

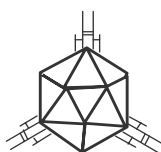
HIV STRATEGIMØTE

6. november 1997

**Forelesningsmanuskripter og
sammendrag med anbefalinger**

Redaktører:

**Birgitta Åsjø, Helvi Holm Samdal,
Anne Grete Skar, Gunnar Haukenes,
Svein Arne Nordbø, Yngvar Tveten,
Pål Jenum, Gunnar Hoddevik.**



**REFERANSEGRUPPE
FOR EKSTERN KVALITETSSIKRING
I SEROLOGI OG VIROLOGI**

INNHALDSFORTEGNELSE

Forord	2
Deltagerliste	3
Program	4
Sammendrag og anbefalinger	5-10
Innlegg i følge programmet	
Humant immunsviktvirus (HIV):	
Struktur, biologi og patogenese	11-20
Betydning av HIV-1-subtyper	21-26
Diagnostikk:	
HIV-primærttesting og oppfølging av positivt resultat .	27-34
HIV-infeksjon og bekreftelsestesting	35-40
Kvalitative og kvantitative HIV-1-analyser	41-44
HIV isolering og karakterisering. Er det nødvendig?	45-48
Bruk av internkontroll	49-52
Trenger vi en nasjonal godkjenningsordning for HIV-tester?	53-56
Forebygging og behandling:	
Den norske HIV-epidemien og forebyggingstiltak	57-58
Pasientmonitorering og antiviral terapi	59-64
Perinatal HIV-smitte	65-68
Helsearbeidere og HIV-smitte	69-76

Forord

I regi av Referansegruppe for ekstern kvalitetsikring i serologi og virologi ble det holdt strategimøte om HIV på Folkehelse den 6. november 1997. Programmet var satt sammen av en programkomité bestående av: Birgitta Åsjø (leder), Anne Grete Skar, Helvi Holm Samdal, Gunnar Haukenes, Svein Arne Nordbø, Yngvar Tveten, Pål Jenum og Gunnar Hoddevik. Programkomiteens medlemmer er også redaktører av rapporten.

Rapporten inneholder sammendrag og anbefalinger samt foredragene (manuskriptene) til møtet, som er gjengitt i sin helhet.

Bergen, mars 1998

Birgitta Åsjø, Anne Grete Skar, Helvi Holm Samdal, Gunnar Haukenes, Svein Arne Nordbø,
Yngvar Tveten, Pål Jenum og Gunnar Hoddevik.

DELTAGERLISTE

Aandahl, Einar, Lillehammer mikrobiologiske lab., Fylkessykehuset, Lillehammer
Aavitsland, Preben, Avdeling for bakteriologi, Statens institutt for folkehelse, Oslo
Albert, Jan, SMI, Avdeling for klinisk virologi, Stockholm, Sverige
Csango, Peter, Vest-Agder Sentralsykehus, Kristiansand
Degré, Miklos, Mikrobiologisk institutt, Rikshospitalet, Oslo
Gutteberg, Tore J., Mikrobiologisk avdeling, Regionsykehuset i Tromsø
Haukenes, Gunnar, Mikrobiologisk avdeling, Haukeland sykehus, Bergen
Haukland, Hanne H., Mikrobiologisk avdeling, Regionsykehuset i Tromsø
Hjetland, Reidar, Mikrobiologisk avdeling, Sentralsykehuset i Sogn & Fjordane, Førde
Hoddevik, Gunnar M., Avdeling for virologi, Statens institutt for folkehelse, Oslo
Holm-Hansen, Carol, Avdeling for virologi, Statens institutt for folkehelse, Oslo
Holter, Ellen, Mikrobiologisk institutt, Rikshospitalet, Oslo
Iveland, Hjørdis, Mikrobiologisk avdeling, Buskerud sentralsykehus, Drammen
Jeansson, Stig, Mikrobiologisk avdeling, Ullevål sykehus, Oslo
Jenum, Pål, Avdeling for bakteriologi, Statens institutt for folkehelse, Oslo
Kanestrøm, Anita, Mikrobiologisk avdeling, Haukeland sykehus, Bergen
Lindemann, Rolf, Barneavdelingen, Ullevål sykehus, Oslo
Lingås, Egil, Avdeling for sykehushygiene, Rikshospitalet, Oslo
Løvestad, Arild, Mikrobiologisk avdeling, Østfold Sentralsykehus, Fredrikstad
Mortensen, Lisa, Mikrobiologisk laboratorium, Nordland Sentralsykehus, Bodø
Myrmel, Helge, Blodbanken, Haukeland sykehus, Bergen
Mæland, Arild, Infeksjonsmedisinsk avdeling, Ullevål sykehus, Oslo
Natås, Olav B., Mikrobiologisk avdeling, Rogaland sentralsykehus, Stavanger
Nordbø, Svein Arne, Avdeling for mikrobiologi, Regionsykehuset i Trondheim
Opsjøn, Sissel Linda, Avdeling for mikrobiologi, Regionsykehuset i Trondheim
Samdal, Helvi Holm, Avdeling for virologi, Statens institutt for folkehelse, Oslo
Schøyen, Rolf, Mikrobiologisk laboratorium, Vestfold Sentralsykehus, Tønsberg
Skar, Anne Grete, Mikrobiologisk avdeling, Ullevål sykehus, Oslo
Skaug, Kjell, Avdeling for virologi, Statens institutt for folkehelse, Oslo
Tjade, Trygve, Mikrobiologisk avdeling, Sentralsykehuset i Akershus, Nordbyhagen
Tveten, Yngvar, Telelab a/s, Laboratorium for medisinsk mikrobiologi, Gulset, Skien
Vik, Inger Sofie Samdal, Mikrobiologisk laboratorium, Fylkessjukehuset, Molde
Ørstavik, Ivar, Avdeling for virologi, Statens institutt for folkehelse, Oslo

PROGRAM

09.30 - 09.40	Velkommen, ved referansegruppens leder; Inger Sofie Samdal Vik
Møteleder: Del I	Gunnar Haukenes
09.40 - 10.00 (15 + 5') Birgitta Åsjø	HIV- struktur, biologi og patogenese
10.00 - 10.35 (30 + 5') Jan Albert	Betydning av HIV-1 subtyper
10.35 - 10.35	Kaffepause
10.50 - 11.20 (25 + 5') Helvi Holm Samdal	HIV-primærttesting og oppfølging av positivt resultat
11.20 - 11.40 (15 + 5') Kjell Skaug	HIV-infeksjon og bekreftelsestesting
11.40 - 12.05 (20 + 5') Svein Arne Nordbø	Kvalitative og kvantitative HIV-1 analyser
12.05 - 12.20 (10 + 5') Birgitta Åsjø	HIV isolering og karakterisering. Er det nødvendig?
12.20 - 12.35 (10 + 5') Gunnar Hoddevik	Bruk av internkontroll
12.35 - 12.50 (10 + 5') Ivar Ørstavik	Trenger vi en nasjonal godkjenningsordning for HIV-tester?
12.50 - 13.15 Gunnar Haukenes	Konklusjoner, diskusjon
13.15 - 14.00	Lunch
Møteleder: Del II	Helvi Holm Samdal
14.00 - 14.15 (10 + 5') Preben Aavitsland	Den norske HIV-epidemien og forebyggingstiltak
14.15 - 14.40 (20 + 5') Arild Mæland	Pasientmonitorering og antiviral terapi
14.40 - 15.00 (15 + 5') Rolf Lindemann	Perinatal HIV-smitte
15.00 - 15.20 (15 + 5') Egil Lingås	Helsearbeidere og HIV-smitte
15.20 - 15.45 Helvi Holm Samdal	Konklusjoner, diskusjon
15.45 - 17.00	Oppsummering

SAMMENDRAG OG ANBEFALINGER

Humant immunsvikt-virus

Humant immunsviktvirus (HIV) er etiologisk agens til ervervet immunsviktsyndrom (AIDS). Det hører til slekten *Lentivirus* i familien *Retroviridae* og genomet består av to RNA-tråder. Assosiert med RNA i nukleokapsidet finnes også de enzymer (revers transkriptase, RNase H og integrase) som er nødvendig for å omskrive viralt RNA til DNA og integrering i cellens genom. HIV finnes i to typer; HIV-1 og HIV-2. HIV-1 deles i to genetiske hovedgrupper som kalles M (major) og O (outlier). I gruppen M finnes minst 9 genetiske subtyper (benevnt A-H og J). Årsaken til at det oppstår subtyper er den raske genetiske forandringen som er karakteristisk for HIV. I visse strøk av verden dominerer spesielle subtyper. Isolering og *in vitro* dyrking av HIV gjorde det mulig å utvikle serologiske tester for å stille diagnosen hos pasienter med AIDS, påvise smittede personer som fortsatt er friske og forhindre smitte via blod/blodprodukter. Dagens tester påviser de kjente subtyper av HIV. Ved uventet eller avvikende resultat i forhold til klinikk kan dette skyldes en ny subtype eller variant av subtype. Det er i dag ikke klart om ulike subtyper skiller seg fra hverandre i biologiske egenskaper som virulens, smittsomhet og følsomhet for antivirale midler.

Melding om HIV-infeksjon i Norge

Omkring årsskiftet 1997/98 var det totalt påvist 1770 personer med HIV-infeksjon i Norge. Av disse fordelte 1640 seg på gruppene: homo/biseksuelle menn (660), stoffmisbrukere (386), heteroseksuelle (298) og innvandrere fra høyendemiske fødeland (296). De siste årene er det nydiagnostisert i overkant av 100 HIV-positive personer årlig. I Norge følges prevalensen av HIV-positive systematisk blant blodgivere, gravide og rekrutter. HIV-positive meldes semi-anonymt til Meldingssystem for smittsomme sykdommer (MSIS) idet navn ikke oppgis, heller ikke fødselsdag, men fødselsmåned og år. AIDS meldes nominativt, dvs. med alle persondata.

Laboratoriediagnostikk

Generelt:

Det skjer stadig en utvikling av nye metoder og nye analysestrategier diskuteres. Den medisinske faglige ansvarlige ved det enkelte laboratorium må selv løpende vurdere metodevalg.

Svake positive reaksjoner i forbindelse med serokonversjon og uspesifikke reaksjoner hos friske (falske positive) er årsak til de fleste diagnostiske problemene i Norge i dag. I tillegg må en være forberedt på at det kan dukke opp nye varianter/subtyper/grupper som testene ikke fanger.

Strategimøtet anbefaler at det i svaret til rekvirent brukes betegnelsen reaktiv og ikke positiv før den endelige konklusjonen foreligger.

Påvisning av anti-HIV:

a) Primærttesting:

Dagens anti-HIV ELISA primærttester fyller kravene til sensitivitet og spesifisitet. Testprinsippene er slik at det antas at både IgM og IgG antistoff blir påvist, og også infeksjon med HIV-gruppe O.

Primært reaktive sera skal restestes in duplo med samme testkit. Hvis en eller begge retestene er reaktive, utføres supplerings testing og/eller konfirmasjonstesting (se nedenfor) og det innhentes ny serumprøve.

Hvis 1. prøve bekreftes anti-HIV positiv innhentes ny prøve umiddelbart. Hensikten er å utelukke prøveforveksling.

Hvis 1. prøve ikke bekreftes positiv innhentes ny prøve etter minst 3 uker, eventuelt ved neste kontroll/blodtapping (gravide og blodgivere). Ved klar mistanke om eksposisjon kan ny prøve tas før det er gått 3 uker.

Ved negativ primæranalyse skal det når det foreligger mistanke om eksposisjon innhentes ny serumprøve etter minst 3 uker. I spesielle situasjoner kan det være aktuelt å ta prøve tidligere.

b) Bekreftelsestesting/avkreftelsestesting:

Western blot anvendes i Norge og mange andre land som gullstandard for både å bekrefte og avkreftede primærttest positive resultater. Minstekravet som må stilles til en positiv western blot-analyse er påvisning av antistoff mot både gag-, pol- og env-kodete proteiner, som anbefalt av f.eks. American Red Cross.

Strategimøtet vil fremheve at de enkelte western blot kits og batcher av samme kit kan variere. Det anbefales derfor at laboratoriene regelmessig kontrollerer de western blot kits de bruker med et eget svakt positivt serum.

Western blot påviser ikke IgM-antistoff og kan eventuelt være negativ ved ELISA-konversjonstidspunktet. Avlesningen er visuell/subjektiv og uspesifikke båndmønstre kan skape problemer.

På denne bakgrunn anser strategimøtet at det kan være like relevant først å undersøke et primærttest-reaktivt 1. serum med en supplerende test som å undersøke direkte med western blot (Den supplerende testen må være minst like sensitiv som primærttesten og forskjellig fra primærttesten når det gjelder antigensammensetning eller prinsipp. I praksis betyr dette at supplerings testen også kan brukes som primærttest, forutsatt akseptabel spesifisitet). Ved reaktivt resultat i supplerings testen, utføres western blot. Ved negativt resultat i den supplerende testen, kan en be om ny prøve uten å utføre western blot og dersom primærttesten er klart negativ på serum 2, kan en konkludere med negativt resultat. Dersom serum 2 er positivt med primærttesten er retningslinjene i Norge i dag at resultatene skal bekreftes eller avkreftes ved at både serum 1 og 2 undersøkes med western blot.

Avdeling for virologi, Statens institutt for folkehelse, presenterte på møtet resultater fra sin egen studie hvor verdien av bruk av en supplerende test på serum 2 ble evaluert. Resultatene etter to års observasjon tyder på at når supplerings testen er negativ også på serum 2, kan man

uten bruk av western blot konkludere med negativt resultat, uspesifikk reaksjon i primærttest. Det ble ikke diskutert på møtet om denne strategien skulle anbefales brukt i Norge.

Påvisning av HIV:

a) Virusisolering:

HIV-isolering er både tids- og ressurskrevende og skal kun skje i laboratorium med BSL-3 standard. Molekylærbiologiske metoder med høy sensitivitet og spesifisitet har langt på vei erstattet virusisolering. HIV-isolering, i begrenset omfang, kan fortsatt være aktuelt ved spesielle problemstillinger som: Identifisering av nye subtyper, klarlegging av smittekjeder, uvanlige sykdomsforløp og uttalt terapiresistens.

Strategimøtet anbefaler at HIV-isolering kun utføres ved laboratorier som har løpende erfaring med metoden. På Senter for virologisk forskning, Høyteknologisenteret i Bergen, kan isolering utføres etter avtale; se side 45-47.

b) Nukleinsyreanalyser:

Selv om flere av testene er godkjent for bruk av flere typer prøvematerialer, bør prøvetakingen standardiseres og optimaliseres slik at alle metodene kan benyttes

Det anbefales å benytte EDTA-blod, eventuelt EDTA-plasma, framfor serum (Det benyttes vanlige, kommersielt tilgjengelige tappeglass med EDTA). Heparin-blod/plasma bør ikke benyttes. Da RNA raskt brytes ned dersom prøvene ikke behandles optimalt, er det svært viktig at de foreslåtte retningslinjene blir fulgt. Det er alltid en fordel å ta kontakt på forhånd med laboratoriet som utfører analysene dersom det er lang prøvetransport, for å sikre en optimal forsendelse.

Kvalitative tester:

HIV kan påvises enten som provirus-DNA i infiserte lymfocytter eller som RNA i frie viruspartikler i plasma.

Kvalitative nukleinsyretester er blant annet aktuelle for å påvise smitte i vindusfasen hvor antistofftestene ennå ikke gir sikkert svar.

Til kvalitative DNA analyser; PCR (in-house) og NucliSens, sendes EDTA-blod direkte til laboratoriet som skal utføre testingen. Prøvene skal oppbevares i romtemperatur, og er holdbare i minst 4 døgn.

Kvantitative tester:

Disse brukes for å måle mengde fritt sirkulerende virus i plasma eller spinalvæske. I dag finnes det 3 kommersielle kvantitative tester på markedet. (Quantiplex "branched DNA", Amplicor og NucliSens). Resultatene av kvantitativ testing brukes sammen med andre parametre, for å avgjøre om man skal starte med antiviral behandling, og for å følge effekten av behandlingen.

Også til de kvantitative testene oppbevares EDTA-blodet i romtemperatur inntil det blir sentrifugert. Separasjon av plasma bør skje innen 4 timer (Quantiplex "branched DNA"), 6 timer (Amplicor) eller 30 timer (NucliSens) etter prøvetakingen. Vanlig bordsentrifugering uten kjøling med ca. 1000 x g i bunnen av røret i 10-20 min. er tilstrekkelig. Avpipettering

bør skje med plastpipette. HIV-1 RNA er stabilt i plasma ved romtemperatur i 1 døgn (Amplicor) til 4 døgn (NucliSens) og ved 2-8⁰ C i minst 5 døgn og kan frysetines, i motsetning til serum hvor frysetining medfører rask reduksjon i mengden av HIV-1 RNA som kan detekteres.

HIV-1 RNA i plasma har god holdbarhet i frosset tilstand. Dersom prøvene skal oppbevares i lengre tid før testing, anbefales nedfrysing til -70⁰ C.

For Quantiplex "branched DNA" testen anbefales det at plasma fryses ned til -70⁰ C innen 30 min. etter separasjon fra cellene (holdbarheten ved -20⁰ C er 72 timer). Eventuell transport av plasma til denne analysen bør skje på tørris.

Bestemmelse av en pasients RNA-nivå under terapi bør skje med en så sensitiv metode som mulig. Jo lavere man kommer etter terapistart desto større er sjansen for fremtidig vedvarende effekt. De beste testenenes nedre grense er i dag på ca. 50 viruspartikler/ml, men utviklingen av mer følsomme kvantitative tester for HIV-1 fortsetter.

CD4-tallet og HIV-RNA i plasma er de viktigste prognosemarkørene. Det er viktig at hver pasient følges med samme kvantiteringsmetode fordi hver pasient er sin "egen kontroll". Dersom resultatet ikke stemmer med det kliniske bildet, må en kontrollere med andre kvantitative tester. Avviket kan skyldes at pasienten er infisert med en subtype/variant som den først valgte test ikke fanger opp.

c) p24 antigen:

De kvalitative nukleinsyretestene er vist å ha høyere følsomhet enn ELISA-tester som påviser p24 antigen.

Tester for påvisning av p24 antigen anbefales ikke lenger brukt som mål på effekt av behandling.

I forbindelse med transplantasjon er det fortsatt rutine at giver skal undersøkes på p24 antigen (EU-krav).

Internkontroll for primæranalyser:

Strategimøtet anbefaler at det brukes en svak positiv internkontroll i hvert oppsett. Kontrollen kommer i tillegg til de validitetskontrollene som følger med testen. Kontrollen skal om mulig være kalibrert mot internasjonalt akseptert standard, men foreløpig finnes ikke dette for HIV. Hensikten med denne kontrollen er å kontrollere inter-batch og inter-assay reproduserbarhet og nøyaktighet. Dersom internkontrollen ved overgang til et nytt batch-nummer av testen viser vesentlig endring av verdien i forhold til det vanlige, kan det bety at diagnostisk følsomhet er endret.

Kommersielle sera til bruk som internkontroll finnes. Avdeling for virologi, Folkehelse, har produsert for salg en internkontroll for primær anti-HIV testing. Det ble anbefalt at man etablerer et rapporteringssystem fra brukerne om erfaringene med denne kontrollen slik at disse kan komme alle til nytte. Avdeling for virologi ved Folkehelse oppfordres til å ta et initiativ.

Nasjonal godkjenningsordning for HIV-tester

Internasjonalt går utviklingen i retning av å kreve formell godkjenning av nye tester som ønskes introdusert. Møtet frarådet opprettelsen av et nasjonalt godkjenningssystem som kunne bli både kostbart og tungrodd.

Møtet anbefalte opprettelsen en nasjonal gruppe som kan gi råd om valg og bruk av HIV-tester. Avdeling for virologi ved Folkehelse oppfordres til å ta et initiativ.

Behandling

Generelt:

I løpet av de siste 2-3 årene har det nærmest skjedd en revolusjon i HIV-behandlingen. Dette skyldes i hovedsak tre forhold:

1. Ny kunnskap om HIV-infeksjonens dynamikk og forløp
2. Utvikling av følsomme metoder for å bestemme mengden virus i plasma
3. Utvikling av proteinasehemmere som kan kombineres med reverstranskriptase-hemmere til en behandling som er effektiv for et flertall av pasientene.

HIV-RNA mengden i plasma sammen med CD4-tallet er de to viktigste prognostiske markørene for pasienter med HIV-infeksjon. Forholdet mellom disse markørene brukes også til å avgjøre når asymptomatiske pasienter skal begynne med antiviral behandling. Hos pasienter med symptomer starter behandlingen så snart som mulig. Pasienter hvor behandlingen utsettes, følges med HIV-RNA kvantitering og CD4-måling hver 6. måned mens de som behandles kontrolleres hver 3. måned. Fordi pasientene er sine egne kontroller er det viktig at HIV-RNA kvantiteringen skjer med samme kommersielle test.

Gravide og nyfødte:

Det viktigste er å forebygge HIV-smitte fra mor til barn. Nå behandles HIV-positive gravide med revers-transkriptasehemmere.

Barn født av HIV-positive mødre vil være antistoff positive på grunn av passivt overført maternelt IgG. Dette kan påvises opptil 2 års alder. Før de maternelle antistoffene er borte, må mulig HIV-smitte hos barnet utredes med PCR-undersøkelse (påvisning av virus). Navlesnorblod er uegnet for å avklare smitte. Barnet følges med anti-HIV- (EIA) og HIV-DNA-undersøkelse hver 3. måned. Prøvematerialet skal være EDTA-blod. Barnet følges etter fødselen, om nødvendig i opptil 2 år for å avklare HIV-smitte. Det er stor uenighet om hvorvidt barn som er født av HIV positive mødre skal ha profylakse med zidovudin etter fødselen.

For å hindre HIV-smitte til barnet frarådes amming.

Helsearbeidere og HIV-smitte:

Det vises til veileder, "Forebygging av blodsmitte i helsevesenet" som er et vedlegg til smittevernloven (Kan bestilles gratis fra Statens helsetilsyn. Rekvisisjon IK-nummer: 2552, tlf: 22 24 88 88 eller faks: 22 24 95 90).

Profylaktisk behandling skal startes på mistanke om aktuell HIV-smitte. Strategimøtet stilte spørsmålsteget ved duobehandling når flere land alltid anbefaler trippelbehandling. Strategimøtet anbefaler at den ansvarlige sammen med de ansatte gjennomgår rutine for handling i akutsituasjoner.

HIV-struktur, biologi och patogenes

Birgitta Åsjö, Avd. för mikrobiologi och immunologi, Gade institutt, Universitetet i Bergen

Humant immunbristvirus (HIV) är etiologiskt agens till det förvärvade immunbristsyndromet AIDS och HIV-epidemin representerar ur flera aspekter (medicinshistoriskt, socialt, virologiskt och molekylärbiologiskt) en unik situation. HIV har fungerat som en väldig "katalysator" för forskning kring virus-värdcellsrelationer, cellbiologi, molekylärbiologi och 3-dimensionell strukturbiologi.

VIRUS

Utmärkande för släktet Lentivirus och till skillnad från andra retrovirus inom familjen *Retroviridae* har lentivirus ett anmärkningsvärt komplext genom (1). Det c:a 9 kilobas stora genom innehåller 9 kända gener (Fig 1a) som kodar för strukturella och regulatoriska proteiner samt virala enzymer nödvändiga för omvänd transkription, integrering och den mognad av viruspartikeln som måste ske efter att virus lämnat den infekterade cellen. Virusgenomet har i 3' och 5' änden "long terminal repeats" (LTR) innehållande promotor-enhancersekvenser samt "response elements" (2,3) för cellulära transkriptionsfaktorer (Fig 2). Principiellt kan man se en tidig och en sen fas i HIVs replikationscykel. I den tidiga fasen (Fig. 1b) syntetiseras regulatoriska proteiner (huvudsakligen tat och rev, men också nef) från dubbelsplitsade mRNA (4). Av regulatoriska proteiner är tat och rev helt nödvändiga i virus livscykel. Efter bindning till sitt response element (TAR) inom LTR fungerar tat som en elongeringsfaktor för mRNA och stimulerar således transkriptionen av HIV. Rev är ett skyttelprotein mellan cellens kärna och cytoplasma. Det är associerat med cellens spliceosomer. Med hjälp av rev proteinet bundet till sitt response element (RRE) i icke-splitsat genomiskt RNA och enkelsplitsade mRNA, kan dessa passera genom kärnmembranet till cytoplasman för translatering (5). Nef är inte absolut nödvändigt i virus livscykel men påverkar replikationsförmågan och nedreglerar uttrycket av CD4 på den infekterade cellens yta. Deletioner i nef ger ett virus som replikerar mycket dåligt i primära celler (6) både *in vitro* och *in vivo* i apor (7). Mutationer i nef har fått stort intresse som en möjlig väg att utveckla ett levande försvagat vaccin. Vaccinförsök med nef-muterat SIV i apor har visat skydd vid provokation med vildtyp SIV (8). Vidare har man funnit muterade nef-gener hos flera HIV-smittade personer vilka definierats som "långtidsöverlevare" (9).

I den sena translationsfasen (Fig. 1c) syntetiseras de proteiner vilka ingår i själva viruspartikeln.

HIV är ett höljeklätt virus (10). Virionen har en ikosahedral struktur med 72 utskott. Dessa är uppbyggda av två proteiner gp120 och gp41. I höljet finns det rikligt med cellulära proteiner (adhesionsmolekyler som ICAM-1, transplantationsantigen HLA klass I och II m.fl.) vilka följer med från värdcellen i samband med knoppningsprocessen. Matrixprotein p17 finns mellan höljet och själva kapsiden. Denna är uppbyggd av p24 proteinet och innehåller virusgenomet, vilket består av två RNA-trådar, var och en c:a 9 kb långa. Associerat med RNA i kapsiden finns också de enzymer (reverse transkriptase, RNase H och integrase) vilka är nödvändiga för att omskriva viralt RNA till DNA och integrering i cellens genom. Två HIV specifika proteiner Vpr (11) och Vpu (12), uttrycks bara i den infekterade cellen. Vpr hindrar cellen från att gå in i mitos och dela sig genom en arrest i G2 fasen. Vpu nedreglerar uttrycket av CD4 på den infekterade cellen. Effekten förstärks i samband med nef.

Vif är en "infektivitetsfaktor" och nödvändig för infektion av primära lymfocyter samt av vissa men inte alla T celledlinjer (13). Det råder fortfarande delade meningar om vif finns med i själva virionen eller bara uttrycks i den infekterade cellen.

HIV finns i två typer, HIV-1 och HIV-2. HIV-1 indelas ytterligare i grupp M och grupp O virus där grupp M har blivit bäst karakteriserad med 9 kända undergrupper (clades) (se manuskript av Jan Albert).

INFEKTION

HIV infekterar huvudsakligen CD4+ lymfocyter men också monocyter och olika vävnadsmakrofager (inklusive mikroglia celler) fungerar som målceller. Förutom CD4 molekylen, som är primär receptor för HIV, måste virus binda till ytterligare cellulär(a) komponent(er). Detta har man känt till länge genom att animala celler som transfekterats med human CD4 inte blev permissiva för HIV infektion (14). För c:a två år sedan identifierades denna sekundära receptor. Den representeras antingen av en α (CXCR4) eller en β (CCR5) - kemokinreceptor (15). Upptäckten av dessa receptorer representerar en milpelare inom HIV forskningen eftersom det gav en biologisk förklaring till de olikheter i *in vitro* biologiska egenskaper man funnit och som legat till grund för skillnader i celltropism (16). CXCR4 eller fusin uttrycks på de flesta celler och användes av de HIV varianter som kan isoleras från halvparten av patienter i sena sjukdomsstadier. Dessa virus kan infektera och replikera i en rad olika CD4+ celledlinjer förutom i primära mononukleära celler. De inducerar karakteristiska multinukleära jätteceller (syncytier) i indikatorlinjen MT-2 och har därför benämnts syncytiebildande (SI) virus, T celltrofa eller "rapid/high" (17). En del SI virus kan i tillegg till CXCR4 använda sig av β -kemokinreceptorerna CCR5, CCR3 eller CCR2. CCR5 uttrycks efter aktivering av mononukleära celler och finns ytterst sällan på etablerade celledlinjer. Denna receptor används av de virusvarianter som kallas icke syncytiebildande (NSI), makrofagtrofa eller "slow/low" och som kan isoleras under hela HIV-infektionen. Figur 3 sammanfattar HIVs livscykel från bindning och penetration, omvänd transkription och integrering till frisättning av nya partiklar genom avknoppning och extracellulär mognad då det virusspecifika proteaset klyver gag-prekursormolekylen så den karakteristiska konformade kapsiden kan bildas.

PATOGENES

Kännetecknande för HIV-infektionen är en kontinuerlig nedgång i antalet CD4+ celler. Detta leder till en immunbrist med åtföljande opportunistiska mikrobiella infektioner och vissa tumörformer och som med ett gemensamt namn kallas AIDS. C:a 15 år efter att HIV isolerats och identifierats som etiologiskt agens till AIDS känner vi infektionsförloppet relativt gott (Fig 4). Efter den primära infektionsfasen, som kan vara symptomatisk eller asymptomatisk, förekommer HIV i mycket höga nivåer i plasma och kan då endast påvisas i form av HIV-RNA eller p24 antigen. Vid serokonversion sjunker virusmängden och är ofta under detektionsnivå, dock med påvisbara toppar av och till, under ett varierande antal år. Med tiden ökar mängden virus (virus load) i plasma, antalet CD4+ celler sjunker under kritiska nivåer och patienterna börjar få symptom på sin immunbrist. Patienterna har gått från det asymptomatiske till den symptomatiske stadiet (18).

Trots intensiv forskningsaktivitet har man inte helt lyckats avklara vilken/vilka mekanismer som ligger bakom den så gott som totala förlusten av CD4+ celler. Effekten av HIV *in vitro* på primära lymfocyter varierar med olika virusvarianter och kan vara direkt lytisk, syncytiebildande eller knappt märkbar. *In vivo* är det inte klarlagt om HIV är lytiskt.

Syncytiebildning tycks vara sällan förekommande men kan ses i hjärna och i tonsillväv samt i adenoidväv (19,20). Apoptos är också en aktuell dödsorsak för både CD4+ och CD8+ celler. Sannolikt är det en kombination av flera mekanismer som får de CD4+ cellerna att försvinna. Det var länge ett mysterium hur så få infekterade celler ($1/10^4$ - $1/10^5$ i blod) kunde leda till förlust av så många CD4+ celler. Svaret var att man bara undersökt blod och inte lymfatisk väv där den huvudsakliga virusreplikationen sker. Det förekommer inte en verkligt latent fas i HIV-infektionen utan virusreplikationen är aktiv och pågående från 1:a dag (21,22). Det anges att c:a 10^{10} virioner produceras var dag och en infekterad CD4+ cell möjligen lever i 2 dagar (23). Ett viktigt undantag är de relativt få HIV-infekterade CD4+ minnescellerna som lever länge (okänt hur länge). Antalet lymfocyter i perifert blod representerar endast c:a 2% av totala antalet lymfocyter som finns i kroppen medan mestparten befinner sig i olika lymfoida organ (24). En viktig fråga är om nedgången av CD4+ lymfocyter i blod är en återspeglning av samma nedgång i lymfatisk väv. I tonsillbiopsier från HIV-infekterade personer i olika sjukdomsstadier har vi kunnat visa att CD4 talet hålls relativt konstant trots mycket variabla CD4 tal i blod. Först i sena stadier av HIV-infektionen med mycket låga CD4 tal i blod förloras också CD4+ celler i lymfatiska organ. Vi har vidare funnit att antalet CD4+ celler med replikationskompetent virus sällan överstiger 1%. Under denna infektionsnivå tycks CD4+ cellerna kunna ersättas så att CD4 cellsnivåerna i tonsill håller sig relativt konstanta. Vid 1% CD4+ celler med infektiöst virus nås antagligen ett kritiskt stadium där kompenseringen inte tycks kunna upprätthållas utan det blir reella cellförluster (25).

Ett välkänt problem i behandling av mikroorganismer (bakterier såväl som virus) är utveckling av resistens och HIV är inget undantag. Eftersom virusreplikation är en förutsättning för att resistent virus skall uppstå betyder det att man bör eftersträva så kraftig behandling att virusreplikationen inte längre kan detekteras. Behandlingseffekten bör också maximeras genom att kombinera droger som angriper olika steg i virus livscykel. Virusspecifika enzymer representerar naturliga angreppspunkter för antiviral behandling men också andra proteiner och gener är tänkbara. Fig. 3 anger olika strategier för antiviral behandling. Dagens behandling rättar sig mot ett tidigt steg (reverse transkriptase) och ett sent steg (proteas) i HIVs livscykel. Flera olika strategier för genterapi är under utveckling. De innebär bland annat bruk av antisens oligonukleotider, ribozymmer och transdominanta negativa proteiner. Ett generellt problem för dessa genetiska antiviralia är att få tillräckligt upptag och koncentration av medlen i de infekterade cellerna. Sammantaget har de senaste 2-3 åren inneburit en helomvändning i vår syn på HIV-infektionen och dess behandlingsmöjligheter. Vi vet att HIV förökar sig hela tiden och huvudsakligen i lymfatisk väv. Virusbördan säger mer om sjukdomsförloppet än CD4 talet i blod. Det viktigaste för att hindra sjukdomsprogression är att bromsa virusreplikationen mest möjligt. Kanske kommer vi uppleva att HIV-infektionen blir en behandlingsbar virusinfektion. För > 90% av världens HIV-smittade är antiviral behandling en ekonomisk omöjlighet och ett vaccin framstår fortfarande som enda lösningen på världens HIV-problem.

REFERENSER

1. Green, W.C.: The molecular biology of human immunodeficiency virus type-1 infection. *N.E.J.M.* 324:308-317, 1991
2. Haseltine, W.A.: Molecular biology of the human immunodeficiency virus type 1. *FASEB J.* 5:2349-60, 1991
3. Gaynor, R.: Cellular transcription factors involved in the regulation of HIV-1 gene expression. *AIDS* 6:347-363, 1992
4. Cullen, B.R.: Regulation of HIV gene expression. *AIDS* 9:S19-32, 1995
5. Szilvay, A.M., Brokstad, K.A., Kopperud, R., Haukenes, G. and Kalland, K.H.: Nuclear export of the human immunodeficiency virus type 1 nucleoplasmatic shuttle protein rev is mediated by its activation domain and is blocked by trans-dominant negative mutants. *J.Virol.* 69:3315-23, 1995
6. Chowers, M.Y., Spina, C.A., Kwok, T.J., Fitch, N.J.S., Richman, D.D. and Guatelli, J.C.: Optimal infectivity in vitro of human immunodeficiency virus type 1 requires an intact nef gene. *J.Virol.*68:2906-14, 1994
7. Kestler III, H.W., Ringler, D.J., Mori, K., Panicali, D.L., Sehgal, P.K., Daniel, M.D. and Desrosiers, R.C.: Importance of the nef gene for maintenance of high virus loads and for development of AIDS. *Cell* 65:651-662, 1991
8. Daniels, M.D., Kirchhoff, F., Czajak, S.C., Sehgal, P.K. and Desrosiers, R.C.: Protective effects of a live-attenuated SIV vaccine with a deletion in the nef gene. *Science* 258:1938-41, 1992
9. Deacon, N.J., Tsykin, A., Solomon, A. et al.: Genomic structure of an attenuated quasispecies of HIV-1 from a blood transfusion donor and recipients. *Science* 270:988-91, 1995
10. Gelderblom, H.R., Hausmann, E.H.S., Ozel, M. et al.: Fine structure of human immunodeficiency virus (HIV) and immunolocalization of structural proteins. *Virology* 156:171-76, 1987
11. Ayyavoo, V., Mahalingam, S., Rafaeli, Y., Koshodkar, S., Chang, D, Nagashunmugam, T., Williams, W.V. and Weiner, D.B.: HIV-1 viral protein R (vpr) regulates replication and cellular proliferation in T cells and monocytoid cells in vitro. *J.Leukoc.Biol.* 62:93-99, 1997
12. Fujita, K., Maldarelli, F. and Silver, J.: Bimodal down-regulation of CD4 in cells expressing human immunodeficiency virus type 1 vpr and env. *J.Gen.Virol.* 77:2393-401, 1996
13. Goncalves, J., Korin, Y., Zack, J. and Gabuzda, D.: Role of vif in human immunodeficiency virus type 1 reverse transcription. *J.Virol.* 70:8701-9, 1996
14. Tersmette, M., Van Dongen, J.J.M., Clapham, P.R., Goede, R.E.Y., Wolvers-Tettero, I.L.M., Guerts van Kessel, A., Huisman, J.G., Weiss, R.A. and Miedema, F.: Human immunodeficiency virus infection studied in CD4-expressing human-murine T-cell hybrids. *Virology* 168:267-273, 1989
15. Broder, C.C. and Collman, R.G.: Chemokine receptors and HIV. *J.Leukoc. Biol.* 62:20-29, 1997
16. Åsjö, B., Morfeldt-Månson, L., Albert, J., Biberfeld, G., Karlsson, A., Lidman, K. and Fenyö, E.M.: Replicative capacity of human immunodeficiency virus from patients with varying severity of HIV infection. *Lancet* ii:660-62, 1986
17. Koot, M., Keet, I.P., Vos, A.H., de Goede, R.E., Roos, M.T., Coutinho, R.A., Miedema, F., Schellekens, P.T. and Tersmette, M.: Prognostic value of HIV-1 syncytium-inducing phenotype for rate of CD4+ cell depletion and progression to AIDS. *Ann.Intern.Med.* 118:681-88, 1993
18. Cohn, J.A.: HIV-1 infection. *BMJ* 314:487-491, 1997

19. Sharer, L.R.: Pathology of HIV-1 infection of the central nervous system. A review. *J.Neuropathol.Exp.Neurol.* 51:3-11, 1992
20. Frankel, S.S., Tenner-Racz, K., Racz, P., Wenig, B.M., Hansen, C.H., Nelson, A.M., Pope, M. and Steinman, R.M.: Active replication of HIV-1 at the lymphoepithelial surface of the tonsil. *Am.J.Pathol.* 151:89-96, 1997
21. Embretsen, J., Zupanic, M, Ribas, J.L., Burke, A., Racz, P., Tenner-Racz, K. and Haase, A.T.: Massive covert infection of helper T lymphocytes and macrophages by HIV during the incubation period of AIDS. *Nature* 362:359-62, 1993
22. Pantaleo, G., Graziosi, C., Demarest, J.F., Butini, L., Montroni, M., Fox, C.H., Orenstein, J.M., Kotler, D.P. and Fauci, A.S.: HIV infection is active and progressive in lymphoid tissue during the clinically latent stage of disease. *Nature* 362:355-58, 1993
23. Perelson, A.S., Neumann, A.U., Markowitz, M., Leonard, J.M. and Ho, D.D.: HIV-1 dynamics in vivo: virion clearance rate, infected cell life span and virion generation time. *Science* 271:1582-86, 1996
24. Røsok, B.I., Bostad, L., Voltersvik, P., Olofsson, J., Åsjö, B. and Brinchmann, J.E.: Reduced CD4 cell counts in blood do not reflect CD4 cell depletion in tonsillar tissue in asymptomatic HIV-1 infection. *AIDS* 10:F35-38, 1996
25. Røsok, B.I., Brinchmann, J.E., Voltersvik, P., Olofsson, J. and Åsjö, B.: Correlates of latent and productive HIV-1 infection in tonsillar tissue. *Proc.Natl. Acad.Sci. USA*, 94:9332-36, 1997
26. Cann, A.J. and Karn J.: Molecular biology of HIV: new insights into the virus life-cycle. *AIDS* 3:S19-34,1989
27. Fauci, A., Pantaleo, G., Stanley, S. and Weissman, D.: Immunopathogenic mechanisms of HIV infection. *Ann.Intern.Med.* 124:654-63, 1996

BETYDELSE AV HIV-1 SUBTYPER

Jan Albert, Virologiska enheten, Smittskyddsinstitutet, Stockholm

Bakgrund och epidemiologi

HIV-1 delas in två genetiska huvudgrupper kallade M (major) och O (outlier), inom grupp M finns minst 9 genetiska subtyper (A-J)(1). För en utförlig beskrivning av genetiska subtyper och hur de definieras hänvisas till det kompendium som utges av HIV databasen i Los Alamos (1) som också finns tillgängligt via internet (<http://hiv-web.lanl.gov>). Orsaken till att de genetiska subtyper uppkommit är fr.a. den snabba genetiska förändring som karakteriserar HIV, men även epidemiologiska faktorer t.ex. så kallade "founder effects". Subtyperna uppvisar en ojämn utbredning över världen. I centrala Afrika har alla subtyper har påvisats, men subtyp A och D dominerar (1). Subtyp B dominerar i västvärlden (1) och som en konsekvens baseras mycket av vår kunskap om HIV-1 på studier av subtyp B, något som är olyckligt eftersom flera andra subtyper är minst lika viktiga ur globalt perspektiv. Subtyp C dominerar i östra och södra Afrika samt i Indien (1). Subtyp E är vanligast i Thailand och angränsande länder (1). Subtyp F-J är mer ovanliga, men har rapporterats från centrala Afrika och flera andra kontinenter (1). Grupp O virus förekommer lågprevalent i fr.a. Kamerun och Gabon, men har också rapporterats från flera europeiska länder hos personer med anknytning till dessa två länder (1). P.g.a. av att de flesta genetiska subtyperna har sin karakteristiska utbredning kan kunskap om vilken subtyp en person är infekterad med ge värdefull epidemiologisk information.

Ett av kriterierna för definitionen av en genetisk subtyp säger att en subtyp inte ska vara rekombinant, d.v.s. att alla delar av genomet ska tillhöra samma subtyp (d.v.s. ha samma epidemiologiska historia). Det är viktigt att känna till att detta kriterium inte uppfylls av flera de nuvarande genetiska subtyperna. Sålunda finns det inget virus isolat som är en "ren" subtyp E eller G utan alla kända isolat av dessa subtyper är rekombinanta eftersom delar av genomet härrör från subtyp A. Av bl.a. detta skäl är det troligt att de nuvarande kriterierna för definitionen subtyper kommer att revideras (Thomas Leitner, Los Alamos, personlig kommunikation).

Metoder för att bestämma subtyp

Tre olika metoder har huvudsakligen använts för att bestämma den HIV-1 subtyp som en individ bär på, nämligen sekvensering, heteroduplex mobility assay (HMA) och serologi. Var och en har sina fördelar och nackdelar.

DNA eller RNA sekvensering med efterföljande fylogenetisk trädanalys kan betraktas som gyllene standard. Dock kan både sekvenseringen och trädanalys göras på många olika sätt. En relativt utförlig redogörelse av Thomas Leitner finns publicerad i HIV databas kompendiet (1). En vanlig och relativt enkel strategi är att PCR amplifiera V3 området i HIV-1 höljegen (env) direkt från DNA i patientlymfocyter, att sedan sekvensera PCR fragmentet med "cycle sequencing" teknik och till sist utföra trädanalys med neighbor-joining eller maximum likelihood metod med hjälp av PHYLIP programmet (1,2). Analys av detta korta fragment ger i de allra flesta fall samma information som analys av längre DNA fragment (1). Andra delar av genomet t.ex. p17 fragmentet ger också tillförlitlig information. Rekombinanta virus är vanliga och utgör ett speciellt problem eftersom analys av ett litet genfragment såsom V3 eller p17 oftast inte avslöjar att ett virus är rekombinant. Ett sätt att attackera problemet är

att sekvensera två genfragment från skilda delar av genomet, t.ex. p17 och V3, men för att helt utesluta rekombination måste hela genomet sekvenseras, något som självklart bara kan göras på ett fåtal speciellt utvalda stammar. DNA sekvensering är även i sin enklaste form en relativt komplicerad metod som knappast kan användas i storskalig screening, men att subtypbestämma upp till något hundratal HIV stammar med hjälp av DNA sekvensering är fullt möjligt för ett laboratorium med erfarenhet av metoden.

Heteroduplex mobility assay "HMA" är också en molekylär biologisk metod som bygger på PCR (3). I detta fall hybridiseras dock PCR amplifikatet från det okända provet med kända kontroller representerande olika subtyper (prober). Likheten mellan prov och respektive probe kan sedan utvärderas genom gelelektrofores. Metoden är enklare än DNA sekvensering, men fortfarande relativt resurskrävande. Analysresultatet överensstämmer väl med DNA sekvensering, men en viss risk för feltypning föreligger (3). En HMA kit i halvfabrikat finns att erhålla från NIH AIDS reagent programme.

Serologiska tester för subtypbestämning är attraktiva p.g.a. sin enkelhet, men tyvärr är precisionen inte alls lika hög som för de genetiska testerna. Detta beror på att antikroppar uppvisar en betydande grad av korsreaktivitet mellan subtyper (4). De vanligaste metoderna är baserade på peptider från V3 loopen i HIV:s hölje, men andra principer har också beskrivits.

Diagnostiska antikroppstest

Så gott som alla kommersiella antikroppstester som används idag är baserade på antigener representerande subtyp B, i vissa test finns även HIV-2 och HIV-1 grupp O antigen inkluderat. Erfarenheten visar att korsreaktionen mellan HIV-1 subtyper i de allra flesta fall är så god att subtyp B antigen kan användas för att med stor säkerhet också påvisa infektion med andra subtyper. Det finns dock några påpekanden som behöver göras. Det finns data som talar för att dagens subtyp B baserade tester kan vara sämre på att tidigt detektera serokonversion med subtyp A virus (och ev. andra subtyper) än serokonversion med subtyp B. Detta verkar fr.a. gälla 3:e generations ELISA test med som har mycket hög specificitet. Ett fullt utvecklat antikroppsmönster verkar dock inte utgöra ett problem. Flera av tidigare generationers HIV antikroppstester (ELISA) hade klara brister i förmågan att påvisa infektion med grupp O virus. De flesta tillverkare har därför inkluderat någon form av grupp O antigen (peptid eller rekombinant protein) i sina tester, vilket har minskat problemet markant. Det måste dock påpekas att den genetiska variationen inom grupp O är minst lika stor som inom grupp M och därför behöver inte ett enda grupp O antigen vara idealiskt för påvisning av alla grupp O infektioner.

HIV-1 RNA kvantifiering i plasma

Det har visats att flera kommersiella HIV RNA kvantifieringstest inte ger tillförlitliga resultat hos individer infekterade med vissa subtyper (5). På samma sätt som antikroppstesterna är RNA testerna i huvudsak utvecklade och uttestade på subtyp B prov. Vi har visat att både Roches HIV monitor test och Organons NASBA (Nuclisens) test ger falskt låga eller helt negativa resultat på många prov från subtyp A infekterade individer (5). Subtyp C och D verkar kvantifieras ungefär lika bra som subtyp B, medan situationen för resterande subtyper (E, F, G, H, I, J) är mer oklar. Grupp O kvantifieras inte heller tillförlitligt. Chirons bDNA test förfaller vara mer tillförlitlig än de andra två testerna. Roche och Organon är dock medvetna om problemen med sina tester och andra generations test är under utveckling och

finns i vissa fall redan tillgängliga. Problemen med kvantifiering av vissa subtyper bör därför vara betydligt mindre redan inom kort tid.

Det bör nämnas att de kommersiella test för diagnostiskt påvisning av HIV DNA i princip lider av samma problem. Vi har visat att Roches HIV-1 Amplicor i standard utförande ger många falskt negativa resultat på Afrikanska prov (6). Relativt enkla modifieringar förbättrade resultaten högst avsevärt (6). Även här kan förbättrade 2:a generationstest förväntas inom kort.

Sjukdomsprogress och smittsamhet

Det finns mycket få studier som har undersökt om det finns subtyp-specifika skillnader i virulens och smittsamhet. Det har förslagits att subtyp E skulle vara mer smittsamt än subtyp B och det skulle förklara att subtyp E ersatt subtyp B som vanligaste subtyp i Thailand (7), men dessa data har nyligen ifrågasatts (8,9). Det finns likaså mycket få studier som jämför virulens mellan subtyper. Preliminära data från en studie talar snarast emot att det skillnader i virulens mellan subtyp B och C (10). Vi har data som talar i samma riktning (Alaeus *et al.*, personlig kommunikation), men helt klart krävs ytterligare studier innan några säkra slutsatser kan dras. Man bör minnas att genetiska faktorer kan påverka virulens eftersom det är klarlagt att HIV-1 är mer virulent än HIV-2 (11). Likaså finns det ett starkt samband mellan biologisk fenotyp hos HIV och virulens så att rapid/high, SI stammar är mer virulenta än slow/low, NSI stammar (12-15). Vi har undersökt om biologisk fenotyp, som bestäms av chemokin-coreceptor användning skiljer sig mellan subtyper (16). Vi fann att CXCR4 användning bestämmer biologisk fenotyp för alla subtyper, men att CXCR4, SI fenotyp var under-representerad hos subtyp C. I analogi med subtyp B skulle detta kunna tala för att subtyp C är mindre virulent än andra subtyper, en hypotes som bör prövas i prospektiva studier.

Antiviral behandling

Väldigt lite är känt om eventuella skillnader i antiviral känslighet mellan subtyper, dock talar tillgängliga data för att skillnaderna i de flesta fall är små. Grupp O virus och HIV-2 är dock oftast resistent mot den grupp läkemedel som kallas non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTI) till vilken bl.a. nevirapine och delaviridine hör. Vi har jämfört känslighet för AZT, ddI, 3TC, nevirapine, ritonavir och foscavir hos HIV isolat representerande subtyp A - E och fann inga skillnader mellan subtyper (17). Dock har enligt preliminära rapporter andra funnit att enstaka subtyp A isolat har sänkt känslighet för nevirapine.

Sammanfattning

Sammanfattningsvis kan sägas att subtypsbestämning kan ge viktig epidemiologisk information och kan hjälpa till att förklara oväntade laboratorietestresultat, fr.a. oväntat låga HIV RNA nivåer. Det finns för närvarande mycket knapphändig information om eventuella skillnader mellan subtyper vad gäller biologiska egenskaper såsom virulens, smittsamhet, och känslighet för antivirala läkemedel. Tillgängliga data talar dock snarast emot förekomst av stora skillnader. Troligen är individuella variationer hos både virus och värd inom subtyp betydligt viktigare än skillnader mellan subtyper.

REFERENSER

1. Myers G, Korber B, Foley B, Jeang K-T, Mellors JW, Wain-Hobson S. (1996) Human retroviruses and AIDS 1996: A compilation and analysis of nucleic acid and amino acid sequences. Theoretical Biology and Biophysics Group T10, Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, New Mexico, USA.
2. Leitner T, Korovina G, Marquina S, Smolskaya T, Albert J. Molecular and biological characterization of Russian HIV-1 strains. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1996;12:1595-603.
3. Bachmann MH, Delwart EL, Shpaer EG, Lingenfelter P, Singal R, Mullins JI. HIV type 1 variation in World Health Organization-sponsored vaccine evaluation sites: genetic screening, sequence analysis, and preliminary biological characterization of selected viral strains. WHO. Network for HIV Isolation and Characterization. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1994;10:1327-43.
4. Pau CP, Kai M, Holloman-Candal DL, Luo CC, Kalish ML, Schochetman G, Byers B, George JR. Antigenic variation and serotyping of HIV type 1 from four World Health Organization-sponsored HIV vaccine sites. WHO Network for HIV Isolation and Characterization. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1994;10:1369-77.
5. Alaeus A, Lidman K, Sönnerborg A, Albert J. Subtype-specific problems with quantification of plasma HIV-1 RNA. *AIDS* 1997;11:859-65.
6. Lyamuya E, Bredberg-Rådén U, Albert J, Grankvist O, Msangi V, Kagoma C, Mhalu F, Biberfeld G. Comparison of in-house and commercial sample preparation and PCR amplification systems for the detection of HIV-1 in African samples. *J Clin Microbiol* 1997;35:278-80.
7. Soto-Ramirez LE, Renjifo B, McLane MF, Marlink R, O'Hara C, Sutthent R, Wasi C, Vithayasai P, Vithayasai V, Apichartpiyakul C, Auewarakul P, Pena Cruz V, Chui DS, Osathanondh R, Mayer K, Lee TH, Essex M. HIV-1 Langerhans' cell tropism associated with heterosexual transmission of HIV. *Science* 1996;271:1291-3.
8. Pope M, Frankel SS, Mascola JR, Trkola A, Isdell F, Birx DL, Burke DS, Ho DD, Moore JP. Human immunodeficiency virus type 1 strains of subtypes B and E replicate in cutaneous dendritic cell T-cell mixtures without displaying subtype-specific tropism. *J Virol* 1997;71:8001-7.
9. Dittmar MT, Simmons G, Hibbitts S, Ohare M, Louisirirotchanakul S, Beddows S, Weber J, Clapham PR, Weiss RA. Langerhans cell tropism of human immunodeficiency virus type 1 subtype A through F isolates derived from different transmission groups. *J Virol* 1997;71:8008-13.
10. Galai N, Kalinkovich A, Burstein R, Vlahov D, Bentwich Z. African HIV-1 subtype C and rate of progression among Ethiopian immigrants in Israel [letter]. *Lancet* 1997;349:180-1.
11. Marlink R, Kanki P, Thior I, Travers K, Eisen G, Siby T, Traore I, Hsieh CC, Dia MC, Gueye EH, Helliger J, Gušye-Ndiaye A, Sankal, J-L, Ndoeye I, Mboup S, Essex M. Reduced rate of disease development after HIV-2 infection as compared to HIV-1. *Science* 1994;265:1587-90.
12. Åsjö B, Morfeldt-Månsson L, Albert J, Biberfeld G, Karlsson A, Lidman K, Fenyö EM. Replicative capacity of human immunodeficiency virus from patients with varying severity of HIV infection. *Lancet* 1986;ii:660-2.

13. Tersmette M, de Goede REY, Al BJM, Winkler IN, Gruters RA, Cuypers HT, Huisman HG, Miedema F. Differential syncytium-inducing capacity of human immunodeficiency virus isolates: Frequent detection of syncytium-inducing isolates in patients with acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) and AIDS-related complex. *J Virol* 1988;62:2026-32.
14. Koot M, Keet IP, Vos AH, de Goede RE, Roos MT, Coutinho RA, Miedema F, Schellekens PT, Tersmette M. Prognostic value of HIV-1 syncytium-inducing phenotype for rate of CD4+ cell depletion and progression to AIDS. *Ann Intern Med* 1993;118:681-8.
15. Karlsson A, Parsmyr K, Sandström E, Fenyö EM, Albert J. MT-2 cell tropism as a prognostic marker for disease progression in HIV-1 infection. *J Clin Microbiol* 1994;32:364-70.
16. Tscherning C, Alaeus A, Fredriksson R, Björndal Å, Deng HK, Littman DR, Fenyö EM, Albert J. Differences in chemokine coreceptor usage between genetic subtypes of HIV-1. *Virology* 1997; in press.
17. Palmer S, Alaeus A, Albert J, Cox S. Drug susceptibility of subtypes A, B, C, D and E human immunodeficiency virus type 1 primary isolates. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1997; in press.

HIV PRIMÆRTESTING OG OPPFØLGING AV POSITIVT RESULTAT

Helvi Holm Samdal, Avdeling for virologi, Statens institutt for folkehelse

Valg av tester til bruk i rutinen skjer etter bl.a. vurdering av sensitivitet og spesifisitet. Blant andre forhold som det bør legges vekt på er hvilken populasjon testen skal brukes på, dvs. hvilket formål testingen har. I blodgiverscreening er høy sensitivitet den viktigste egenskap. For pasientdiagnose er det verdifullt å velge tester med høy spesifisitet¹. Dagens anti-HIV primærttester oppfyller begge disse krav.

Vi har ikke data på hvor lang tid det går fra smitte til påvisbar viremi/immunrespons hos individer som ikke har symptomer i tidlig fase, i motsetning til de med symptomer, som har en inkubasjonstid fra 1 til 2 uker fra smitte til symptomer^{2,3}. Som svar på infeksjonen sees vanligvis først en forbigående anti-HIV-IgM respons som etterfølges av en vedvarende anti-HIV-IgG respons. Oppfølging av personer med primær symptomatisk HIV infeksjon viser at dagens anti-HIV tester er reaktive 1-2 uker etter symptomdebut². Viruset kan påvises i vindusfasen før serokonversjon⁴. Vi antar at antistoffresponsen hos de som ikke har symptomer er den samme². Hos disse gruppene er det ikke vist signifikante forskjeller i virusmengde (HIV-antigen/HIV-RNA) ved serokonversjonstidspunkt, og heller ikke i antistoffnivå etter serokonversjon (små materialer)⁵.

Fremgangsmåten for påvisning av HIV infeksjon vil avhenge av indikasjonene for rekvisisjon av undersøkelsen. Ved opplysninger om eksposisjon for smitte, kliniske symptomer o.l. må HIV antigen/PCR/dyrking vurderes i tillegg til den primære antistofftesten. Ved screeningundersøkelser er HIV - antistofftesten første valg. I dette innlegget vil jeg belyse momenter ved HIV antistoff primærttesting.

HIV primærttestene som brukes i Norge i dag har en sensitivitet på 98.5 - 100% og en spesifisitet på 95.6 - 100%⁵. Disse resultatene er fremkommet ved sammenlikninger av ulike HIV tester på forskjellige paneler og i laboratorierutinen. Resultatene viser den relative sensitivitet/spesifisitet mellom testene brukt på panelene. I rutinen vil den "sanne" sensitivitet av en test på et serum først kunne bedømmes når neste serumprøve foreligger.

Sensitiviteten av en anti-HIV test vurderes vanligvis på prøver fra HIV-1/HIV-2 positive pasienter og fra pasienter i serokonversjonsfase. Det foreligger ikke vedtatte kriterier for hvilke serummateriale paneler bør inneholde, og hvordan de skal være sammensatt. HIV-1 panelene har hittil inneholdt flest sera fra pasienter med HIV-1 subtype B. Da gruppe O ble oppdaget, var det noen primærttester som ikke påviste denne. Når en ny test lanseres nå er den som regel også testet på et panel som inneholder sera fra gruppe O.

Testing på serokonversjonspaneler har som formål å undersøke hvor tidlig testene kan påvise antistoff etter smitte/symptomer. Slik panelene hittil har vært sammensatt, har det vist seg at forbedringen i testenenes evne til å påvise tidlig infeksjon stort sett gjelder subtype B⁶.

Dette viser at både HIV-positiv paneler og HIV-serokonversjonspaneler bør inneholde størst mulig antall grupper og subtyper.

Spesifisiteten av en primær anti-HIV test evalueres vanligvis på friske personer, ofte blodgivere, som har testet negativt på HIV-infeksjon med alle tilgjengelige tester. Det brukes også paneler med "tricky sera", bl.a. fra pasienter med økt immunglobulinmengde i serum på

grunn av andre infeksjoner. Panelene er ofte preselektert, det vil si at de er valgt ut ved testing med en annen primærttest. Den beste informasjon om en tests spesifisitet ville være å bruke den parallelt med laboratoriets egen primærttest på uselekterte sera i rutinen. Slike studier foreligger oftest først når testen har vært på markedet en tid.

Ulike individer kan ha ulik immunrespons på de forskjellige HIV antigener⁷. Noen personer reagerer med høye antistoff titre mot p24, mens andre kan reagere sterkere på andre antigener. Selv om reaksjonsevnen er forskjellig, vil de fleste danne antistoffer mot alle virale proteiner i løpet av HIV-infeksjonen. Lave antistofftitre sees tidlig i infeksjonen, men også sent ved terminal AIDS⁸.

Dagens western blot tester viser at antistoffer mot p55 og p24 (gag proteiner) og gp160 (envelope proteiner) opptrer tidlig i infeksjonen^{4,9}, etterfulgt av antistoffer mot p66 (pol proteiner)⁵ før hele mønsteret av antistoffer kompletteres. Dagens primærttester er bygget opp med tanke på denne utvikling, med antigener fra de immundominante områder av env og core regionene. Testprinsippene har også betydning, da kompetitiv ELISA har vist seg mindre sensitiv enn indirekte ELISA. Til gjengjeld regnes en kompetitiv test som mer spesifikk. Det ble registrert en klar forbedring i testenenes evne til å påvise tidlig infeksjon da tester som påviser både IgM og IgG antistoffer kom på markedet. For optimal følsomhet inneholder dagens HIV-1/HIV-2 tester både syntetiske peptid- og rekombinante protein antigener.

Blant hurtigtestene er det variasjon i sensitivitet og spesifisitet, men enkelte hurtigtester har vist seg like sensitive som 3. generasjons testene¹⁰. Trettiåtte serumprøver fra 14 pasienter i serokonversjonsfase ble undersøkt med 4 ulike hurtigtester for påvisning av HIV-1/HIV-2 (SUDS (Murex), TestPack (Abbott), HIV-SPOT(Diagnostic Biotechnology) og CAPILLUS Cambridge Biotech) samt 2. og 3. generasjons anti-HIV-1/HIV-2 EIA. Resultatene for TestPack og SUDS var samsvarende med 3. generasjons EIA resultatene.

Primær HIV antistofftesting og supplerende undersøkelser

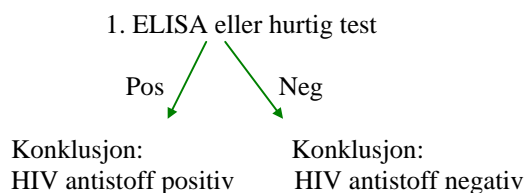
Når en prøve er reaktiv i primærttesting anbefaler fabrikantene at den retestes in duplo. CDC anbefaler også retesting¹¹, dette kreves også i Europarådets retningslinjer for kvalitetskontroll av transfusjonstesting¹². De fleste norske laboratorier følger en slik strategi. Strategikonferansen bør derfor anbefale slik praksis.

I USA anbefales det å bruke betegnelsen reaktiv om positive primærttestresultater i svaret til rekvirenten. Betegnelsen positiv brukes først om resultatet når endelig konklusjon foreligger etter bekreftelsestesting¹³. Dette kan forhindre misforståelser i oppfattelsen av primærttestresultatet og vi foreslår at dette innføres i Norge også.

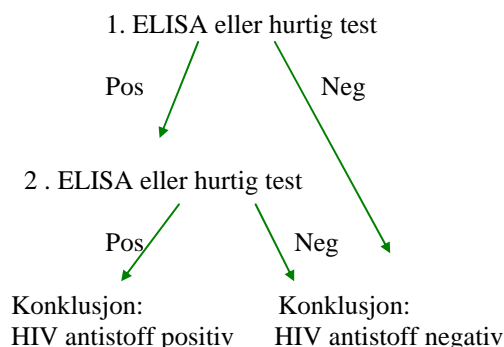
En reaktiv primærttesting kan vurderes og følges opp på forskjellige måter. I Norge er det tradisjon for å bekrefte HIV infeksjon med western blot undersøkelse, dette er ikke mulig i land med knappe ressurser. WHO anbefaler tre ulike strategier for å avklare slike resultater uten bruk av western blot, avhengig av prevalens av HIV infeksjoner i det aktuelle området¹⁴. Figur 1 viser flytskjema for de anbefalte strategiene.

Figur 1. Flytskjema for alternative HIV teststrategier

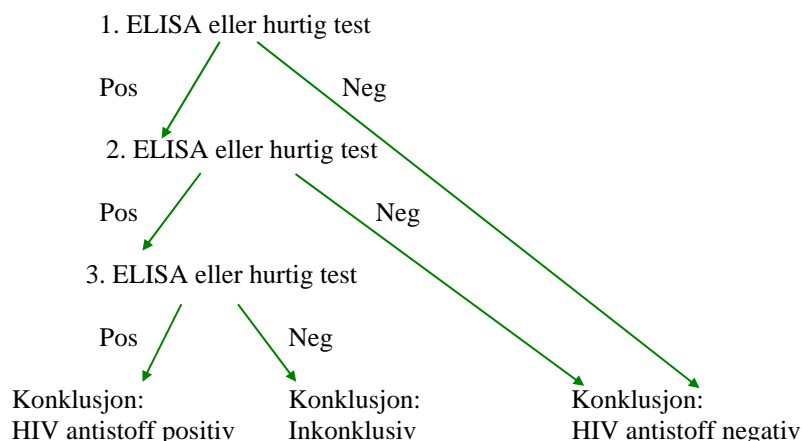
Strategi I



Strategi II



Strategi III



Med bakgrunn i betraktninger om prevalens og prediktive verdier av tester har Avdeling for virologi prøvd ut en modifikasjon av WHO strategi II som supplement til bekreftelsestesting med western blot:

Norge er et område med lav prevalens av HIV. Den positive prediktive verdi av en test kan defineres som antall personer som bekreftes å være infisert blant de individer som blir funnet gjentatt reaktive i primærttesting. Når prevalensen er lav, vil den positive prediktive verdi bli lav. I Norge vil gjentatt reaktive primærttestresultat med én type test som regel skyldes uspesifikke reaksjoner. Slike resultater må derfor bekreftes med western blot undersøkelse.

Den negative prediktive verdi av en test defineres som antall ikke infiserte personer blant alle individer med negativt testresultat. Når prevalensen er lav, vil den negative prediktive verdi være høy. I Norge har derfor et negativt primærttestresultat blant friske personer uten risikoanamnese stor sannsynlighet for å være riktig.

Når en prøve blir gjentatt reaktiv i primærttest skal det også innhentes ny prøve for full testing. Beskjed om mulig uspesifikk reaksjon, og tiden som går før konklusjon av western blot

undersøkelsene foreligger, kan være besværlig for klienten. I noen tilfeller vil muligens belastningen avholde personer i risikomiljøer fra å teste seg.

Avdeling for virologi, Folkehelse, har derfor gjennomført et prosjekt for å finne ut om disse forhold kunne bedres ved bruk av WHO strategi II som supplement til bekreftelsestesting. I prosjektet ble det brukt supplerende ELISA/hurtigtester i kombinasjon med primærttesting i en modifisert versjon av WHO strategi II. Til forskjell fra WHO strategien valgte vi supplerende tester med lik eller bedre sensitivitet enn primærttesten. Begrunnelsen for å velge tester med lik eller bedre sensitivitet enn primærttestene er å få bedre grunnlag for vurderingen av spesifisiteten av primærttestreaksjonen. Det forutsettes da at det velges supplerende tester med andre antigenprepareringer/testprinsipper enn primærttesten for å redusere muligheten for de samme uspesifikke reaksjoner. Når sensitiviteten av supplerende test er lik eller bedre enn for primærttesten, vil en negativ reaksjon med supplerende test indikere at primærttestreaksjonen er uspesifikk.. En positiv reaksjon med supplerende test vil gi økt sannsynlighet for at primærttestresultatet er reelt positivt. Hensikten med strategien var å kunne gi raskt svar tilbake til rekvirenten og derved klienten med en økt sikkerhet i vurderingen av spesifisiteten av primærttestresultatet.

For å evaluere strategien ble alle primært reaktive sera også undersøkt med western blot. I prosjektet ble to hurtigtester og en ELISAtest prøvd ut som supplerende tester.

Ved primærttesting av 65 000 prøver i helseregion 2 i perioden januar til september 1996 , ble det innsendt 53 gjentatt reaktive sera til Avdeling for virologi, Folkehelse. Tretten av disse var reaktive i alle supplerende tester. 12/13 var western blot positive, det siste serumet var western blot inkonklusivt, men HIV RNA positivt. De resterende 40 sera var negative i den supplerende ELISAtesten og western blot negative. Fire av disse var reaktive i de to hurtigtestene, to i hver.

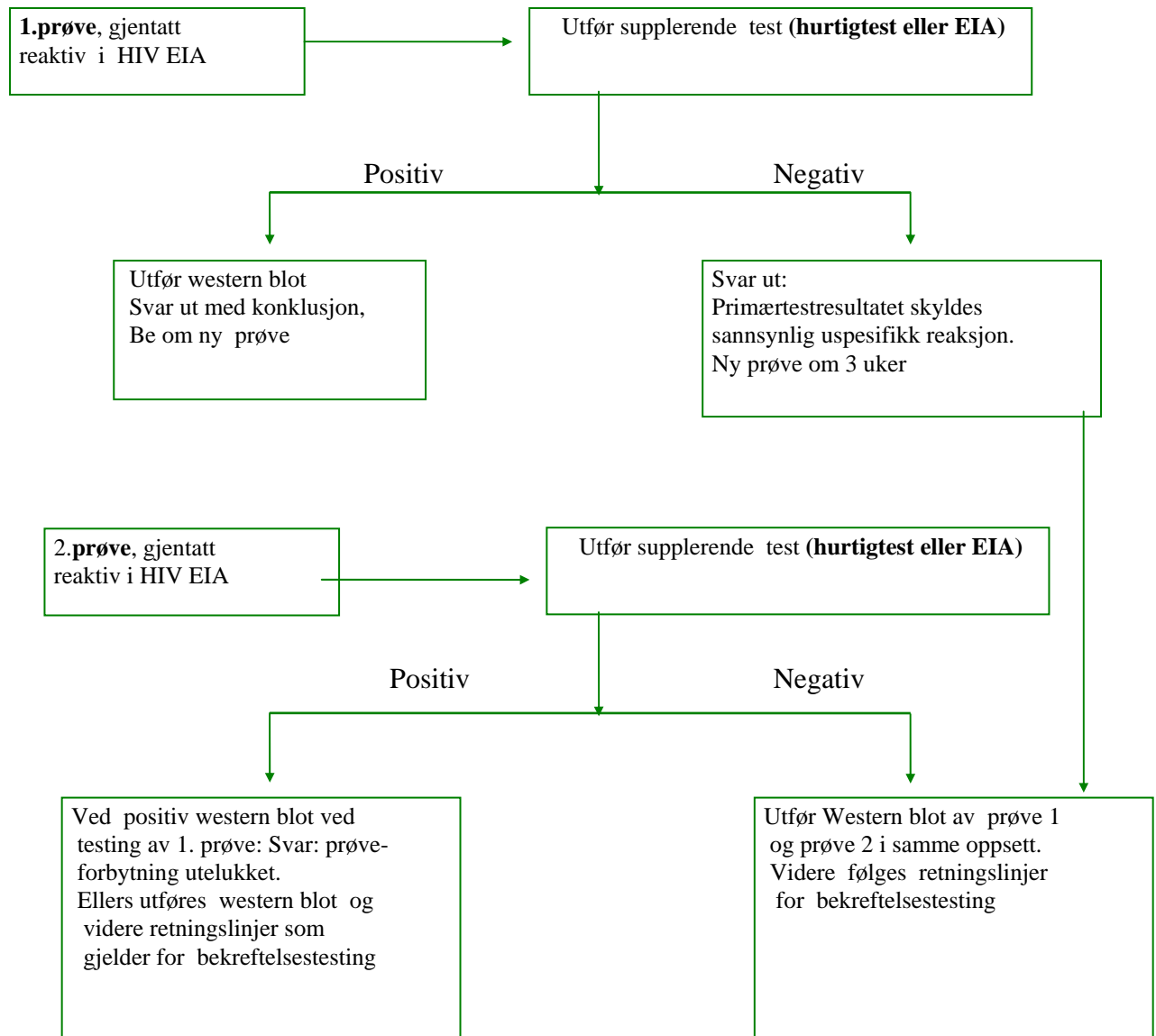
Det ble bedt om ny prøve etter 3 uker, og denne ble mottatt fra 43 av de 53 personene med gjentatt positivt primærttestresultat. Det samme HIV testresultatet ble oppnådd for de 13 HIV positive og for 27 av de 30 HIV negative personene. Prøve nr. 2 fra tre av de HIV negative personene var primærttest negative.

Dette viser at ved bruk av kombinasjon av primærttesting og supplerende testing ifølge WHO strategi II, kunne 13 sera straks rapporteres som sannsynlig HIV-positive med den supplerende ELISAtesten. Femten av seraene ville blitt rapportert som sannsynlig positive ved bruk av en av hurtigtestene som supplerende test. For de 53 prøvene var den positive prediktive verdi av primærttesten 25 %. Ved å kombinere primærttesten med en av hurtigtestene eller ELISAtesten, økte den positive prediktive verdi til henholdsvis 87% og 100%.

Ut fra disse resultater foreslår vi at en slik strategi anvendes for oppfølging av gjentatt reaktivt primærttestresultat i Norge, for å gi rask vurdering og tilbakemelding til rekvirenten om spesifisiteten av dette resultatet.

I figur 2 vises flytskjema for denne strategien.

Figur 2. Flytskjema for oppfølging av gjentatt reaktivt resultat i HIV antistoff primærttest.



Dagens høye standard på HIV-antistofftester har bedret kvaliteten av HIV- screening. Hvis indikasjonen er eksposisjon for HIV smitte, må det også suppleres med andre undersøkelser som HIV antigen og PCR og eventuelt dyrking. Slike undersøkelser er spesielt indisert ved spørsmål om vertikal overføring av HIV smitte. Antistofftestene skiller ikke mellom passivt overførte og egenproduserte antistoffer, og først ved alder > 18 måneder vil eventuelle påviste HIV antistoffer kunne sies å være egenproduserte. Hvis oppfølging av voksne som har vært eksponert for smitte gir negativt resultat ved alle undersøkelser for HIV-infeksjon, vil problemstillingen være hvor lenge personen skal følges før spørsmålet om HIV-smitte er endelig avgjort.

CDC anbefaler fortsatt 6 måneders oppfølging¹⁵, og dette følges av engelske helsemyndigheter¹⁶. Siste utgave av Smittevernloven (Veileder) anbefaler også 6 måneder oppfølging¹⁷.

De primærtester som anvendes i dag vil påvise serokonversjon hos de fleste pasienter med primær HIV infeksjon innen en måned² SMI anbefaler tre måneder som en tilstrekkelig lang oppfølgingstid etter eksposisjon. Dette baseres på vurdering av screeningstestenes sensitivitet på godt karakteriserte pasientmaterialer².

Bør strategikonferansen tilrå samme retningslinjer som i Sverige?

Referanser:

1. Lunle F, Rosenheim M, Duneton P et al. Suggestions for evaluating and using hepatitis C screening tests. Abstract P10 , Inaugural meeting of the European society for clinical virology, Bologna (1997) September 7-10.
2. Gaines H, Thorstensson R, Lindbäck S et al. HIV-testning. Smittskydd (1995) 2:3-5.
3. Hirsh MS, Curran J. Human immunodeficiency viruses. In : Fields BN, Knipe BM, Howley PN et al. (Eds) : Fields' Virology. 3rd ed. Lippincott-Raven Publishers. Philadelphia (1996) 1953-1975.
4. Mortimer PP. Ten years of laboratory diagnosis of HIV: How accurate is it now?. J Antimicrob Chemother (1996) 37, Suppl. B, 27-32.
5. Henrard DR, Daar E, Farzadegan H et al. Virologic and immunologic characterizations of symptomatic and asymptomatic primary HIV-1 infections. J AIDS Human Retro (1995) 9; 305-310.
6. WHO (1994) Operational characteristics of commercially available assays to detect antibodies to HIV-1 and/or HIV-2 in human sera. Global Programme on AIDS, GPA/RID/CRD/94.4. World Health Organization, Geneva.
7. Apetrei C, Lousert-Ajaka I, Descamps D et al. Lack of screening test sensitivity during HIV-1 non-subtype B seroconversions. AIDS (1996) 10: F57-F60.
8. Constantine NT, Callahan JD, Watts DM. In: Mitchell S, Gringle R, Archbold E. (Eds): HIV testing & quality control. AIDSTECH/Family Health International (1991) 16-17.
9. Gutiérrez A, Soriano V, Bravo R et al. Seroreversion in patients with end-stage HIV infection. Vox Sang (1994) 67; 238 - 239.
10. Reed D, Chin D, Chan L. HIV-1 western blot standardization. Genelabs Diagnostics PTE, Ltd. 1995.
11. Samdal HH, Gutigard BG, Labay D et al. Comparison of the sensitivity of four rapid assays for the detection of antibodies to HIV-1/HIV-2 during seroconversion. Clin and Diagn Virol (1996) 7; 55 - 61.
12. CDC . Guidelines for preventing transmission of human immunodeficiency virus through transplantation of human tissue and organs. MMWR (1994) 43; RR-8
13. Council of Europe. Recommendation No. R (95) 15 on the preparation, use and quality assurance of blood components. (1995) 117.
14. Constantine NT, Callahan JD, Watts DM. In: Mitchell S, Gringle R, Archbold E. (Eds): HIV testing & quality control. AIDSTECH/Family Health International (1991) s. 55.
15. Sato PA, Maskill WJ, Tamashiro H et al. Strategies for laboratory HIV testing: an examination of alternative approaches not requiring Western blot. Bull WHO (1994) 72; 129 - 134.
16. CDC. Update: Provisional public health service recommendations for chemoprophylaxis after occupational exposure to HIV. MMWR Morb Mortal Wkly Rep (1996) 45: 468 - 472.
17. CDR. New guidelines on post exposure prophylaxis of health care workers exposed to HIV at work. CDR Wkly (1997) (7) 27.
18. Statens helsetilsyn. Smittevernloven. Veileder. (1997) s.38.

HIV-INFEKSJON OG BEKREFTELSESTESTING

Kjell Skaug, Avdeling for virologi, Statens institutt for folkehelse

HIV infeksjon kan påvises ved direkte påvisning av viruset, HIV-RNA eller HIV-Ag (p24) og/eller ved deteksjon av HIV antistoff. HIV antistoff primærttestene har høy sensitivitet, men til tross for at spesifisiteten av testene er god, er falske positive testresultater relativt vanlige når screening utføres i befolkning med lav HIV prevalens. Når primæranalysen er reaktiv, må resultatet derfor bekreftes med tilleggsundersøkelser.

Flere strategier og antistofftester, som indirekte immunofluorescens, radioimmunoprecipitation, immuno blot tester som western blot og HIV RIBA, er i bruk forskjellige steder i verden for å bekrefte/avkrefte en reaktiv primæranalyse. Western blot er den mest anerkjente av bekreftelsestestene¹. Til forskjell fra primærttestene som er basert på HIV rekombinant proteiner og/eller syntetiske peptider, er western blot basert på elektroforetisk adskilte HIV antigener. Vi bruker western blot striper fra Genelabs Diagnostics (HIV BLOT 2.2) som er påført et serum (IgG) kontroll bånd og et syntetisk HIV-2 peptid for påvisning av HIV-2 antistoff. De samlede testresultater for den enkelte pasient må vurderes i forhold til tidspunkt for mulig smitte (serokonversjon eller AIDS) og den epidemiologiske situasjon (virusvarianter). Til forskjell fra 3.gen EIA testene, påvises bare IgG anti-HIV, og i den akutte fasen av HIV infeksjonen kan western blot derfor bli senere positiv enn screening testen. Ved nysmitte vises som oftest først antistoff mot p55, p24 (gag proteiner) og gp160 (env protein) etterfulgt av antistoff mot p66 (pol proteiner), før hele mønsteret av antistoffer fremtrer. Et slikt komplett mønster sees blant asymptomatiske bærere. På den annen side sees i den terminale fase av infeksjonen ofte færre bånd og bortfall av antistoff (p24). Som regel bekreftes eller utelukkes HIV infeksjon gjennom oppfølging med undersøkelse av nye prøver (fig. 1). Når det gjelder oppfølging av barn født av HIV positive mødre, se innlegg av Rolf Lindemann.

Western blot avleses visuelt og god erfaring med undersøkelsen og produktet er viktig. For hver prøve registreres hvilke bånd som kommer frem samt styrken av disse. Det båndmønster som presenteres vurderes og undersøkelsen besvares neg/pos eller usikker.

Negativ western blot: Dersom ingen virusspesifikke bånd kan påvises er western blot negativ (tabell 1B). Dersom opplysninger om klinikk forenlig med symptomer på primær HIV infeksjon foreligger, gjøres vurderinger om ytterligere supplerende undersøkelser.

Positiv western blot: Forskjellige helsemyndigheter/organisasjoner stiller ulike krav til hvor mange og hvilke virusspesifikke bånd som skal være påvist for at western blot er positiv (tabell 1A). Til forskjell fra det Genelabs anbefaler (positivt resultat: 2 env og gag eller pol bånd er påvist), bruker vi ved Avdeling for virologi, Folkehelse, American Red Cross' definisjon som krever at antistoffer overfor alle tre ulike virus proteiner, gag, pol og env, skal være påvist. Asymptomatiske HIV positive viser vanligvis et spesielt, og som oftest et komplett båndmønster, og dersom prøven ikke viser reaksjon med HIV-2 komponenten, blir konklusjonen av undersøkelsen HIV-1 infeksjon. Prøver som viser reaksjon med HIV-2 kontrollbåndet undersøkes videre med HIV-2 western blot (Pasteur New Lav Blot II; fabrikantens kriterier for deteksjon av HIV-2 følges). Dersom prøven er HIV-2 western blot negativ vurderes reaksjonen med det syntetiske HIV-2 peptidet i Genelabs western blot som

¹ WHO Global programme on AIDS. Operational characteristics of commercially available assays to detect antibodies to HIV-1 and/or HIV-2 in human sera. Report 8/1994

en uspesifikk reaksjon. Dersom prøven både er western blot HIV-1 og HIV-2 positiv, kan dette skyldes dobbeltinfeksjon.

Usikkert western blot resultat: Western blot resultatet karakteriseres som usikkert dersom bare enkelte bånd påvises. Etter hvilke bånd, og spesielt når bånd mot env-protein påvises, vurderes supplerende HIV antigen og/eller HIV PCR undersøkelser. Erfaringsmessig teller sterke spesifikke bånd også mer enn svake diffuse bånd. Usikre/uspesifikke western blot test resultater avklares vanligvis ved oppfølging og undersøkelse av ny prøve 3 uker etter første prøvetaking. Ved nysmitte sees som oftest ved sammenligning av 1. og 2. prøve i samme oppsett en utvikling med påvisning av flere og sterkere bånd i 2. prøve. Undersøkelse av blodprøver fra AIDS tilfeller kan også vise ufullstendige western blot reaksjonsmønstre. I slike tilfeller vil HIVPCR gi positivt resultat. Reaksjonen karakteriseres som uspesifikk dersom bare de samme og enkelte, svake bånd (p17, p24 og/eller p55, p31 eller p51 eller p66) påvises i de to prøvene. Undersøkelser viser blant annet at 10-20% av ELISA negative viser reaksjon med p24 eller p17 komponenten i western blot. Slike sera er vanligvis negative i andre supplerende antistofftester.

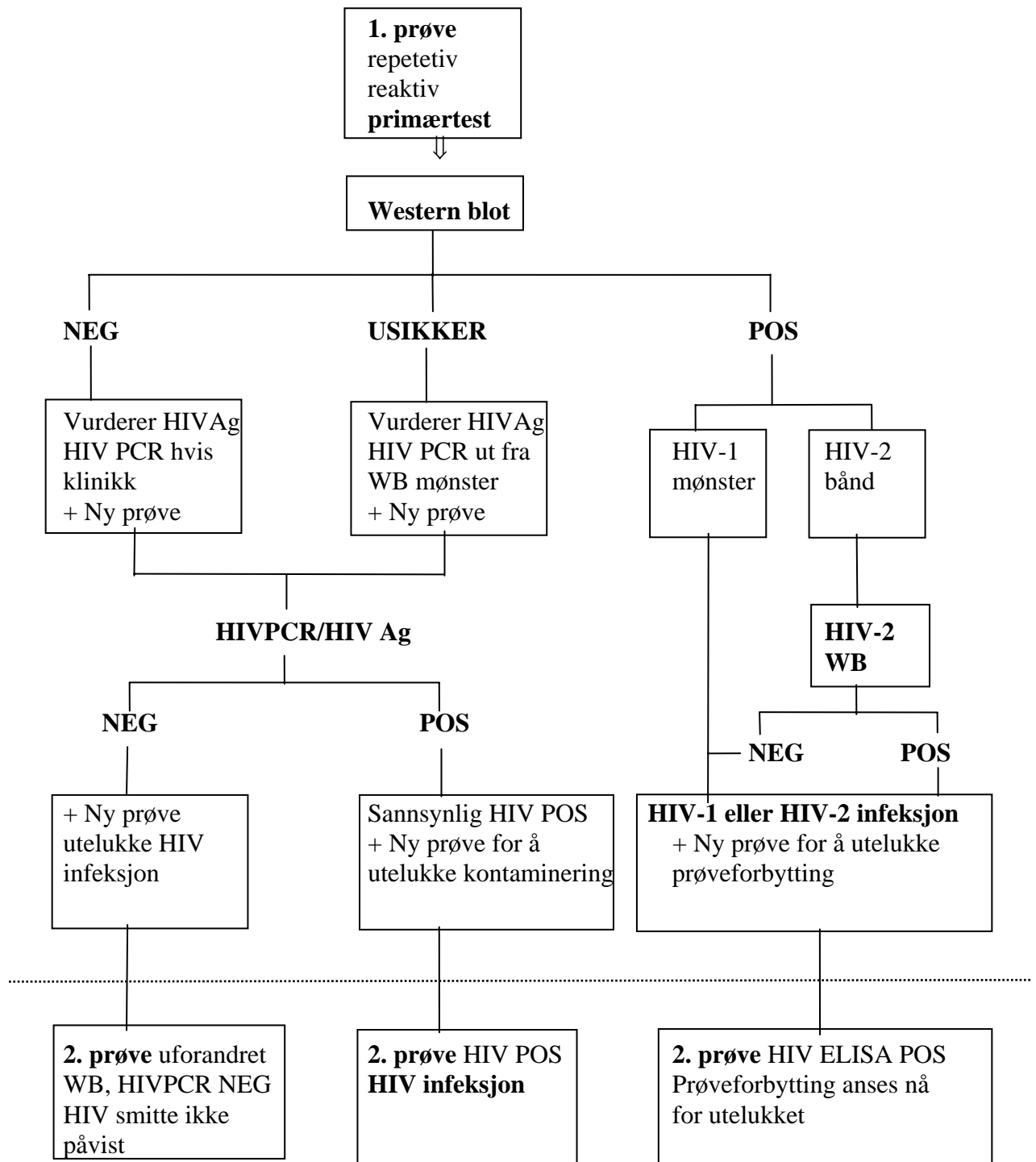
Western blot sensitivitet/spesifisitet kan variere noe fra et produkt til en annet. Likeledes er det batch variasjoner. Det er derfor viktig at man har erfaring med det western blot produkt en anvender i diagnostikken. Med bruk av Genelabs Diagnostics (HIV BLOT 2.2) western blot anbefaler vi American Red Cross' definisjon for HIV positivt resultat (antistoffer overfor tre ulike virus proteiner, GAG, POL og ENV skal være påvist), men hvilke positive/negative kriterier som skal brukes, kan være produktavhengig.

Andre immunoblot tester som HIV-RIBA (Chiron) samsvarer godt med western blot resultater. RIBA testen er vist å gi færre uspesifikke reaksjoner enn western blot. Den vil derfor også være egnet som konfirmasjonstest eller som et supplement til western blot. Nyere immunoblot tester for påvisning av både HIV Ag (p24) og antistoff, på en og samme stripe, er nå også lansert (Deciscan HIV Ag - Ab, Pasteur), og en slik test kan være et supplement til western blot.

Med den erfaring vi i dag har med western blot i HIV diagnostikken, og fordi man i western blot kan påvise HIV antistoff mot alle antigenene i viruset, anbefaler vi at HIV-infeksjon bekrefte med western blot.

Prøver som er reaktive i primærttesten kan vise et usikkert western blot resultat. Dette kan føre til feiltolkning og unødvendig oppfølging av pasientene. For raskt å avklare spesifisiteten av primærttesten (prøver som er reaktive i primærtten, men negative i supplerende tester), anbefaler vi en strategi som vist i fig. 3a og b. Med den erfaring vi har ved Folkehelse med slike prøver og med hurtigtester som supplerende test, anbefaler vi ikke å bruke western blot som konfirmerende test, men bare be om ny prøve for å utelukke HIV infeksjon.

Fig. 1: Tidligere strategi for konfirmasjon av reaktive prøver i HIV primært testen (Avdeling for virologi, Statens institutt for folkehelse)



Tabell 1: KRITERIER FOR HIV WESTERN BLOT:

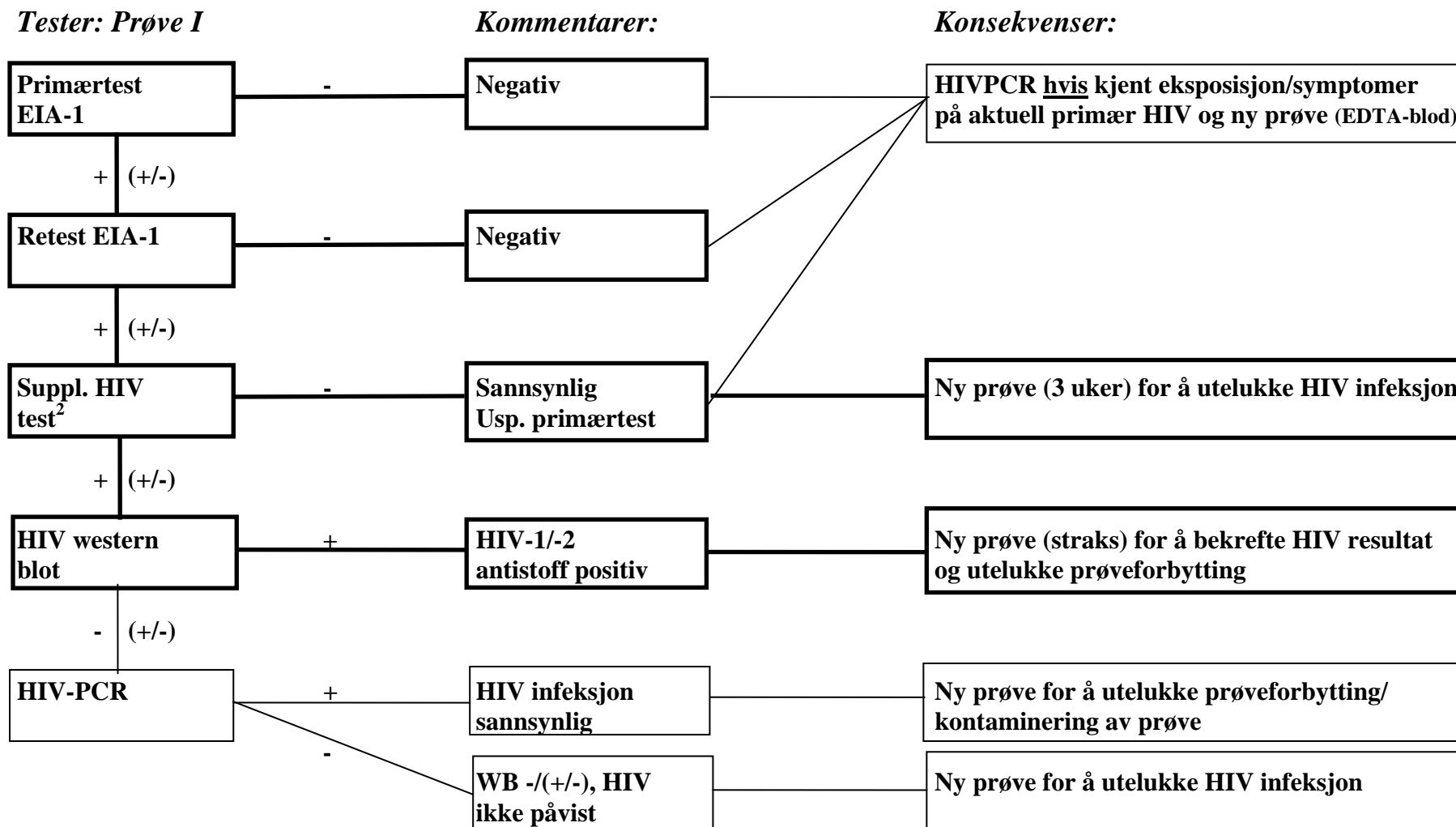
A: HIV western blot positivt resultat:

Center for Disease Control (CDC) and ASTPHLD	Minst et ENV (gp41, gp120/160) bånd og p24
American Food and Drug Administration (USFDA)	p24, p31 og ENV (gp41 eller gp120/gp160)
Centre National Transfusion Sanguine (SFTS)	To ENV bånd med GAG eller POL
WHO	To ENV bånd med eller uten GAG eller POL
Consortium for Retrovirus Serology Standardization (CRSS)	Et ENV bånd samt p24 eller p31
American Red Cross	Ett bånd for GAG, POL og ENV
Paul Ehrlich Institute	To bånd, et må være ENV

B: HIV western blot negativt resultat:

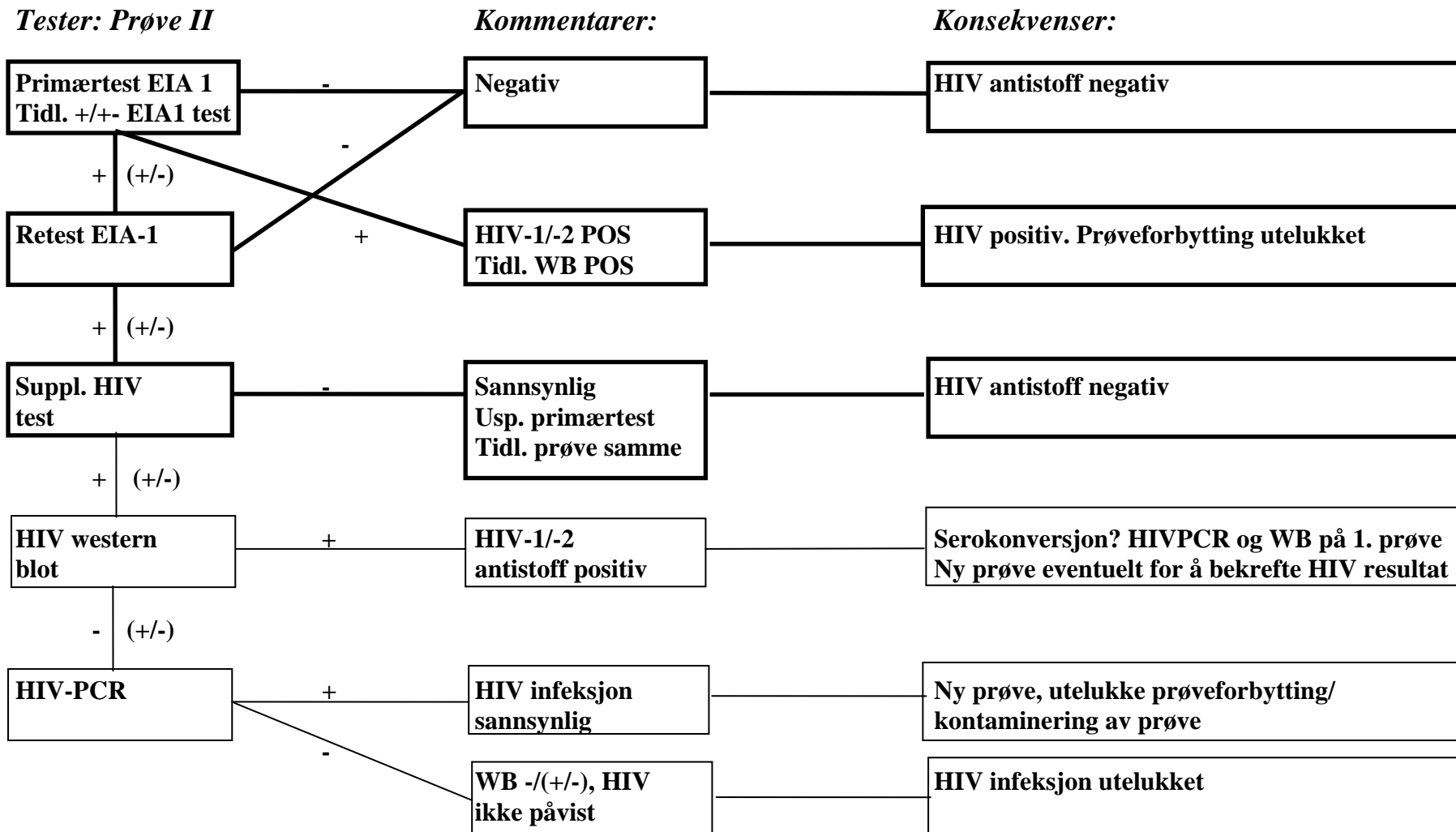
Center for Disease Control (CDC) and ASTPHLD	Ingen bånd påvist
American Food and Drug Administration (USFDA)	Ingen bånd påvist
Centre National Transfusion Sanguine (SFTS)	Ingen bånd påvist Bare uspesikke bånd p17 med eller uten p39, p42, p55 Hverken er usikker eller positiv WB
WHO	Ingen bånd påvist Bare p17 bånd
Consortium for Retrovirus Serology Standardization (CRSS)	Ingen bånd påvist
American Red Cross	Ingen bånd påvist
Paul Ehrlich Institute	Ingen HIV-1 spesifikke bånd påvist

Fig. 3a: HIV -diagnostikk (forslag)



² Krav til HIV supplerende test: Samme sensitivitet som primærttesten, men forskjellig fra primærttest mhp testprinsipp og/eller antigener

Fig. 3b: HIV -diagnostikk (forslag)



KVALITATIVE OG KVANTITATIVE HIV-1 ANALYSER

Svein Arne Nordbø, Avdeling for mikrobiologi, Regionsykehuset i Trondheim, 7006 Trondheim

Kvalitative analyser

De kvalitative nukleinsyretestene påviser enten HIV-1 RNA i plasma eller provirus DNA i hvite blodlegemer. I Norge benyttes p.t. in-house PCR tester (Haukeland og Folkehelse) til kvalitative HIV-1 DNA analyser, men det finnes også kommersielle tester tilgjengelig både for påvisning av HIV-1 RNA og provirus DNA. Disse metodene er svært sensitive, og kan med fordel benyttes som konfirmasjonstester når andre bekreftelsestester (western blot) ikke gir et sikkert svar. Påvisning av provirus DNA i de hvite blodlegemene hos nyfødte barn av HIV-positiv mødre er en sikker metode for å avgjøre hvorvidt barnet er smittet eller ei. Det kan også være aktuelt å benytte en kvalitativ nukleinsyretest i de tilfellene hvor man mistenker at pasienten er i en serokonversjonsfase, og antistofftestene ikke gir et sikkert svar.

Deteksjon av p24 antigen med ELISA-teknikk har i flere år vært benyttet som en kvalitativ test til å påvise HIV-1 virus i serum. Disse testene har først og fremst vært brukt for å diagnostisere en primær HIV-infeksjon i serokonversjonsfasen, men har også vært benyttet som et prognostisk parameter hos pasienter med langtkommen HIV-infeksjon. Sammenlignet med dagens nukleinsyretester har disse testene en betydelig lavere sensitivitet og spesifisitet, og bør derfor utgå som rutinetester.

Kvantitative analyser

De kvantitative metodene benyttes først og fremst til å måle HIV-1 RNA nivået i plasma, men enkelte av testene kan også gjøre kvantitative målinger i andre typer prøvemateriale (serum, lymfocytter, helblod, spinalvæske m.m.). HIV-1 RNA målinger i plasma utgjør sammen med telling av CD4-positive lymfocytter de 2 viktigste prognostiske markørene for pasienter med HIV-infeksjon. I dagens situasjon er HIV-1 RNA målinger helt essensielle for å vurdere når man skal starte behandling med antivirale midler og for vurdering av behandlingseffekt og monitorering av evt. resistensutvikling. Det har vært vanlig å starte behandlingen når HIV-1 RNA nivået når 30-50.000 kopier/ml, men enkelte starter behandlingen på et betydelig lavere nivå. Etter 4-8 ukers behandling bør HIV-1 RNA nivået være så lavt som mulig (<400 kopier/ml). Enkelte kommersielle tester er nå blitt så sensitive at de kan detektere nivåer helt ned til 20-50 kopier/ml. Produsentene av disse testene anbefaler å monitorere pasienter under behandling med antivirale midler og som har et HIV-1 RNA-nivå <400 kopier/ml med de mest sensitive metodene for å fange opp en evt. terapivikt så tidlig som mulig. Det er utviklet egne kommersielle tester for å påvise de vanligste mutantene som kan ha nedsatt følsomhet for enkelte anti-retrovirale midler.

Det finnes 3 forskjellige kommersielle tester for kvantitative analyser av HIV-1 RNA: "Branched DNA" (Quantiplex HIV-1 RNA, Chiron Corporation), RT-PCR (Amplicor HIV Monitor Test, Roche Diagnostics) og NucliSens (Organon Technika). "Branched DNA" (bDNA) metoden er en hybridiseringstest som baserer seg på amplifikasjon av deteksjonssignalet. Et utvalg av prober hybridiserer med enkelt-trådet HIV-1 RNA i prøven, og RNA-DNA kompleksene knyttes til en fast fase via capture-prober. bDNA

molekyler fester seg til spesifikke sekvenser på probene, og ved å tilsette enzym-merkede prober som fester seg til bDNA, vil det bli dannet omfattende forgreninger med mange enzymmolekyler pr. probe. Ved å tilsette et egnet substrat vil det utvikles en kjemiluminiscens som kan avleses i et luminometer. Prinsippet for bDNA er vist i figur 1 som er hentet fra artikkelen til Mark L. Collins og medarbeidere i; *Nucleic Acid Research*, 1997, Vol. 25, No. 15, 2979-2984.

Fordelene med denne testen er at man ved å benytte et utvalg av forskjellige prober oppnår lik sensitivitet for alle de vanligste subtypene av HIV-1. Siden testen ikke benytter enzymer til reverstranskribering eller amplifisering, vil testen heller ikke være følsom for evt. inhibitorer av disse enzymene. Sensitiviteten på standardutgaven av testen er 500 kopier/ml, men denne kan økes til 60 kopier/ml med den nyeste testen og endrede isolasjonsprosedyrer. Presisjonen er den samme som for de øvrige testene: ca. 0,5 log.

NucliSens (tidligere NASBA) er en isoterm amplifikasjonstest, i motsetning til PCR som er avhengig av sykliske temperatursvingninger. Testen benytter seg av 3 enzymer samtidig : revers transkriptase, RNase H og DNA-avhengig RNA polymerase. Metoden etterlikner den naturlige livssyklus for retrovirus, og genererer RNA-kopier via cDNA syntese. Testen bruker primere som amplifiserer et område i gag-regionen som er nesten identisk med det området som den kommersielle PCR-testen benytter. Til hver prøve tilsettes 3 interne standarder (10^4 , 10^5 og 10^6 kopier/ml) som amplifiseres sammen med pasientens stamme. De amplifiserte produktene detekteres via en meget sensitiv elektrokjemiluminiscens (ECL) som bl.a. gjør bruk av ruthenium- og biotin-merkede prober. Ifølge produsenten kan testen benyttes på alle typer biologisk prøvemateriale, men erfaringene viser at EDTA-plasma er klart å foretrekke. Sensitiviteten er avhengig av prøvevolumet (10 - 2000 μ l). Nedre deteksjonsgrense er 80 kopier/ml. Ved å benytte en forbedret RNA-ekstraksjonsteknikk kan sensitiviteten økes ytterligere til 10-20 kopier/ml. Testen amplifiserer HIV-1 subtypene B, A og D mest effektivt, og subtype E mindre effektivt. I likhet med de andre kvantitative testene detekteres verken HIV-O eller HIV-2 RNA. I løpet av kort tid vil det imidlertid komme en ny versjon som detekterer alle de vanligste subtypene av HIV-1 (A-H) samt HIV-O like bra.

Amplacor HIV-1 Monitor testen finnes i 2 versjoner: standard og ultrasensitiv. Metoden er en RT-PCR hvor revers transkripsjon og amplifisering skjer via enzymet *Thermus thermophilus* DNA polymerase (rTth pol). Det benyttes biotinylerede primere fra gag-regionen og vanlige nukleotider (dNTP) samt deoxyuridin trifosfat (dUTP) som ikke finnes i naturlig DNA. Ved å forbehandle prøvene med enzymet uracil-N-glykosylase, vil evt. kontaminasjon med tidligere produserte PCR-produkter som inneholder dUTP bli ødelagt . Etter denaturering blir prøvene overført til ELISA-plater som er coatet med HIV-1 spesifikke prober. De biotinylerede PCR-produktene hybridiserer med probene, og kan etter vask visualiseres ved å tilsette egnet konjugat (avidin-HRP) og substrat (TMB) og avleses i et vanlig fotometer for ELISA-plater. Hvert serum tilsettes en kjent kvantiteringsstandard (QS) som amplifiseres av de samme primerene, men detekteres i egne brønner av en probe som kun er spesifikk for amplikonene til denne spesielle standarden. Beregning av HIV-1 RNA mengden i den aktuelle prøven baserer seg på OD-verdiene til titreringene av prøven og QS.

I tidligere versjoner var denne testen kun optimalisert for kvantitering av HIV-1 RNA for subtype B som er mest utbredt i Vest-Europa og U.S.A. Alle kit som nå leveres på det norske markedet har inkludert flere nye primer-par som skal gi adekvat amplifisering også av de øvrige subtypene.

Deteksjonsgrensen for standardtesten er 400 kopier/ml, mens den ultrasensitive testen kan detektere under 50 kopier/ml. Den ultrasensitive metoden er optimalisert for området 50 -

50.000 kopier/ml, og er først og fremst beregnet på pasienter som får antiviral behandling eller av annen årsak har en lav virusmengde i plasma.

En reduksjon av HIV-1 RNA $> 0,5$ log regnes som en signifikant behandlingseffekt. Med moderne kombinasjonsbehandling får man ofte en reduksjon av RNA-nivået $> 2-3$ log.

Prøvetaking

Selv om flere av testene er godkjent for bruk av flere typer prøvematerialer, bør prøvetakingen standardiseres og optimaliseres slik at alle metodene kan benyttes. Best resultat oppnår man i samtlige tester ved å benytte EDTA-plasma. Heparinblod og serum bør *ikke* benyttes.

Til *kvalitative* DNA analyser (PCR og NucliSens) sendes EDTA-blod direkte til laboratoriet som skal utføre testingen. Prøvene skal oppbevares i *romtemperatur*, og er holdbare i minst 4 døgn.

Også til de *kvantitative* RNA testene oppbevares EDTA-blodet i romtemperatur inntil det blir sentrifugert. Separasjon av plasma bør skje innen 4 timer (bDNA), 6 timer (PCR) eller 30 timer (NucliSens) etter prøvetakingen. HIV-1 RNA er stabilt i plasma ved romtemperatur i 1 døgn (PCR) til 4 døgn (NucliSens) og ved 2-8 C i minst 5 døgn og kan frysetines, i motsetning til serum hvor frysetining medfører rask reduksjon i mengden av HIV-1 RNA som kan detekteres. HIV-1 RNA i plasma har god holdbarhet i frosset tilstand. Dersom prøvene skal oppbevares i lengre tid før testing, anbefales nedfrysing til -70 C. For bDNA testen anbefales det at plasma fryses ned til -70 C innen 30 min. etter separasjon fra cellene (holdbarheten ved -20 C er 72 timer). Evt. transport av plasma til denne analysen bør skje på tørris.

Da RNA raskt brytes ned dersom prøvene ikke behandles optimalt, er det svært viktig at de foreslåtte retningslinjene blir fulgt. Det er alltid en fordel å ta kontakt med laboratoriet som utfører analysene på forhånd dersom det er lang prøvetransport for å sikre en optimal forsendelse.

Siden sensitiviteten til de amplifiserte testene kan variere noe for enkelte subtyper, bør det mikrobiologiske laboratoriet som utfører HIV-1 kvantiteringen kontaktes dersom det er et åpenbart misforhold mellom det rapporterte HIV-1 nivå og klinikk/CD4-tall. I slike tilfeller bør prøve sendes til et laboratorium som benytter en annen metode for å sammenligne resultatene.

Utviklingen av nye kvantitative tester for HIV-1 går meget raskt. Det er derfor viktig å ta kontakt med det aktuelle referanselaboratoriet for å få førstehåndsinformasjon om de aktuelle metodene som er i bruk.

HIV - isolering och karakterisering, är det nödvändigt?

Birgitta Åsjö, Avd. f. mikrobiologi och immunologi, Gades institutt, Universitetet i Bergen

Isolering och identifiering av humana retrovirus representerar en milpelare inom retrovirologien och var möjlig enbart tack vare **a)** kunskapen att aktivera och med hjälp av Interleukin-2 (IL-2) expandera och propagera humana lymfocyter under längre tid (2-4 veckor) samt **b)** ett specifikt och känsligt detektionssystem för att påvisa närvaro av virus, nämligen reverse transkriptastesten.

Innan HTLV-1 framgångsrikt isolerades 1980 (1) var det gjort ett oändligt antal isoleringsförsök baserade på den metod man använde för t.ex. musretrovirus. Celler infekterade med exempelvis Moloney musleukemivirus producerar så stora mängder virus att det räcker med 24-48 timmars inkubering av lymfocyter i vanligt medium utan någon aktivering av cellerna. De ständigt negativa isoleringsförsöken från humana celler gjorde att flertalet forskare ifrågasatte om det över huvud taget existerade humana retrovirus.

Isolering och *in vitro* propagering av HIV var den första stora framgången i kampen mot AIDS-epidemien. Därmed blev det möjligt att producera reagenser för att serologiskt identifiera HIV-infekterade men ännu inte sjuka personer och förhindra smitta via blod/blodprodukter.

VIRUSISOLERING

Oavsett vilket utgångsmaterial man önskar isolera HIV ifrån, måste de HIV+ cellerna aktiveras. Vanligtvis utnyttjar man den fysiologiskt goda aktivering som erhålls genom allogen stimulering via HLA olikheter. Patientceller samodlas med phytohaemagglutinin (PHA)-stimulerade lymfocyter från 1-3 HIV negativa blodgivare. Kulturen expanderas i närvaro av IL-2 (5-20 units/ml medium). Stimulering kan också uppnås via antikropp mot T cellsreceptorn (TcR) eller med någon monoklonal anti-CD3 antikropp. Byte av medium sker 2 gånger i veckan och det höstede mediet analyseras för närvaro av HIV (p24 Elisa eller RT-test).

Det är känt att bland den CD8+ populationen finns celler med cytotoxisk effekt på HIV-infekterade celler (2) och celler vilka producerar lösliga (3,4) suppresserande faktor(er). Tre sådana hämmande β -kemokiner har nyligen identifierats, Rantes, MIP-1 α och MIP-1 β (5). Det finns emellertid fler "CD8+ cell antiviral factor(s)" (CAF) påvisade hos CD8+ celler från både HIV-negativa blodgivare och HIV+ patienter (6). För att öka isoleringsfrekvensen är det därför vanligt att CD8-depletera de HIV-negativa cellerna före stimulering och om möjligt även CD8-depletera patientens celler.

Vid vissa tillfällen kan det vara önskvärt att isolera HIV specifikt från CD4+ lymfocyterna. Dessa kan då selekteras med hjälp av anti-CD4 täckta magnetkuler. Samodling skall ske med likaledes renade CD4+ celler från HIV-negativa blodgivare. Genom att monocytterna oftast förloras vid selektionen är PHA-stimulering lite effektiv och man bör välja anti-CD3 eller anti-TcR stimulering (7)

VIRUSKARAKTERISERING

Skillnader i *in vitro* biologiska egenskaper hos HIV isolat har visat sig vara av betydelse *in vivo*. Det finns ett samband mellan virus fenotyp och kliniskt sjukdomsstadium (8-10). Skillnaderna manifesterar sig *in vitro* i förmågan/oförmågan att infektera och kunna replikera i etablerade maligna celler, inducera syncytiebildning (i MT-2 celler) och bruk av olika kemokinreceptorer (CCR5, CCR3, CCR2, CXCR4) (11). Virusfenotypningen sker vanligtvis genom att samodla virusproducerande lymfocyter med indikator-celler (Jurkat-tat och MT-2). Slow/low, icke syncytiebildande virus replikerar endast i Jurkat-tat celler (ger ibland också syncytier) medan rapid/high syncytiebildande virus replikerar och ger syncytier i både MT-2 celler och Jurkat-tat (10,12).

HAR HIV-ISOLERING EN PLATS I DIAGNOSTIKEN?

Virusisolering spelade en viktigare roll i begynnelsen av epidemien än vad den gör idag. HIV-isolering är både tids- och resurs-krävande samt skall ske i laboratorium med BSL-3 standard. För att uppnå ett tillfredställande isoleringsresultat är det helt nödvändigt med personal som har löpande erfarenheter med isolering och odling av HIV. Per idag finns ett ställe i Norge som uppfyller dessa krav, Senter för virologisk forskning, UiB, Høyteknologisenteret i Bergen.

Har HIV-isolering fortsatt en plats i diagnostiken eller är det uteslutande av intresse i forsknings-sammanhang? **För** isolering talar att det är en helt specifik metod och man erhåller ett aktivt infektiöst virus. **Mot** isolering talar att metoden är mycket resurs- och arbetskrävande och att den inte är så känslig. Dagens specifika och känsliga molekylärbiologiska metoder har i flera sammanhang ersatt HIV-isolering. *Virusisolering kan dock vara av betydelse i vissa tillfällen:*

- a) vid identifiering av nya subtyper,
- b) i samband med speciella smittkedjor,
- c) ovanligt och annorlunda sjukdomsförlopp,
- d) vid uttalad terapivikt kan det vara betydelsefullt att isolera virus och testa dess känslighet för antivirala medel *in vitro*,
- e) eventuellt barn till smittad mor. Med dagens behandling av mor under graviditeten samt intravenösa behandling av barnet minskar risken avsevärt för smitta. Virusisolering är mindre känslig än molekylärbiologisk metodik och odling från navelsträngsblod kan aldrig utesluta kontamination av blod från modern.

Sammanfattningsvis finns det fortfarande behov för HIV-isolering i begränsad omfattning. Senter för virologisk forskning, Høyteknologisenteret i Bergen, kan erbjuda HIV-isolering endast efter direkt avtale med Birgitta Åsjö. Tel: 55 58 45 08 eller fax: 55 58 45 12.

REFERENSER:

- 1) Poiesz, B.J., Ruscetti, F.W., Gazdar, A.F., Bunn, P.A., Minna, J.D. and Gallo, R.C.: Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. Proc.Natl. Acad.Sci. 77:6815-19, 1980
- 2) Walker, B.D. and Plata, F.: Cytotoxic T lymphocytes against HIV. AIDS 4:177-84, 1990.
- 3) Walker, B.D., Moody, D., Stites, D.P. and Levy, J.A.: CD8+ lymphocytes can control HIV infection *in vitro* by suppressing virus replication. Science 234:1563-1566, 1986

- 4) Brinchmann, J.E., Gaudernack, G. and Vartdal, T.: CD8+ T cells inhibit HIV replication in naturally infected CD4+ T cells. Evidence for a soluble inhibitor. *J.Immunol.* 144:2961-69, 1990
- 5) Cocci, F., DeVico, A.L., Garzino-Demo, A., Arya, S.K., Gallo, R.C. and Lusso, P. Identification of RANTES, MIP-1 α and MIP-1 β as the major HIV suppressive factors produced by CD8+ T cells. *Science*, 270:1811-15, 1995
- 6) Røsok, B., Voltersvik, P., Larsson, B.M., Albert, J., Brinchmann, J. and Åsjö, B.: CD8+ T cells from HIV-1 seronegative individuals suppress virus replication in acutely infected cells. *AIDS.Res.Hum.Reptr.* 13:79-85, 1997
- 7) Brinchmann, J.E., Gaudernack, G., Thorsby, E., Jonassen, T.Ø. and Vartdal, F.: Reliable isolation of human immunodeficiency virus from cultures of naturally infected CD4+ T cells. *J.Virol.Methods* 25:293-300, 1989
- 8) Åsjö, B., Morfeldt-Månson, L., ALbert, J., Biberfeld, G., Karlsson, A., Lidman, K. and Fenyö, E.M.: Replicative capacity of human immunodeficiency virus from patients with varying severity of HIV infection. *Lancet* ii:660-62, 1986
- 9) Koot, M., Keet, I.P., Vos, A.H., de Goede, R.E., Roos, M.T., Coutinho, R.A., Miedema, F., Schellekens, P.T. and Tersmette, M.: Prognostic value of HIV-1 syncytium-inducing phenotype for rate of CD4+ cell depletion and progression to AIDS. *Ann.Intern.Med.* 118:681-88, 1993
- 10) Karlsson, A., Parsmyr, K., Sandström, E., Fenyö, E.M. and Albert, J.: MT-2 tropism as a prognostic marker for disease progression in HIV-infection. *J.Clin. Microbiol.* 32:364-70, 1994
- 11) Moore, J.P., Trkola, A. and Dragic, T.: Co-receptors for HIV-1 entry. *Current Opinion in Immunology* 9:551-62, 1997.
- 12) Åsjö, B., Albert, J., Chiodi, F. and Fenyö, E.M.: Improved tissue culture technique for production of poorly replicating Human Immunodeficiency Virus strains. *J.Virol.Methods* 19:191-96, 1988

BRUK AV INTERNKONTROLL

Gunnar Hoddevik, Avdeling for virologi, Statens institutt for folkehelse.

Generelt:

Analysen av kontrollmaterialet må alltid utføres parallelt med analysen av prøvematerialet. De fleste kommersielle tester leveres med både positiv(e) og negativ(e) kontrollprøve(r) som primært er med for å vise at testen holder produsentens krav til validitet. Dette kalles ofte for en "go - no go" kontroll. I tillegg til de "go - no go" kontroller som følger med fra produsenten, benyttes også uavhengige og sporbare internkontroller. Når et laboratorium akkrediteres for å utføre visse analyser, er bruk av internkontroller et krav. Disse kontrollene bør kalibreres mot internasjonalt aksepterte kontroller om slike finnes.

Hensikten med internkontrollene er å avsløre feil under analysearbeidet. Tilfeldige feil vil særlig påvirke presisjonen (reproduserbarheten), mens systematiske feil påvirker resultatenes nøyaktighet (riktighet). Tilfeldige feil er det ofte vanskelig å finne årsaken til; systematiske feil kan enten gi vedvarende for høye eller for lave verdier, og lar seg som regel påvise. Når presisjonen øker, blir resultatene mer pålitelige (*Bolann og Omenås, Tidsskr Nor Lægeforen nr. 21, 1997; 117: 3088-3092*). Størrelse og hyppighet på systematiske avvik som krever aksjon er gjenstand for individuell vurdering, men forslag til retningslinjer finnes (*Westgard og medarbeidere, Clin Chem, 1981; 27: 493-501*).

For serologiske tester med gradert respons i forhold til fortykning bør man, dersom det kun brukes én positiv internkontroll, legge denne i det lineære området av titeringskurven; helst like over cut off. I dette området er det mest relevant å påvise avvik. I en serie i et oppsett bør internkontrollen fortrinnsvis settes sist, fordi tilfeldig variasjon etter vår erfaring med et begrenset materiale er størst mot slutten av en serie. Brukes internkontrollen to eller flere ganger i hvert oppsett, bør den stå først og sist i oppsettet. For tester som utføres i plater kan kontrollen også brukes til å avsløre intra-assayvariasjon.

Dersom gjennomsnittsverdien av internkontrollen endrer seg ved overgang til nytt lottnummer av samme test og forholdene for øvrig er konstante, er reagenset forandret. Det er mulig med et forandret reagens uten at kontrollenverdien endrer seg, men det anses som lite aktuelt. Endret analytisk følsomhet ved overgang til nytt lottnummer følges ikke nødvendigvis av endret diagnostisk følsomhet, men brukeren bør være på vakt når kontrollverdien endres betydelig.

Tilgang på internkontroller:

Vanligvis har laboratoriene laget sine egne internkontroller, ofte med utgangspunkt i gammelt pasientmateriale. Noen har også brukt den mest høytitrede positiv kontroll som følger med testen fortynnet ut til en passende styrke. I dag finnes det flere kommersielle tilbud på internkontrollsera for anti-HIV. Fra mai 1997 har Statens institutt for folkehelse tilbudt en internkontroll for 3. generasjons anti-HIV EIA primærttester. Inntil september 1997 var det 12 laboratorier som hadde benyttet seg av tilbudet. For å sikre at kontrollmaterialet holdes mest mulig stabilt lagres det ved -70° C i rør med O-ring i korken, og fremsendes til bruker på tørris.

Gråsoner:

Med gråsonene menes det området som resultatene fra gjentatte oppsett av en spesifikk positiv prøve med cut off-verdi sprer seg over pga. analysevariasjon. Analyseverdier fra negative prøver kan også havne i dette området pga. uspesifikk reaksjon eller fordi en ekte negativ prøve rent unntaksvis pga. tilfeldighet når opp mot cut off. Noen tester har en gråsoner som er anbefalt av produsenten. For anti HIV tester henviser Abbott til retningslinjer fra Paul Erlich-Instituttet i Tyskland som, avhengig av testen, anbefaler fra 10-15 % av cut off som negativ gråsoner. Det er ikke oppgitt hvordan gråsonen beregnes. Laboratorier som bestemmer sin egen gråsoner gjør dette vanligvis med utgangspunkt i variasjonen (størrelsen på standardavviket) eller variasjonskoeffisienten (standardavviket i % av gjennomsnittsverdien) på resultatene av laboratoriets internkontroll (artikkelen til Bolan og Omenås). Forutsetningen er at internkontrollen er valgt slik at spredningen omkring gjennomsnittet ligger på den lineære del av titreringskurven og at dette også ville gjelde for spredningsområdet under cut off om kontrollens (gjennomsnitt)verdi hadde ligget på cut off. Systematiske feil forutsettes lukket ut.

Dersom serum fra en HIV-pasient i tidlig omslagsfase brukes som internkontroll, må en forvente større spredning enn med et fortynt serum fra sen rekonvalesent. Dette skyldes blant annet at tidlige antistoffer har lav bindingsstyrke og at IgG og IgM opptrer i blanding. Folkehelsas tilbud for løpende kontroll av anti HIV EIA primærttester er et fortynt serum tappet ca. 1/2 år etter infeksjonen. Et ufortynnet omslagsserum med verdi like over cut off ville kanskje være mer relevant, men kan likevel ikke skaffes i de mengder som trengs for å etablere en felles nasjonal kontroll for løpende bruk.

Erfaring med bruk av Folkehelsa's internkontroll for anti-HIV EIA primærttester:

Folkehelsa's internkontroll for anti-HIV EIA primærttester ble opprinnelig utprøvet på fem laboratorier med følgende resultat:

Lab. nr.	Test	Antall analys er	Gjennomsnitt- resultat i % av cut off	Standardavvik
1	Abbott HIV-1/HIV-2 3rd gen. pluss EIA	58	179	20
2	Abbott HIV-1/HIV-2 3rd gen. pluss EIA	65	150	16
3	Abbott HIV-1/HIV-2 3rd gen. pluss EIA	52	145	21
4	Abbott AxSYM HIV-1/HIV-2	62	189	31
5	Murex HIV I + II	68	204	44

I løpet av det 1/2 året den har vært i bruk, har to laboratorier meldt tilbake om problemer med spesielle lottnummer av Abbotts HIV-1/HIV-2 3. generasjon plus EIA test:

a) Fra fylkeslaboratoriet på Lillehammer ble det for et spesielt lottnummer rapportert om et gjennomsnitt på 0,89x cut off (gjennomsnitt av fem analyser). Når restene av de samme kontrollene ble analysert ved et annet laboratorium som brukte et annet lottnummer av samme test, ble gjennomsnittet av fire analyser 1,39x cut off. Lillehammer fikk tilsvarende verdier når de byttet til nytt lottnummer.

b) Fra laboratoriet ved Innherred sykehus, Levanger, var gjennomsnittet av 3 lottnummer, med tilnærmet samme gjennomsnitt, 1,32x cut off (55 analyser). Ved overgang til et spesielt, nytt lottnummer sank gjennomsnittet til 1,09x cut off (20 analyser). Presisjonen var den samme. Levanger kontaktet Abbott og fikk tilsendt et nytt lottnummer, som ga kontrollverdier med samme verdi som opprinnelig.

For alle de lottene som er nevnt ovenfor godkjente kittets egne kontroller oppsettet ("go - no go" kontroll).

For samme tidsrom har vi fått tilbakemelding fra Telelab i Skien som med ulike lottnummer av Abbott Axzym HIV-1/HIV-2 har fått stabile gjennomsnitt på ca. 1,8x cut off.

Erstatning av reagens:

Det anbefales at et laboratorium som ved overgang til nytt lottnummer får tydelig avvikende gjennomsnittsverdi i forhold til den vanlige for internkontrollen, kontakter Avdeling for virologi, Folkehelse slik at en i fellesskap kan avgjøre om en skal henvende seg til leverandøren for å få reagensene erstattet.

Konklusjon:

Bruk av felles internkontroll på landsbasis kan være gunstig fordi erfaringer kan deles fortløpende mellom de laboratoriene som bruker samme test. Med nasjonal produksjon er det også mulighet for kort vei mellom bruker og produsent, for både utvikling og tilpassing av kontroller. Det kan også være en fordel at kontrollene kan utprøves og kontrolleres i vår nasjonale ringtest, bl.a. for å få visshet om at reagensene er stabile når de samme brukes over flere år.

TRENGER VI EN NASJONAL GODKJENNINGSORDNING FOR HIV-TESTER?

Ivar Ørstavik, Avdeling for virologi, Statens institutt for folkehelse.

Det er en meget kompleks oppgave å sikre optimal kvalitet på laboratoriediagnosen av HIV-infeksjoner. Forskjellige former for nasjonal godkjenning av testsett ("kit") for in vitro diagnostika (IVD) er ett av flere tiltak.

Nasjonal utvikling

I tiden fra 1986 til tidlig på 1990-tallet kom i alt 4 rundskriv fra Helsedirektøren hvor et ad hoc utvalg ga råd om bruk av tester for HIV-diagnostikk. Før og etter 1990 har Avdeling for virologi sendt ut rapporter til de medisinske mikrobiologiske laboratoriene om resultater av evalueringer av flere forskjellige testsett basert på egne undersøkelser. Ringtestene fra avdelingen har praktisk talt hvert år hatt testmateriale for HIV-undersøkelse, og en kan se på rapportene fra disse ringtestene som en form for rådgivning. Ringtestene gir også en oversikt over de viktigste testsett som er i bruk i landet, og det samme gjør den katalog over testsett o.a. for rutineundersøkelser i virologi og bakteriologisk serologi som alle laboratorier bidrar til og som utgis fra Folkehelse med ca. ett års mellomrom. Det skjer også en rådgivning på regionalt nivå. Vi er alle kjent med at det skjer en utstrakt kommunikasjon mellom landets laboratorier, som bidrar til valg av testsett.

Konklusjon: Det har aldri eksistert en formell godkjenningsordning for HIV-testsett i Norge. Valg av testsett har skjedd på grunnlag av en relativt lite formalisert rådgivning.

Internasjonal utvikling

Flere land i og utenfor Europa har etablert nasjonale institusjoner for godkjenning av IVD for HIV-infeksjon. Eksempler er Food and Drug Administration i USA og Paul Ehrlich Institut i Tyskland. I Frankrike er fra 1994 alle humanmedisinske IVD for diagnostikk og screening underlagt registreringsplikt, og registrering er bl.a. avhengig av godt dokumentert klinisk evaluering. For registrerte IVD for HIV-, HTLV- og hepatittvirus(B og C)-infeksjoner må produsenten dessuten gjennomføre utprøving av alle produksjonslotter på testpaneler utlevert fra godkjenningsorganet "Agence du médicament", som også foretar stikkprøver i egen regi. Institusjonaliserte registreringsordninger for HIV-IVD finnes i flere andre europeiske land, men synes å være mindre omfattende i Norden og i Storbritannia. I Danmark anbefaler nå Sundhedsstyrelsen landets blodbanker å anvende bestemte anti-HIV-testsett etter råd fra Statens seruminstitut. I Storbritannia praktiseres en lignende ordning for testsett til bruk for blodgiverscreening.

Konklusjon: I utlandet synes det å være en tendens til at man krever mer formaliserte prosedyrer for å sikre optimal diagnostikk av HIV-infeksjon. En viktig grunn er hensynet til bruk av disse metoder for screening av blodgivere og for sikring av blodprodukter.

(Interessant i denne forbindelse er arbeidet med EU-lovgivning på området. Her søker man å regulere omsetningen av medisinsk utstyr ved såkalte direktiver, som allerede er tilpasset den lov for medisinsk utstyr hos oss som forvaltes av Helsetilsynet. Men direktivet som dekker HIV-testsett (in vitro diagnostika) er ennå ikke ferdig. En viktig årsak er stor uenighet

mellom landene nettopp hvor store krav man skal stille til produsentenes dokumentasjon før de skal få lov til å markedsføre HIV-testsett.)

Aktuelle HIV-testsett

HIV1+2 -testsett i bruk i Norge ved begynnelsen av 1997 (Hovedkilde: Diagnostiske rutinetester i virologi og bakteriologisk serologi ved medisinske laboratorier, Folkehelse 1997)

Navn:	Metode	Antall lab.	Herav blod*
AxSYM HIV-1/HIV-2, Abbott	MEIA	10	8-9
IMx HIV-1/HIV-2 3rd gen Plus, Abbott	MEIA	3	-
HIV-1/HIV-2 3rd gen. Plus EIA, Abbott	EIA	17	9-10
Genelavia mixt, Sanofi Diagn. Pasteur	EIA	2	1
Wellcozyme HIV 1+2, Murex	EIA	2	-
<u>ABBOTT PRISM HIV-1/HIV-2, Abbott</u>	<u>ChLIA</u>	<u>1</u>	<u>1</u>

* Med forbehold, ikke spesifisert i kilden.

Dessuten 2 hurtigtester (SUDS og Test Pack) i tilsammen 4 laboratorier, og 2 forskjellige Western blot testsett i 6 forskjellige laboratorier, og 3 forskjellige PCR-baserte testsett i 4 forskjellige laboratorier. For påvisning av HIV nukleinsyre var det i bruk 2 kommersielle og 3 egenproduserte tester i 5 forskjellige laboratorier.

I tillegg 3 forskjellige antigenester for HIV-1 i 6 laboratorier

Ialt regner vi med at 29 eller 30 laboratorier eller blodbanker utfører en eller flere HIV-tester som rutineundersøkelse.

Konklusjon: Mer enn 16 forskjellige testsett er i bruk. Prioritert i rådgivning har vært tester som brukes for å utelukke HIV-infeksjon. Vanligvis brukes de samme testsett som førstevalg ved diagnostiske undersøkelser og ved screening (feks. for å utelukke HIV-infeksjon hos blodgivere og organdonorer). Abbott er nesten enerådende her på det norske marked.

Laboratoriernes valg av nytt testsett

Det kan være flere grunner til at et laboratorium ønsker nytt HIV-testsett:

- Bedre sensitivitet og spesifisitet
- Tekniske årsaker (Systemtilpasning)
- Erstatte et testsett som viser varierende kvalitet (batch-variasjon)

- (Ny-introduksjon av HIV-test på laboratoriet)

Nye og bedre testsett på markedet er kan hende den viktigste grunn. Det er viktig at laboratoriet vet når det nye er så mye bedre enn det testsett det selv bruker at det må skifte.

Tilpasning til eksisterende teknikk for andre testsett eller ønsket om å anskaffe en helt ny "pakke" er en minst like vanlig grunn til at det blir snakk om å introdusere noe nytt. Det er imidlertid også mulig at laboratoriets tekniske "løsning" kan stille seg hindrende i veien for nødvendig overgang til nytt testsett.

Hvis batch-variasjoner får for stort omfang, bør skifte av testsett overveies.

Nedenfor er listet det jeg anser som de viktigste kilder for opplysninger om testsett som laboratoriene benytter seg av når de skal gjøre et valg. I tillegg kommer litteratur på området og andre kanaler for mer generell faglig informasjon.

- Produsentens opplysninger
- Nasjonal rådgivning/anbefaling.
- Andre lands anbefaling/godkjenning

Det er mange forskjellige produsenter og enda flere testsett, og for enkelte kan det være vanskelig å holde en tilstrekkelig oversikt. Produsentens presentasjon er viktig, men må ikke alene avgjøre valget av nytt testsett. Tilbudet på dette området endres imidlertid stadig med at nye testsett introduseres, og det er derfor naturlig at også mer omfattende og mer nøytral informasjon blir lagt til grunn. Her er det at den nasjonale og internasjonale rådgivning og godkjenning som nevnt innledningsvis kommer inn.

Konklusjon: En nasjonal rådgivning må sikre en god oversikt over kvaliteten på tilgjengelige testsett. (Det vil være naturlig at den baseres på kunnskap om virksomheten ved nasjonale rådgivnings- og godkjenningsorganer i andre land.). Rådgivningen skal i første rekke sikre at de nye testsett som tas i bruk er av tilstrekkelig kvalitet. Den bør også bidra til at laboratoriene skifter over til nye testsett av bedre kvalitet når det er faglige grunner til det.

Avslutning

Takket være blant annet ad hoc utvalgenes arbeid i en periode da HIV-testenes sensitivitet og spesifisitet endret seg betydelig og den mindre formelle rådgivning i de følgende år, kan det hevdes at optimale testsett har vært brukt og brukes i Norge. Det har trolig også vært viktig at testsettene i vårt land med få unntak har vært brukt av spesialister i medisinsk mikrobiologi.

Jeg vil derfor ikke foreslå at vi i Norge i dag stiller krav om et nasjonalt godkjenningsorgan for HIV-testsett. Dette vil bli dyrt og kan i verste fall føre til forsinket introduksjon av bedre testsett, noe historien har eksempler på, både i USA og i Europa.

Etter min oppfatning bør vi basere oss på den nasjonale rådgivning, som har fungert godt hittil. Den har flere aktører, og innledningsvis er nevnt regionslaboratoriene og Folkehelsen. Rådgivningen har som regel vært ad hoc-preget, og det er naturlig at hoveddelen av rådgivningen skjer på den måten. I tillegg bør, etter min oppfatning, en del av den nasjonale

rådgivning blir noe mer formalisert enn i dag, ved at den ytterligere *dokumenteres*, f.eks. i form av regelmessige rapporter.

En formalisert/dokumentert rådgivning bør i tillegg til HIV-testsett, også omfatte testsett for HTLV- og kroniske hepatittvirusinfeksjoner. Ved Folkehelsa har vi fått en henvendelse fra Transfusjonsrådet om dette, og et nordisk møte av blodbanker i fjor gikk så langt at det ønsket nasjonale godkjenningsorganer i Norden. Jeg tror også det er viktig at dette spørsmålet reises på grunn av det økte engasjement som flere andre land i Europa viser. Vi må ikke risikere at vårt land blir en dumpingplass for tvilsomme testsett eller underlødige batcher av testsett.

Avdeling for virologi har en rådgivningsoppgave i dag. I tillegg til arbeid som er nevnt innledningsvis, har vi i de senere år søkt å utvide våre kontakter internasjonalt, i første rekke med søsterorganisasjonene i København, i Stockholm og i Helsingfors, og dessuten i Frankrike og i Tyskland. Vi har også god kontakt med og fått i stand en samarbeidsavtale med Helsetilsynet som blant annet forvalter Lov om medisinsk utstyr. Avgjørende for avdelingens rådgivning er imidlertid samarbeid med all den kompetanse som fins på området innenfor det nasjonale fagmiljø, og at vi sikrer at rådgivningen er uttrykk for en nasjonal *konsensus*.

Konklusjon

Møtet inviteres til diskusjon om hvordan vi skal legge opp den nasjonale rådgivningen for de nevnte testsett i årene som kommer. Mine stikkord er litt øket dokumentasjon av aktiviteten, nasjonalt samarbeid og økt kontakt med andre institusjoner/organisasjoner i andre land (i første rekke de nordiske land) som gir råd/godkjenner testsett.

Kilder:

AIDS-skriv nr. 6. 31.02.86, Helsedirektoratet: Vurdering av de kommersielle undersøkelsesmetodene til screening av blodgivere og testing av pasienter for antistoffer mot HTLV-II/LAV.

AIDS-skriv nr. 26. 22.02.88, Helsedirektoratet: Vurdering av kommersielle tester for undersøkelse på HIV-antistoff og HIV-antigen.

AIDS skriv nr. 40. 13.02.90, Helsedirektoratet: Vurdering av kommersielle tester for undersøkelse på HIV-antistoff.

Det er innhentet opplysninger fra Folkehelsas søsterorganisasjoner i Helsingfors (KTL), København (SSI) og Stockholm (SMI). Opplysninger fra Agence du Medicament baseres på skriftlig materiale og opplysninger fra Ingeborg Hagerup Jensen, Helsetilsynet.

DEN NORSKE HIV-EPIDEMIEN OG FOREBYGGINGSTILTAK

Preben Aavitsland, Avdeling for bakteriologi, Folkehelsa

Overvåking

HIV-infeksjon meldes anonymt til Meldingssystem for smittsomme sykdommer (MSIS) mens AIDS meldes med navn. Meldingsskjemaene er som regel meget godt utfylt, men i noen tilfeller må vi kontakte melderer for ytterligere opplysninger. Meldingsdekninga er 100%: alle diagnostiserte tilfeller blir meldt fra laboratoriene, og vi får inn skjema fra klinikerne på alle pasientene.

HIV-prevalensen følges systematisk blant gravide, blodgivere og rekrutter, og mindre systematisk i andre grupper, som rettslig obduserte stoffmisbrukere og stoffmisbrukere i institusjoner. I tillegg overvåkes den samlede testeaktiviteten. Opplysningene forsøkes sett i sammenheng.

Utvikling før 1997

Ved inngangen til 1997 var 1659 personer diagnostisert med HIV-infeksjon i Norge. 1539 (93%) av disse tilhørte de fire store risikogruppene. Tabellen viser diagnoseår for disse tilfellene.

	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	Tot	Andel
Homoseksuelle menn	12	103	70	72	46	48	36	59	28	43	37	44	35	633	38%
Stoffmisbrukere	1	75	96	67	31	24	19	14	11	11	11	9	8	377	23%
Heteroseksuelle	0	6	11	29	33	22	18	22	29	27	17	24	33	271	16%
Afrikane	0	1	6	19	20	30	11	40	31	29	17	23	31	258	16%

Opplysninger om tidligere negative tester og smitteanamnesen gjør det mulig å fastslå året for smitte for en stor andel av tilfellene. Vi kan derfor tegne et rimelig sikkert bilde av epidemiens utvikling i Norge:

Homoseksuelle menn: De første tilfellene ble smittet like før 1980, men epidemien skjøt fart først i 1982-4 før den snudde etter en topp på 70-100 nye tilfeller per år i 1985. Epidemien snudde før helsemyndighetenes tiltak kom i gang. Dette kan trolig tilskrives gruppas egne forebyggingsiltak og selvfølgelig en umiddelbar og stor atferdsendring som følge av frykt. Etter 1986 har 40-50 blitt smittet hvert år, men det ser ikke ut til å være noen nedgang.

Stoffmisbrukere: De første tilfellene ble smittet tidlig på 1980-tallet og epidemien skjøt fart først fra 1984. Den snudde raskt i 1985-6 etter at over 200 var smittet. Dette var over et år før helsedirektøren ga klarsignal for friere tilgjengelighet av sprøyter. Kulimineringen av epidemien skyldes antakelig andre endringer i atferd: Bruk av bare egne sprøyter, desinfisering av sprøyter, deling av sprøyter med bare HIV-negative. Etter 1986 har insidensen gått ned fra 30-40 til 10-15 årlig, trolig som følge av vedvarende sikker atferd og rehabilitering eller død av potensielle smittekilder.

Heteroseksuelle kvinner og menn: Vi anslår en langsomt stigende insidens med start i 1980-2 og med 20-30 nye smittede per år de siste ti åra. 151 (56%) er smittet i utlandet, de fleste i Afrika, og 120 (44%) i Norge. Smittekilden for personer smittet heteroseksuelt i Norge er:

stoffmisbrukere (26%), afrikanere (19%), biseksuelle menn (7%), blodmottakere (4%) og andre (44%). Blant de siste finner vi heteroseksuelle smittekilder uten kjent risiko for HIV-infeksjon. Økning i denne gruppa vil være et tegn på en økning i den heteroseksuelle epidemien, såkalt andregenerasjons heteroseksuell spredning. Foreløpig har det vært få tegn til dette i Norge.

Afrikanere: Personer som kommer fra afrikanske land sør for Sahara til Norge, og som er smittet før ankomst, tilhører denne gruppa. Antallet avhenger av hvor mange personer som kommer, og hvor de kommer fra. Mange personer i denne gruppa har ikke fått oppholdstillatelse (uavhengig av HIV-infeksjon) og er derfor ikke lenger i landet.

Situasjonen ved inngangen til 1997

	Diagnostiserte		Kjente døde		Mørketall HIV-infeksjon	HIV-positive i live i Norge
	HIV	AIDS	av AIDS	av andre årsaker		
Homoseksuelle menn	633	318	270	7	ca 150	ca 500
Stoffmisbrukere	377	82	59	62	ca 20	ca 200
Heteroseksuelle	271	79	56	1	ca 150	ca 350
Afrikanere	258	31	-	-	ca 50	ca 150

Vi antar at mørketallet er høyest blant homoseksuelle menn. Mørketallet er trolig veldig lavt blant stoffmisbrukere fordi denne gruppa har høy testeaktivitet, bl.a. i samband med opphold i fengsler og behandlingsinstitusjoner. Det er stor dødelighet av ikke-HIV-relaterte årsaker blant stoffmisbrukerne.

Utfordringer de nærmeste åra og konklusjon

Særlige utsatte grupper i åra framover er norske turister og arbeidstakere i Afrika og Sørøst-Asia, homoseksuelle menn og faste partnere til HIV-positive.

Den norske forebyggingstrategien bygger bl.a. på tidlig diagnostikk og veiledning av HIV-smittede. HIV-testing må markedsføres enda sterkere for å nå de udiagnostiserte (mørketallet). Bedre behandlingsmuligheter er et tilleggsargument. Det må ansees som meningsløst å ikke kjenne til sin HIV-infeksjon.

Videre må allmennlegene bli flinkere til å gjenkjenne symptomer og tegn på primær HIV-infeksjon og, med veiledning fra laboratoriene, følge riktig prøvetakingsstrategi i slike tilfeller. Klinikerne må også bli flinkere til å gjenkjenne symptomer og tegn på langt kommet HIV-sykdom.

Ettersom melding av HIV-infeksjon skjer uten pasientidentitet, kan ikke MSIS følge pasientene før de meldes med AIDS. Dersom de dør eller utvandrer før AIDS, forblir dette ukjent for MSIS. Dette problemet blir større dersom HIV-positives levetid uten AIDS forlenges som følge av forbedret behandling. Vi vil da få redusert mulighet til å anslå hvor mange HIV-positive som lever i landet til ethvert tidspunkt.

ANTIVIRAL TERAPI OG PASIENTMONITORERING

Arild Mæland, Infeksjonsmedisinsk avdeling, Ullevål Sykehus

Det er i løpet av de 2-3 siste årene skjedd en revolusjon innen HIV-terapien. Dette paradigmaskifte skyldes i hovedsak tre forhold: En nyervervet kunnskap om HIV-infeksjonens dynamikk, utvikling av metoder for å måle mengden av virus i blod og utvikling av proteasehemmere. David Ho ble for sine bidrag til det første punktet, med bestemmelse av virusets levetid i plasma og forskjellige celler, og de forskjellige HIV-infiserte cellers levetid, kåret som årets mann 1996 i Time Magazine. HIV-infiserte celletyper som lymfocytter og dendritiske celler antas å ha en halveringstid fra ca en dag opp til to uker, men ifølge Ho har man nå holdepunkter for at enkelte HIV-infiserte celler kan ha en halveringstid på opptil 140 dager. Halveringstid for fritt virus i plasma antas på grunnlag av forsøk hos aper å være så kort som under et kvarter, mens generasjonstiden for HIV er 2,6 dager (Perelson et al. Science 1996;271:1582-5).

I størrelsesorden 10^{10} til 10^{12} viruspartikler dannes pr. dag (ca 1 mill. x antall RNA-kopier pr. ml plasma ved måling) hvorav ca. 1 av 1000 infiserer nye celler. HIV har sannsynligvis et enormt tilpasningspotensiale. HIV-genomet består av ca. 10 000 nukleotider og antas å ha en mutasjonsfrekvens på ca. 1:10 000, dette betyr at hver eneste viruspartikkel kan ha en endret nukleotide og hvis dette fører til en ny aminosyre vil hvert eneste virus ha en mutasjon med en ny aminosyre. Hvis slike mutasjoner har et fortrinn, f. eks. resistens overfor et antiviralt middel, fremfor andre, vil viruspartikler med slike mutasjoner raskt kunne etablere viruspopulasjoner resistente overfor antivirale midler (JM Coffin. Science 1995;267:483-9). Det er vist ved monoterapi at resistensutvikling med økt viremi skjer allerede innen to uker etter terapistart (R Schuurmann et al. J Inf Dis 1995;171:1411-9)

Monitoreringsmarkører.

Våre markører for monitorering av behandling ved siden av klinikken er CD4-tallet og HIV-RNA i plasma. CD4-tallet har beholdt sin sentrale plass helt siden HIV-epidemiens start og er fortsatt det beste mål for pasientens immunologiske reaktivitet og risiko for sykdomsutvikling. Vår nye markør, HIV-RNA er den markør som best angir med hvilken fart immunsvikten progredierer. Brukt sammen er de to meget gode prognosemarkører. HIV-antigen antas idag ikke å ha særlig verdi i monitorering og bør utgå til fordel for HIV-RNA bestemmelse.

Bestemmelse av en pasients RNA-nivå under terapi bør skje med en så sensitiv metodikk som mulig. Av metoder tilgjengelige for rutinebruk har Amplicor Monitor vært den mest sensitive med kvantiering mulig ned til 400 kopier pr. ml. Denne test krever 0,2 ml plasma. Med en annen teknikk som krever 0,5 ml plasma og en ekstra høy-hastighets sentrifugering, kan man øke sensitiveten til Amplicor Monitor slik at man kan kvantitere virusmengder ned til ca. 50 viruskopier pr. ml. Vi har ved Ullevål Sykehus nå i snart ett år anvendt standardutgaven av Amplicor Monitor og er nå i ferd med å introdusere den ultrasensitive varianten i rutinen. Det er elegant vist i studier at dess lavere et assay's kvantiteringsgrense er dess bedre vil assayet kunne skille ut de pasienter som vil ha langvarig effekt av terapien, når man ser på hvilke pasienter som kommer under denne grensen etter terapistart. Dess lavere man kommer etter terapistart dess større sjans for fremtidig vedvarende effekt. FDA gir nå foreløpig godkjenning etter et «accelerated approval program» til nye antivirale medikamenter som har god effekt bedømt ved RNA-målinger i et halvt år.

Amplicor Monitor er basert på en subtype B primer og har hatt lav sensitivitet for en del andre subtyper. Dette har i vårt land hatt den konsekvens at afrikanere og en del heteroseksuelt smittede pasienter har hatt falsk lave verdier ved RNA-måling. Imidlertid har man nå utviklet «Add-in primers» basert på andre subtyper. Disse ble tatt i bruk ved Ullevål sykehus sommeren 1997 og vi kunne raskt observere hvordan de nevnte pasientgrupper fikk økte verdier ved sine målinger.

Terapi

Tilgjengelige midler

Vi har idag fem registrerte nukleosidanaloger; zidovudin (Retrovir), didanosin (Videx), zalcitabine (Hivid), lamivudin (Epivir) og stavudin (Zerit). Tre proteasehemmere er tatt i bruk og er under registrering; saquinavir (Invirase), indinavir (Crixivan) og ritonavir (Norvir). Det ventes i løpet av vinteren en ny utgave av saquinavir (Fortovase) som vil ha større biotilgjengelighet og dermed større antiviral effekt enn dagens saquinavir, likeså forventes nelfinavir (Viracept) å bli registrert med det første. Det finnes to non-nukleosid revers transkriptasehemmere tilgjengelig på registreringsfritak: nevirapine (Viramune) og delavirdin (Rescriptor) men det er hittil liten erfaring med bruk av disse i Europa.

Når skal terapi startes ?

Det har de siste årene vært en trend mot å starte tidligere i forløpet av HIV-infeksjonen enn før. Et internasjonalt ekspertpanel anbefaler nå å sette alle med virusmengde over 10 000 kopier/ml på behandling uansett CD4-tall (CCJ Carpenter et al. JAMA 1997;277:1962-9). Retningslinjer fra National Institutes of Health i USA under publisering i MMWR vil anbefale at alle med CD4-tall under $500 \times 10^6 / L$ eller med RNA-nivå over 20 000 skal starte terapi. Danskene har foreløpig blitt enige om å behandle alle med CD4 under 300 eller RNA over 100 000 / ml. Argumenter for å starte tidlig er bl.a. at det da er lettere å oppnå god effekt og at man ikke presist vet når det kan være for sent å starte med tanke på å unngå immunsvikt i pasientens resterende levetid Argumenter for sen start er at at man ikke har oversikt over eventuell langtids toksisitet av dagens midler og at dagens beste terapi, trippelterapi med to nukleosidanaloger og en proteasehemmer, ikke gir ønsket effekt hos alle pasienter. Ca. en tredjedel av pasientene vil ikke komme ned under påvisningsgrensen for virus i blod selv med trippelterapi Ser man tilbake på utviklingen de siste årene, så har det nok vært lurt å vente med terapi. Mange av de som startet med monoterapi i 1995 ville nok profitert på å vente til 1996 og da startet dobbelterapi, og mange av dem som startet dobbelterapi i 1996 ville nok vært tjent med å heller vente til 1997 og da startet med trippelterapi. Jeg tror mange av våre pasienter som i år starter trippelterapi vil kunne være tjent med å vente til neste år, ikke nødvendigvis på fire-medikamenters terapi, men på et bedre utvalg av midler og på økt viten om når og hvordan man bør starte. All erfaring fra vi startet med zidovudin monoterapi til dagens mer avanserte forståelse og terapi sier oss at pasienter som har vært antiviralt behandlet, uansett form for terapi, er vanskeligere å behandle med en ny terapi enn pasienter som aldri har vært behandlet. I denne sammenheng omtales ofte pasientene som terapi-erfarne og terapi-naive.

De nevnte retningslinjer gir relativt brå grenser for start av terapi og lager en del åpenbart lite rasjonelle situasjoner. Etter danskens retningslinjer skal en pasient med CD4-tall på 320 og et virustall på 90 000 kopier ikke behandles mens en pasient med 290 celler og 1000 kopier

skal behandles, som også skal en pasient med 700 celler og 110 000 kopier. Retningslinjer bør etter min mening inkorporere den dynamiske sammenheng som det er mellom RNA nivå og antall CD4-celler. Dess høyere CD4-tall, dess høyere RNA nivå bør kreves for å starte, fordi pasienten da er lengre fra immunsvikt. Dess lavere CD4-tallet er dess mindre virusmengde kan man tolerere, idet pasienten da er i større fare for å utvikle immunsvikt. En regel som ivaretar dette resonnement må angi et behandlingstidspunkt hvor RNA-nivå relateres til CD4-tallet. Regelen om å starte når

$$\log \text{RNA} > \text{CD4} : 100$$

er lett å huske og bryter ikke med ovennevnte argumentasjon for valg av starttidspunkt.

En viktig prognosestudie fra MACS-cohorten ble publisert sommeren 1997 (Mellors et al. Ann Int Med 1997;126:946-54) og er en stor del av grunnlaget for de ovennevnte retningslinjer fra NIH. En tabellarisk oversikt over når man skal starte terapi basert på nevnte prognose-studie kan settes opp slik:

RNA \ CD4	< 200	200 - 300	300 - 500	> 500
> 100 000	T	T	T	T
30 000 - 100 000	T	T	I	I
10 000 - 30 000	T	I	0	0
< 10 000	T	I	0	0

T = Terapi, I = individuell vurdering, 0 = Ikke terapi .

Ved diskusjon av prognosen for pasienter med høye CD4-tall og høye RNA-nivå må man huske på at disse pasientene vil vise tegn til progresjon i form av fallende CD4 før de kliniske manifestasjoner kommer, og dermed kan man ikke si at deres dårlige prognose indikerer rask terapistart på samme måte som for pasienter med lave CD4-tall. Det er også viktig når man vurderer behandlingstart å ha klart for seg at valget ikke står mellom å starte med en gang eller ikke starte, men mellom å starte eller vente. Denne ventetid bør benyttes aktivt til å lære pasienten om HIV og HIV-terapi, spesielt om hva vi ønsker å oppnå med terapien, om nødvendigheten av compliance og om interaksjoner. Alle pasienter bør ha minst et par konsultasjoner før behandlingstart. På grunn av usikkerheten i målingen bør man også ha et par sett av CD-4tall og HIV-RNA med en måneds mellomrom. Ved siden av CD4 og HIV-RNA vil også kunnskap om smittetidspunkt og stabilitet eller progresjon av CD4 og HIV-RNA kunne bidra til en riktig avgjørelse om å starte eller vente.

Denne diskusjon om tidspunkt for start gjelder asymptomatiske pasienter, pasienter med kroniske HIV-relaterte sykdomsplager bør starte behandling uansett verdi av de nevnte markører.

Hva skal man starte med ?

Vår mest effektive etablerte terapi i dag er trippelterapi bestående av to nukleosidanaloger og en proteasehemmer . En trippelterapi bestående av to nukleosidanaloger og en non-nukleosid revers transkriptasehemmer, nevirapin, har også vist god effekt (i INCA-studien) men pasientene hadde her relativt høye CD4-tall og lave RNA-verdier. Vi har som nevnt heller

ikke erfaring med denne kombinasjonen i Europa. Det er derfor idag utstrakt enighet om at alle pasienter bør starte med to nukleosidanaloger og en proteasehemmer. Dobbelterapi med to nukleosidanaloger gir på langt nær samme effekt. Det har vært hevdet at slik dobbelterapi skal kunne gies til pasienter med et lavt HIV-RNA nivå, og ved bruk av RNA-assays med høy kvantiteringsgrense får man da relativt bra effekt. Imidlertid viser bruk av assays med lave kvantiteringsgrenser (50 kopier/ml og under) at slik behandling gir langt dårligere effekt enn trippelterapi også i denne pasientgruppen (AVANTI-2 studien som presentert av J. Lange oktober 97). Det er også vist at det nettopp er de pasienter som kommer under kvantiteringsgrensen i de mest sensitive assays som vil ha vedvarende effekt av behandlingen (Inca-studien som presentert av J. Montaner oktober 97)

Av de tilgjengelige proteasehemmerne anses ritonavir og indinavir som mer effektive enn saquinavir, men gir også mer bivirkninger. I og med at den initiale antivirale effekt bør være sterkest mulig for å unngå resistensutvikling og tilbakefall med viremi, velges oftes ritonavir eller indinavir. Ritonavir har den fordel at det tas kun morgen og kveld, mens indinavir må tas tre ganger daglig og krever fasting, samt rikelig væskeinntak for å unngå utfelling i urinen. Ritonavir har nok mest initiale bivirkninger, men dose-opptrapping over et par uker hjelper mye på dette. I et slikt trippelopplegg kan man benytte en av flere nukleosidkombinasjoner: ZDV+DDI, ZDV+3TC, d4T+3TC, DDI+d4T eller ZDV+DDC. Zidovudin finnes nå også som tabletter a 300 mg og tas da to ganger daglig. Saquinavir vil som nevnt snart foreligge i kapsler som inneholder den dobbelte mengde saquinavir i en ny galenisk formulering som vil gi en 8 - 10 ganger bedre biotilgjengelighet. Hvis dette midlet innfrir forventningene om å ha en antiviral effekt på linje med indinavir og ritonavir samt en tolerabilitet som «gamle» saquinavir, vil nye saquinavir kunne bli et førstevalg som proteaseinhibitor, også fordi ved svikt i form av økt viremi vil muligheten for å ha fornyet effekt ved skifte fra saquinavir til ritonavir eller indinavir være større enn ved skifte fra indinavir eller ritonavir til saquinavir. Dette skyldes at saquinavir sannsynligvis gir mindre utvikling av kryssresistens mot ritonavir og indinavir enn omvendt.

Reserveterapi

Pasienter som ikke tolerer en slik trippelterapi som nevnt ovenfor, vil oftest kunne skifte til andre medikamenter med fortsatt god effekt idet vi som nevnt har mange midler og kombinasjoner å velge blant. Derimot, for pasienter som ikke har tilstrekkelig effekt av en slik trippelterapi, har vi pr. idag dessverre lite å by på. Ofte vil dette være langtkomne pasienter med høy sykelighet og stor tilleggsmedikasjon, hvor også interaksjonene ofte blir uoverskuelig. Regelen er at man ved dårlig effekt skal forsøke å skifte minst to medikamenter, hvis dette er mulig. Sannsynligvis vil vi allerede neste år ha et bedre utvalg av medikamenter å bruke i slike situasjoner.

Hos pasienter som har stått på forskjellige medikamenter i flere år, gjerne med monoterapi etterfulgt av dobbelterapi etterfulgt av trippelterapi, kan det være vanskelig å vite hvilken nytte pasienten egentlig har av terapien. Hos noen av disse kan det være aktuelt å seponere terapien et par måneder for å se hvilket RNA-nivå pasienten ligger på uten behandling (pasientens «set-point»). Skal man være sikker på at pasienten har nytte av terapien bør HIV-RNA nivået under behandling være minst 0,5 - 0,7 log lavere enn utgangsnivået.

Praktisk pasientoppfølging

Asymptomatiske pasienter som ikke behandles bør komme til kontroll hvert halvår med legetime etter forutgående måling av CD4 og HIV-RNA samt hematologiske og biokjemiske

prøver. Man gjør anamnese for det halvår som er gått og man må forsikre seg om at pasienten ikke bidrar til smittespredning. Konsultasjonen bør benyttes til å diskutere tidspunkt for behandlingsstart og pasienten må få informasjon om antiviral terapi, spesielt nødvendigheten av god compliance.

Pasienter som kommer med en langtkommet HIV-infeksjon hvor terapi skal startes raskt bør få minst et par konsultasjoner før terapistart med legen som skal styre behandlingen, med tanke på viktigheten av skikkelig compliance. Man bør også ha et par CD4- og HIV-RNA-målinger med en måneds mellomrom før terapistart. Tidspunktet for start bør diskuteres med pasienten slik at de initiale men forbigående bivirkninger ikke ødelegger ferier, eksamener etc.

Under behandling bør pasientene følges hver tredje måned med måling av CD4 og HIV-RNA samt hematologiske og biokjemiske prøver. Initialt bør man ta enkle hematologiske prøver hver sjette uke, spesielt hos langtkomne pasienter som settes på zidovudin og dermed er i fare for en anemi som kan komme fort.

Andre indikasjoner for terapi

Bortsett fra å behandle en HIV-smittet pasient for å unngå progredierende immunsvikt, er det andre situasjoner hvor HIV-terapi er indisert. Det er idag utbredt enighet om at pasienter med akutt HIV-sykdom (i ukene etter smitte) bør behandles, selv om det er usikkerhet om hvor lenge denne terapi skal vare. HIV-infiserte gravide kvinner bør behandles for å hindre smitte til barnet. Personer eksponert for HIV-smitte bør i noen tilfeller behandles, ihvertfall hvis man kommer til med terapi raskt etter eksposisjonen. Disse tre spesielle indikasjoner er ikke nærmere omtalt her.

PERINATAL HIV-SMITTEFEIL! BOKMERKE ER IKKE DEFINERT.

Rolf Lindemann, Barneavdelingen, Ullevål sykehus, 0407 Oslo

Diagnostikk

HIV smitte til barn er hovedsakelig vertikal, dvs. fra en HIV positiv mor i forbindelse med svangerskap og fødsel. Man kan imidlertid ikke se bort fra inokulasjon (spesielt hos barn i den 3. Verden), blodprodukter og incest.

HIV-Antistoff (HIV-As) av typen IgG passerer placenta, slik at alle barn født av en HIV positiv mor er HIV-As positiv EIA-testene skiller ikke mellom egenproduserte og maternelt overførte antistoffer. Ved sammenligning av mor og barns prøver i western blot kan man få indikasjon på eventuell egenproduksjon hos barnet fordi antistoff persisterer hos barnet i gjennomsnittlig 10 mndr., men har vært påvist i opptil 15 mndr.

Diagnostikk av HIV smitte hos barn baseres primært på deteksjon av virus. Strategien er i dag prøver av barnet kort etter fødsel og senere hver 3 måned inntil HIV-virus er påvist eller at barnet er HIV-As negativ, dvs. ikke smittet. Dette innebærer en oppfølging i inntil 2 år. Analyser som bør utføres hver 3. måned er HIV-As, HIV-DNA PCR og evt. virus-dyrkning (1). Selv om HIV-DNA PCR er den mest sensitive testen, kan det likevel ta flere måneder før den er positiv ut fra tidspunktet for virusoverføring (2).

Profylakse

Det viktigste er å forebygge HIV smitte fra mor til barn. Spørsmålet som reiser seg er hvorvidt en HIV positiv kvinne skal/bør bli gravid? Med de behandlings-tilbudene vi har i dag er det vanskelig å finne argumenter mot et svangerskap, selv om det kan virke som om barn som er smittet perinatalt har dårligere prognose enn en som er smittet i voksen alder.

Ved å behandle med AZT (zidovudine) i svangerskapet fortrinnsvis fra 14., men helst ikke senere enn 34. svangerskapsuke er transmisjonen av virus fra mor til barn redusert til under 10% (3). Det er nå rutine at en gravid HIV positiv kvinne skal behandles i svangerskapet med AZT (zidovudine).

I denne studien ble også barna behandlet i 6 uker etter fødselen (3). Det er imidlertid ikke foretatt noen kontrollert studie med behandling enten av mor alene eller bare av barnet etter fødselen. I og med at det kan oppstå resistens mot zidovudine ved en forebyggende behandling, er det flere som foreløpig går imot behandling av barna etter fødselen (4). Dette understøttes også av potensielle bivirkninger hos nyfødte som kardial dysfunksjon, malignitet og kromosomale forandringer (5).

Det har lenge vært diskutert hvorvidt forløsningsmetode kan forebygge transmisjon fra mor til barn. Det er ingen enkeltstudie som har vist at en form for forløsning er bedre enn en annen. To meta-analyser viser imidlertid at keisersnitt reduserer risiko for vertikal smitte (odds ratio 0,65 og 0,8) (6,7). Studiene har imidlertid ikke tatt hensyn til mødrenes immunstatus, mengde av virus, tidspunkt for vannavgang, varighet av fødselsforløpet, bruk av antiviral medikasjon og ikke minst hvorvidt der var elektiv eller hasteseccio (8).

Vaginal-skylling med klorhexidin før fødselen har vært hevdet å skulle kunne redusere vertikal smitte, men har ikke vist seg effektiv (9). Vannavgang mer enn 4 timer derimot, gir en økt risiko for vertikal smitte (10).

Virus er påvist i morsmelk. Brysternæring øker risiko for smitte fra mor til barn med 14% (11). Det er derfor kontraindisert å amme barnet hvis mor er HIV positiv i I-land. I U-land derimot, er spebarnsdødeligheten et større problem pga. kunstig ernæring, enn risikoen for smitte fra mor til barn.

Behandling

Foreløpig synes det ikke å være holdepunkt for "profylaktisk" behandling med AZT av et barn født av en HIV positiv mor (4). Når barnet er verifisert HIV-positivt og CD4 celler er < 200 og/eller at det er kliniske tegn på alvorlig immunosuppresjon startes behandling. Til nå har monoterapi med zidovudine, 10-30 mg/kg/d p.o. fordelt på 2 doser vært den anbefalte behandlingen. Hvorvidt man skal utvide behandlingen til duo- eller trippelbehandlingen er fortsatt diskutert (12, 13). Så langt er det ikke data som tilsier tillegg av didanosine, lamivudine og/eller nevirapine.

Ved fallende CD4 tall skal barna ha PCP-profylakse. De får trimetoprim-sulfa som en daglig dose 3 dager i uken.

På barneavdelingen Ullevål sykehus har vi behandlet 9 av totalt 17 perinatalt smittede barn med AZT. Seks barn er døde mens 3 har konvertert fra å være HIV-Ag positiv til å bli HIV-Ag negativ etter AZT behandling. Tre av barna har nå vært uten behandling i 4 år og er fortsatt HIV-Ag negativ og i klinisk meget god allmenntilstand.

To av barna som fikk tilleggsbehandling med indinavir til zidovudin har hatt alvorlige bivirkninger. En utviklet en diabetes med ketoacidose vel 6 måneder gammel. Det andre barnet fikk leversvikt og døde 1½ år gammelt. Hverken diabetes eller leversvikt er kjent som komplikasjon til HIV/AIDS og blir derved å anse som bivirkning til behandling med proteasehemmer.

Konklusjon

Det er fortsatt et stort behov for informasjon og veiledning til HIV positiv gravide og å opprettholde HIV screening i svangerskapet, selv om deteksjonen er lav.

Kvinnene skal behandles med zidovudin og sannsynligvis lamivudin fortrinnsvis fra 14. svangerskapsuke og frem til fødselen. Proteasehemmere er kontraindisert pga. teratogen effekt.

Det synes som om keisersnitt reduserer transmisjon fra mor til barn, men flere studier er nødvendig.

Det er stor uenighet om hvorvidt barn født av en HIV positiv mor skal ha profylakse med zidovudin etter fødselen.

HIV-DNA PCR er den mest sensitive testen for å påvise smitte i og med at HIV-As ikke kan brukes pga. maternell overgang. Resultatet kan være falsk negativt og smitte må verifiseres med gjentatte og/eller andre tester. At barnet er HIV negativt kan først bekreftes når barnet er rundt 2 år gammelt og HIV-As negativ

Ved CD4 celler < 200 og/eller kliniske symptomer skal det startes med zidovudin, 10-30 mg/kg/d. Det er enda ikke fastsatt om det skal/bør gis duo- eller trippelbehandling til barn. Når antiviral behandling er startet skal barna også ha PCP profylakse.

Barn som er HIV positive kan gå i barnehage/skole som andre barn, men vi oppfordrer foreldrene til å opplyse om tilstanden til en eller flere av de ansatte. Dette gjelder rektor, sosiallærer og klasseforstander på skolen og barnehagebestyrer og avdelingsleder i barnehagen. Dette bør skje i trygge forhold med pasientens lege til stede sammen med foreldrene.

Litteratur

1. Krivine A, Le Bourdelles S, Firtion G, et al. Viral kinetics in HIV-1 perinatal infection. *Lancet* 1997;350:493.
2. Simonon A, Lapage P, Karita E, et al. An assessment of the timing of mother-to-child transmission of human immunodeficiency virus type 1 by means of polymerase chain reaction. *J Acquired Immune Defic Syndr* 1994;7:952-7.
3. Connor EM, Sperling RS, Gelber R, et al. Reduction of maternal-infant transmission of human immunodeficiency virus type 1 with zidovudine treatment. *N Engl J Med* 1994;331:1173-80.
4. Lindsay MK, Nesheim SR. Human immunodeficiency virus infection in pregnant women and their newborns. *Clin Perinatol* 1997;24:161-80.
5. Centers for Disease Control and Prevention: Recommendations of the US Public Health Service Task Force on the use of zidovudine to reduce perinatal transmission of human immunodeficiency virus. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 43(RR-11):1, 1994.
6. Villari P, Spino C, Chalmers TC, et al. Cesarean section to reduce perinatal transmission of human immunodeficiency virus. *Online J Curr Clin Trials* 2:July 8(doc no 74),1993.
7. Dunn DT, Newell ML, Mayaux MJ, et al. Mode of delivery and vertical transmission of HIV-1: A review of prospective studies. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1994;7:1064-6.
8. Mofenson LM. A critical review of studies evaluating then relationship of mode of delivery to perinatal transmission of human immunodeficiency virus., *Pediatr Infect Dis J* 1995;14:169-76.
9. Biggar RJ, Miotti PG, Taha TE, et al. Perinatal intervention trial in Africa: Effect of a birth canal cleansing intervention to prevent HIV transmission. *Lancet* 1996;347:1647-50.
10. Landesman SH, Kalish LA, Burns DN, et al. Obstetrical factors and the transmission of human immunodeficiency virus type I from mother to child. *N Engl J Med* 1996;334:1617-23.
11. Dunn DT, Newell ML, Adres AE, et al. Risk of human immunodeficiency virus type 1 transmission through breastfeeding. *Lancet* 1992;340:585-8.
12. 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.
13. Sölder B, Wintergerst U, Notheis G, et al. Effect of antiretroviral combination therapy (zidovudine/didanosine or zidovudine/lamivudine) on quantitative plasma human immunodeficiency virus -ribonucleic acid in children and adolescents infected with human immunodeficiency virus. *J Pediatr* 1997;130:293-9.

HELSEARBEIDERE OG HIV-SMITTE

Egil Lingaas, Avdeling for sykehushygiene, Rikshospitalet

Rapporterte tilfeller av yrkesbetinget smitte av helsearbeidere

På verdensbasis var ved utgangen av juni 1996 rapportert 84 sikre og 155 mulige tilfeller av yrkesmessig HIV-smitte blant helsearbeidere.

Tabell 1. Rapporterte tilfeller av sikker og mulig yrkesbetinget HIV-smitte av helsearbeidere

Feil! Bokmerke er ikke definert.	Sikkert dokumentert serokonversjon	Mulig serokonversjon
USA	51	108
Europa	26	43
Resten av verden	7	4
Totalt	84	155

Smitterisiko ved aksidentell inokulasjon

Det var per desember 1995 publisert 25 prospektive undersøkelser av risiko for yrkesbetinget HIV-smitte etter stikkskade med HIV-forurenset gjenstand. Resultatene er summert i tabell 2.

Tabell 2. Infeksjonsrate etter aksidentell inokulasjon med HIV

Feil! Bokmerke er ikke definert. Antall skader	6948
Serokonversjon	21
Infeksjonsrate	0,32%
Konfidensintervall (95%)	0,18-0,46%

Smitterisikoen kan variere mye avhengig av typen stikkskade, den overførte blodmengde, og antallet viruspartikler i blodet.

Risikofaktorer knyttet til selve inokulasjonsskaden

Faktorer som øker risikoen i forhold til gjennomsnittet:

Dyp inokulasjon

Synlig blod på skadegjenstanden

Gjenstand som har vært brukt intravaskulært

Hul nål (kanyle)

Grov kanyle (< Ch 18)

Faktorer som reduserer risikoen i forhold til gjennomsnittet:

Stikk på suturnål

Stikk gjennom hanske

Stikkskadenes epidemiologi

Det er gjort mange undersøkelser av stikkskadenes epidemiologi de siste 10-20 år, ikke minst etter at HIV-smitte ble en trussel for helsepersonell. En konklusjon som går igjen i de fleste undersøkelser er at det har vært en betydelig under-rapportering av stikkskader. Dette har trolig bedret seg noe de senere år, men fortsatt er det mange episoder som ikke rapporteres, ikke minst blant leger. Resultatene ved de ulike undersøkelser av insidensen av stikkskader representere derfor minimumstall.

De fleste undersøkelser av stikkskader er utført blant personale som arbeider på sykehus. Resultatene rapporteres på ulike måter, f.eks i forhold til antall ansatte, antall senger, eller antall prosedyrer og varierer tildels betydelig mellom de forskjellige undersøkelsene. I et utvalg undersøkelser fra større somatiske sykehus varierte f.eks. gjennomsnittlig antall stikkskader mellom 24 og 189 per 1000 personår. En undersøkelse fra Stockholm i 1988 viste at 85% av de som hadde arbeidet i helsevesenet i mer enn 10 år hadde stukket seg.

Undersøkelser fra USA har vist opptil 3 ganger økning av antallet stikkskader ved universitetssykehus fra 1978 til 1988 - "før og etter AIDS", til tross for intens innsats for å redusere antallet stikkskader. Økningen antas dels å skyldes bedre rapportering, men også at det har vært en reell økning av risiko for stikkskader i perioden.

Frekvensen av stikkskader varierer mellom yrkesgrupper og mellom de ulike medisinske spesialiteter. Sykepleiere, bioingeniører og renholdspersonell er de grupper som hyppigst rapporterer stikkskader. Høyest insidens finner man ikke overraskende blant kirurgisk personale og anestesipersonale. Ved 2-6% av alle kirurgiske inngrep oppstår det stikkskader. Publisert litteratur har rapportert at kirurger stikker seg gjennomsnittlig 4-13 ganger per år. Mange andre spesialiteter og yrkesgrupper har imidlertid også en høy forekomst av slike skader.

Undersøkelser av årsakene til stikkskader viser at 30 - 50% av skadene oppstår som følge av at personalet ikke følger regler og retningslinjer for håndtering av stikkende og skjærende gjenstander (se nedenfor). . Det er m.a.o. bare vel halvparten av skadene som kan karakteriseres som "hendelige uhell".

Risikofaktorer knyttet til den aktuelle kroppsvæske

HIV er påvist i de fleste sekreter og vevsvæsker fra mennesker, men det er først og fremst blod og blodkomponenter som har praktisk betydning som smittekilde i yrkesmessig sammenheng. Eksponering for blod har høyest risiko. Risikoen øker med økende virustiter i blodet. Risikoen er størst ved primær HIV-infeksjon og ved fullt utviklet AIDS.

Blodsmitteførende kroppsvæsker med lavere risiko enn blod:

Spinalvæske, peritonealvæske, pleuravæske, leddvæske og fostervann, samt sæd og vaginalsekret regnes som potensielt smitteførende, men smitterisikoen er mindre enn med blod. Alle kroppsvæsker med synlig innhold av blod regnes også som smitteførende.

Kroppsvæsker som ikke medfører risiko for HIV-smitte:

Med unntak av sæd, vaginalsekret og fostervann regnes andre kroppsvæsker som kommer ut via naturlige åpninger ikke som smitteførende i yrkesmessig sammenheng. Dette gjelder svette, tårevæske, morsmelk, spytt (unntatt ved tannbehandling), neseseekret, ekspektorat, oppkast, urin og avføring

Smitterisiko ved eksponisjon på slimhinner eller skadet hud

Smitteoverføring ved blodkontakt med slimhinner eller skadet hud er dokumentert, men risikoen er mye lavere enn ved inokulasjon (tabell 2 og 3). I de fleste tilfeller av slik smitte har det vært en omfattende eksponering for smitteførende blod, f.eks. langvarig kontakt (> 15 minutter) eller kontakt med store defekte hudområder. I 21 prospektive oppfølgingsstudier av knapt 2900 helsearbeidere som har fått HIV-positivt blod på skadet hud eller slimhinne hadde man per desember 1995 bare påvist ett tilfelle av serokonversjon (tabell 3).

Tabell 3. Infeksjonsrate etter aksidentell eksponering for HIV på slimhinne eller defekt hud

Feil! Bokmerke er ikke definert. Antall skader	2882
Serokonversjon	1
Infeksjonsrate	0,03%
Konfidensintervall (95%)	0,006-0,18%

Smitterisiko ved eksponisjon på hel hud

Søl av HIV-holdig blod på hel hud er ikke dokumentert som årsak til smitte. Mer enn 10.000 helsearbeidere er fulgt opp etter slik eksponering.

Overlevelse av HIV utenfor kroppen

HIV dør raskt ved inntørring med 90-99% reduksjon av levende virus allerede i løpet av noen timer. I forsøk med svært høye viruskonsentrasjoner (100.000 ganger høyere enn virusmengden i blod hos pasienter med HIV-infeksjon) kunne riktignok levende virus påvises 1-3 dager etter inntørring. I flytende miljø (vevskulturvæske) har man kunnet påvise levende HIV i opptil 15 dager.

Følsomhet for desinfeksjon

HIV inaktiveres raskt av varme (> 60°C) og de vanlig brukte kjemiske desinfeksjonsmidler (klorpreparater, oksydative midler, fenoler, glutaraldehyd). Klorheksidin og sprit (etanol 70% og isopropanol 60%) har også effekt på HIV.

FOREBYGGING AV BLODSMITTE HOS HELSEARBEIDERE

Forholdsregler ved kontakt med blod

1. Bruk hansker ved kontakt med eller ved fare for kontakt med blod og kroppsvæsker. Vask hendene når hanskene er tatt av.
2. Dekk til egne sår med plastbandasje eller flytende plaster, også når du bruker hansker.
3. Beskytt øyne, nese og munn ved fare for blodsprut (visir eller vernebriller og munnbind)
4. Bruk beskyttelsesfrakk (eller plastforkle) ved fare for blodsprut.

Retningslinjer for håndtering av stikkende og skjærende gjenstander

Stikkskader er den dominerende årsak til yrkesbetinget blodsmitte. Derfor er det særlig viktig at alle kjenner reglene for håndtering av sprøytespisser og andre stikkende og skjærende gjenstander som kan være forurenset med blod og andre kroppsvæsker. Disse reglene er de samme for alle typer smittestoff som smitter ved "blodsmitte":

1. Ta den nødvendig tid til prosedyren
2. Vær forsiktig ved håndtering av spisse og skarpe gjenstander slik som sprøytespisser, suturnåler, skalpeller og skalpellblad, glass o.a.
3. Beskyttelseshylsen til engangs sprøytespisser skal normalt ikke settes tilbake på plass over spissen etter bruk. Grunnen til dette er faren for å stikke seg med den brukte spissen, fordi man ved en slik manøver fører spissen mot sine egne fingre.
4. I enkelte tilfelle kan dette likevel være nødvendig, f.eks. for kanyler til blodprøvetaking med vakuumenteknikk, der kanylen må skrus ut av en holder etter bruk. Det skal da brukes enhånds teknikk. Dette kan gjøres ved å plassere beskyttelseshylsen i en egen holder eller ved å legge hylsen på et fast underlag og føre spissen inn uten å holde i beskyttelsehylsen.
5. Ta ikke fra hverandre kanyler og sprøyte etter bruk, men kast sprøyten med kanylen sittende på direkte i emballasje beregnet for dette formål.
6. Beholdere for brukte sprøyter o.l skal finnes på det stedet der sprøyten brukes (i samme rom).
7. Beholdere for stikkende/skjærende avfall skal aldri fylles mer enn ca 2/3 fulle. Mange stikkskader har skjedd i forbindelse med at helsearbeidere har prøvd å dytte sprøyter ned i nesten fulle beholdere.

Emballering av stikkende/skjærende avfall:

For stikkende/skjærende avfall må det brukes emballasje med materialkvalitet som sikrer mot gjennombrudd og lekkasje. Den bør være merket slik at det tydelig går frem at den inneholder stikkende/skjærende avfall.

I Norge er det foreslått følgende krav til utforming av emballasje for slikt avfall:

1. Beholderen bør ikke være utstyrt slik at det legges opp til at sprøyte-spissen skal kobles fra sprøyten. Dette fordi sprøyter med spiss skal kastes som en enhet uten at spissen kobles fra.
2. Åpningen skal være utformet slik at det under normale forhold er vanskelig å fjerne innholdet.
3. Beholderen skal kunne fylles med én hånd og må være utformet slik at den ikke forurenses på utsiden i forbindelse med fylling.
4. Beholderen må være utstyrt med tilstrekkelig god lukking. Lukkemekanismen bør kunne låses permanent når beholderen skal kastes.
5. Beholderen må være sterk nok. Undersøkelse for å påvise beholderens styrke mot ødeleggelse kan utføres på følgende måte: Beholderen fylles med 1 ml sprøyter påkoblet 0,5 mm x 16 mm sprøytespisser. Den fylte beholderen holdes i vertikal stilling og slippes fra en høyde på 1,0 meter til en hard horisontal flate, og den skal da ikke penetreres eller ødelegges.
6. Når beholderen er forsvarlig lukket kan den kastes i oppsamlingsenheter for smittefarlig avfall. Smittefarlig avfall må ikke komprimeres før eller under transport, såfremt det ikke på forhånd er forsvarlig dekontaminert.

TILTAK VED AKSIDENTELL EKSPOSISJON FOR BLOD ELLER KROPPSVÆSKER

Definisjon

Med aksidentell eksposisjon menes situasjoner der materiale som kan inneholde blodbårne smittestoff trenger gjennom intakt hud som følge av stikk-/skjære-skade eller bitt, eller kommer i direkte kontakt med slimhinner, (øye, nese, munn/svelg) eller åpne sår. Vanligvis vil slike situasjoner oppstå i yrkessammenheng for helsepersonell og enkelte andre yrkesgrupper.

Organisering og ansvar

Alle helseinstitusjoner må som en del av sin internkontroll ha et system for oppfølging av ansatte som er blitt eksponert for blodsmitte. Retningslinjene for slik oppfølging må foreligge skriftlig og være lett tilgjengelige for alle ansatte. Informasjon om retningslinjene må også inngå i programmet for opplæring av nyansatte.

Førstehjelp

Ved **stikkskade** med spontan blødning anbefales det å tilstrebe litt blødning, eventuelt ved forsiktig klemming omkring stikkstedet. Det anbefales ikke å provosere blødning etter overflatiske stikkskader uten spontan blødning. Vask deretter med såpe og vann i 10 minutter og desinfiser området til slutt med ett av følgende desinfeksjonsmidler:

- klorheksidin spritopløsning 5 mg/ml
- klorheksidin vandig løsning 1 mg/ml
- jodsprit 2%
- jodoform 0,2 mg/ml

Hvis ingen av disse alternativene er tilgjengelige, kan man bruke vanlig desinfeksjonssprit (etanol 70%, isopropanol 60%).

Ved **blodsprut i øyne, munn, nese** skylles med rikelig vann i minst 10 minutter.

Ved **blodsøl i sår** skylles med rikelig vann. Deretter desinfeksjon med vandig klorheksidin løsning 1 mg/ml eller jodoform 0,2 mg/ml.

Blodprøver

Det må tas blodprøve av den som er blitt eksponert og hvis mulig også av den personen som blodet stammer fra (kildepersonen). Samtykke fra kildepersonen er nødvendig. Kildepersonen undersøkes så snart som mulig på HBsAg, anti-HCV og anti-HIV. Dersom kildepersonen er HBsAg positiv, må serum fra den eksponerte snarest undersøkes på anti-HBs titer. Andre analyser av den eksponerte personens serum er ikke nødvendige i første omgang, men serum må oppbevares for å kunne dokumentere serologisk status på tidspunktet for eksponering og en eventuell senere serokonversjon.

Kjemoprofylakse

Kjemoprofylakse med zidovudin etter aksidentall eksposisjon for HIV er dokumentert å redusere risikoen for HIV-smitte (odds ratio 0,2). Det er til tross for dette rapportert tilsammen 16 tilfeller (hvorav 11 helsearbeidere) der kjemoprofylakse ikke hindret serokonversjon. Median tid mellom eksponering og behandlingsstart var 1,5 timer i disse tilfellene. Median dose var 1000 mg/dg og behandlingsvarighet 21 dager.

Kjemoprofylakse mot HIV bør alltid styres av en kompetent lege, fortrinnsvis en spesialist i infeksjonsmedisin. De fleste institusjoner kan imidlertid ikke være dekket med slik spesialist på døgnbasis. Derfor må det være etablert rutiner som sikrer at midlertidig profylakse kan startes snarest mulig av annen lege etter nærmere angitte retningslinjer.

Starttidspunkt og varighet

Kjemoprofylakse må startes så snart som mulig, og helst innen 1-2 timer etter skaden. Dersom svar på testing av kildepersonen ikke foreligger innen dette tidspunkt bør det vurderes å starte en midlertidig profylakse inntil svaret foreligger. For at profylaksen skal kunne startes så raskt som mulig, bør de institusjoner der dette er aktuelt ha startpakker med medikament for 2-3 dagers behandling lett tilgjengelig. Anbefalt behandlingsvarighet er 4 uker.

Indikasjoner

Kjemoprofylakse er bare anbefalt når smitekilden er sikkert HIV-positiv. Når smitekilden er ukjent, f.eks. ved stikk på etterlatte sprøytespisser, er det ikke indikasjon for profylakse.

Avhengig av risikoen for smitte anbefales profylakse med en kombinasjon av to eller tre medikamenter. Ved uklare risikoforhold anbefales trippelprofylakse. Risiko for resistens mot antiretrovirale medikamenter tas med i vurderingen.

Trippelprofylakse:

Indikasjoner: Perkutane inokulasjonsskader med mye blod eller blod med høyt titer av HIV. F.eks. dyp stikkskade med hul nål brukt intravaskulært på pasient med akutt primær HIV-infeksjon eller AIDS.

Behandling:

zidovudin	(Retrovir)	200 mg x 3
lamivudin	(EpiVir)	150 mg x 2
indinavir	(Crixivan)	800 mg x 3

Behandlingsvarighet 4 uker.

Dobbelprofylakse:

Indikasjoner: -Perkutan inokulasjon av blod, men hverken mye blod eller høyt HIV-titer. F.eks. stikk på suturnål, gjennom hanske, brukt på pasient i asymptomatisk fase.

-Perkutane inokulasjon av annen smitteførende kroppsvæske.

-Eksponisjon på slimhinne eller synlig skadet hud for blod eller annen smitteførende kroppsvæske.

Behandling:

zidovudin	(Retrovir)	200 mg x 3
lamivudin	(EpiVir)	150 mg x 2

Behandlingsvarighet 4 uker.

Kontraindikasjoner

Foreløpig frarådes proteasehemmere (indinavir) ved graviditet i første trimester

Ingen kjemoprofylakse

Profylakse er ikke indisert ved inokulasjonsskader eller slimhinneeksponering med kroppsvæske som ikke er smitteførende.

Profylakse er ikke anbefalt etter kontakt med hel hud, uansett hvilken kroppsvæske den omfatter.

Videre oppfølging og kontroll

Det er svært viktig at denne oppfølgingen skjer under kontroll av en kompetent lege. Det er viktig at vedkommende får nødvendig støtte og hjelp for best mulig å kunne takle den psykiske belastning han/hun er utsatt for i denne tiden. Dersom donor er HIV-antistoff negativ, eller hvis donor er ukjent, er ingen flere tiltak nødvendige, bortsett fra en kontrollprøve 6 måneder etter skaden. Helsearbeidere som har blitt eksponert for blod som testes positivt for HIV-antistoff bør følges opp med blodprøver etter 6 uker, og etter 3 og 6 måneder. Noen få tilfeller av serokonversjon (5%) har vært rapportert senere enn 6 måneder etter skaden, men oppfølging utover 6 måneder anses vanligvis ikke nødvendig.

Kjemoprofylakse synes ikke å forsinke serokonversjonen i de tilfeller der profylaksen ikke virker.

Tabell 4. Serologiske undersøkelser av person som har vært utsatt for mulig yrkesbetinget HIV-smitte

Feil! Bokmerke er ikke definert.	0-prøve *	6 uker	3 måneder	6 måneder
Prøver som tas av alle	Anti-HBs, HBsAg ** Anti-HCV Anti-HIV ASAT/ALAT			Anti-HBs HBsAg * Anti-HCV Anti-HIV ASAT/ALAT
Tilleggsprøver når kilden er anti-HIV positiv		Anti-HIV	Anti-HIV	

* Når kildepersonen er ukjent eller negativ på HBsAg, anti-HCV og anti-HIV behøver 0-prøven ikke undersøkes med én gang, men oppbevares for å sikre dokumentasjon av serokonversjon dersom det blir positive funn i prøven tatt etter 6 måneder.

** Det er ikke nødvendig å undersøke på HBsAg dersom anti-HBs er positiv.

Spesielle forholdsregler i oppfølgingsperioden

Personer som er blitt utsatt for mulig blodsmitte skal ikke gi blod i oppfølgingsperioden på 6 måneder. Risikoen for seksuell smitte ved eventuell serokonversjon tilsier at den eksponerte bør ta forholdsregler ved bruk av kondom .

Referanser

1. Bell DM. Occupational risk of human immunodeficiency virus infection in healthcare workers: An overview. *Am J Med* 1997;102 (5B):9-15.
2. CDC. Update: Provisional Public Health Service recommendations for chemoprophylaxis after occupational exposure to HIV. *MMWR* 1996;45:468-72.
3. Gerberding JL. Management of occupational exposures to blood-borne viruses. *N Engl J Med* 1995;332:444-51.
4. Kinloch-de Loës S, Hirschel BJ, Hoen B, et al. A controlled trial of zidovudine in primary human immunodeficiency infection. *N Engl J Med* 1995;333:408-13.
5. CDC. Case-control study of HIV seroconversion in health-care workers after percutaneous exposure to HIV-infected blood - France, United Kingdom, and United States, January 1988- August 1994. *MMWR* 1995;44:929-33.
6. Ciesielski CA, Melter RP. Duration of time between exposure and seroconversion in healthcare workers with occupationally acquired infection with human immunodeficiency virus. *Am J Med* 1997;102 (5B):115-6.
7. Statens helsetilsyn. Anbefalinger i forhold til posteksposisjonell profylakse - HIV-infeksjon. Rundskriv IK 40/96, 1996.
8. Statens helsetilsyn. Smittevernloven. Veileder. Forebygging av blodsmitte i helsevesenet. IK-2552, 1997.