Heidelberglaan 100, 3584 CX Utrecht, tel.: 088 - 7551378, e-mailadres: c.s.hakkers@umcutrecht.nl

Belangenconflict/financiële ondersteuning: geen gemeld.

Trefwoorden: antiretrovirale therapie, hiv-1 verval, hiv-reservoirs, kinderen, kindergeneeskunde, provirale reservoirs, virale suppressie.

Keywords: antiretroviral therapy, children, HIV-1 decay, HIV reservoirs, paediatrics, paediatrics, proviral reservoirs, viral suppression.

Ontvangen 13 februari 2015, geaccepteerd 19 februari 2015.

Daarom wordt momenteel levenslange therapie geadviseerd. Steeds meer kinderen hebben toegang tot vroege cART en de methoden om hiv-1 reservoirs te meten worden steeds sensitiever. In deze studie hebben de auteurs deze methoden gebruikt om bij een klein cohort van perinataal geïnficeerde kinderen langdurig de hiv-1 reservoirs te meten.

Studieopzet

In de vroege behandeling-groep (de VB-groep) bevinden zich vier perinataal hiv-1-geïnficeerde kinderen die gestart zijn met cART op een leeftijd tussen 0,5 en 2,6 maanden in het kader van klinische studies. Zij werden uitgebreid geëvalueerd om de aanhoudende aanwezigheid van hiv-1-provirale en -replicatiecompetente reservoirs te kwantificeren. Daarnaast werden lage-level viremie en hiv-1-specifieke immuunresponsen geanalyseerd. De late behandeling-groep (de LB-groep) bestond uit vier perinataal geïnficeerde kinderen die begonnen met cART op een leeftijd tussen 6 en 14,7 jaar.

Hiv-1-specifieke immuunresponsen, HLA-typering en plasma-RNA-detectie werden verricht volgens de geldende methoden (zie hiervoor het originele artikel). Om proviraal hiv-1-DNA in perifere bloed mononucleaire cellen ('peripheral blood mononuclear cells', PBMCs) te meten, werd polymerasekettingreactie ('polymerase chain reaction', PCR) gebruikt. Middels verschillende kleuringen werden de volgende subpopulaties onderscheiden in het totaal aantal (rustende) CD4+-cellen: centrale geheugencellen, transitionele geheugencellen, effectorgeheugencellen, en naïeve cellen.

Voor de evaluatie van verval van hiv-1-proviraal DNA in de tijd voerden de auteurs een regressieanalyse uit op \log_{10} hiv-1-DNA kopiegetallen. Statistische significantie van de exponentiële vervalmodellen werd geëvalueerd middels de 'root mean square error' (RMSE). De nulhypothese dat de RMSE voorkwam als het gevolg van toeval werd geëvalueerd met een permutatietest.

Resultaten

Proefpersonen

In beide groepen (VB en LB) bevonden zich vier kinderen. De VB-kinderen begonnen met cART nog voor de leeftijd van 2,6 maanden en werden gevolgd gedurende 14-17,7 jaar. Binnen een mediaan van dertien weken na het starten van cART hadden zij allen ondetecteerbare hiv-1 RNA-waarden. Drie kinderen hebben sindsdien continu onderdrukte RNA-waarden gehad. Het vierde kind had twee geïsoleerde RNA2-waarden van 1.100 en 1.600 kopieën/mL op de leeftijd van achttien maanden. Na veranderen van het cART-regime werd het RNA

weer ondetecteerbaar en is zo gebleven gedurende 17,7 jaar. In alle vier de VB-kinderen bleef het CD4-gehalte binnen de normaalwaarden voor de leeftijd, en geen enkel kind had een HLA-klasse I allel geassocieerd met spontane controle van hiv-1-replicatie.

Plasmaviremie en hiv-1-specifieke T-celresponsen

Patiënten die een ondetecteerbare hiv-1 RNA-waarde hebben bij routinebepalingen, kunnen nog steeds (zeer) lage RNA-waarden hebben, die wel worden opgepikt door hoog-sensitieve bepalingen. Deze lage waarden kunnen worden verklaard door hiv-1-expressie vanuit provirale reservoirs, dan wel door een lage mate van nog aanwezige virusreproductie. Ook in deze studie werden ultrasensitieve bepalingen gebruikt om de virusproductie onder cART te evalueren. Bij alle vier de VB-kinderen waren de hiv-1 RNA-waarden onder de grenzen van detectie (<2 hiv-1 RNA-kopieën/mL). Bij alle LB-kinderen werden juist wel lage level-waarden gevonden (mediaan 8 kopieën/mL). Er is ook gekeken naar hiv-1 specifieke immuunresponsen. Hiervoor gebruikten de auteurs responsen van CD8+ T-cellen, responsen van CD4+ T-cellen en de aanwezigheid van antistoffen. Als gekeken werd naar de frequenties van geactiveerde CD8+ T-cellen in het perifere bloed van de VB-kinderen, waren deze niet hoger dan hiv-1-ongeïnficeerde kinderen. Hiv-1-specifieke antilichamen waren niet detecteerbaar middels ELISA bij drie van de vier VB-kinderen, en niet detecteerbaar middels western blot bij twee van de vier VB-kinderen. Alle vier de LB-kinderen hielden sterke reacties op alle negen hiv-1 proteïnen bij western blot. Daarnaast werden hiv-1-specifieke CD4+ en CD8+ T-celresponsen niet gevonden bij alle VB-kinderen, en wel bij alle LB-kinderen. De auteurs concluderen uit deze data dat er waarschijnlijk extreem weinig tot geen voortgaande hiv-1 productie is bij de VB-kinderen.

Hiv-1 suppressie

Het aanwezig blijven van hiv-1 reservoirs met viraal DNA vormt een barrière voor genezing. Er waren grote verschillen tussen de waarden van hiv-1 proviraal DNA in de VB-groep en de LB-groep. De mediaan in de VB-groep was 7 kopieën/miljoen PBMCs met een range van 4-12 kopieën/miljoen PBMCs, en de mediaan in de LB-groep was 181 kopieën/miljoen PBMCs met een range van 68-345 kopieën/miljoen PBMCs. De waarden in de VB-groep waren dus uitzonderlijk laag. Gezien de aanwijzingen dat er weinig tot geen virale replicatie is in de VB-groep, is het waarschijnlijk dat dit DNA hoofdzakelijk geïntegreerd provirus betreft. Zelfs na het verrijken van de PBMCs met CD4+ T-cellen, een

bekend hiv-1 reservoir, bleven de hiv-1 DNA-kopieën van de VB-groep extreem laag. Voor de LB-groep konden deze testen niet worden uitgevoerd wegens een gebrek aan beschikbare monsters. Daarna hebben de auteurs gekeken welke van de geïntegreerde provirussen replicatie-competent waren. Dit hebben ze gedaan door de frequentie vast te stellen van cellen met replicatie-competente virussen die konden worden gevonden in 10 miljoen tot 24 miljoen rustende CD4+ T-cellen. De frequenties van latent geïnficeerde rustende CD4+ T-cellen waren onder de grens van detectie (<0,1 infectieuze unit/miljoen cellen) in alle vier de VB-kinderen, terwijl replicatiecompetente virussen wel bij alle vier de LB-kinderen werden gevonden met een range van 0,22-3,25 infectieuze units/miljoen cellen. Er werden negen virale uitgroebepalingen gedaan bij de VB-jeugd, en daarvan testte slechts één van de twintig replicaten (met elk 10 miljoen cellen) positief bij één proefpersoon, op het tweede tijdstip. Dit is ongeveer equivalent met 0,05 infectieuze units per miljoen cellen.

Hiv-1 provirale reservoirs verval

De hiv-1 DNA waarden die in de VB-kinderen werden gemeten waren lager dan de meeste hiv-1-geïnficeerde volwassenen en kinderen die cART gebruiken.^{10,11} Eerdere longitudinale studies bij volwassenen en kinderen enkele jaren na het starten van cART lieten een initiële steile daling zien in reservoirgrootte, gevolgd door een vervlakkings van die daling.¹²⁻¹⁵ De data in die studies suggereerden dat volledige eradicatie van het provirale reservoir niet mogelijk is, zelfs niet met de juiste cART. In deze studie hebben de auteurs de stabiliteit van hiv-1 DNA waarden in de tijd onderzocht door hiv-1 DNA waarden te meten in PMBCs verkregen op de leeftijd van één tot twee jaar, drie jaar, vijf jaar, tien jaar en dertien jaar. Bij de eerste tijdstippen (één tot twee jaar) werden hiv-1 DNA-getallen van 1 tot 1,5 log₁₀ kopieën per miljoen PBMCs gevonden, en deze getallen bleven ongeveer gelijk in de eerste vijf jaar. Maar na tien en dertien jaar werden nog maar 0,6-0,7 log₁₀ kopieën per miljoen PBMCs gevonden. De waarden van elke proefpersoon pasten in een exponentieel vervalmodel. Een trend in verval werd gevonden en was statistisch significant voor de drie proefpersonen met voldoende data (één had slechts zes data tijdstippen). Variabiliteit in de getallen leek minder te worden naarmate de tijd toenam, maar er is meer data van meer proefpersonen nodig om die trend te bevestigen.

Aandeel van geheugen CD4+-T-celsubklassen in reservoirs

De auteurs vonden wisselende vervalsnelheden nadat

gestart was met cART. Dit zou kunnen betekenen dat er variabiliteit is in de cellulaire reservoirs met proviraal DNA. Daarnaast vonden ze een verschil in de snelheid van het verval bij de VB-kinderen en wat eerder over volwassenen is gerapporteerd.¹⁵ Bovendien is er wel een verval maar zijn er geen hiv-specifieke immunoresponsen in de VB-kinderen. Dit betekent mogelijk dat vroege therapie het ontstaan van lang levende reservoirs inperkt. Daarom hebben de auteurs de verdeling van proviraal DNA in verschillende CD4+-T-celsubklassen onderzocht in drie van de VB-kinderen. Zij vonden in deze kleine onderzoekspopulatie met name transitionele geheugen CD4+-T-cellen als de grootste groep met proviraal DNA; meer dan centrale- of effectorgeheugen CD4+-T-cellen. Bij patiënten die beginnen met cART tijdens een chronische infectie worden juist meer centrale geheugen CD4+-T-cellen met proviraal DNA gevonden.¹⁶ Bij patiënten die cART zijn gestart tijdens primaire infectie en waarbij de hiv-1-replicatie gecontroleerd is na het staken van therapie wordt juist wel weer hetzelfde patroon gevonden.¹⁷

Beschouwing

In deze studie werd de persistentie van hiv-1 in vier VB-kinderen met onderdrukt plasma hiv-1-RNA geanalyseerd om te onderzoeken of langdurige suppressie van hiv-1-replicatie na vroege cART de hiv-1-persistentie verandert. De auteurs vonden in de VB-kinderen geen detecteerbare viremie, zelfs niet met ultrasensitieve bepalingen, geen circulerende geactiveerde T-cellen en ook geen hiv-1 specifieke immunoresponsen. Daarnaast vonden ze slechts hele lage frequenties van PBMCs die hiv-1-DNA herbergden, en bij de meeste kinderen kon geen replicatiecompetent virus worden geïsoleerd. Al deze data zijn suggestief voor een beperking van voortgaande hiv-1-productie. Een belangrijke nieuwe vinding was dat provirale hiv-1-kopieën in circulerende PBMCs verminderden na tien of meer jaar van virologische suppressie middels cART.

Provirale hiv-1 DNA-reservoirs komen tijdens primaire infectie snel tot stand en vormen een obstakel voor genezing. Er zijn aanwijzingen dat het starten van cART vroeg in de primaire infectie de grootte van het provirale hiv-1 DNA reservoir beperkt. Ananworanich et al toonden een geleidelijke toename aan van provirale reservoirs in de darm en in perifeer bloed gedurende het beloop van de primaire infectie.¹⁸ Strain et al vonden bij volwassenen een afname in provirale DNA-waarden in PBMCs tijdens de eerste twee jaar van antiretrovirale therapie als deze was gestart tijdens de primaire infectie.¹⁵

Chun et al en Hocqueloux et al vonden significant lagere hiv-1 DNA-kopieën bij volwassenen die vroeg waren begonnen met behandeling dan bij degenen die laat waren begonnen.^{19,20} In de huidige studie waren de waarden van hiv-1 proviraal DNA in de VB-kinderen laag en vergelijkbaar met de waarden die gevonden worden bij langetermijnstudies van volwassenen met een vroege initiatie van therapie, en bij elite controllers.^{14,21} De waarden van proviraal hiv-1-DNA in PBMCs van de meeste proefpersonen waren zelfs maar net boven de detectielimiet van een hoog sensitieve bepaling. De waarden die in de proefpersonen werden gevonden op een leeftijd van één tot twee jaar (wat het vroegste tijdstip is waarop er genoeg PBMCs beschikbaar zijn voor evaluatie) zijn gelijk of lager dan waarden die gevonden worden bij volwassenen één jaar na initiatie van cART.¹⁵ Als deze waarden vergeleken worden met PBMC-specifieke DNA-waarden vóór de start van cART bij 14 kinderen die op een leeftijd van 9 jaar zijn gestart, zijn deze een stuk lager.¹¹ De laatste waarden correleren dan juist wel weer met de waarden die gevonden zijn in de LB-groep. Het feit dat de viremie blijft bestaan in deze groep suggereert een voortdurende aanvulling van de provirale reservoirs. Het verval in deze groep kan echter niet worden onderzocht, omdat in deze studie geen longitudinale PBMC monsters verzameld zijn. In het cohort beschreven door Zanchetta et al daalden de hiv-1 DNA-kopieën met een gemiddelde van één log na vier jaar therapie.¹¹ Al deze data suggereren dat vroege start van cART het aantal langlevende cellen met hiv-1 proviraal DNA vermindert; en dat beperking van voortgaande hiv-1-replicatie aanvulling van het reservoir in de tijd limiteert.

Het verval van het provirale DNA bij de VB-kinderen in de afwezigheid van hiv-1-specifieke immuunresponsen duidt er ook op dat een vroege start van cART het aantal lang levende cellen met proviraal DNA vermindert. Bij een studie van Buzon et al waarbij verval van proviraal DNA werd gemeten in volwassenen die tijdens de primaire infectie werden behandeld, werd met name een daling gezien van DNA-waarden in effectorgeheugen-cellen en terminaal gedifferentieerde CD4+ T-cellen.²² Het lijkt er op dat met name lang levende centrale geheugen CD4+T-cellen het provirale DNA bevatten bij chronisch geïnfecteerde patiënten. In de huidige studie werd juist een groot aandeel van transitionele geheugen CD4+T-cellen gevonden, en ook een ander cohort toont een kleinere bijdrage van de langer levende centrale geheugen CD4+T-cellen.¹⁷ Theoretisch zou dus een vroege of zeer vroege initiatie van antiretrovirale

therapie de infectie van langer levende cellen kunnen beperken; juist de cellen die een obstakel vormen voor genezing. Om deze hypothese te testen zijn aanvullende pediatrische studies gepland.

De vraag is of bij de VB-kinderen de reservoirs zodanig zijn beperkt dat een hernieuwde opkomst van plasma-viremie te voorkomen is als cART wordt gestaakt. Het feit dat de auteurs weinig tot geen replicatiecompetent virus konden vinden zou kunnen betekenen dat de detecteerbare provirussen geen replicatiepotentieel hebben. De vraag is of restricties in onderzocht bloedvolume er niet voor hebben gezorgd dat er geen replicatiecompetent virus werd gevonden. Herhaaldelijk testen bracht namelijk toch replicatiecompetent virus op bij een proefpersoon, al waren de waarden van proviraal hiv-1-DNA extreem laag. Eriksson et al vonden ook replicatiecompetent virus bij twee patiënten met provirale DNA-waarden onder de detectiegrens.¹⁰ Deze uitkomsten laten zien dat een grote hoeveelheid PBMCs of CD4+T-cellen (uit monsters > 500 mL of door leukaferese) gewenst is voor het meten van de totale en de replicatie-competente hiv-1-provirale reservoirs.

Conclusie

Het vroeg starten van effectieve antiretrovirale therapie vermindert de waarden van proviraal en replicatiecompetent hiv-1 en daarnaast ondersteunt dit het verval van provirale reservoirs. Het verval in PBMC proviraal hiv-1-DNA suggereert, samen met weinig tot geen replicatiecompetent hiv-1, dat levenslange therapie mogelijk niet noodzakelijk is voor alle patiënten; dit zou met name gelden voor degenen die starten met cART tijdens primaire infectie. Verder onderzoek is echter nodig om parameters voor virale reservoirs te definiëren die een succesvolle controle van hiv-1-replicatie voorspellen na het staken van cART. Totdat dit beter uitgezocht is, is aan te raden alle hiv-1-geïnfecteerde patiënten cART te laten continueren.

Referenties

1. Global report: UNAIDS report on the global aids epidemic 2013. http://www.unaids.org/en/media/unaids/contentassets/documents/epidemiology/2013/gr2013/UNAIDS_Global_Report_2013_en.pdf accessed 7 november 2013.
2. Luzuriaga K, Bryson Y, Krogstad P, et al. Combination treatment with zidovudine, didanosine, and nevirapine in infants with human immunodeficiency virus type 1 infection. *N Engl J Med* 1997;336:1343–9.
3. Luzuriaga K, McManus M, Catalina M, et al. Early therapy of vertical human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infection: control of viral replication and absence of persistent HIV-1-specific immune responses. *J Virol* 2000;74:6984–91.
4. Luzuriaga K, McManus M, Mofenson L, Britto P, Graham B, Sullivan JL.

- A trial of three antiretroviral regimens in HIV-1-infected children. *N Engl J Med* 2004;350:2471-80.
5. Chadwick EG, Rodman JH, Britto P, et al. Ritonavir-based highly active antiretroviral therapy in human immunodeficiency virus type 1-infected infants younger than 24 months of age. *Pediatr Infect Dis J* 2005;24:793-800.
 6. Violari A, Cotton MF, Gibb DM, et al. Early antiretroviral therapy and mortality among HIV-infected infants. *N Engl J Med* 2008;359:2233-44.
 7. Guidelines for the use of antiretroviral agents in pediatric HIV infection. <http://aidsinfo.nih.gov/proxy.library.uu.nl/guidelines/html/2/pediatric-treatment-guidelines/0> Accessed 7 November 2013.
 8. Consolidated guidelines on the use of antiretroviral drugs for treating and preventing HIV infection-recommendations for a public health approach. http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/85321/1/9789241505727_eng.pdf Accessed 7 November 2013.
 9. Persaud D, Ray SC, Kajdas J, et al. Slow human immunodeficiency virus type 1 evolution in viral reservoirs in infants treated with effective antiretroviral therapy. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2007;23:381-90.
 10. Eriksson S, Graf EH, Dahl V, et al. Comparative analysis of measures of viral reservoirs in HIV-1 eradication studies. *PLoS Pathog* 2013;9:e1003174.
 11. Zanchetta M, Walker S, Burghel N, et al. Long-term decay of the HIV-1 reservoir in HIV-1-infected children treated with highly active antiretroviral therapy. *J Infect Dis* 2006;193:1718-27.
 12. Luzuriaga K, Wu H, McManus M, et al. Dynamics of human immunodeficiency virus type 1 replication in vertically infected infants. *J Virol* 1999;73:362-7.
 13. Finzi D, Blankson J, Siliciano JD, et al. Latent infection of CD4+ T cells provides a mechanism for lifelong persistence of HIV-1, even in patients on effective combination therapy. *Nat Med* 1999;5:512-7.
 14. Blankson JN, Finzi D, Pierson TC, et al. Biphasic decay of latently infected CD4+ T cells in acute human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Infect Dis* 2000;182:1636-42.
 15. Strain MC, Little SJ, Daar ES, et al. Effect of treatment, during primary infection, on establishment and clearance of cellular reservoirs of HIV-1. *J Infect Dis* 2005;191:1410-8.
 16. Chomont N, El-Far M, Ancuta P, et al. HIV reservoir size and persistence are driven by T cell survival and homeostatic proliferation. *Nat Med* 2009;15:893-900.
 17. Saez-Cirion A, Bacchus C, Hocqueloux L, et al. Post-treatment HIV-1 controllers with a long-term virological remission after the interruption of early initiated antiretroviral therapy ANRS VISCONTI Study. *PLoS Pathog* 2013;9:e1003211.
 18. Ananworanich J, Schuetz A, Vandergeeten C, et al. Impact of multi-targeted antiretroviral treatment on gut T cell depletion and HIV reservoir seeding during acute HIV infection. *PLoS One* 2012;7:e33948.
 19. Chun TW, Justement JS, Murray D, et al. Rebound of plasma viremia following cessation of antiretroviral therapy despite profoundly low levels of HIV reservoir: implications for eradication. *AIDS* 2010;24:2803-8.
 20. Hocqueloux L, Avettand-Fenoel V, Jacquot S, et al. Long-term antiretroviral therapy initiated during primary HIV-1 infection is key to achieving both low HIV reservoirs and normal T cell counts. *J Antimicrob Chemother* 2013;68:1169-78.
 21. Julg B, Pereyra F, Buzon MJ, et al. Infrequent recovery of HIV from but robust exogenous infection of activated CD4(+) T cells in HIV elite controllers. *Clin Infect Dis* 2010;51:233-8.
 22. Buzon MJ, Sun H, Li C, et al. HIV-1 persistence in CD4(+) T cells with stem cell-like properties. *Nat Med* 2014;20:139-42.