



ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ (INTEGRATED MASTER)

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΦΑΡΜΟΓΩΝ & ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΩΝ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«Η χρήση της μεθόδου TMA για την μέτρηση του ιικού φορτίου HIV-1 RNA, σε άτομα που ζουν με τον ιό HIV και λαμβάνουν αντιρετροϊκή θεραπεία, καθώς και σε άτομα με νεοδιαγνωσθείσα λοίμωξη στην Αττική»

Ειρήνη Κωστέτσου Α.Μ.:788

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Απόστολος Μπελούκας, Αναπληρωτής Καθηγητής Πα.Δ.Α., Επιβλέπων
Βασίλειος Δουρής, Επίκουρος Καθηγητής Π.Ι., Υπεύθυνο Μέλος ΔΕΠ ΤΒΕΤ
Θεολόγος Μιχαλίδης, Αναπληρωτής Καθηγητής Π.Ι., Μέλος ΔΕΠ ΤΒΕΤ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ

ΝΟΕΜΒΡΙΟΣ 2024



SCHOOL OF HEALTH SCIENCES
INTEGRATED MASTERS DEGREE
DEPARTMENT OF BIOLOGICAL APPLICATIONS & TECHNOLOGIES

INTERGRATED MASTERS DISSERTATION

“The use of TMA method to quantify HIV-1 RNA viral load in people living with HIV and receiving antiretroviral therapy, as well as in people with newly diagnosed infection in Attica”

Irene Costetsou, RN: 788

COMMITTEE OF EXAMINERS

Apostolos Beloukas, Associate Professor UNIWA, Supervisor
Vasilios Douris, Assistant Professor UoI, Responsible Member DBAT
Theologos Mihailidis, Associate Professor UoI, Member DBAT

IOANNINA
NOVEMBER 2024

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα Διπλωματική Εργασία εκπονήθηκε στο Εθνικό Κέντρο Αναφοράς AIDS Νοτίου Ελλάδος – Ε.Κ.Α.Α.Ν.Ε., της Σχολής Δημόσιας Υγείας, του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής. Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επιβλέποντα Καθηγητή μου, Απόστολο Μπελούκα, Αναπληρωτή Καθηγητή και την Υπεύθυνη Εργαστηρίου, Παναγιώτα Ρέστα, Μοριακή Βιολόγο – Γενετίστρια, καθώς και όλα τα μέλη της επιστημονικής ομάδας για την καθοδήγησή τους και την άριστη συνεργασία. Επιπλέον, ευχαριστώ τον Υπεύθυνο του τΒΕΤ, Βασίλειο Δουρή, Επίκουρο Καθηγητή του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και τον Θεολόγο Μιχαηλίδη, Αναπληρωτή Καθηγητή του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Τέλος, ευχαριστώ όλους τους συγγενείς, φίλους και συναδέλφους μου, οι οποίοι βρίσκονται πάντα δίπλα μου, με στηρίζουν και εκδηλώνουν διαρκώς το ενδιαφέρον και την αγάπη τους.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ	5
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	6
ABSTRACT	7
1. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	8
1.1. Επιδημιολογικά δεδομένα της HIV λοίμωξης/AIDS	8
1.1.1. Παγκόσμια στοιχεία	8
1.1.2. Ελληνικά στοιχεία	10
1.1.3 Ελληνικά στοιχεία για το έτος 2023	13
1.1.4 Κατηγορίες κινδύνου απόκτησης HIV	14
1.2. Η μέτρηση του ιικού φορτίου HIV-1 RNA ως Δείκτης Επιδημιολογικής Επιτήρησης	16
1.2.1. Δείκτης καθυστερημένης διάγνωσης	16
1.2.2. Εργαλείο Παρακολούθησης της Αποτελεσματικότητας της Αντιρετροϊκής Θεραπείας	18
1.3. Εργαστηριακές μέθοδοι μέτρησης του ιικού φορτίου HIV-1 RNA	19
1.3.1. Σύγκριση μεταξύ των εμπορικά διαθέσιμων δοκιμασιών TMA και real-time RT-PCR	21
1.3.2 Σύγκριση μεταξύ των μεθόδων RT-PCR, bDNA και NASBA	23
2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	26
2.1. Σκοπός	26
2.2. Υλικά & Εξοπλισμός	26
2.3. Μεθοδολογία	27
2.3.1.Επιλογή & προετοιμασία δειγμάτων	27
2.3.2. Συλλογή δημογραφικών χαρακτηριστικών	27
2.3.3. Μέτρηση ιικού φορτίου HIV-1 RNA με Real-Time TMA	28
2.3.4. Στατιστική ανάλυση	31
2.4. Αποτελέσματα	32
2.4.1. Δημογραφικά χαρακτηριστικά	32
2.4.2. Ανάλυση μεταξύ δημογραφικών χαρακτηριστικών και ιικού φορτίου HIV-1 RNA	34
2.5. Συζήτηση	38
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	41

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

HIV	Human Immunodeficiency Virus
AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome
UNAIDS	Joint United Nations Programme on HIV/AIDS Κοινό Πρόγραμμα Οργανισμού Ηνωμένων Εθνών για τον ιό του AIDS
WHO ΠΟΥ	World Health Organization Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας
HAART	Highly Active Antiretroviral Therapy
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
ΕΟΔΥ	Εθνικός Οργανισμός Δημόσιας Υγείας
ΕΚΑΑΝΕ	Εθνικό Κέντρο Αναφοράς AIDS Νοτίου Ελλάδας
PWH	People live with HIV Άτομα που ζουν με τον ιό HIV
PWID XEN	People who inject drugs; People who use drugs Άτομα που κάνουν χρήση ναρκωτικών ουσιών
MSM ΑΣΑ	Men having sex with men Άνδρες που έχουν σεξουαλικές επαφές με άνδρες
NAAT	Nucleic Acid Amplification Test
TMA	Transcription Mediated Amplification
RT-PCR	Real-Time Polymerase Chain Reaction
NASBA	Nucleic Acid Sequence-Based Amplification
Pol	Polymerase
LTRs	Long Terminal Repeats
LLoQ	Lower Limit of Lower Quantification
ULoQ	Upper Limit of Lower Quantification

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα διπλωματική εργασία επικεντρώνεται στη μέτρηση του ιικού φορτίου HIV-1 RNA, με τη χρήση της μεθόδου TMA, σε άτομα που ζουν με τον ιό HIV και λαμβάνουν αντιρετροϊκή θεραπεία, καθώς και σε άτομα με νεοδιαγνωσθείσα λοίμωξη, στην περιφέρεια της Αττικής. Διερευνάται η συσχέτιση των μετρήσεων του ιικού φορτίου με ορισμένα δημογραφικά χαρακτηριστικά, όπως το φύλο, η ηλικία, η εθνικότητα και η κατηγορία κινδύνου απόκτησης και γίνεται σχολιασμός της επίτευξης των στόχων της UNAIDS. Ξεκινώντας από το θεωρητικό πλαίσιο, παρατίθενται τα επιδημιολογικά δεδομένα της λοίμωξης HIV/AIDS, κυρίως στην Ελλάδα, και δίνεται έμφαση στα πιο πρόσφατα δεδομένα του έτους 2023. Παρουσιάζεται επίσης, η αξία της μέτρησης του ιικού φορτίου HIV-1 RNA ως δείκτης επιδημιολογικής επιτήρησης και αναλύονται οι εργαστηριακές μέθοδοι Μοριακής Βιολογίας της μέτρησης του ιικού φορτίου. Στο πειραματικό μέρος της εργασίας περιγράφεται αναλυτικά η μέθοδος TMA, με τη χρήση του εμπορικά διαθέσιμου σετ αντιδραστηρίων Aptima™ HIV-1 Quant Dx Assay της εταιρείας Hologic, στην πλήρως αυτοματοποιημένη πλατφόρμα Panther®System. Η μέθοδος παρέχει την δυνατότητα απομόνωσης RNA από το πλάσμα ασθενών με λοίμωξη HIV, χρησιμοποιώντας την τεχνολογία σύλληψης στόχων, ακολουθούμενο από ενίσχυση των περιοχών *LTR* και *pol* του HIV-1 RNA και ανίχνευση των προϊόντων ενίσχυσης με τη χρήση ανιχνευτών φθορισμού στην πλατφόρμα Panther®System. Τα αποτελέσματα του ποσοτικού προσδιορισμού του ιικού φορτίου HIV-1 RNA και της στατιστικής ανάλυσης, έδειξαν σημαντικές διαφορές στο ιικό φορτίο ανάλογα με το στάδιο της θεραπείας και τα δημογραφικά χαρακτηριστικά των ασθενών. Συγκεκριμένα, το ιικό φορτίο HIV-1 RNA εμφανίζεται συχνά χαμηλότερο έως και “μη μεταδοτικό” ή μη ανιχνεύσιμο στα άτομα που παρακολουθούνται συστηματικά και λαμβάνουν αντιρετροϊκή θεραπεία, σε σύγκριση με όσους είναι πρόσφατα διαγνωσμένοι. Αυτή η συσχέτιση τονίζει τη σημασία της τακτικής παρακολούθησης όλων των ομάδων του πληθυσμού για τη βελτίωση της ποιότητας ζωής και τη βέλτιστη θεραπευτική καταστολή του ιού, προκειμένου να επιτευχθεί το ευρύτερο σχέδιο των στόχων της UNAIDS, για την εξάλειψη του AIDS ως παγκόσμια απειλή, για τη δημόσια υγεία, μέχρι το 2030.

Λέξεις – Κλειδιά:

Ιικό φορτίο HIV-1 RNA, αντιρετροϊκή θεραπεία, TMA, επιδημιολογία, παρακολούθηση, UNAIDS

ABSTRACT

This thesis focuses on the measurement of HIV-1 RNA viral load, using the TMA method, in people living with HIV and receiving antiretroviral therapy, as well as in people with newly diagnosed infection, in the region of Attica, in Greece. The association of viral load measurements with certain demographic characteristics, such as gender, age, ethnicity and mode of HIV acquisition, is explored and the achievement of UNAIDS goals is commented on. Starting from the theoretical background, the epidemiological data of HIV/AIDS infection, mainly in Greece, are listed, and emphasis is placed on the most recent data of the year 2023. Moreover, the value of measuring HIV-1 RNA viral load as an indicator of epidemiological surveillance is presented and the molecular biology laboratory methods of viral load measurement are analyzed. In the experimental part of the thesis, the TMA method is described in detail, using the commercially available Aptima™ HIV-1 Quant Dx Assay Kit, by the Hologic Company, on the fully automated Panther®System platform. The method includes isolation of RNA from the plasma of HIV-infected patients using target capture technology, followed by amplification of the *LTR* and *pol* regions of HIV-1 RNA and detection of the amplification products using fluorescent probes on the Panther®System platform. The results of HIV-1 RNA viral load quantification and statistical analysis showed significant differences in viral load according to treatment stage and patient demographic characteristics. In particular, HIV-1 RNA viral load often appears lower and even “untransmissible” or undetectable in people who are routinely monitored and receive antiretroviral therapy, compared to those who are newly diagnosed. This association emphasizes the importance of routine surveillance of all population groups to improve quality of life and optimal therapeutic suppression of the virus in order to achieve the broader agenda of the UNAIDS goals of eliminating AIDS as a global threat, of public health, until 2030.

Keywords:

HIV-1 RNA viral load, antiretroviral therapy, TMA, epidemiology, surveillance, UNAIDS

1. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1. Επιδημιολογικά δεδομένα της HIV λοίμωξης/AIDS

1.1.1. Παγκόσμια στοιχεία

Ο Ιός της Επίκτητης Ανοσοανεπάρκειας του Ανθρώπου (*Human Immunodeficiency Virus; HIV*) ανήκει στην οικογένεια των Ρετροϊών και του γένους *Lentivirus*. Ο ιός HIV είναι η αιτία παθογένεσης του Συνδρόμου της Επίκτητης Ανοσοανεπάρκειας - παγκοσμίως γνωστό ως AIDS (*Acquired Immune Deficiency Syndrome; AIDS*), ένα σύνδρομο το οποίο είναι, ουσιαστικά, εμφανές κυρίως στο τελικό στάδιο της λοίμωξης από τον συγκεκριμένο ιό [1].

Έως τώρα, οι ιοί HIV-1 και HIV-2 είναι τα δύο στελέχη του ιού HIV που έχουν εντοπιστεί, με τον τελευταίο να ανιχνεύεται ιδίως στην Δυτική Αφρική, συγκριτικά με τον πρώτο τύπο, ο οποίος είναι υπεύθυνος για τις περισσότερες επιδημίες, και σε γεωγραφικό επίπεδο, κατανέμεται σε όλο τον κόσμο. Όλες οι γνωστές υποομάδες του ιού HIV-1 και του ιού HIV-2 πιστεύεται ότι μεταδόθηκαν στον άνθρωπο από τα διαφορετικά είδη του Ιού Ανοσοανεπάρκειας των Πιθήκων (*Simian Immunodeficiency Virus; SIV*) που απαντώνται σε πρωτεύοντα θηλαστικά. [2, 3]. Ο ιός SIV υπάρχει σε ξεχωριστές γενεαλογίες που συγκεντρώνονται σε διαφορετικά είδη πρωτεύοντων [3]. Ο ιός HIV-1 είναι ο τύπος HIV ιού που μοιάζει περισσότερο με τον ιό SIV που συναντάται στους κοινούς χιμπατζήδες (*SIV Chimpanzee; SIVcpz*) στο νοτιοανατολικό Καμερούν, και δημιουργεί έτσι την ιδέα ότι ο ιός HIV-1 προέκυψε από τους χιμπατζήδες στη συγκεκριμένη περιοχή [4]. Ο ίδιος ο ιός SIVcpz προέκυψε στους χιμπατζήδες μέσω ενός ανασυνδυασμού δύο χωριστών γενεαλογικών γενεών του αρχικού ιού, ο οποίος είναι γνωστό ότι μολύνει τα είδη *Red-capped Mangabey*, καθώς επίσης και τα είδη *Cercopithecus* [2, 4].

Ο ιός HIV-1 υποδιαιρείται στις ομάδες M (Major), N (non-M, non-O) και O (Outlier). Στην **ομάδα M** του ιού HIV-1 καταλογίζεται η παγκόσμια πανδημία του AIDS, εκτιμάται ότι εμφανίστηκε στους ανθρώπους κατά το 1920 κοντά στην Κινσάσα, ένα τότε μέρος του Βελγικού Κονγκό, και αυτή η εκτίμηση ήταν το αποτέλεσμα χρονικής κλίμακας εξελικτικών μοντέλων που εφαρμόστηκαν σε σύγχρονα δείγματα και ανακτήθηκαν πρώιμα δείγματα του HIV-1 M [5]. Προηγουμένως, είχε βρεθεί από τις γενετικές διαφορές μεταξύ των δειγμάτων LEO70 και DRC60, αλλά και των μεταγενέστερων δειγμάτων ότι η ομάδα M HIV-1 είχε μεταδοθεί στους ανθρώπους το 1908±10 χρόνια [6, 7]. Φαίνεται πως η πρώτη ομάδα, η M, είναι το πιο κοινότυπο στέλεχος του συγκεκριμένου ιού, ενώ, περισσότεροι από το 90% των ανθρώπων που είναι φορείς του ιού HIV έχουν μολυνθεί από αυτόν σε κάποια στιγμή της ζωής τους [8]. Ο ιός HIV-1 της **ομάδας O** ευρίσκεται ιδιαίτερα στην Κεντρική αλλά και την Δυτική Αφρική, όπου εμφανίζει τον μεγαλύτερο επιπολασμό στο Καμερούν [9]. Ο τύπος της **ομάδας N** φαίνεται να έχει το μικρότερο αντίκτυπο στον ανθρώπινο οργανισμό και να είναι λιγότερο παθογόνος, σε σχέση με τα άλλα δυο στελέχη, αφού εκτιμάται πως λιγότεροι από 20 άνθρωποι είναι φορείς του συγκεκριμένου στελέχους, από το 2015 έως τώρα [10].

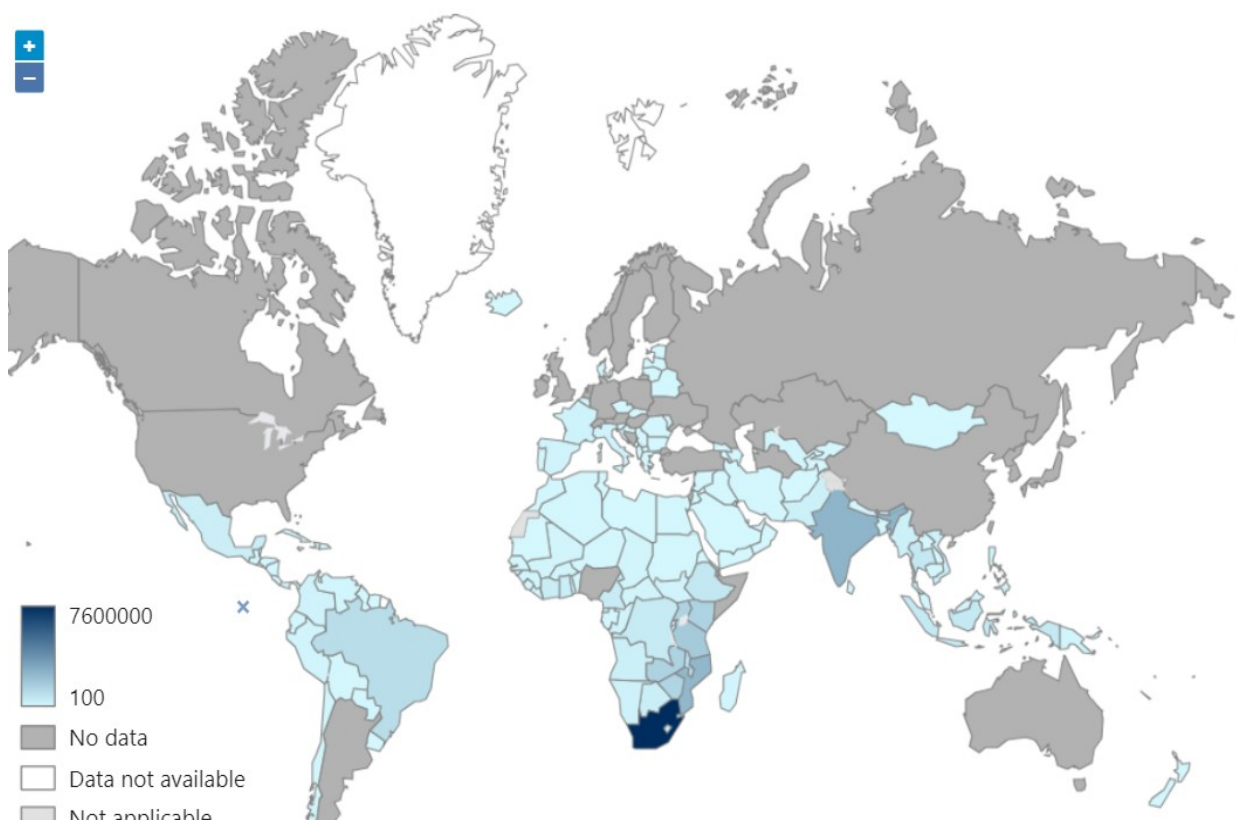
Αξίζει να αναφερθεί, πως, εντοπίζονται ελάχιστες διαφορές ως προς την δομή των HIV-1 και HIV-2, οι οποίες είναι επάνω στις γλυκοπρωτεΐνες του ιικού φακέλου.

Ο ιός αυτός προσβάλλει τα ρυθμιστικά CD4+ T-λεμφοκύτταρα, που αποτελούν κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος και μέλη της επίκτητης ανοσίας του οργανισμού, και, όπως υποδηλώνει και το όνομά τους, είναι οι κύριοι ρυθμιστές της ανοσιακής απόκρισης, με αποτέλεσμα να καθιστά τον οργανισμό περισσότερο ευάλωτο σε ασθένειες όπως η φυματίωση, οι λοιμώξεις και ορισμένοι τύποι καρκίνων [1]. Ο ιός μεταδίδεται με τα σωματικά υγρά ενός μολυσμένου ατόμου –λόγου χάριν το αίμα, το μητρικό γάλα, το σπέρμα και τα κολπικά υγρά, ενώ, δεν μεταδίδεται με τα φιλά και τις αγκαλιές ή μέσω του φαγητού, και μπορεί επιπλέον να μεταδοθεί από τη μητέρα στο έμβρυο. Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (ΠΟΥ), η προχωρημένη νόσος ορίζεται ως ο αριθμός των κυττάρων CD4 που είναι μικρότερος από 200 κύτταρα/mm³ ή αλλιώς το στάδιο 3 ή 4 του ΠΟΥ σε ενήλικες και εφήβους, και όλοι οι ανήλικοι άνθρωποι που είναι μολυσμένοι με HIV ηλικίας κάτω των 5 ετών εικάζονται να έχουν προχωρημένη HIV νόσο [11].

Η πανδημία του ιού HIV παραμένει, στις μέρες μας, ένα μείζον παγκόσμιο ζήτημα για τη δημόσια υγεία, επειδή ήδη έχει προκαλέσει τον θάνατο περίπου 40,4 εκατομμύρια ανθρώπων έως τώρα, ενώ έχει διαρκή επιπολασμό σε όλες τις χώρες σε παγκόσμιο επίπεδο, ορισμένες εκ των οποίων αναφέρουν τάσεις αύξησης σε νέες λοιμώξεις, ενώ το προηγούμενο διάστημα είχαν αισθητή πτώση. Έως τα τέλη του 2022 εκτιμάται πως υπήρχαν περίπου 39,0 εκατομμύρια άτομα μολυσμένα με HIV, δύο τρίτα εκ των οποίων βρίσκονται στην Αφρική, και το 2020 εικάζεται πως ο ιός στοίχισε τη ζωή σε περίπου 630.000 ανθρώπους που τελικά πέθαναν από αιτίες που σχετίζονται με τη μόλυνση, ενώ περίπου ένα διπλάσιο νούμερο μολύνθηκε από τον ιό HIV [11]. Το 2022, κατά τη διάγνωση των φορέων, περίπου το 86% ήταν ενήμερο για την κατάστασή του, τα ¾ ακολουθούσαν αντιρετροϊκή θεραπεία, και το 71% είχε καταφέρει μείωση στο ιικό φορτίο του. Ο ΠΟΥ και άλλες διεθνείς συμμαχίες στρέφονται μέχρι το 2025, να έχει διαγνωσθεί το 95% των φορέων του ιού, το 95% εκ των οποίων θα πρέπει να λαμβάνουν αντιρετροϊκή θεραπευτική αγωγή, και το 95% των φορέων του ιού θα πρέπει να επιτυγχάνει μέσω της θεραπείας κατεσταλμένο ιικό φορτίο ώστε να υπάρχει εξατομικευμένο όφελος αλλά και να ελαττωθούν τα μελλοντικά ποσοστά του ιού στις κοινωνίες [11]. Ακόμη, κατά τον ΠΟΥ, τα ποσοστά της μόλυνσης από τον HIV, για το 2022, φαίνονται στην **Εικόνα 1**, όπου, χαρακτηριστικά, για την χώρα μας ο αριθμός αυτός ανέρχεται στις 17.000 ανθρώπων συγκριτικά με την νότια Αφρική, όπου ο αριθμός είναι και ο μεγαλύτερος της εικόνας και ανέρχεται στα 7,6 εκατομμύρια ανθρώπων [12].

Αναλύσεις στα δεδομένα του 2019 που εξήχθησαν από την ενημέρωση Global Burden of Disease 2019 και τα δεδομένα του Κοινού Προγράμματος των Ηνωμένων Εθνών για το HIV/AIDS (*Joint United Nations Programme on HIV/AIDS; UNAIDS*) το 2019 έδειξαν πως παρά το γεγονός ότι πολλές χώρες εμφάνισαν μικρή επίπτωση, στη Ρωσία, στην Ουκρανία, στην Πορτογαλία, στην Ισπανία, στη Βραζιλία και στις Ηνωμένες Πολιτείες, ο επιπολασμός αυξάνεται, ήδη από το 2010. Σήμερα πάνω από το 0,5% του παγκόσμιου πληθυσμού έχει μολυνθεί, περίπου 5.000 νέες μολύνσεις εμφανίζονται καθημερινά, όπου οι 500 είναι ανήλικοι. Τα ποσοστά θνησιμότητας μειώνονται διαρκώς, και τώρα ανέρχονται σε 11 θανάτους ανά

100.000 πληθυσμό, ενώ προβλέπεται μείωση στους 8,5 θανάτους, έως το 2040. Ο επιπολασμός συνεχίζει να αυξάνεται, με τη Νότια Αφρική, τη Νιγηρία, τη Μοζαμβίκη, την Ινδία, την Κένυα και τις Ηνωμένες Πολιτείες να έχουν τη μεγαλύτερη επιβάρυνση [13]. Την τελευταία δεκαετία, ο αριθμός και τα ποσοστά των καινούριων μολύνσεων αυξάνονται διαρκώς στην Ευρώπη, στη Νότια Αμερική, στη Βόρεια Αμερική και σε άλλες περιοχές, ενώ, η κάθετη μετάδοση στο έμβρυο διαμέσου της μητέρας συνεχίζεται με υψηλά ποσοστά παρά τα αποτελέσματα των θεραπευτικών αγωγών [13].

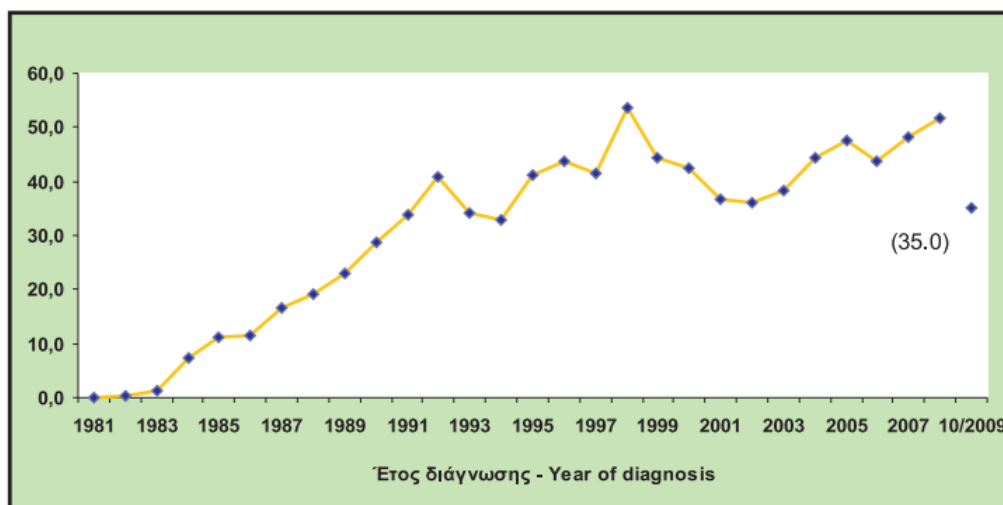


Εικόνα 1. Ο επιπολασμός του HIV το 2022, κατά τον ΠΟΥ [12].

1.1.2. Ελληνικά στοιχεία

Από το 1985, και έπειτα από απόφαση του Υπουργού Υγείας, Πρόνοιας & Κοινωνικών Ασφαλίσεων, το Εθνικό Κέντρο Αναφοράς AIDS Νοτίου Ελλάδας (ΕΚΑΑΝΕ) λειτουργεί (ΕΜΠ.12166/οικ.23/ΕΓΚ2/26-7-1985) και είναι το πρώτο κέντρο αναφοράς AIDS στην χώρα μας, καθώς επίσης και το μοναδικό που ο ΠΟΥ έχει αναγνωρίσει ως Εθνικό Κέντρο Αναφοράς AIDS [14]. Αρχικά αποτελούσε τον βασικό πυρήνα δράσης για την ιχνηλάτηση και την αντιμετώπιση της λοίμωξης HIV/AIDS στην Ελλάδα, και στη συνέχεια εντάχθηκε στη Μονάδα Εργαστηριακής Επιτήρησης λοίμωξης από HIV/AIDS και ιογενών ηπατιτιδών στο Εργαστήριο ΕΛΝΟ, του τμήματος Πολιτικών Δημόσιας Υγείας της Σχολής Δημόσιας Υγείας του Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής, και είναι καθολικός διάδοχός της (Ν. 4610/2019, Μέρος Β, Κεφ. Α, Άρθρα; 57,58) [14].

Το κύριο γνώρισμα της επιδημίας του HIV στην Ελλάδα κατά την πρώτη δεκαετία του 21^{ου} αιώνα, είναι η κρίσιμη αύξηση μετά το 2004, ενώ μια αυξητική τάση σημειώθηκε και το 2008. Στην παρακάτω **Εικόνα 2** φαίνεται η πορεία των νέων μολύνσεων λόγω HIV ανά τα έτη στην χώρα μας [15].

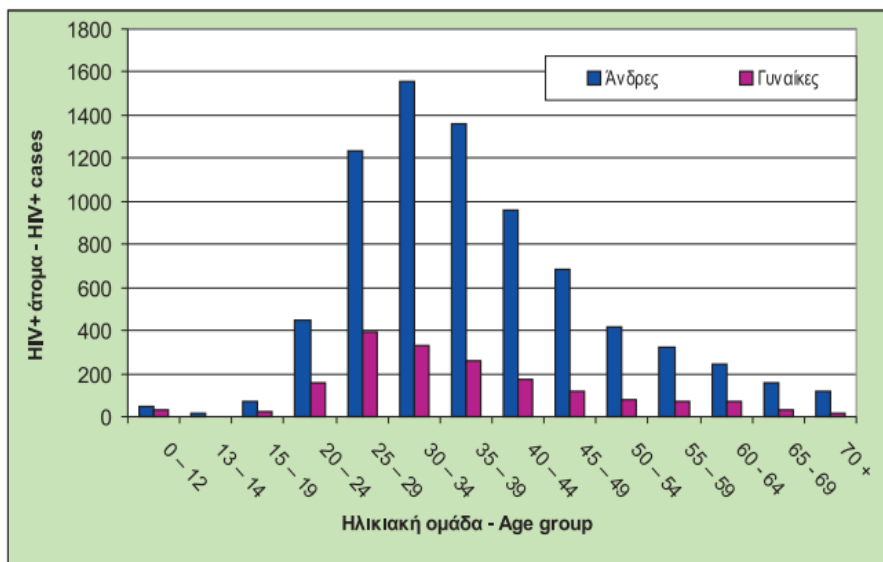


Εικόνα 2. Νέες διαγνώσεις HIV ανά εκατομμύριο πληθυσμού στην Ελλάδα (έως και την 31/10/2009) [15].

Το επιδημιολογικό δελτίο για την πορεία της λοίμωξης από HIV/AIDS στην χώρα μας εκδίδεται, πλέον, κάθε χρόνο από τον Εθνικό Οργανισμό Δημόσιας Υγείας (ΕΟΔΥ) και το Εθνικό Μητρώο HIV της Ηλεκτρονικής Διακυβέρνησης Κοινωνικής Ασφάλισης (ΗΔΙΚΑ). Μια δεκαετία πριν, στο 24^ο τεύχος του ΕΟΔΥ, για τον HIV/AIDS, στα στοιχεία που δηλώθηκαν στο Κέντρο Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων (ΚΕΕΛΠΝΟ) έως και την 31^η Οκτωβρίου 2009, αναφέρεται πως ο συνολικός αριθμός των ανθρώπων με AIDS που δηλώθηκαν στην χώρα μας μέχρι την 31^η Οκτωβρίου 2009 ήταν σε 3027, όπου οι 2557 (84,5%) ήταν άνδρες και οι 470 (15,5%) ήταν γυναίκες [15].

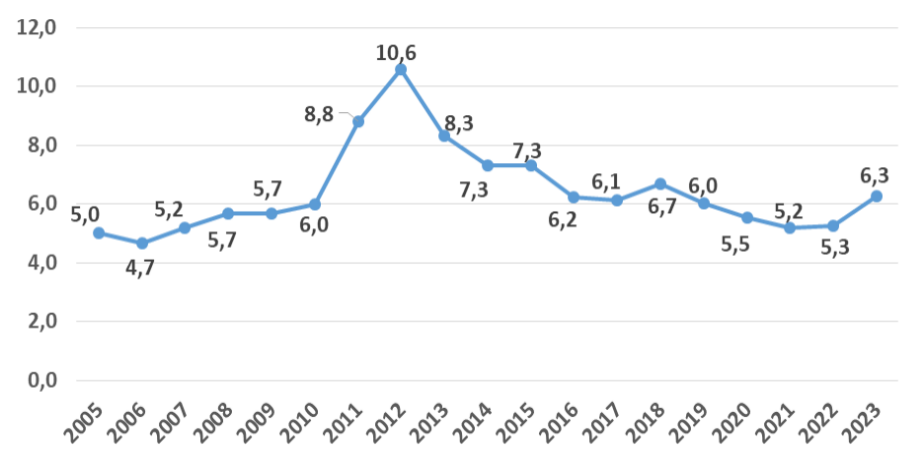
Ακόμη, από την αρχή του έτους και έως τότε, δηλώθηκαν 462 νέα περιστατικά μόλυνσης από HIV, όπου οι 385 (83,3%) ήταν άνδρες και οι 77 (16,7%) ήταν γυναίκες, και από το σύνολο οι 49 (10,6%) είχαν ήδη εμφανίσει ή ανέπτυξαν κλινικά AIDS εντός του έτους, το 44,6% των περιστατικών είχαν σημειωθεί ως «ακαθόριστα» συγκριτικά με τον τρόπο μετάδοσης, το 68,8% ήταν άνδρες που έχουν σεξουαλικές επαφές με άνδρες (ΑΣΑ), ενώ για ένα άτομο δηλώθηκε η μετάγγιση μολυσμένου αίματος ως τρόπος μετάδοσης, με την πλειονότητα των κρουσμάτων να περιλαμβάνει ανθρώπους ηλικίας μεταξύ 25-44 ετών, και το μεγαλύτερο ποσοστό των ανδρών (17,7%) αλλά και των γυναικών (18,2%) ήταν ηλικίας μεταξύ 25-29 ετών κατά την αναφορά της μόλυνσης [15]. Θα πρέπει να σημειωθεί, πως, ο συνολικός αριθμός των φορέων του HIV (συμπεριλαμβανομένων και αυτών που είχαν φτάσει ήδη σε προχωρημένα στάδια AIDS) που δηλώθηκαν στην χώρα μας έως την συγκεκριμένη ημερομηνία ήταν μόλις 9798 περιστατικά, όπου οι 7881 (80,4%) ήταν άνδρες, οι 1869 (19,1%) γυναίκες και για πολύ λίγα άτομα δεν σημειώθηκε το φύλο τους [15]. Είναι σημαντικό το γεγονός πως ο αριθμός των θετικών παιδιών μικρότερων των 13 ετών παρέμεινε χαμηλός στη Ελλάδα και ήταν μόνο 80 αναφορές, όπου τα 49 (61,3%) ήταν αγόρια και τα 30 ήταν κορίτσια (37,5%), με τα περισσότερα (71,3%) να έχουν μολυνθεί από τη μητέρα τους και το 15% ήταν πολυμεταγγιζόμενα παιδιά [15]. Στην παρακάτω **Εικόνα 3** φαίνονται αναλυτικά το φύλο και οι ηλικίες των οροθετικών ατόμων στην

Ελλάδα έως και τον Οκτώβριο του 2009. Μέσα στο 2009 και έως και τον Οκτώβριο, δηλώθηκαν 73 νέες περιπτώσεις AIDS, όπου οι 57 (78,1%) ήταν άνδρες και οι 16 (21,9%) γυναίκες και οι 49 δηλώθηκαν ως οροθετικοί μέσα στο 2009, ενώ το 43,8% των νέων εμφανίσεων με AIDS ήταν ΑΣΑ, ενώ το 31,5% απέκτησε τον ιό πιθανότατα μέσω της ετεροφυλοφιλικής σεξουαλικής επαφής, με την πλειονότητα των νέων περιπτώσεων να αφορά ηλικίες άνω των 35 ετών κατά τη διάγνωση [15].



Εικόνα 3. Συνολικά δηλωθέντα HIV οροθετικά άτομα κατά ηλικιακή ομάδα κατά τη δήλωση και κατά φύλο στην Ελλάδα έως και την 31/10/2009 [15]

Στην **Εικόνα 4** φαίνονται οι νέες διαγνώσεις HIV λοίμωξης ανά 100.000 πληθυσμού στην Ελλάδα, από το 2005 έως το 2023. Παρόλο που μέχρι και το 2010, οι ετήσιες διαγνώσεις HIV, δεν ξεπερνούσαν τις 6 ανά 100.000 πληθυσμού, το 2011 παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση (8,8 διαγνώσεις /100.000 πληθυσμού), η οποία κορυφώθηκε το 2012 (10,6 διαγνώσεις/100.000 πληθυσμού). Από το 2013 και μετά, οι νέες διαγνώσεις HIV εμφανίζουν πτωτική τάση. Ο αριθμός νέων διαγνώσεων το 2023 ανήλθε σε 6,3/100.000 πληθυσμού, λίγο πιο αυξημένος σε σχέση με την προηγούμενη τριετία. [17]. Ο συνολικός αριθμός των περιστατικών HIV (συμπεριλαμβανομένων των περιπτώσεων AIDS) που έχουν διαγνωστεί στην Ελλάδα έως τις 31/12/2023 ανέρχεται σε 20.627, εκ των οποίων το 82,1% είναι άνδρες, το 17,7% γυναίκες και το 0,2% μη δηλωμένο φύλο [17].

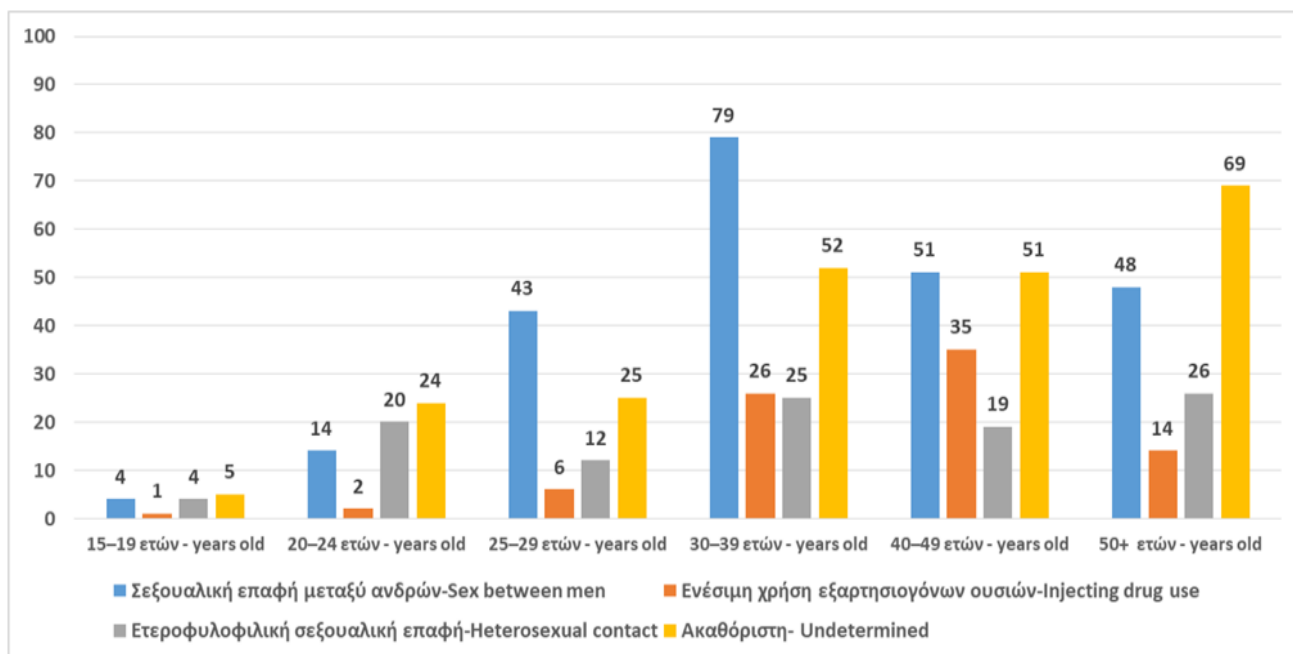


Εικόνα 4. Νέες διαγνώσεις μόλυνσης από HIV ανά 100.000 πληθυσμού στην Ελλάδα (2005-2023).

1.1.3 Ελληνικά στοιχεία για το έτος 2023

Στο δελτίο επιδημιολογικής επιτήρησης HIV/AIDS του ΕΟΔΥ για την περσινή χρονιά, από την αρχή του έτους 2023 έως και τον Δεκέμβριο του ίδιου έτους, αναφέρεται αύξηση 19,5 % νέων περιστατικών, σε σχέση με το 2022, και συγκεκριμένα καταγράφονται 657 νέες περιπτώσεις λοίμωξης με HIV, όπου οι 506 (77 %) ήταν άνδρες και οι 151 (23 %) ήταν γυναίκες. Μέσα σε αυτά τα περιστατικά, συμπεριλαμβάνονται 63 άτομα (9,6%) που είχαν ήδη εμφανίσει ή ανέπτυξαν AIDS κατά τη διάρκεια του έτους, μετά τη διάγνωσή τους με HIV. Από τις νέες διαγνώσεις, το 37,3% αφορά Έλληνες, το 22,7% αλλοδαπούς, ενώ το 40% δεν είχε καταχωρημένη εθνικότητα.

Από τον Ιανουάριο μέχρι και τον Δεκέμβριο του 2023, τα περισσότερα περιστατικά μολύνσεων HIV/AIDS που διαγνώστηκαν και δηλώθηκαν στον ΕΟΔΥ και το Εθνικό Μητρώο HIV αφορούσαν σεξουαλική επαφή μεταξύ ανδρών και ειδικότερα, οι 240 (36,5%) ήταν άνδρες που έχουν σεξουαλική επαφή με άνδρες (ΑΣΑ), οι 106 (16,1%) ήταν άτομα με ετεροφυλική σεξουαλική επαφή, οι 84 (12,8%) ήταν άτομα που κάνουν χρήση ναρκωτικών ουσιών (XEN) και 1 περιστατικό (0,2%) αφορούσε κάθετη μετάδοση, ενώ αρκετά αυξημένα ήταν και τα περιστατικά που είχαν ακαθόριστο ή μη συμπληρωμένο τρόπο μετάδοσης 226 (34,4%). Η πλειονότητα των περιστατικών ηλικιακών ομάδων 30-39 ετών, 40-49 ετών και άνω των 50 ετών αφορά τις κατηγορίες κινδύνου απόκτησης ΑΣΑ, XEN και ακαθόριστο τρόπο μετάδοσης αντίστοιχα. Στην παρακάτω **Εικόνα 5** φαίνονται οι νέες διαγνώσεις HIV ανά κατηγορία μετάδοσης και ανά ηλικιακή ομάδα [17].

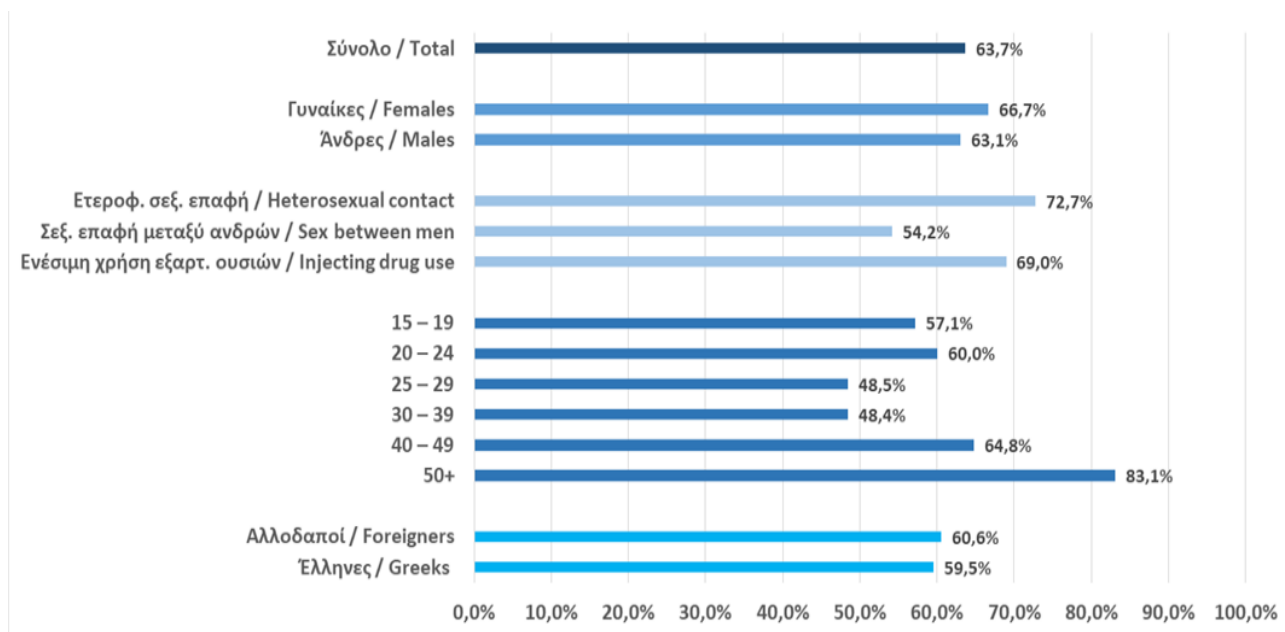


* Συμπεριλαμβανομένων των περιστατικών που όταν διαγνώστηκαν είχαν ήδη αναπτύξει AIDS

* Including cases presenting with AIDS when diagnosed with HIV

Εικόνα 5. Νέες διαγνώσεις HIV ανά κατηγορία μετάδοσης και ανά ηλικιακή ομάδα για το έτος 2023 [17].

Στην **Εικόνα 6** παρουσιάζονται τα ποσοστά των περιπτώσεων HIV με καθυστερημένη διάγνωση ανά φύλο, κατηγορία μετάδοσης, ηλικιακή ομάδα και εθνικότητα. Μόλις το 37,3% των περιπτώσεων είχαν καταγεγραμμένες τιμές CD4 T-λεμφοκυττάρων κατά τη διάγνωση, ποσοστό αρκετά χαμηλότερο από τα προηγούμενα έτη. Οι πιο ευάλωτες ομάδες όσον αφορά την καθυστερημένη διάγνωση ήταν οι γυναίκες (66,7%), τα άτομα με ετερόφυλη σεξουαλική επαφή (72,7%), τα άτομα ηλικιακής ομάδας άνω των 50 ετών (83,1%) και τα άτομα αλλοδαπής εθνικότητας (60,6 %).



* Συμπεριλαμβανομένων των περιστατικών που όταν διαγνώστηκαν είχαν ήδη αναπτύξει AIDS

* Including cases presenting with AIDS when first diagnosed with HIV

Εικόνα 6. Περιπτώσεις HIV με καθυστερημένη διάγνωση ($CD4 < 350$ κύτταρα/ mm^3) ανά φύλο, κατηγορία μετάδοσης, ηλικιακή ομάδα και εθνικότητα για το έτος 2023[17]

Το 2023 ήταν μια χρονιά όπου υπήρξε μια αξιοσημείωτη αύξηση στα περιστατικά νέων διαγνώσεων HIV με ακαθόριστο τρόπο μετάδοσης (34,4%), άγνωστη εθνικότητα (40%) και μη καταγεγραμμένες τιμές CD4 T-λεμφοκυττάρων κατά τη διάγνωση (62,7%) [17]. Οι παρατηρήσεις αυτές, σε σύγκριση με τα προηγούμενα έτη, καθιστά δύσκολη την εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων και η διαφορά αυτή θα μπορούσε να αποδοθεί στην αλλαγή του τρόπου καταγραφής των περιστατικών HIV και AIDS μετά την έναρξη της παραγωγικής λειτουργίας του Εθνικού Μητρώου HIV [17].

1.1.4 Κατηγορίες κινδύνου απόκτησης HIV

Η Ελλάδα βίωσε νωρίς τη νοσηρότητα και τη θνησιμότητα λόγω HIV/AIDS, όμως οι αποτελεσματικές αντιρετροϊκές θεραπείες έχουν μετριάσει τα αποκυήματα της επιδημίας. Οι άνδρες που έχουν σεξουαλικές επαφές με άνδρες (ΑΣΑ), είναι ο κύριος λόγος διασποράς του HIV στην Ελλάδα, ενώ οι λοιμώξεις σε χρήστες ενέσιμων ναρκωτικών έχουν χαμηλότερα ποσοστά [18], [19]. Μια διεθνής έρευνα για ομοφυλόφιλους άνδρες που έρχονται σε επαφές μεταξύ τους και που σχεδιάστηκε για να μετρήσει το

επίπεδο και την κατανομή της σεξουαλικής υγείας, των συμπεριφορών κινδύνου και προφύλαξης, των αναγκών προαγωγής της υγείας, και της κάλυψης/αποδοχής παρεμβάσεων, αλλά και για να παρέχει μια επισκόπηση των βασικών δημογραφικών στοιχείων και ευρημάτων για την κατάσταση αυτή στην Ελλάδα που καλύπτουν τις προαναφερθείσες διαστάσεις ειδικά όσον αφορά τον HIV, με συμμετέχοντες 2909 άνδρες που πληρούσαν τα κριτήρια ένταξης για την ανάλυση με ηλικία μεταξύ 15-74 ετών (μέσος όρος 35 έτη), έδειξε πως το 14,4% των συμμετεχόντων ανέφερε μέτριο και το 8,9% σοβαρό άγχος και κατάθλιψη, με αυτοαναφερόμενο επιπολασμό του ιού να είναι 11% [20]. Οι περισσότεροι συμμετέχοντες ανέφεραν να μην έχουν σταθερούς άνδρες συντρόφους (74%, n=2153), και ο αριθμός των μη σταθερών συντρόφων τον τελευταίο χρόνο ήταν πάνω από δύο για περισσότερους από τους μισούς συμμετέχοντες (61,5%, n=1321), ενώ πολύ λίγοι συμμετέχοντες δεν είχαν προσπαθήσει ποτέ να λάβουν προφύλαξη πριν από την έκθεση (2,2%, n = 63) και λιγότεροι από τους μισούς συμμετέχοντες (41,2%, n = 1199) δεν είχαν ενημερωθεί ποτέ για αυτή [20]. Σχεδόν οι μισοί από τους συμμετέχοντες (51,6%, n = 1501) δεν γνώριζαν ότι ο εμβολιασμός κατά των ιών της ηπατίτιδας Α και Β συνιστάται για τους ομοφυλόφιλους άνδρες, με τα αποτελέσματα της έρευνας αυτής να εντοπίζουν σημαντικές ανάγκες που μπορούν να βοηθήσουν στη χάραξη πολιτικής καθώς επίσης και στον σχεδιασμό πρόληψης κατά της λοίμωξης HIV/AIDS [20].

Μια άλλη έρευνα με έδρα τη Θεσσαλονίκη έδειξε πως κατά τη διάρκεια της πανδημίας του κορονοϊού (2019-2021) αναφέρθηκαν αυξημένες μολύνσεις από HIV στα άτομα που κάνουν χρήση ναρκωτικών ουσιών (XEN), με τους άστεγους και την κοινή χρήση σύριγγας να συνδέονται με αυξημένο κίνδυνο μόλυνσης με HIV [21]. Σαφώς, προγράμματα με στόχο τον πληθυσμό των υποεξυπηρετούμενων τέτοιων ατόμων υψηλού κινδύνου μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον έγκαιρο εντοπισμό των καινούριων μολύνσεων και για τη βελτίωση της αντιμετώπισης των κρουσμάτων και της περαιτέρω φροντίδας τους [21].

Σε αυτό το σημείο θα πρέπει να επισημανθεί το γεγονός, πως, έχει αναφερθεί πως η υποκείμενη μόλυνση με κορονοϊό αυξάνει τα ψευδώς θετικά αποτελέσματα για τον HIV/AIDS. Μεταξύ Μαρτίου του 2020 και Ιανουαρίου του 2022, περίπου 32.000 ασθενείς σε ένα μόνο νοσοκομείο του Ντιτρόιτ υποβλήθηκαν σε έλεγχο για μόλυνση HIV με τεστ αντιγόνου/αντισώματος τελευταίας γενιάς, τέταρτης γενιάς, εντός 2 εβδομάδων από τον έλεγχο για κορονοϊό, και συνολικά, 335 από αυτά τα άτομα βρέθηκαν θετικά στον HIV, ενώ μεταξύ αυτών με επιβεβαιωμένο με τεστ κορονοϊό, σχεδόν οι μισές από τις θετικές εξετάσεις HIV (47%) αποδείχθηκαν ψευδώς θετικές, με αρνητικά διαγνωστικά παρακολούθησης, ενώ, αντίθετα, το 23% των θετικών μεταξύ εκείνων χωρίς κορονοϊό ήταν ψευδώς θετικές, χωρίς καμία δημογραφική μεταβλητή να αντιπροσωπεύει τη διαφορά -ούτε η κατάσταση εμβολιασμού εγκυμοσύνης ή κορονοϊό [22]. Οι αναφορές για ψευδή τεστ μεταξύ HIV και κορονοϊού είναι αρκετά κοινές, με τα τεστ να είναι ψευδώς θετικά είτε για τον κορονοϊό σε άτομα με επιβεβαιωμένη λοίμωξη από HIV, είτε ψευδώς θετικά για HIV σε άτομα με επιβεβαιωμένη λοίμωξη από κορονοϊό [23]. Συνεπώς, είναι απαραίτητη η προσοχή των τεστ ανίχνευσης HIV ακόμη και σε εμβολιασμένα κατά του κορονοϊού άτομα [24].

1.2. Η μέτρηση του ιικού φορτίου HIV-1 RNA ως Δείκτης Επιδημιολογικής Επιτήρησης

Το 1981 σημειώθηκαν οι πρώτες 6 περιπτώσεις AIDS στις ΗΠΑ με κύριο υπεύθυνο τον ιό του HIV [25]. Έκτοτε και έως τις μέρες μας έχουν κατασκευαστεί ποικίλες εργαστηριακές μέθοδοι με σκοπό τον εντοπισμό της μόλυνσης από τον HIV, συμπεριλαμβανομένων των Western blot, ενζυμικών ανοσοδοκιμασιών (*Enzyme ImmunoAssays; EIAs*) συμπεριλαμβανομένων των ενζυμικών ανοσοπροσροφητικών δοκιμασιών (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assays; ELISAs*), του έμμεσου ανοσοφθορισμού, των δοκιμών ενίσχυσης νουκλεϊκού οξέος (*Nucleic Acid Amplification Tests; NAATs*), κ.α. Γενικότερα, η ταυτοποίηση των αντισωμάτων κατά του HIV-1 συμβαίνει μέσω μιας EIA –η οποία έχει υψηλή ευαισθησία, και, στη συνέχεια, δεδομένου πως το αποτέλεσμα είναι θετικό, ακολουθεί ο έλεγχος για την τελική επιβεβαίωση γίνεται με κάποια άλλη ανοσοδοκιμή με πολύ υψηλή ειδικότητα, όπως είναι, παραδείγματος χάριν, η Western Blot [25, 26].

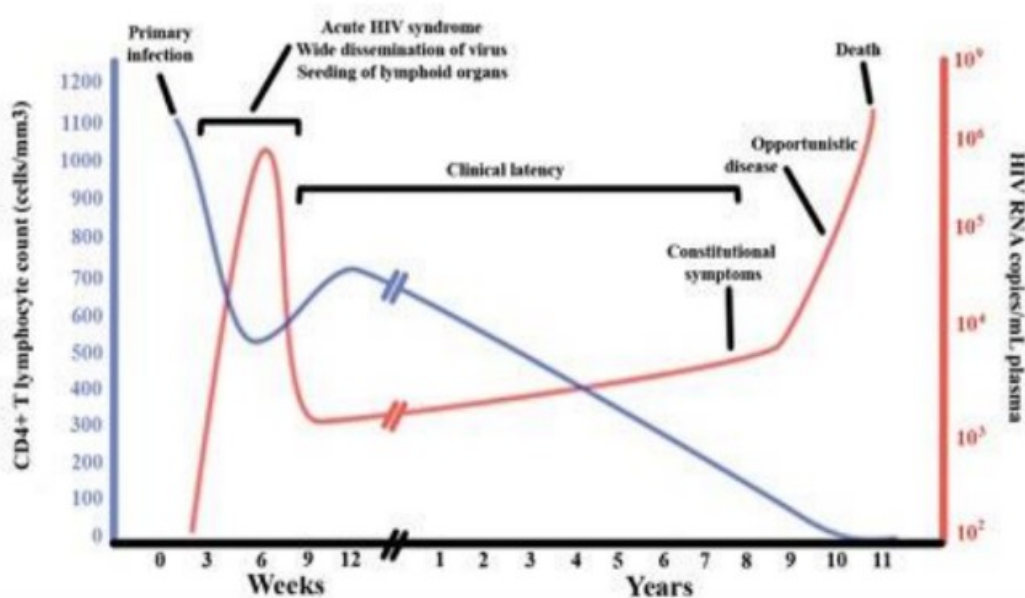
Ωστόσο, θα πρέπει να σημειωθεί, πως, το 2019, τα Κέντρα Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων (*Centers for Disease Control and Prevention; CDC*) υπολόγισαν ότι περίπου 1,2 εκατομμύρια άνθρωποι στις Ηνωμένες Πολιτείες έχουν ενεργή μόλυνση από τον HIV, ενώ, σχεδόν οι 160.000 από αυτούς δεν ξέρουν πως φέρουν τον ιό. Επιπλέον, το CDC αναφέρει πως λιγότερο από το 40% των ανθρώπων στις Ηνωμένες Πολιτείες έχουν κάνει τεστ για την πιθανή μοριακή ταυτοποίηση του HIV [27]. Αδιαμφισβήτητα, τα ψευδή αποτελέσματα των δοκιμασιών διάγνωσης του HIV μπορεί να έχουν σημαντικό συναισθηματικό και κοινωνικό αντίκτυπο σε ένα άτομο. Παραδείγματος χάριν, σε ανοσοδοκιμασίες έχει αναφερθεί στην υπάρχουσα βιβλιογραφία, πως, ο χρόνος λήψης του δείγματος αλλά και η περαιτέρω επεξεργασία του, ο πιθανός κορεσμός σε αντισώματα κατά του HIV, οι πιθανές μολύνσεις από άλλα παθογόνα, καθώς επίσης και οι πιθανές ακολουθούμενες θεραπευτικές αγωγές, το υπερβολικό φορτίο ολικών αντισωμάτων, οι διασταυρούμενες αντιδράσεις με άλλα αντιγόνα ή αντισώματα εντός του δείγματος, είναι μερικοί από τους παράγοντες που μπορούν ίσως να επηρεάσουν το τελικό αποτέλεσμα, και φυσικά, υπάρχουν πολλοί άλλοι παράγοντες που επηρεάζουν το τελικό εργαστηριακό αποτέλεσμα ανίχνευσης της ύπαρξης του HIV εντός ενός κλινικού δείγματος [28, 29]. Παραδείγματος χάριν, και με αφορμή την πρόσφατη πανδημία της ασθένειας του κορονοϊού (*Coronavirus Disease 2019; COVID-19*), είναι χαρακτηριστικό, πως, κάποιες πηγές μαρτυρούν μια πιθανή σχετική αύξηση των ψευδών θετικών αποτελεσμάτων μοριακής ταυτοποίησης του HIV σε άτομα που έχουν μολυνθεί και έχουν νοσήσει με COVID ή έχουν εμβολιαστεί με την ακίδα πρωτεΐνη του κορονοϊού -προς την μετέπειτα παραγωγή αντισωμάτων –όπως αναφέρθηκε σε προηγούμενη παράγραφο [28, 30].

1.2.1. Δείκτης καθυστερημένης διάγνωσης

Δείκτες της HIV-1 λοίμωξης θεωρούνται το HIV-1 RNA, το καψιδιακό ιικό αντιγόνο p24, τα ειδικά ως προς τον HIV αντισώματα καθώς επίσης και τα CD4+ κύτταρα. Αν θεωρήσουμε την ορομετατροπή, δηλαδή τη στιγμή της εμφάνισης των ειδικών αντισωμάτων έναντι του ιού HIV-1 στον ορό του ασθενούς, ως χρονικό σημείο αναφοράς, τότε η λοίμωξη HIV-1 διακρίνεται αρχικά στην πρώτη φάση πριν την ορομετατροπή, και

μετά στην φάση κατόπιν ορομετατροπής. Η πρώτη φάση –αυτή πριν από την ορομετατροπή– διαρκεί περίπου 2-4 εβδομάδες και χαρακτηρίζεται από την παρουσία μεγάλων συγκεντρώσεων του ιικού RNA και του καψιδιακού ιικού αντιγόνου p24, που θεωρούνται ως οι δύο κυριότεροι δείκτες διάγνωσης της πρώιμης λοίμωξης από HIV-1. Έπειτα, μετά την ορομετατροπή, θα εμφανιστούν πρώτα τα IgM, και μετά θα ακολουθήσουν τα IgG αντισώματα έναντι του ιού.

Ως καθυστερημένη διάγνωση ορίζεται η ανίχνευση της HIV λοίμωξης σε ένα επίπεδο που η ανοσιακή απόκριση του ξενιστή έχει ήδη πληγεί κατά πολύ [31]. Με άλλα λόγια, όψιμη (καθυστερημένη) διάγνωση του HIV συμβαίνει όταν ένα άτομο διαγνώστηκε για πρώτη φορά με HIV με αριθμό CD4 < 350 κύτταρα/ μL ή με κάποιο άλλο συμβάν που καθορίζει το AIDS, ανεξάρτητα από τον αριθμό των κυττάρων CD4. Τα άτομα που έχουν ενδείξεις πρόσφατης λοίμωξης, δηλαδή που έχουν διαγνωστεί κατά τη διάρκεια της ορομετατροπής, και δεν ταξινομούνται στην καθυστερημένη διάγνωση [32].



Εικόνα 7. Τα επίπεδα των CD4+ T κυττάρων και του ιικού RNA του HIV κατά τη λοίμωξη [33].

Στην όψιμη διάγνωση της μόλυνσης από HIV μπορεί να σταθεί ιδιαίτερα αποτελεσματική η Real-Time PCR, η οποία προσφέρει δυνατότητα εντοπισμού του HIV πολύ πιο πριν προκαλέσει ορομετατροπή, που για τις παραπάνω τεχνολογίες σαφώς είναι κύρια προϋπόθεση, και είναι μια πολύ ευαίσθητη μέθοδος που ταυτοποιεί λιγότερα από 20 ιικά αντίγραφα στο κλινικό δείγμα ενός φορέα του ιού, ενώ μπορεί να εντοπίσει πολλούς γονότυπους του HIV συνεπώς ελαττώνει κατά πολύ τα ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα. Ωστόσο, παρά τα πλεονεκτήματα, η εν λόγω μέθοδος χρειάζεται ειδικό εργαστηριακό εξοπλισμό και σωστά εκπαιδευμένο προσωπικό για την εκτέλεσή της, καθιστώντας έτσι δύσκολη την εφαρμογή της σε μεγάλη κλίμακα και σε όλες τις μονάδες υγείας [34, 35, 36].

1.2.2. Εργαλείο Παρακολούθησης της Αποτελεσματικότητας της Αντιρετροϊκής Θεραπείας

Η υψηλά ενεργή αντιρετροϊκή θεραπεία (*Highly Active Antiretroviral Therapy; HAART*) είναι ένα σχήμα θεραπευτικών αγωγών για τη διαχείριση και τη θεραπεία του ιού HIV-1. Βασικός στόχος της HAART είναι η ταυτόχρονη χορήγηση διαφορετικών φαρμάκων που αναστέλλουν την αντιγραφή του ιού μέσω διαφόρων μηχανισμών, ούτως ώστε η διάδοση του ιού που έχει αντοχή σε έναν μοναδικό παράγοντα, να αναστέλλεται μέσω της δράσης των άλλων δύο παραγόντων. Για τη θεραπεία του ιού, σήμερα υπάρχουν τουλάχιστον 25 διαφορετικά φάρμακα σε 6 διαφορετικές κατηγορίες. Στις βασικές κλάσεις αντιρετροϊκών φαρμάκων περιλαμβάνονται οι νουκλεοσιδική/ νουκλεοτιδική αναστολείς της αντίστροφης μεταγραφάσης, οι μη νουκλεοσιδική αναστολείς της αντίστροφης μεταγραφάσης, οι αναστολείς της πρωτεάσης, οι αναστολείς της ιντεγκράσης και οι αναστολείς εισόδου. Για τους περισσότερους φορείς του HIV, δίχως κάποια προηγούμενη θεραπεία, το πρότυπο περίθαλψης είναι ένας συνδυασμός δύο νουκλεοσιδικών αναστολών αντίστροφης μεταγραφάσης και ενός μη νουκλεοσιδικού αναστολέα της αντίστροφης μεταγραφάσης ή αναστολέα ιντεγκράσης. [37].

Στην HAART, τόσο πριν την έναρξή της, όσο και στη διάρκειά της, είναι υψίστης σημασίας η μέτρηση του φορτίου του HIV. Το ιικό φορτίο του φορέα πριν την έναρξη της HAART αναφέρεται ευρέως ως αρχικό ιικό φορτίο (*baseline viral load*), και είναι ισχυρός παράγοντας της πορείας της νόσου σε άτομα μολυσμένα με τον HIV. Η γρηγορότερη ελάττωση των CD4+ T κυττάρων και ο αυξημένος κίνδυνος σποραδικών μολύνσεων, όπως και η χαμηλότερη αποτελεσματικότητα της HAART είναι συνδεδεμένα με την ύπαρξη μεγάλου αριθμού αντιγράφων του γενώματος του HIV. Ορισμένες πηγές της υπάρχουσας βιβλιογραφίας μαρτυρούν ότι άτομα με μεγαλύτερο αρχικό ιικό φορτίο είχαν αυξημένο ρίσκο για γρήγορη πρόοδο της νόσου καθώς επίσης και αυξημένη θνητότητα [38]. Το ιικό φορτίο ίσως είναι βιοδείκτης του πιθανού κινδύνου μετάδοσης της μόλυνσης HIV και σε άλλα άτομα [39]. Άλλα βιβλιογραφικά στοιχεία καταδεικνύουν πως οι φορείς που έχουν ελαττωμένο ιικό φορτίο έχουν επίσης και μικρότερη πιθανότητα μετάδοσης του ιού κατά την σεξουαλική επαφή στους σεξουαλικούς συντρόφους τους [40]. Η μέτρηση της συγκέντρωσης των CD4+ κυττάρων και η μέτρηση του φορτίου του HIV μέσω *real-time RT-PCR* αποτελούν κύρια εργαλεία παρακολούθησης της εξέλιξης της μόλυνσης στους φορείς, και αφού ξεκινήσει η HAART πραγματοποιείται τακτικός έλεγχος ιικού φορτίου για να αξιολογηθεί η αποτελεσματικότητά της κατά την καταστολή του ιού, ενώ τα κοινά διαστήματα είναι η 4η εβδομάδα μετά την εκκίνηση της HAART, έπειτα η 12η εβδομάδα, η 24η εβδομάδα και η 36η εβδομάδα –όπου ολοκληρώνεται έτσι ο πρώτος κύκλος, ενώ, μετέπειτα, ο φορέας του ιού παρακολουθείται ανά εξάμηνο. Μια ουσιαστική ελάττωση του φορτίου του ιού από το πρώτο στάδιο –δηλαδή από την πρώτη και τη δεύτερη μέτρηση, δείχνει θετική ανταπόκριση στη θεραπεία. Σκοπός της HAART είναι η ελάττωση του φορτίου του ιού νωρίς ήδη από την πρώιμη φάση της μόλυνσης και η διατήρησή του, σε επίπεδα βάσει του εκάστοτε πρωτοκόλλου που ακολουθείται [40]. Τέλος, θα πρέπει να σημειωθεί και το γεγονός, πως, το ιικό φορτίο έχει σταθεί ο βασικότερος παράγοντας εκτίμησης του ρίσκου για μετάδοση του HIV-1 σε ζευγάρια, ωστόσο η μετάδοση αυτή έχει βρεθεί να είναι σπάνια μεταξύ φορέων που έχουν <1.500 αντίγραφα του RNA του HIV-1/ ml πλάσματος [41].

1.3. Εργαστηριακές μέθοδοι μέτρησης του ιικού φορτίου HIV-1 RNA

Μόλις πρωτοξεκίνησε η επιδημία του AIDS, για την ποσοτική μέτρηση του φορτίου του ιού αξιοποιήθηκαν καλλιέργειες μονοπύρηνων κυττάρων από το περιφερικό αίμα των φορέων του HIV. Η διαδικασία στηρίζεται στην καλλιέργεια των εν λόγω κυττάρων από μολυσμένο ασθενή που διεγείρονται από φυτοαιμοσυγκολλητίνη οροαρνητικών δοτών, οι οποίοι προσφέρουν ευαίσθητα κύτταρα-στόχους για την αντιγραφή του ιού, ο οποίος μπορεί να απομονωθεί είτε από τον κύριο πληθυσμό των κυττάρων είτε έπειτα από κλωνοποίησή τους προς τη λήψη βιολογικών κλώνων του HIV. Ο προσδιορισμός του HIV επιτελείται είτε μέσω της αντίστροφης μεταγραφής του καψιδιακού αντιγόνου p24 του ιού είτε με μια δοκιμασία δραστηριότητας της αντίστροφης μεταγραφής, ενώ, αφού απομονωθεί, ο ιός μπορεί να πολλαπλασιαστεί και να μολύνει τα διεγερμένα μονοπύρηννα κύτταρα των καλλιεργειών από υγιείς δότες, και τα δείγματα από καλλιέργεια που εμφανίζουν υψηλή παραγωγή του ιού αποθηκεύονται στην κατάψυξη για μελλοντική χρήση [42]. Παρ' όλ' αυτά, η δυσχέρεια της συγκεκριμένης μεθόδου, η απουσία επαναληψιμότητας, καθώς επίσης και η ύπαρξη αρνητικών αποτελεσμάτων σε φορείς του ιού με <200 CD4+ T κύτταρα/ mm³ οδήγησαν στην εύρεση άλλων μεθόδων με μεγαλύτερη ακρίβεια αλλά και αξιοπιστία, και στην δημιουργία τεχνολογιών μέτρησης του φορτίου του HIV [42].

Η πρώτη διαθέσιμη μοριακή μέθοδος για την ταυτοποίηση του ιικού φορτίου ήταν εμπορικά διαθέσιμη από το 1996, ενώ, έως τώρα, είναι εγκεκριμένες πολλές διαφορετικές NAATs, όπως η real time RT-PCR, η τεχνολογία του διακλαδισμένου DNA (*Branched DNA; bDNA*) και η ενίσχυση νουκλεϊκών οξέων με τη μεσολάβηση μεταγραφής (*Transcription Mediated Amplification; TMA*). Κάθε τέτοια μέθοδος ίσως παρουσιάζει διαφορές ως προς τα τεχνικά χαρακτηριστικά αυτής (γονίδια-στόχοι, απαιτούμενος χρόνος πλάσματος, περιοχές ανίχνευσης, χρόνος εκτέλεσης της δοκιμασίας, κ.λπ.) και τη μεθοδολογία, ωστόσο, το τελικό αποτέλεσμα εκφράζεται κατά σύμβαση είτε ως αντίγραφα του RNA είτε ως log₁₀ /ml πλάσματος [42].

Η ευρέως διαδεδομένη real time RT-PCR (που χρησιμοποιεί και το EKAANE) μετρά το φορτίο του HIV στο πλάσμα των φορέων, και η αρχή της εν λόγω μεθόδου βασίζεται αρχικά στην μετατροπή του RNA του HIV σε cDNA διαμέσου της αντίστροφης μεταγραφής, και στη συνέχεια, το cDNA ενισχύεται μέσω της PCR με τη βοήθεια ειδικών για τον ιό ζευγών εκκινητών, με προέλευση εκ των μακρών επαναλαμβανόμενων τερματικών ακολουθιών (*Long Terminal Repeats; LTRs*) από γονιδιακές περιοχές των γονιδίων gag, env και pol, και χρειάζονται 40 κύκλοι για την ενίσχυση του cDNA με συγκριμένα στάδια: (α) αποδιάταξη του δίκλωνου μορίου cDNA μέσω αύξησης της θερμοκρασίας, (β) υβριδοποίηση των ζευγών εκκινητών με ελάττωση της θερμοκρασίας, και (γ) επιμήκυνση των εκκινητών και σύνθεση της καινούριας αλυσίδας του DNA με τη βοήθεια της Taq DNA pol μέσω αύξησης της θερμοκρασίας [42].

Η PCR πλεονεκτεί έναντι των ανοσοδοκιμασιών όσον αφορά τον χρόνο που απαιτείται για την ανίχνευση του ιού. Ωστόσο, οι θερμοκυκλοποιητές αποτελούν ακριβό εξοπλισμό και απαιτούν εκπαιδευμένο προσωπικό που συχνά απουσιάζει από περιβάλλοντα εργασίας περιορισμένων πόρων. Επιπλέον, υπάρχουν

και άλλοι περιορισμοί, όπως η πιθανότητα ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων λόγω επιμόλυνσης και η έλλειψη κόστους-αποδοτικότητας [43]. Για την αντιμετώπιση των μειονεκτημάτων των δοκιμασιών που βασίζονται στην PCR, αναπτύχθηκαν πρόσφατα μέθοδοι ισοθερμικής ενίσχυσης, όπως η TMA και η NASBA. Η μέθοδος ισοθερμικής ενίσχυσης είναι μία διαδικασία ενίσχυσης ειδικής για αλληλουχίες όπου δεν απαιτείται θερμοκυκλοποιητής και μπορεί να πραγματοποιηθεί σε μία μόνο θερμοκρασία. Αυτό καθιστά τη διαδικασία απλούστερη και ταχύτερη (περίπου 15–60 λεπτά) από οποιαδήποτε άλλη μέθοδο που βασίζεται σε PCR [43]. Η αρχή της μεθόδου TMA βασίζεται, αρχικά, στη μετατροπή του RNA σε cDNA διαμέσου της αντίστροφης μεταγραφής, χρησιμοποιώντας την MMLV αντίστροφη μεταγραφάση, και μετά, τα μόρια cDNA χρησιμεύουν ως εκμαγεία για τη δημιουργία εκατοντάδων μορίων RNA (κλωνοποίηση του RNA), με τη βοήθεια της T7 RNA πολυμεράσης, σε σταθερή θερμοκρασία 41°C. Τέλος, το κλωνοποιημένο RNA ανιχνεύεται χρησιμοποιώντας ανιχνευτές ειδικούς για το HIV-1 γονιδίωμα και το ιικό φορτίο προσδιορίζεται με βάση τα σήματα ενίσχυσης σε σύγκριση με μια τυπική καμπύλη [44].

Πίνακας 1: Χαρακτηριστικά των κυρίων εμπορικά διαθέσιμων δοκιμασιών μέτρησης HIV-1 VL, κατάλληλων για χρήση σε κεντρικά εργαστήρια. Εγκεκριμένα από FDA, επισημασμένα “Conformite Europeene” (CE), και/ή WHO prequalified [44]

NATs Nucleic Acid Tests	Manufacturer & trade name	Viral genome region(s) detected	Plasma volume (ul)	VL range (copies/ml plasma)	Testing time	Random access modality	Dried Blood Spot utility
Polymerase chain reaction based assays - NAAT							
Real-time RT-PCR	Abbott RealTime	<i>int</i>	200 500 600 1,000	150-10 ⁷ 75-10 ⁷ 40-10 ⁷ 40-10 ⁷	7h	No	Yes
	Beckman Coulter DxN Veris	<i>pol</i>	175 1000	235- 1.06x10 ⁷ 35- 1.06x10 ⁷	1.5h	Yes	-
	Biocentric Generic HIV Charge Virale	<i>LTR</i>	250	390-5x10 ⁶	7h	No	Yes
	Cepheid GeneXpert Cartridge- based nucleic acid amplification test (CB- NAAT)	<i>LTR</i>	1000	40-10 ⁷	1.5h	Yes	Yes
	Qiagen Artus RG	<i>LTR</i>	200	45-4.5x10 ⁷	5h	No	-
	Roche Cobas CAP/CTM, v2.0	<i>LTR, gag</i>	1000	20-10 ⁷	7h	No	Yes
	Siemens Versant kPCR 1.5	<i>Pol</i>	500	35-11 x10 ⁷	6h	No	-

Isothermal amplification based assays - NAAT							
NASBA & TMA	bioMérieux NucliSENS Easy Q, v2.0 Nucleic acid sequence based amplification assay (NASBA)	gag	100	25-10 ⁸	2h	No	Yes
			500	20-2 x 10 ⁷			
(T7 RNA polymerase)	Hologic Aptima Quant Dx Transcription-mediated amplification assay (TMA)	LTR, pol	500	13-10 ⁷	3h	Yes	-
Signal amplification methodology - NAT							
Signal amplification	Siemens Versant bDNA, v3.0	pol	1000	75-500,000	7h	No	-

1.3.1. Σύγκριση μεταξύ των εμπορικά διαθέσιμων δοκιμασιών TMA και real-time RT-PCR

Μια μελέτη το 2022 σύγκρινε την επίδοση της δοκιμασίας Hologic Aptima Quant Dx (TMA) με τη δοκιμασία Abbott Real Time (Real-time RT-PCR) για την παρακολούθηση του ιικού φορτίου HIV-1 RNA, σε κλινικά δείγματα πλάσματος και δείγματα Dried Blood Spots (DBS) που συλλέχθηκαν από ασθενείς στην Κένυα. Επιπλέον, αξιολογήθηκε η σταθερότητα του HIV σε δείγματα DBS. Συνολικά, 436 δείγματα πλάσματος είχαν μετρήσιμα αποτελέσματα τόσο με τη δοκιμασία Hologic Aptima Quant Dx όσο και με τη δοκιμασία Abbott Real Time. Η συμφωνία μεταξύ των δύο δοκιμασιών στα 1000 αντίγραφα/mL πλάσματος ήταν 97,48% ($r = 0,9589$), (mean bias = 0,33 log αντίγραφα/mL). Για τα δείγματα DBS, η συμφωνία μεταξύ των δύο δοκιμασιών στα 1000 αντίγραφα/mL ήταν 94,64%, ($r=0,8692$), (mean bias = 0,35 log αντίγραφα/mL). Η συνολική συμφωνία μεταξύ των δειγμάτων DBS που αναλύθηκαν με το Hologic Aptima Quant Dx Assay την ημέρα 0 έναντι της ημέρας 21 ήταν 95,71%, με mean bias -0,154. Συμπερασματικά, η δοκιμασία Hologic Aptima Quant Dx είναι μια ακριβής μέθοδος για την παρακολούθηση του ιικού φορτίου HIV-1 RNA σε κλινικά δείγματα πλάσματος και DBS ασθενών στην Κένυα. Η επίδοση αυτής της δοκιμασίας ήταν ισοδύναμη με εκείνη της δοκιμασίας Abbott Real Time για την ποσοτικοποίηση του ιικού φορτίου στα δείγματα πλάσματος και δείγματα DBS. Σε αυτή τη μελέτη δόθηκε η δυνατότητα εξέτασης έως και 1000 δείγματα/ημέρα, χάριν της υψηλής απόδοσης, της τυχαίας πρόσβασης και του πλήρη αυτοματισμού που παρέχονται από την πλατφόρμα Panther. Αυτό καθιστά το Hologic Aptima Quant Dx στην πλατφόρμα Panther μια καλή λύση για κλινικά εργαστήρια που πρέπει να καλύψουν το χάσμα μεταξύ της τρέχουσας ικανότητας εξετάσεων HIV-1 και των στόχων UNAIDs. Μπορεί να βοηθήσει στην κάλυψη της αυξημένης ζήτησης των εξετάσεων στα εργαστήρια που εκτελούν μέτρηση του ιικού φορτίου HIV-1 RNA [45].

Η δοκιμασία Aptima HIV-1 Quant Dx είναι μια μέθοδος ιικού φορτίου HIV τελευταίας γενιάς, που χρησιμοποιεί το pol και το LTR ως τυχαίους στόχους, παρέχοντας ποσοτικά αποτελέσματα βασισμένα κυρίως στο pol, ενώ το LTR χρησιμοποιείται για την αναφορά των αποτελεσμάτων όταν απουσιάζει το σήμα

από pol. Στοιχεία μαρτυρούν πως η ιαμμία που βασίζεται σε LTR (μερικές φορές υπερβαίνει τα 1.000 αντίγραφα/mL) παρατηρήθηκε σε ένα μικρό ποσοστό (έως 1%) ασθενών υπό αντιρετροϊκή αγωγή, που θεωρήθηκαν κατά πολύ ιολογικά κατασταλαμένοι με βάση μεμονωμένα την ανάλυση pol. Οι άνδρες, >700 έναντι <200 CD4 κύτταρα/mL καθώς και η διπλή θεραπεία, συμπεριλαμβανομένης της NRTI συν είτε NNRTI, είτε PI/b ή INSTI, συσχετίστηκαν ανεξάρτητα με αυξημένο κίνδυνο ανίχνευσης ιικού φορτίου HIV-1 με βάση το LTR μέσω πολυμεταβλητής λογιστικής παλινδρόμησης. Ακόμη, παρατηρήθηκε σημαντική γραμμική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων RNA HIV-1 που βασίζονται σε LTR και στο προ-ϊικό DNA. Επιπλέον, σε μια μικρή ομάδα ασθενών με επίπεδα RNA HIV-1 >200 αντίγραφα/mL, οι διαχρονικές αξιολογήσεις έδειξαν παράλληλη κινητική μεταξύ της ιαμμίας του πλάσματος και του προϊικού DNA. Η αλληλούχιση του pol για την αξιολόγηση της αντοχής στο φάρμακο σε ασθενείς με ιαμμία που βασίζεται σε LTR απέτυχε στο RNA HIV-1 πλάσματος, ενώ ήταν επιτυχής στο προϊικό DNA. Η ανίχνευση/ποσοτικοποίηση της ιαμμίας HIV-1 με βάση μόνο το σήμα LTR με δοκιμασία διπλού στόχου σε δείγματα που δεν μπορούν να ανιχνευθούν με την πιο συμβατική pol στόχου χρειάζεται ακριβή αξιολόγηση. Η αποκάλυψη της βιολογικής βάσης αυτού του φαινομένου, που περιγράφεται εδώ για πρώτη φορά, είναι υποχρεωτική για τη διαπίστωση της συνάφειας και της σημασίας τόσο από παθογενετική όσο και από κλινική άποψη [46].

Σε μια άλλη έρευνα συγκρίθηκε η δοκιμασία Hologic Aptima Quant Dx (TMA) με τη δοκιμασία Abbott Real Time (Real-time RT-PCR), με τη δεύτερη να χρησιμοποιείται ως εξέταση ρουτίνας για τη μέτρηση του ιικού φορτίου, HIV-1 RNA, στο Νοσοκομείο Lazzaro Spallanzani στη Ρώμη. Σε μερικές περιπτώσεις η σύγκριση επεκτάθηκε και στη δοκιμασία Roche Cobas CAP/CTM, v2.0. Για την πλήρη κατανόηση της μεταβλητότητας και της συμφωνίας μεταξύ των αναλύσεων στο χαμηλό εύρος ιικού φορτίου, αναλύθηκαν αραιώσεις του 3ου Διεθνούς Προτύπου HIV-1 (WHO-IS), από 2.000 σε 31 αντίγραφα/ml (5.700–88 IU/ml) και κλινικά δείγματα (από 1.000 αντίγραφα/ml έως «μη ανιχνεύσιμο» HIV-1 RNA). Επιπλέον, η σύγκριση επικεντρώθηκε στην ανίχνευση και ποσοτικοποίηση πολλαπλών υποτύπων HIV-1, χρησιμοποιώντας κλινικά δείγματα και δύο πάνελ εξωτερικής αξιολόγησης ποιότητας: το WHO-ST (WHO 2nd International Reference Panel Preparation for HIV-1 Subtypes for NAT) και το QCMD (Quality Control for Molecular Diagnostics HIV-1 RNA EQA panel, Scotland, UK). Συμπερασματικά, η απόδοση της δοκιμασίας Hologic Aptima Quant Dx μπορεί να θεωρηθεί ισοδύναμη με εκείνη της δοκιμασίας Abbott Real Time που αποδεικνύει υψηλή αποτελεσματικότητα για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση όλων των τιμών ιικού φορτίου και όλων των κύριων μη- B υποτύπων HIV-1 και CRFs. Αξιοσημείωτα χαρακτηριστικά της δοκιμασίας Hologic Aptima Quant Dx είναι η αυξημένη ακρίβεια (accuracy) και επαναληψιμότητα (reproducibility), ακόμη και σε χαμηλές τιμές HIV RNA, και η φαινομενική υψηλότερη ευαισθησία (sensitivity) σε σύγκριση με τη δοκιμασία Abbott Real Time. Μαζί με την εξαιρετική απόδοση, είναι σημαντικό να τονιστεί η ευκολία χρήσης και η βελτιωμένη ροή εργασιών της δοκιμασίας Hologic Aptima Quant Dx στην πλήρως αυτοματοποιημένη πλατφόρμα Panther. Αυτό το σύστημα επιτρέπει την εξέταση τυχαίας πρόσβασης διαφόρων αναλυτών, που επεξεργάζονται έως και 275 δείγματα σε μια βάρδια 8 ωρών και την έκδοση των αποτελεσμάτων σε περίπου 2,5 ώρες. Αυτό επιτρέπει υψηλή ευελιξία για προσαρμογή σε χαμηλό ή υψηλό throughput testing. Σε συνδυασμό με τα δεδομένα κλινικής απόδοσης, αυτά τα

χαρακτηριστικά καθιστούν το Hologic Aptima HIV-1 Quant Dx Assay που εκτελείται στην πλατφόρμα Panther μια ελκυστική λύση για την τακτική παρακολούθηση του ιικού φορτίου HIV-1 RNA σε κλινικά εργαστήρια [47].

Σε μια ακόμη μελέτη συγκρίθηκε η επίδοση της δοκιμασίας Hologic Aptima Quant Dx (TMA) στην πλατφόρμα Panther με αυτή της δοκιμασίας Roche Cobas CAP/CTM, v2.0 (Real-time RT-PCR), χρησιμοποιώντας πάνελ HIV-1 για ειδικότητα, κίνδυνο διασταυρούμενης μόλυνσης, ευαισθησία, επαναληψιμότητα, γραμμικότητα και ευκολία χρήσης. Έγινε αξιολόγηση της κλινικής απόδοσης εξετάζοντας κλινικά δείγματα πλάσματος που εξετάστηκαν είτε αναδρομικά είτε προοπτικά και στις δύο δοκιμασίες. Η ανάλυση probit των αντιγράφων αραιώσεων του NIBSC του ΠΟΥ του παγκοσμίου στάνταρ για τον HIV-1, έδωσε LOD 8,6 copies/ml για το Aptima και 15,2 c/ml για το CAP/CTM. Η συμφωνία μεταξύ των δοκιμασιών ήταν εξαιρετική κατά τη μέτρηση του HIV RNA σε βαθμονομημένη αναφορά ($\kappa = 0,90$, $p < 0,001$) και καλή κατά τη μέτρηση κλινικών δειγμάτων ($\kappa = 0,62$, $p < 0,001$). Η συσχέτιση μεταξύ των δειγμάτων που ποσοτικοποιήθηκαν με τις δύο μεθόδους ήταν πολύ καλή ($r = 0,95$, $p < 0,001$) και η μέση διαφορά μεταξύ των τιμών που ελήφθησαν με τις δύο δοκιμασίες ήταν 0,02 log c/ml για τους υποτύπους B και μη. Η συντριπτική πλειοψηφία των αποτελεσμάτων έδειξε $< 0,5$ λογαριθμική διακύμανση μεταξύ των δύο δοκιμασιών (89%). μόνο ένα δείγμα έδειξε αποτελέσματα που διέφεραν κατά πάνω από 1,0 log c/ml. Συμπερασματικά, η συγκριτική αυτή μελέτη επισημάνει τις εξαιρετικές τεχνικές επιδόσεις της δοκιμασίας Hologic Aptima Quant Dx για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό των HIV-1 RNAs όλων των κύριων υποτύπων της ομάδας M, και αυτό ενισχύεται από τον αυτοματισμό δείγματος προς αποτέλεσμα που παρέχεται από την πλατφόρμα Panther. Η επίδοση της νέας πλήρως αυτοματοποιημένης δοκιμασίας Hologic Aptima Quant Dx είναι επαρκής για την κλινική παρακολούθηση του ιικού φορτίου HIV-1 RNA κατά τη διάρκεια λοιμώξεων και θεραπείας. Η δοκιμασία αυτή είναι κατάλληλη για εργαστηριακή χρήση ρουτίνας [48].

1.3.2 Σύγκριση μεταξύ των μεθόδων RT-PCR, bDNA και NASBA

Μια μελέτη του 1996 που αξιολόγησε τις ίδιες μεθόδους συγκριτικά για την ποσοτικοποίηση του RNA του HIV-1 στο πλάσμα του αίματος των φορέων, έδειξε πως μεταξύ 60 δειγμάτων από φορείς ανιχνεύτηκε το HIV-1 RNA σε 56 από την RT-PCR (ευαισθησία, 93,3%), σε 41 από το bDNA (ευαισθησία, 68,3%) και σε 60 από το NASBA (ευαισθησία, 100%). Το RNA του HIV-1 δεν ανιχνεύθηκε με καμία από αυτές τις μεθόδους σε 34/34 δείγματα πλάσματος από αρνητικούς σε δοκιμασίες αντισωμάτων αντι-HIV-1 αιμοδότες (ειδικότητα, 100%). Επιπροσθέτως, τα επίπεδα του ιικού RNA όπως προσδιορίστηκαν με τις εν λόγω μεθόδους έδειξαν μεγάλες συσχετίσεις, και η συχνότητα των αντίστοιχων αποτελεσμάτων ήταν 80,4% μεταξύ της RT-PCR και της NASBA, 77,5% μεταξύ RT-PCR και bDNA, και 58,6% μεταξύ bDNA και NASBA. Μετά την έναρξη της HAART, οι διακυμάνσεις του επιπέδου του ιικού RNA που παρατηρήθηκαν με τις τρεις μεθόδους φάνηκαν να είναι παρόμοιες. Τα επίπεδα RNA του HIV-1 συσχετίστηκαν αντιστρόφως με τον αριθμό των CD4+ T κυττάρων, ενώ δεν βρέθηκε σημαντική συσχέτιση με τα επίπεδα του καριδιακού αντιγόνου p24 του HIV-1. Ακόμη, όταν εκτιμήθηκαν οι εν λόγω μέθοδοι ως προς την αναπαραγωγικότητα,

οι συντελεστές διακύμανσης κυμαίνονταν μεταξύ 11-40% για την RT-PCR, μεταξύ 6-35% για το bDNA και μεταξύ 13-62% για το NASBA. Η ποσοτικοποίηση του RNA του ιού σε υπερκείμενα καλλιέργειας από στελέχη HIV-1 υποτύπων A έως και H, έδειξε ότι το bDNA μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον ποσοτικό προσδιορισμό του RNA από όλους τους υποτύπους HIV-1, ενώ η RT-PCR απέτυχε να ανιχνεύσει RNA από στελέχη του υποτύπου A και η NASBA απέτυχε να εντοπίσει τα στελέχη του υποτύπου G [49].

Μια μελέτη του 2007 που σύγκρινε τις τρεις διαφορετικές αναλύσεις, RT-PCR, bDNA και NASBA, για την ομάδα των 16 θετικών δειγμάτων HIV-1, η τιμή φορτίου του ιού ήταν υψηλότερη για την real time RT-PCR, ακολουθούμενη από το bDNA και μετά από το NASBA. Οι τρεις δοκιμές ικού φορτίου έτσι βρέθηκαν να είναι κατά πολύ συνδεδεμένες με τη κυκλοφορία της ανασυνδυασμένης μορφής BC του HIV-1 RNA στην Κίνα [50].

Σε έρευνα του 2009, από τους 4500 ασθενείς της κλινικής, συμπεριλήφθηκαν 419 ασθενείς (1588 ικά φορτία) όπου το 39% των ικών φορτίων αναφέρθηκαν ως ανιχνεύσιμα με RT-PCR έναντι 5% ως ανιχνεύσιμα από την τεχνολογία bDNA, με τον μέσο συντελεστή διακύμανση να είναι υψηλότερος πριν από την αλλαγή της ανάλυσης, ενώ βρέθηκε και μια αναλογία πιθανοτήτων 16,7 για ικό φορτίο >75 αντίγραφα/ml κατά τις περιόδους της RT-PCR έναντι της τεχνολογίας bDNA. Αυτά τα δεδομένα υποστηρίζουν και προηγούμενες αναφορές, υποδηλώνοντας ότι η τεχνολογία bDNA μπορεί να κάνει πιο αξιόπιστη διάκριση μεταξύ καταστολής του ιού και του χαμηλού επιπέδου ιαμίας σε σταθερούς ασθενείς σε θεραπεία. Η ιαμία χαμηλού επιπέδου, που σημειώνεται περισσότερο με την RT-PCR, μπορεί να προάγει τις μη απαραίτητες δοκιμές, ενώ οι διαφορές που παρατηρήθηκαν ως προς την αξιοπιστία του ικού φορτίου ίσως επηρεάσουν τις αντιετροϊκές δοκιμές και τα τελικά σημεία διασφάλισης ποιότητας. Τέλος, επισημαίνεται πως οι σωλήνες διαχωρισμού του πλάσματος που χρησιμοποιούνται συνήθως ενδέχεται να επηρεάσουν διαφορετικά τα αποτελέσματα της RT-PCR και της τεχνολογίας bDNA [51].

Πιο πρόσφατα δεδομένα, του 2014, μαρτυρούν, πως, τα αποξηραμένα δείγματα αίματος είναι μια καλή εναλλακτική λύση συγκριτικά με τα δείγματα πλάσματος για τη μέτρηση του φορτίου του HIV-1, και τόσο η RT-PCR όσο και η NASBA είχαν σημαντικά αποτελέσματα στα πρώτα δείγματα, τόσο για τους υποτύπους B όσο και για τους μη B, όπου σωστά εντοπίστηκε η αποτυχία της θεραπείας στο νέο όριο του ΠΟΥ των 1.000 αντιγράφων/ml, ωστόσο η ανάλυση NASBA έδειξε καλύτερη ειδικότητα από την RT-PCR [52].

Ωστόσο, θα πρέπει να τονιστεί, πως σε τέτοιες συγκριτικές μελέτες παίζουν ρόλο πολλοί παράγοντες, που έχουν να κάνουν με την χρησιμοποιούμενη μέθοδο και τους περιορισμούς της, την εφαρμογή της από το προσωπικό, αλλά και τις συνθήκες έκαστου συμμετέχοντα φορέα του HIV. Χρειάζονται νέες τέτοιες μελέτες και πρόσφατες, διότι δεν υπάρχουν συγκριτικά δεδομένα και για τις τρεις μεθόδους στην παρούσα φάση, όμως θα πρέπει να ληφθούν υπ' όψιν πολλοί παράγοντες, όπως έχει ήδη αναφερθεί, οι οποίοι επηρεάζουν σημαντικά το τελικό αποτέλεσμα [23, 28, 29]. Βέβαια, το τελευταίο διάστημα η επιστήμη έχει επικεντρωθεί στην PCR, και πολλές μελέτες συγκρίνουν την κλασική RT-PCR με πιο εξελιγμένες μορφές της, ωστόσο, το να γίνει σύγκριση μεταξύ διαφόρων test kits διαφόρων εταιρειών ίσως δεν είναι τόσο ωφέλιμο, διότι δεν υπάρχει κοινός παρανομαστής στις ποικίλες λιγοστές μελέτες, και ακόμη, κάθε οδηγός εφαρμογής του εκάστοτε test kit έχει τις δικιές του οδηγίες και τους δικούς του περιορισμούς ως προς τους πιθανούς φορείς.

Θα ήταν λοιπόν, εξαιρετικά ωφέλιμο, να υπάρξουν μελέτες όπου συγκρίνουν τις ίδιες μεθόδους στους ίδιους ασθενείς, ώστε να υπάρχει κοινός παρανομαστής, ή ακόμη και των ίδιων μεθόδων τα διάφορα test kits των εταιρειών –οστόσο στους ίδιους ασθενείς και από τα ίδια δείγματα, υπό τις ίδιες συνθήκες, και μάλιστα με αρκετές παραμέτρους, έτσι ώστε να αποφευχθεί η πιθανότητα του ψεύδους ή μιας διαφοροποιημένης ποσότητας ιικών αντιγράφων. Από την άλλη, θα πρέπει να τονιστεί πως δεν είναι το ζήτημα να συγκριθεί μια εταιρεία με μια άλλη, αλλά να εφαρμοστεί άριστα ένα τεστ σύμφωνα με όλες τις παραμέτρους του, προς ένα πιο άρτιο τελικό αποτέλεσμα –κάτι που μας δίδαξε η πρόσφατη πανδημία της COVID-19.

2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1. Σκοπός

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η μέτρηση του ιικού φορτίου HIV-1 RNA, με τη χρήση της μεθόδου TMA, σε άτομα που ζουν με τον ιό HIV και λαμβάνουν αντιρετροϊκή θεραπεία, καθώς και σε άτομα με νεοδιαγνωσθείσα λοίμωξη. Η έρευνα επικεντρώνεται στα δείγματα που απεστάλησαν για εξέταση στο ΕΚΑΑΝΕ από νοσοκομειακές μονάδες της Αττικής και αποσκοπεί περαιτέρω στη συσχέτιση των μετρήσεων του ιικού φορτίου με ορισμένα δημογραφικά χαρακτηριστικά, όπως το φύλο, η ηλικία, η εθνικότητα και η ομάδα κινδύνου.

2.2. Υλικά & Εξοπλισμός

Για τη διεξαγωγή της πειραματικής πορείας χρησιμοποιήθηκαν υλικά και εξοπλισμός που αφορούσαν στο διαχωρισμό πλάσματος από ολικό αίμα και στον ποσοτικό προσδιορισμό του ιικού φορτίου HIV-1 RNA με τη μέθοδο Real-Time TMA στην πλήρως αυτοματοποιημένη πλατφόρμα Panther® System. Πιο συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν τα εξής αναλώσιμα, αντιδραστήρια και εργαστηριακός εξοπλισμός:

- Πιπέτες (P1000, P200, P20, and P10) και ρύγχη με φίλτρο
- Ψυχόμενη φυγόκεντρος 24 θέσεων (Hettich Universal 32R)
- Σωληνάρια πλάσματος
- Δευτερεύοντα σωληνάρια πλάσματος (secondary tubes)
- Πλήρως αυτοματοποιημένη πλατφόρμα Panther® System
- Εμπορικά διαθέσιμο σετ αντιδραστηρίων Aptima™ HIV-1 Quant Dx Assay της Hologic
- Universal fluids για την πλατφόρμα Panther® System
- Ρύγχη πλατφόρμας Panther® System
- Σωληνάρια αντιδράσεων (MTUs)

Στον Πίνακα 2 παρουσιάζεται αναλυτικά το σετ αντιδραστηρίων Aptima™ HIV-1 Quant Dx Assay της εταιρείας Hologic. Αναγράφονται επίσης, οι συνθήκες αποθήκευσης τους (storage), η χρονική διάρκεια διατήρησης της σταθερότητας τους μετά την ανασύσταση (stability), η χρονική διάρκεια διατήρησης της σταθερότητας τους επί της αυτοματοποιημένης πλατφόρμας Panther (on-board stability) και η επάρκεια αντιδράσεων/επαναχρήσεων τους (reactions/loads).

Πίνακας 2. Αναλυτική περιγραφή του σετ αντιδραστηρίων Aptima™ HIV-1 Quant Dx Assay της εταιρείας Hologic					
Reagent	Stability	On-board stability	Storage	Reactions/Loads	
qHIV-1 Amplification Reagent (Reconstituted)	30 days	72 hrs	2oC to 8oC	100 Total Reactions/ 5 Loads	
qHIV-1 Enzyme Reagent (Reconstituted)	30 days	72 hrs	2oC to 8oC	100 Total Reactions/ 5 Loads	
qHIV-1 Promoter Reagent (Reconstituted, Photosensitive)	30 days	72 hrs	2oC to 8oC	100 Total Reactions/ 5 Loads	
qHIV-1 Target Capturagent	30 days	72 hrs	2oC to 8oC	100 Total Reactions/ 5 Loads	
qHIV-1 NC CONTROL – 1 replicate tested	Valid for 24 hours – Single use		15°C to 30°C	Consumes 1 reaction	
qHIV-1 LPC CONTROL – 1 replicate tested	Valid for 24 hours – Single use		15°C to 30°C	Consumes 1 reaction	
qHIV-1 HPC CONTROL – 1 replicate tested	Valid for 24 hours – Single use		15°C to 30°C	Consumes 1 reaction	
qHIV-1 PCAL – 3 replicates tested	Valid for 24 hours – Single use If only 1 valid replicate →run invalid		15°C to 30°C	Consumes 3reactions	

2.3. Μεθοδολογία

2.3.1. Επιλογή & προετοιμασία δειγμάτων

Η διαδικασία επιλογής δειγμάτων προς εξέταση μέτρησης ιικού φορτίου πραγματοποιήθηκε αποκλειστικά από αιμοληψίες που διενεργήθηκαν σε νοσοκομειακές μονάδες εντός της περιφέρειας Αττικής. Οι αιμοληψίες αυτές πραγματοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια τακτικής εργαστηριακής παρακολούθησης ατόμων που ζουν με τον ιό HIV (people with HIV, PWH) που λαμβάνουν αντιρετροϊκή θεραπεία, καθώς επίσης και κατά τη διαδικασία αρχικού εργαστηριακού ελέγχου ατόμων με νεοδιαγνωσθείσα HIV λοίμωξη. Οι γενικές αίματος που απεστάλησαν για εξέταση στο ΕΚΑΑΝΕ τηρούσαν υπό όλες τις συνθήκες διασφάλισης της σταθερότητας και ακεραιότητας του πλάσματος.

Η εξέταση μέτρησης ιικού φορτίου πραγματοποιήθηκε 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 της μιας ημέρας χρονικό διάστημα.

2.3.2. Συλλογή δημογραφικών χαρακτηριστικών

Για τα επιλεγμένα δείγματα πλάσματος, συλλέχθηκαν συγκεκριμένα δημογραφικά χαρακτηριστικά από το αρχείο του ΕΚΑΑΝΕ. Η συλλογή των δεδομένων έγινε με βάση τον αριθμό παραπεμπτικού που αντιστοιχεί σε κάθε δείγμα, διασφαλίζοντας έτσι την ακριβή ταύτιση των πληροφοριών με τα αντίστοιχα δείγματα πλάσματος. Τα δεδομένα που καταγράφηκαν περιλάμβαναν το φύλο, την ηλικία, την εθνικότητα και τον κίνδυνο απόκτησης του κάθε ασθενή. Τα στοιχεία αυτά συλλέχθηκαν και καταχωρήθηκαν με τρόπο που διασφαλίζει την προστασία των προσωπικών δεδομένων και την ανωνυμία των συμμετεχόντων.

2.3.3. Μέτρηση ιικού φορτίου HIV-1 RNA με Real-Time TMA

Για τη μέτρηση του ιικού φορτίου, HIV-1 RNA, χρησιμοποιήθηκε το εμπορικά διαθέσιμο σετ αντιδραστηρίων Aptima™ HIV-1 Quant Dx Assay της εταιρείας Hologic και η πλήρως αυτοματοποιημένη πλατφόρμα Panther® System. Το συγκεκριμένο σετ αντιδραστηρίων παρέχει την δυνατότητα απομόνωσης RNA από το πλάσμα ασθενών με λοίμωξη HIV, χρησιμοποιώντας την τεχνολογία σύλληψης στόχων (target capture), ακολουθούμενο από ενίσχυση των περιοχών LTR και pol του HIV-1 RNA (target amplification by TMA) και ανίχνευση των προϊόντων ανίχνευσης με τη χρήση ανιχνευτών φθορισμού (detection of amplicons by torches) [48]. Τα τρία παραπάνω στάδια της εξέτασης, πραγματοποιούνται σε ένα δοκιμαστικό σωλήνα στην πλατφόρμα Panther® System.



Εικόνα 8. Αντιδραστήρια Aptima™ HIV-1 Quant Dx Assay της εταιρείας Hologic και η πλήρως αυτοματοποιημένη πλατφόρμα Panther® System

Τα βήματα της εξέτασης μέτρησης ιικού φορτίου με τη μέθοδο TMA παρατίθενται αριθμητικά παρακάτω και στη συνέχεια ακολουθεί μια πιο λεπτομερής περιγραφή του προαναλυτικού και αναλυτικού σταδίου της εξέτασης και της ερμηνείας των αποτελεσμάτων

I. Προαναλυτικό στάδιο εξέτασης

- I.1.** Προετοιμασία σετ αντιδραστηρίων Aptima™ HIV-1 Quant Dx Assay
- I.2.** Προετοιμασία πλατφόρμας Panther® System
- I.3.** Ποιοτικός έλεγχος (quality control)
- I.4.** Φόρτωση δειγμάτων στην πλατφόρμα Panther® System

II. Αναλυτικό στάδιο εξέτασης

- II.1** Απομόνωση νουκλεϊκού οξέος (target capture)
- II.2** Ενίσχυση του HIV-1 RNA (target amplification by TMA)
- II.3** Ανίχνευση προϊόντων ενίσχυσης & ποσοτικοποίηση (detection of amplicons by torches)

III. Ερμηνεία & καταγραφή αποτελεσμάτων

II.

Προετοιμασία σετ αντιδραστηρίων Aptima™ HIV-1 Quant Dx Assay

Όλα τα αντιδραστήρια πρέπει να φτάσουν θερμοκρασία 15°C έως 30°C πριν τη χρήση τους. Συγκεκριμένα, τα αντιδραστήρια ενίσχυσης, ενζύμων και υποκινητών (Amplification, Enzyme, and Promoter Reagents) χρειάζονται επιπλέον ανασύσταση, καθώς βρίσκονται σε λυοφιλοποιημένη αρχικά μορφή. Για την αποφυγή δημιουργίας μη-έγκυρων αποτελεσμάτων στην αυτοματοποιημένη πλατφόρμα Panther®System, είναι πολύ σημαντικό να τηρηθούν οι απαραίτητοι χρόνοι ανασύστασης και επιθυμητής θερμοκρασίας των αντιδραστηρίων, πριν τη χρήση τους.

Προετοιμασία πλατφόρμας Panther®System

Πριν τεθεί σε λειτουργία η αυτοματοποιημένη πλατφόρμα Panther®System, γίνεται έλεγχος όλων των ενδείξεων εργασιών συντήρησης του μηχανήματος και ολοκλήρωση αυτών σε περίπτωση εκκρεμότητας. Η συχνότητα εργασιών συντήρησης ποικίλει από μηνιαία συντήρηση (monthly maintenance), εβδομαδιαία συντήρηση (mag wash, change of sample shield) έως και συντήρηση ημερησίως πριν το μηχάνημα τεθεί σε λειτουργία (prime instrument). Τέλος, ελέγχεται πριν και καθ' όλη τη διάρκεια λειτουργίας της πλατφόρμας ότι υπάρχει επάρκεια αναλωσίμων, όπως ρύγχη και σωληνάρια αντιδράσεων.

Ποιοτικός έλεγχος (quality control)

Για την διασφάλιση της εγκυρότητας των αποτελεσμάτων, πρέπει αρχικά να ολοκληρωθεί η βαθμονόμηση της εξέτασης (assay calibration) και να αναλυθούν οι μάρτυρες (negative control NC, low positive control LPC and high positive control HPC). Ένας μόνο θετικός βαθμονομητής (positive calibrator PCAL) εκτελείται εις τριπλούν κάθε φορά που φορτώνεται ένα σετ αντιδραστηρίων Aptima™ HIV-1 Quant Dx Assay στην πλατφόρμα Panther®System. Ταυτόχρονα με τον θετικό βαθμονομητή, αναλύονται και ο αρνητικός μάρτυρας, ο θετικός μάρτυρας χαμηλού επιπέδου και ο θετικός μάρτυρας υψηλού επιπέδου σε μονές αντιδράσεις. Μόλις ολοκληρωθεί η βαθμονόμηση και η ανάλυση των μαρτύρων, η ισχύς τους διαρκεί για έως και 24 ώρες. Κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας, τα κριτήρια αποδοχής του βαθμονομητή και των μαρτύρων επαληθεύονται αυτόματα από το λογισμικό στο μηχάνημα. Εάν είναι έγκυρη μόνο η μία από τις τρεις αντιδράσεις του θετικού βαθμονομητή, το λογισμικό ακυρώνει αυτόματα την εκτέλεση της βαθμονόμησης. Αναφορικά με τους μάρτυρες, ο αρνητικός μάρτυρας πρέπει να δώσει αποτέλεσμα "Not Detected" και οι θετικοί μάρτυρες πρέπει να δώσουν αποτελέσματα εντός προκαθορισμένων παραμέτρων (LPC Target: ~ 3 Log₁₀ c/mL, HPC Target: ~ 5 Log₁₀ c/mL). Εάν κάποιος από τους μάρτυρες έχει μη έγκυρο αποτέλεσμα, το λογισμικό ακυρώνει αυτόματα την ανάλυση των μαρτύρων. Για το λόγο αυτό και ώστε να μη σπαταληθούν αντιδράσεις από το σετ αντιδραστηρίων Aptima™ HIV-1 Quant Dx Assay, επιλέγεται να ολοκληρωθεί πρώτα η βαθμονόμηση και η ανάλυση των μαρτύρων και στη συνέχεια να φορτωθούν τα δείγματα στην πλατφόρμα προς εξέταση μέτρησης ιικού φορτίου [53].

Απομόνωση νουκλεϊκού οξέος (target capture)

Το σύστημα Panther® ξεκινά με την απομόνωση νουκλεϊκού οξέος από τα δείγματα πλάσματος ασθενών, το οποίο περιλαμβάνει τη λύση των κυττάρων και την απελευθέρωση του ιϊκού RNA. Το δείγμα επεξεργάζεται με απορρυπαντικό για τη διαλυτοποίηση του ιικού φακέλου, τη μετουσίωση πρωτεϊνών και την απελευθέρωση ιικού γενωμικού RNA. Ολιγονουκλεοτίδια σύλληψης υβριδοποιούνται σε εξαιρετικά

διατηρημένες περιοχές του HIV-1 γονιδιώματος, εάν υπάρχει, στο δείγμα προς εξέταση. Στη συνέχεια, ο υβριδικός στόχος συλλαμβάνεται σε μαγνητικά μικροσωματίδια που διαχωρίζονται από το δείγμα σε μαγνητικό πεδίο. Αφού συλληφθούν τα μαγνητικά σωματίδια, το υγρό υπερκείμενο, που περιέχει άχρηστα κυτταρικά υπολείμματα και πρωτεΐνες, απομακρύνεται. Ύστερα, τα μαγνητικά σωματίδια υποβάλλονται σε πολλαπλά βήματα πλύσεων με κατάλληλα ρυθμιστικά διαλύματα για την απομάκρυνση τυχόν προσμείξεων και για να διασφαλιστεί ότι μόνο το ιϊκό RNA παραμένει προσδεμένο στα σωματίδια. Μετά τις πλύσεις, τα μαγνητικά σωματίδια απελευθερώνουν το δεσμευμένο HIV-1 RNA το οποίο είναι έτοιμο για το επόμενο στάδιο της ανάλυσης, δηλαδή την ενίσχυση μέσω της μεθόδου TMA [53].

Ενίσχυση των στόχων HIV-1 RNA με TMA (target amplification by TMA)

Το σετ αντιδραστηρίων Aptima HIV-1 Quant Dx χρησιμοποιεί τη μέθοδο TMA για την ενίσχυση δύο περιοχών του HIV-1 RNA, pol και LTR. Ένα ανεξάρτητο σήμα παράγεται από την ενίσχυση κάθε περιοχής χρησιμοποιώντας ειδικούς εκκινητές, οι οποίοι έχουν σχεδιαστεί για να ενισχύουν τις ομάδες HIV-1 M, N και O. Η TMA βασίζεται στη δράση δύο ένζυμων, την αντίστροφη μεταγραφάση από τον ιό λευχαιμίας ποντικού Moloney (MMLV) και την T7 RNA πολυμεράση. Η αντίστροφη μεταγραφάση χρησιμοποιείται για τη δημιουργία συμπληρωματικού DNA (cDNA) της αλληλουχίας-στόχου, όπου εμπεριέχεται αλληλουχία υποκινητή για την T7 RNA πολυμεράση. Η αντίστροφη μεταγραφάση έχει επίσης και δράση RNase-H για την υδρόλυση του RNA από το υβριδικό μόριο RNA-cDNA. Εφόσον το υβριδικό μόριο RNA-cDNA υδρολυθεί, το μονόκλωνο cDNA μετατρέπεται σε δίκλωνο DNA, ώστε να ξεκινήσει η μεταγραφή με τη δράση της T7 RNA πολυμεράσης, η οποία παράγει πολλαπλά αντίγραφα RNA, γεγονός που οδηγεί σε εκθετική αύξηση της ποσότητας του στόχου RNA. Αυτά τα αντίγραφα RNA που παράγονται, μπορούν να λειτουργήσουν ξανά ως πρότυπο για την αντίστροφη μεταγραφή σε cDNA και μεταγραφή ξανά σε RNA. Αυτή η κυκλική διαδικασία επαναλαμβάνεται, σε ισοθερμική συνθήκη των 41oC, οδηγώντας σε εκθετική αύξηση της ποσότητας του RNA [53].

Ανίχνευση προϊόντων ενίσχυσης (Detection of amplicons by torches)

Η ανίχνευση επιτυγχάνεται χρησιμοποιώντας ανιχνευτές φθορισμού μονόκλωνου νουκλεϊκού οξέος (ss nucleic acid torches) οι οποίοι υπάρχουν κατά την ενίσχυση κάθε στόχου που υβριδοποιούνται ειδικά στα αμπλικόνια σε πραγματικό χρόνο. Κάθε ανιχνευτής φθορισμού έχει ένα φθοροφόρο και ένα μόριο απόσβεσης φθορισμού (quencher). Όταν ο ανιχνευτής φθορισμού δεν υβριδοποιείται στο αμπλικόνιο, το μόριο απόσβεσης φθορισμού βρίσκεται σε κοντινή απόσταση από το φθοροφόρο και καταστέλλει τον φθορισμό. Όταν ο ανιχνευτής φθορισμού συνδέεται στο αμπλικόνιο, το μόριο απόσβεσης φθορισμού απομακρύνεται από το φθοροφόρο και θα εκπέμψει σήμα σε ένα συγκεκριμένο μήκος κύματος όταν διεγερθεί από μια πηγή φωτός. Καθώς περισσότεροι ανιχνευτές φθορισμού υβριδοποιούνται στο αμπλικόνιο, παράγεται ένα υψηλότερο σήμα φθορισμού. Ο χρόνος που απαιτείται για να φτάσει το σήμα φθορισμού κάθε στόχου σε ένα καθορισμένο κατώφλι (threshold Time, "tTime") είναι ανάλογος με την ποσότητα του ενισχυμένου HIV-1 RNA στο αρχικό δείγμα. Κάθε αντίδραση έχει έναν εσωτερικό βαθμονομητή/εσωτερικό μάρτυρα (internal calibrator/internal control, IC) που ελέγχει πιθανές διακυμάνσεις στην επεξεργασία, την ενίσχυση και την ανίχνευση του δείγματος. Στη συνέχεια, η συγκέντρωση ενός δείγματος υπολογίζεται χρησιμοποιώντας τους tTimes τόσο για ενίσχυση του στόχου pol όσο και για τον στόχο LTR από το

λογισμικό της πλατφόρμας Panther®System. Μέσω του αλγορίθμου του και της σύγκρισης με τις αποθηκευμένες πληροφορίες βαθμονόμησης, το λογισμικό της πλατφόρμας Panther®System επιστρέφει ένα μόνο, κλινικά επικυρωμένο αποτέλεσμα για κάθε δείγμα [53].

Ερμηνεία αποτελεσμάτων

Το λογισμικό της πλατφόρμας Panther® αυτόματα καθορίζει τη συγκέντρωση του ιικού φορτίου HIV-1 RNA για τα δείγματα και τους μάρτυρες, συγκρίνοντας τα αποτελέσματα με μία πρότυπη καμπύλη. Οι συγκεντρώσεις του ιικού φορτίου εκφράζονται σε αριθμό αντιγράφων RNA ανά ml πλάσματος (copies/ml) και σε λογαριθμική κλίμακα του 10 (log₁₀ copies/mL), συνήθως στο εύρος από 30 έως 10.000.000 αντίγραφα/ml. Το σετ αντιδραστηρίων Aptima HIV-1 Quant Dx διαθέτει συστήματα ενίσχυσης και ανίχνευσης διπλού - στόχου, στοχεύοντας pol και LTR ανεξάρτητα. Το αποτέλεσμα που αναφέρεται από την πλατφόρμα Panther® βασίζεται στο πρωτεύον σύστημα, pol, εκτός εάν η pol δεν ενισχυθεί. Σε αυτές τις περιπτώσεις, το σύστημα θα αναφέρει το αποτέλεσμα από το δευτερεύον σύστημα, LTR. Στον **Πίνακα 3** παρουσιάζεται η ερμηνεία των αποτελεσμάτων [53].

Πίνακας 3. Ερμηνεία αποτελεσμάτων συγκέντρωσης ιικού φορτίου HIV-1 RNA.		
Αναφερόμενο αποτέλεσμα Aptima™ HIV-1 Quant Dx		Ερμηνεία συγκέντρωσης HIV-1 RNA
Assay		
Copies/ml	Κλίμακα Log10	
Not detected	Not detected	Μη ανιχνεύσιμο HIV-1 RNA
<30 detected	<1.47	Ανιχνεύσιμο HIV-1 RNA αλλά σε επίπεδο <LLOQ
30 – 10,000,000	1.47 – 7.00	Η συγκέντρωση HIV-1 RNA βρίσκεται μεταξύ του γραμμικού εύρους από 30 έως 10,000,000 copies/ml
>10,000,000	>7.00	Η συγκέντρωση HIV-1 RNA υπερβαίνει το ανώτατο όριο ποσοτικού προσδιορισμού (ULOQ)
Invalid	Invalid	Υπήρχε λάθος στη δημιουργία αποτελέσματος. Το δείγμα θα πρέπει να επανεξεταστεί.

2.3.4. Στατιστική ανάλυση

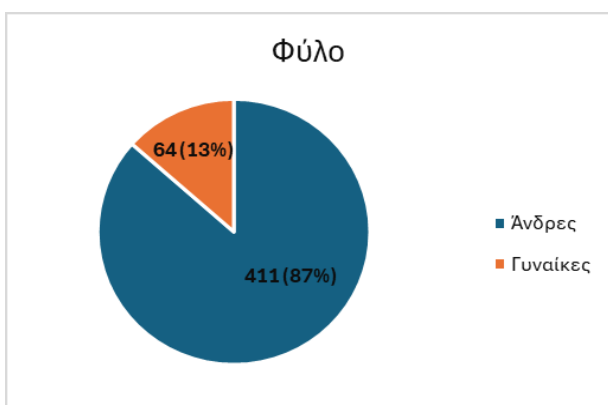
Στην αρχική βάση δεδομένων συλλέχθηκαν 521 δείγματα. Ωστόσο, από τα 521 δείγματα διαγράφηκαν όλα τα διπλότυπα (παραπάνω από 1 μέτρηση ιικού φορτίου στον ίδιο ασθενή) και συνεπώς η τελική βάση δεδομένων απαρτίζεται από 475 δείγματα διαφορετικών ατόμων. Οι ποσοτικές μεταβλητές (ηλικία) εκφράζονται ως μέση τιμή ± τυπική απόκλιση. Η διερεύνηση της κανονικότητας εξετάστηκε βάσει γραφικών μεθόδων (ιστόγραμμα, θηκόγραμμα, Q-Q plot, κλπ) σε συνδυασμό με το στατιστικό έλεγχο του Kolmogorov-Smirnov. Οι κατηγορικές μεταβλητές παρουσιάζονται ως σχετικές (%) και απόλυτες (N) συχνότητες. Για τη διερεύνηση πιθανής σχέσης μεταξύ δύο κατηγορικών μεταβλητών διεξήχθη χ^2 test. Για τις αναλύσεις όπου δεν πληρούνταν οι προϋποθέσεις του ελέγχου χ^2 διεξήχθη ο αντίστοιχος μη παραμετρικός έλεγχος Fisher's exact test. Για τη συσχέτιση μεταξύ μιας ποσοτικής με μια κατηγορική μεταβλητή με τουλάχιστον 3 κατηγορίες, όπου σε κάθε κατηγορία η ποσοτική μεταβλητή ακολουθεί

κανονική κατανομή, διεξήχθη έλεγχος One-Way ANOVA. Επιπλέον, διεξήχθησαν post-hoc αναλύσεις με διόρθωση Bonferroni για την περαιτέρω διερεύνηση της σχέσης ανά 2 ομάδες. Σαν επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας ορίστηκε το $\alpha=0,05$. Για όλους τους στατιστικούς ελέγχους χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πρόγραμμα SPSS. Για τη δημιουργία των γραφημάτων χρησιμοποιήθηκε το.

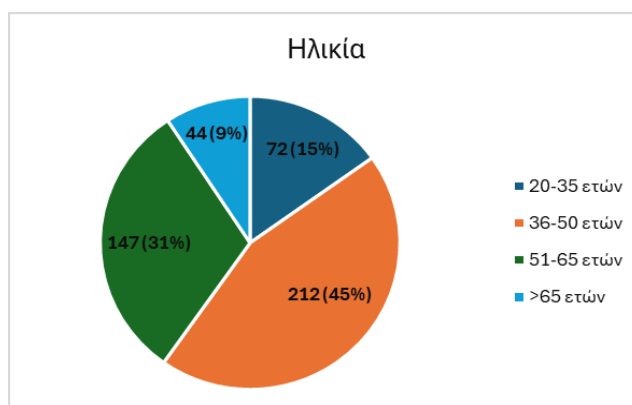
2.4. Αποτελέσματα

2.4.1. Δημογραφικά χαρακτηριστικά

Το τελικό δείγμα ήταν 475 ασθενείς. Στη συγκεκριμένη ενότητα περιγράφονται τα δημογραφικά χαρακτηριστικά των ασθενών (Γράφημα 1 έως 4). Από το σύνολο των ασθενών, το 87% ήταν άνδρες και το 13% γυναίκες (Γράφημα 1). Αναφορικά με την ηλικία τους, το 15% είχαν ηλικία 20-35 έτη, το 45% είχαν ηλικία 36-50 έτη, το 31% είχαν ηλικία 51-65 έτη και το 9% είχαν ηλικία >65 έτη (Γράφημα 2). Το 83% είχαν ελληνική υπηκοότητα, ενώ το υπόλοιπο 17% δεν είχαν (Γράφημα 3). Η υπηκοότητα του κάθε ατόμου αναλυτικά περιγράφεται στον Πίνακα 4. Σχετικά με τον κίνδυνο απόκτησης, το 7% ήταν άτομα που κάνουν χρήση ναρκωτικών, το 70% άτομα με ομοφυλόφιλη σεξουαλική επαφή, το 22% άτομα με ετερόφυλη σεξουαλική επαφή και το 1% λόγω μετάγγισης (Γράφημα 4).



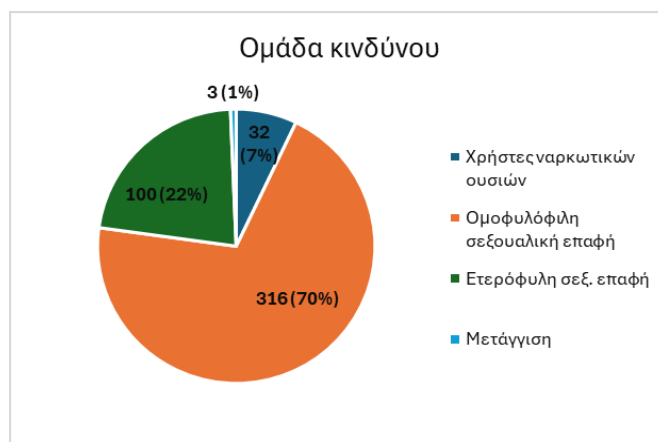
Γράφημα 1. Κατανομή των ασθενών, ανά φύλο.



Γράφημα 2. Κατανομή των ασθενών, ανά ηλικία.



Γράφημα 3. Κατανομή των ασθενών, ανά υπηκοότητα.



Γράφημα 4. Κατανομή των ασθενών, ανά κίνδυνο απόκτησης.

Πίνακας 4. Υψηκότητα ασθενών (αναλυτικά).		
<i>Χώρα</i>	<i>N</i>	<i>%</i>
Ελλάδα	394	83,47
Αλβανία	11	2,33
Κύπρος	5	1,06
Ουκρανία	5	1,06
Γεωργία	4	0,85
Τουρκία	4	0,85
Βουλγαρία	3	0,64
Ισπανία	3	0,64
Σιέρα Λεόνε	3	0,64
Αγγλία	2	0,42
Αίγυπτος	2	0,42
Αιθιοπία	2	0,42
Αρμενία	2	0,42
Ινδία	2	0,42
Καζακστάν	2	0,42
Νιγηρία	2	0,42
Πακιστάν	2	0,42
Πολωνία	2	0,42
Ρουμανία	2	0,42
Ρωσία	2	0,42
Αμερική	1	0,21
Αφγανιστάν	1	0,21
Βραζιλία	1	0,21
Γερμανία	1	0,21
Ιρλανδία	1	0,21
Ιταλία	1	0,21
Καμερούν	1	0,21
Κένυα	1	0,21
Κογκό	1	0,21
Μολδαβία	1	0,21
Μπαγκλαντές	1	0,21
Ουγκάντα	1	0,21
Συρία	1	0,21
Ακτή Ελεφαντοστού	1	0,21
Ανγκόλα	1	0,21
Λιβερία	1	0,21
Τανζανία	1	0,21
Ταϊλάνδη	1	0,21

Αναφορικά με το ιικό φορτίο HIV-1 RNA των ασθενών, οι 238 (50,11%) είχαν μη ανιχνεύσιμο ιικό φορτίο, οι 174 (36,63%) είχαν ιικό φορτίο <LLOQ (<30 copies/ml και >12 copies/ml) , οι 26 (5,47%) σημείωσαν 30 – 100 copies/ml, οι 19 (4,0%) 100 – 10³ copies/ml, οι 3 (0,63%) 10³ – 10⁴ copies/ml, οι 4 (0,84%) 10⁴ – 10⁵ copies/ml και οι 11 (2,32%) 10⁵ – 10⁷ copies/ml (**Πίνακας 5**).

Πίνακας 5. Ιικό φορτίο HIV-1 RNA ασθενών.		
<i>Ιικό φορτίο HIV-1 RNA</i>	<i>N</i>	<i>%</i>
Μη ανιχνεύσιμο	238	50,11
< LLoQ (<30 copies/ml)	174	36,63
30 – 100 copies/ml	26	5,47
100 – 10 ³ copies/ml	19	4,0
10 ³ – 10 ⁴ copies/ml	3	0,63
10 ⁴ – 10 ⁵ copies/ml	4	0,84
10 ⁵ – 10 ⁷ copies/ml	11	2,32

Τα άτομα με νεοδιαγνωθείσα λοίμωξη HIV (αρχικός έλεγχος) ήταν 12 (2,5%), ενώ τα PWH (παρακολούθηση) ήταν 463 (97,5%). Το διάμεσο ιικό φορτίο HIV-1 RNA των ατόμων με νεοδιαγνωθείσα λοίμωξη HIV ήταν 104.775 (5.445 – 193.494) copies/ml. Στη συνέχεια το ιικό φορτίο HIV-1 RNA κατηγοριοποιήθηκε σε μη ανιχνεύσιμο, μη μεταδοτικό και >200 copies/ml και συσχετίστηκε με τον αριθμό των ατόμων με νέες λοιμώξεις HIV (αρχικός έλεγχος) και τον αριθμό των PWH (παρακολούθηση) (Πίνακας 6). Τα άτομα με νεοδιαγνωθείσα λοίμωξη HIV είχαν στατιστικά σημαντικά υψηλότερο φορτίο από τους PWH (8,3% των ατόμων σε αρχικό εργαστηριακό έλεγχο είχαν μη ανιχνεύσιμο ιικό φορτίο, έναντι του 51,2% των ατόμων σε παρακολούθηση, ενώ το 83,3% των ατόμων σε αρχικό εργαστηριακό έλεγχο είχαν >200 copies/ml σε σχέση με το 3,9% που σημείωσαν τα άτομα σε παρακολούθηση – p<0,001).

Πίνακας 6. Ιικό φορτίο ασθενών HIV-1 RNA, ανάλογα με το αν οι ασθενείς είχαν έρθει για αρχικό έλεγχο ή ήταν σε παρακολούθηση.		
	<i>Νέες λοιμώξεις HIV (αρχικός έλεγχος) (n=12)</i>	<i>PWH (παρακολούθηση) (n=463)</i>
<i>Ιικό φορτίο HIV-1 RNA</i>	<i>%</i>	<i>%</i>
Μη ανιχνεύσιμο	8,33	51,19
Μη μεταδοτικό (<200 copies/ml)	8,33	44,92
>200 copies/ml	83,33	3,89

Για την παραπάνω ανάλυση ο έλεγχος που διεξήχθη ήταν ο χ² test και το αντίστοιχο p-value<0,001.

2.4.2. Ανάλυση μεταξύ δημογραφικών χαρακτηριστικών και ιικού φορτίου HIV-1 RNA

Στη συνέχεια το ιικό φορτίο HIV-1 RNA των ασθενών συσχετίστηκε με το φύλο τους (Πίνακας 7). Όπως φαίνεται από τα αποτελέσματα, το ιικό φορτίο των ανδρών διέφερε στατιστικά σημαντικά από το φορτίο των γυναικών, με το αντίστοιχο p-value = 0,035. Αναλυτικότερα, παρατηρούμε ότι υπήρχαν περισσότεροι άνδρες με μη ανιχνεύσιμο ιικό φορτίο (51,58%) σε σχέση με τις γυναίκες (40,63%), ενώ όσο πιο πολύ αυξανόταν το ιικό φορτίο το ποσοστό μεγάλωνε για τις γυναίκες:

- 46,88% των γυναικών με ιικό φορτίο < LLoQ (<30 copies/ml) έναντι 35,04% των ανδρών,
- 6,25% των γυναικών με ιικό φορτίο 100 – 10³ copies/ml έναντι 3,65% των ανδρών,
- 1,56% των γυναικών με ιικό φορτίο 10⁴ – 10⁵ copies/ml έναντι 0,73% των ανδρών,
- 4,69% των γυναικών με ιικό φορτίο 10⁵ – 10⁷ copies/ml έναντι 1,95% των ανδρών

Πίνακας 7. Ιικό φορτίο ασθενών HIV-1 RNA, ανά φύλο.		
	<i>Άνδρες (n=411)</i>	<i>Γυναίκες (n=64)</i>
<i>Ιικό φορτίο HIV-1 RNA</i>	%	%
Μη ανιχνεύσιμο	51,58	40,63
<LLoQ (< 30 copies/ml)	35,04	46,88
30 – 100 copies/ml	6,33	0,0
100 – 10 ³ copies/ml	3,65	6,25
10 ³ – 10 ⁴ copies/ml	0,73	0,0
10 ⁴ – 10 ⁵ copies/ml	0,73	1,56
10 ⁵ – 10 ⁷ copies/ml	1,95	4,69

Για την παραπάνω ανάλυση ο έλεγχος που διεξήχθη ήταν ο Fisher's exact test και το αντίστοιχο p-value=0,035.

Στην επόμενη ανάλυση διερευνήθηκε αν το ιικό φορτίο HIV-1 RNA διέφερε ανά την υπηκοότητα των ασθενών (**Πίνακας 8**). Όπως φαίνεται από τα τελικά αποτελέσματα, ο έλεγχος Fisher's exact test ανέδειξε στατιστικά σημαντικές διαφορές στα ποσοστά μεταξύ ασθενών με ελληνική και άλλη υπηκοότητα, με το αντίστοιχο p-value = 0,003. Αναλυτικότερα, οι ασθενείς με ελληνική υπηκοότητα είχαν σημαντικά υψηλότερο ποσοστό στην ομάδα με μη ανιχνεύσιμο ιικό φορτίο (53,55%) σε σχέση με τους ασθενείς με άλλη υπηκοότητα (34,62%). Αντίθετα, στις ομάδες με υψηλότερο ιικό φορτίο το ποσοστό ήταν υψηλότερο στους ασθενείς με άλλη υπηκοότητα. Αναλυτικότερα:

- 34,77% των ασθενών με ελληνική υπηκοότητα είχαν ιικό φορτίο <LLoQ (<30 copies/ml), ενώ το αντίστοιχο ποσοστό για τους ασθενείς με άλλη υπηκοότητα ήταν 46,15%
- 5,08% των ασθενών με ελληνική υπηκοότητα είχαν ιικό φορτίο 30 – 100 copies/ml, ενώ το αντίστοιχο ποσοστό για τους ασθενείς με άλλη υπηκοότητα ήταν 6,41%
- 4,06% των ασθενών με ελληνική υπηκοότητα είχαν ιικό φορτίο 100 – 10³ copies/ml, ενώ το αντίστοιχο ποσοστό για τους ασθενείς με άλλη υπηκοότητα ήταν 2,56%
- 0,25% των ασθενών με ελληνική υπηκοότητα είχαν ιικό φορτίο 10³ – 10⁴ copies/ml, ενώ το αντίστοιχο ποσοστό για τους ασθενείς με άλλη υπηκοότητα ήταν 2,56%
- 0,76% των ασθενών με ελληνική υπηκοότητα είχαν ιικό φορτίο 10⁴ – 10⁵ copies/ml, ενώ το αντίστοιχο ποσοστό για τους ασθενείς με άλλη υπηκοότητα ήταν 1,28%
- 1,52% των ασθενών με ελληνική υπηκοότητα είχαν ιικό φορτίο 10⁵ – 10⁷ copies/ml, ενώ το αντίστοιχο ποσοστό για τους ασθενείς με άλλη υπηκοότητα ήταν 6,41%

Πίνακας 8. Ιικό φορτίο ασθενών HIV-1 RNA, ανά υπηκοότητα.		
	<i>Ελληνική (n=394)</i>	<i>Άλλη (n=78)</i>
<i>Ιικό φορτίο HIV-1 RNA</i>	%	%
Μη ανιχνεύσιμο	53,55	34,62
<LLoQ (<30 copies/ml)	34,77	46,15
30 – 100 copies/ml	5,08	6,41
100 – 10 ³ copies/ml	4,06	2,56
10 ³ – 10 ⁴ copies/ml	0,25	2,56
10 ⁴ – 10 ⁵ copies/ml	0,76	1,28
10 ⁵ – 10 ⁷ copies/ml	1,52	6,41

Για την παραπάνω ανάλυση ο έλεγχος που διεξήχθη ήταν ο Fisher's exact test και το αντίστοιχο p-value=0,003.

Στη συνέχεια το ικό φορτίο των ασθενών συσχετίστηκε με την εκάστοτε κατηγορία κινδύνου απόκτησης, ενώ τα αποτελέσματα της παρουσιάζονται στον **Πίνακα 9**. Η ομάδα των ασθενών με μετάγγιση εξαιρέθηκε από τη συγκεκριμένη ανάλυση, λόγω πολύ χαμηλού δείγματος (3 ασθενείς). Από τα αποτελέσματα της ανάλυσης φάνηκε μια στατιστικά σημαντική διαφορά στα ποσοστά μεταξύ των 3 κατηγοριών κινδύνων απόκτησης, με $p\text{-value} = 0,033$. Τα άτομα με ομοφυλόφιλη σεξουαλική επαφή σημείωσαν υψηλότερο ποσοστό ασθενών με μη ανιχνεύσιμο ικό φορτίο (54,75%) σε σχέση με τα άτομα με ετερόφυλη σεξουαλική επαφή (44%) και τα άτομα που κάνουν χρήση ναρκωτικών ουσιών (40,63%). Επιπλέον, τα άτομα που κάνουν χρήση ναρκωτικών ουσιών σημείωσαν τα υψηλότερα ποσοστά ασθενών στις ομάδες με υψηλότερο ικό φορτίο, ενώ ακολούθησαν οι ασθενείς με ετερόφυλη σεξουαλική επαφή.

	<i>Χρήση ναρκωτικών ουσιών (n=32)</i>	<i>Ομοφυλόφιλη σεξουαλική επαφή (n=316)</i>	<i>Ετερόφυλη σεξουαλική επαφή (n=100)</i>
Ικό φορτίο HIV-1 RNA	%	%	%
Μη ανιχνεύσιμο	40,63	54,75	44
<LLoQ (<30 copies/ml)	40,63	34,49	42
30 – 100 copies/ml	3,13	6,01	3
100 – 10 ³ copies/ml	6,25	2,53	6
10 ³ – 10 ⁴ copies/ml	0	0,95	0
10 ⁴ – 10 ⁵ copies/ml	3,13	0,32	2
10 ⁵ – 10 ⁷ copies/ml	6,25	0,95	3

*Για την παραπάνω ανάλυση ο έλεγχος που διεξήχθη ήταν ο Fisher's exact test και το αντίστοιχο p-value=0,033.
Από τη συγκεκριμένη ανάλυση εξαιρέθηκε η ομάδα με μετάγγιση, καθώς απαρτιζόταν από μόλις 3 ασθενείς.

Στη συνέχεια το ικό φορτίο των ασθενών συσχετίστηκε με την ηλικία των ασθενών, ενώ τα αποτελέσματα της παρουσιάζονται στον **Πίνακα 10**. Η ηλικία φάνηκε να συσχετίστηκε στατιστικά σημαντικά με το ικό φορτίο των ασθενών ($p=0,009$). Αναλυτικότερα, οι νεότεροι ηλικιακά ασθενείς (20-35 ετών) είχαν χαμηλότερο ποσοστό μη ανιχνεύσιμου ικού φορτίου (40,28%) σε σχέση με τις υπόλοιπες ομάδες, οι οποίες είχαν από 50% έως 55%, ενώ αυτή η αναλογία αντιστρεφόταν όταν μεγάλωνε το ικό φορτίο (οι νεαροί ασθενείς είχαν υψηλότερα ποσοστά στις ομάδες με αυξημένο ικό φορτίο σε σχέση με τους μεγαλύτερους σε ηλικία ασθενείς).

	<i>20-35 έτη (n=72)</i>	<i>36-50 έτη (n=212)</i>	<i>51-65 έτη (n=147)</i>	<i>>65 έτη (n=44)</i>
Ικό φορτίο HIV-1 RNA	%	%	%	%
Μη ανιχνεύσιμο	40,28	50,94	52,38	54,55
<LLoQ (<30 copies/ml)	31,94	37,26	39,46	31,82
30 – 100 copies/ml	11,11	4,25	6,12	0
100 – 10 ³ copies/ml	6,94	3,3	1,36	11,36
10 ³ – 10 ⁴ copies/ml	1,39	0,47	0	2,27
10 ⁴ – 10 ⁵ copies/ml	2,78	0,94	0	0
10 ⁵ – 10 ⁷ copies/ml	5,56	2,83	0,68	0

Για την παραπάνω ανάλυση ο έλεγχος που διεξήχθη ήταν ο χ^2 test και το αντίστοιχο p-value=0,009.

Στη συνέχεια οι ασθενείς ομαδοποιήθηκαν ανάλογα με το ικό τους φορτίο σε 3 ομάδες: ασθενείς με μη ανιχνεύσιμο ικό φορτίο (50,11%), ασθενείς με ικό φορτίο <LLoQ (<30 copies/ml και >12 copies/ml) (36,63%) και ασθενείς με ικό φορτίο >30 copies/ml (13,26%), ενώ διερευνήθηκε αν οι συγκεκριμένες ομάδες συσχετίζονται με τα δημογραφικά στοιχεία των ασθενών. Τα αποτελέσματα των αναλύσεων παρουσιάζονται στον **Πίνακα 11**. Από τη συγκεκριμένη ανάλυση φάνηκε ότι το φύλο και η κατηγορία κινδύνου απόκτησης των ασθενών δεν συσχετίστηκαν στατιστικά σημαντικά με το ικό φορτίο των ασθενών. Αναφορικά με την υπηκοότητα των ασθενών, τα αποτελέσματα ήταν παρόμοια με του Πίνακα 5, με αυτούς ελληνικής υπηκοότητας να εμφανίζουν υψηλότερο ποσοστό ασθενών με μη ανιχνεύσιμο ικό φορτίο, το οποίο έφθινε όσο αυξανόταν το ικό φορτίο (88,7% των ασθενών με μη ανιχνεύσιμο ικό φορτίο είχαν ελληνική υπηκοότητα, ενώ το ποσοστό ήταν 79,2% για τους ασθενείς με ικό φορτίο <LLoQ και 75,4% για τους ασθενείς με ικό φορτίο >30 copies/ml). Αντίθετα, για τους ασθενείς με άλλη υπηκοότητα το ποσοστό αυξανόταν όσο αυξανόταν το ικό φορτίο (p=0,007). Επιπλέον, φαίνεται πως η ηλικία των ασθενών συσχετίστηκε στατιστικά σημαντικά με το ικό τους φορτίο, με το αντίστοιχο p-value = 0,008. Αναλυτικότερα, οι ασθενείς με υψηλότερο ικό φορτίο (>30 copies/ml) ήταν νεότεροι, με μέση ηλικία 44±13 έτη, σε σχέση με τις άλλες ομάδες (μέση ηλικία 48±12 έτη για τους ασθενείς με ικό φορτίο <LLoQ και μέση ηλικία 49±12 έτη για τους ασθενείς με μη ανιχνεύσιμο ικό φορτίο). Ωστόσο, μετά από τις επιμέρους post-hoc αναλύσεις και διόρθωση Bonferroni φάνηκε ότι η ηλικία διέφερε στατιστικά σημαντικά μόνο μεταξύ των ασθενών με μη ανιχνεύσιμο ικό φορτίο και των ασθενών με ικό φορτίο >30 copies/ml (p<0,05).

Πίνακας 11. Δημογραφικά χαρακτηριστικά, ανά ικό φορτίο HIV-1 RNA ασθενών.				
Ικό φορτίο HIV-1 RNA	Μη ανιχνεύσιμο	<LLoQ (<30 copies/ml)	>30 copies/ml	p
N	238	174	63	-
Φύλο				
Άνδρες	89,1%	82,8%	87,3%	0,176
Γυναίκες	10,9%	17,2%	12,7%	
Υπηκοότητα				
Ελληνική	88,7%	79,2%	75,4%	0,007
Άλλη	11,3%	20,8%	24,6%	
Κατηγορία κινδύνου απόκτησης*				
Χρήση ναρκωτικών ουσιών	5,7%	7,9%	11,1%	0,219
Ομοφυλόφιλη σεξουαλική επαφή	75,2%	66,5%	63,0%	
Ετερόφυλη σεξουαλική επαφή	19,1%	25,6%	25,9%	
Ηλικία (έτη)	49±12α	48±12	44±13α	0,008
Οι κατηγορικές μεταβλητές (φύλο, υπηκοότητα, ομάδα κινδύνου) παρουσιάζονται ως ποσοστά ανά ομάδα ικού φορτίου και οι ποσοτικές μεταβλητές (ηλικία) ως μέση τιμή ± τυπική απόκλιση. Για τις παραπάνω αναλύσεις χρησιμοποιήθηκε ο έλεγχος χ ² για το φύλο, την υπηκοότητα και την ομάδα κινδύνου και ο έλεγχος One-Way ANOVA για την ηλικία, ενώ διεξήχθησαν και post-hoc αναλύσεις με διόρθωση Bonferroni (αp<0,05 για τη σύγκριση της ομάδας με μη ανιχνεύσιμο ικό φορτίο σε σχέση με την ομάδα με >30 copies/ml). *Από τη συγκεκριμένη ανάλυση εξαιρέθηκε η ομάδα με μετάγγιση, καθώς απαρτιζόταν από μόλις 3 ασθενείς.				

2.5. Συζήτηση

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης παρουσιάζουν ενδιαφέρουσες πληροφορίες αναφορικά με το ιικό φορτίο HIV-1 RNA σε PWH και λαμβάνουν αντιρετροϊκή θεραπεία, καθώς και σε άτομα με νεοδιαγνωσθείσα λοίμωξη, εντός της περιφέρειας της Αττικής. Από το σύνολο του δείγματος των 475 ασθενών, το 87% ήταν άνδρες, το 83% είχαν ελληνική υπηκοότητα και το 70% ήταν άτομα με ομοφυλόφιλη σεξουαλική επαφή. Επιπλέον, από το σύνολο των 475 δειγμάτων, το 97,5% (463) αφορούσε σε PWH (παρακολούθηση), ενώ το υπόλοιπο 2,5% (12) σε νέες λοιμώξεις HIV (αρχικός εργαστηριακός έλεγχος).

Από την ομάδα PWH, το 51,19% είχε μη ανιχνεύσιμο ιικό φορτίο και το 44,92% είχε “μη μεταδοτικό” ιικό φορτίο <200 copies/ml. Όταν το ιικό φορτίο είναι κάτω από το όριο των 200 copies/ml, θεωρείται ότι το άτομο δεν είναι ικανό να μεταδώσει τον ιό μέσω της σεξουαλικής επαφής και χαρακτηρίζεται ως U=U (Undetectable=Untransmittable), σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες της UNAIDS [54], [55]. Αθροιστικά λοιπόν, το 96,11% της ομάδας PWH έχει ιικό φορτίο κάτω από το όριο των 200 copies/ml, πλησιάζοντας σημαντικά τον στόχο του U=U, αλλά και το τρίτο “95%” του στόχου 95-95-95 της UNAIDS, που θέτει ως σκοπό το 95% των ατόμων που λαμβάνουν θεραπεία να έχουν μη ανιχνεύσιμο ιικό φορτίο [54], [55], [57]. Με αυτόν τον τρόπο το U=U, που επικεντρώνεται στην πρόληψη της μετάδοσης, αλληλοσυμπληρώνεται με το τρίτο “95%”, το οποίο αφορά αυστηρότερη θεραπευτική καταστολή [56], [57]. Παρόλο που δεν έχει επιτευχθεί πλήρως ο στόχος, το ποσοστό είναι αρκετά κοντά και αντικατοπτρίζει την επιτυχία της αντιρετροϊκής θεραπείας στην καταστολή του ιού. Συγκρίνοντας με διεθνείς μελέτες, τα αποτελέσματα είναι εντός των επιπέδων που παρατηρούνται σε χώρες με ισχυρά προγράμματα θεραπείας του HIV [37], [39], [40], [56], [58]. Ωστόσο, υπάρχει ακόμα περιθώριο βελτίωσης, ειδικά για την επίτευξη του στόχου μη ανιχνεύσιμου ιικού φορτίου στο 95%.

Αναφορικά με την ομάδα των ατόμων με νεοδιαγνωσθείσα λοίμωξη HIV, το διάμεσο ιικό φορτίο ήταν 104.775 copies/ml, με εύρος από 5.445 έως 193.494 copies/ml. Αυτό υποδεικνύει ότι τα άτομα αυτά είχαν πολύ υψηλό ιικό φορτίο κατά τον αρχικό εργαστηριακό έλεγχο, το οποίο αποτελεί ένδειξη καθυστερημένης διάγνωσης της HIV λοίμωξης. Το γεγονός ότι το 83,33% της ομάδας αυτής είχε ιικό φορτίο πάνω από 200 copies/ml, έρχεται σε συμφωνία με αποτελέσματα άλλων μελετών, σύμφωνα με τις οποίες πάνω από το 30% των νέων διαγνώσεων στην Ελλάδα γίνονται καθυστερημένα [59], [60], [61]. Παρόλα αυτά όμως, το αποτέλεσμα αυτό της παρούσας μελέτης χρειάζεται περισσότερη διερεύνηση, καθώς μόνο 12 από το σύνολο των 475 δειγμάτων αφορούσαν νεοδιαγνωσθείσες λοιμώξεις HIV. Η καθυστερημένη διάγνωση δυσχεραίνει την επίτευξη των στόχων της UNAIDS και απαιτείται περισσότερη ενημέρωση και προληπτικός έλεγχος για να μειωθεί αυτό το ποσοστό [32], [59], [60], [61].

Η συσχέτιση του φύλου με το ιικό φορτίο HIV-1 RNA ανέδειξε στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p=0,035$). Οι άνδρες είχαν υψηλότερα ποσοστά μη ανιχνεύσιμου ιικού φορτίου (51,58%) σε σχέση με τις γυναίκες (40,63%), ενώ όσο πιο πολύ αυξανόταν το ιικό φορτίο (<LLoQ, $100-10^3$ copies/ml, 10^4-10^5 copies/ml, 10^5-

10^7 copies/ml) το ποσοστό μεγάλωνε για τις γυναίκες. Παρά το γεγονός ότι οι άνδρες αποτελούσαν το 87% του δείγματος, το εύρημα αυτό ενδέχεται να αντανακλά διαφορές στη φαρμακοκινητική των αντιρετροϊκών φαρμάκων μεταξύ ανδρών και γυναικών, όπως έχει αναφερθεί σε άλλες μελέτες [62], [63]. Επιπλέον, κοινωνικοί παράγοντες, όπως η πρόσβαση σε υγειονομική φροντίδα, η συμμόρφωση με τη θεραπεία και η υποστήριξη που λαμβάνουν τα δύο φύλα, μπορεί να διαδραματίζουν ρόλο.

Η συσχέτιση της υπηκοότητας με το ιικό φορτίο HIV-1 RNA ανέδειξε στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p=0,007$), με την ομάδα των ατόμων με ελληνική υπηκοότητα να εμφανίζουν υψηλότερο ποσοστό ασθενών με μη ανιχνεύσιμο ιικό φορτίο, το οποίο έφθινε όσο αυξανόταν το ιικό φορτίο (88,7% με μη ανιχνεύσιμο ιικό φορτίο, ενώ 79,2% με ιικό φορτίο <LLoQ και 75,4% με ιικό φορτίο >30 copies/ml). Αντίθετα, το ποσοστό αυξανόταν όσο αυξανόταν το ιικό φορτίο για τους ασθενείς με άλλη υπηκοότητα. Παρά το γεγονός ότι τα άτομα με ελληνική υπηκοότητα αποτελούσαν το 83% του δείγματος, το εύρημα αυτό μπορεί να οφείλεται σε διάφορους παράγοντες, όπως η δυνατότητα πρόσβασης σε υπηρεσίες υγείας, η καλύτερη κατανόηση της ασθένειας και των θεραπευτικών επιλογών από τους διαφορετικούς πολιτισμούς, καθώς και η συμμόρφωση με τη θεραπεία. Επομένως, ίσως να υπάρχει ανάγκη για παρεμβάσεις από την κοινωνία που να στοχεύουν στη βελτίωση της πρόσβασης και της ενημέρωσης των ατόμων άλλης υπηκοότητας που ζουν στην Ελλάδα σε θέματα HIV λοίμωξης, ώστε να επιτευχθεί υψηλότερη συμμόρφωση και καλύτερη υγειονομική φροντίδα.

Οι δύο προηγούμενες παράγραφοι, οδηγούν στο συμπέρασμα ότι οι άντρες είχαν καλύτερη ανταπόκριση στη θεραπεία σε σύγκριση με τις γυναίκες, καθώς και τα άτομα με ελληνική υπηκοότητα σε σχέση με εκείνους με άλλη υπηκοότητα. Τα ευρήματα αυτά υπογραμμίζουν την ανάγκη για ενίσχυση των προσπαθειών να αντιμετωπιστούν οι διακρίσεις και τα εμπόδια στην πρόσβαση και συμμόρφωση με τη θεραπεία, ειδικά για τις γυναίκες και τα άτομα με άλλη υπηκοότητα. Οι παρεμβάσεις που αφορούν τις ομάδες αυτές, μπορεί να συμβάλλουν στην επίτευξη του στόχου μηδενικών διακρίσεων της UNAIDS [57].

Αναφορικά με τη συσχέτιση της κατηγορίας κινδύνου απόκτησης με το ιικό φορτίο HIV-1 RNA, τα αποτελέσματα έδειξαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p=0,033$). Η ομάδα των ατόμων με ομοφυλόφιλη σεξουαλική επαφή σημείωσε το υψηλότερο ποσοστό ασθενών με μη ανιχνεύσιμο ιικό φορτίο (54,75%), σε σχέση με την ομάδα των ατόμων με ετερόφυλη σεξουαλική επαφή (44%) και την ομάδα των ατόμων που κάνουν χρήση ναρκωτικών ουσιών (40,63%). Παρά το γεγονός ότι τα άτομα με ομοφυλόφιλη σεξουαλική επαφή αποτελούσαν το 70% του δείγματος, η παρατήρηση αυτή ίσως υποδηλώνει ότι τα άτομα με ομοφυλόφιλη σεξουαλική επαφή έχουν καλύτερη συμμόρφωση με τη θεραπεία και ενδεχομένως πιο τακτική πρόσβαση στις υπηρεσίες υγείας. Αντίθετα, η ομάδα των ατόμων που κάνουν χρήση ναρκωτικών ουσιών σημείωσε τα υψηλότερα ποσοστά ασθενών με υψηλότερο ιικό φορτίο ($100-10^3$ copies/ml, 10^4-10^5 copies/ml, 10^5-10^7 copies/ml), ενώ ακολούθησαν τα άτομα με ετερόφυλη σεξουαλική επαφή. Συγκεκριμένα για την ομάδα των ατόμων που κάνουν χρήση ναρκωτικών ουσιών, ενδεχομένως, αυτό να αιτιολογείται από τις προκλήσεις που συνοδεύουν τη χρήση ναρκωτικών ουσιών, όπως η ασταθής πρόσβαση σε θεραπεία, οι ταυτόχρονες λοιμώξεις από άλλο αιτιολογικό παράγοντα και η δυσκολία παρακολούθησης της θεραπείας.

Η UNAIDS εργάζεται για την πρόληψη νέων μολύνσεων, ειδικά μέσω προγραμμάτων εκπαίδευσης και πρόσβασης σε προφυλακτικά, καθώς και τη διάδοση της θεραπείας PrEP (προφύλαξη πριν από την έκθεση), που βοηθά στην αποτροπή της μόλυνσης σε ευάλωτες ομάδες. Προκειμένου λοιπόν, να επιτευχθεί ο στόχος μηδενικών νέων μολύνσεων της UNAIDS, περισσότερη υποστήριξη χρειάζεται να δοθεί και στις υπόλοιπες ευάλωτες ομάδες, πέραν των ατόμων με ομοφυλόφιλες σεξουαλικές επαφές [57].

Αναφορικά με τη συσχέτιση της ηλικίας με το ιικό φορτίο HIV-1 RNA, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι ασθενείς με ιικό φορτίο >30 copies/ml ήταν νεότεροι (μέση ηλικία 44 ± 13 έτη), συγκριτικά με τους ασθενείς που είχαν μη ανιχνεύσιμο ιικό φορτίο (μέση ηλικία 49 ± 12 έτη). Η στατιστικά σημαντική διαφορά αυτή ($p=0,008$), μπορεί να υποδεικνύει ότι περισσότεροι παράγοντες επηρεάζουν την παρακολούθηση της αντιρετροϊκής θεραπείας στους νεότερους ηλικιακά ασθενείς. Πιο συγκεκριμένα, οι νεότεροι ενήλικες μπορεί να έχουν διαφορετική στάση απέναντι στη συμμόρφωση με τη θεραπεία, είτε λόγω μειωμένης ενημέρωσης είτε λόγω κοινωνικοοικονομικών και ψυχολογικών παραγόντων, όπως π.χ. ασταθής εργασιακή κατάσταση, λιγότερη σταθερότητα στον τρόπο ζωής ή φόβος στίγματος ή αποκλεισμού, που επηρεάζουν τη διατήρηση της συνέπειας στη θεραπεία. Είναι, επίσης, πιθανό οι νεότεροι ασθενείς να έχουν διαγνωστεί πιο πρόσφατα, και συνεπώς να βρίσκονται στα αρχικά στάδια της θεραπείας τους. Κατά τη διάρκεια αυτών των πρώτων σταδίων, υπάρχει πιθανότητα να μην έχει επιτευχθεί ακόμη πλήρης καταστολή του ιικού φορτίου. Αυτό καθιστά επιτακτική την ανάγκη για στοχευμένες παρεμβάσεις, ειδικά σε νεότερους ασθενείς, που να προωθούν την ενημέρωση για τα οφέλη της αντιρετροϊκής θεραπείας, την τακτική παρακολούθηση και τη συμμόρφωσή τους στη θεραπεία.

Συνοψίζοντας, τα αποτελέσματα της διπλωματικής αυτής εργασίας τονίζουν την αποτελεσματικότητα της αντιρετροϊκής θεραπείας στη μείωση του ιικού φορτίου HIV-1 RNA, στα περισσότερα άτομα που ζουν με τον ιό HIV και κατοικούν στην Αττική. Ωστόσο, οι διαφορές που παρατηρήθηκαν ανάλογα με το φύλο, τον κίνδυνο απόκτησης, την ηλικία και την υπηκοότητα υπογραμμίζουν την ανάγκη για εξατομικευμένες παρεμβάσεις και βελτιώσεις, έτσι ώστε να εξασφαλιστεί ότι όλες οι ευάλωτες ομάδες πληθυσμού θα έχουν πρόσβαση σε αποτελεσματική θεραπεία και φροντίδα, για να ζουν υγιείς και να αποφεύγονται οι θάνατοι που σχετίζονται με το AIDS [57], [58]. Οι παρατηρήσεις αυτές μπορούν να συμβάλλουν στην καλύτερη κατανόηση και επίτευξη των στόχων της UNAIDS, οι οποίοι αποτελούν μέρος ενός ευρύτερου σχεδίου, για την εξάλειψη του AIDS ως παγκόσμια απειλή, για τη δημόσια υγεία, μέχρι το 2030 [57].

- [1]. Campbell, E. M., & Hope, T. J. (2015). HIV-1 capsid: the multifaceted key player in HIV-1 infection. *Nature Reviews Microbiology*, 13(8), 471-483.
- [2]. Keele, B. F., Van Heuverswyn, F., Li, Y., Bailes, E., Takehisa, J., Santiago, M. L., Bibollet-Ruche, F., Chen, Y., Wain, L. V., Liegeois, F., Loul, S., Ngole, E. M., Bienvenue, Y., Delaporte, E., Brookfield, J. F. Y., Sharp, P. M., Shaw, G. M., Peeters, M., & Hahn, B. H. (2006). Chimpanzee reservoirs of pandemic and nonpandemic HIV-1. *Science*, 313(5786), 523–526.
- [3]. Sharp, P. M., & Hahn, B. H. (2011). Origins of HIV and the AIDS pandemic. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 1(1), a006841–a006841.
- [4]. Bailes, E., Gao, F., Bibollet-Ruche, F., Courgnaud, V., Peeters, M., Marx, P. A., Hahn, B. H., & Sharp, P. M. (2003). Hybrid origin of siv in chimpanzees. *Science*, 300(5626), 1713–1713. <https://doi.org/10.1126/science.1080657>
- [5]. Faria, N. R., Rambaut, A., Suchard, M. A., Baele, G., Bedford, T., Ward, M. J., Tatem, A. J., Sousa, J. D., Arinaminpathy, N., Pépin, J., Posada, D., Peeters, M., Pybus, O. G., & Lemey, P. (2014). The early spread and epidemic ignition of HIV-1 in human populations. *Science*, 346(6205), 56–61.
- [6]. AIDS: Origin of pandemic ‘was 1920s Kinshasa’. (2014, Οκτώβριος 2). BBC News. <https://www.bbc.com/news/health-29442642> (ανακτήθηκε στις 3 Ιανουαρίου 2024)
- [7]. Worobey, M., Gemmel, M., Teuwen, D. E., Haselkorn, T., Kunstman, K., Bunce, M., Muyembe, J.-J., Kabongo, J.-M. M., Kalengayi, R. M., Van Marck, E., Gilbert, M. T. P., & Wolinsky, S. M. (2008). Direct evidence of extensive diversity of HIV-1 in Kinshasa by 1960. *Nature*, 455(7213), 661–664. <https://doi.org/10.1038/nature07390>
- [8]. Faria, N. R., Rambaut, A., Suchard, M. A., Baele, G., Bedford, T., Ward, M. J., & Lemey, P. (2014). The early spread and epidemic ignition of HIV-1 in human populations. *science*, 346(6205), 56-61.
- [9]. D’arc, M., Ayouba, A., Esteban, A., Learn, G. H., Boué, V., Liegeois, F., & Peeters, M. (2015). Origin of the HIV-1 group O epidemic in western lowland gorillas. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(11), E1343-E1352.
- [10]. Mourez, T., Simon, F., & Plantier, J. C. (2013). Non-M variants of human immunodeficiency virus type 1. *Clinical microbiology reviews*, 26(3), 448-461.
- [11]. World Health Organization. (2023, July 13). HIV. <https://www.who.int/newsroom/factsheets/detail/hiv-aids> (ανακτήθηκε στις 3 Ιανουαρίου 2024).
- [12]. World Health Organization. (2023). Estimated number of people (all ages) living with HIV. <https://www.who.int/data/gho/data/indicators/indicatordetails/GHO/estimated-number-of-people--living-with-hiv> (ανακτήθηκε στις 3 Ιανουαρίου 2024).
- [13]. Govender, R. D., Hashim, M. J., Khan, M. A., Mustafa, H., & Khan, G. (2021). Global epidemiology of hiv/aids: A resurgence in north America and Europe. *Journal of Epidemiology and Global Health*, 11(3), 296–301.
- [14]. Εργαστήριο επιτήρησης λοιμωδών νοσημάτων | μονάδα εργαστηριακής επιτήρησης hiv/aids λοίμωξης και ιογενών ηπατιτίδων. Ανακτήθηκε 4 Μάρτιος 2024, από <https://eelno.uniwa.gr/monada-ergastiriakis-epitirisis-hiv-aids-loimoxis-kai-iogenon-ipatitidon/>
- [15]. Κέντρο Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων. Δελτίο Επιδημιολογικής Επιτήρησης της HIV/AIDS λοίμωξης στην Ελλάδα, 31-10-2009 (Τεύχος 24). Αθήνα 2009. Πρόσβαση στο δικτυακό τόπο: <http://www.keelpno.gr>
- [16]. HIV AIDS Greece. Ανακτήθηκε 4 Μάρτιος 2024, από <http://www.hivaids.gr/i/pliroforisi/deltio>
- [17]. Εθνικός Οργανισμός Δημόσιας Υγείας. Επιδημιολογική Επιτήρηση HIV/AIDS Προκαταρκτικά δεδομένα 2023 (Έως και 31/10/2023) <https://eody.gov.gr/wp-content/uploads/2020/07/epidimiologiko-deltio-hiv-2023-synoptiko-1.pdf>
- [18]. Nikolopoulos, G., Paraskevis, D., & Hatzakis, A. (2008). HIV epidemiology in Greece. *Future Microbiology*, 3(5), 507–516. <https://doi.org/10.2217/17460913.3.5.507>

- [19]. Tsakona, D., Kapetanakis, A., Kyrou, D., Vrontaras, N., Xochelli, A., Metallidis, S., Tsachouridou, O., Chini, M., Meliou, M., Psychogiou, M., Basoulis, D., Antoniadou, A., Protopapas, K., Panagopoulos, P., Petrakis, V., Gogos, C., Leonidou, L., & Karamanidou, C. (2023). Mapping frailty in people living with HIV: A nationwide study in Greece. *HIV Medicine*, 24(2), 170–179.
- [20]. Pantavou, K., Tsiakalakis, G., Chanos, S., Polkas, G., Papageorgiou, G., Dedes, N., Schmidt, A. J., & Nikolopoulos, G. K. (2021). Key Findings from the European Men-Who-Have-Sex-With-Men Internet Survey in Greece. *Epidemiologia*, 2(1), 114–123. <https://doi.org/10.3390/epidemiologia2010010>
- [21]. Sypsa, V., Roussos, S., Tsirogianni, E., Tsiara, C., Paraskeva, D., Chrysanthidis, T., Chatzidimitriou, D., Papadimitriou, E., Paraskevis, D., Goulis, I., Kalamitsis, G., & Hatzakis, A. (2023). A new outbreak of HIV infection among people who inject drugs during the COVID-19 pandemic in Greece. *International Journal of Drug Policy*, 117, 104073. <https://doi.org/10.1016/j.drugpo.2023.104073>
- [22]. Gudipati S et al. Increase in false-positive fourth-generation human immunodeficiency virus tests in patients with coronavirus disease 2019. *Clinical Infectious Diseases* 2023 May 9; [e-pub].
- [23]. Mouliou, D. S., & Gourgoulisanis, K. I. (2021). False-positive and false-negative COVID-19 cases: Respiratory prevention and management strategies, vaccination, and further perspectives. *Expert Review of Respiratory Medicine*, 15(8), 993–1002. <https://doi.org/10.1080/17476348.2021.1917389>
- [24]. Mouliou, D.S.; Dardiotis, E. Current Evidence in SARS-CoV-2 mRNA Vaccines and Post-Vaccination Adverse Reports: Knowns and Unknowns. *Diagnostics* 2022, 12, 1555. <https://doi.org/10.3390/diagnostics12071555>
- [25]. Greene, W. C. (2007). A history of AIDS: looking back to see ahead. *European journal of immunology*, 37(S1), S94-S102
- [26]. Barik, S.K., Mohanty, K.K., Bisht, D., Joshi, B., Jena, S., & Tripathy, S. (2018). An Overview of Enzyme Immunoassay: The Test Generation Assay in HIV/AIDS Testing. *Journal of AIDS and Clinical Research*, 9, 1-5
- [27]. HIV diagnoses | HIV in the us | HIV statistics center | HIV | CDC. (2023, Ιούλιος 23). <https://www.cdc.gov/hiv/statistics/overview/in-us/diagnoses.html> (ανακτήθηκε στις 3 Ιανουαρίου 2024).
- [28]. Mouliou, D. S. (2022). Managing Viral Emerging Infectious Diseases via current Molecular Diagnostics in the Emergency Department: the Tricky Cases. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 20(9), 1163–1169.
- [29]. Bangalee, A., Bhoora, S., & Punchoo, R. (2021). Evaluation of serological assays for the diagnosis of HIV infection in adults. *South African Family Practice*, 63(1), 5316. <https://doi.org/10.4102/safp.v63i1.5316>
- [30]. Alfie, L. G., Longueira, Y. S., Pippo, M., Cruces, L., Quiroga, M. F., Turk, G., & Laufer, N. (2023). Increased risk of false-positive HIV ELISA results after COVID-19. *AIDS (London, England)*, 37(6), 947–950.
- [31]. WHO, “WHO RECOMMENDS HIV SELF-TESTING-EVIDENCE UPDATE AND CONSIDERATIONS FOR SUCCESS POLICY BRIEF,” 2019.
- [32]. Croxford, S., Stengaard, A. R., Brännström, J., Combs, L., Dedes, N., Girardi, E., Grabar, S., Kirk, O., Kuchukhidze, G., Lazarus, J. V., Noori, T., Pharris, A., Raben, D., Rockstroh, J. K., Simões, D., Sullivan, A. K., Van Beckhoven, D., Delpéch, V. C., & The EuroTEST HIV Late Diagnosis Definition Working Group. (2022). Late diagnosis of HIV: An updated consensus definition. *HIV Medicine*, 23(11), 1202–1208. <https://doi.org/10.1111/hiv.13425>
- [33]. Μήνα Ψυχोगιού, “HIV Επιδημιολογία.” 2022.
- [34]. Cepheid, “Xpert® HIV-1 Viral Load,” 2017. Accessed: Jul. 02, 2023. [Online]. Available: <https://www.cepheid.com/en-US.html>
- [35]. 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>

- [36]. 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>
- [37]. Eggleton, J. S., & Nagalli, S. (2023). Highly Active Antiretroviral Therapy(HAART). *Stat Pearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK554533/>
- [38]. J. W. Mellors et al., “Plasma Viral Load and CD4 + Lymphocytes as Prognostic Markers of HIV-1 Infection,” 1997. [Online]. Available: <http://annals.org/>
- [39]. 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.
- [40]. 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.
- [41]. 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
- [42]. Dispinseri, S., Saba, E., Vicenzi, E., Kootstra, N. A., Schuitemaker, H., & Scarlatti, G. (2014). HIV-1 isolation from infected peripheral blood mononuclear cells. *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N.J.), 1087, 187–196. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-670-2_15
- [43]. Kabir, M. A., Zilouchian, H., Caputi, M., & Asghar, W. (2020). Advances in HIV diagnosis and monitoring. *Critical reviews in biotechnology*, 40(5), 623-638.
- [44]. Parekh, B. S., Ou, C. Y., Fonjungo, P. N., Kalou, M. B., Rottinghaus, E., Puren, A., ... & Nkengasong, J. N. (2018). Diagnosis of human immunodeficiency virus infection. *Clinical microbiology reviews*, 32(1), e00064-18.
- [45]. Matilu Mwau, Schaffer, S., Kimani, H., Purity Kasiano, Ogolla, F., Ajema, E., Scriven Adoyo, Ednah Nyairo, Saleri, N. and Sangeetha Vijaysri Nair (2022). Comparison of the performance of Aptima HIV-1 Quant Dx Assay with Abbott Real Time HIV Assay for viral load monitoring using plasma and Dried Blood Spots collected in Kenya. *PLOS ONE*, 17(8), pp.e0269838–e0269838.
- [46]. Amendola, A., Sberna, G., Federica Forbici, Abbate, I., Lorenzini, P., Pinnetti, C., Antinori, A. and Maria Rosaria Capobianchi (2020). The dual-target approach in viral HIV-1 viremia testing: An added value to virological monitoring? *PLOS ONE*, 15(2), pp.e0228192–e0228192.
- [47]. Amendola, A., Pisciotta, M., Aleo, L., Ferraioli, V., Angeletti, C. and Capobianchi, M.R. (2016). Evaluation of the Aptima® HIV-1 Quant Dx assay for HIV-1 RNA viral load detection and quantitation in plasma of HIV-1-infected individuals: A comparison with Abbott Real Time HIV-1 assay. *Journal of Medical Virology*, 88(9), pp.1535–1544.
- [48]. Sandres-Sauné, K., Raymond, S., J. Boineau, Pasquier, C. and Izopet, J. (2016). Detection and quantification of HIV-1 RNA with a fully automated transcription-mediated-amplification assay. *Journal of Clinical Virology*, 84, pp.70–73.
- [49]. Coste, J., Montes, B., Reynes, J., Peeters, M., Segarra, C., Vendrell, J. P., Delaporte, E., & Segondy, M. (1996). Comparative evaluation of three assays for the quantitation of human immunodeficiency virus type 1 RNA in plasma. *Journal of Medical Virology*, 50(4), 293–302. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9071\(199612\)50:4<293::AID-JMV3>3.0.CO;2-3](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9071(199612)50:4<293::AID-JMV3>3.0.CO;2-3)
- [50]. Pan, P., Tao, X., Zhang, Q., Xing, W., Sun, X., Pei, L., & Jiang, Y. (2007). Clinical comparison of branched DNA and reverse transcriptase-PCR and nucleic acid sequence-based amplification assay for the quantitation of circulating recombinant form_{BC} HIV-1 RNA in plasma. *AIDS* (London, England), 21 Suppl 8, S27-32. <https://doi.org/10.1097/01.aids.0000304693.16767.66>
- [51]. Rj, L., B, M., Cj, S., B, H., & De, B. (2009). Reliability at the lower limits of HIV-1 RNA quantification in clinical samples: A comparison of RT-PCR versus bDNA assays. *PloS One*, 4(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006008>
- [52]. Mercier-Delarue, S., Vray, M., Plantier, J. C., Maillard, T., Adjout, Z., De Olivera, F., Schnepf, N., Maylin, S., Simon, F., & Delaugerre, C. (2014). Higher specificity of nucleic acid sequence-based amplification isothermal technology than of real-time pcr for quantification of hiv-1

- rna on dried blood spots. *Journal of Clinical Microbiology*, 52(1), 52–56.
<https://doi.org/10.1128/JCM.01848-13>
- [53]. Aptima HIV-1 Quant Dx Assay, AW-18107-001 Rev. 001
- [54]. Eisinger, R.W., Dieffenbach, C.W. and Fauci, A.S. (2019) ‘HIV viral load and transmissibility of HIV infection’, *JAMA*, 321(5), p. 451. doi:10.1001/jama.2018.21167.
- [55]. Prevention Access Campaign. (2016). *Undetectable = Untransmittable (U=U) – Risk of sexual transmission of HIV from a person living with HIV who has an undetectable viral load*. Available at: <https://www.preventionaccess.org/undetectable> (Accessed: 17 October 2024)
- [56]. Rodger, A.J. *et al.* (2019) ‘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*, 393(10189), pp. 2428–2438. doi:10.1016/s0140-6736(19)30418-0.
- [57]. UNAIDS. (2020). *Global AIDS Update 2020: Seizing the moment – Tackling entrenched inequalities to end epidemics*. Available at: <https://www.unaids.org/en/resources/documents/2020/global-aids-update> (Accessed: 17 October 2024)
- [58]. Cohen, M.S. *et al.* (2016) ‘Antiretroviral therapy for the prevention of HIV-1 transmission’, *New England Journal of Medicine*, 375(9), pp. 830–839. doi:10.1056/nejmoa1600693.
- [59]. Metallidis, S. *et al.* (2012) ‘Time Trends and correlates of late presentation for HIV care in northern Greece during the Decade 2000 to 2010’, *Journal of the International AIDS Society*, 15(2). doi:10.7448/ias.15.2.17395.
- [60]. Petrakis, V. *et al.* (2020) ‘Late presenters of HIV infection in an HIV unit of a Tertiary University Hospital in a rural region of Greece’, *AIDS Research and Human Retroviruses*, 36(7), pp. 601–605. doi:10.1089/aid.2019.0246.
- [61]. Kostaki, E.G. *et al.* (2022) ‘Estimation of the determinants for hiv late presentation using the traditional definition and molecular clock-inferred dates: Evidence that older age, heterosexual risk group and more recent diagnosis are prognostic factors’, *HIV Medicine*, 23(11), pp. 1143–1152. doi:10.1111/hiv.13415.
- [62]. Gandhi M, Aweeka F, Greenblatt RM, Blaschke TF (2004) ‘Sex differences in pharmacokinetics and pharmacodynamics’, *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 44(1), pp. 499–523. doi:10.1146/annurev.pharmtox.44.101802.121453.
- [63]. Siemieniuk R A C, Lytvyn L, Mah Ming J, Mullen R M, Anam F, Otieno T *et al.* (2017) ‘Antiretroviral therapy in pregnant women living with HIV: A clinical practice guideline’, *BMJ* [Preprint]. doi:10.1136/bmj.j3961.