



ΔΗΜΟΚΡΙΤΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΡΑΚΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ
ΠΡΟΝΟΙΑΣ

**Επιδημιολογική Επιτήρηση του ιικού φορτίου και του
γονοτύπου του ιού HIV-1 σε νεοδιαγνωσθείσες λοιμώξεις**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Ρέστα Παναγιώτα, ΑΜ: 354

Επιβλέπων καθηγητής: Απόστολος Μπελούκας, Αναπληρωτής Καθηγητής
Τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών ΠΑΔΑ

Αθήνα, 2023



ΔΗΜΟΚΡΙΤΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΡΑΚΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ
ΠΡΟΝΟΙΑΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ:
«ΛΟΙΜΩΔΗ ΝΟΣΗΜΑΤΑ – ΔΙΕΘΝΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗ:
ΑΠΟ ΤΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΣΤΗΝ ΚΛΙΝΙΚΗ ΠΡΑΞΗ»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Επιδημιολογική Επιτήρηση του ιικού φορτίου και του
γονοτύπου του ιού HIV-1 σε νεοδιαγνωσθείσες λοιμώξεις**

Ρέστα Παναγιώτα, ΑΜ: 354

ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Επιβλέπων καθηγητής: Απόστολος Μπελούκας, Αναπληρωτής Καθηγητής Τμήματος Βιοϊατρικών
Επιστημών ΠΑΔΑ

2ο Μέλος: Ιωάννης Καρακασιλιώτης, Αναπληρωτής Καθηγητής Τμήματος Ιατρικής, ΔΠΘ

3ο Μέλος: Περικλής Παναγόπουλος, Αναπληρωτής Καθηγητής Τμήματος Ιατρικής, ΔΠΘ

Αθήνα, 2023



DEMOCRITUS UNIVERSITY OF THRACE
SCHOOL OF INSTITUTIONAL LABORATORIES

UNIVERSITY OF WEST ATTICA
FACULTY OF HEALTH AND CARE
SCIENCES

POSTGRADUATE COURSE:
«INFECTIOUS DISEASES – INTERNATIONAL MEDICINE:
FROM BENCH TO BEDSIDE»

MASTER DISSERTATION

Epidemiological Surveillance of HIV-1 Viral Load and Genotype in Newly Diagnosed Cases

Resta Panagiota, RN: 354

COMMITTEE OF EXAMINERS

Supervisor: Apostolos Beloukas, Associate Professor, Department of Biomedical Sciences, UNIWA

Member 2: Ioannis Karakasiliotis, Associate Professor, Department of Medicine, DUTH

Member 3: Periklis Panagopoulos, Associate Professor, Department of Medicine, DUTH

Athens, 2023

Περιεχόμενα

Περιεχόμενα	4
Ευχαριστίες	6
Συντομογραφίες	7
Περίληψη	8
Abstract	9
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	10
1.1 Η Λοίμωξη από τον ιό του HIV-1	10
1.2 Δομή και Κύκλος Ζωής του HIV	11
1.3 Επιδημιολογικά Δεδομένα για την HIV - 1 Λοίμωξη	15
1.4 Εργαστηριακές Μέθοδοι Ανίχνευσης και Επιβεβαίωσης της HIV-1 Λοίμωξης.....	18
1.5 Η μέτρηση του ιικού φορτίου HIV ως Δείκτης Επιδημιολογικής Επιτήρησης.....	20
1.5.1 Δείκτης καθυστερημένης διάγνωσης	21
1.5.2 Εργαλείο Παρακολούθησης της Αποτελεσματικότητας της Αντιρετροϊκής Θεραπείας	22
1.6 Η γονοτυπική ανάλυση του ιού HIV-1 ως εργαλείο Μοριακής Επιδημιολογίας	26
1.6.1 Εξέταση Αντοχής στα Αντιρετροϊκά Φάρμακα	26
1.6.2 Μέθοδος βελτιστοποίησης του φαρμακευτικού σχήματος	27
1.6.3 Μέθοδος μελέτης της μεταδιδόμενης αντοχής.....	27
1.6.4 Εργαλείο Μελέτης Δικτύων Μετάδοσης.....	27
1.6.5 Εφαρμογή στις φυλογενετικές αναλύσεις.....	27
2. Πειραματικό Μέρος	29
2.1 Σκοπός.....	29
2.2 Υλικά - Εξοπλισμός.....	29
2.3 Συλλογή & Προετοιμασία Δειγμάτων	30
2.4 Μέτρηση Ιικού φορτίου	30
2.4.1 Απομόνωση Νουκλεϊκού Οξέος.....	31
2.4.2 Αλυσιδωτή Αντίδρασης Πολυμεράσης Αντίστροφης Μεταγραφής (RT-PCR).....	31
2.4.3 Αλυσιδωτή Αντίδρασης Πολυμεράσης Πραγματικού Χρόνου (Real Time PCR).....	31
2.5 Γονοτύπηση.....	34
2.5.1 Απομόνωση Ιικού Γονιδιώματος.....	34
2.5.2 PCR Αντίστροφης Μεταγραφής (Reverse Transcription, RT-PCR)	35
2.5.3 Φωλεακή Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (Nested PCR).....	35
2.5.4 Ηλεκτροφόρηση.....	35
2.5.5 Καθαρισμός προϊόντος (PCR purification)	36
2.5.6 Εκτίμηση ποιότητας και ποσότητας καθαρισμένου προϊόντος PCR.....	37
2.5.7 Προετοιμασία δειγμάτων για αλληλούχηση κατά Sanger	37
2.5.8 Ανάλυση Αποτελεσμάτων Γονοτύπησης	37

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	38
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	43
4.1 Αρχικό ιικό φορτίο HIV-1	43
4.2 Γονότυπος και Μεταλλάξεις Αντοχής	47
Βιβλιογραφία	53

Ευχαριστίες

Η παρούσα Διπλωματική Εργασία εκπονήθηκε στο Εθνικό Κέντρο Αναφοράς AIDS Νοτίου Ελλάδος – Ε.Κ.Α.Α.Ν.Ε. και στο Εργαστήριο Μοριακής Μικροβιολογίας και Ανοσολογίας – Ε.Μ.Μ.Α., στο Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω από καρδιάς τον Επιβλέποντα Καθηγητή μου, Απόστολο Μπελούκα για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, την συνεχή καθοδήγησή του και την άριστη συνεργασία. Επιπλέον, οφείλω να ευχαριστήσω όλα τα μέλη της επιστημονικής ομάδας, που ο καθένας τους ξεχωριστά διαδραματίζει έναν μοναδικό ρόλο στην καθημερινότητά μου εντός και εκτός εργαστηρίου.

Τέλος, η παρούσα διπλωματική, όπως και κάθε βήμα εξέλιξής μου, δεν θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί χωρίς την στήριξη από την οικογένειά μου, γι' αυτό και τους ευχαριστώ.

Συντομογραφίες

HIV	Human Immunodeficiency Virus	HAART	Highly Active Antiretroviral Therapy
AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome	SPVL	Set-Point Viral Load
UNAIDS	Joint United Nations Programme on HIV/AIDS	ARS	Acute Retroviral Syndrome
PWID	People who Inject Drugs	PCR	Polymerase Chain Reaction
MSM	Men having sex with men	EIA	Enzyme ImmunoAssay
IgM	Immunoglobulin M	FDA	Food & Drug Administration
IgG	Immunoglobulin G	NAAT	Nucleic Acid Amplification Test
MA	Matrix Protein	Env	Envelope
CA	Capsid Protein	Vif	Virion infectivity Factor
HSV-2	Herpes Simplex Virus-2	Vpr	Viral protein R
RNA	Ribonucleic acid	Vpu	Viral protein U
tRNA	Transfer RNA	Nef	Negative regulatory Factor
gp	Glycoprotein	RT	Reverse transcriptase
Gag	Group Specific Antigen	PR	Protease
Pol	Polymerase	IN	Integrase
CCR5	C-C Chemokine Receptor Type 5	WHO	World Health Organization
RTC	Reverse Transcription Complex	IQS-H	Internal Quantitative Standard High
DNA	Deoxyribonucleic Acid	IQS-L	Internal Quantitative Standard Low
CDC	Centers for Disease Control and Prevention	Ct	Cycle Threshold
ECDC	European Centers for Disease Control and Prevention	LOD	Limit of Detection
NASBA	Nucleic Acid Sequence-Based Amplification	LOQ	Limit of Qualification
LTRs	Long Terminal Repeats	ΕΟΔΥ	Εθνικός Οργανισμός Δημόσιας Υγείας

Περίληψη

Ο ιός της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας τύπου 1 (Human immunodeficiency virus, HIV-1) αποτελεί μείζον ζήτημα Δημόσιας Υγείας για τέσσερις δεκαετίες. Παρότι υπάρχει πλέον διαθέσιμη η αποτελεσματική αντιρετροϊκή θεραπεία (highly active antiretroviral therapy, HAART) η οποία μπορεί να μειώσει τα επίπεδα ιικού πολλαπλασιασμού ραγδαία μειώνοντας κατ' επέκταση και τον κίνδυνο μετάδοσης, οι νέες μολύνσεις HIV-1 παραμένουν σε σταθερά επίπεδα. Στην Ελλάδα τα νέα περιστατικά λοίμωξης με HIV-1 το 2022 ανήλθαν στα 565 αν και οι μελέτες κάνουν λόγο για αύξηση των επιπέδων μετάδοσης μεταξύ ορισμένων πληθυσμών όπως τα άτομα που κάνουν χρήση ενδοφλέβιων ναρκωτικών (XEN). Η συγκεκριμένη ομάδα υψηλού κινδύνου έχει βρεθεί στο επίκεντρο επιδημικών εξάρσεων στην Ελλάδα και την προηγούμενη δεκαετία. Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν 30 νεοδιαγνωσθείσες λοιμώξεις που αφορούσαν XEN ως προς το ικό τους φορτίο και τον γονότυπό τους πριν την έναρξη αντιρετροϊκής θεραπείας. Η πλειοψηφία των δειγμάτων αφορούσε άνδρες (90%), ελληνικής εθνικότητας (83%) με διάμεση ηλικία τα 40,8 έτη. Η μέτρηση του ιικού φορτίου πραγματοποιήθηκε με Real-Time RT-PCR και η ανάλυση γονότυπου με αλληλούχηση Sanger. Τα αποτελέσματα των παραπάνω εξετάσεων ανέδειξαν μία διάμεση τιμή αρχικών ιικών φορτίων η οποία ανέρχεται στα 61.600 αντίγραφα του ιικού γονιδιώματος/ml πλάσματος (4,79 log₁₀). Η ανάλυση της γονιδιακής περιοχής POL του HIV-1 οδήγησε στην ταξινόμηση των δειγμάτων σε τρεις κατηγορίες γονοτύπων A, G και CRF ακριβώς σε ίση αναλογία ενώ ταυτόχρονα εντοπίστηκαν τέσσερις περιπτώσεις μεταλλαγμένων στελεχών. Οι μεταλλάξεις που εντοπίστηκαν ήταν η E138K και η K101E οι οποίες προσδίδουν ανοχή στην τάξη αντιρετροϊκών φαρμάκων των μη νουκλεοσιδικών αναστολέων της αντίστροφης μεταγραφάσης (Non-Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors - NNRTIs).

Λέξεις - Κλειδιά: HIV, AIDS, νέες διαγνώσεις, εργαστηριακή παρακολούθηση, μέτρηση ιικού φορτίου, ανάλυση γονότυπου, άτομα που ζουν με τον HIV, Real-Time RT-PCR, Αλληλούχηση κατά Sanger

Abstract

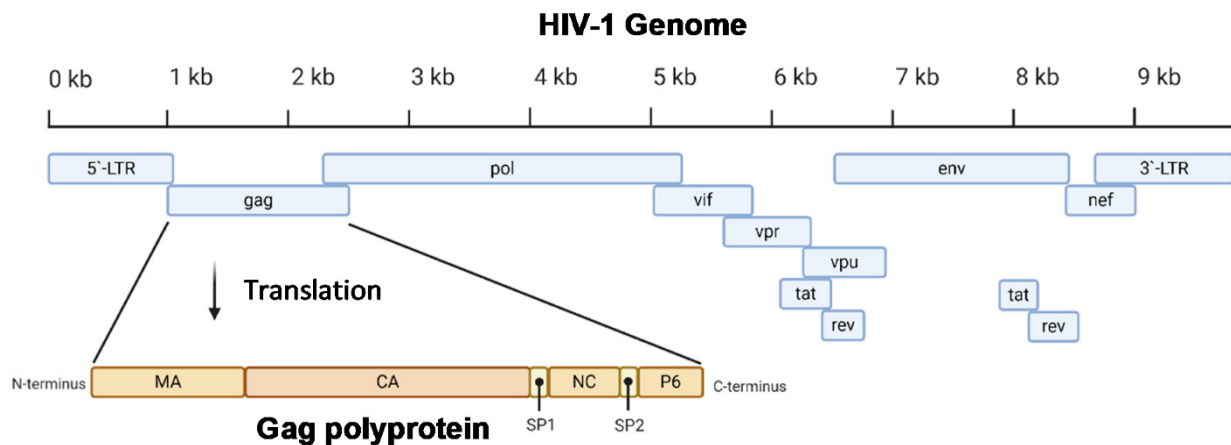
Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) has been a major Public Health issue for four decades. Even though, highly active antiretroviral therapy (HAART), which can decrease rapidly the viral replication, is available and thereby the risk of transmission is now reduced, new HIV-1 infections remain at stable levels. In Greece, new cases of HIV-1 infection in 2022 reached the number of 565, although a number of studies in the literature point out an increasing rate in transmission levels among certain populations such as people who inject drugs (PWID). This particular high-risk group has been related to epidemic outbreaks in Greece in the previous decade as well. In this thesis, 30 newly diagnosed individuals who inject drugs were included. Their baseline viral load and genotype were analysed before the initiation of antiretroviral therapy. The majority of the samples were of Greek (83%) men (90%), with a median age of 40.8 years. Viral load measurement was performed using Real-Time RT-PCR and genotype analysis was conducted with Sanger sequencing. The results of these tests revealed a median baseline viral load of 61,600 copies/ml (4.79 log₁₀). Also, the analysis of the POL region in HIV-1 genome led to the classification of these samples into three classes of HIV-1 genotypes A, G and CRF in exactly equal proportion while, at the same time, four cases of mutant strains were identified. The mutations identified were E138K and K101E which are responsible for antiretroviral drugs resistance and especially to the Non-Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors (NNRTIs) class.

Key-Words: HIV, AIDS, new diagnoses, laboratory monitoring, baseline viral load measurement, people who live with HIV, Real-Time RT-PCR, Sanger Sequencing

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Η Λοίμωξη από τον ιό του HIV-1

Ο ιός της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας τύπου 1 (Human immunodeficiency virus, HIV-1) απομονώθηκε για πρώτη φορά το 1983 και αναγνωρίστηκε τότε ως αιτιολογικός παράγοντας του Συνδρόμου Επίκτητης Ανοσοανεπάρκειας (AIDS) το οποίο είχε αναγνωριστεί ως νέα ασθένεια ήδη από το 1981 [1]. Ο HIV-1 πιστεύεται ότι προήλθε από τον ιό της ανοσοανεπάρκειας των πιθήκων (SIV) που μεταπήδησε από τους χιμπατζήδες στον άνθρωπο, πιθανότατα μέσω της κατανάλωσης κρέατος [2]. Είναι ένας Ρετροϊός του γένους Lentivirus ο οποίος έχει ως βασικό στόχο τα ανθρώπινα CD4+ T-κύτταρα και δευτερευόντως τα μακροφάγα [3]. Όπως φανερώνει και η ταξινόμησή του στην οικογένεια των Ρετροϊών (Retroviridae) το γενετικό υλικό του ιού είναι μονόκλωνο RNA (ssRNA) θετικής πολικότητας μήκους 9,8kb, σε δύο αντίγραφα και αποτελείται από εννέα γονιδιακές περιοχές. Τρεις από αυτές κωδικοποιούν τις βασικές πολυπρωτεΐνες (Gag, Pol και Env) και οι υπόλοιπες έξι τις βοηθητικές πρωτεΐνες (Tat, Rev, Nef, Vpr, Vif και Vpu) [4]–[6].



Εικόνα 1. Η οργάνωση του HIV-1 γονιδιώματος [7].

Καθώς ο ιός πολλαπλασιάζεται μέσα στα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος του ξενιστή του, το αποδυναμώνει προοδευτικά οδηγώντας σε ανοσοκαταστολή και καθιστά τους φορείς του ευάλωτους σε ευκαιριακές λοιμώξεις και στην ανάπτυξη διάφορων κακοηθειών [8]. Ο HIV-1 μπορεί να εντοπιστεί σε διάφορα σωματικά υγρά των ατόμων που ζουν με τον ιό, όπως στο αίμα, σπέρμα, κολπικά υγρά, πρωκτικά υγρά και στο μητρικό γάλα. Από αυτά τα υψηλότερα επίπεδα ιοσωματιδίων ανιχνεύονται στο αίμα και κατ' επέκταση η μετάδοση μπορεί να συμβεί μέσω της κοινής χρήσης μολυσμένων βελόνων, μεταγγίσεων αίματος ή τυχαίων τραυματισμών από μολυσμένες βελόνες μεταξύ εργαζομένων στον τομέα της υγειονομικής περίθαλψης. Ακόμα, τόσο το σπέρμα όσο και τα κολπικά υγρά περιέχουν επίσης υψηλά επίπεδα του ιού, με την σεξουαλική επαφή να αποτελεί τον πιο κοινό τρόπο μετάδοσης του HIV παγκοσμίως. Τέλος, ιικά

σωματίδια μπορεί να εντοπιστούν και στο μητρικό γάλα με αποτέλεσμα η μετάδοση από μητέρα σε παιδί (κάθετη μετάδοση) να είναι πιθανή τόσο κατά την κύηση και τον τοκετό, όσο και κατά την διάρκεια του θηλασμού. Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι ο HIV δεν μεταδίδεται μέσω περιστασιακών επαφών, όπως αγκαλιές, χειραψίες ή κοινή χρήση φαγητού ή ποτού κλπ [9].

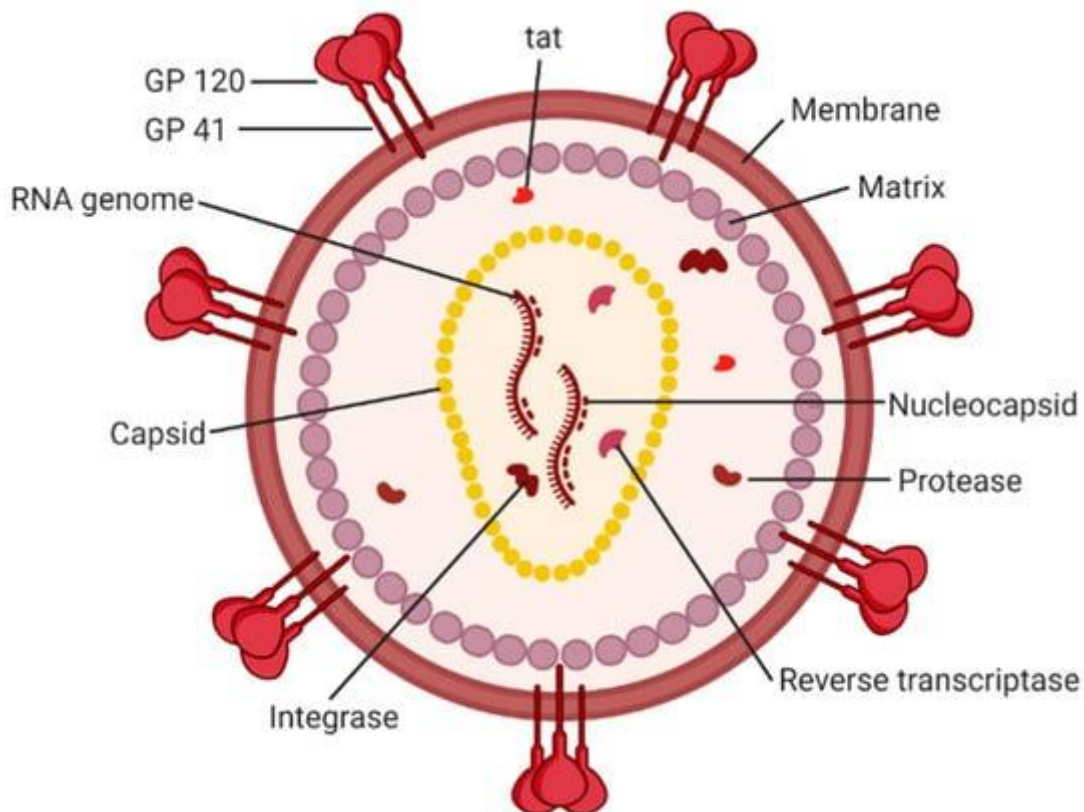
Σήμερα, η αντιρετροϊκή θεραπεία (highly active antiretroviral therapy, HAART), δηλαδή η φαρμακευτική αγωγή που χρησιμοποιείται για τη θεραπεία της λοίμωξης από τον ιό του HIV είναι τόσο αποτελεσματική που έχει αλλάξει ριζικά την κλινική και επιδημιολογική εξέλιξη της νόσου [10]. Η HAART περιλαμβάνει τη χορήγηση ενός συνδυασμού αντιρετροϊκών φαρμάκων για τη αντιμετώπιση και την διαχείριση της λοίμωξης και την επιβράδυνση της εξέλιξης της νόσου [9]. Στόχος της είναι η καταστολή του ιικού πολλαπλασιασμού σε επίπεδα μη ανιχνεύσιμα στο αίμα, γεγονός που αποτρέπει την περαιτέρω βλάβη του ανοσοποιητικού συστήματος του ξενιστή μειώνοντας τον κίνδυνο μετάδοσης [9]. Η αποτελεσματικότητα της HAART είναι καλά τεκμηριωμένη, καθώς πολυάριθμες μελέτες αναφέρουν σημαντικές βελτιώσεις στην υγεία και την ποιότητα ζωής των ατόμων που ζουν με HIV και λαμβάνουν συνεχή θεραπεία [11].

Χαρακτηριστικά, μελέτες όπως η PARTERN που ολοκληρώθηκε το 2019, αποδεικνύουν πως ο κίνδυνος μετάδοσης του HIV από άτομο φορέα υπό αντιρετροϊκή θεραπεία και με μη ανιχνεύσιμο ιικό φορτίο, είναι μηδενικός. Τα αποτελέσματα αυτά υποστηρίζουν την ευρύτερη διάδοση του μηνύματος της εκστρατείας U=U (Undetectable equals Untransmissible) η οποία, βασιζόμενη στην έγκαιρη διάγνωση και την αποτελεσματική θεραπεία, σκοπεύει στην βελτίωση της ποιότητας ζωής των ατόμων που ζουν με τον HIV σε κλινικό αλλά και κοινωνικό επίπεδο, αντιμετωπίζοντας το στίγμα και τις κοινωνικές διακρίσεις [12]. Επιπλέον, η αποτελεσματική λήψη της HAART διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στον μετριασμό του κινδύνου της κάθετης μετάδοσης τόσο κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης όσο και του θηλασμού, υπογραμμίζοντας περαιτέρω τη σημασία της άμεσης παρέμβασης [10].

1.2 Δομή και Κύκλος Ζωής του HIV

Το ιικό σωματίδιο περικλείει τα βασικά συστατικά του HIV που επιτρέπουν στον ιό να μολύνει τα κύτταρα-στόχους και να πολλαπλασιάζεται μέσα σε αυτά. Το ιοσωμάτιο έχει σφαιρικό σχήμα με μέση διάμετρο περίπου 120-140 νανόμετρα (nm). Εξωτερικά εντοπίζεται ο ιικός φάκελος, ο οποίος περιλαμβάνει συστατικά από τη μεμβράνη του κυττάρου ξενιστή τα οποία προσλαμβάνει κατά τη διαδικασία εκβλάστησης. Ο φάκελος αποτελείται από μια λιπιδική διπλοστοιβάδα δομημένη από τις ιικές γλυκοπρωτεΐνες gp41 και gp120 οργανωμένες σε ένα τριμερές. Η gp120 είναι υπεύθυνη για τη σύνδεση με τους υποδοχείς των κυττάρων ξενιστών, ενώ η gp41 συμμετέχει στη σύντηξη των μεμβρανών του ιού και του κυττάρου ξενιστή. Οι αλλαγές στην διαμόρφωση

του φακέλου κατά τη σύνδεση και τη σύντηξη του υποδοχέα είναι κρίσιμες για την είσοδο του ιού στα κύτταρα-στόχους [13], [14].



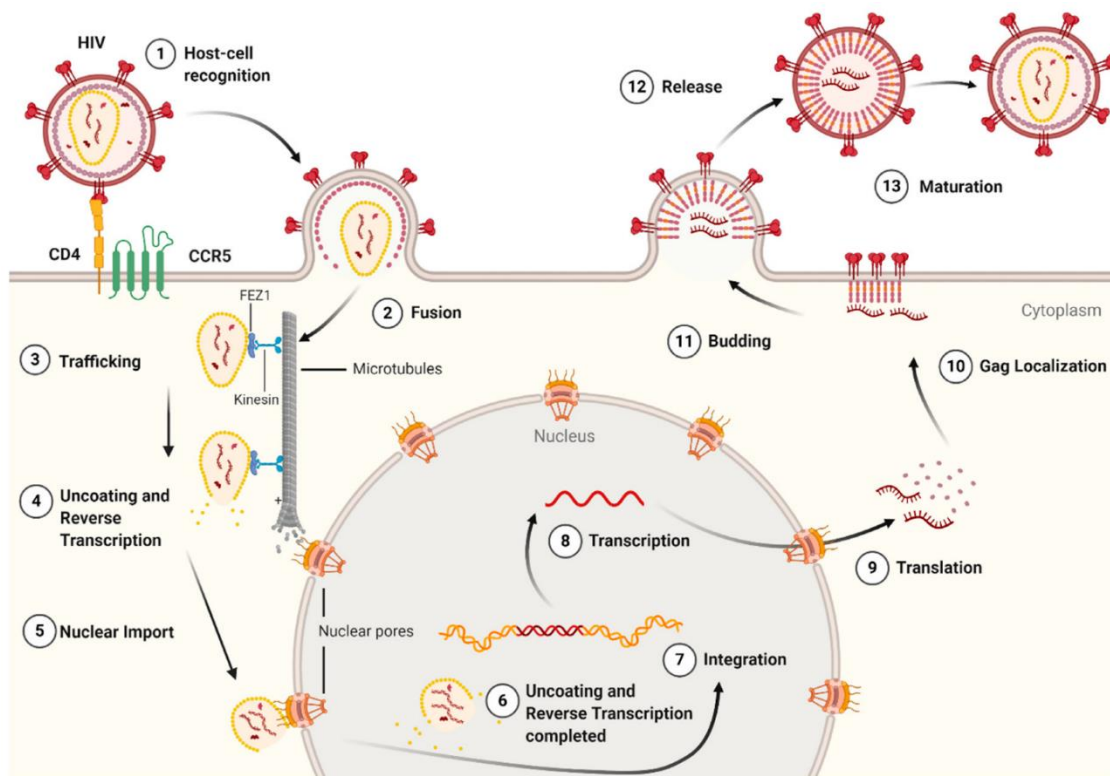
Εικόνα 2. Σχηματική απεικόνιση του ιοσωματίου του HIV-1 [13].

Εσωτερικά του φακέλου βρίσκεται μία πρωτεϊνική στιβάδα που ονομάζεται μήτρα (Matrix, MA) και διαδραματίζει δομικό αλλά και λειτουργικό ρόλο στη συναρμολόγηση του ιοσωματιδίου. Το επόμενο στρώμα αποτελείται από το ικό καψίδιο (Capsid, CA), το οποίο περιβάλλει το ικό γονιδίωμα RNA και τις ικές πρωτεΐνες. Το καψίδιο αποτελείται από πολλές πρωτεϊνικές υπομονάδες διατεταγμένες σε δομή πλέγματος. Εντός του καψιδίου, το γονιδίωμα του HIV-1 είναι συσκευασμένο σε δύο αντίγραφα μονόκλωνου RNA. Συνδέεται με ικές πρωτεΐνες, συμπεριλαμβανομένης και της πρωτεΐνης του νουκλεοκαψιδίου (NC), ενώ εσωτερικά συναντώνται και διάφορα ικά ένζυμα, όπως η αντίστροφη μεταγραφάση (RT), η ιντεγκράση (IN) και η πρωτεάση (PR), τα οποία είναι απαραίτητα για την αντιγραφή του ιού [15].

Ο κύκλος ζωής του HIV-1 περιλαμβάνει μια σειρά διαδικασιών που διευκολύνουν την είσοδο, την αντιγραφή, τη συναρμολόγηση και την απελευθέρωση του ιού. Η κατανόηση αυτών των διαδικασιών είναι ζωτικής σημασίας για την ανάπτυξη αποτελεσματικών αντιρετροϊκών θεραπειών και εμβολίων. Το αρχικό στάδιο της εισόδου του ικού σωματιδίου πραγματοποιείται

μέσω της πρόσδεσης του HIV στους υποδοχείς επιφάνειας CD4 και τους συνυποδοχείς, όπως ο CCR5 ή ο CXCR4, στην επιφάνεια των κυττάρων-στόχων, κυρίως των CD4+ T κυττάρων και των μακροφάγων. Η γλυκοπρωτεΐνη του ιικού φακέλου, gp120, αλληλεπιδρά με τον CD4 υποδοχέα, οδηγώντας σε δομικές αλλαγές που πυροδοτούν τη σύνδεση της gp120 με τον συνυποδοχέα, ξεκινώντας τη σύντηξη της ιικής με την κυτταρική μεμβράνη. Η διαδικασία σύντηξης επιτρέπει στο ικό καψίδιο να εισέλθει στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου ξενιστή [16]–[18].

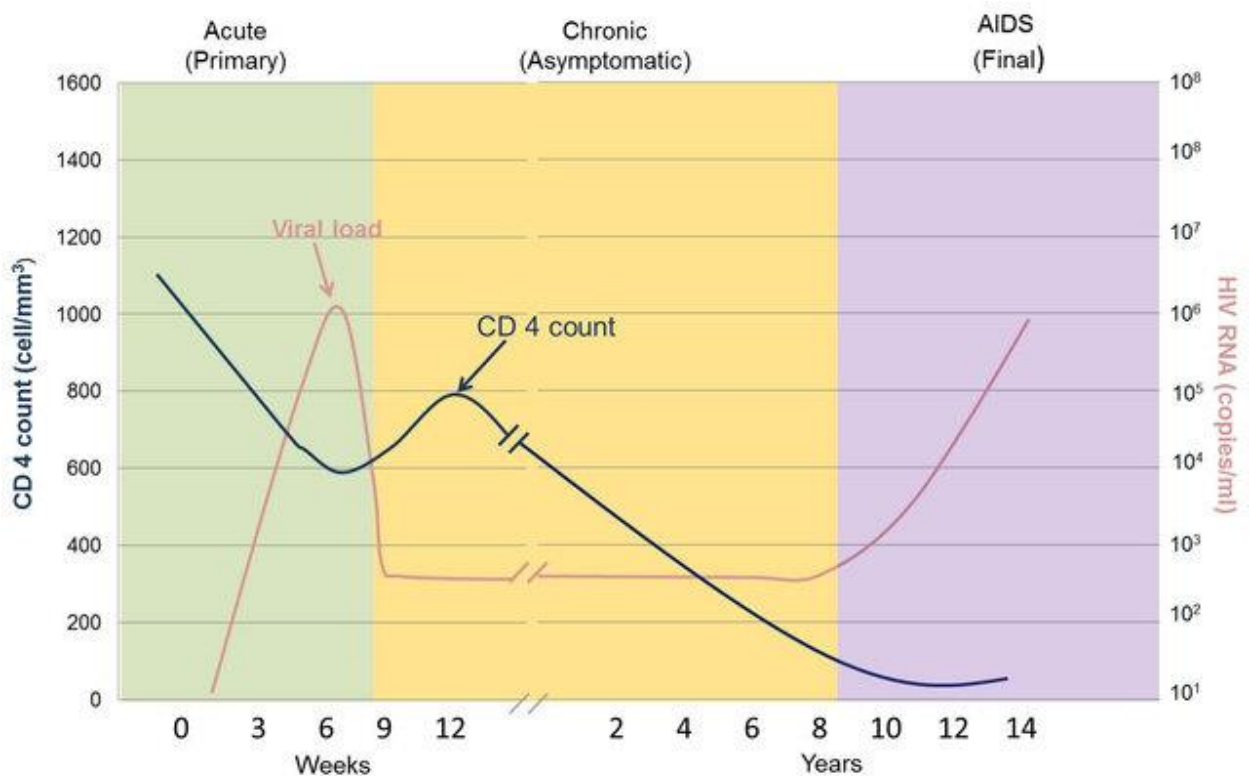
Κατά την είσοδο στο κύτταρο ξενιστή, το ικό γονιδίωμα μετατρέπεται από RNA σε DNA μέσω της διαδικασίας της αντίστροφης μεταγραφής, η οποία επιτελείται από το ικό ένζυμο της αντίστροφης μεταγραφάσης (RT). Η αντίστροφη μεταγραφή πραγματοποιείται από ένα σύμπλοκο που ονομάζεται σύμπλοκο αντίστροφης μεταγραφής (Reverse Transcription Complex, RTC), το οποίο περιλαμβάνει το ικό γονιδίωμα RNA, ιικές πρωτεΐνες και μόρια tRNA. Το ικό γονιδίωμα χρησιμεύει ως καλούπι για τη σύνθεση ενός γραμμικού ιικού DNA, το οποίο στη συνέχεια μετατρέπεται σε δίκλωνο DNA. Αυτό το DNA ενσωματώνεται στο γονιδίωμα του κυττάρου-ξενιστή με τη βοήθεια της ιντεγκράσης, ενός ιικού ενζύμου [19], [20].



Εικόνα 3. Ο κύκλος ζωής του HIV-1 [13].

Την ενσωμάτωση του ιικού γονιδιώματος στο χρωμόσωμα του κυττάρου ξενιστή διαδέχεται η λανθάνουσα φάση της λοίμωξης όπου ο ιός παίρνει την μορφή προιού. Κατά την λανθάνουσα

αυτή κατάσταση το ιικό γονιδίωμα παραμένει μεταγραφικά σιωπηλό και δεν παράγει νέα ιικά σωματίδια. Δεξαμενές του HIV-1 μπορούν να δημιουργηθούν σε CD4+ T κύτταρα μνήμης και σε άλλους κυτταρικούς τύπους. Αυτές οι δεξαμενές μπορούν να παραμείνουν για μεγάλες χρονικές περιόδους, επιτρέποντας στον ιό να αποφύγει την ανοσολογική αντιμετώπιση. Για τον λόγο αυτό τα κύτταρα που αποτελούν δεξαμενές του HIV-1 αποτελούν σημαντική πρόκληση για την πορεία της λοίμωξης και την θεραπεία από τον HIV. Το χρονικό διάστημα κατά το οποίο ο ιός μπορεί να παραμείνει ανενεργός στον πυρήνα ενός κυττάρου ποικίλλει και επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες, όπως το κυτταρικό περιβάλλον, η ανοσολογική απόκριση του ξενιστή και τα χαρακτηριστικά του ίδιου του ιού [21], [22].



Εικόνα 4. Οι διαφορετικές φάσεις της HIV-1 λοίμωξης [23].

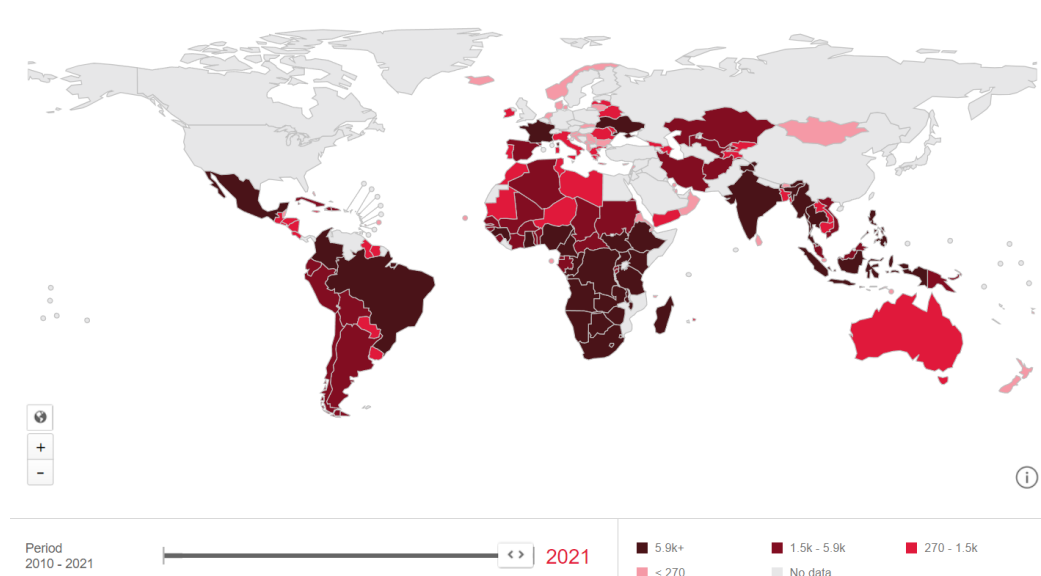
Την λανθάνουσα και ασυμπτωματική αυτή φάση της λοίμωξης ακολουθεί η επόμενη, συμπτωματική περίοδος. Σε μοριακό επίπεδο το ιικό γονιδίωμα μεταγράφεται με την βοήθεια του μηχανισμού μεταγραφής του κυττάρου ξενιστή, με αποτέλεσμα την παραγωγή ιικού RNA που χρησιμεύει ως γονιδίωμα για τα ιικά σωματίδια που πρόκειται να δημιουργηθούν. Αυτά τα ιικά μεταγραφώματα εξάγονται από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα, όπου υποβάλλονται σε μια σειρά βημάτων επεξεργασίας, συμπεριλαμβανομένης της ωρίμανσης και της μετάφρασης, για την παραγωγή ιικών πρωτεϊνών. Η ιική πολυπρωτεΐνη Gag που δημιουργείται διασπάται από την ιική πρωτεάση σε μεμονωμένες δομικές μονάδες, συμπεριλαμβανομένων των πρωτεϊνών καψιδίου (CA), μήτρας (MA) και νουκλεοκαψιδίου (NC). Η συναρμολόγηση των νέων ιικών σωματιδίων

πραγματοποιείται στην πλασματική μεμβράνη του κυττάρου. Οι πρωτεΐνες αυτές αλληλεπιδρούν με το ικό γονιδίωμα και με άλλα ικά συστατικά, οδηγώντας στο σχηματισμό ενός ανώριμου ικού σωματιδίου. Η ωρίμανση περιλαμβάνει, μεταξύ άλλων, την αναδιάταξη των ικών πρωτεϊνών και τη συσπείρωση του ικού γονιδιώματος [24].

Τέλος, τα ώριμα ικά σωματίδια απελευθερώνονται από το μολυσμένο κύτταρο μέσω μιας διαδικασίας που ονομάζεται εκβλάση. Οι γλυκοπρωτεΐνες του ικού φακέλου συσσωρεύονται στην πλασματική μεμβράνη, όπου αλληλεπιδρούν με κυτταρικές δομές που εμπλέκονται στην εκβλάση. Η διαδικασία αυτή επιτρέπει στο ικό σωματίδιο να αποκτήσει ένα λιπιδικό περίβλημα που προέρχεται από τη μεμβράνη του κυττάρου ξενιστή, ενώ οι ικές πρωτεΐνες και το RNA περικλείονται εντός της δομής αυτής. Τα νέα αυτά ικά σωματίδια είναι ικανά να μολύνουν άλλα κύτταρα-στόχους, διακονίζοντας τον κύκλο ζωής του ιού [25].

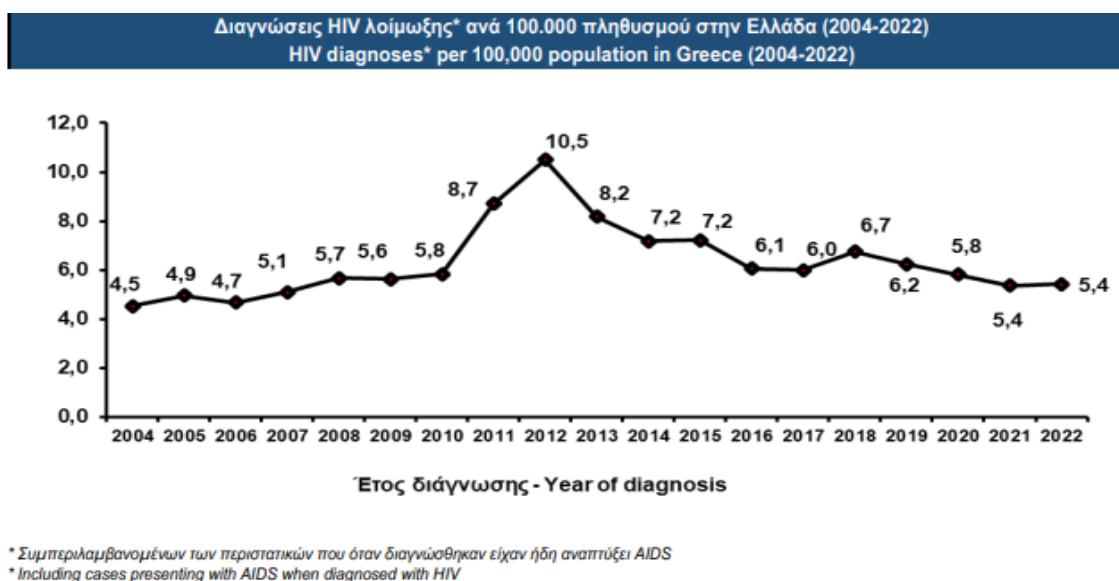
1.3 Επιδημιολογικά Δεδομένα για την HIV - 1 Λοίμωξη

Τα τελευταία χρόνια πολλαπλές κρίσεις σε υγειονομικό αλλά και κοινωνικό επίπεδο έχουν συγκλονίσει τον κόσμο. Δεν θα μπορούσε λοιπόν, να μείνει ανεπηρέαστος και ο κλάδος της επιδημιολογίας του HIV. Το εξώφυλλο του UNAIDS για το 2022 τονίζει παραστατικά τον κίνδυνο που διατρέχουν οι στόχοι που έχουν τεθεί παγκοσμίως για την αντιμετώπιση της HIV-1 λοίμωξης [26]. Με τα τελευταία παγκόσμια δεδομένα να αφορούν το 2021, τόσο ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (Π.Ο.Υ), όσο και το UNAIDS αναφέρουν πως 38.400.000 άτομα παγκοσμίως ζουν με τον ιό του HIV. Το 2021 οι νέες λοιμώξεις ανήλθαν στις 1.500.000 σε όλον τον κόσμο ενώ περί τα 650.000 άτομα κατέληξαν από ασθένειες που σχετίζονται με την HIV-1 λοίμωξη, νούμερο που αντιστοιχεί σε μία ζωή κάθε λεπτό. Ενδεικτικό της κατάστασης αποτελεί το δεδομένο ότι κάθε δύο λεπτά το 2021, ένα έφηβο κορίτσι ή μια νεαρή γυναίκα εκτίθεται για πρώτη φορά στον HIV[26], [27].



Εικόνα 5. Χάρτης από το UNAIDS που απεικονίζει τις νέες λοιμώξεις παγκοσμίως για το έτος 2021. <https://aidsinfo.unaids.org/>

Πιο συγκεκριμένα η Ανατολική Ευρώπη και Κεντρική Ασία, η Μέση Ανατολή, η Βόρεια Αφρική και Λατινική Αμερική έχουν σημειώσει αύξηση των ετήσιων μολύνσεων από τον ιό HIV την τελευταία δεκαετία. Στην Ευρώπη, από τα 2,8 εκατομμύρια ανθρώπων που ζουν με τον HIV, οι 180.000 μολύνθηκαν το 2021. Συνολικά το 73% γνωρίζει την κατάστασή του, το 63% λαμβάνει αντιρετροϊκή θεραπεία και το 60% έχει επιτύχει την ιική καταστολή [27]. Για το ίδιο έτος, στην Ελλάδα διαγνώστηκαν και δηλώθηκαν 572 νέα περιστατικά HIV, αριθμός που αντιστοιχεί στις λιγότερες διαγνώσεις της δεκαετίας 2011-2021. Ο Εθνικός Οργανισμός Δημόσιας Υγείας (ΕΟΔΥ) έχει διαθέσει ωστόσο τα επιδημιολογικά δεδομένα για την Ελλάδα και για το 2022. Τα νέα περιστατικά ανήλθαν στα 565 εκ των οποίων τα 450 (79,6%) αφορούσαν σε άνδρες και τα 115 (20,4%) σε γυναίκες. Ένα ποσοστό περί το 10% των περιπτώσεων αφορούσαν σε άτομα τα οποία είχαν ήδη εμφανίσει ή ανέπτυξαν κλινικά συμπτώματα του AIDS εντός του συγκεκριμένου έτους. Οι περισσότερες νέες διαγνώσεις (61,6 %) αφορούσαν σε άτομα ελληνικής εθνικότητας και άνδρες ηλικίας 30 – 39 και 40 – 49 ετών (25,1% και 25,3%, αντίστοιχα). Στις γυναίκες η κύρια ηλικιακή ομάδα κατά τη διάγνωση ήταν αυτή των 30 – 39 ετών (28,7%) και ακολουθούσε η ομάδα των 50 και άνω (27,8%). Η τελευταία αυτή πληθυσμιακή ομάδα αφορούσε στην πλειοψηφία της αλλοδαπής εθνικότητας γυναίκες (59,4%) που είχαν μολυνθεί μέσω ετεροφυλοφιλικής σεξουαλικής επαφής (78,1%) [28]. Στο Εθνικό Κέντρο Αναφοράς AIDS Ν. Ελλάδος το 2022, πραγματοποιήθηκαν οι 288 από τις 565 (51%) νέες πανελλαδικές διαγνώσεις με τα επιδημιολογικά δεδομένα του κέντρου να συμφωνούν απόλυτα με αυτά του ΕΟΔΥ [29].



Εικόνα 6. Διαγνώσεις HIV λοίμωξης ανά 100.000 πληθυσμού στην Ελλάδα (2004-2022), Πίνακας από το Δελτίο Επιδημιολογικής Επιτήρησης HIV/AIDS στην Ελλάδα, ΕΟΔΥ [28].

Είναι δεδομένο πως ο HIV μπορεί να επηρεάσει οποιονδήποτε, ανεξάρτητα από τον σεξουαλικό προσανατολισμό, την εθνικότητα, το φύλο ή την ηλικία του. Ωστόσο υπάρχουν ορισμένοι πληθυσμοί που έχουν περισσότερες πιθανότητες να εκτεθούν στον ιό λόγω συγκεκριμένων παραγόντων, συμπεριλαμβανομένης της κοινότητας ή του υποπληθυσμού στον οποίον ανήκουν αλλά και ορισμένες συμπεριφορές κινδύνου που μπορεί να ακολουθούν [30]. Οι πληθυσμοί που πλήττονται δυσανάλογα από τον HIV και αποτελούν τις ομάδες υψηλού κινδύνου αφορούν σε άνδρες που έχουν σεξουαλικές επαφές με άνδρες (ΑΣΑ), τα άτομα που εργάζονται στο σεξ, τους χρήστες ενδοφλέβιων εξαρτησιογόνων ουσιών (XEN) και τα διεμφυλικά άτομα.

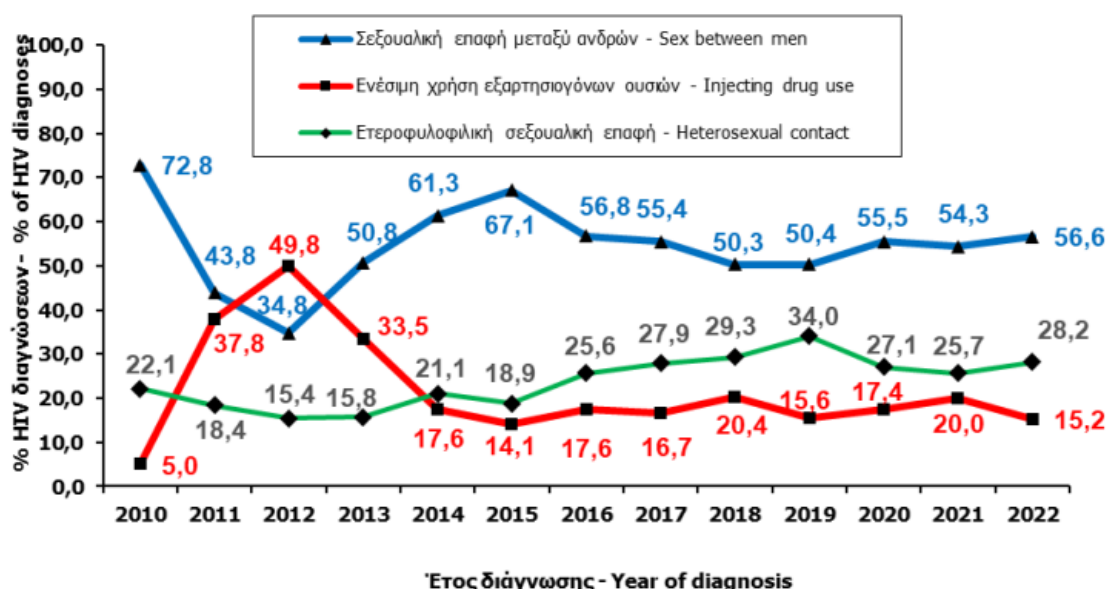
Παρότι οι βασικοί πληθυσμοί κινδύνου αντιπροσωπεύουν λιγότερο από το 5% του παγκόσμιου πληθυσμού, αυτοί και οι σεξουαλικοί τους σύντροφοι αποτέλεσαν το 70% των νέων μολύνσεων από τον ιό HIV το 2021. Σε κάθε περιοχή του κόσμου, υπάρχουν πληθυσμοί-κλειδιά που είναι ιδιαίτερα ευάλωτοι στη έκθεση στον ιό HIV. Οι φυλετικές μειονότητες βιώνουν συχνά σημαντικές ανισότητες που σχετίζονται έμμεσα και με τον HIV, όπως στο Ηνωμένο Βασίλειο, την Βόρεια Ιρλανδία και στις Ηνωμένες Πολιτείες, όπου στους έγχρωμους πληθυσμούς παρατηρήθηκε μικρότερης κλίμακας μείωση των νέων διαγνώσεων του HIV σχέση με τον γενικό πληθυσμό. Ακόμα στην Αυστραλία, τον Καναδά και τις Ηνωμένες Πολιτείες, τα ποσοστά έκθεσης στον HIV είναι υψηλότερα σε κοινότητες ιθαγενών από ό,τι σε στις υπόλοιπες κοινότητες [26]. Στην Ελλάδα, τα δεδομένα για το 2022 αναφέρουν πως στις περιπτώσεις που αναφέρθηκε ο πιθανός τρόπος μετάδοσης του ιού (78,9% των συνολικών περιστατικών), οι 44,1% αφορούσαν σε μεταδόσεις μέσω σεξουαλικής επαφής μεταξύ ανδρών, το 21,9% σε μεταδόσεις μέσω ετεροφυλοφιλικής σεξουαλικής επαφής, το 11,9% σε μεταδόσεις μέσω της από κοινού χρήσης ενδοφλέβιων εξαρτησιογόνων ουσιών. Στο υπόλοιπο 21,1% των νέων περιπτώσεων δεν είχε προσδιοριστεί ο τρόπος μετάδοσης του HIV [28].

Οι χρήστες ενδοφλεβίων ναρκωτικών (XEN) έχουν κατά καιρούς βρεθεί στο επίκεντρο επιδημικών εξάρσεων τόσο στην χώρα μας όσο και παγκοσμίως. Συγκεκριμένα, στην Ελλάδα το 2011, παρατηρήθηκε μία δραματική αύξηση στους XEN ως προς τις εκατοστιαίες αναλογίες του τρόπου μόλυνσης σε σχέση με το 2010 (της τάξης του 1500% περίπου) [31]. Συνεχίζοντας την αυξητική αυτή τάση, το 2012 οι νέες δηλώσεις HIV λοιμώξεις στους XEN διπλασιάστηκαν, φτάνοντας τις 522 [32]. Για πρώτη φορά από την αρχή της επιδημίας στην Ελλάδα, οι XEN αποτέλεσαν την πληθυσμιακή ομάδα με τον μεγαλύτερο αριθμό δηλώσεων μόλυνσης από τον HIV (44,2%) ξεπερνώντας τους άνδρες που είχαν σεξουαλικές επαφές με άνδρες (ΑΣΑ) [33]–[36]. Μετά από τις οργανωμένες προσπάθειες τόσο των Εθνικών όσο και τον Παγκόσμιων φορέων για την καταπολέμηση της επιδημίας HIV που είχε ξεσπάσει στην χώρα μας, το 2013 η μετάδοση του ιού στα διάφορα δίκτυα χρηστών περιορίστηκε. Οι άνδρες που είχαν σεξουαλικές επαφές με

άνδρες ήταν και πάλι η κατηγορία μετάδοσης με τα περισσότερα νέα περιστατικά σε σχέση με τις υπόλοιπες ομάδες και τα συνολικά κρούσματα μειώθηκαν στα 920. Σε συνέχεια της πτωτικής πορείας των δεικτών της επιδημίας, το 2014 δηλώθηκαν 802 περιστατικά από τα οποία το 13,2% ήταν χρήστες ενδοφλέβιων ναρκωτικών (XEN) ενώ το 2015 και 2016 οι νέες λοιμώξεις δεν ξεπέρασαν τις 700 (691 και 616 αντίστοιχα) [37]–[39]. Από το 2017 έως και σήμερα, όπως φαίνεται και στον πίνακα που ακολουθεί, οι νέες λοιμώξεις δεν ξεπέρασαν τις 6,7 ανά 100.000 πληθυσμού και η μετάδοση ανάμεσα στους XEN παραμένει περιορισμένη και διαχειρίσιμη [28].

Ποσοστιαία αναλογία διαγνώσεων HIV* που μολύνθηκαν μέσω σεξουαλικής επαφής ή από κοινού χρήσης ενδοφλέβιων εξαρτησιογόνων ουσιών, κατά κατηγορία μετάδοσης και έτος διάγνωσης στην Ελλάδα (2010-2022)

Percentage of HIV cases* infected through sexual contact or injecting drug use by transmission mode and year of diagnosis in Greece (2010-2022)



Εικόνα 7. Διαγνώσεις HIV λοίμωξης ανά 100.000 πληθυσμού στην Ελλάδα (2004-2022), Πίνακας από το Δελτίο Επιδημιολογικής Επιτήρησης HIV/AIDS στην Ελλάδα, ΕΟΔΥ [28].

1.4 Εργαστηριακές Μέθοδοι Ανίχνευσης και Επιβεβαίωσης της HIV-1 Λοίμωξης

Ο στόχος που έχει τεθεί από το UNAIDS για την εξάλειψη της επιδημίας του HIV παγκοσμίως έως το 2030 συνοψίζεται εν συντομία ως 95-95-95. Ο σκοπός είναι το 95% των ανθρώπων που ζουν με τον HIV να γνωρίζουν την κατάστασή τους, το 95% των ανθρώπων αυτών να λαμβάνει αντιρετροϊκή θεραπεία και το 95% όσων λαμβάνουν HAART να έχουν κατεσταλμένο ιικό φορτίο [8], [40]. Όπως γίνεται κατανοητό, το πρώτο και βασικό βήμα για την επίτευξη του στόχου είναι η έγκαιρη διάγνωση της λοίμωξης. Λαμβάνοντας υπόψιν ωστόσο το σημείο που βρισκόμαστε

παγκοσμίως ως προς την επίτευξη των στόχων αυτών, η επιτυχία του προγράμματος 95-95-95 φαίνεται να κινδυνεύει. Συγκεκριμένα η λέξη «κίνδυνος» αποτυπώθηκε στο κόκκινο εξώφυλλο του UNAIDS για τον απολογισμό του 2022, με πηχυαία γράμματα. Χαρακτηριστικά, αναφέρουν στην επιδημιολογική αυτή έκδοση πως οι πολλαπλές παγκόσμιες κρίσεις των τελευταίων 2 χρόνων, έχουν ανατρέψει την παγκόσμια ανταπόκριση στην πανδημία του AIDS [26].

Ήδη από τον Ιούλιο του 2021, ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας δημοσίευσε ενημερωμένες κατευθυντήριες οδηγίες σχετικά με την πρόληψη, την διάγνωση, την θεραπεία, και την παρακολούθηση της HIV λοίμωξης. Γίνεται εκτενής αναφορά στις ομάδες ατόμων που θα πρέπει να εξετάζονται τακτικά για τον HIV, όπως είναι ενήλικες, έφηβοι ή παιδιά που παρουσιάζουν συμπτώματα που μπορεί να υποδεικνύουν λοίμωξη από τον ιό HIV, αλλά και φυματίωση, ιογενή ηπατίτιδα και άλλων σεξουαλικά μεταδιδόμενων λοιμώξεων. Σε κάθε περίπτωση, τα παιδιά που γεννιούνται από μητέρες φορείς του HIV και τα συμπτωματικά βρέφη αποτελούν ένα πληθυσμό κινδύνου όπου η έγκαιρη διάγνωση είναι καταλυτικής σημασίας. Επίσης, τόσο οι βασικοί πληθυσμοί κινδύνου αλλά και όλες οι έγκυες γυναίκες, θα πρέπει να εξετάζονται συχνά προκειμένου να γνωρίζουν την κατάστασή τους ως προς την HIV λοίμωξη [41]. Το Ευρωπαϊκό Κέντρο Πρόληψης και Ελέγχου Νοσημάτων (ECDC) αναφέρει στις κατευθυντήριες οδηγίες πως η εξέταση για τον HIV πρέπει να είναι εθελοντική, εύκολα προσβάσιμη και εμπιστευτική. Το ζήτημα της εμπιστευτικότητας και της ανωνυμίας του ελέγχου είναι εξαιρετικά σημαντικό καθώς για ορισμένους πληθυσμούς, κοινωνικά ευάλωτους, η έλλειψη εμπιστευτικότητας μπορεί να τους αποτρέψει από το να εξεταστούν και, εάν στη συνέχεια βρεθούν θετικοί, να έχουν πρόσβαση σε θεραπεία και περίθαλψη [42]. Σε εθνικό επίπεδο, ο ΕΟΔΥ το 2022 ανανέωσε τις κατευθυντήριες οδηγίες για την διάγνωση της HIV λοίμωξης σε κλινικές δομές και στην κοινότητα. Ο αλγόριθμος που ακολουθείται στην Ελλάδα είναι εναρμονισμένος με τα όσα ορίζουν τόσο ο WHO όσο και ο ECDC. Συγκεκριμένα, γίνονται αναλυτικές αναφορές και συστάσεις για τον προληπτικό ή/και τον διαγνωστικό έλεγχο του πληθυσμού, για την εργαστηριακή διάγνωση εγκύων και νεογνών και ατόμων που ανήκουν σε διάφορες ομάδες κινδύνου [43].

Οι προτεινόμενες εργαστηριακές μέθοδοι εξέτασης βασίζονται στο γεγονός ότι οι ιολογικοί δείκτες που ανιχνεύονται με χρονολογική σειρά στο αίμα ατόμου που έχει εκτεθεί στον HIV είναι αρχικά το ιικό RNA στην συνέχεια το αντιγόνο p24 και τέλος αντισώματα έναντι των ιικών αντιγόνων [44]. Κατάλληλο δείγμα προς εξέταση αποτελεί το πλάσμα και ορός ενώ έχουν αναπτυχθεί πλέον και τεχνολογίες που παρέχουν την δυνατότητα εξέτασης ολικού αίματος ή στοματικού επιχρίσματος. Ο αρχικός έλεγχος έναντι του HIV μπορεί να πραγματοποιηθεί σε οποιοδήποτε Νοσοκομείο ή Δομή Υγείας, η επιβεβαίωση της θετικότητας ωστόσο, απαιτεί την αποστολή εκ νέου δείγματος σε κάποιο Κέντρο Αναφοράς HIV. Στα Κέντρα Αναφοράς HIV-

AIDS η διάγνωση βασίζεται στην εφαρμογής μίας αρχικής ανοσοενζυμικής δοκιμασίας 4^{ης} γενιάς (EIA/LIA) κατά την οποία ταυτόχρονα ανιχνεύονται τόσο τα αντισώματα τάξης IgG και IgM έναντι των τύπων HIV-1/2 όσο και το αντιγόνο p24 του HIV. Οι συγκεκριμένες τεχνολογίες προσεγγίζουν πλέον το 100% στην ευαισθησία και το 97,87%-99,9% στην ειδικότητα. Ακριβώς λόγω της υψηλής αυτής ευαισθησίας, είναι πιθανή η εμφάνιση ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων. Για τον λόγο αυτό, στην περίπτωση θετικού αποτελέσματος στην αρχική αυτή δοκιμασία ακολουθεί δεύτερος επιβεβαιωτικός έλεγχος ο οποίος επιτρέπει την διαφοροποίηση των ειδικών αντισωμάτων έναντι των HIV-1/2. Παραδοσιακά, η κύρια εξέταση επιβεβαίωσης ήταν η ανοσοαποτύπωση κατά Western (Western Blot). Ωστόσο, πλέον τείνει να αντικατασταθεί μερικώς η χρήση της από τεχνολογίες γρηγορότερες, ευκολότερες και με τα ίδια επίπεδα ειδικότητας και ευαισθησίας, όπως είναι η τεχνική ανοσοχρωματογραφίας (Genieus HIV1/2) [29], [43]. Αξίζει να αναφερθεί πως γίνεται αναφορά πλέον και για την δυνατότητα αυτοεξέτασης για τον HIV. Ο ΠΟΥ αναφέρει για το συγκεκριμένο ζήτημα πως οι κοινότητες θα πρέπει πλέον να συμμετέχουν στην ανάπτυξη μοντέλων αυτοελέγχου για τον HIV τα οποία θα προβλέπουν την χρήση των self-test σαν αρχική εξέταση η οποία θα πρέπει να ακολουθείτε από περαιτέρω δοκιμές σε εξειδικευμένα εργαστήρια με βάση τον εκάστοτε εθνικό αλγόριθμο [45].

Εκτός από τα διαγνωστικά πρωτόκολλα που βασίζονται στην ανίχνευση ανοσολογικών δεικτών (αντιγόνων ή/και αντισωμάτων), η μέτρηση του ιικού RNA που παραδοσιακά χρησιμοποιείται για την παρακολούθηση της HIV-1 λοίμωξης, όπως θα αναπτυχθεί και στην επόμενη παράγραφο, μπορεί πλέον να χρησιμοποιηθεί και ως επιβεβαιωτική εξέταση. Η βιβλιογραφία αναφέρει πως η ιολογική διάγνωση της HIV-1 λοίμωξης με Real Time PCR παρουσιάζει πλεονεκτήματα έναντι των υπολοίπων τεχνολογιών ως προς την ευαισθησία καθώς είναι ο πρώτος βιοδείκτης που γίνεται ανιχνεύσιμος (στην 11-14 ημέρα μετά την μόλυνση) [43]. Ωστόσο δεν προτείνεται ως αρχική εξέταση αλλά ως επιβεβαιωτική τεχνολογία σε περιπτώσεις θετικού αρχικού ελέγχου (screening) και αρνητικού ή αμφίβολου επιβεβαιωτικού αποτελέσματος και σε περιπτώσεις που συνδράμουν κλινικά συμπτώματα πρωτολοίμωξης. Ακόμα, σε νεογνά που γεννιούνται από μητέρες θετικές στο HIV, η ανίχνευση του ιικού RNA είναι μάλλον η πιο ασφαλής προσέγγιση διάγνωσης της κάθετης μετάδοσης. Τέλος, η μέτρηση του ιικού φορτίου HIV πραγματοποιείται ως screening εξέταση των δοτών αίματος, σπέρματος, οργάνων και ιστών.

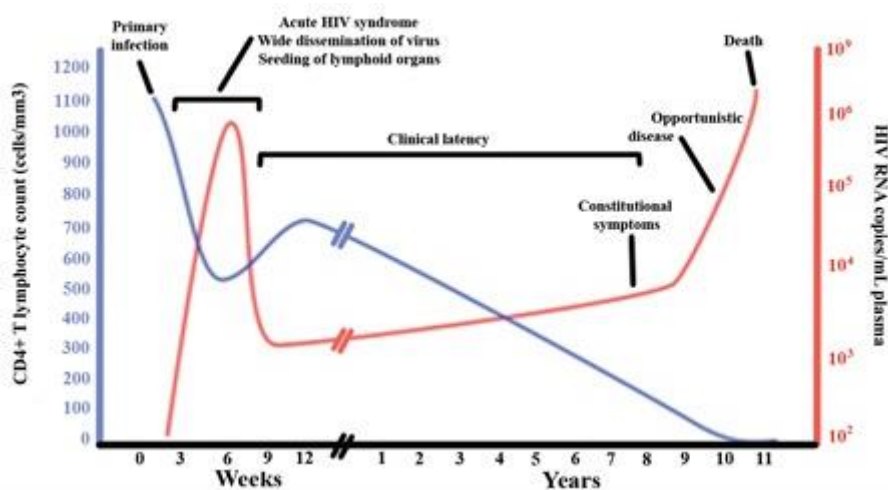
1.5 Η μέτρηση του ιικού φορτίου HIV ως Δείκτης Επιδημιολογικής Επιτήρησης

Η μέτρηση του ιικού RNA στο αίμα των ατόμων που ζουν με τον ιό του HIV έχει πολλές εφαρμογές στην επιτήρηση της λοίμωξης. Αρχικά, όπως ήδη αναφέρθηκε στην προηγούμενη

παράγραφο, η ανίχνευση του ιικού RNA μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως επιβεβαιωτική μέθοδος διάγνωσης. Επιπλέον, χρησιμοποιείται στην ρουτίνα της παρακολούθησης της αποτελεσματικότητας της αντιρετροϊκής θεραπείας των ατόμων που ζουν με τον HIV [43]. Παρακάτω αναλύονται οι εφαρμογές της μέτρησης του ιικού φορτίου ως δείκτη επιδημιολογικής επιτήρησης της HIV λοίμωξης.

1.5.1 Δείκτης καθυστερημένης διάγνωσης

Αν και οι διαθέσιμες διαγνωστικές εξετάσεις για την HIV λοίμωξη εμφανίζουν υψηλή ειδικότητα και ευαισθησία και συνδυαστικά μπορούν να μειώσουν τα διαγνωστικά παράθυρα καθιστώντας δυνατή την διάγνωση της λοίμωξης μερικές ημέρες μετά την έκθεση στον ιό, το ζήτημα της καθυστερημένης διάγνωσης αποτελεί ακόμα και σήμερα ένα φλέγον θέμα παγκοσμίως. Ως καθυστερημένη διάγνωση ορίζεται η ανίχνευση της HIV λοίμωξης σε ένα επίπεδο όπου το ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή έχει ήδη πληγεί σε μεγάλο βαθμό. Συγκεκριμένα, τα άτομα που διαγιγνώσκονται καθυστερημένα συνήθως έχουν αριθμό CD4+ κυττάρων μικρότερο από 350 κύτταρα/ml ή παρουσιάζονται με τα συμπτώματα του AIDS, ανεξάρτητα από τα CD4+ κύτταρα [46]. Όπως φαίνεται και στην που ακολουθεί, για να μειωθούν σε αυτά τα επίπεδα τα CD4+ κύτταρα μπορεί να μεσολαβήσουν και χρόνια από την είσοδο του ιού στον οργανισμό [47].



Εικόνα 8. Τα επίπεδα των CD4+ κυττάρων και του HIV-1 RNA κατά την διάρκεια της λοίμωξης [47].

Ο αντίκτυπος της καθυστερημένης διάγνωσης γίνεται φανερός τόσο στην αποτελεσματικότητα της αντιρετροϊκής θεραπείας, όσο και στην μεταδοτικότητα αλλά και στην γενικότερη εξέλιξη της νόσου. Σύμφωνα με δημοσιεύματα στο «Lancet Public Health» το 2017, εκτιμήθηκε ότι το 15-30% των ατόμων που ζουν με HIV διαγιγνώσκονται καθυστερημένα [48]. Αρκετοί παράγοντες έχουν συσχετιστεί με το συγκεκριμένο φαινόμενο και σε αυτούς μπορεί να περιλαμβάνονται η έλλειψη γνώσεων σχετικά με τον ιό του HIV, ο φόβος του στιγματισμού και των διακρίσεων, η

περιορισμένη πρόσβαση σε υπηρεσίες υγειονομικής περίθαλψης και οι χαμένες ευκαιρίες για εξέταση. Ορισμένοι πληθυσμοί όπως τα διεμφυλικά άτομα, τα άτομα που κάνουν ενέσιμη χρήση ναρκωτικών ουσιών και οι περιθωριοποιημένοι πληθυσμοί με περιορισμένη πρόσβαση στην υγειονομική περίθαλψη, αποτελούν τις ομάδες που εμφανίζουν μεγαλύτερα ποσοστά καθυστερημένης διάγνωσης. Η καθυστερημένη διάγνωση οδηγεί αναπόφευκτα σε καθυστερημένη έναρξη της HAART, γεγονός που έχει συσχετιστεί με πολλά ανεπιθύμητα αποτελέσματα. Συγκεκριμένα, το ζήτημα αυτό έχει συσχετιστεί με αυξημένα ποσοστά ευκαιριακών λοιμώξεων, ραγδαία εξέλιξη της νόσου και αυξημένη θνησιμότητα. Μια μελέτη που δημοσιεύτηκε στο BMJ ανέφερε ότι τα άτομα που διαγνώστηκαν καθυστερημένα είχαν τριπλάσιο κίνδυνο να καταλήξουν μέσα στο πρώτο έτος της διάγνωσης σε σύγκριση με εκείνα που διαγνώστηκαν νωρίς [49].

Η τεχνολογία της Real-Time PCR μπορεί να συνεισφέρει στην αντιμετώπιση του ζητήματος της καθυστερημένης διάγνωσης καθώς παρέχει την δυνατότητα ανίχνευσης της HIV λοίμωξης νωρίτερα από την ορομετατροπή, που για τις υπόλοιπες τεχνολογίες αποτελεί βασική προϋπόθεση. Είναι εξαιρετικά ευαίσθητη τεχνική, ανιχνεύοντας λιγότερα από 20 αντίγραφα του ιικού γονιδιώματος στο πλάσμα του ατόμου που εξετάζεται [50]. Επιπλέον, δύναται να ανιχνεύσει μία μεγάλη ομάδα γονοτύπων του ιού, περιορίζοντας στο ελάχιστο τα ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα [50]. Η χρήση, λοιπόν, δοκιμασιών ενίσχυσης νουκλεϊκών οξέων (NAAT), μπορεί να εφαρμοστεί τόσο σε άτομα που πιθανώς να γνωρίζουν την έκθεσή τους στον ιό όσο και σαν εργαλείο screening σε πληθυσμούς υψηλού κινδύνου, όπως άτομα με σεξουαλικές επαφές χωρίς προφυλάξεις ή κοινής χρήσης ενδοφλεβίων ναρκωτικών. Αυτή η προσέγγιση, επιτρέπει την έγκαιρη ανίχνευση του HIV σε άτομα που μπορεί να έχουν μεγαλύτερη πιθανότητα πρόσφατης μόλυνσης αλλά δεν έχουν ακόμη ορομετατραπεί [51]. Ωστόσο, μετά την οξεία φάση της λοίμωξης, το ιικό φορτίο μειώνεται σε τέτοια επίπεδα που σε ορισμένους ανθρώπους που ζουν με τον ιό του HIV να μην καθίσταται ανιχνεύσιμο από τις μοριακές μεθόδους. Τότε, ελλοχεύει ο κίνδυνος ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων, εξού και η ανάγκη συνδυασμού των μοριακών και ανοσολογικών μεθόδων στους αλγόριθμους διάγνωσης [51], [52]. Τέλος, στο σημείο αυτό αξίζει να αναφερθεί πως παρότι παρουσιάζει αρκετά πλεονεκτήματα, η Real-Time PCR απαιτεί για την εκτέλεσή της ειδικό εργαστηριακό εξοπλισμό και σωστά εκπαιδευμένο προσωπικό, δυσχεραίνοντας έτσι την εφαρμογή της σε ευρεία κλίμακα και σε όλες τις δομές υγείας.

1.5.2 Εργαλείο Παρακολούθησης της Αποτελεσματικότητας της Αντιρετροϊκής Θεραπείας

Η λοίμωξη από τον ιό του HIV αποτελεί πλέον μία διαχειρίσιμη «χρόνια» κατάσταση κατά την οποία το άτομο που ζει με τον ιό, λαμβάνοντας τακτικά την αντιρετροϊκή του θεραπεία, ζει

απρόσκοπτα. Καταλύτης της παραπάνω επιστημονικής επίτευξης αποτέλεσε η ανάπτυξη εξαιρετικά αποτελεσματικών αντιρετροϊκών φαρμάκων. Η HAART περιλαμβάνει τη χρήση ενός συνδυασμού φαρμακευτικών ουσιών για την καταστολή του πολλαπλασιασμού του ιού HIV, την επιβράδυνση της εξέλιξης της νόσου και τη βελτίωση της λειτουργίας του ανοσοποιητικού συστήματος. Η αποτελεσματικότητα της θεραπείας είναι τέτοια που επιτυγχάνει την καταστολή του ιικού πολλαπλασιασμού σε βαθμό όπου τελικά το ιικό φορτίο μειώνεται σε μη ανιχνεύσιμα επίπεδα [53]. Έχει ήδη αναφερθεί η συσχέτιση της καταστολής του κύκλου ζωής του ιού με την παρεμπόδιση της μετάδοσής του (U=U).

Τα αντιρετροϊκά φάρμακα ταξινομούνται σε διάφορες ομάδες (κλάσεις) ανάλογα με τις δραστικές ουσίες από τις οποίες αποτελούνται. Οι διαφορετικές κατηγορίες στοχεύουν και σε διαφορετικά στάδια του κύκλου ζωής του HIV. Οι κύριες κλάσεις αντιρετροϊκών φαρμάκων περιλαμβάνουν τους νουκλεοσιδικούς/νουκλεοτιδικούς αναστολείς αντίστροφης μεταγραφάσης (nucleoside/nucleotide reverse transcriptase inhibitors, NRTIs), τους μη νουκλεοσιδικούς αναστολείς της αντίστροφης μεταγραφάσης (non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors, NNRTIs), τους αναστολείς της πρωτεάσης (protease inhibitors, PIs), τους αναστολείς της ιντεγκράσης (INSTIs) και τους αναστολείς εισόδου (π.χ. ανταγωνιστές του CCR5) [54]. Τα συνδυαστικά σχήματα αποτελούνται συνήθως από τρία ή περισσότερα φάρμακα από διαφορετικές κατηγορίες.

Οι κατευθυντήριες οδηγίες για τις θεραπευτικές στρατηγικές έναντι του HIV επικαιροποιούνται τακτικά από οργανισμούς όπως το CDC αλλά και σε εθνικό επίπεδο από τον ΕΟΔΥ. Γίνονται συστάσεις σχετικά με το πότε πρέπει να ξεκινήσει η θεραπεία, ποια φάρμακα πρέπει να χρησιμοποιηθούν και ποιες στρατηγικές παρακολούθησης. Λαμβάνονται υπόψη παράγοντες όπως ο αριθμός των κυττάρων CD4+, το ιικό φορτίο και η παρουσία συν-λοιμώξεων [55]. Είναι σημαντικό οι πάροχοι υγειονομικής περίθαλψης να ακολουθούν αυτές τις κατευθυντήριες γραμμές για να διασφαλίσουν τα βέλτιστα αποτελέσματα της θεραπείας.

Η μέτρηση του ιικού φορτίου τόσο πριν την έναρξη όσο και κατά την διάρκεια της αντιρετροϊκής θεραπείας είναι καθοριστικής σημασίας. Το ιικό φορτίο που φέρει το άτομο πριν την έναρξη της θεραπείας αναφέρεται ως baseline viral load. Το αρχικό αυτό ιικό φορτίο αποτελεί ισχυρό προγνωστικό παράγοντα της εξέλιξης της νόσου σε άτομα με HIV. Η παρουσία πολλαπλών αντιγράφων του ιικού γονιδιώματος σχετίζονται με ταχύτερη μείωση των CD4+ κυττάρων, αυξημένο κίνδυνο ευκαιριακών λοιμώξεων και χαμηλότερη ανταπόκριση στην θεραπεία. Μια μελέτη των J. W. Mellors et al., ανέδειξε ότι τα άτομα με υψηλότερο baseline viral load είχαν μεγαλύτερο κίνδυνο ταχύτατης εξέλιξης της νόσου και αυξημένης θνησιμότητας [56]. Επιπλέον, το αρχικό ιικό φορτίο μπορεί να αποτελέσει και δείκτη του σχετικού κινδύνου μετάδοσης του

HIV. Περισσότερα αντίγραφα του ιικού γονιδιώματος συσχετίζονται με αυξημένη μολυσματικότητα, καθώς τα άτομα αυτά έχουν μεγαλύτερη δυνατότητα μετάδοσης του HIV σε άλλους [57]. Αρκετές μελέτες, όπως η μελέτη HPTN 052, έχουν καταδείξει ότι τα άτομα με μειωμένο ιικό φορτίο έχουν σημαντικά μειωμένο κίνδυνο μετάδοσης του HIV στους σεξουαλικούς τους συντρόφους [58]. Πιο συγκεκριμένα, στην μελέτη των T.C. Quinn et. al., αποδείχτηκε πως το ιικό φορτίο αποτέλεσε τον κύριο παράγοντα πρόβλεψης του κινδύνου ετεροφυλοφιλικής μετάδοσης του HIV-1 με την μετάδοση να είναι σπάνια μεταξύ ατόμων με επίπεδα κάτω των 1.500 αντιγράφων HIV-1 RNA ανά ml πλάσματος [59]. Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι τα αριθμητικά όρια της Real-Time PCR μπορεί να διαφέρουν ανάλογα με την μέθοδο που ακολουθεί το εκάστοτε εργαστήριο, σε κάθε περίπτωση όμως πρέπει να βρίσκονται στα πλαίσια που προβλέπει ο ΠΟΥ.

Επιπρόσθετα, η μέτρηση του ιικού φορτίου με Real-Time PCR αποτελεί μαζί με την μέτρηση των CD4+ κυττάρων, βασικό εργαλείο παρακολούθησης της λοίμωξης. Συγκεκριμένα, μετά την έναρξη της θεραπείας, διενεργείται τακτική εξέταση ιικού φορτίου για την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητάς της όσον αφορά την επίτευξη ιικής καταστολής. Τα συνήθη διαστήματα εξέτασης παρακολούθησης είναι η 4^η εβδομάδα μετά την έναρξη της θεραπείας, στην συνέχεια η 12^η εβδομάδα, ακολουθεί εξέταση μέτρησης ιικού φορτίου την 24^η εβδομάδα και ο πρώτος κύκλος ολοκληρώνεται την 36^η εβδομάδα. Στην συνέχεια, το άτομο που ζει με τον ιό του HIV παρακολουθεί την πορεία της καταστολής του ιικού του φορτίου κάθε 6 μήνες. Μια σημαντική μείωση του ιικού φορτίου από το αρχικό επίπεδο σχετικά νωρίς, από την 1^η ή 2^η μέτρηση, υποδηλώνει θετική ανταπόκριση στην ART. Ο στόχος της θεραπείας είναι η επίτευξη και η διατήρηση ενός μη ανιχνεύσιμου ιικού φορτίου, το οποίο συνήθως ορίζεται ως λιγότερο από 50 ή 20 αντίγραφα/ml πλάσματος, ανάλογα με το πρωτόκολλο που ακολουθείται [58].

Σε μία μελέτη που συμπεριέλαβε 411.436 άτομα που ζουν με τον ιό του HIV υπό θεραπεία διερευνήθηκε η πιθανότητα ιολογικής ανάκαμψης του HIV. Παρατηρήθηκε πως στα άτομα που έφεραν αρχικό ιικό φορτίο $\geq 100\ 000$ copies/mL υπήρξε μεγαλύτερος κίνδυνος ανάκαμψης σε σχέση με όσους ξεκίνησαν να λαμβάνουν αντιρετροϊκή με αρχικό φορτίο < 100.000 copies/mL. Επιπλέον η επίτευξη της ιολογικής καταστολής σε διάστημα μεγαλύτερο των 6 μηνών αποτέλεσε ισχυρό δείκτη για την πιθανή αποτυχία θεραπείας [60].

Από τα παραπάνω γίνεται κατανοητό πως η μέτρηση του ιικού φορτίου τόσο πριν όσο και κατά την διάρκεια λήψης HAART αποτελεί ένα βασικό εργαλείο επιτήρησης τόσο των νέων HIV-1 λοιμώξεων όσο και των ατόμων παρακολουθούνται ενόσω ζουν με τον ιό. Οι τεχνικές με τις οποίες μπορεί να πραγματοποιηθεί η μέτρηση του ιικού φορτίου είναι οι εξής:

1. Αλυσιδωτή Αντίδρασης Πολυμεράσης Αντίστροφης Μεταγραφάσης - Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR):

Η RT-PCR είναι η gold standard μέθοδος για τη μέτρηση του ιικού φορτίου HIV-1. Περιλαμβάνει την απομόνωση ιικού RNA από το πλάσμα του αίματος, ακολουθούμενη από αντίστροφη μεταγραφή του RNA σε συμπληρωματικό DNA (cDNA). Το cDNA στη συνέχεια ενισχύεται χρησιμοποιώντας PCR με ειδικούς εκκινητές και ανιχνευτές που στοχεύουν συντηρημένες περιοχές του γονιδιώματος HIV-1. Τα ενισχυμένα προϊόντα ποσοτικοποιούνται και το ικό φορτίο προσδιορίζεται με βάση μια τυπική καμπύλη [61].

2. Ενίσχυση Νουκλεϊκού Οξέος με βάση την αλληλούγηση - Nucleic Acid Sequence-Based Amplification (NASBA):

Η NASBA είναι μια μέθοδος ισοθερμικής ενίσχυσης που χρησιμοποιείται για την ποσοτικοποίηση του HIV-1 RNA. Περιλαμβάνει τη χρήση τριών ενζύμων (αντίστροφη μεταγραφάση, RNase H και T7 RNA πολυμεράση) για την ενίσχυση του RNA σε σταθερή θερμοκρασία. Το ενισχυμένο RNA ανιχνεύεται χρησιμοποιώντας ανιχνευτές ειδικούς για το γονιδίωμα του HIV-1 και το ικό φορτίο προσδιορίζεται συγκρίνοντας τα σήματα ενίσχυσης με μια τυπική καμπύλη [62].

3. Transcription-Mediated Amplification (TMA):

Η TMA είναι μια ακόμη μέθοδος ισοθερμικής ενίσχυσης που χρησιμοποιείται για τη μέτρηση του ιικού φορτίου HIV-1. Περιλαμβάνει τη μεταγραφή του ιικού RNA σε αμπλικόνια RNA από το ένζυμο TMA. Τα αμπλικόνια στη συνέχεια ενισχύονται χρησιμοποιώντας RNA-εξαρτώμενη RNA πολυμεράση και το ενισχυμένο RNA ανιχνεύεται χρησιμοποιώντας ανιχνευτές ειδικούς για το HIV-1 γονιδίωμα. Το ικό φορτίο προσδιορίζεται με βάση τα σήματα ενίσχυσης σε σύγκριση με μια τυπική καμπύλη [63].

4. Droplet Digital PCR (ddPCR):

Η ddPCR είναι μια νεότερη τεχνολογία που χρησιμοποιείται για τη μέτρηση του ιικού φορτίου. Διαχωρίζει το μείγμα της αντίδρασης της PCR σε χιλιάδες σταγονίδια, με κάθε σταγονίδιο να λειτουργεί ως ξεχωριστό σημείο αντίδρασης. Η ενίσχυση του ιικού RNA συμβαίνει στα μεμονωμένα σταγονίδια και η παρουσία ή η απουσία ενίσχυσης ανιχνεύεται με φθορισμό. Το ικό φορτίο προσδιορίζεται με βάση τον αριθμό των θετικών σταγονιδίων [64].

Οι τεχνολογίες αυτές διαθέτουν διαφορετικά όρια ευαισθησίας, ακρίβειας και απόδοσης. Η επιλογή της μεθόδου μέτρησης του ιικού φορτίου εξαρτάται από παράγοντες όπως οι εργαστηριακές δυνατότητες, οι πόροι και οι συγκεκριμένες κλινικές ή ερευνητικές απαιτήσεις.

Στην Ελλάδα η μέτρηση του ιικού RNA βασίζεται σχεδόν αποκλειστικά στον συνδυασμό των RT-PCR και Real-Time PCR.

1.6 Η γονοτυπική ανάλυση του ιού HIV-1 ως εργαλείο Μοριακής

Επιδημιολογίας

Μέσα από την γονοτυπική ανάλυση της αλληλουχίας του HIV που λαμβάνεται από ένα άτομο που ζει με τον ιό, καθίσταται δυνατή η άντληση κρίσιμων πληροφοριών σχετικά με τα συγκεκριμένα στελέχη και τις γενετικές μεταλλάξεις που εντοπίζονται. Οι πληροφορίες αυτές είναι πολύτιμες τόσο για τη λήψη αποφάσεων που αφορούν στα θεραπευτικά σχήματα όσο και για την παρακολούθηση της ανθεκτικότητας στα φάρμακα και την κατανόηση της δυναμικής μετάδοσης του HIV. Ο HIV-1 ταξινομείται σε διάφορες ομάδες, υποτύπους αλλά και ανασυνδυασμένες μορφές (Circulating Recombinant Forms-CRF) με βάση τις γενετικές παραλλαγές στο ιικό γονιδίωμα. Ο κύριος γονότυπος του HIV-1 είναι η Ομάδα Μ, η πιο διαδεδομένη ομάδα, υπεύθυνη για την παγκόσμια πανδημία του HIV. Εντός της Ομάδας Μ, υπάρχουν επιμέρους διάφοροι υπότυποι (Α, Β, C, D, F, G, H, J και K) και πολυάριθμοι CRF [65]. Οι τελευταίοι υπότυποι προκύπτουν από ανασυνδυασμένες μορφές χάρη στην ανάμειξη διαφορετικών υποτύπων. Ακόμα, οι υπότυποι Α και F χωρίζονται περαιτέρω σε υπο-υπότυπους (sub-subtypes) Α1-Α5 και F1 και F2. Ως προς τον παγκόσμιο επιπολασμό, την Ομάδα Μ ακολουθεί η Ομάδα Ο ή ομάδα Outlier η οποία είναι λιγότερο συχνή και εντοπίζεται κυρίως στη Δυτική και Κεντρική Αφρική [66]. Είναι γενετικά διακριτή από την ομάδα Μ και έχει χαμηλότερο παγκόσμιο επιπολασμό. Επιπλέον, σπανιότερα εντοπίζεται η Ομάδα Ν η οποία διαφέρει γενετικά τόσο από την ομάδα Μ όσο και από την ομάδα Ο. Έχει εντοπιστεί μονάχα σε λίγα άτομα στο Καμερούν, εκεί όπου έχει εντοπιστεί και η Ομάδα Ρ. Στην Ελλάδα, οι πιο διαδεδομένες ομάδες υποτύπων είναι οι Α1 και Β [67].

Οι εφαρμογές της γονοτυπικής ανάλυσης του HIV σε άτομα που διαγιγνώσκονται θετικά παρατίθενται παρακάτω:

1.6.1 Εξέταση Αντοχής στα Αντιρετροϊκά Φάρμακα

Η ανάλυση του γονότυπου του HIV διαδραματίζει κεντρικό ρόλο στον εντοπισμό μεταλλάξεων ανθεκτικότητας στα φάρμακα. Με την ανάλυση συγκεκριμένων περιοχών του γονιδιώματος του HIV, όπως τα γονίδια της αντίστροφης μεταγραφάσης και της ιικής πρωτεάσης, και της ιντεργκράσης, η ανάλυση γονότυπου μπορεί να εντοπίσει γνωστές μεταλλάξεις που σχετίζονται με αντοχή σε συγκεκριμένες κατηγορίες αντιρετροϊκών φαρμάκων. Αυτές οι πληροφορίες καθοδηγούν του επιβλέποντες ιατρούς ως προς την επιλογή αποτελεσματικών σχημάτων αντιρετροϊκής θεραπείας (HAART) και βοηθούν στην πρόληψη της αποτυχίας [68].

1.6.2 Μέθοδος βελτιστοποίησης του φαρμακευτικού σχήματος

Στις μέρες μας, παρέχεται η δυνατότητα της σχεδόν προσωποποιημένης ιατρικής (personalised medicine). Αυτό επιτυγχάνεται, στην περίπτωση του HIV, με την γονοτυπική ανάλυση των στελεχών του HIV που εντοπίζονται στον κάθε οργανισμό ξεχωριστά. Η πληροφορία αυτή βοηθά στον εντοπισμό των πιο αποτελεσματικών φαρμάκων για την καταστολή της ιικής αναπαραγωγής με βάση των συγκεκριμένο συνδυασμό στελεχών που εντοπίζονται στον εκάστοτε εξεταζόμενο. Η βελτιστοποίηση της θεραπείας μέσω της γονοτυπικής καθοδήγησης οδηγεί στα καλύτερα δυνατά αποτελέσματα [69].

1.6.3 Μέθοδος μελέτης της μεταδιδόμενης αντοχής

Μέσα από την ανάλυση του γονοτύπου μπορεί επίσης να εντοπιστεί η μεταδιδόμενη αντοχή στα φάρμακα, η οποία αναφέρεται στην παρουσία μεταλλάξεων ανθεκτικότητας σε άτομα που εκτέθηκαν πρόσφατα στον ιό και δεν έχουν λάβει ακόμη αντιρετροϊκή θεραπεία. Η παρακολούθηση των μεταδιδόμενων προτύπων αντοχής στα φάρμακα είναι ζωτικής σημασίας για την κατανόηση του επιπολασμού και της δυναμικής της αντοχής σε διαφορετικούς πληθυσμούς. Βοηθά στην ενημέρωση των στρατηγικών πρόληψης, των κατευθυντήριων γραμμών θεραπείας και της ανάπτυξης νέων αντιρετροϊκών φαρμάκων [70].

1.6.4 Εργαλείο Μελέτης Δικτύων Μετάδοσης

Η γονοτύπηση του HIV χρησιμοποιείται σε μοριακές επιδημιολογικές μελέτες για την κατανόηση των προτύπων μετάδοσης του ιού στους διάφορους πληθυσμούς. Συγκρίνοντας τις γενετικές αλληλουχίες διαφορετικών στελεχών HIV, οι ερευνητές μπορούν να ομαδοποιήσουν τις μεταδόσεις, να εντοπίσουν τα δίκτυα μετάδοσης και να αξιολογήσουν τον αντίκτυπο των παρεμβάσεων στη δυναμική μετάδοσης. Αυτές οι πληροφορίες βοηθούν στις στοχευμένες προσπάθειες πρόληψης και στον έλεγχο της μετάδοσης του HIV [71]. Στην Ελλάδα, παρόμοιες μελέτες έχουν ανά καιρούς αναδείξει διάφορα δίκτυα μετάδοσης, παρέχοντας χρήσιμες πληροφορίες στους κρατικούς φορείς επιτήρησης [72].

1.6.5 Εφαρμογή στις φυλογενετικές αναλύσεις

Για την κατασκευή φυλογενετικών δέντρων, οι γονοτυπική ανάλυση είναι απαραίτητη. Στα δέντρα αυτά απεικονίζονται οι εξελικτικές σχέσεις μεταξύ διαφορετικών στελεχών HIV. Η φυλογενετική ανάλυση βοηθά στον εντοπισμό δικτύων που σχετίζονται με νέες λοιμώξεις, στη

διερεύνηση της προέλευσης των ικών στελεχών και στην κατανόηση της εξάπλωσης του HIV εντός των πληθυσμών. Έχει σημαντικές επιπτώσεις στις παρεμβάσεις στη δημόσια υγεία και μπορεί να κατευθύνει τις μελλοντικές στρατηγικές πρόληψης [73].

Οι τεχνικές απαιτούν στο σύνολό τους την αλληλούχηση και την ανάλυση συγκεκριμένων περιοχών του γονιδιώματος του HIV-1 για τον εντοπισμό γενετικών παραλλαγών και μεταλλάξεων ανθεκτικότητας στα φάρμακα. Υπάρχουν διάφορες εργαστηριακές τεχνικές και εμπορικές δοκιμασίες διαθέσιμες για τον προσδιορισμό του γονότυπου του HIV-1. Μερικές τεχνικές με τις οποίες μπορούμε να αναλύσουμε το ικό γονιδίωμα είναι οι εξής:

1. Αλληλούχηση κατά Sager, Sanger Sequencing:

Η αλληλούχηση κατά Sanger είναι μια ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος για τον προσδιορισμό του γονότυπου του HIV-1. Περιλαμβάνει την ενίσχυση συγκεκριμένων περιοχών του ικού γονιδιώματος, όπως τα γονίδια της αντίστροφης μεταγραφάσης, της πρωτεάσης, αλλά και της ιντεργκράσης και βασίζεται στην μέθοδο τερματισμού του πολυμερισμού με την χρήση διδεόξυνουκλεοτιδίων. Οι αλληλουχίες που παραλαμβάνονται με την παραπάνω διαδικασία συγκρίνονται με μια αλληλουχία αναφοράς για τον εντοπισμό γενετικών παραλλαγών και μεταλλάξεων που πιθανώς να προσδίδουν ανοχή στα γνωστά αντιρετροϊκά φάρμακα [74].

2. Αλληλούχηση Επόμενης Γενιάς, Next-Generation Sequencing (NGS):

Μία πληθώρα τεχνολογιών όπως οι Illumina και Ion Torrent, αποτελούν τις μεθόδους αλληλούχησης νέας γενιάς, Next-Generation Sequencing (NGS). Η ανάπτυξη αυτών των τεχνολογιών έχει φέρει επανάσταση στην γενετική ανάλυση καθώς επιτρέπουν την ταυτοποίηση εκατομμυρίων ικών θραυσμάτων του γονιδιώματος ταυτόχρονα, δίνοντας την δυνατότητα μίας βαθύτερης κατανόησης της ικής ποικιλομορφίας και της παρουσίας των μεταλλάξεων ανοχής σε φάρμακα. Ανάλογα με την τεχνολογία που χρησιμοποιείται μπορεί να περιλαμβάνεται η αλληλούχηση διάφορων αμπλικονίων ή/και ολόκληρου του ικού γονιδιώματος [74].

3. Εμπορικά διαθέσιμα πρωτόκολλα αλληλούχησης, Commercial Genotyping Assays:

Διάφορες εμπορικές δοκιμασίες είναι διαθέσιμες για τον προσδιορισμό του γονότυπου του HIV-1, προσφέροντας τυποποιημένες και εύκολες ως προς την επεξεργασία λύσεις. Αυτές οι δοκιμασίες χρησιμοποιούν τυπικά την ενίσχυση μέσω PCR των περιοχών-στόχων και ακολουθεί η εφαρμογή μεθόδων προσδιορισμού της αλληλουχίας ή μεθόδων υβριδοποίησης για τον εντοπισμό γενετικών παραλλαγών και μεταλλάξεων ανοχής. Παραδείγματα εμπορικά διαθέσιμων δοκιμασιών γονότυπου αποτελούν τα Trugene HIV-1 Genotyping Kit και ViroSeq HIV-1 Genotyping System [75].

Σε κάθε περίπτωση η γονοτυπική ανάλυση απαιτεί την χρήση διάφορων διαθέσιμων ηλεκτρονικών εργαλείων και βάσεων δεδομένων όπως είναι η Stanford HIV Drug Resistance Database [76] και η HIV Drug Resistance Database [77] του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας. Αυτά τα εργαλεία διαθέτουν αλγόριθμους για τον προσδιορισμό των προφίλ ανοχής στα φάρμακα.

2. Πειραματικό Μέρος

2.1 Σκοπός

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η μέτρηση του ιικού φορτίου και η επιτήρηση του γονότυπου των ατόμων που διαγνώστηκαν θετικά στον HIV-1 και συγκαταλέχθηκαν στην ομάδα υψηλού κινδύνου XEN (Χρήστες Ενδοφλέβιων Ναρκωτικών). Στο σύνολό τους, τα δείγματα που εξετάστηκαν στο Εθνικό Κέντρο Αναφοράς AIDS N. Ελλάδος αφορούσαν σε άτομα που ζουν με τον ιό του HIV και έχουν διασυνδεθεί στις Ειδικές Μονάδες Λοιμώξεων τριών Νοσοκομείων της Αττικής. Η μέτρηση του ιικού τους φορτίου πραγματοποιήθηκε με το εμπορικά διαθέσιμο κιτ Xpert® HIV-1 Viral Load της Cepheid [50] σε θερμοκυκλοποιητή I-CORE και η γονοτύπηση των δειγμάτων κατά Sanger βασίστηκε σε ένα in house πρωτόκολλο που αναπτύχθηκε στο Εργαστήριο Μοριακής Μικροβιολογίας και Ανοσολογίας (Ε.Μ.Μ.Α) του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής και πραγματοποιήθηκε στα δείγματα των συμμετεχόντων πριν ξεκινήσουν την αντιρετροϊκή τους θεραπεία [78].

2.2 Υλικά - Εξοπλισμός

- Πιπέτες (P1000, P200, P20, and P10) και tips με φίλτρο
- Σύστημα GeneXpert® Dx της Cepheid Xpert®
- Δοχείο Ανάλυσης GeneXpert® της Cepheid Xpert®
- Θερμοκυκλοποιητής I-CORE και Applied Biosystems MiniAmp Thermal Cycler
- 1,5mL αποστειρωμένα σωληνάρια φυγοκέντρησης Eppendorf (RNAase / DNAase free)
- 0,2 mL αποστειρωμένα PCR σωληνάρια (RNAase / DNAase free)
- Σύστημα ηλεκτροφόρησης Gel αγαρόζης (ηλεκτροδοτούμενη δεξαμενή πηκτώματος)
- 96x well plates και φιλμ σφραγίσματος
- Σύστημα φωτογράφισης πηκτώματος (FastGene FAS-DIGI PRO)
- Συσκευή ανάδευσης (Vortex)

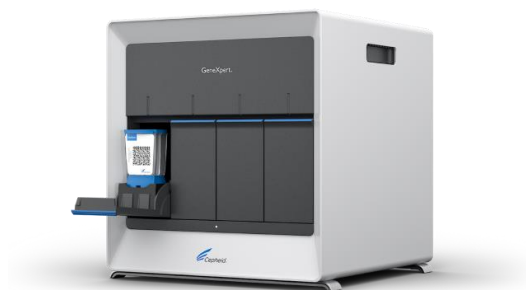
- Φυγόκεντρος (FastGene High Speed Mini Centrifuge)
- Ψυχόμενη φυγόκεντρος 24 θέσεων (Hettich Universal 32R)
- Φασματοφωτόμετρο (Quawell 9000)
- Ξηρός θερμικός επωαστήρας (Genius Dry Bath Incubator, MD series, MD-02N)
- Ξηρός θερμικός επωαστήρας (FastGene Mini Dry Bath Advance)

2.3 Συλλογή & Προετοιμασία Δειγμάτων

Τόσο η εξέταση μέτρησης ιικού φορτίου όσο και η γονοτυπική ανάλυση πραγματοποιήθηκαν σε δείγματα πλάσματος από αιμοληψίες με αντιπηκτικό παράγοντα (EDTA). Το ολικό αίμα φυγοκεντρήθηκε σε 3200 rpm για 15 λεπτά και έπειτα απομονώθηκε το υπερκείμενο, δηλαδή το πλάσμα, το οποίο και εξετάστηκε. Τα δείγματα φυλάσσονταν στους -20°C για σύντομη αποθήκευση ή στους -80°C για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα.

2.4 Μέτρηση Ιικού φορτίου

Η ποσοτικοποίηση του ιικού φορτίου πραγματοποιήθηκε με το εμπορικά διαθέσιμο κιτ Xpert® HIV-1 Viral Load της Cepheid [50]. Το συγκεκριμένο αντιδραστήριο παρέχει την δυνατότητα απομόνωσης νουκλεϊκού οξέος, αντίστροφης μεταγραφής και πραγματοποίησης Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης Πραγματικού Χρόνου (real time PCR) σε μία μόνο εξέταση. Ο κυκλοποιητής που χρησιμοποιήθηκε ήταν I-CORE (Εικόνα 7).



Εικόνα 9. Κυκλοποιητής I-CORE της Cepheid [79].

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν σχεδιασμένοι να υβριδοποιούν στις περιοχές του γονιδιώματος του HIV-1 που ονομάζονται 5' long terminal repeats (5'-LTR) ανιχνεύοντας αλληλουχίες των ομάδων M (με τους υπότυπους) A, B, C, D, F, G, H, J, K, CRF01_AE, CRF02_AG, and CRF03_AB), N, και της ομάδας O [50].

2.4.1 Απομόνωση Νουκλεϊκού Οξέος

Για την απομόνωση του ιικού γονιδιώματος (ριβονουκλεϊκού οξέος, RNA) από το εξεταζόμενο πλάσμα χρησιμοποιήθηκαν τα εξής αντιδραστήρια:

1. θειοκυανική γουανιδίνη 2ml (Guanidinium Thiocyanate)
2. διάλυμα πλύσης 0,5 ml (Rinse Reagent)
3. διάλυμα κατακρύμνησης (έκλουσης) 1,5 ml (Elution Reagent)
4. διάλυμα δέσμευσης 2,4ml (Binding Reagent)
5. πρωτεΐναση K 0,48 ml (Proteinase K Reagent)
6. 1-1,2 ml πλάσματος προς εξέταση

Στην συγκεκριμένη εξέταση χρησιμοποιήθηκε μάρτυρας επάρκειας όγκου του δείγματος (Sample Volume Adequacy, SVA) ο οποίος ελέγχει και επιβεβαιώνει, εάν προστέθηκε ο σωστός όγκος πλάσματος με κατάλληλο τρόπο στο δοχείο ανάλυσης [50].

2.4.2 Αλυσιδωτή Αντίδρασης Πολυμεράσης Αντίστροφης Μεταγραφής (RT-PCR)

Με την χρήση της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης Αντίστροφης Μεταγραφής το ιικό RNA μετατράπηκε σε συμπληρωματικό DNA (complementary DNA, cDNA) το οποίο στην συνέχεια υποβλήθηκε σε Αλυσιδωτή Αντίδρασης Πολυμεράσης Πραγματικού Χρόνου. Για την πραγματοποίηση της διαδικασίας οι εκκινητές, το ρυθμιστικό διάλυμα, ιόντα μαγνησίου, δεοξυριβονουκλεοτίδια και το ένζυμο που χρησιμοποιήθηκαν περικλείονταν στο κιτ σε έτοιμες συγκεντρώσεις από τον κατασκευαστή.

Στην συγκεκριμένη αντίδραση χρησιμοποιείται ένα εσωτερικό ποσοτικό πρότυπο ελέγχου (Internal Quantitative Standard High and Low IQS-H and IQS-L) για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης του HIV-1 RNA και την ποσοτικοποίηση του. Τα υψηλά (IQS-H) and χαμηλά (IQS-L) πρότυπα ελέγχου έχουν βαθμονομηθεί σύμφωνα με τις οδηγίες του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας.

2.4.3 Αλυσιδωτή Αντίδρασης Πολυμεράσης Πραγματικού Χρόνου (Real Time PCR)

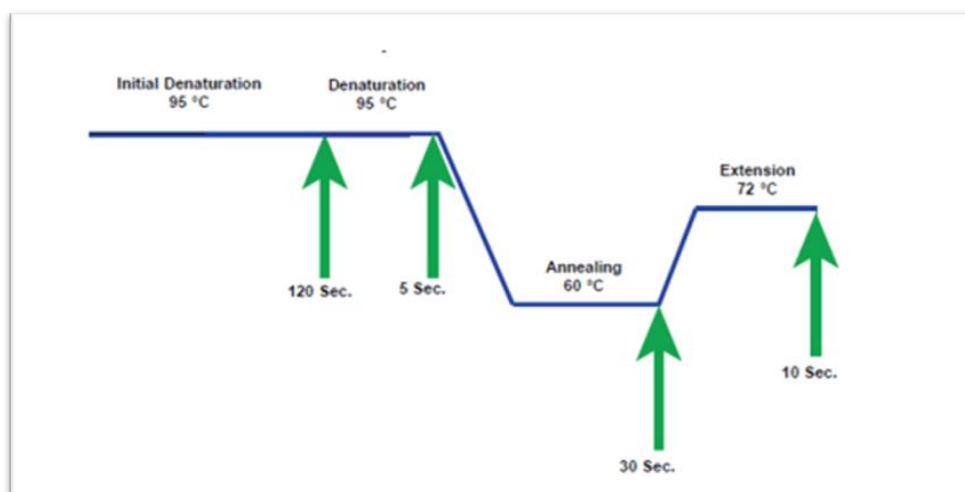
Κατά την διαδικασία της Αλυσιδωτή Αντίδρασης Πολυμεράσης Πραγματικού Χρόνου η ποσότητα του cDNA που ενισχύεται μπορεί να οπτικοποιηθεί και μετρηθεί σε πραγματικό χρόνο με την χρήση φθορίζουσών ουσιών προσδεδεμένων σε ειδικούς ανιχνευτές (probes). Εκτός από την φθορίζουσα χρωστική, στον ανιχνευτή είναι προσδεδεμένη και μία ουσία που απορροφά την εκπομπή φθορισμού της χρωστικής (quencher). Μέσω της τεχνολογίας της 5'-νουκλεάσης ο ανιχνευτής προσδέεται στην αλληλουχία στόχο καθοδικά του εκκινητή αυξάνοντας ταυτόχρονα

και την ευαισθησία της μεθόδου. Κατά την διάρκεια επιμήκυνσης της νουκλεοτιδικής αλυσίδας του DNA η αλληλουχία του ανιχνευτή καταστρέφεται και απομακρύνονται οι δύο ουσίες που ήταν προσδεσμένες σε αυτόν, η φθορίζουσα αλλά και αυτή που απορροφά την εκπομπή. Η απομάκρυνση αυτή επιτρέπει την απελευθέρωση του σήματος της χρωστικής και την ανίχνευσή του σε πραγματικό χρόνο. Η αύξηση του σήματος φθορισμού είναι ανάλογη του αριθμού αντιγράφων που παράγονται. Ο κύκλος στην διάρκεια του οποίου γίνεται πρώτη φορά ανιχνεύσιμη η εκπομπή της φθορίζουσας αποτελεί το κατώφλι (cycle threshold, Ct) και ορίζεται συνήθως στον 30^ο θερμικό κύκλο.

Πριν την έναρξη της εξέτασης πραγματοποιείται ένας έλεγχος ανίχνευσης (Probe Check Control, PCC) προκειμένου να διασφαλιστεί ότι το ολικό σύστημα της GeneXpert λειτουργεί κατάλληλα για να ολοκληρώσει την αντίδραση. Έτσι ελέγχεται το σήμα φθορισμού, η ενυδάτωση των αντιδραστηρίων που βρίσκονται σε μορφή σφαιριδίων, η πλήρωση του σωληναρίου δοκιμασίας και η ακεραιότητα του ανιχνευτή φθορισμού [80].

Τα βήματα για την Αλυσιδωτή Αντίδρασης Πολυμεράσης Πραγματικού Χρόνου παρουσιάζονται στην παρακάτω:

1. Αρχική αποδιάταξη του δίκλωνου cDNA στους 95°C για 120 δευτερόλεπτα (πραγματοποιείται μόνο μία φορά στην αρχή του πειράματος) στην συνέχεια επαναλαμβάνονται στα βήματα 2-4 για 40 κύκλους.
2. Αποδιάταξη στους 95°C για 5 δευτερόλεπτα.
3. Υβριδοποίηση των Εκκινητών στους 60°C για 30 δευτερόλεπτα.
4. Επιμήκυνση της πολυνουκλεοτιδικής αλυσίδας στους 72°C για 10 δευτερόλεπτα.

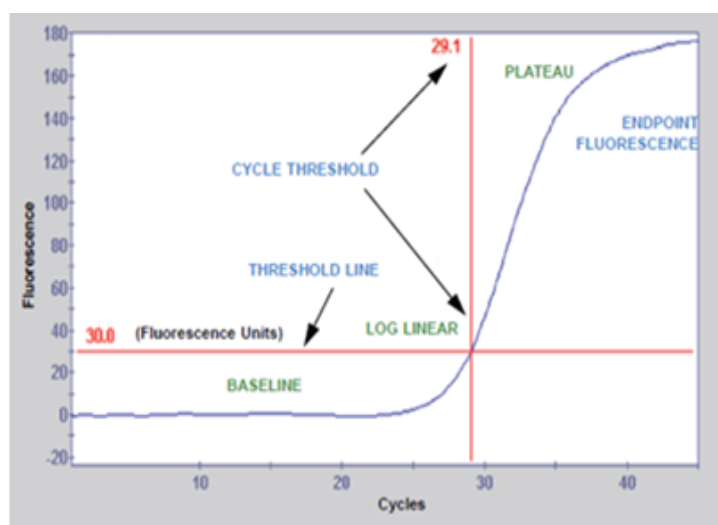


Εικόνα 10. Αναπαράσταση της θερμικής κυκλοποίησης με αύξηση και μείωση της θερμοκρασίας για την αποδιάταξη του δίκλωνου μορίου cDNA, τον υβριδισμό και την επιμήκυνση των εκκινητών με σκοπό την σύνθεση νέας αλυσίδας DNA [50].

Τα αποτελέσματα της παραπάνω διαδικασίας αποτυπώνονται σε διάγραμμα στο οποίο οι κύκλοι αντιγραφής βρίσκονται στον άξονα x και ο φθορισμός στο άξονα y. Το όριο ανίχνευσης (Limit of Detection, LOD) για την συγκεκριμένη εξέταση Real-Time RT-PCR αποτελεί το όριο πάνω από το οποίο το HIV-1 RNA γίνεται ανιχνεύσιμο. Ως LOD της εξέτασης ορίζονται τα 18,3 copies/mL πλάσματος. Το όριο ποσοτικοποίησης (Limit of Qualification, LOQ) αποτελεί το όριο πάνω από το οποίο το HIV-1 RNA είναι ανιχνεύσιμο και ποσοτικοποιήσιμο. Το LOQ της εξέτασης ορίζεται στα 40 copies/mL [81].

Με βάση τα LOD και LOQ της εξέτασης προκύπτουν τέσσερα είδη αποτελεσμάτων:

- Θετικό αποτέλεσμα – ακριβής αριθμός copies/mL πλάσματος. Το HIV-1 RNA είναι ανιχνεύσιμο και ποσοτικοποιήσιμο και βρίσκεται εντός του εύρους αναλυτικών μετρήσεων, ταυτόχρονα η καμπύλη βρίσκεται πάνω από το Ct.
- Θετικό αποτέλεσμα - ικό φορτίο $> 1 \times 10^7$ copies/mL. Το HIV-1 RNA είναι ανιχνεύσιμο, αλλά μη ποσοτικοποιήσιμο και βρίσκεται πάνω από το εύρος αναλυτικών μετρήσεων.
- Θετικό αποτέλεσμα – ικό φορτίο < 40 copies/mL. Το HIV-1 RNA είναι ανιχνεύσιμο, ωστόσο βρίσκεται κάτω του εύρους αναλυτικών μετρήσεων, ταυτόχρονα η καμπύλη παραμένει κάτω από το Ct, επομένως δεν μπορεί να δοθεί ακριβής ποσοτική απάντηση για τον αριθμό αντιγράφων/mL πλάσματος.
- Αρνητικό αποτέλεσμα – ικό φορτίο $< 18,3$ copies/mL, δηλαδή είναι μη ανιχνεύσιμο.



Εικόνα 11. Καμπύλη ανάπτυξης Real-time RT-PCR [50].

2.5 Γονοτύπηση

Για την ανίχνευση του γονότυπου του ιού HIV-1 πραγματοποιήθηκε αλληλούχηση κατά Sanger όπως περιγράφεται στις ενότητες που ακολουθούν. Συνοπτικά στο απομονωμένο νουκλεϊκό οξύ πραγματοποιείται PCR αντίστροφης μεταγραφάσης η οποία ακολουθείται από μία φωσφακική PCR. Στο τέλος της διαδικασίας αυτής το προϊόν της αντίδρασης οπτικοποιείται μέσω ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης και εν συνεχεία πραγματοποιείται ο καθαρισμός του με εμπορικά διαθέσιμο αντιδραστήριο (Invitrogen PureLink Quick PCR Purification kit). Μετά την εκτίμηση ποιότητας και ποσότητας του καθαρισμένου προϊόντος PCR μέσω φωτομέτρησης τα δείγματα προετοιμάζονται για αλληλούχηση κατά Sanger. Τέλος, τα αποτελέσματα αναλύονται με το λογισμικό SeqScape™ Software v2.7 της εταιρείας Thermo Fisher Scientific.

2.5.1 Απομόνωση Ιικού Γονιδιώματος

Σε δείγματα που ανιχνεύτηκε ιικό φορτίο μεγαλύτερο των 1000 copies/ml πραγματοποιήθηκε εκ νέου απομόνωση νουκλεϊκού οξέος από το πλάσμα της ίδιας αιμοληψίας. Το εμπορικά διαθέσιμο αντιδραστήριο QIAamp Viral RNA Mini Kit που χρησιμοποιήθηκε έφερε τις εξής οδηγίες:

1. Ανάμιξη 560μl διαλύματος AVL (διάλυμα λύσης) και 140μl δείγματος.
2. Ανάδευση στην συσκευή vortex και αναμονή για 10 min.
3. Σύντομη μικροφυγοκέντρηση δευτερολέπτων.
4. Προσθήκη 560μl κρύας απόλυτης αιθανόλης.
5. Ανάδευση με τη συσκευή vortex.
6. Μικροφυγοκέντρηση δευτερολέπτων.
7. Μεταφορά 630 μl στην κολώνα καθαρισμού.
8. Φυγοκέντρηση στις 6.000 rcf για 1 min στους 25°C.
9. Απόρριψη του εκλυόμενου παραπροϊόντος.
10. Επανάληψη των βημάτων 8 και 9.
11. Προσθήκη στην κολώνα 500 μl διαλύματος AW1 (διάλυμα πλύσης 1).
12. Φυγοκέντρηση στις 6.000 rcf για 1 min στους 25°C.
13. Απόρριψη του εκλυόμενου παραπροϊόντος.
14. Προσθήκη του διαλύματος AW2 (διάλυμα πλύσης 2).
15. Φυγοκεντρείται στις 20.000 rcf για 3 min στους 25°C.

16. Απόρριψη και πάλι του εκλυόμενου παραπροϊόντος.
17. Μεταφορά της κολόνας σε αποστειρωμένο καταλλήλως σημειωμένο σωληνάκι eppendorf και προσθήκη 40μl διαλύματος έκλουσης AVE.
18. Φυγοκέντρηση στις 6.000 rcf για 1 min στους 25°C.
19. Στο εκλυόμενο προϊόν περιέχεται το RNA.

2.5.2 PCR Αντίστροφης Μεταγραφής (Reverse Transcription, RT-PCR)

Το προϊόν που παραλήφθηκε με την παραπάνω διαδικασία υποβλήθηκε σε PCR αντίστροφης μεταγραφής με την χρήση του διαθέσιμου από την Invitrogen Superscript III One-Step RT-PCR system kit. Τα αντιδραστήρια της πειραματικής διαδικασίας αποτέλεσαν σε κατάλληλες συγκεντρώσεις το, έτοιμο από τον κατασκευαστή, Master MIX. Αυτό περιείχε εκκινητές, το ρυθμιστικό διάλυμα και τα ιόντα μαγνησίου και χλωρίου αραιωμένα σε νερό ελεύθερο από DNAάσες και RNAάσες. Η DNA πολυμεράση που χρησιμοποιήθηκε ήταν η Platinum Taq High Fidelity DNA πολυμεράση (αριθμός καταλόγου: 12574-035).

Το RNA μήτρα που προέρχεται από την απομόνωση που αναφέρεται παραπάνω προστίθεται στο Master Mix σε όγκο που κυμαίνεται από 10 έως 20μl ανάλογα με την αρχική του συγκέντρωση.

2.5.3 Φωλεακή Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (Nested PCR)

Σκοπός της Nested PCR αποτελεί η περαιτέρω ενίσχυση της γονιδιακής περιοχής POL του ιικού γονιδιώματος του HIV-1. Για την πραγματοποίησή της χρησιμοποιήθηκε το εμπορικά διαθέσιμο kit της Invitrogen Platinum PCR SuperMix high fidelity (αριθμός καταλόγου: 12532-016). Συνοπτικά τα βήματα της συγκεκριμένης διαδικασίας περιλάμβαναν την ανάμειξη του προϊόντος της προηγούμενης αντίδρασης (DNA μήτρα) με τους κατάλληλους εκκινητές και τα υπόλοιπα αντιδραστήρια σε συγκεντρώσεις που ορίζουν οι οδηγίες του κατασκευαστή.

Η επιτυχία του παραπάνω βήματος αξιολογείται με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης.

2.5.4 Ηλεκτροφόρηση

Για την παρασκευή του πηκτώματος αγαρόζης 1% ακολουθούνται τα εξής βήματα:

1. Ανάμειξη 1gr αγαρόζης με 100ml από το ρυθμιστικό διάλυμα (Tris-borate-EDTA-TBE) σε κωνική φιάλη.
2. Θέρμανση του μίγματος στα μικροκύματα με σταδιακή ανάδευση μέχρι να διαλυθεί η αγαρόζη στο ρυθμιστικό διάλυμα.
3. Προσθήκη χρωστικής SYBR® Safe DNA Gel Stain της εταιρίας Invitrogen™ (αριθμός καταλόγου: S33102) σε κατάλληλη αναλογία και ήπια ανάδευση.

4. Έκχυση του διαλύματος στο δοχείο πηκτώματος και αναμονή ως την πήξη του.
5. Στην ηλεκτροφορητική συσκευή τοποθετείται το ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα, TBE, σε συγκέντρωση 0.5x.
6. Στο πρώτο πηγάδι ηλεκτροφόρησης τοποθετούνται 4 μL μάρτυρα ο HyperLadder™ 50bp της εταιρίας Meridian© (αριθμός καταλόγου: BIO-33054) και στις επόμενες θέσεις τοποθετούνται διαδοχικά τα προϊόντα της φωλεακής PCR αναμιγμένα με διάλυμα φόρτωσης DNA Gel Loading Dye (6X) της εταιρείας Thermo Scientific™ (αριθμός καταλόγου: FERR0611) σε ποσότητες 5 μL και 1 μL αντίστοιχα.
7. Εφαρμογή τάση 120V και αναμονή για 40 min.
8. Οπτικοποίηση των ζωνών υπό ακτινοβολία UV σε κατάλληλη συσκευή.

2.5.5 Καθαρισμός προϊόντος (PCR purification)

Για τον καθαρισμό του ενισχυμένου προϊόντος της PCR χρησιμοποιήθηκε το εμπορικά διαθέσιμο αντιδραστήριο της Invitrogen PureLink Quick PCR Purification kit (REF: K310001). Τα βήματα που ακολουθήθηκαν περιγράφονται παρακάτω:

1. Ανάμιξη του διαλύματος B2 με το προϊόν PCR που επρόκειτο να καθαριστεί σε αναλογία 4:1 και μεταφορά σε κολώνα καθαρισμού.
2. Φυγοκέντρηση σε 10.000 ref για 1 min στους 25°C.
3. Απόρριψη του εκκλύμενου διαλύματος.
4. Προσθήκη στην κολώνα 650 μl διαλύματος W1 (διάλυμα πλύσης) .
5. Φυγοκέντρηση σε 10.000 ref για 1 min στους 25°C.
6. Απόρριψη του εκκλύμενου διαλύματος.
7. Φυγοκέντρηση σε μέγιστη ταχύτητα για 3 min στους 25°C με σκοπό να απομακρυνθεί όλη η ποσότητα αιθανόλης που περιέχει το διάλυμα W1.
8. Προσθήκη 40 μl από το διάλυμα έκλουσης E.1
9. Φυγοκέντρηση σε μέγιστη ταχύτητα για 3 min στους 25°C.
10. Συλλογή και φύλαξη του εκκλύμενου προϊόντος σε συνθήκες βαθιάς ψύξης ως την αλληλούχησή του.

2.5.6 Εκτίμηση ποιότητας και ποσότητας καθαρισμένου προϊόντος PCR

Πριν την διαδικασία της αλληλούχησης είναι απαραίτητη η εκτίμηση της ποσότητας και ποιότητας του καθαρισμένου προϊόντος PCR. Αρχικά πραγματοποιείται ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης όπως αναφέρεται στην υποπαράγραφο 2.5.4 για την παρατήρηση των ζωνών. Επιπλέον χρησιμοποιείται η συσκευή Quawell 9000 Spectrophotometer για φωτομέτρηση και υπολογισμό της καθαρότητας του διαλύματος η οποία αποτυπώνεται από τον λόγο 260/280 που αντιπροσωπεύει την απορρόφηση του DNA προς την απορρόφηση των πρωτεϊνών που πιθανόν να υπάρχουν ακόμα στο καθαρισμένο προϊόν, και η συγκέντρωση εκφράζεται σε ng/ul.

2.5.7 Προετοιμασία δειγμάτων για αλληλούχηση κατά Sanger

Η αλληλούχηση κατά Sanger πραγματοποιήθηκε σε εξωτερική εταιρεία. Τα δείγματα αραιώθηκαν και σε κάθε πηγάδι, από τα 96 διαθέσιμα του πιάτου αλληλούχησης, υπήρχαν 3μl εκκινητή τελικής συγκέντρωσης 1pm/μl και 12 μl δείγματος τελικής συγκέντρωσης 8ng/μl. Για κάθε δείγμα χρησιμοποιήθηκαν 8 εκκινητές και κατ' επέκταση πραγματοποιήθηκαν 8 τμηματικές αναγνώσεις της γονιδιακής περιοχής POL του ιικού γονιδιώματος.

Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν με το λογισμικό SeqScape™ Software v2.7 της εταιρείας Thermo Fisher Scientific το οποίο δίνει την δυνατότητα στοίχισης των αλληλουχιών με μία αλληλουχία πρότυπο. Ο χρωματικός κώδικας των κορυφών είναι εξής: κόκκινο για θυμίνη (T), πράσινο για αδείνη (A), μπλε για κυτοσίνη (C), και μαύρο για γουανοσίνη (G). Είναι δυνατή η εκτίμηση ύπαρξης του γονότυπου B σε αυτό το σημείο καθώς η αποθηκευμένη ως πρότυπο αλληλουχία γονότυπου B (γαλάζιο χρώμα) στοιχίζεται με τις εισαγόμενες αλληλουχίες ενδιαφέροντος (κίτρινο χρώμα) και εμφανίζονται με κάθετες μπλε γραμμές τα διαφορετικά νουκλεοτίδια. Τέλος η κάθε αλληλουχία μετατρέπεται σε αρχείο FASTA και αναλύεται περαιτέρω ο γονότυπος κάθε δείγματος.

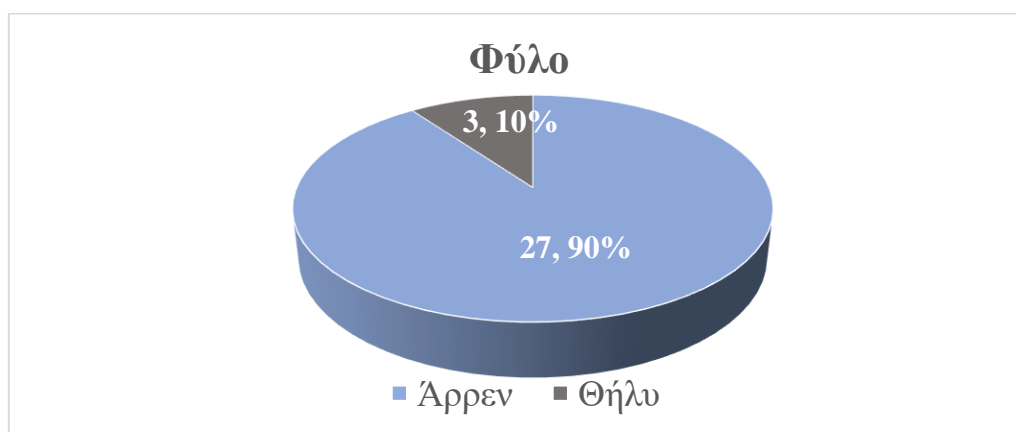
2.5.8 Ανάλυση Αποτελεσμάτων Γονοτύπησης

Η γονοτύπηση των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε σε διαδικτυακές βάσεις δεδομένων όπως οι HIV Drug Resistance Database του Stanford University, η REGA HIV Subtyping Tool του KU Leuven University, και η Comet HIV-1 του Luxembourg Institute of Health. Ο τρόπος με τον οποίο λειτουργούν οι βάσεις δεδομένων είναι μέσω σύγκρισης-στοίχισης της αλληλουχίας που εισάγεται με πρότυπες αλληλουχίες που υπάρχουν στο λογισμικό του προγράμματος. Το αποτέλεσμα των μεταλλάξεων και του γονότυπου δίνεται με βάση την αλληλουχία με την οποία το δείγμα ενδιαφέροντος φέρει τη μικρότερη απόκλιση 25 και εμφανίζεται με τη μορφή ποσοστού.

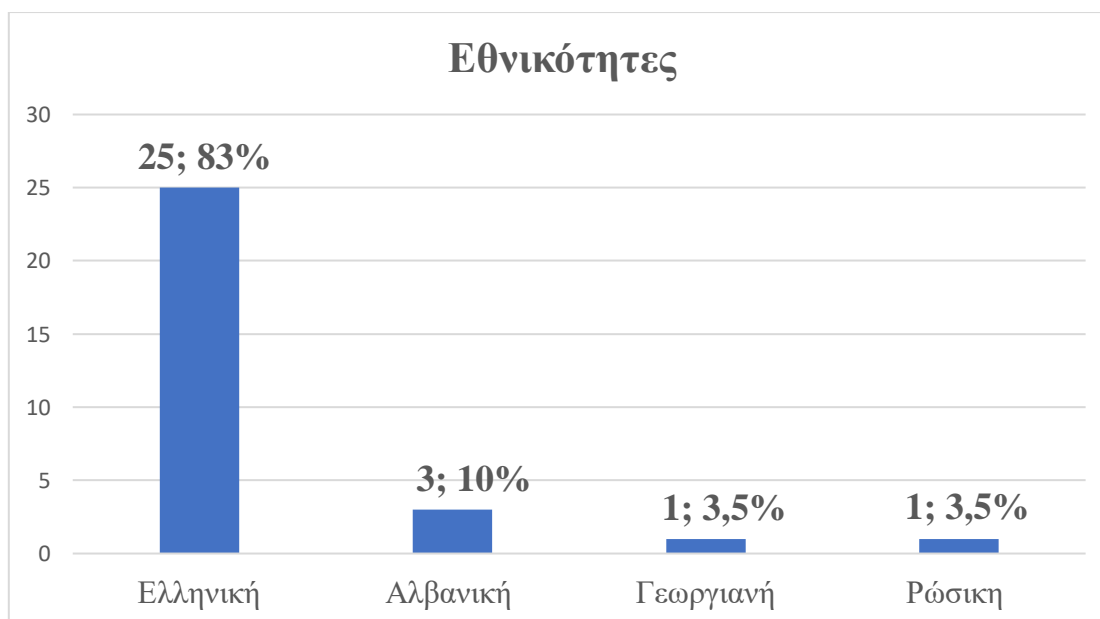
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στην συγκεκριμένη εργασία συμπεριλήφθηκαν 30 περιπτώσεις νέων λοιμώξεων HIV-1, 20 από τις οποίες αφορούσαν σε άτομα που διαγνώστηκαν θετικά το έτος 2022 και οι υπόλοιπες 10 σε νέες επιβεβαιωμένες λοιμώξεις έως τις 30/6/2023. Ως κριτήριο συμπερίληψης των παραπάνω περιστατικών στην μελέτη, τέθηκε η κατάταξή τους στην ομάδα κινδύνου XEN (Χρήστες Ενδοφλεβίων Ναρκωτικών). Η συγκεκριμένη ομάδα υψηλού κινδύνου, όπως έχει ήδη αναλυθεί στην εισαγωγή της συγκεκριμένης εργασίας, αποτελεί διαχρονικά μία ομάδα εξέχουσας σημασίας για την επιδημιολογική επιτήρηση της λοίμωξης του HIV τόσο στην Ελλάδα όσο και παγκοσμίως.

Πιο αναλυτικά, η πλειοψηφία των ατόμων που εξετάστηκαν ήταν άνδρες, ελληνικής εθνικότητας με διάμεση ηλικία τα 40,8 έτη. Στους πίνακες που ακολουθούν (Πίνακες 1 και 2) παρατίθενται μερικά επιδημιολογικά στοιχεία για τα άτομα αυτά.

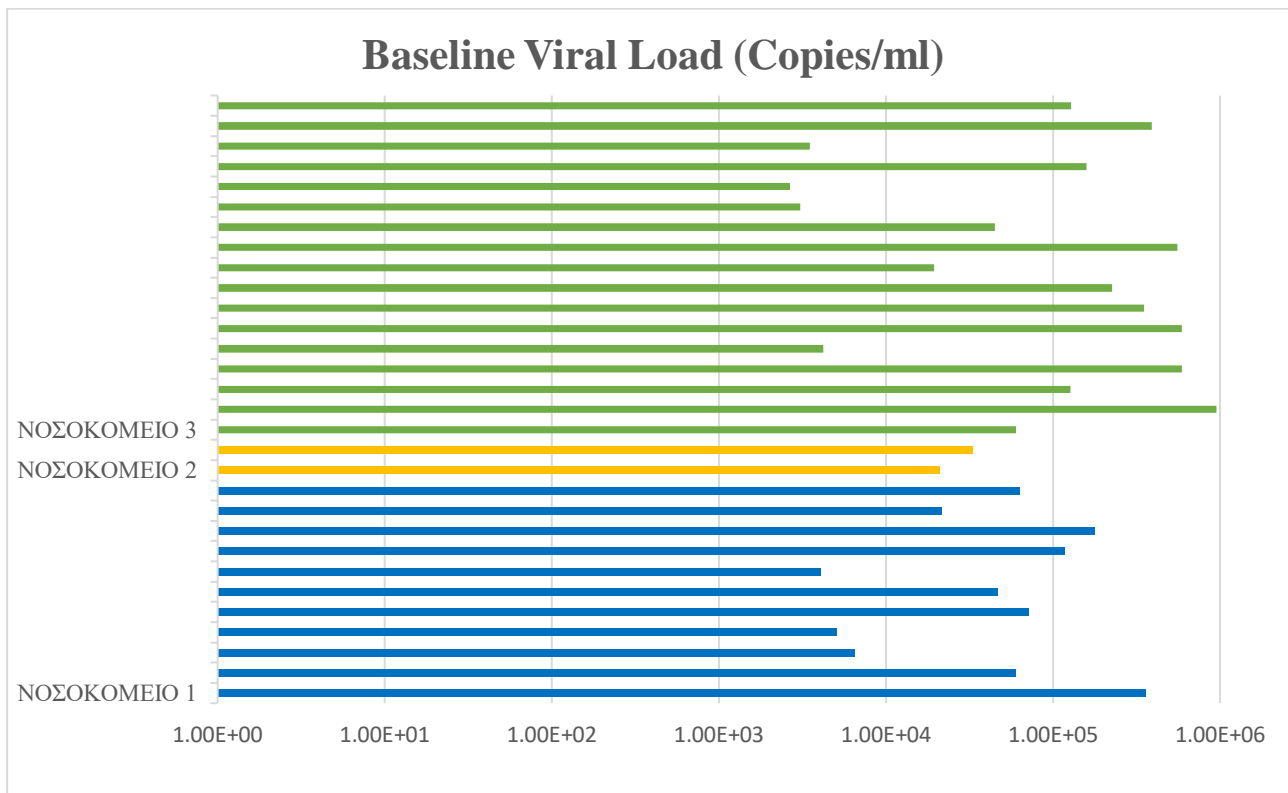


Πίνακας 1. Το φύλο των ατόμων που συμπεριλήφθηκαν στην μελέτη.



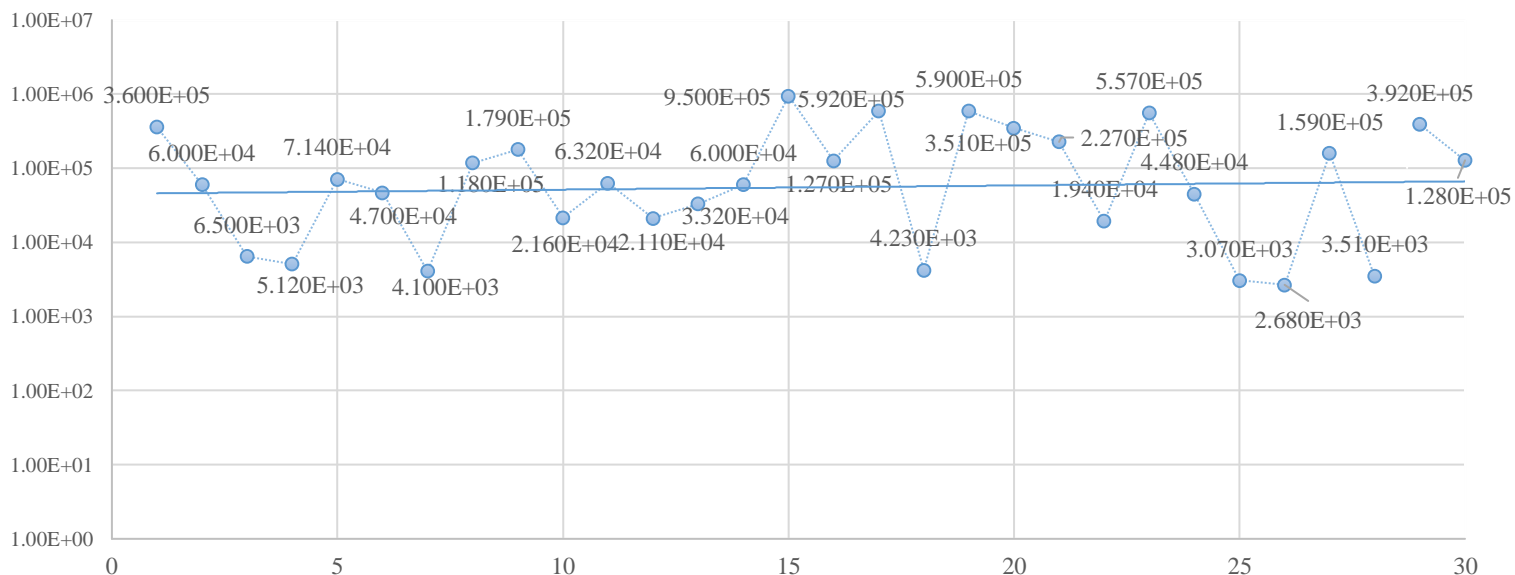
Πίνακας 2. Οι εθνικότητες των ατόμων που συμπεριλήφθηκαν στην μελέτη.

Από τις μετρήσεις των ικών φορτίων πριν την έναρξη της αντιρετροϊκής θεραπείας παρατηρήθηκε ότι η διάμεση τιμή των ικών αντιγράφων ανά ml πλάσματος (copies/ml) ήταν τα 61.600 (4,79 log₁₀) (IQR: 19.400 - 215.000 copies/ml, 4,29 log₁₀- 5,33 log₁₀). Στον Πίνακα 3 που ακολουθεί παρατίθενται οι συνολικές μετρήσεις ικών φορτίων (baseline viral loads) ανά νοσοκομείο.



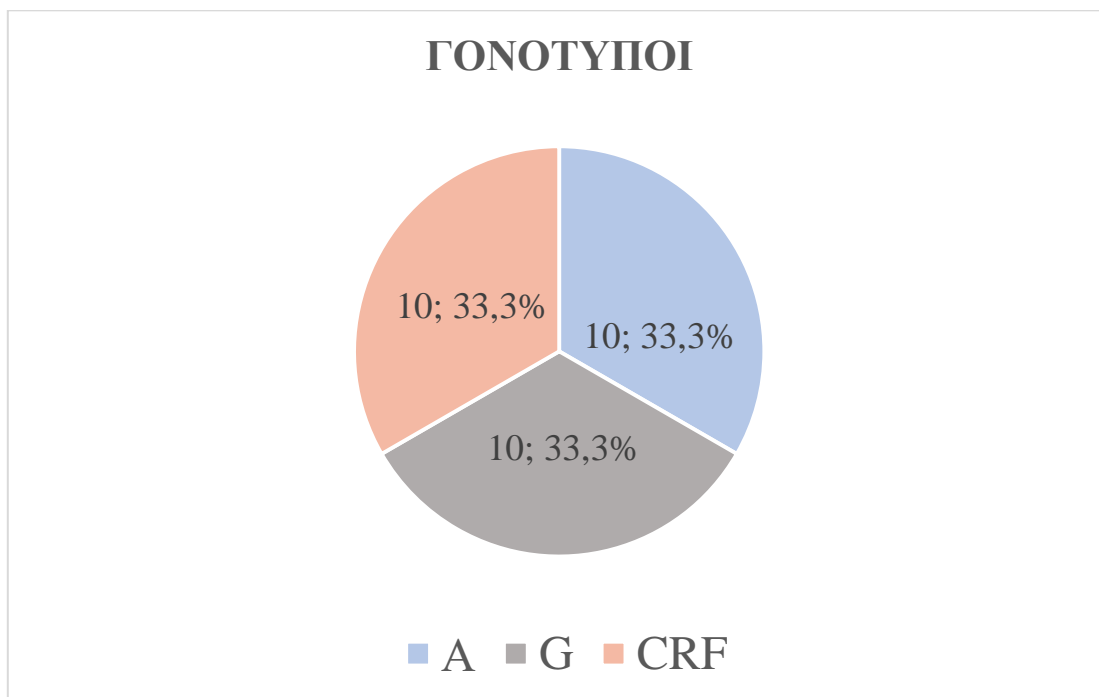
Πίνακας 3. Αποτελέσματα μετρήσεων ικών φορτίων ανά Νοσοκομείο.

Επιπλέον, οι μετρήσεις τοποθετήθηκαν σε ένα γράφημα διασποράς (Πίνακας 4) όπου συμπεριλήφθηκε και η γραμμή της τάσης των ικών φορτίων παίρνοντας τα παρακάτω αποτελέσματα.



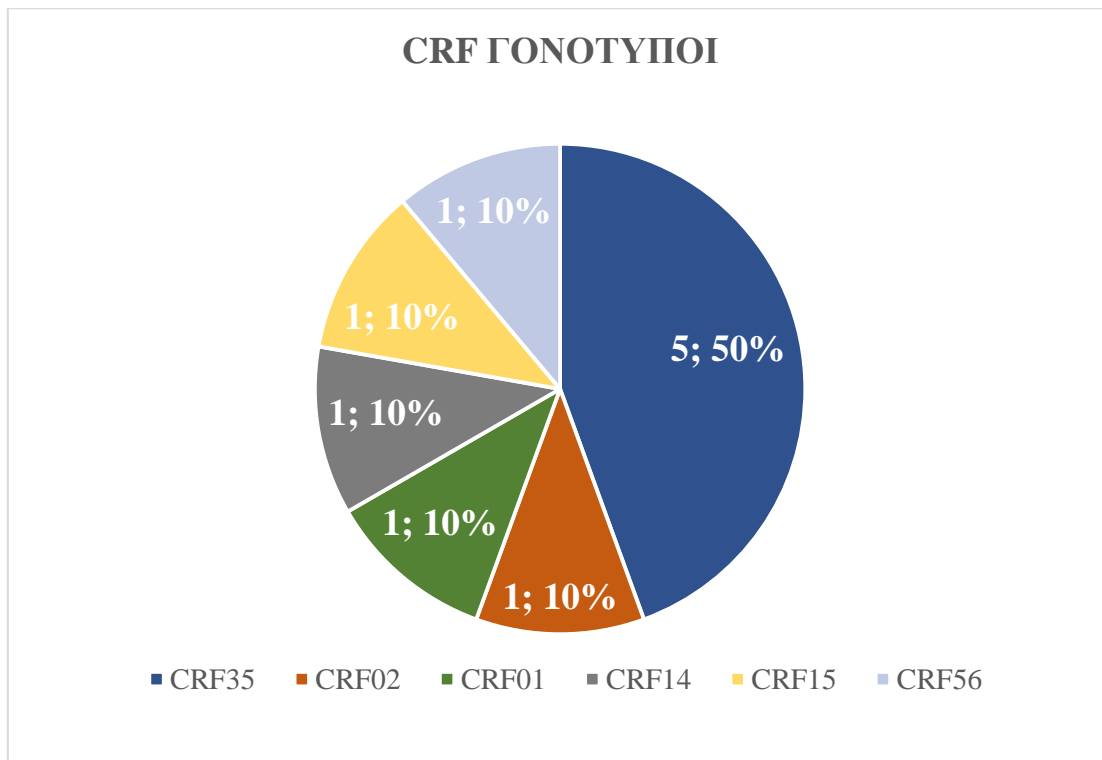
Πίνακας 4. Γράφημα διασποράς των ικών φορτίων με γραμμή τάσης.

Από την ανάλυση των αλληλουχιών της γονιδιακής περιοχής PR-RT αντλήθηκαν στοιχεία για την ταξινόμηση των δειγμάτων σε ομάδες γονοτύπων HIV. Στον Πίνακα 5 αναγράφονται οι διαφορετικοί γονότυποι που ανιχνεύθηκαν στα 30 δείγματα που αναλύθηκαν.



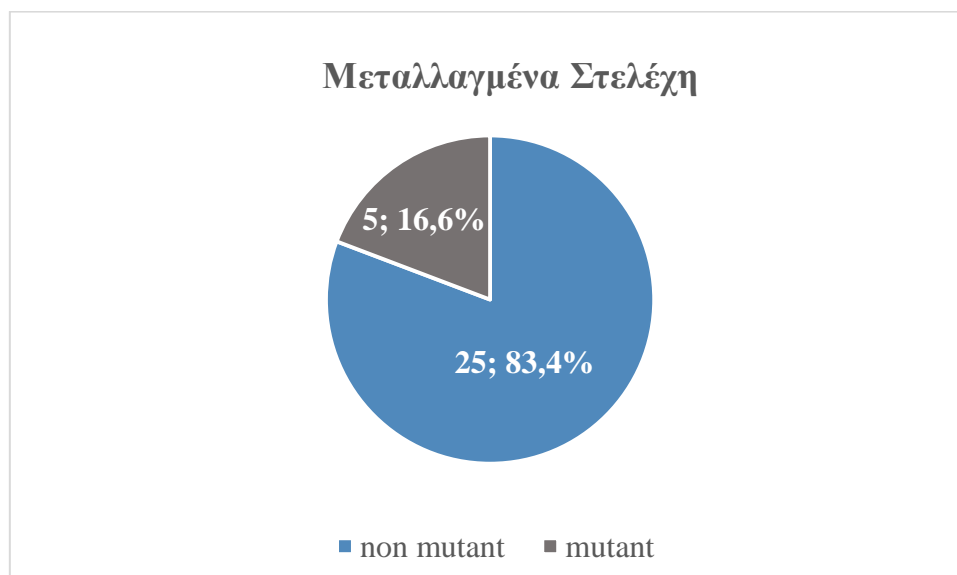
Πίνακας 5. Οι γονότυποι του HIV που παρατηρήθηκαν.

Οι ανασυνδυσμένες αλληλουχίες CRF που ανιχνεύθηκαν ταξινομήθηκαν περαιτέρω σε υποκατηγορίες όπως φαίνεται και στον Πίνακα 6 που ακολουθεί.

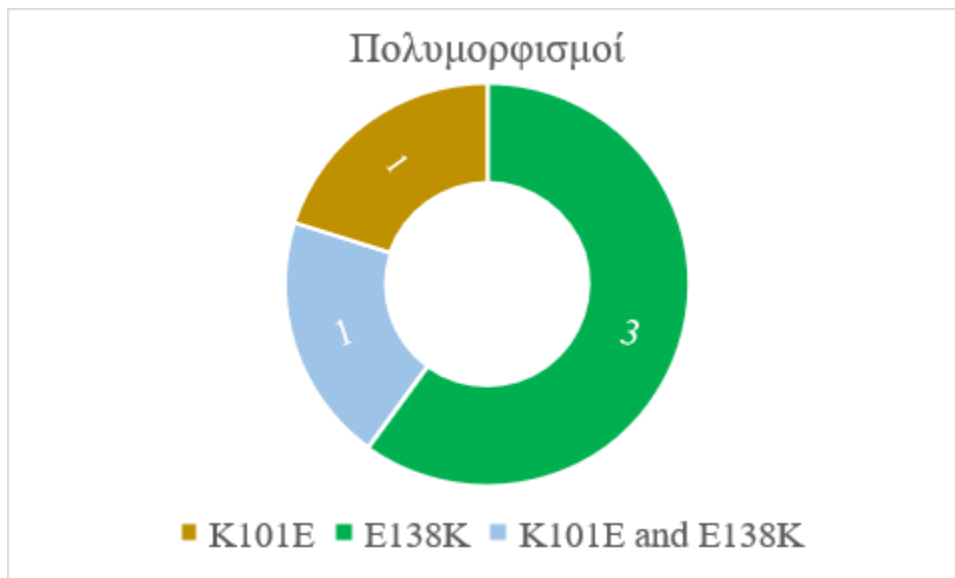


Πίνακας 6. Οι υποκατηγορίες ανασυνδυασμένων γονοτύπων CRF.

Τέλος, πραγματοποιήθηκε ανάλυση των νουκλεοτιδικών πολυμορφισμών των γονιδιακών περιοχών PR-RT αλλά και της INT με σκοπό την ανίχνευση μεταλλάξεων που προσδίδουν αντοχή στα γνωστά αντιρετροϊκά φάρμακα. Από τα 30 δείγματα που μελετήθηκαν, τα 5 εμφάνισαν τουλάχιστον έναν πολυμορφισμό ενδιαφέροντος (Πίνακες 7 και 8).



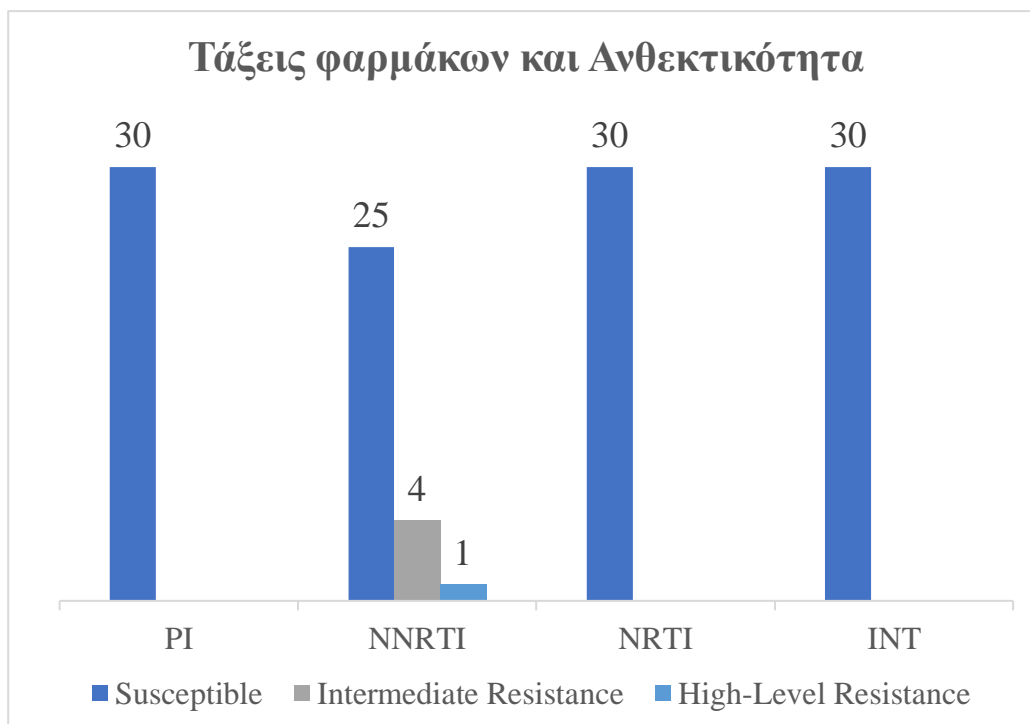
Πίνακας 7. Το 16,6% των αλληλουχιών που αναλύθηκε βρέθηκε να φέρει πολυμορφισμούς που σχετίζονται με αντοχές στα αντιρετροϊκά φάρμακα.



Πίνακας 8. Οι πολυμορφισμοί που ανιχνεύτηκαν στα δείγματα που αναλύθηκαν.

Οι παραπάνω πολυμορφισμοί σχετίζονται με αντοχές στα φάρμακα της κατηγορίας των NNRTIs όπως φαίνεται και στο γράφημα που ακολουθεί (Πίνακας 9). Η αντοχή στα αντιρετροϊκά φάρμακα ταξινομείται με τον εξής τρόπο:

- R: Ισχυρή αντοχή ή στη διαδικασία ανάπτυξης ισχυρής αντοχής (High-Level Resistance)
- I: Ενδιάμεση αντοχή. (Intermediate Resistance)
- S: Ευαισθησία (Susceptible)



Πίνακας 9. Στον πίνακα παρουσιάζονται οι διάφορες τάξεις φαρμάκων καθώς και τα επίπεδα αντοχής που βρέθηκαν να έχουν τα δείγματα που εξετάστηκαν.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1 Αρχικό ιικό φορτίο HIV-1

Το αρχικό ιικό φορτίο σε άτομα που διαγιγνώσκονται πρόσφατα με HIV φαίνεται πως ποικίλλει ευρέως και επηρεάζεται από πληθώρα παραγόντων όπως το στάδιο της λοίμωξης στο οποίο βρίσκεται το άτομο που εξετάζεται, η φυσιολογική του ικανότητα ανοσολογικής απόκρισης κ.α.. Είναι λοιπόν γεγονός πως δεν φαίνεται να υπάρχει συχνότερα παρατηρούμενο αρχικό ιικό φορτίο καθώς αυτό μπορεί να κυμαίνεται από πολύ χαμηλά έως πολύ υψηλά επίπεδα. Η ταξινόμηση των μετρήσεων σε υψηλά, ενδιάμεσα ή χαμηλά επίπεδα ιικού φορτίου γίνεται κατά μέσο όρο ως εξής:

1. Υψηλές τιμές αρχικού ιικού φορτίου: Στα άτομα που παρουσιάζεται υψηλό αρχικό ιικό φορτίο, συνήθως ανιχνεύονται από δεκάδες χιλιάδες έως και εκατομμύρια αντίγραφα ιικού γονιδιώματος/ml πλάσματος. Αυτές οι τιμές παρατηρούνται συχνά σε άτομα με οξεία ή πρόσφατη λοίμωξη HIV ή σε άτομα που έχουν καθυστερήσει τη διάγνωση και κατ' επέκταση και την έναρξη της αντιρετροϊκής θεραπείας (ART). Τα υψηλά ιικά φορτία υποδηλώνουν υψηλότερο επίπεδο ιικού πολλαπλασιασμού και συνδέονται με ταχύτερη εξέλιξη της νόσου, εάν δεν αντιμετωπιστούν άμεσα με θεραπεία. Επιπλέον πολύ υψηλά αρχικά ιικά φορτία (>100.000 copies/ml) έχουν συσχετιστεί και με αυξημένο κίνδυνο αποτυχίας της ιικής καταστολής από την αντιρετροϊκή [81].
2. Ενδιάμεσες τιμές αρχικού ιικού φορτίου: Σε αυτή την κατηγορία συγκαταλέγονται μετρήσεις ιικού φορτίου που δεν ξεπερνούν τα μερικά χιλιάδες ή δεκάδες χιλιάδες αντίγραφα/ml. Η συγκεκριμένες τιμές συχνά αντικατοπτρίζουν είτε την πολύ έγκαιρη μέτρηση, πριν ακόμη την έναρξη της οξείας φάσης, είτε, συχνότερα, την χρόνια ασυμπτωματική φάση της λοίμωξης. Ο κίνδυνος μετάδοσης ελλοχεύει σε κάθε περίπτωση και η εξέλιξη της νόσου μπορεί να αποβεί μοιραία ακόμη και με ενδιάμεσα επίπεδα αρχικού ιικού φορτίου εάν δεν χορηγηθεί άμεσα HAART.
3. Χαμηλές τιμές αρχικού ιικού φορτίου: Σε ορισμένες περιπτώσεις, τα άτομα μπορεί να παρουσιάσουν χαμηλό αρχικό ιικό φορτίο, συνήθως κάτω από μερικές χιλιάδες αντίγραφα/ml. Ο ιικός πολλαπλασιασμός στα άτομα αυτά είναι σχετικά μειωμένος ίσως επειδή βρίσκονται σε κατάσταση μακροχρόνιας λοίμωξη HIV με αποτελεσματικό ανοσολογικό έλεγχο του ιού. Στην 3η αυτή κατηγορία μπορεί να συναντήσουμε και τις σπάνιες περιπτώσεις των Elite Controllers. Τα άτομα αυτά είναι ικανά να διατηρούν το ιικό τους φορτίο κάτω από τα επίπεδα ανίχνευσης ή ποσοτικοποίησης (συνηθέστερα λιγότερα από 40 αντίγραφα/ml) για παρατεταμένο χρονικό διάστημα, χωρίς να λαμβάνουν αντιρετροϊκή θεραπεία [82], [83].

Στην βιβλιογραφία υπάρχει μία πληθώρα ερευνητικών εργασιών στις οποίες μελετάται μεταξύ άλλων και το ιικό φορτίο των ατόμων που διαγνώσκονται θετικά στο HIV πριν την έναρξη της θεραπείας. Ενδεικτικά μερικές από τις μελέτες παρατίθενται παρακάτω. Σε μία μελέτη που δημοσιεύτηκε στο περιοδικό «HIV Medicine» το 2016 αντλήθηκαν στοιχεία από συνολικά 356 άτομα, 135 από τα οποία διαγνώστηκαν θετικά στον HIV το χρονικό διάστημα 1996–2001, ενώ τα υπόλοιπα 221 διαγνώστηκαν από το 2001 έως το 2009. Οι συνολικές μετρήσεις των ικών φορτίων των ατόμων αυτών πριν την έναρξη θεραπείας έδειξαν ότι η μέση τιμή των ικών αντιγράφων ανά ml ήταν από 4,5 log₁₀ έως 5,7 log₁₀ (31.622 - 501.187 αντίγραφα) [84]. Μία μελέτη των Mellors et al., που δημοσιεύτηκε στο Science συμπεριέλαβε 209 άτομα που ζούσαν με τον ιό του HIV. Μεταξύ άλλων στην μελέτη αυτή εξετάστηκαν και οι τιμές των αρχικών ικών τους φορτίων οι οποίες ήταν κανονικά κατανομημένες σε ένα εύρος τιμών από 500 (2,7 log₁₀) έως 294.200 (5,5 log₁₀) αντίγραφα ανά ml [85]. Ακόμα, στην μελέτη των Laurent Hocquelou et al., στους 307 ανθρώπους που συμπεριέλαβαν οι μετρήσεις έδειξαν πως τα ικά τους φορτία πριν την έναρξη θεραπείας κυμαίνονταν στα 3.162 με 199.526 (3,5 log₁₀ – 5,3 log₁₀) με διάμεση τιμή τα 31.622 (median 4,5 log₁₀) [86]. Σε μία πιο πρόσφατη μελέτη στην Κίνα, από τα 758 άτομα που εξετάστηκαν, οι 499 (65,8%) έφεραν αρχικό ικό φορτίο < 100.000 copies/ml (2 log₁₀), 211 (27,8%) ανήκαν στο εύρος των ≥ 100.000 και < 500.000 (5,7 log₁₀) copies/ml ενώ μόλις 48 άτομα (6,3%) είχαν ικό φορτίο μεγαλύτερο των 500.000 copies/ml [87]. Η διάμεση τιμή των ικών αντιγράφων των 139 ατόμων που μελετήθηκαν από τους Kronfli et al., ήταν τα 1970 copies/ml (3,3 log₁₀) [88]. Σε μία διαφορετική μελέτη από τους Joseph A Delaney, εξετάστηκε μία ποικιλία παραγόντων που οδηγούν σε μυοκαρδιακά εμφράγματα τα άτομα που ζουν με τον ιό του HIV. Μεταξύ άλλων συσχετίστηκε και αρνητικά το υψηλό αρχικό ικό φορτίο πριν την έναρξη της θεραπείας. Στα 11.324 άτομα που συμπεριλήφθηκαν στην μελέτη η διάμεση τιμή του ικού φορτίου ήταν τα 37.053 copies/ml (4,56 log₁₀) [89]. Σε συνολικά 134 άτομα από την Αργεντινή, στην μελέτη των M Eugenia Socías το ικό φορτίο πριν την έναρξη θεραπείας ήταν περί τα 74.131 copies/ml (4,87 log₁₀) [90]. Τέλος, στο Ενωμένο Βασίλειο το 2018 πραγματοποιήθηκε μία μελέτη με 104 συμμετέχοντες η οποία στόχευε στην μελέτη παραγόντων που σχετίζονται με την συνεχή ανίχνευση του HIV-1 RNA στο πλάσμα κατά τη διάρκεια της μακροχρόνιας συνεχούς κατασταλτικής αντιρετροϊκής θεραπείας πρώτης γραμμής. Από τα αποτελέσματα, αντλούμε την πληροφορία πως το αρχικό ικό φορτίο των 104 αυτών ατόμων είχε διάμεση τιμή τα 79.432 copies/ml (4,9 log₁₀) [91].

Όλες οι προαναφερθείσες μελέτες αφορούσαν σε άτομα που ζουν με τον ιό του HIV από όλες τις ομάδες υψηλού κινδύνου. Ειδικά για τους Χρήστες Ενδοφλεβίων Ναρκωτικών, μία μεγάλη μελέτη 922 ατόμων από τον Καναδά, αποκάλυψε ότι η διάμεση τιμή του αρχικού ικού φορτίου

τους ήταν τα 50.118 copies/ml (4,7 log₁₀) [92]. Σε μία ακόμη μελέτη, οι Walsh et al., συγκέντρωσαν 93 μετρήσεις αρχικού ιικού φορτίου από άτομα που κάνουν χρήση ενδοφλεβίων ναρκωτικών στην Αυστραλία καταλήγοντας σε μία διάμεση τιμή των 27.150 copies/ml (4,43 log₁₀) [93]. Επιπλέον, ανάμεσα στους 292 HIV-θετικούς ανθρώπους που κάνουν χρήση ενδοφλεβίων ναρκωτικών στο Βιετνάμ, η διάμεση τιμή των αρχικών ιικών τους φορτίων ήταν τα 61.200 copies/ml (4,78 log₁₀) [94]. Στην Ελλάδα, λόγω του έντονου επιδημιολογικού ενδιαφέροντος γύρω από την ομάδα των XEN έχουν διεξαχθεί πολλαπλές μελέτες. Χαρακτηριστικά αναφέρονται οι μελέτες ΑΡΙΣΤΟΤΕΛΗΣ για την Αθήνα [95] και η μελέτη ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ στην Θεσσαλονίκη [96] όπου συνολικά συμπεριλήφθηκαν 2329 άτομα έως και τον Απρίλιο του 2021. Τα προγράμματα αυτά περιλαμβάνουν τόσο τεστ εξέτασης για τον HIV αλλά και για άλλες λοιμώξεις που συναντώνται συχνότερα μεταξύ των χρηστών, όπως η Ηπατίτιδα C, όσο και υπηρεσίες συμβουλευτικής, εισαγωγής στα μητρώα θεραπείας κλπ. Μία μικρότερης έκτασης μελέτη, η TRIP, συμπεριέλαβε 45 άτομα που διαγνώστηκαν θετικά στον ιό του HIV και ανήκαν στην κατηγορία των XEN. Σκοπός της ήταν η ανάδειξη διάφορων δικτύων μετάδοσης του HIV στις διάφορες κοινότητες χρηστών στην Αθήνα. Μεταξύ άλλων στην μελέτη συμπεριλήφθηκαν και οι μετρήσεις των αρχικών ιικών φορτίων των ατόμων αυτών όπου ως διάμεση τιμή αναδείχθηκαν τα 269.153 copies/ml (5,43 log₁₀) [97]. Η μελέτη αυτή ανέδειξε και τις υψηλότερες τιμές ιικών φορτίων σε σχέση με όσες περιεγράφηκαν παραπάνω. Στον Πίνακα που ακολουθεί συνοψίζονται τα ευρήματα των παραπάνω μελετών.

ΜΕΛΕΤΗ	ΑΝΤΙΓΡΑΦΑ ΙΙΚΟΥ ΦΟΡΤΙΟΥ (copies/ml)	ΑΝΤΙΓΡΑΦΑ ΙΙΚΟΥ ΦΟΡΤΙΟΥ (log₁₀)
ΟΛΕΣ ΟΙ ΟΜΑΔΕΣ ΥΨΗΛΟΥ ΚΙΝΔΥΝΟΥ		
1. McKinnon E et al., Determinants of residual viraemia during combination HIV treatment: Impacts of baseline HIV RNA levels and treatment choice., HIV Medicine 2016, Volume 17(7) 495-504 [84].	31.622-501.187	4,5 - 5,7
2. Mellors J et al., Prognosis in HIV-1 Infection Predicted by the Quantity of Virus in Plasma, SCIENCE 1996, Volume 272 [85].	500-294.200	2,7-5,5
3. Hocqueloux L. et al., Long-term antiretroviral therapy initiated during primary HIV-1 infection is key to achieving both low HIV	median 31.622	median 4,5

reservoirs and normal T cell counts. J Antimicrob Chemother. 2013, Volume 68 [86].		
4. Chen S. et al., Very high baseline HIV viremia impairs efficacy of non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor-based ART: A long-term observation in treatment-naïve patients. Infectious Diseases of Poverty 2020, Volume 9(1) [87].	<ul style="list-style-type: none"> • <100.000 (65,8%) • ≥100.000 και <500.000 (27,8%) • ≥500.000 (6,3%) 	<ul style="list-style-type: none"> • 2 (65,8%) • 2 < ≥5,7 (27,8%) • > 5,7 (6,3%)
5. Kronfli N. et al., Delayed linkage to HIV care among asylum seekers in Quebec, Canada, BMC Public Health 2019, Volume 19(1) [88].	median 1970	median 3,3
6. Delaney J. et al., Cumulative Human Immunodeficiency Viremia, Antiretroviral Therapy, and Incident Myocardial Infarction, Epidemiology 2019, Volume 30(1) [89].	median 37.053	median 4,56
7. Socías M. et al., Acute retroviral syndrome and high baseline viral load are predictors of rapid HIV progression among untreated Argentinean seroconverters, Journal of the International AIDS Society 2011 Volume 14(1) [90].	median 74.131	median 4,87
8. Ruggiero A. et al., Factors associated with persistence of plasma HIV-1 RNA during long-term continuously suppressive firstline antiretroviral therapy, Open Forum Infectious Diseases 2018, Volume 5(2) [91].	median 79.432	median 4,9
ΧΡΗΣΤΕΣ ΕΝΔΟΦΛΕΒΙΩΝ ΝΑΡΚΩΤΙΚΩΝ		
1. Loh J. et al., Longer duration of homelessness is associated with a lower likelihood of non-detectable plasma HIV-1 RNA viral load among people who use illicit drugs in a Canadian setting, AIDS Care - Psychological and Socio-Medical Aspects of AIDS/HIV 2016, Volume 28(11) [92].	median 50.118	median 4,7
2. Walsh N. et al., HIV treatment outcomes among people who inject drugs in Victoria, Australia, BMC Infectious Diseases 2014, Volume 14(1) [93].	median 27.150	median 4,43
3. Nguyen H. et al., A prospective "test-and-treat" demonstration project among people who inject drugs in Vietnam, Journal of the International AIDS Society 2018, Volume 21 [94].	median 61.200	median 4,78

ΧΡΗΣΤΕΣ ΕΝΔΟΦΛΕΒΙΩΝ ΝΑΡΚΩΤΙΚΩΝ ΣΤΗΝ ΕΛΛΑΔΑ

Psichogiou M. et al., Identifying, linking, and treating people who inject drugs and were recently infected with HIV in the context of a network-based intervention, AIDS Care - Psychological and Socio-Medical Aspects of AIDS/HIV 2019, Volume 31 [97].	median 269.153	median 5,43
--	----------------	-------------

Πίνακας 10. Συνοπτικός πίνακας των μελετών που συμπεριλήφθηκαν στην παράγραφο.

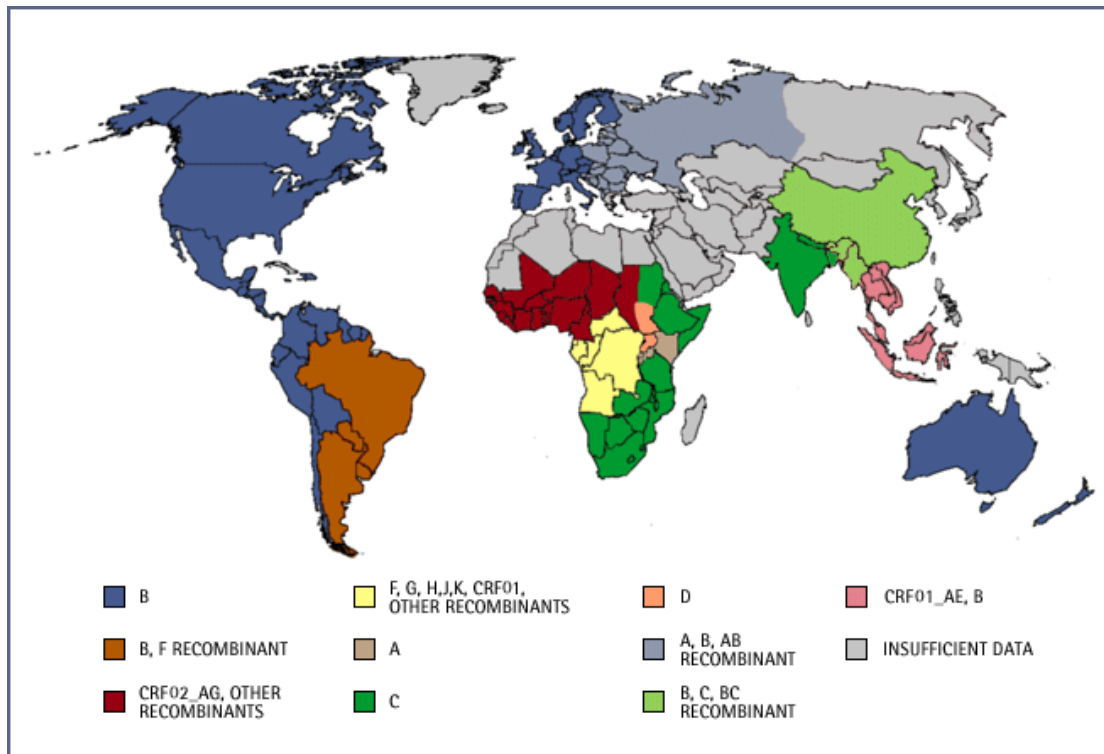
Το αρχικό HIV-1 RNA μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως βιοδείκτης με πολλαπλές εφαρμογές όπως έχει ήδη αναπτυχθεί παραπάνω. Ως προς την πρόβλεψη της επιτυχίας της αντιρετροϊκής θεραπείας σε XEN, σε μία μελέτη τους οι Huong Thi Duong et al., παρατήρησαν πως περίπου το 40% όσων είχαν αρχικά διαγνωστεί με αρχικό HIV-1 RNA >1000 αντίγραφα/mL προβλέπεται να επιτύχουν μακροχρόνια ικκή καταστολή με την συνεχή λήψη και συμμόρφωση στην αντιρετροϊκή θεραπεία [98].

Όπως γίνεται εμφανές από τις παραπάνω μελέτες οι Χρήστες Ενδοφλεβίων Ναρκωτικών σε σύγκριση με τα υπόλοιπα άτομα που ζουν με τον ιό του HIV δεν φαίνεται να εμφανίζουν σημαντικά υψηλότερα αρχικά ικά φορτία. Τα αρχικά HIV-1 RNA φαίνεται πως κυμαίνονται μεταξύ μερικών δεκάδων χιλιάδων και εκατοντάδων χιλιάδων αντιγράφων ανά ml πλάσματος γεγονός που τα κατατάσσει στην κατηγορία των υψηλών τιμών αρχικού ικού φορτίου. Στα πλαίσια αυτά και σύμφωνα με τα όσα αναφέρει και η διεθνής βιβλιογραφία κυμαίνονται και τα αποτελέσματα της παρούσας διπλωματικής (διάμεσο αρχικό ικό φορτίο 61.600 copies/ml, 4,79 log₁₀). Αξίζει να σημειωθεί πως οι μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν σε Έλληνες χρήστες ενδοφλεβίων ναρκωτικών στην μελέτη των Psichogiou M. et al., ήταν οι υψηλότερες σε σύγκριση με τις υπόλοιπες.

4.2 Γονότυπος και Μεταλλάξεις Αντοχής

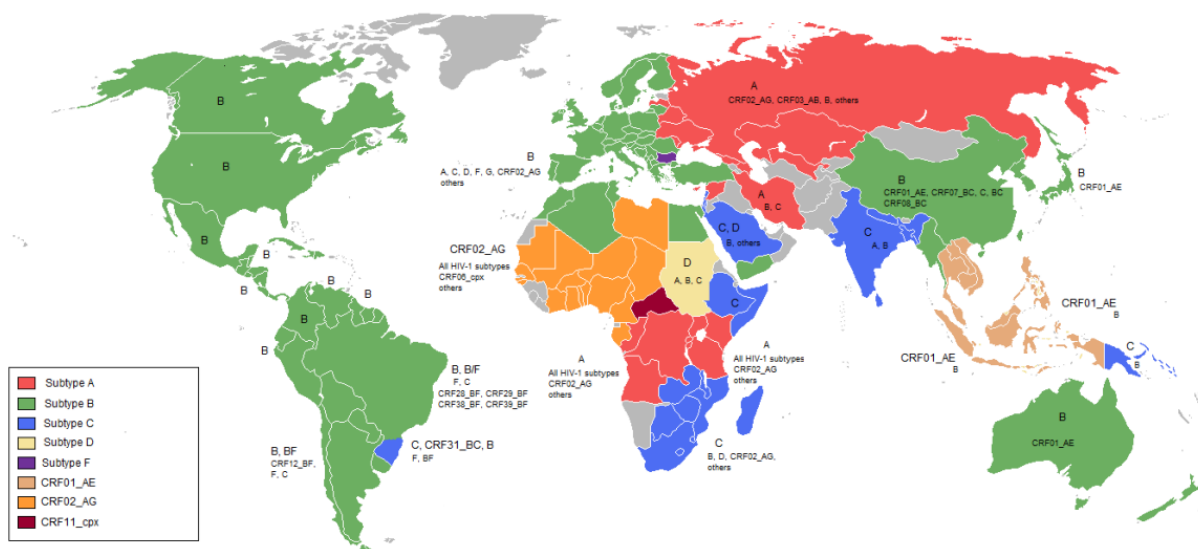
Σύμφωνα με διάφορες μελέτες, συμπεριλαμβανομένων των Thomson et al. [99] και Hemelaar et al. [100], ο πιο κοινός γονότυπος του HIV-1 στην Ευρώπη είναι ο υποτύπος B. Πιο αναλυτικά, το 2002 ο Thomson et al. διεξήγαγε μια ανασκόπηση της μοριακής επιδημιολογίας του HIV-1, εξετάζοντας την κατανομή των γονότυπων παγκοσμίως. Στα αποτελέσματά τους σημείωσαν πως υποτύπος B ήταν ιδιαίτερα διαδεδομένος στη Δυτική και Κεντρική Ευρώπη. Λίγα χρόνια μετά, το 2004, ο Hemelaar et al. (2006) με την ερευνητική του ομάδα ανέλυσαν την παγκόσμια κατανομή των γενετικών υποτύπων και των ανασυνδυασμένων γονοτύπων του HIV-1. Τα ευρήματά τους ανέδειξαν επίσης τον υπότυπο B ως τον κυρίαρχο υποτύπο στη Δυτική και Κεντρική Ευρώπη κατά τη διάρκεια της περιόδου διεξαγωγής της μελέτης τους. Αντίστοιχες εργασίες που αφορούσαν

στην παγκόσμια κατανομή των γονοτύπων του HIV τα έτη εκείνα απέδιδαν εικόνες σαν τον Άτλα που ακολουθεί.

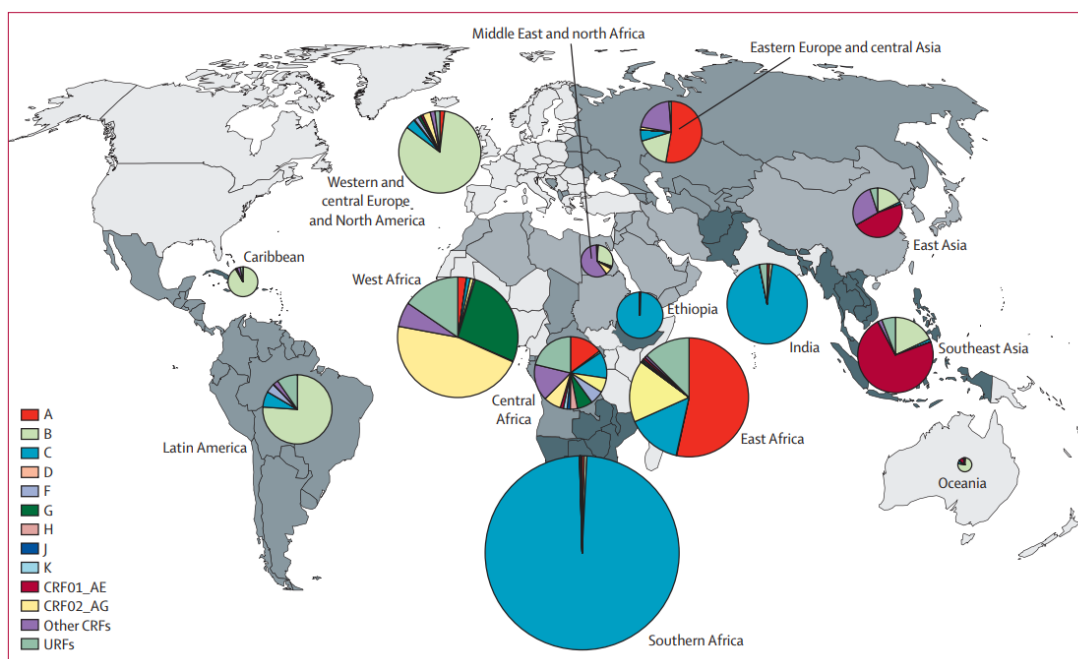


Εικόνα 12. Ο χάρτης συνοψίζει την παγκόσμια κατανομή των στελεχών HIV-1 το 2003 [101].

Ωστόσο, είναι σημαντικό να τονιστεί ότι η επιδημία του HIV-1 είναι εξαιρετικά περίπλοκη σε μοριακό επίπεδο και ότι η κατανομή των γονοτύπων φαίνεται μερικώς να έχει αλλάξει από τότε που διεξήχθησαν αυτές οι μελέτες. Ο υποτύπος B ήταν ιστορικά κυρίαρχος σε πολλές ευρωπαϊκές χώρες, ιδιαίτερα στη Δυτική και Κεντρική Ευρώπη. Ωστόσο, η παρουσία άλλων υποτύπων και κυκλοφορούντων ανασυνδυασμένων μορφών (CRF) έχει επίσης αναφερθεί σε συγκεκριμένους πληθυσμούς εντός της Ευρώπης. Για παράδειγμα, έχουν διεξαχθεί πολλές μελέτες μέσα από τις οποίες αποκαλύπτεται η παρουσία ανασυνδυασμένων μορφών, όπως CRF01_AE και CRF02_AG, παράλληλα με τον υποτύπο B σε ορισμένους πληθυσμούς. Όπως φαίνεται και στις εικόνες που ακολουθούν, από το 2010 (Εικόνα 11) έως το 2015 (Εικόνα 12) η παρουσία των ανασυνδυασμένων υποτύπων έγινε ολοένα και πιο έντονη παγκοσμίως.



Εικόνα 13. Ο χάρτης συνοψίζει την παγκόσμια κατανομή των στελεχών HIV-1 το 2010 [102].



Εικόνα 14. Ο χάρτης συνοψίζει την παγκόσμια κατανομή των στελεχών HIV-1 το 2010-2015[103]

Οι πιο πρόσφατες μελέτες αποκαλύπτουν ολοένα και περισσότερους γονότυπους στις διάφορες περιοχές του κόσμου αλλά και της Ευρώπης. Οι Yebra et al., εστίασαν στην Ισπανία και ανακάλυψαν πως εκεί ο βασικός υπότυπος μεταξύ των ανδρών που κάνουν σεξ με άνδρες (MSM) ήταν ο B, ενώ ταυτόχρονα εντόπισαν μια αξιοσημείωτη επικράτηση της μεταδιδόμενης αντοχής στα φάρμακα στον ισπανικό πληθυσμό [104]. Πλέον, με τα μοριακά εργαλεία που διαθέτουμε, μας δίνεται η δυνατότητα να μελετούμε τις νέες μεταδόσεις του HIV μέσα από ομάδες γνωστές ως Molecular Transmission Clusters – MTCs. Σε μία μελέτη του 2019 χρησιμοποιήθηκε ένα

σύνολο δεδομένων από 8.955 αναλύσεις αλληλουχιών HIV-1 μεγάλης κλίμακας από εννέα Ευρωπαϊκές ομάδες κοορτής (και ελληνικής προέλευσης) και μία Καναδική. Σκοπός της μελέτης ήταν ο εντοπισμός πιθανών ομάδων MTC. Παρατήσαν λοιπόν πως ένα μεγάλο ποσοστό (>40%) των αλληλουχιών ταξινομήθηκε σε ομάδες MTC με εμφανή την διάδοση του υποτύπου B στα δίκτυα των MSM [105]. Τέτοιου είδους πληροφορίες είναι σημαντικές για το σχεδιασμό στρατηγικών πρόληψης και παρέμβασης στη δημόσια υγεία.

Στην Ελλάδα, διάφορες μελέτες αναδεικνύουν την παρουσία πληθώρας υποτύπων και ανασυνδυασμένων μορφών του HIV-1, με τον υποτύπο B να παραμένει αρκετά διαδεδομένος. Γίνονται επίσης αναφορές για τη μετάδοση ανθεκτικών στα φάρμακα στελεχών HIV-1 και την εισαγωγή μη-B υποτύπων μέσω της μετανάστευσης. Η εργασία των Limnaios et al., αποκάλυψε πως στα 3093 άτομα που ζουν με τον ιό του HIV-1 στην Ελλάδα και μελετήθηκαν, οι μισοί (1560, 50.4%) φέρουν γονότυπους B και οι υπόλοιποι 1533 (49.6%) φέρουν τον υπότυπο A1 [106]. Σε σύγκριση με τους υπόλοιπους πληθυσμούς, ο επιπολασμός των υποτύπων και των ανασυνδυασμένων μορφών του ιού HIV-1 στους Χρήστες Ενδοφλεβίων Ναρκωτικών στην Ελλάδα από το 1998 έως το 2009 ήταν παρόμοιος. Η επιδημική έξαρση που ξεκίνησε το 2010 στον πληθυσμό αυτό έφερε πολλές αλλαγές στα κυκλοφορούντα στελέχη με αποτέλεσμα ο επιπολασμός των κλάδων HIV-1 να διαφέρει σημαντικά μεταξύ των πληθυσμών των XEN. Συγκεκριμένα, περισσότεροι από τους μισούς (64,6%) των XEN κατά τα έτη 2010–2012 ταξινομήθηκαν ως CRF35_AD και CRF14_BG ενώ αυτοί οι υπότυποι δεν είχαν εντοπιστεί στον πληθυσμό στο παρελθόν (1998-2009) [107]. Στον Πίνακα που ακολουθεί παρουσιάζονται τα παραπάνω.

Subtypes (n, %)Populations	A	CRF35_AD	B	CRF14_BG	CRF02_AG	Others	Total	
Total sampled HIV-1 infected population (1998–2009)	572 (24.6%)	0	1,396 (60.0%)	0	44 (1.9%)	315 (13.5%)	2,327	
IDUs (1998–2009)	22 (28.9%)	0	43 (56.6%)	0	4 (5.3%)	7 (9.2%)	76	$p^1=$ 0.12
IDUs (2010–2012)	23 (11.2%)	58 (28.2%)	41 (19.9%)	75 (36.4%)	1 (0.5%)	8 (3.9%)	206	p $^2<0.001$

IDUs: Injecting Drug Users; CRF: Circulating Recombinant Forms (CRFs).

¹Comparison of the prevalence of subtypes and CRFs between the total sampled HIV-1 infected population (1998–2009) and the IDUs (1998–2009).

²Comparison of the prevalence of subtypes and CRFs between the IDUs sampled during 1998–2009 and 2010–2012.

Πίνακας 11. Ο επιπολασμός των υποτύπων του HIV-1 σε άτομα που κάνουν χρήση ενδοφλεβίων ουσιών στην Ελλάδα [107].

Τα ίδια συμπεράσματα διεξάγονται από αντίστοιχες μελέτες στην Ελλάδα, όπως αυτή της Kostaki E et al., όπου η φυλογενετική ανάλυση αποκάλυψε ότι η πλειονότητα 746 των

αλληλουχιών εμπίπτουν σε τέσσερις υπότυπους τοπικών δικτύων μετάδοσης: CRF14_BG (N=456, 58,3%), CRF35_AD (N=149, 19,1%), υποτύπος B (N=118, 15,1%) και A1 (N=59, 7,5%). Τα δεδομένα αυτά βρίσκονται σε συμφωνία τα όσα εντοπίστηκαν στην παρούσα διπλωματική εργασία καθώς ανιχνεύθηκαν τόσο γονότυποι A, G και CRF. Συγκεκριμένα ο CRF35 ήταν και σε αυτή την εργασία ένας από τους συχνότερα παρατηρούμενους μεταξύ των χρηστών στην Ελλάδα ακολουθούμενος από τους CRF14 και CRF02 [108].

Σχετικά με τις μεταλλάξεις K1013 και E138K που ανιχνεύθηκαν στα δείγματα που εξετάστηκαν στην παρούσα διπλωματική, οι οποίες προσδίδουν αντοχή στην κατηγορία των NNRTIs αντιρετροϊκών φαρμάκων πραγματοποιήθηκε αναζήτηση της βιβλιογραφίας για παρόμοιες μελέτες. Η συγκεκριμένη τάξη φαρμάκων συνδέεται άμεσα με την δράση του ενζύμου της αντίστροφης μεταγραφάσης αναστέλλοντας τη λειτουργία της αποκλείοντας το ενεργό της κέντρου αλλοστερικά. Η αντοχή στα NNRTIs προκύπτει κυρίως μέσω ειδικών μεταλλάξεων κοντά στο σημείο δέσμευσης της φαρμακευτικής ουσίας με το ένζυμο, οι οποίες οδηγούν σε αλλαγές της διαμόρφωσης στον χώρο μειώνοντας τη δέσμευση των αναστολέων NNRTI [109]. Οι συνήθεις μεταλλάξεις που σχετίζονται με την αντίσταση στα NNRTI περιλαμβάνουν τις K103N, Y181C και G190A. Ο επιπολασμός της μεταδιδόμενης αντοχής στα NNRTI ποικίλλει στις διάφορες γεωγραφικές περιοχές. Μελέτες έχουν δείξει ότι ο συνολικός επιπολασμός της μεταδιδόμενης αντοχής σε NNRTI κυμαίνεται από λιγότερο από 5% έως και πάνω από 15%, ανάλογα με τον πληθυσμό και την τοποθεσία [110]. Στην υποσαχάρια Αφρική έχουν αναφερθεί τα υψηλότερα ποσοστά της μεταδιδόμενης αντοχής σε NNRTI σε σύγκριση με άλλες περιοχές [111].

Μελέτες έχουν δείξει ότι ο επιπολασμός των μεταλλάξεων αντοχής στους NNRTI είναι υψηλότερος σε σύγκριση με άλλες κατηγορίες φαρμάκων, όπως οι νουκλεοσιδικοί αναστολείς της αντίστροφης μεταγραφάσης (NRTI) και οι αναστολείς πρωτεάσης (PI) [111], [112]. Οι νουκλεοσιδικοί αναστολείς της αντίστροφης μεταγραφάσης (NRTIs) αποτελούν ακρογωνιαίο λίθο της HAART και συνήθως περιλαμβάνονται στα σχήματα πρώτης γραμμής. Ενώ μπορεί να εμφανιστεί αντοχή στους NRTI, ο επιπολασμός των μεταλλάξεων είναι γενικά χαμηλότερος σε σύγκριση με τους NNRTI. Αυτό οφείλεται εν μέρει στον υψηλότερο γενετικό φραγμό που σχετίζεται με τους NRTI, γεγονός που σημαίνει ότι συνήθως απαιτούνται πολλαπλές μεταλλάξεις για την ανάπτυξη σημαντικής αντοχής [112]. Ακόμα υψηλότερο γενετικό φραγμό φαίνεται να έχουν οι αναστολείς πρωτεάσης (PIs). Κατά συνέπεια, ο επιπολασμός της πρωτογενούς αντοχής στα PIs είναι σχετικά χαμηλός. Ωστόσο, μπορεί να παρατηρηθεί επίκτητη αντίσταση στα PIs είτε λόγω μη βέλτιστης συμμόρφωσης είτε εξαιτίας άλλων παραγόντων που οδηγούν σε αποτυχία της θεραπείας [112]. Τέλος, αναφορικά με τους αναστολείς της ιντεγκράσης σε άτομα που είναι δεν

έχουν λάβει ακόμα στη θεραπεία, ο επιπολασμός είναι γενικά χαμηλός. Η ανασκόπηση και μετα-ανάλυση 119 μελετών των Tostevin A et al ανέφερε συνολικό επιπολασμό μεταλλάξεων αντοχής σε 0,2% (95% διάστημα εμπιστοσύνης: 0,1-0,3) του πληθυσμού [113]. Στο ίδιο χαμηλό ποσοστό κυμαίνονταν και οι παρατηρήσεις των Wensing AMJ et al. όπου μεταξύ των 3.109 συμμετεχόντων, μόνο 7 άτομα (0,2 %) έφεραν μεταλλάξεις αντοχής στους αναστολείς της ιντεγράσης [114].

Το 2017 στην Ελλάδα, η επιστημονική ομάδα των D. Paraskevis et al., στην έρευνα που διεξήγαγε παρατήρησε πως ο επιπολασμός των μεταλλάξεων αντοχής σε μη νουκλεοσιδικούς αναστολείς ανάστροφης μεταγραφάσης (NNRTI) ήταν 16,9% μεταξύ των ατόμων που δεν είχαν λάβει προηγουμένως θεραπεία. Στις αλληλουχίες που αναλύθηκαν οι κυρίαρχες μεταλλάξεις αντοχής βρέθηκαν να είναι οι E138A και K103N [115]. Τα αποτελέσματα αυτά βρίσκονται σε συμφωνία με τα ευρήματα της παρούσας διπλωματικής εργασίας.

Βιβλιογραφία

- [1] F. Barré-Sinoussi *et al.*, “Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS),” *Science (1979)*, vol. 220, no. 4599, 1983, doi: 10.1126/science.6189183.
- [2] P. M. Sharp and B. H. Hahn, “Origins of HIV and the AIDS pandemic,” *Cold Spring Harb Perspect Med*, vol. 1, no. 1, Sep. 2011, doi: 10.1101/cshperspect.a006841.
- [3] S. G. Deeks, J. Overbaugh, A. Phillips, and S. Buchbinder, “HIV infection,” *Nat Rev Dis Primers*, vol. 1, Oct. 2015, doi: 10.1038/nrdp.2015.35.
- [4] J. Coffin and R. Swanstrom, “HIV pathogenesis: Dynamics and genetics of viral populations and infected cells,” *Cold Spring Harb Perspect Med*, vol. 3, no. 1, 2013, doi: 10.1101/cshperspect.a012526.
- [5] M. E. Meissner, N. Talledge, and L. M. Mansky, “Molecular Biology and Diversification of Human Retroviruses,” *Frontiers in Virology*, vol. 2, Jun. 2022, doi: 10.3389/fviro.2022.872599.
- [6] E. Rossi, M. E. Meuser, C. J. Cunanan, and S. Cocklin, “Structure, function, and interactions of the hiv-1 capsid protein,” *Life*, vol. 11, no. 2. MDPI AG, pp. 1–25, Feb. 01, 2021. doi: 10.3390/life11020100.
- [7] E. Rossi, M. E. Meuser, C. J. Cunanan, and S. Cocklin, “Structure, function, and interactions of the hiv-1 capsid protein,” *Life*, vol. 11, no. 2. MDPI AG, pp. 1–25, Feb. 01, 2021. doi: 10.3390/life11020100.
- [8] “UNAIDS.” <https://www.unaids.org/en> (accessed Jun. 29, 2023).
- [9] “CDC / HIV.” <https://www.cdc.gov/hiv/default.html> (accessed Jun. 29, 2023).
- [10] “WHO / HIV - AIDS.” <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hiv-aids> (accessed Jun. 29, 2023).
- [11] C. Liu, K. Weber, E. Robison, Z. Hu, L. P. Jacobson, and S. J. Gange, “Assessing the effect of HAART on change in quality of life among HIV-infected women,” *AIDS Res Ther*, vol. 3, no. 1, Mar. 2006, doi: 10.1186/1742-6405-3-6.
- [12] A. J. Rodger *et al.*, “Risk of HIV transmission through condomless sex in serodifferent gay couples with the HIV-positive partner taking suppressive antiretroviral therapy (PARTNER): final results of a multicentre, prospective, observational study,” *The Lancet*, vol. 393, no. 10189, pp. 2428–2438, Jun. 2019, doi: 10.1016/S0140-6736(19)30418-0.
- [13] E. Rossi, M. E. Meuser, C. J. Cunanan, and S. Cocklin, “Structure, function, and interactions of the hiv-1 capsid protein,” *Life*, vol. 11, no. 2. MDPI AG, pp. 1–25, Feb. 01, 2021. doi: 10.3390/life11020100.
- [14] K. Qu *et al.*, “Maturation of the matrix and viral membrane of HIV-1,” 2021. [Online]. Available: <https://www.science.org>
- [15] V. Marie and M. L. Gordon, “The HIV-1 Gag Protein Displays Extensive Functional and Structural Roles in Virus Replication and Infectivity,” *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 23, no. 14. MDPI, Jul. 01, 2022. doi: 10.3390/ijms23147569.

- [16] E. M. Campbell and T. J. Hope, “Live cell imaging of the HIV-1 life cycle,” *Trends in Microbiology*, vol. 16, no. 12. pp. 580–587, Dec. 2008. doi: 10.1016/j.tim.2008.09.006.
- [17] J. L. Elliott and S. B. Kutluay, “Going beyond Integration: The Emerging Role of HIV-1 Integrase in Virion Morphogenesis,” *Viruses*, vol. 12, no. 9. MDPI AG, Sep. 01, 2020. doi: 10.3390/v12091005.
- [18] B. Chen, “Molecular Mechanism of HIV-1 Entry,” *Trends in Microbiology*, vol. 27, no. 10. Elsevier Ltd, pp. 878–891, Oct. 01, 2019. doi: 10.1016/j.tim.2019.06.002.
- [19] V. Scoca and F. Di Nunzio, “The HIV-1 capsid: From structural component to key factor for host nuclear invasion,” *Viruses*, vol. 13, no. 2. MDPI, Feb. 01, 2021. doi: 10.3390/v13020273.
- [20] E. Mailler, S. Bernacchi, R. Marquet, J. C. Paillart, V. Vivet-Boudou, and R. P. Smyth, “The life-cycle of the HIV-1 gag–RNA complex,” *Viruses*, vol. 8, no. 9. MDPI AG, Sep. 10, 2016. doi: 10.3390/v8090248.
- [21] L. Chavez, V. Calvanese, and E. Verdin, “HIV Latency Is Established Directly and Early in Both Resting and Activated Primary CD4 T Cells,” *PLoS Pathog*, vol. 11, no. 6, Jun. 2015, doi: 10.1371/journal.ppat.1004955.
- [22] R. D. von L. J. O. WA. Ferguson MR, “HIV-1 replication cycle,” *Clin Lab Med.*, vol. 22, no. 3, pp. 611–635, Sep. 2002.
- [23] S. L. Manoto, M. Lugongolo, U. Govender, and P. Mthunzi-Kufa, “Point of care diagnostics for HIV in resource limited settings: An overview,” *Medicina (Lithuania)*, vol. 54, no. 1. MDPI AG, Mar. 01, 2018. doi: 10.3390/medicina54010003.
- [24] E. O. Freed, “HIV-1 assembly, release and maturation,” *Nature Reviews Microbiology*, vol. 13, no. 8. Nature Publishing Group, pp. 484–496, Jul. 16, 2015. doi: 10.1038/nrmicro3490.
- [25] W. I. Sundquist and H. G. Kräusslich, “HIV-1 assembly, budding, and maturation,” *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, vol. 2, no. 7. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012. doi: 10.1101/cshperspect.a006924.
- [26] UNAIDS, “Executive summary — In Danger: UNAIDS Global AIDS Update 2022,” Jul. 2022.
- [27] WHO, “Key facts HIV - 2021 .”
- [28] ΕΟΔΥ, “Επιδημιολογική Επιτήρηση HIV/AIDS στην Ελλάδα,” Αθήνα, 2022.
- [29] Κ. Μ. Ανδρουτσοπούλου Μ., “Ανίχνευση & Εργαστηριακή Παρακολούθηση της HIV-1 Λοίμωξης,” Αθήνα, 2022.
- [30] HIV.gov, “Is the Risk of HIV Different for Different Groups?,” 2022.
- [31] ΚΕΕΛΠΝΟ, “Επιδημιολογική Επιτήρηση HIV/AIDS στην Ελλάδα,” Αθήνα, 2011.
- [32] ΚΕΕΛΠΝΟ, “Επιδημιολογική Επιτήρηση HIV/AIDS στην Ελλάδα,” Αθήνα, 2012.
- [33] G. K. Nikolopoulos, E. G. Kostaki, and D. Paraskevis, “Overview of HIV molecular epidemiology among people who inject drugs in Europe and Asia,” *Infection, Genetics*

- and Evolution*, vol. 46. Elsevier B.V., pp. 256–268, Dec. 01, 2016. doi: 10.1016/j.meegid.2016.06.017.
- [34] A. Hatzakis *et al.*, “Design and baseline findings of a large-scale rapid response to an HIV outbreak in people who inject drugs in Athens, Greece: The ARISTOTLE programme,” *Addiction*, vol. 110, no. 9, pp. 1453–1467, Sep. 2015, doi: 10.1111/add.12999.
- [35] M. A. Tsang *et al.*, “Network characteristics of people who inject drugs within a new HIV epidemic following austerity in Athens, Greece,” *J Acquir Immune Defic Syndr (1988)*, vol. 69, no. 4, pp. 499–508, 2015, doi: 10.1097/QAI.0000000000000665.
- [36] G. K. Nikolopoulos *et al.*, “Big events in Greece and HIV infection among people who inject drugs,” *Subst Use Misuse*, vol. 50, no. 7, pp. 825–838, Jun. 2015, doi: 10.3109/10826084.2015.978659.
- [37] ΚΕΕΛΠΙΝΟ, “Επιδημιολογική Επιτήρηση HIV/AIDS στην Ελλάδα,” Αθήνα, 2014.
- [38] ΚΕΕΛΠΙΝΟ, “Επιδημιολογική Επιτήρηση HIV/AIDS στην Ελλάδα,” Αθήνα, 2015.
- [39] ΚΕΕΛΠΙΝΟ, “Επιδημιολογική Επιτήρηση HIV/AIDS στην Ελλάδα,” Αθήνα, 2016.
- [40] “Global AIDS Strategy 2021-2026 - End Inequalities. End AIDS. .”
- [41] WHO, “Consolidated guidelines on HIV prevention, testing, treatment, service delivery and monitoring: recommendations for a public health approach,” Jul. 16, 2021.
- [42] Ecdc, “Public health guidance on HIV, hepatitis B and C testing in the EU/EEA – An integrated approach,” 2018, doi: 10.2900/79127.
- [43] ΕΟΔΥ, “ΚΑΤΕΥΘΥΝΤΗΡΙΕΣ ΟΔΗΓΙΕΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΤΗΣ HIV ΛΟΙΜΩΞΗΣ ΣΕ ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΔΟΜΕΣ ΚΑΙ ΣΤΗΝ ΚΟΙΝΟΤΗΤΑ,” 2022.
- [44] B. S. Parekh *et al.*, “Diagnosis of human immunodeficiency virus infection,” *Clinical Microbiology Reviews*, vol. 32, no. 1. American Society for Microbiology, Jan. 01, 2019. doi: 10.1128/CMR.00064-18.
- [45] WHO, “WHO RECOMMENDS HIV SELF-TESTING-EVIDENCE UPDATE AND CONSIDERATIONS FOR SUCCESS POLICY BRIEF,” 2019.
- [46] Μήνα Ψυχογιού, “HIV Επιδημιολογία.” 2022.
- [47] H. M. Naif, “Pathogenesis of HIV infection,” *Infect Dis Rep*, vol. 5, no. SUPPL.1, pp. 26–30, 2013, doi: 10.4081/idr.2013.s1.e6.
- [48] S. Croxford *et al.*, “Mortality and causes of death in people diagnosed with HIV in the era of highly active antiretroviral therapy compared with the general population: an analysis of a national observational cohort,” *Lancet Public Health*, vol. 2, no. 1, pp. e35–e46, Jan. 2017, doi: 10.1016/S2468-2667(16)30020-2.
- [49] M. May *et al.*, “Impact of late diagnosis and treatment on life expectancy in people with HIV-1: UK Collaborative HIV Cohort (UK CHIC) Study,” *BMJ (Online)*, vol. 343, no. 7829, Oct. 2011, doi: 10.1136/bmj.d6016.
- [50] Cepheid, “Xpert® HIV-1 Viral Load,” 2017. Accessed: Jul. 02, 2023. [Online]. Available: <https://www.cepheid.com/en-US.html>

- [51] J. W. Hargrove *et al.*, “Improved HIV-1 incidence estimates using the BED capture enzyme immunoassay,” *AIDS*, vol. 22, pp. 511–518, 2008, [Online]. Available: <http://journals.lww.com/aidsonline>
- [52] C. D. Pilcher *et al.*, “Amplified transmission of HIV-1: comparison of HIV-1 concentrations in semen and blood during acute and chronic infection,” *AIDS*, vol. 12, no. 13, 2007, [Online]. Available: <http://journals.lww.com/aidsonline>
- [53] M. S. Cohen *et al.*, “Antiretroviral Therapy for the Prevention of HIV-1 Transmission,” *New England Journal of Medicine*, vol. 375, no. 9, pp. 830–839, Sep. 2016, doi: 10.1056/nejmoa1600693.
- [54] HIVinfo.NIH.gov, “What to Start: Choosing an HIV Treatment Regimen,” 2021.
- [55] CDC, “HIV Treatment, Care, and Viral Suppression,” 2023.
- [56] J. W. Mellors *et al.*, “Plasma Viral Load and CD4 + Lymphocytes as Prognostic Markers of HIV-1 Infection,” 1997. [Online]. Available: <http://annals.org/>
- [57] C. D. Pilcher, J. J. Eron, S. Galvin, C. Gay, and M. S. Cohen, “Acute HIV revisited: new opportunities for treatment and prevention,” *Journal of Clinical Investigation*, vol. 113, no. 7, pp. 937–945, Apr. 2004, doi: 10.1172/jci200421540.
- [58] M. S. Cohen *et al.*, “Prevention of HIV-1 Infection with Early Antiretroviral Therapy,” *New England Journal of Medicine*, vol. 365, no. 6, pp. 493–505, Aug. 2011, doi: 10.1056/nejmoa1105243.
- [59] M. D. , M. J. W. M. D. , N. S. M. B. , D. S. M. B. , C. L. M. D. , F. W.-M. PH. D. , M. O. M. B. S. , T. L. M. A. , A. R. H. G. M. D. , F. T. R. P. S. G. THOMAS C. QUINN, “VIRAL LOAD AND HETEROSEXUAL TRANSMISSION OF HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS TYPE 1,” *The New England Journal of Medicine* , vol. 342, no. 13, pp. 921–929, 2000.
- [60] F. Raffi *et al.*, “Impact of baseline plasma HIV-1 RNA and time to virological suppression on virological rebound according to first-line antiretroviral regimen,” *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, vol. 72, no. 12, pp. 3425–3434, Dec. 2017, doi: 10.1093/jac/dkx300.
- [61] P. K. Drain *et al.*, “Point-of-Care HIV Viral Load Testing: an Essential Tool for a Sustainable Global HIV/AIDS Response,” *Clin Microbiol Rev*, 2019, [Online]. Available: <https://doi.org/10>
- [62] F. Rouet *et al.*, “Comparison of the Generic HIV Viral Load® assay with the Amplicor™ HIV-1 Monitor v1.5 and Nuclisens HIV-1 EasyQ® v1.2 techniques for plasma HIV-1 RNA quantitation of non-B subtypes: The Kesho Bora preparatory study,” *J Virol Methods*, vol. 163, no. 2, pp. 253–257, Feb. 2010, doi: 10.1016/j.jviromet.2009.10.005.
- [63] K. Sauné, S. Raymond, J. Boineau, C. Pasquier, and J. Izopet, “Detection and quantification of HIV-1 RNA with a fully automated transcription-mediated-amplification assay,” *Journal of Clinical Virology*, vol. 84, pp. 70–73, Nov. 2016, doi: 10.1016/j.jcv.2016.09.002.
- [64] M. C. Strain *et al.*, “Highly Precise Measurement of HIV DNA by Droplet Digital PCR,” *PLoS One*, vol. 8, no. 4, Apr. 2013, doi: 10.1371/journal.pone.0055943.

- [65] J. A. G. et al. Hemelaar, “Global and regional molecular epidemiology of HIV-1, 1990–2015: a systematic review, global survey, and trend analysis,” *Lancet Infect Dis*, vol. 19, no. 2, pp. 143–155, 2019.
- [66] T. , K. B. , N. A. et al. Zhu, “An African HIV-1 sequence from 1959 and implications for the origin of the epidemic.,” *Nature* , vol. 391, pp. 594–597, 1998.
- [67] S. Limnaios *et al.*, “Dating the Origin and Estimating the Transmission Rates of the Major HIV-1 Clusters in Greece: Evidence about the Earliest Subtype A1 Epidemic in Europe,” *Viruses*, vol. 14, no. 1, Jan. 2022, doi: 10.3390/v14010101.
- [68] V. A. Johnson *et al.*, “Update of the Drug Resistance Mutations in HIV-1: December 2008,” *International AIDS Society–USA Topics in HIV Medicine*, vol. 16, no. 5, pp. 138–145, 2008, [Online]. Available: www.iasusa.org
- [69] A. Gupta-Wright *et al.*, “Virological failure, HIV-1 drug resistance, and early mortality in adults admitted to hospital in Malawi: an observational cohort study,” *Lancet HIV*, vol. 7, no. 9, pp. e620–e628, Sep. 2020, doi: 10.1016/S2352-3018(20)30172-7.
- [70] WHO, “HIV drug resistance report 2019,” 2019.
- [71] J. O. Wertheim *et al.*, “The global transmission network of HIV-1,” *Journal of Infectious Diseases*, vol. 209, no. 2, pp. 304–313, Jan. 2014, doi: 10.1093/infdis/jit524.
- [72] D. Paraskevis *et al.*, “Transmission dynamics of HIV-1 drug resistance among treatment-naïve individuals in Greece: The added value of molecular epidemiology to public health,” *Genes (Basel)*, vol. 8, no. 11, Nov. 2017, doi: 10.3390/genes8110322.
- [73] M. , V. A.-M. , & L. P. Salemi, *The phylogenetic handbook: A practical approach to phylogenetic analysis and hypothesis testing.*, 2nd ed. Cambridge, UK: Cambridge University Press., 2009.
- [74] N. T. Parkin *et al.*, “Multi-laboratory comparison of next-generation to sanger-based sequencing for HIV-1 drug resistance genotyping,” *Viruses*, vol. 12, no. 7, Jul. 2020, doi: 10.3390/v12070694.
- [75] J. Z. Li *et al.*, “Comparison of illumina and 454 deep sequencing in participants failing raltegravir-based antiretroviral therapy,” *PLoS One*, vol. 9, no. 3, Mar. 2014, doi: 10.1371/journal.pone.0090485.
- [76] Stanford University, “HIV Drug Resistance Database.” <https://hivdb.stanford.edu/> (accessed Jul. 02, 2023).
- [77] WHO, “HIV drug resistance database”, Accessed: Jul. 02, 2023. [Online]. Available: <https://extranet.who.int/hivdrug-surveillance/>
- [78] Κασσάνδρα Πρόκτερ, “Ανάπτυξη in-house πειραματικού πρωτοκόλλου για την αλληλούχηση του γονιδίου της Ιντεγκράσης του Ιού HIV-1 και την ανίχνευση πολυμορφισμών που μπορεί να σχετίζονται και με την ανάπτυξη ανοχής σε αντιρετροϊκή θεραπεία,” Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής, Αθήνα, 2022.
- [79] Cepheid, “Cepheid.com.” <https://www.cepheid.com/en-US.html> (accessed Jul. 02, 2023).
- [80] Cepheid, “Cepheid GeneXpert System Brochure CE IVD”.

- [81] O. Mor *et al.*, “Evaluation of the real time HIV-1, xpert HIV-1, and aptima HIV-1 quant dx assays in comparison to the nucli sens EasyQ HIV-1 v2.0 assay for quantification of HIV-1 viral load,” *J Clin Microbiol*, vol. 53, no. 11, pp. 3458–3465, Nov. 2015, doi: 10.1128/JCM.01806-15.
- [82] J. R. Castillo-Mancilla *et al.*, “Suboptimal Adherence to Combination Antiretroviral Therapy Is Associated with Higher Levels of Inflammation despite HIV Suppression,” *Clinical Infectious Diseases*, vol. 63, no. 12, pp. 1661–1667, Dec. 2016, doi: 10.1093/cid/ciw650.
- [83] C. A. Hartana and X. G. Yu, “Immunological effector mechanisms in HIV-1 elite controllers,” *Current Opinion in HIV and AIDS*, vol. 16, no. 5. Lippincott Williams and Wilkins, pp. 243–248, Sep. 01, 2021. doi: 10.1097/COH.0000000000000693.
- [84] E. McKinnon, A. Castley, L. Payne, S. Pummer, and D. Nolan, “Determinants of residual viraemia during combination HIV treatment: Impacts of baseline HIV RNA levels and treatment choice,” *HIV Med*, vol. 17, no. 7, pp. 495–504, Aug. 2016, doi: 10.1111/hiv.12323.
- [85] J. W. Mellors, C. R. Rinaldo, P. Gupta, R. M. White, J. A. Todd, and L. A. Kingsley, “Prognosis in HIV-1 Infection Predicted by the Quantity of Virus in Plasma,” *Science (1979)*, vol. 272, 1996.
- [86] L. Hocqueloux *et al.*, “Long-term antiretroviral therapy initiated during primary HIV-1 infection is key to achieving both low HIV reservoirs and normal T cell counts,” *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, vol. 68, no. 5, pp. 1169–1178, May 2013, doi: 10.1093/jac/dks533.
- [87] S. Chen *et al.*, “Very high baseline HIV viremia impairs efficacy of non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor-based ART: A long-term observation in treatment-naïve patients,” *Infect Dis Poverty*, vol. 9, no. 1, Jun. 2020, doi: 10.1186/s40249-020-00700-8.
- [88] N. Kronfli *et al.*, “Delayed linkage to HIV care among asylum seekers in Quebec, Canada,” *BMC Public Health*, vol. 19, no. 1, Dec. 2019, doi: 10.1186/s12889-019-8052-y.
- [89] J. A. Delaney *et al.*, “Cumulative Human Immunodeficiency Viremia, Antiretroviral Therapy, and Incident Myocardial Infarction,” *Epidemiology*, vol. 30, no. 1, pp. 69–74, Jan. 2019, doi: 10.1097/EDE.0000000000000930.
- [90] M. E. Socías *et al.*, “Acute retroviral syndrome and high baseline viral load are predictors of rapid HIV progression among untreated Argentinean seroconverters,” *J Int AIDS Soc*, vol. 14, no. 1, 2011, doi: 10.1186/1758-2652-14-40.
- [91] A. Ruggiero *et al.*, “Factors associated with persistence of plasma HIV-1 RNA during long-term continuously suppressive firstline antiretroviral therapy,” *Open Forum Infect Dis*, vol. 5, no. 2, Feb. 2018, doi: 10.1093/ofid/ofy032.
- [92] J. Loh *et al.*, “Longer duration of homelessness is associated with a lower likelihood of non-detectable plasma HIV-1 RNA viral load among people who use illicit drugs in a Canadian setting,” *AIDS Care - Psychological and Socio-Medical Aspects of AIDS/HIV*, vol. 28, no. 11, pp. 1448–1454, Nov. 2016, doi: 10.1080/09540121.2016.1189498.
- [93] N. Walsh *et al.*, “HIV treatment outcomes among people who inject drugs in Victoria, Australia,” *BMC Infect Dis*, vol. 14, no. 1, Dec. 2014, doi: 10.1186/s12879-014-0707-9.

- [94] H. H. Nguyen *et al.*, “A prospective ‘test-and-treat’ demonstration project among people who inject drugs in Vietnam,” *J Int AIDS Soc*, vol. 21, 2018, doi: 10.1002/jia2.25151/full.
- [95] A. Hatzakis *et al.*, “Design and baseline findings of a large-scale rapid response to an HIV outbreak in people who inject drugs in Athens, Greece: The ARISTOTLE programme,” *Addiction*, vol. 110, no. 9, pp. 1453–1467, Sep. 2015, doi: 10.1111/add.12999.
- [96] V. Sypsa *et al.*, “A new outbreak of HIV infection among people who inject drugs during the COVID-19 pandemic in Greece,” *International Journal of Drug Policy*, vol. 117, Jul. 2023, doi: 10.1016/j.drugpo.2023.104073.
- [97] M. Psychogiou *et al.*, “Identifying, linking, and treating people who inject drugs and were recently infected with HIV in the context of a network-based intervention,” *AIDS Care - Psychological and Socio-Medical Aspects of AIDS/HIV*, vol. 31, no. 11, pp. 1376–1383, Nov. 2019, doi: 10.1080/09540121.2019.1601671.
- [98] H. T. Duong *et al.*, “A community-based intervention to decrease the prevalence of HIV viremia among people who inject drugs in Vietnam,” *Lancet Reg Health West Pac*, vol. 27, p. 100538, 2022, doi: 10.1016/j.
- [99] Michael M Thomson, Lucía Pérez-Álvarez, and Rafael Nájera, “Molecular epidemiology of HIV-1 genetic forms and its significance for vaccine development and therapy,” *THE LANCET Infectious Diseases*, vol. 2, pp. 461–471, Aug. 2002.
- [100] J. Hemelaar, E. Gouws, P. D. Ghys, and S. Osmanov, “Global and regional distribution of HIV-1 genetic subtypes and recombinants in 2004,” *AIDS*, vol. 20, no. 16, 2006, [Online]. Available: <http://journals.lww.com/aidsonline>
- [101] Francine E, McCutchan, and Henry M., “HIV-1 Global Gistribution.” Jackson Foundation, 2003. Accessed: Jul. 03, 2023. [Online]. Available: <https://www.pbs.org/wgbh/pages/frontline/aids/atlas/clade.html>
- [102] A. F. Santos and M. A. Soares, “HIV genetic diversity and drug resistance,” *Viruses*, vol. 2, no. 2. MDPI AG, pp. 503–531, 2010. doi: 10.3390/v2020503.
- [103] J. Hemelaar *et al.*, “Global and regional molecular epidemiology of HIV-1, 1990–2015: a systematic review, global survey, and trend analysis,” *Lancet Infect Dis*, vol. 19, no. 2, pp. 143–155, Feb. 2019, doi: 10.1016/S1473-3099(18)30647-9.
- [104] G. Yebra, Á. Holguín, D. Pillay, and S. Hué, “Phylogenetic and demographic characterization of HIV-1 transmission in Madrid, Spain,” *Infection, Genetics and Evolution*, vol. 14, no. 1, pp. 232–239, Mar. 2013, doi: 10.1016/j.meegid.2012.12.006.
- [105] D. Paraskevis *et al.*, “HIV-1 molecular transmission clusters in nine European countries and Canada: Association with demographic and clinical factors,” *BMC Med*, vol. 17, no. 1, Jan. 2019, doi: 10.1186/s12916-018-1241-1.
- [106] S. Limnaios *et al.*, “Dating the Origin and Estimating the Transmission Rates of the Major HIV-1 Clusters in Greece: Evidence about the Earliest Subtype A1 Epidemic in Europe,” *Viruses*, vol. 14, no. 1, Jan. 2022, doi: 10.3390/v14010101.
- [107] D. Paraskevis *et al.*, “Economic recession and emergence of an HIV-1 outbreak among drug injectors in Athens metropolitan area: A longitudinal study,” *PLoS One*, vol. 8, no. 11, Nov. 2013, doi: 10.1371/journal.pone.0078941.

- [108] Kostaki E *et al.*, “Detailed Molecular Surveillance of the HIV-1 Outbreak Among People who Inject Drugs (PWID) in Athens During a Period of Four Years.,” *Curr HIV Res.*, vol. 15, no. 6, pp. 396–404, 2017.
- [109] V. A. Johnson *et al.*, “Update of the Drug Resistance Mutations in HIV-1: December 2008,” *International AIDS Society*, vol. 16, no. 5, 2008, [Online]. Available: www.iasusa.org
- [110] M. C. Hosseinipour *et al.*, “The public health approach to identify antiretroviral therapy failure: High-level nucleoside reverse transcriptase inhibitor resistance among Malawians failing first-line antiretroviral therapy,” *AIDS*, vol. 23, no. 9, pp. 1127–1134, Jun. 2009, doi: 10.1097/QAD.0b013e32832ac34e.
- [111] D. E. Bennett *et al.*, “Drug resistance mutations for surveillance of transmitted HIV-1 drug-resistance: 2009 update,” *PLoS One*, vol. 4, no. 3, Mar. 2009, doi: 10.1371/journal.pone.0004724.
- [112] R. K. Gupta *et al.*, “HIV-1 drug resistance before initiation or re-initiation of first-line antiretroviral therapy in low-income and middle-income countries: a systematic review and meta-regression analysis,” *Lancet Infect Dis*, vol. 18, no. 3, pp. 346–355, Mar. 2018, doi: 10.1016/S1473-3099(17)30702-8.
- [113] A. Tostevin *et al.*, “Recent trends and patterns in HIV-1 transmitted drug resistance in the United Kingdom,” *HIV Med*, vol. 18, no. 3, pp. 204–213, Mar. 2017, doi: 10.1111/hiv.12414.
- [114] Wensing AM *et al.*, “2017 Update of the Drug Resistance Mutations in HIV-1.,” *Top Antivir Med.* , vol. 24, no. 4, pp. 132–133, Dec. 2016.
- [115] D. Paraskevis *et al.*, “Transmission dynamics of HIV-1 drug resistance among treatment-naïve individuals in Greece: The added value of molecular epidemiology to public health,” *Genes (Basel)*, vol. 8, no. 11, Nov. 2017, doi: 10.3390/genes8110322.