ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΠΡΟΝΟΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΟΜΕΑΣ ΙΑΤΡΙΚΩΝ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΩΝ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΝΤΟΧΗΣ ΣΤΗΝ ΑΝΤΙΡΕΤΡΟΪΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΚΑΙ ΤΩΝ ΠΙΘΑΝΩΝ ΠΡΟΤΥΠΩΝ ΜΕΤΑΔΟΣΗΣ ΤΗΣ ΣΕ HIV-1 ΟΡΟΘΕΤΙΚΟΥΣ ΧΡΗΣΤΕΣ ΕΝΔΟΦΛΕΒΙΩΝ ΝΑΡΚΩΤΙΚΩΝ (ΧΕΝ) ΟΥΣΙΩΝ»

ΧΡΙΣΤΙΝΑ ΛΕΣΚΟΥ, Α.Μ.: 621-16036

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΑΠΟΣΤΟΛΟΣ ΜΠΕΛΟΥΚΑΣ,

ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΑΘΗΝΑ, 2021

UNIVERSITY OF WEST ATTICA

FACULTY OF HEALTH AND CARE SCIENCES

DEPARTMENT OF BIOMEDICAL SCIENCES

DIVISION OF MEDICAL LABORATORIES

DISSERTATION

"STUDY OF THE RESISTANCE TO ANTIRETROVIRAL THERAPY AND POSSIBLE TRANSMISSION PATTERNS TO HIV-1 SEROPOSITIVE INTRAVENOUS DRUG USERS (IDUs)"

CHRISTINA LESKOU, C.N. 621-16036

SUPERVISOR: APOSTOLOS BELOUKAS, ASSISTANT PROFESSOR OF MOLECULAR MICROBIOLOGY & VIROLOGY

ATHENS, 2021

Μέλη εξεταστική επιτροπής και εισηγητής της εργασίας :

ΑΠΟΣΤΟΛΟΣ ΜΠΕΛΟΥΚΑΣ

Apostolos Beloukas

Digitally signed by Apostolos Beloukas
Date: 2021.09.07 12:59:38 +03'00'

ΕΛΕΝΗ ΓΙΑΝΝΟΥΛΑΚΗ

Eleni Giannoulaki

Digitally signed by Eleni Giannoulaki
Date: 2021.09.13 17:53:58 +03'00'

ΧΡΥΣΑΝΘΗ ΒΟΓΙΑΤΖΑΚΗ

Chrysanthi Vogiatzaki

Digitally signed by Chrysanthi Vogiatzaki
Date: 2021.08.11 16:33:24 +03'00'

ΔΗΛΩΣΗ ΣΥΓΓΡΑΦΕΑ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ/ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η κάτωθι υπογεγραμμένη Χριστίνα Λέσκου του Γκέργκη, με αριθμό μητρώου 621-16036 φοιτήτρια του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής της Σχολής Βιοϊατρικών Επιστημών του Τμήματος Ιατρικών Εργαστηρίων, δηλώνω υπεύθυνα ότι:

«Είμαι συγγραφέας αυτής της πτυχιακής/διπλωματικής εργασίας και ότι κάθε βοήθεια την οποία είχα για την προετοιμασία της είναι πλήρως αναγνωρισμένη και αναφέρεται στην εργασία. Επίσης, οι όποιες πηγές από τις οποίες έκανα χρήση δεδομένων, ιδεών ή λέξεων, είτε ακριβώς είτε παραφρασμένες, αναφέρονται στο σύνολό τους, με πλήρη αναφορά στους συγγραφείς, τον εκδοτικό οίκο ή το περιοδικό, συμπεριλαμβανομένων και των πηγών που ενδεχομένως χρησιμοποιήθηκαν από το διαδίκτυο. Επίσης, βεβαιώνω ότι αυτή η εργασία έχει συγγραφεί από μένα αποκλειστικά και αποτελεί προϊόν πνευματικής ιδιοκτησίας τόσο δικής μου, όσο και του Ιδρύματος.

Παράβαση της ανωτέρω ακαδημαϊκής μου ευθύνης αποτελεί ουσιώδη λόγο για την ανάκληση του πτυχίου μου».

Η Δηλούσα,

Χριστίνα Λέσκου

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ iii
1.1 Γενικά χαρακτηριστικά του ιού HIV 1
1.1.1 Κλινικά συμπτώματα του HIV/AIDS 2
1.2 Δομή του ιού 3
1.2.1 Οργάνωση του γονιδιώματος του ιού HIV 3
1.2.1.1 Γενετική ποικιλομορφία του ιού HIV 6
1.3 Πολλαπλασιασμός του HIV 7
1.4 Μετάδοση του ιού HIV 8
1.5 Επιδημιολογία του HIV/AIDS 8
1.5.1 Επιδημιολογία του HIV/AIDS στην Ελλάδα 10
1.5.2 Επιδημία του HIV/AIDS στους ΧΕΝ 11
1.6 Αντιρετροϊκή θεραπεία 12
1.6.1 Αντοχή στην αντιρετροϊκή θεραπεία 14
2. ΣΚΟΠΟΣ 16
3. ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ 16
3.1 Εξοπλισμός εργαστηρίου 16
3.1.1 Μηχανήματα και συσκευές 16
3.1.2 Πλαστικά και γυάλινα υλικά 16
3.2 Δειγματοληψία 17
3.3 Καθαρισμός προϊόντων PCR-Purification 17
3.4 Ηλεκτροφόρηση 17
3.5 Φωτομέτρηση 18
3.6 Αλληλούχιση κατά Sanger 18
3.7 Ανάλυση Αλληλουχιών και Ανίχνευση Μεταλλάξεων 18
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ 19
4.1 Αλληλούχιση κατά Sanger 19

4.2 Ανίχνευση Μεταλλάξεων στις HIV-1 αλληλουχίες 20
4.2.1 Μεταλλάξεις στο γονίδιο της πρωτεάσης 21
4.2.2 Μεταλλάξεις στο γονίδιο της αντίστροφης μεταγραφάσης (RT) 23
4.3 Μεταλλάξεις που προκαλούν HIV-1 αντοχή 24
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ 27
6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ 28
ΠΕΡΙΛΗΨΗ 29
SUMMARY 30
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ 31

Συντομογραφίες

HIV	Human Immunodeficiency Virus
AIDS	Acquired Immunodeficiency Syndrome
SIV	Simian Immunodeficiency Virus
RT	Reverse Transcriptase
PR	Protease
IN	Integrase
PIC	Pre-Integration Syndrome
KS	Kaposi's Syndrome
HSV	Herpes Simplex Virus
CRF	Circulating Recombinant Forms
URF	Unique Recombinant Forms
PWID	People Who Inject Drugs
MSM	Men Who have sex with Men
MSW	Men who have sex with Women
XEN	Χρήστες Ενδοφλέβιων Ναρκωτικών ουσιών
ΑΣΑ	Άντρες που κάνουν σεξ με Άντρες
SW	Sex Workers
TRIP	Transmission Reduction Intervention Programme
HAART	Highly-Active Antiretroviral Therapy
NRTIs	Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors
NNRTIs	Nucleotide Reverse Transcriptase Inhibitors
NtRTIs	Non Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors
PIs	Protease Inhibitors
FIs	Fusion Inhibitors
CRIs	Co-Receptor Inhibitors
INIs	Integrase Inhibitors
HIVDR-ADR	Acquired HIV Drug Resistance
HIVDR-TDR	Transmitted HIV Drug Resistance
HIVDR-PDR	Pre-treatment HIV Drug Resistance

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Γενικά χαρακτηριστικά του ιού HIV

Ο *ιός της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας* (Human Immunodeficiency Virus, HIV) ανήκει στην τάξη των Ortervirales, στην οικογένεια των Retroviridae, στην υπο-οικογένεια των Orthoretrovirinae και στο γένος Lentivirus. Στο ίδιο γένος ανήκουν και οι ιοί της ανοσοανεπάρκειας των πιθήκων (Simian Immunodeficiency Viruses, SIVs), οι οποίοι μολύνουν διάφορα είδη μαϊμούδων και χιμπατζήδων. Οι ιοί που ανήκουν στο γένος Lentivirus προκαλούν χρόνιες επίμονες λοιμώξεις σε διάφορα είδη θηλαστικών, όπως τα αιλουροειδή, τα αιγοπρόβατα και τα πρωτεύοντα του Παλαιού Κόσμου. Υπάρχουν δύο τύποι του ιού HIV, ο HIV-1 και ο HIV-2, οι οποίοι θεωρείται ότι προέρχονται από δύο διαφορετικούς τύπους SIV, οι οποίοι πέρασαν από τον πίθηκο στον άνθρωπο, ξεπερνώντας το φράγμα των ειδών (Sharp P.M. and Hahn B.H., 2011). Όσον αφορά το γενετικό του υλικό, ο HIV-1 χαρακτηρίζεται από μεγάλη γενετική ποικιλομορφία και ταξινομείται σε 4 ομάδες (groups), η καθεμιά από τις οποίες υποδιαιρείται σε υπότυπους: η ομάδα M που διακρίνεται στους υπότυπους A-K, η ομάδα O, η ομάδα N και η πιο πρόσφατη, ομάδα P. Συγκριτικά με τον HIV-1, ο HIV-2 εξελίσσεται με πιο αργούς ρυθμούς, είναι λιγότερο επικίνδυνος και ταξινομείται με βάση το γενετικό του υλικό στους υπότυπους A-E, ενώ γενετικά διαφέρουν μεταξύ τους κατά ποσοστό μεγαλύτερο από 55% (Plantier et al, 2009; Sharp et al., 2001; Gao et al., 1994; Beloukas et al., 2016).

Ο ιός της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας ταυτοποιήθηκε για πρώτη φορά το 1983, όταν απομονώθηκε από βοηθητικά Τ-λεμφοκύτταρα (Helper T-Lymphocytes, T_H) και χαρακτηρίστηκε ως ο αιτιολογικός παράγοντας του *Συνδρόμου της Επίκτητης Ανοσοανεπάρκειας* (Acquired Immune Deficiency Syndrome, AIDS), που είχε ήδη αναγνωριστεί από το 1981 (Greenwood, Slack, Peutherer and Barer, 2007). Ο ιός HIV προσβάλλει τα κύτταρα που είναι υπεύθυνα για την άμυνα του οργανισμού ενάντια στις λοιμώξεις, καθιστώντας το άτομο επιρρεπή σε οποιονδήποτε λοιμογόνο παράγοντα (https://www.hiv.gov/hiv-basics/overview/about-hiv-and-aids/what-are-hiv-and-aids, accessed date: 10/10/2020). Ο ιός στοχεύει στο ανοσοποιητικό σύστημα του ανθρώπου και πιο συγκεκριμένα στα κύτταρα με δείκτη CD4+, ή αλλιώς τα βοηθητικά Τ-

λεμφοκύτταρα, τα μονοκύτταρα και τα δενδριτικά κύτταρα (Dendritic Cells, DC) (Greenwood, Slack, Peutherer and Barer, 2007).

1.1.1 Κλινικά συμπτώματα του HIV/AIDS

Τα στάδια της λοίμωξης από τον ιό HIV είναι η οξεία/αρχική λοίμωξη, η λανθάνουσα/χρόνια λοίμωξη και το τελευταίο στάδιο, το AIDS (Tortora, Funke and Case, 2016). Η οξεία λοίμωξη εμφανίζεται περίπου 2 με 4 εβδομάδες μετά την έκθεση του ατόμου στον ιό και τα συμπτώματα μοιάζουν με εκείνα της γρίπης, όπως για παράδειγμα πυρετός, πονοκέφαλος και κόπωση. Σε αυτό το στάδιο, ο ιός αρχίζει να πολλαπλασιάζεται και να καταστρέφει τα CD4+ κύτταρα του ξενιστή με γρήγορο ρυθμό. Η συγκέντρωση του HIV στο αίμα είναι πολύ υψηλή, με αποτέλεσμα να αυξάνεται και η μεταδοτικότητα του. Στη χρόνια λοίμωξη, το άτομο μπορεί να μην εμφανίσει καθόλου κλινικά συμπτώματα και για αυτό τον λόγο χαρακτηρίζεται και ως το ασυμπτωματικό στάδιο της λοίμωξης. Ο ιός προσπίπτει στη λανθάνουσα κατάσταση, όπου ο ρυθμός αναπαραγωγής του μειώνεται σε μεγάλο βαθμό όμως, το άτομο μπορεί να μεταδώσει τον ιό. Η χρόνια λοίμωξη μπορεί να διαρκέσει παραπάνω από 10 χρόνια και προς το τέλος της, το ιϊκό φορτίο αυξάνεται εκ νέου και μειώνονται σταδιακά τα CD4+ που είχαν αρχίσει να επανέρχονται στα φυσιολογικά τους επίπεδα (https://www.cdc.gov/hiv/basics/transmission.html, accessed date: 12/11/2020).

Το AIDS αποτελεί το τελικό στάδιο της HIV λοίμωξης και το πιο δριμύ. Όταν ο αριθμός των CD4+ κυττάρων είναι μικρότερος ή ίσος με 200 κύτταρα/mm^3 ή/και το άτομο προσβάλλεται από μία ή περισσότερες ευκαιριακές λοιμώξεις, τότε διαγιγνώσκεται με AIDS. Στις ευκαιριακές λοιμώξεις κατατάσσονται διάφορες μυκητιάσεις (π.χ. λοίμωξη από *Candida albicans, Pneumocystis jiroveci, Cryptosporidium parvum* κ.α.), η λοίμωξη από τον ιό του απλού έρπητα (*Herpes Simplex Virus*, HSV) και διάφορες μορφές καρκίνου, όπως το λέμφωμα και το σάρκωμα Kaposi (Kaposi's sarcoma, KS). Στο στάδιο του AIDS το ανοσοποιητικό σύστημα είναι καταβεβλημένο σε εξαιρετικά μεγάλο βαθμό και μειώνεται αισθητά η ικανότητα του να προστατεύει τον οργανισμό από άλλες λοιμώξεις. Τα επίπεδα του ιϊκού φορτίου στο αίμα είναι πολύ υψηλά, γεγονός που συνεπάγεται την υψηλή μεταδοτικότητα του ιού. Από τη στιγμή της διάγνωσης και χωρίς τη χορήγηση θεραπείας, ο ασθενής έχει προσδόκιμο ζωής περίπου

3 χρόνια (https://hivinfo.nih.gov/understanding-hiv/fact-sheets/stages-hiv-infection, accessed date: 12/11/2020; https://www.cdc.gov/hiv/basics/livingwithhiv/opportunisticinfections.html, accessed date: 12/11/2020)

1.2 Δομή του ιού

Η δομή του HIV ακολουθεί τη χαρακτηριστική δομή των ρετροϊών. Το ιϊκό σωματίδιο του HIV-1 είναι πλειομορφικό, έχει σφαιρικό σχήμα και διάμετρο περίπου 100nm. Ο ιός περιβάλλεται από φάκελο, μία φωσφολιπιδική διπλοστιβάδα, στην επιφάνεια του οποίου εντοπίζονται ακίδες από μια γλυκοπρωτεΐνη, την gp120. Ο φάκελος φέρει επίσης, τη διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη gp41, η οποία συνδέεται με την gp120, καθώς και κάποιες πρωτεΐνες που προέρχονται από το κύτταρο-ξενιστή, όπως αντιγόνα του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας και ακτίνη. Εσωτερικά του περιβλήματος εντοπίζεται η πρωτεϊνική μήτρα που δομείται από την πρωτεΐνη (matrix protein) p17 και η οποία περιβάλει ένα κωνικό καψίδιο, το νουκλεοκαψίδιο. Η κύρια πρωτεΐνη του νουκλεοκαψιδίου είναι η p24. Το νουκλεοκαψίδιο περιβάλλει 2 πανομοιότυπα μονόκλωνα RNA μόρια θετικής πολικότητας (+ssRNA), που αποτελούν το γονιδίωμα του ιού, καθώς και τα ένζυμα αντίστροφη μεταγραφάση (p64) και ιντεγκράση (p32), τα οποία προσδένονται στα μόρια +ssRNA και είναι απαραίτητα για τον πολλαπλασιασμό του ιού. Επίσης, προσδεμένο στο γονιδίωμα του ιού βρίσκεται ένα μόριο tRNA που φέρει το αμινοξύ λυσίνη (Lys), καθώς είναι απαραίτητο για την έναρξη της αντίστροφης μεταγραφής του ιϊκού γονιδιώματος και τη σύνθεση συμπληρωματικής cDNA αλυσίδας. Τέλος, ενδιάμεσα της πρωτεϊνικής μήτρας και του νουκλεοκαψιδίου εντοπίζεται η πρωτεάση (p10) (Goldschmidt et al., 2010; Ferguson, M. R. et al., 2002; Tortora, Funke and Case, 2016; Turner and Summers, 1999).

1.2.1 Οργάνωση του γονιδιώματος του ιού HIV

Το γονιδίωμα του HIV έχει μήκος περίπου 10kb και αποτελείται από δύο πανομοιότυπα μονόκλωνα γραμμικά μόρια RNA. Τα μόρια RNA είναι θετικής πολικότητας, δηλαδή μπορούν να λειτουργούν ως μόρια mRNA, τα οποία κωδικοποιούν μία πολυπρωτεΐνη από την οποία στη συνέχεια θα προκύψουν οι επιμέρους πρωτεΐνες του ιού. Για την άμεση μετάφραση των 2 αντιγράφων RNA, στο 5’ άκρο υπάρχει

προσδεμένη καλύπτρα και στο 3΄ άκρο μία πολυ-Α ουρά. Το γονιδίωμα του ιού HIV-1 αποτελείται από τα δομικά γονίδια *gag*, *pol* και *env*, τα βοηθητικά γονίδια *vif*, *vpr*, *nef*, *vpu* και τα ρυθμιστικά γονίδια *rev* και *tat*. Τα δομικά γονίδια κωδικοποιούν πρωτεΐνες και ένζυμα απαραίτητα για τη συναρμολόγηση και τον πολλαπλασιασμό του ιού, ενώ τα βοηθητικά και τα ρυθμιστικά κωδικοποιούν πρωτεΐνες και παράγοντες με ρυθμιστικό ρόλο στα διάφορα στάδια του κύκλου ζωής του ιού εντός του κυττάρου-ξενιστή (Rajarapu, 2014; Ferguson et al., 2002).

Το γονίδιο *gag*, από την αγγλική φράση group specific antigen, που σημαίνει ειδικό αντιγόνο ομάδας, κωδικοποιεί την πρόδρομη πολυπρωτεΐνη Pr55gag, η οποία είναι υπεύθυνη για το σχηματισμό κύριων δομικών πρωτεϊνών του νουκλεοκαψιδίου και της πρωτεϊνικής μήτρας. Κατά το στάδιο της εκβλάστησης στον πολλαπλασιασμό του HIV-1, ενεργοποιείται το ένζυμο πρωτεάση p10 και διασπά την Pr55gag στις επιμέρους πρωτεΐνες p17 της μήτρας, p24 του νουκλοεκαψιδίου, p15 και τα πεπτίδια (spacer peptides) 1 και 2 (Sandefur et al., 2000; Freed, 2001).

Το γονίδιο *env*, από την αγγλική λέξη envelope, που σημαίνει φάκελος ή περίβλημα, κωδικοποιεί τις γλυκοπρωτεΐνες gp120 και gp41 που απαρτίζουν τον ιϊκό φάκελο. Οι δυο δομικές πρωτεΐνες του φακέλου δημιουργούνται με την διάσπαση της πρόδρομης γλυκοπρωτεΐνης gp160 που κωδικοποιείται από το γονίδιο *env*. Η gp120 φέρει τον επίτοπο για τη σύνδεση του HIV με τον υποδοχέα CD4+ και η gp41 φέρει στο αμινοτελικό άκρο της ένα υδρόφοβο πεπτίδιο σύντηξης, το οποίο συμμετέχει στη σύντηξη του ιού με τη μεμβράνη του κυττάρου-ξενιστή. Το γονίδιο *env* ενεργοποιείται μόνο σε συγκεκριμένες περιπτώσεις, όπως κατά την επαφή ενός ιϊκού σωματιδίου με το εκάστοτε κύτταρο-στόχο (Sandefur et al., 2000).

Το γονίδιο *pol*, από την αγγλική λέξη polymerase, που σημαίνει πολυμεράση, κωδικοποιεί τα ένζυμα πρωτεάση (protease, PR) p10, αντίστροφη μεταγραφάση (reverse transcriptase, RT) p66/51 και ιντεγκράση (integrase, IN) p32 και δεν διαθέτει κωδικόνιο έναρξης. Η αλληλουχία που κωδικοποιεί την πρωτεάση χαρτογραφείται στο 5’ άκρο του γονιδίου, ακολουθεί η αντίστροφη μεταγραφάση, ενώ η αλληλουχία που κωδικοποιεί την ιντεγκράση εντοπίζεται στο 3’ άκρο του γονιδίου. Αρχικά, τα ένζυμα συντίθενται ως μέρος της πρόδρομης πρωτεΐνης Pr160GagPol και στη συνέχεια κόβονται από την ιϊκή πρωτεάση. Τα ένζυμα που κωδικοποιούνται από το γονίδιο *pol* δεν είναι λειτουργικά

στην απλή μορφή τους ως μονομερή και πρέπει να αποκτήσουν διμερή, ετεροδιμερή και τετραμερή μορφή για να είναι πλήρως λειτουργικά (Freed, 2001; Rajarapu, 2014; Hill et al., 2006; Pommier et al., 2005).

Η πρωτεάση είναι ένα ασπαρτιλικό ομοδιμερές που αποτελείται από 99 αμινοξέα σε κάθε πολυπεπτίδιο. Η διαδικασία αυτή λαμβάνει χώρα κατά τον κύκλο πολλαπλασιασμού του ιού, μετά το στάδιο της εκβλάστησης και σηματοδοτεί την έναρξη του σταδίου της ωρίμανσης. Η σημασία της πρωτεάσης έγκειται στη δράση της, δηλαδή την αποκοπή των ιϊκών πρόδρομων πολυπρωτεϊνών Gag και GagPol, η οποία καθορίζει τη λοιμογόνο δράση του ιού. Η δραστηριότητα της πρωτεάσης δεν είναι αυτή καθεαυτή απαραίτητη για τη δημιουργία του ιού. Ωστόσο, έχει παρατηρηθεί ότι με την καταστολή της πρωτεάσης, ο ιός καθίσταται αβλαβής και τα νέα ιϊκά σωματίδια που παράγονται δεν ωριμάζουν και είναι μη μολυσματικά (Nicholson et al., 1995; Frankel and Young, 1998; Wensing et al., 2010).

Η αντίστροφη μεταγραφάση (RT) είναι ένα ετεροδιμερές ένζυμο που αποτελείται από δύο επιμέρους πρωτεΐνες, τις p51 και p66, οι οποίες προέρχονται από την πρωτεόλυση της Pr55gag από την πρωτεάση του HIV-1. Η RT είναι μια RNA-εξαρτώμενη DNA πολυμεράση και έχει διπλή λειτουργία. Η μία λειτουργία της είναι αυτή της DNA πολυμεράσης, δηλαδή η προσθήκη dNTPs κατά την αντιγραφή των νουκλεϊκών οξέων και η δεύτερη είναι αυτή της RNAάσης Η, δηλαδή η απομάκρυνση και διάσπαση των αλυσίδων RNA από υβριδικά μόρια RNA/DNA, μέσω υδρόλυσης. Οι δύο ενζυματικές δράσεις της RT είναι εξίσου σημαντικές για την αντιγραφή του γονιδιώματος του ιού. Το ένζυμο RT μεταγράφει αντίστροφα το γονιδίωμα του HIV από μονόκλωνο RNA σε δίκλωνο DNA μόριο. Η υπομονάδα p66 που είναι και η μεγαλύτερη, περιλαμβάνει τα ενεργά κέντρα και των δύο λειτουργιών της RT, ενώ η μικρότερη υπομονάδα p51 έχει δομικό ρόλο. Οι δύο υπομονάδες αποτελούνται αμφότερες από τέσσερις διακριτές περιοχές που ονομάζονται «δάχτυλα», «παλάμη», «αντίχειρας» και «συνδετήρας», οι οποίες είναι τοποθετημένες σε διαφορετικά σημεία. Σε ένα ιϊκό σωματίδιο υπάρχουν περίπου 50 μόρια του ενζύμου RT. Για την εκκίνηση της δράσης της RT απαιτείται η ύπαρξη ενός εκκινητή και μίας DNA μήτρας (Sarafianos et al., 2009; Frankel and Young, 1998).

Η ιντεγκράση είναι ένα διμερές ένζυμο με κύριο ρόλο την ενσωμάτωση του ιϊκού DNA στο γονιδίωμα του κυττάρου-ξενιστή. Μαζί με το cDNA μόριο που προκύπτει από την αντίστροφη μεταγραφή του ιϊκού γονιδιώματος, η ιντεγκράση αποτελεί μέρος του σύμπλοκου προ-ενσωμάτωσης (Pre-integration complex, PIC), η δράση του οποίου περιλαμβάνει την αποκοπή και τη σύνδεση τμημάτων του cDNA με στόχο την ενσωμάτωσή του στο γονιδίωμα του κυττάρου ξενιστή. Η ιντεγκράση αποτελείται από 288 αμινοξέα και περιλαμβάνει τρεις δομικές περιοχές : το N – τελικό άκρο , το κεντρικό τμήμα-πυρήνα και το C – τελικό άκρο. Η ενσωμάτωση του cDNA στο γονιδίωμα του μολυσμένου κυττάρου καταλύεται σε δύο στάδια, την επεξεργασία του 3’ άκρου και τη μεταφορά του κλώνου. Για τη διαδικασία αυτή απαιτείται η ενεργοποίηση και των τριών δομικών περιοχών της ιντεγκράσης. Ωστόσο, ο καταλυτικός πυρήνας είναι εκείνος που περιέχει το ενεργό κέντρο του ενζύμου και μπορεί μόνος του να καταλύσει την αντίστροφη διαδικασία της μεταφοράς του κλώνου. Η ιντεγκράση του ιού HIV-1 είναι όμοια με τις ιντεγκράσες των υπόλοιπων ρετροϊών και η δομή της μοιάζει με άλλες DNA - τρανσφεράσες όπως η τρανσποζάση και η RNAάση H. Κάθε ιϊκό σωματίδιο περιέχει περίπου 40–100 μόρια ιντεγκράσης (Pommier et al., 2005; Esposito and Craigie; 1999; Turner and Summers, 1999).

1.2.1.1 Γενετική ποικιλομορφία του ιού HIV

Ο HIV-1 χαρακτηρίζεται από μεγάλη γενετική ετερογένεια λόγω του εξαιρετικά γρήγορου ρυθμού με τον οποίο πολλαπλασιάζεται και του μεγάλου ποσοστού λάθους του ενζύμου RT. Τα στελέχη του HIV-1 χωρίζονται στις ομάδες M, O, N και P. Η ομάδα M, από την αγγλική λέξη main που σημαίνει κύριος ή πρωτεύων, είναι υπεύθυνη για τα περισσότερα κρούσματα σε παγκόσμιο επίπεδο και διαιρείται σε 9 ξεχωριστούς υπότυπους ή κλάδους (A1 - A5, B-E, F1, F2, J - K). Η ομάδα O, από την αγγλική λέξη outlier που σημαίνει ακραίος, περιλαμβάνει τα εξαιρετικά αποκλίνοντα στελέχη, τα οποία κυριαρχούν στην Ισημερινή Δυτική Αφρική. Η ομάδα N, δηλαδή ούτε M, ούτε O, αποτελείται από λίγα στελέχη, τα οποία κυκλοφορούν στο Καμερούν και προέρχονται από τον SIV του χιμπατζή (SIV_{cpz}) (Sharp, 2001; Kostaki et al, 2020). Η ομάδα P είναι η πιο πρόσφατη, προέρχεται από γορίλες και αποτελείται από 2 στελέχη, τα οποία είναι πολύ σπάνια και λιγότερο μολυσματικά, ακόμη και από τα στελέχη του HIV-2, που είναι ο

λιγότερο μολυσματικός γνωστος τύπος του HIV (Plantier et al, 2009; Alessandri-Gradt et al., 2018).

Οι υπότυποι της ομάδας M έχουν την ικανότητα να συνδυάζονται μεταξύ τους και να δημιουργούν ανασυνδυασμένους ενδοϋπότυπους (inter-subtypes). Οι ανασυνδυασμένες μορφές διακρίνονται σε 2 κατηγορίες: στις κυκλοφορούσες ανασυνδυασμένες μορφές (circulating recombinant forms, CRF) και τις μοναδικές ανασυνδυασμένες μορφές (unique recombinant forms, URF). Στις CRF κατατάσσονται τα στελέχη που έχουν βρεθεί σε τουλάχιστον 3 άτομα, τα οποία επιδημιολογικά δεν σχετίζονται μεταξύ τους ενώ στις URF ανήκουν τα στελέχη που δεν μοιάζουν με κανένα ταυτοποιημένο CRF και έχουν βρεθεί σε λιγότερα από 3 άτομα. Ο ανασυνδυασμός ανάμεσα στους υπότυπους είναι ένας μηχανισμός ευνοϊκός για τον HIV. Με τον τρόπο αυτό, μπορεί να ελέγξει τις ευμενείς και τις επιβλαβείς μεταλλάξεις που λαμβάνουν χώρα στο γονιδίωμα του και να βελτιώσει την ικανότητα του να εξοικειώνεται στα διαφορετικά περιβάλλοντα των ξενιστών του (Paraskevis and Hatzakis, 2018; Santos and Soares, 2010; Vuilleumier and Bonhoeffer, 2015).

1.3 Πολλαπλασιασμός του HIV

Η αναπαραγωγή του HIV χωρίζεται σε δύο κύρια στάδια, το πρώιμο και το τελικό. Το πρώιμο στάδιο περιλαμβάνει την προσρόφηση, τη σύντηξη και την απέκδυση. Το τελικό στάδιο περιλαμβάνει τη γονιδιακή έκφραση, την ωρίμανση των ιικών σωματιδίων και την απελευθέρωση τους. Κατά την προσρόφηση, ο ιός προσκολλάται μέσω της πρωτεΐνης gp120 του φακέλου του στους υποδοχείς των Τ-λεμφοκυττάρων (CD4+). Κατά τη σύντηξη και την απέκδυση γίνεται ενδοκυτταρική μεταφορά του νουκλεοκαψιδίου και απελευθέρωση του γενετικού υλικού στο κυτταρόπλασμα. Αυτές οι τρεις ενέργειες συνιστούν την είσοδο του ιού μέσα στο κύτταρο – στόχο (Freed, E.O, 2015; Wyatt and Sodroski, 1998).

Μετά την είσοδο του ιού ξεκινάει η διαδικασία της δημιουργίας του δίκλωνου DNA μέσω της δράσης του ενζύμου RT. Στη συνέχεια, το δίκλωνο αυτό μόριο ενσωματώνεται στο γονιδίωμα του κυττάρου – ξενιστή μέσω της δράσης της ιντεγκράσης. Ο ιός θα μεταγραφεί και θα μεταφραστεί χρησιμοποιώντας τα ένζυμα και τα κυτταρικά οργανίδια του κυττάρου, με αποτέλεσμα την παραγωγή των πρωτεϊνών του στο κυτταρόπλασμα

του ξενιστή. Έπειτα, όλα τα προϊόντα που σχηματίστηκαν από όλη αυτή τη διαδικασία, θα συναθροιστούν και θα σχηματίσουν το ιϊκό σωματίδιο, παραμένοντας στο κυτταρόπλασμα. Η δημιουργία του σωματιδίου διακρίνεται στη συναρμολόγηση, την εκκόλαψη και την ωρίμανση. Η ωρίμανση του ιού είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη της αντιγονικής του δράσης και της μολυσματικότητας του. Τέλος, λαμβάνει χώρα η εκβλάστηση του ιού, κατά την οποία υπάρχει αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών του καψιδίου με τις πρωτεΐνες του φακέλου στην κυτταρική μεμβράνη του ξενιστή, με σκοπό την απελευθέρωση του μέσω του κυκλοφορικού συστήματος του (Freed, E.O., 2015; Zheng, Y. H. et al., 2005; Sundquist and Krausslich, 2012).

1.4 Τρόποι μετάδοσης του ιού HIV

Ο πιο κοινός τρόπος μετάδοσης του ιού HIV είναι κατά τη σεξουαλική επαφή μέσω του σπέρματος και των κολπικών εκκρίσεων**,** του ορθικού υγρού κατά την πρωκτική συνουσία και δια της στοματικής οδού μέσω του στοματικού σεξ, τουτέστιν, μέσω της επαφής με βλεννογόνες επιφάνειες. Ο δεύτερος πιο κοινός τρόπος μετάδοσης του είναι μέσω του αίματος και των παραγώγων του, δηλαδή μέσω νύξης ή τραυματισμού με βελόνα, ενδοφλέβια χρήση ναρκωτικών ουσιών, χρήση κοινών συριγγών μεταξύ τοξικοεξαρτημένων και με μετάγγιση μολυσμένου αίματος και παραγώγων του. Ο ιός ανιχνεύεται σε μεγαλύτερη συγκέντρωση στο αίμα, στο σπέρμα και στο κολπικό υγρό. Αυτοί οι τρόποι αποτελούν την οριζόντια μετάδοση. Μια ακόμη οδός μετάδοσης του HIV είναι και η περιγεννητική μετάδοση, δηλαδή από τη μητέρα στο νεογνό. Η περιγεννητική μετάδοση μπορεί να επέλθει μέσω του μητρικού γάλακτος κατά το θηλασμό, κατά τη διάρκεια του τοκετού περνώντας μέσα απ' το κανάλι γέννησης και από ενδομητρική μόλυνση, δηλαδή μετάδοση κατά την εγκυμοσύνη. Η μετάδοση ενός ιού από τη μητέρα στο νεογνό ονομάζεται αλλιώς και κάθετη μετάδοση (Rom and Markowicz, 2007; https://www.cdc.gov/hiv/basics/transmission.html, accessed date: 12/11/2020).

1.5 Επιδημιολογία του HIV/AIDS

Η επιδημία του HIV/AIDS εμφανίστηκε για πρώτη φορά στις Η.Π.Α στις αρχές της δεκαετίας του 1980 και αφορούσε σχεδόν αποκλειστικά, άτομα που διατηρούσαν ομοφυλοφιλικές σεξουαλικές επαφές. Πολύ σύντομα, ο ιός μεταδόθηκε και στους χρήστες ενδοφλέβιων ουσιών (People who inject drugs, PWID) (XEN), διευρύνοντας το

μέγεθος της επιδημίας. Η είσοδος του HIV στην Ευρώπη συνέβη άμεσα μετά την εμφάνιση του στις Η.Π.Α. Οι περισσότερες περιπτώσεις αφορούσαν λοιμώξεις από στελέχη υποτύπου Β πρωτίστως σε άντρες που κάνουν σεξ με άντρες (Men who have sex with men, MSM) και ακολούθως σε άντρες που κάνουν σεξ με γυναίκες (Men who have sex with women, MSW). Μικρότερη επίπτωση είχαν οι αιμοφιλικοί που έκαναν συχνά μετάγγιση αίματος και οι ΧΕΝ. Τις τελευταίες δεκαετίες, οι μετακινήσεις πληθυσμών και η μετανάστευση έχουν δώσει χώρο στη λοίμωξη να εξαπλωθεί σε παγκόσμιο επίπεδο (Tortora, Funke and Case, 2016; Beloukas et al., 2016).

Σήμερα, περίπου 38 εκατομμύρια άνθρωποι παγκοσμίως έχουν μολυνθεί και ζουν με HIV λοίμωξη, αριθμός που έχει σταθεροποιηθεί την τελευταία εικοσαετία (unaids.org; Hemelaar, 2012). Η λοίμωξη δεν περιορίζεται, πλέον, μόνο στους άντρες που κάνουν σεξ με άντρες (ΑΣΑ) αλλά έχει εξαπλωθεί στον γενικότερο πληθυσμό με κάποιες ομάδες ατόμων να είναι περισσότερο ευάλωτες. Αυτές οι ομάδες περιλαμβάνουν εκτός από τους ΑΣΑ, επιπλέον και τους ΧΕΝ, τους σεξεργάτες (Sex workers, SW) και τους διεμφυλικούς (transgender). Η πλειοψηφία των ατόμων που ζουν με HIV λοίμωξη βρίσκεται στην Αφρική, όπου παρατηρείται η μεγαλύτερη γενετική ποικιλομορφία του HIV-1. Οι περισσότερο πληγείσες περιοχές βρίσκονται στο υπο-Σαχάριο τμήμα της, με επικρατέστερους υπότυπους τους Α, C και CRF02_AG και κύρια οδό εξάπλωσης μέσω των ετεροφυλόφιλων ανδρών. Επιπλέον, σε αντίθεση με τον υπόλοιπο κόσμο, στην υπο-Σαχάρια Αφρική υπάρχει μεγάλος κίνδυνος μετάδοσης του ιού με περιγεννητική μετάδοση.

Μετά την Αφρική, ακολουθεί η Ασία με τον αμέσως μεγαλύτερο αριθμό κρουσμάτων HIV λοίμωξης, με πιο επιβεβαρυμμένες χώρες την Κίνα και την Ινδία. Η μετάδοση γίνεται μέσω των ΧΕΝ και των ΑΣΑ και τα επικρατέστερα στελέχη ανήκουν στις CRF (π.χ CRF01_AE στην Κίνα). Στη Βόρεια Αμερική, την Κεντρική και Δυτική Ευρώπη και την Ωκεανία ο επικρατέστερος υπότυπος είναι ο Β και η κύρια οδός εξάπλωσης του ιού είναι μέσω των ΑΣΑ. Οι μόνες χώρες ανάμεσα σε αυτές τις περιοχές που οι ΧΕΝ αποτελούν την κύρια ομάδα κινδύνου είναι η Λιθουανία και η Εσθονία. Τουναντίον, στην Ανατολική Ευρώπη και τις χώρες της πρώην Ε.Σ.Σ.Δ υπερέχει ο κλάδος Α και η μετάδοση του HIV γίνεται κυρίως μέσω των ανδρών που κάνουν σεξ με γυναίκες και των ΧΕΝ. Ο επικρατέστερος υπότυπος παγκοσμίως είναι ο C, ο οποίος ευθύνεται για παραπάνω από το 50% των λοιμώξεων HIV/AIDS. Ωστόσο, η κατανομή των υποτύπων και η πορεία της

επιδημίας από χώρα σε χώρα διαφέρει, εξαιτίας των κοινωνικών και οικονομικών φαινομένων που τις χαρακτηρίζουν (Bbosa et al., 2019; Beloukas et al., 2016; Fettig et al., 2014).

1.5.1 Επιδημιολογία του HIV/AIDS στην Ελλάδα

Στην Ελλάδα, το πρώτο κρούσμα HIV/AIDS εμφανίστηκε στις αρχές της δεκαετίας του 1980 στους ΑΣΑ. Οι ετεροφυλοφιλικοί πληθυσμοί άρχισαν να μολύνονται αργότερα, τη δεκαετία του 1990, όπως και στην υπόλοιπη Ευρώπη. Ο επικρατών κλάδος ήταν ο Β, διότι αυτός πρόσβαλε περισσότερο τους ΑΣΑ. Τα μη-Β στελέχη σχετίζονταν με ετεροφυλόφιλους άνδρες και μετανάστες και ήταν ελάχιστα, σε σχέση με τα Β. Με την πάροδο του χρόνου, τα Α-στελέχη και κάποιες ανασυνδυασμένες μορφές άρχισαν να πληθαίνουν, ενώ τα Β-στελέχη να μειώνονται, μετρώντας λιγότερα από τα Α από το 2004 και έπειτα. Συγκεκριμένα στις αρχές του 1980, ο επιπολασμός του υπότυπου Β ήταν περίπου 90% και στα μέσα της δεκαετίας του 2000 έφτασε στο 4%. Η αιτία της σταδιακής αυτής αύξησης των μη-Β στελεχών και συγκεκριμένα των Α, ήταν το μεγάλο μεταναστευτικό κύμα από την ήπειρο της Αφρικής προς τη νότια Ευρώπη. Εντούτοις, η χώρα προέλευσης των περισσότερων νεοδιαγνωσθέντων κρουσμάτων ήταν η Ελλάδα. Σήμερα, ο υπότυπος Α και συγκεκριμένα ο υπό-υπότυπος Α1, έχει ξεπεράσει τον κλάδο Β σε αριθμό περιπτώσεων (Paraskevis et al., 2007; Nikolopoulos et al., 2008; Mouzaki et al., 2015).

Η επίπτωση του HIV/AIDS ήταν σταθερή καθ' όλη τη διάρκεια της δεκαετίας του 1990. Με την είσοδο στη νέα χιλιετία σημειώθηκαν αρκετές διακυμάνσεις όσον αφορά την εμφάνιση νέων κρουσμάτων. Οι άντρες, από την αρχή της επιδημίας μέχρι και σήμερα, πλήττονται κατά πολύ μεγαλύτερο ποσοστό από τη λοίμωξη, σε σύγκριση με τις γυναίκες. Οι ηλικιακές ομάδες με τα περισσότερα κρούσματα είναι τα άτομα 30-39 ετών και ακολουθούν σε επιπολασμό τα άτομα 40-49 ετών και στα δύο φύλα. Με την πάροδο του χρόνου, τα κρούσματα στα ετεροφυλόφιλα άτομα αυξήθηκαν σταδιακά εξαιτίας της μη χρήσης προφυλακτικού. Ωστόσο, οι ΑΣΑ παραμένουν μέχρι και σήμερα, τα άτομα με τον μεγαλύτερο επιπολασμό. Η λοίμωξη στους ΧΕΝ ήταν διαχειρίσιμη και σε χαμηλά επίπεδα με κάποια σποραδικά κρούσματα από την αρχή της επιδημίας μέχρι και τα πρώτα έτη της δεκαετίας του 2010. Τα επικρατέστερα στελέχη ήταν υπότυπου Β και Α, όπως και στους ΑΣΑ. Αδρομερώς, ο επιπολασμός του HIV στην Ελλάδα ήταν σχετικά

χαμηλός σε όλες τις ευπαθείς ομάδες. Εντούτοις, τους πρώτους μήνες του 2011 παρατηρήθηκε μια εκρηκτική αύξηση κρουσμάτων άνευ προηγουμένου στους ΧΕΝ, η οποία διήρκεσε περίπου 3 χρόνια, αλλάζοντας εξ' ολοκλήρου το επιδημιολογικό προφίλ της ασθένειας HIV/AIDS (Paraskevis et al., 2013; Nikolopoulos et al., 2008; eody.gov.gr)

1.5.2 Επιδημία του HIV/AIDS στους ΧΕΝ

Η επιδημική έξαρση στους χρήστες ενδοφλέβιων ναρκωτικών ουσιών συνδέθηκε στενά με την οικονομική ύφεση, στην οποία υποβλήθηκε η Ελλάδα στα τέλη της δεκαετίας του 2000. Το κέντρο της επιδημίας αυτής ήταν η Αθήνα, η πρωτεύουσα. Τα τρία χρόνια που διήρκεσε η επιδημία, τα κρούσματα εκτοξεύθηκαν από περίπου 20 το χρόνο σε περισσότερα από 1000 συνολικά. Η αύξηση αυτή παρατηρήθηκε σε μια περίοδο και σε ένα περιβάλλον όπου είχε τεθεί σε ισχύ πρόγραμμα ανταλλαγής συριγγών με τη βοήθεια του ΟΚΑΝΑ (Οργανισμός Κατά των Ναρκωτικών) και διανομή δωρεάν συριγγών από τα φαρμακεία, με πολύ περιορισμένη, ωστόσο, δράση. Η πλειοψηφία των καταγεγραμμένων κρουσμάτων αφορούσε άτομα του αρσενικού φύλου και ελληνικής καταγωγής, καθώς και άτομα που έκαναν χρήση ηρωίνης με επαναχρησιμοποιημένες βελόνες και είχαν μόνιμη κατοικία (Paraskevis et al., 2013; Pavlopoulou et al., 2017).

Κατά τη διάρκεια της επιδημίας, εισήχθησαν στο προσκήνιο δύο νέοι κλάδοι ανασυνδυασμένης μορφής, οι CRF14_BG και CRF35_AD, οι οποίοι ήταν και οι επικρατέστεροι στους ΧΕΝ εκείνη την περίοδο. Η προέλευση των κυκλοφορούντων γονοτύπων ήταν κυρίως ασιατική και ελληνική, με κάποια στελέχη που εικάζεται ότι προήλθαν από τη Ρουμανία και τη Βουλγαρία. Παρά το γεγονός ότι οι περισσότεροι νεοδιαγνωσθέντες ήταν ελληνικής καταγωγής, η επίπτωση της λοίμωξης ήταν μεγαλύτερη σε μετανάστες. Τα στελέχη που δεν επικρατούσαν ανάμεσα στους ΧΕΝ πριν την επιδημία, εισήχθησαν από άτομο της ομάδας των ΑΣΑ ή από ετεροφυλόφιλο άτομο μέσω απροφύλακτης σεξουαλικής επαφής, καθώς και από χρήστες οι οποίοι μολύνθηκαν στο εξωτερικό ή είχαν μολυνθεί πριν μεταναστεύσουν (Paraskevis et al., 2017; 2013; 2018; Malliori et al., 2011)

Για την αντιμετώπιση της επιδημίας και την πρόληψη νέων περιστατικών, τέθηκε σε ισχύ το πρόγραμμα «ΑΡΙΣΤΟΤΕΛΗΣ». Το πρόγραμμα διήρκεσε από τα μέσα του 2012 έως και το 2013 με πρωτοβουλία του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Αθηνών. Ο

στόχος του ήταν η ταυτοποίηση και η διάγνωση ατόμων με λοίμωξη HIV που ζούσαν με τον ιό και δεν το γνώριζαν, καθώς και η παροχή φαρμακευτικής βοήθειας και πρώτων υλών για την πρόληψη και την απώτερη ύφεση της επιδημίας. Το «ΑΡΙΣΤΟΤΕΛΗΣ» κατάφερε να ελαττώσει τον αριθμό των ατόμων που ζούσαν χωρίς διάγνωση και την επίπτωση του HIV/AIDS στην ευπαθή ομάδα των ΧΕΝ, περίπου ένα χρόνο μετά το πέρας της δράσης του, όταν άρχισε να γίνεται εμφανής η πτώση του αριθμού των κρουσμάτων ανά έτος. Ωστόσο, ο ετήσιος αριθμός κρουσμάτων δεν έφτασε στο σημείο που ήταν προ επιδημίας, παρά μόνο το 2016, όταν άρχισε να σταθεροποιείται ξανά (Pavlopoulou et al., 2020; Sypsa et al., 2017).

Ένα άλλο πρόγραμμα που έλαβε δράση την διετία 2013-2015, είχε σκοπό τον εντοπισμό ατόμων που είχαν μολυνθεί το τελευταίο εξάμηνο από τον ιό, διερευνώντας τα κοινωνικά δίκτυα των χρηστών ενδοφλέβιων ουσιών. Το πρόγραμμα αυτό ονομάστηκε Πρόγραμμα Μείωσης της Μετάδοσης του HIV (Transmission Reduction Intervention Programme, TRIP), δρούσε σε συνεργασία με το «ΑΡΙΣΤΟΤΕΛΗΣ» και μελετούσε τη σχέση μεταξύ των επικίνδυνων συμπεριφορών κατά τη χρήση ναρκωτικών και του ρυθμού μετάδοσης του HIV στους ΧΕΝ για την απώτερη πρόληψη της μετάδοσης του. Ο εντοπισμός και ο έλεγχος των ΧΕΝ που ανήκουν σε συγκεκριμένα δίκτυα οδηγούσε αναδρομικά σε περισσότερα άτομα με πρόσφατη μόλυνση. Με άξονα το γεγονός ότι τα προσφάτως μολυσμένα άτομα είναι και περισσότερο μολυσματικά λόγω του υψηλού φορτίου HIV RNA, το πρόγραμμα συνέδραμε στην πρόληψη μέσω της ταχύτερης δυνατής χορήγησης αντιρετροϊκής θεραπείας στους ΧΕΝ που συμμετείχαν στο πρόγραμμα (Kostaki et al., 2018; Nikolopoulos et al., 2016).

1.6 Αντιρετροϊκή θεραπεία

Για την αντιμετώπιση του HIV έχουν παρασκευαστεί πολλά φάρμακα από τα πρώτα μόλις χρόνια της ανακάλυψης του, το καθένα με διαφορετικό στόχο, δράση και αποτέλεσμα. Η έναρξη της θεραπείας ενός ατόμου με HIV λοίμωξη, παλαιότερα εξαρτιόταν από τον ρυθμό μείωσης των CD4+ και την εμφάνιση των κλινικών συμπτωμάτων του AIDS. Σήμερα, ο αριθμός των CD4+ δεν επηρεάζει τη χρονική στιγμή έναρξης της θεραπείας, η οποία συνήθως παρέχεται αμέσως μετά τη διάγνωση του ασθενούς με HIV. Τα αντιρετροϊκά φάρμακα χορηγούνται συνδυαστικά προς επίτευξη

της μέγιστης δυνατής αποτελεσματικότητας, συνιστώντας την Υψηλής Δραστικότητας Αντιρετροϊκή Θεραπεία (Highly Active Antiretroviral Therapy, HAART) (De Clercq, 2010; Cihlar and Fordyce, 2016).

Οι επτά κατηγορίες αντιρετροϊκών φαρμάκων είναι οι εξής: 1. Νουκλεοσιδικοί αναστολείς της αντίστροφης μεταγραφάσης (Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors, NRTIs), 2. Νουκλεοτιδικοί αναστολείς της αντίστροφης μεταγραφάσης (Nucleotide Reverse Transcriptase Inhibitors, NtRTIs) και 3. Μη νουκλεοσιδικοί αναστολείς της αντίστροφης μεταγραφάσης (Non-Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors, NNRTIs), οι οποίοι παρεμποδίζουν την αντίστροφη μεταγραφάση του HIV απ' το να αντιγράψει το RNA του σε DNA, 4. Αναστολείς της πρωτεάσης (Protease Inhibitors, PIs), οι οποίοι παρεμποδίζουν τη δράση της πρωτεάσης κατά την ωρίμανση των ιϊκών σωματιδίων, 5. Αναστολείς της σύντηξης (Fusion Inhibitors, FIs), που αναστέλλουν τη δράση της διαμεμβρανικής gp41, 6. Αναστολείς των συνυποδοχέων (Co-Receptor Inhibitors, CRIs), που εμποδίζουν τη σύνδεση της gp120 του HIV με τον συνυποδοχέα CCR5 του κυττάρου - ξενιστή και 7. Αναστολείς της ιντεγκράσης (Integrase Inhibitors, INIs), οι οποίοι εμποδίζουν την ενσωμάτωση του ιϊκού DNA στο ανθρώπινο DNA του ξενιστή. Οι πιο διαδεδομένες και περισσότερο μελετημένες τάξεις φαρμάκων είναι οι αναστολείς του ενζύμου RT και της πρωτεάσης (De Clercq, E., 2010; Deeks et al., 1997; Tang and Shafer, 2012; Clavel and Hance, 2004).

Η HAART τέθηκε σε εφαρμογή για πρώτη φορά το 1996. Αποτελείται συνήθως από δύο νουκλεοσιδικούς ή νουκλεοτιδικούς αναστολείς του ενζύμου RT και έναν τρίτο αναστολέα από διαφορετική κατηγορία, συνιστώντας την καλούμενη «τριπλή θεραπεία». Πριν από τη δημιουργία συνδυασμών, διερευνάται οποιαδήποτε αλληλεπίδραση ανάμεσα στα χρησιμοποιούμενα φάρμακα για να προληφθούν τυχόν παρενέργειες. Ο σκοπός της θεραπείας είναι να διατηρήσει, εφόρου ζωής, τα επίπεδα των RNA αντιγράφων του ιού στον ορό σε μη ανιχνεύσιμα επίπεδα, να επιμηκύνει το προσδόκιμο ζωής του ασθενή και να αποτρέψει τη μετάδοση του ιού. Αυτό σημαίνει πως η θεραπεία πρέπει να είναι σταθερή καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής του ατόμου διότι, αφενός, η λοίμωξη από HIV δεν είναι ιάσιμη και αφετέρου, αν σταματήσει η θεραπεία τότε το ιϊκό φορτίο αυξάνεται εκ νέου και η μείωση των CD4+ γίνεται με μεγαλύτερο ρυθμό. Εντούτοις, η χρόνια HAART μπορεί να έχει παρενέργειες και να προκαλέσει

σοβαρά προβλήματα υγείας στον ασθενή, όπως παγκρεατίτιδα ενώ έχει συνδεθεί και με εμφράγματα του μυοκαρδίου. Οι λόγοι για τους οποίους μπορεί να αποτύχει μια αγωγή κατά της λοίμωξης HIV/AIDS είναι η πρόκληση ανεπιθύμητων παρενεργειών, η μη ανεκτικότητα του ατόμου στα φάρμακα της συγκεκριμένης θεραπείας και η αντοχή του ιού στη δράση των φαρμάκων (Yeni, 2006; De Clercq, 2010; Cihlar and Fordyce, 2016).

1.6.1 Αντοχή στην αντιρετροϊκή θεραπεία

Η αντοχή ορισμένων στελεχών στα αντιρετροϊκά φάρμακα προσδίδει μια σημαντική δυσκολία στην επιλογή συγκεκριμένης αγωγής. Ως αντοχή ορίζουμε τη μειωμένη ευαισθησία στην αντιϊκή δράση της χημικής ένωσης του αναστολέα. Η αντοχή εμφανίζεται διότι, η μείωση του ιϊκού φορτίου στο πλάσμα δεν συνεπάγεται την εξάλειψη του από τους λεμφαδένες, το εγκεφαλονωτιαίο υγρό και τους όρχεις, που αποτελούν τη φυσική δεξαμενή του HIV. Η αντοχή μάλιστα, μπορεί να εμφανιστεί από τις πρώτες μόλις εβδομάδες της αγωγής, γεγονός που μπορεί να μαρτυράει την προϋπαρξη ανθεκτικών στελεχών σε ασθενείς που δεν είχαν λάβει ποτέ θεραπεία. Η αποτυχία μιας αγωγής και η χορήγηση μιας νέας μπορούν να προκαλέσουν διασταυρούμενη αντοχή σε κάποια στελέχη του HIV. Η διασταυρούμενη αντοχή είναι η εμφάνιση αντοχής σε κάποια φάρμακα της ίδιας κλάσης, χωρίς να έχει προηγουμένως εκτεθεί ο ιός σε αυτά (Bonhoeffer et al., 1997; Clavel and Hance, 2004; De Clercq, 1994).

Οι μεταλλάξεις που προκαλούν αντοχή στα αντιρετροϊκά φάρμακα οφείλονται στη χορήγηση θεραπείας κάτω από μη ιδανικές συνθήκες, τη λάθος επιλογή θεραπευτικού σχήματος, την μη τήρηση της θεραπείας από τον ασθενή και τη μη συνεπή παρακολούθηση του ασθενούς και των επιπέδων του ιϊκού φορτίου (Bandera et al., 2019). Οι μεταλλάξεις είναι αντικαταστάσεις, εισαγωγές ή επαναλήψεις ενός ή περισσότερων νουκλεοτιδίων. Η αντικατάσταση έστω και ενός νουκλεοτιδίου μπορεί να προκαλέσει αντοχή, η οποία να είναι εμφανής από τα πρώτα κιόλας στάδια της αγωγής. Η καθεμιά από τις κλάσεις των αναστολέων επηρεάζεται διαφορετικά από την κάθε μετάλλαξη που ευνοεί την αντοχή. Ο ελάχιστος αριθμός μεταλλάξεων που απαιτείται να φέρει στο γονιδίωμα του ένα στέλεχος για την εμφάνιση αντοχής σε κάποιο φάρμακο ονομάζεται γενετικό εμπόδιο. Για παράδειγμα, οι αναστολείς της πρωτεάσης έχουν υψηλό γενετικό εμπόδιο, διότι απαιτούνται πολλές μεταλλάξεις για να αποκτήσει αντοχή

ένα στέλεχος σε αυτούς. Το γενετικό εμπόδιο καθορίζεται από τα ανθεκτικά στελέχη που προϋπήρχαν και το ρυθμό πολλαπλασιασμού τους, αλλά και τον ελάχιστο αριθμό μεταλλάξεων που απαιτείται για την απώλεια της αντιρετροϊκής δράσης του αναστολέα (Menendez-Arias, 2002; Clavel, et al., 2004; Luber, 2005).

Υπάρχουν 3 τύποι HIV αντοχής στα φάρμακα σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (World Health Organization, WHO) και είναι: 1. η επίκτητη αντοχή (Acquired HIV Drug Resistance, HIVDR-ADR), η οποία εμφανίζεται στα άτομα που λαμβάνουν θεραπεία αλλά σε ανεπαρκείς ποσότητες ή συγκεντρώσεις φαρμάκων, ή όταν η επιλογή του σχήματος είναι λανθασμένη, ή δεν τηρείται σωστά η θεραπεία, 2. η μεταδιδόμενη αντοχή (Transmitted HIV Drug Resistance, HIVDR-TDR), η οποία εμφανίζεται σε άτομα τα οποία δεν έχουν λάβει ποτέ τους αντιρετροϊκή αγωγή και πιθανόν, έχουν μολυνθεί από ένα ανθεκτικό στέλεχος του ιού HIV και 3. η προ-υπάρχουσα αντοχή (Pre-treatment HIV Drug Resistance, HIVDR-PDR), δηλαδή η αντοχή που εμφανίζεται κατά την πρώτη γραμμή της αντιρετροϊκής θεραπείας και προκύπτει από μετάδοση ανθεκτικού στελέχους ή εμφάνισής του από προηγούμενη θεραπεία (https://www.avert.org/professionals/hiv-programming/treatment/drug-resistance, accessed date: 05/12/2020).

Πέρα από την ευεργετική δράση της, η εκτεταμένη χρήση της αντιρετροϊκής θεραπείας αποτελεί αιτία επιδημικής έξαρσης της μεταδιδόμενης αντοχής του HIV. Η μετάδοση ανθεκτικών στελεχών σε ασθενείς χωρίς θεραπεία έχει παρατηρηθεί από το 1992 και μέχρι και το 2017, τουλάχιστον το 10% απ’ αυτά τα άτομα έχει μολυνθεί από ένα τέτοιο στέλεχος. Η μετάδοση της μεταδιδόμενης αντοχής μπορεί να επέλθει τόσο από άτομα που έχουν λάβει κάποια στιγμή της ζωής τους θεραπεία και έχουν επίκτητη αντοχή, όσο και από άτομα που δεν τους έχει χορηγηθεί ποτέ θεραπεία. Έχει διαπιστωθεί ότι, οι μεταλλάξεις που προσδίδουν μεταδιδόμενη αντοχή μπορούν να επιμείνουν για χρόνια, ακόμη και αν υπάρχει η πίεση από κάποιο αντιρετροϊκό φάρμακο και ότι αν προκαλέσουν μείωση της ιϊκής καταλληλότητας του HIV, μετατρέπονται σε άγριου τύπου στελέχη. Παρ’ ολ’ αυτά, στην Ευρώπη το 95% των ατόμων που έχει ξεκινήσει τη λήψη θεραπείας και έχει προσβληθεί από στέλεχος με μεταλλάξεις μεταδιδόμενης αντοχής, μέσα σε ένα χρόνο κατόρθωσε να ελαττώσει το ιϊκό φορτίο του (Margot et al., 2017; Nanfack et al., 2017; Castro et al., 2013; Wittkop et al., 2011; Pham et al., 2014).

2. ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας ερευνητικής πτυχιακής εργασίας είναι η ανάλυση HIV-1 αλληλουχιών σε δείγματα πλάσματος από μη-θεραπευμένους νεοδιαγνωσθέντες χρήστες ενδοφλέβιων ναρκωτικών (ΧΕΝ) από την Ελλάδα το διάστημα 2016-2019, προκειμένου α) να διερευνηθεί η εμφάνιση μεταλλάξεων που προσδίδουν αντοχή στα διαθέσιμα αντιρετροϊκά φάρμακα και β) να εκτιμηθεί ο επιπολασμός της πρωτογενούς αντοχής στους ΧΕΝ συγκριτικά με την επιδημία του 2011-2012.

3. ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ

3.1 Εξοπλισμός εργαστηρίου

3.1.1 Μηχανήματα και συσκευές

- Απαγωγός (Hood)
- Καταψύκτης βαθιάς κατάψυξης (-80 ^{o}C)
- Ψυγεία και καταψύκτες (-20°C)
- Μικροφυγόκεντρος
- Spin down φυγόκεντρος
- Ηλεκτρική πλάκα θέρμανσης
- Θερμικός κυκλοποιητής PCR Thermal Cycler 2720 (Applied Biosystems)
- Λάμπα υπεριώδους ακτινοβολίας
- Φασματοφωτόμετρο Epoch (BioTek)
- Φούρνος μικροκυμάτων
- Ζυγός ακριβείας
- Συσκευή ηλεκτροφόρησης 200/2.0 Power Supply (Thermo Fisher Scientific)

3.1.2 Πλαστικά και γυάλινα υλικά

- Κωνικές φιάλες
- Πιπέττες 10 – 20 – 100 – 200 – 1000 μl
- Ρύγχη πιπεττών με φίλτρο (filter tips)
- Parafilm
- Δοκιμαστικοί σωλήνες Eppendorf 1.5ml

- PCR tubes 0.2 ml
- Cryobox
- βάσεις-στατώ για δοκιμαστικούς σωλήνες
- 96-well Plate για αλληλούχιση και μεμβράνες σφραγίσματος

3.2 Δειγματοληψία

Ο υπό εξέταση πληθυσμός αποτελείται από 93 νεοδιαγνωσθέντες ΧΕΝ από την περιοχή της Αττικής, οι οποίοι δεν έχουν λάβει αντιρετροϊκή θεραπεία. Η συλλογή των πλασμάτων βρίσκεται στο Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών του Πανεπιστήμιου Δυτικής Αττικής, τα οποία συλλέχθηκαν το χρονικό διάστημα μεταξύ 11/2016 και 01/2019 και αποστάλθηκαν από το Εργαστήριο Υγιεινής, Επιδημιολογίας και Ιατρικής Στατιστικής της Ιατρικής Σχολής, ΕΚΠΑ. Στα δείγματα πλάσματος έχει πραγματοποιηθεί απομόνωση του RNA και εφαρμογή αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης με αντίστροφη μεταγραφή (reverse transcription PCR, RT-PCR) και nested-PCR, στις περιοχές της πρωτεάσης (PR) και 2/3 της αντίστροφης μεταγραφάσης (RT) [θέση HXB2: 2253-3554]. Στην παρούσα μελέτη, συλλέχθηκαν οι πολλαπλασιασμένες HIV-1 αλληλουχίες από τους 93 ΧΕΝ, προκειμένου να αναλυθούν για την παρουσία μεταλλάξεων που προσδίδουν αντοχή στη αντιρετροϊκή θεραπεία.

3.3 Καθαρισμός προϊόντων PCR-Purification

Για το purification χρησιμοποιήθηκε το PureLink™ PCR Purification Kit της εταιρίας Invitrogen™ (αριθμός καταλόγου: #K310002). Η διαδικασία έγινε σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή και περιλαμβάνει τη δέσμευση του DNA και την έκλουσή του. Το τελικό εκκαθαρισμένο προϊόν αποθηκεύτηκε στους -20 ^{o}C.

3.4 Ηλεκτροφόρηση

Η αξιολόγηση των αποτελεσμάτων του «καθαρισμού» (purification) έγινε με ηλεκτροφόρηση των προϊόντων σε γέλη αγαρόζης 1% και έλεγχο για την εμφάνιση ηλεκτροφορητικής ζώνης μοριακού βάρους 1400bp. Για την παρασκευή της αγαρόζης έγινε ανάμειξη σκόνης αγαρόζης με 0,5xTBE και προσθήκη της χρωστικής SYBR® Safe

DNA Gel Stain της εταιρίας Invitrogen™ (αριθμός καταλόγου: S33102). Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε 0,5X TBE στα 120V για 30'-40'. Ως δείκτης μοριακού βάρους (ladder) χρησιμοποιήθηκε ο HyperLadder™ της εταιρίας Meridian© (αριθμός καταλόγου: BIO-33054).

3.5 Φωτομέτρηση

Ο υπολογισμός της καθαρότητας και της συγκέντρωσης των προϊόντων έγινε με φωτομέτρηση, χρησιμοποιώντας το μηχάνημα Epoch™ Spectrophotometer System της εταιρίας BioTek™. Για τη φωτομέτρηση πραγματοποιήθηκε αραίωση των δειγμάτων σε αναλογία 1:5 με απεσταγμένο νερό. Η καθαρότητα των δειγμάτων υπολογίζεται από την τιμή της μέτρησης στα 260/280 nm, η οποία θα πρέπει να εμπίπτει μέσα στα όρια τιμών 1,8-1,9.

3.6 Αλληλούχιση κατά Sanger

Η ανάλυση των HIV-1 αλληλουχιών των υπό εξέταση δειγμάτων πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο αλληλούχισης κατά Sanger (Sanger Sequencing). Η αλληλούχιση κάθε δείγματος πραγματοποιήθηκε με συνολικά 8 εκκινητές, 4 πρόσθιους (forward primers): *RES4, SEQ1, SEQ2, SEQ3* και 4 ανάστροφους (reverse primers): *SEQ5, SEQ6, SEQ7, RES3* και τα δείγματα στάλθηκαν για αλληλούχιση στην εταιρεία CeMIA SA (https://cemia.eu/services/). Η προετοιμασία των δειγμάτων έγινε σύμφωνα με το πρωτόκολλο της εταιρείας, όπου τα δείγματα και οι εκκινητές τοποθετήθηκαν σε 96-well plate στις ζητούμενες συγκεντρώσεις. Συγκεκριμένα, σε κάθε πηγάδι (well) αναμείχθηκαν 8 ng/μl δείγματος και 1pmol/μl εκκινητή και στη συνέχεια το plate σφραγίστηκε για την αποστολή του στην εταιρία αλληλούχισης.

3.7 Ανάλυση Αλληλουχιών και Ανίχνευση Μεταλλάξεων

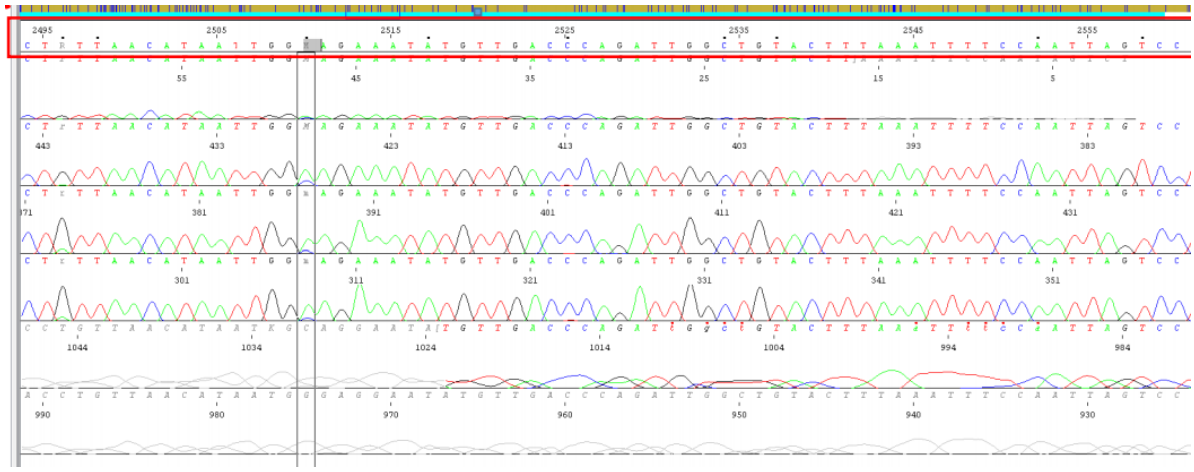
Τα αποτελέσματα της αλληλούχισης στάλθηκαν από την εταιρία CeMIA SA ηλεκτρονικά, ως αρχεία FASTA και η ανάλυσή τους πραγματοποιήθηκε σε μορφή χρωματογραφήματος στο πρόγραμμα SeqScape™ Software v3.0 της εταιρείας Thermo

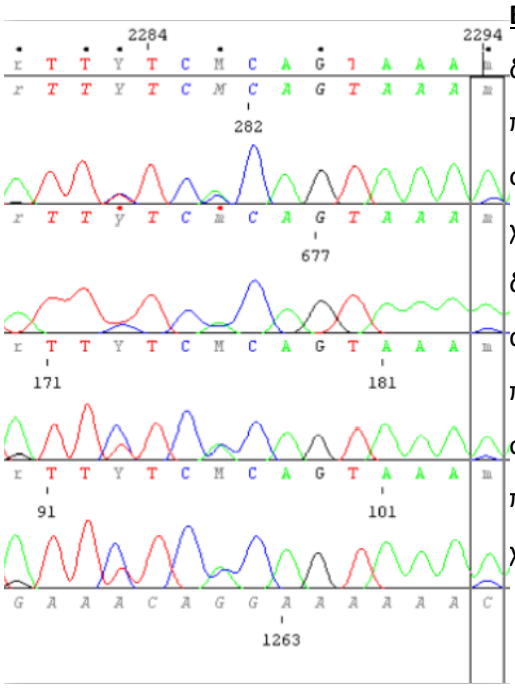
Fisher Scientific. Τα χρωματογραφήματα μελετήθηκαν για την καλή ποιότητα των αλληλουχιών και για την παρουσία μεταλλάξεων. Στο πρόγραμμα SeqScape πραγματοποιήθηκε στοίχιση όλων των αλληλουχιών κάθε δείγματος, που προέκυψαν από την αλληλούχιση κατά Sanger με τους 8 διαφορετικούς εκκινητές και ακολούθησε χειροκίνητος εντοπισμός μεταλλάξεων και εξαγωγή της επεξεργασμένης (consensus) αλληλουχίας. Στη συνέχεια, κάθε consensus αλληλουχία, σε μορφή αρχείου FASTA, αναλύθηκε από τον αλγόριθμο της βάσης δεδομένων Stanford University HIV Drug Resistance Database (HIVdb Program) για την εύρεση αντοχής σε μη νουκλεοσιδικούς αναστολείς της αντίστροφης μεταγραφάσης (Non-Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors, NNRTIs), νουκλεοσιδικούς αναστολείς της αντίστροφης μεταγραφάσης (Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors, NRTIs) και αναστολείς της πρωτεάσης (Protease Inhibitors, PIs).

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 Αλληλούχιση κατά Sanger

Από τα 93 HIV-1 δείγματα που στάλθηκαν για αλληλούχιση, τα 6/93 δεν εμφάνισαν καλή ποιότητα αλληλουχιών για κάποιους από τους εκκινητές και συνεπώς, πραγματοποιήθηκε εκ νέου αποστολή των δειγμάτων με τους συγκεκριμένους εκκινητές στην εταιρία CeMIA SA για επαναληπτική αλληλούχιση. Κατά την ανάλυση κάθε χρωματογραφήματος, στις γενετικές θέσεις όπου εντοπίστηκαν μεταλλάξεις με τη μορφή διπλών ή τριπλών κορυφών, πραγματοποιήθηκαν χειροκίνητες αλλαγές των βάσεων στην consensus αλληλουχία σύμφωνα με τις διεθνείς ονομασίες: παρουσία των βάσεων A-G σημειώθηκε με το γράμμα R, C-T με το Y, A-C με το M, A-T με το W, C-G με το S, G-T με το K και A-G-T με το D, A-C-G με το V, A-C-T με το H, G-C-T με το B.

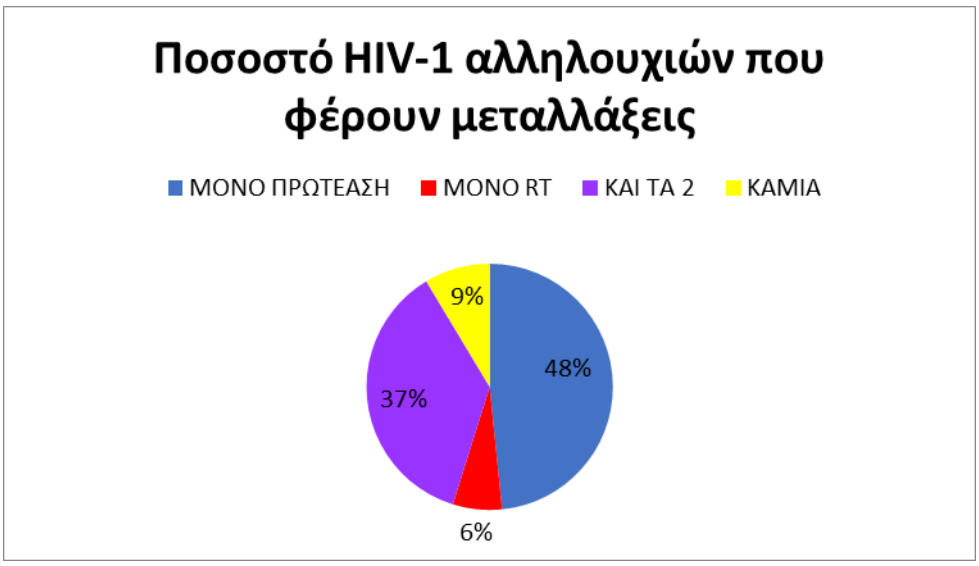




Εικόνα 4.1: α) Τμήμα χρωματογραφήματος από ένα δείγμα της συλλογής κατά την ανάλυσή του στο πρόγραμμα SeqScape Software v3.0. Παρουσιάζεται η στοίχιση των αλληλουχιών που έχουν προκύψει από τη χρήση πολλαπλών εκκινητών κατά την αλληλούχιση του δείγματος. Εντός του κόκκινου πλαισίου εμφανίζεται η consensus αλληλουχία. β) Εμφάνιση διπλών κορυφών που υποδηλώνουν την παρουσία μεταλλαγμένων στελεχών στο δείγμα. Οι μεταλλάξεις που παρουσιάζονται στο συγκεκριμένο τμήμα του χρωματογραφήματος είναι κατά σειρά οι R, Y, M και M.

4.2 Ανίχνευση Μεταλλάξεων στις HIV-1 αλληλουχίες

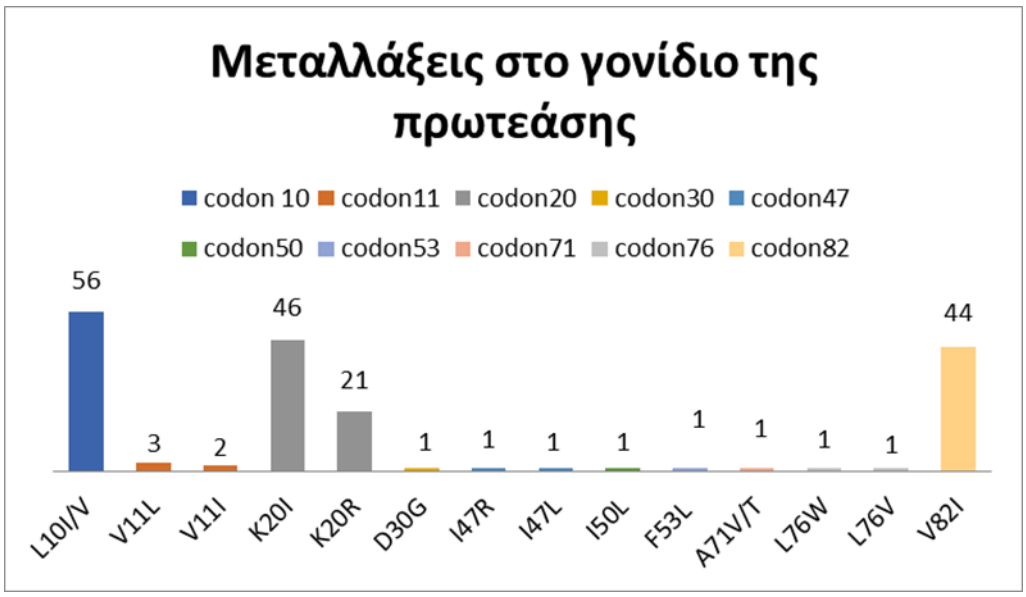
Από τις 93 αλληλουχίες που αναλύθηκαν με τον αλγόριθμο HIVdb Program, η πλειοψηφία φέρει μεταλλάξεις που βρίσκονται στο γονίδιο του ενζύμου της πρωτεάσης (79/93 αλληλουχίες), ενώ οι αλληλουχίες με μετάλλαξη στο γονίδιο του ενζύμου της RT είναι σχεδόν οι μισές σε αριθμό (40/93 αλληλουχίες). Όπως φαίνεται και στο διάγραμμα 4.2, οι αλληλουχίες που φέρουν μεταλλάξεις μόνο στο γονίδιο της πρωτεάσης είναι 45/93 (48,4%), οι αλληλουχίες που φέρουν μεταλλάξεις μόνο στο γονίδιο της RT είναι 6/93 (6,5%), ενώ μεταλλάξεις και στα δύο γονίδια φέρει το 36,6% των δειγμάτων της συλλογής (34/93 αλληλουχίες). Από 8/93 δείγματα απομονώθηκαν HIV-1 αλληλουχίες χωρίς μεταλλάξεις.



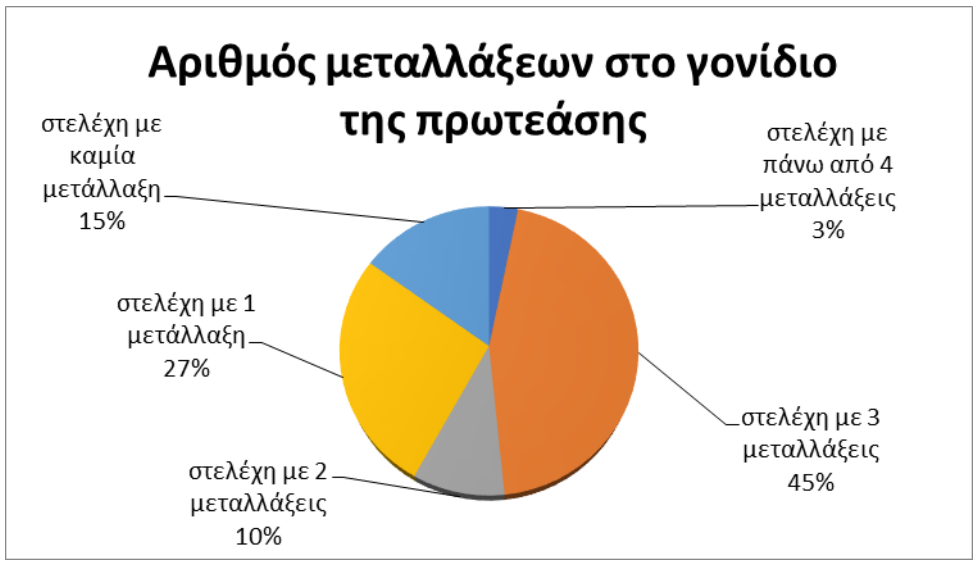
Εικόνα 4.2: Ποσοστό των HIV-1 αλληλουχιών της συλλογής που εμφανίζουν μετάλλαξη στο γονίδιο της πρωτεάσης ή/και της αντίστροφης μεταγραφάσης (RT).

4.2.1 Μεταλλάξεις στο γονίδιο της πρωτεάσης

Όσον αφορά τις μεταλλάξεις που εντοπίστηκαν στο γονίδιο της πρωτεάσης στα 79 από τα 93 δείγματα της συλλογής, η πιο συχνά εμφανιζόμενη μετάλλαξη εντοπίστηκε στο κωδικόνιο 10 και είναι η μετάλλαξη L10I/V. Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 4.3, η μετάλλαξη L10I/V εμφανίστηκε σε 56/93 αλληλουχίες (60,2%) και ακολουθούν οι μεταλλάξεις του κωδικονίου 20: K20I σε ποσοστό 49,5% και K20R σε ποσοστό 21,5% των αλληλουχιών. Στο κωδικόνιο 82 η μετάλλαξη V82I εμφανίστηκε σε 44 αλληλουχίες (47,3%) ενώ οι μεταλλάξεις V11L και V11I στο κωδικόνιο 11 εμφανίστηκαν σε 3 και 2 αλληλουχίες, αντίστοιχα. Τέλος, μεταλλάξεις στα κωδικόνια 30, 50, 53 και 71 εμφανίστηκαν 1 φορά για το καθένα στο σύνολο των αλληλουχιών της συλλογής, ενώ στα κωδικόνια 47 και 76 βρέθηκαν 2 διαφορετικές μεταλλάξεις, οι I47L, I47R και οι L76W, L76V, αντίστοιχα.



Εικόνα 4.3: Σύνολο μεταλλάξεων που εντοπίστηκαν στα κωδικόνια του γονιδίου της πρωτεάσης.

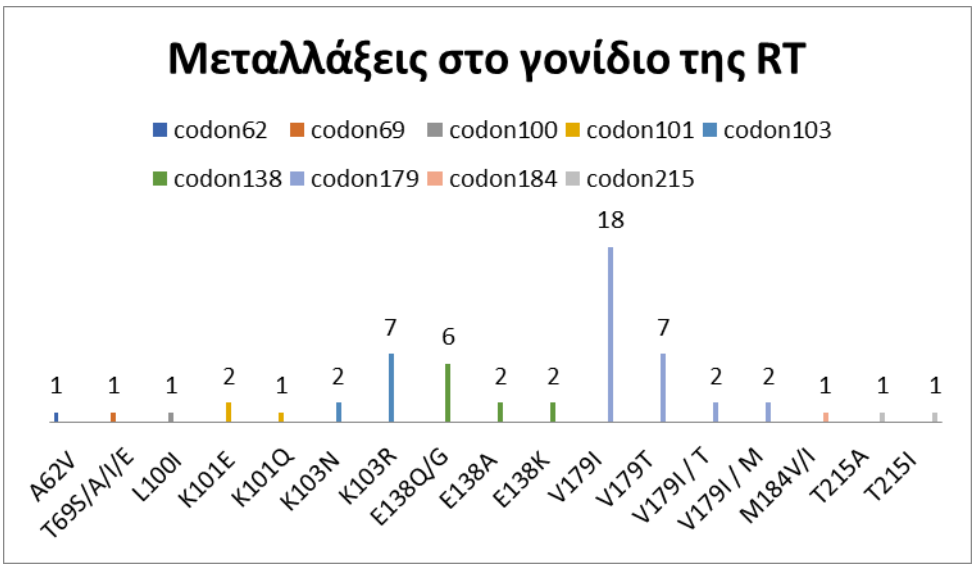


Εικόνα 4.4 : Αριθμός μεταλλάξεων για το γονίδιο της πρωτεάσης που εμφανίστηκαν στις HIV-1 αλληλουχίες των 93 δειγμάτων της συλλογής.

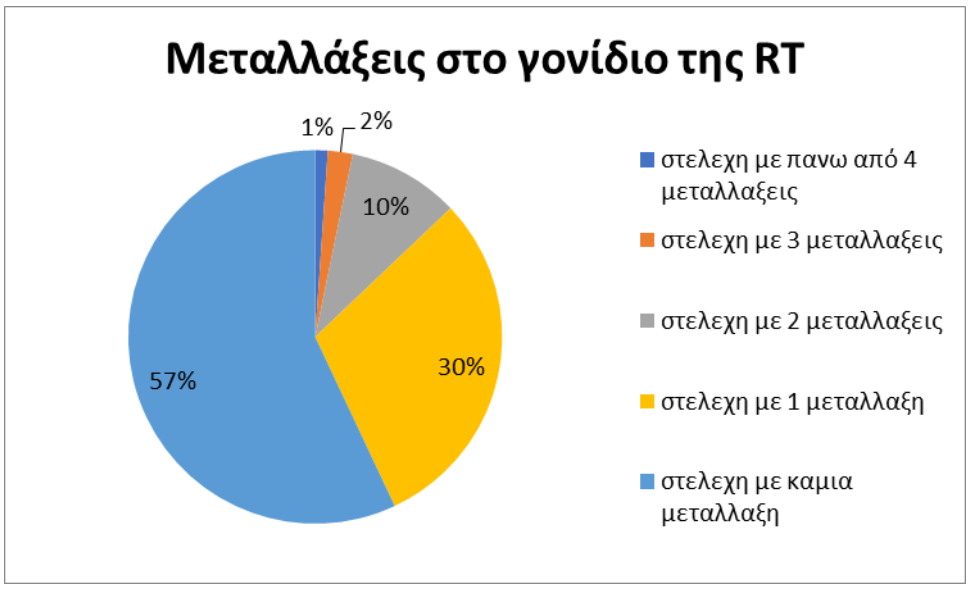
Από τα 93 δείγματα ΧΕΝ της συλλογής, σε ένα μεγάλο ποσοστό (45%, 42/93) εντοπίστηκαν HIV-1 αλληλουχίες με 3 μεταλλάξεις στο γονίδιο της πρωτεάσης, ενώ αρκετά ήταν και τα δείγματα από τα οποία απομονώθηκαν αλληλουχίες που φέρουν 1 μετάλλαξη (27%, 25/93). Στο 15% των αλληλουχιών (14/93) δεν εντοπίστηκε καμία μετάλλαξη. Τέλος, 2 μεταλλάξεις εντοπίστηκαν σε αλληλουχίες από 9/93 δείγματα (10%) και 4 ή περισσότερες μεταλλάξεις εντοπίστηκαν σε μικρό ποσοστό δειγμάτων (3%, 3/93) (Εικόνα 4.4).

4.2.2 Μεταλλάξεις στο γονίδιο της αντίστροφης μεταγραφάσης (RT)

Στην Εικόνα 4.5 που ακολουθεί, παρουσιάζονται οι μεταλλάξεις ανά κωδικόνιο στο γονίδιο της RT, οι οποίες εντοπίστηκαν σε συνολικά 40/93 δείγματα της συλλογής. Παρατηρείται ότι η συχνότητα εμφάνισης μεταλλάξεων είναι μεγαλύτερη στο κωδικόνιο 179 από ότι στα υπόλοιπα κωδικόνια, σε ποσοστό 51% των αλληλουχιών, με κύρια μετάλλαξη την V179I η οποία σημειώθηκε σε 18 αλληλουχίες. Ακολουθούν οι μεταλλάξεις στο κωδικόνιο 138 σε ποσοστό 17% των αλληλουχιών της συλλογής, οι οποίες είναι οι E138Q/G, E138A και E138K σε 6, 2 και 2 αλληλουχίες, αντίστοιχα. Στο κωδικόνιο 103 εντοπίστηκαν μεταλλάξεις σε συνολικά 9 αλληλουχίες, οι οποίες είναι οι εξής: K103N σε 2 αλληλουχίες και K103R σε 7 αλληλουχίες της συλλογής. Τέλος, στο κωδικόνιο 101 εντοπίστηκαν μεταλλάξεις σε 3 αλληλουχίες, ενώ οι υπόλοιπες (6/40) αλληλουχίες εμφάνισαν μεταλλάξεις σε διάφορα κωδικόνια του γονιδίου της RT (Εικόνα 4.5).



Εικόνα 4.5: Σύνολο μεταλλάξεων που εντοπίστηκαν στα κωδικόνια του γονιδίου της αντίστροφης μεταγραφάσης (RT).



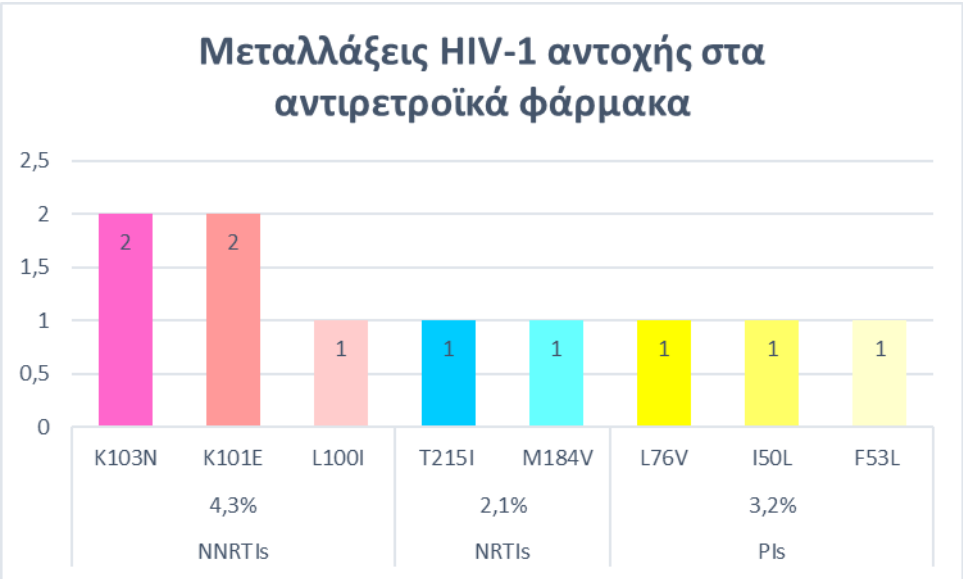
Εικόνα 4.6: Αριθμός μεταλλάξεων για το γονίδιο της αντίστροφης μεταγραφάσης (RT) που εμφανίστηκαν στις HIV-1 αλληλουχίες των 93 δειγμάτων της συλλογής.

Από τα 93 δείγματα ΧΕΝ της συλλογής, στο μεγαλύτερο ποσοστό (57%, 53/93) εντοπίστηκαν HIV-1 αλληλουχίες που δεν φέρουν καμία μετάλλαξη στο γονίδιο της RT, ενώ το μικρότερο ποσοστό αντιστοιχεί στα δείγματα από τα οποία απομονώθηκαν αλληλουχίες που φέρουν 4 ή περισσότερες μεταλλάξεις μεταλλάξεις (1,1%, 1/93). Στο 30,1% των αλληλουχιών (28/93) εντοπίστηκε μόνο 1 μετάλλαξη στο γονίδιο, ενώ σε μικρό ποσοστό των δειγμάτων εντοπίστηκαν αλληλουχίες με 2 μεταλλάξεις (9,7%, 9/93) και με 3 μεταλλάξεις (2,2%, 2/93) (Εικόνα 4.6).

4.3 Μεταλλάξεις που προκαλούν HIV-1 αντοχή

Από τις 85/93 HIV-1 αλληλουχίες στις οποίες εντοπίστηκε οποιαδήποτε μετάλλαξη στο γονίδιο της πρωτεάσης ή/και της RT, οι 7/93 (8%) εμφάνισαν μεταλλάξεις που προσδίδουν αντοχή σε τουλάχιστον μία ή περισσότερες από τις τάξεις αντιρετροϊκών φαρμάκων: μη νουκλεοσιδικοί αναστολείς της αντίστροφης μεταγραφάσης (Non-Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors, NNRTIs), νουκλεοσιδικοί αναστολείς της αντίστροφης μεταγραφάσης (Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors, NRTIs) και αναστολείς της πρωτεάσης (Protease Inhibitors, PIs). Συνεπώς, ο επιπολασμός της πρωτογενούς HIV-1 αντοχής στους μη-θεραπευμένους νεοδιαγνωσθέντες ΧΕΝ της συλλογής εκτιμήθηκε σε ποσοστό 7,5%.

Στην Εικόνα 4.7 παρουσιάζονται σε μορφή διαγράμματος οι μεταλλάξεις που προκαλούν αντοχή στις 3 τάξεις αντιρετροϊκών φαρμάκων NNRTIs, NRTIs και PIs και η συχνότητα εμφάνισής τους στις 7/93 HIV-1 αλληλουχίες.



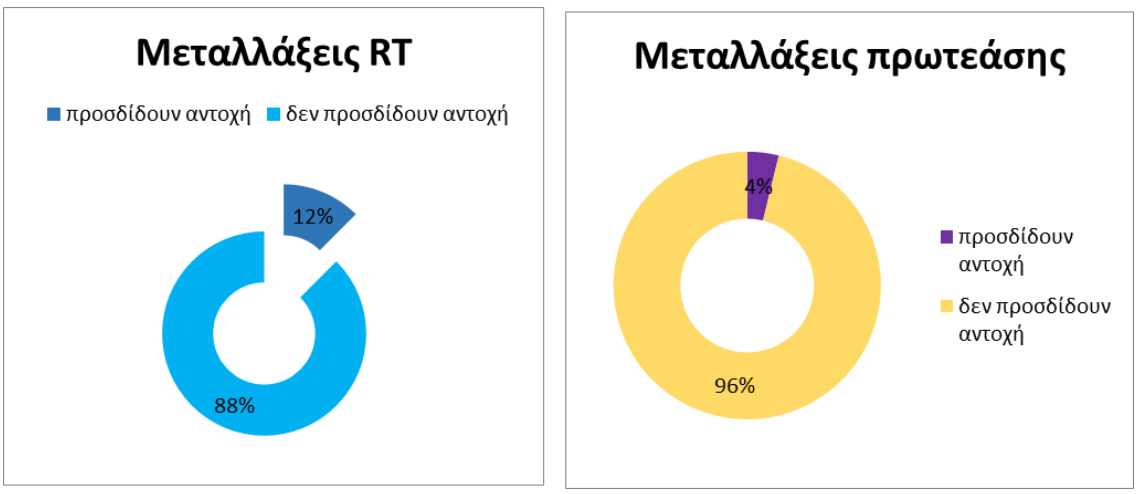
Εικόνα 4.7: Μεταλλάξεις που εντοπίστηκαν σε 7/93 μη-θεραπευμένους νεοδιαγνωσθέντες ΧΕΝ της συλλογής, οι οποίες προσδίδουν αντοχή στις 3 τάξεις αντιρετροϊκών φαρμάκων NNRTIs, NRTIs και PIs για τον HIV-1.

Πίνακας 4.1: Δεδομένα για τους 7/93 μη-θεραπευμένους νεοδιαγνωσθέντες ΧΕΝ που εμφάνισαν αντοχή στα αντιρετροϊκά φάρμακα για τον HIV-1. Στον πίνακα παρουσιάζεται για κάθε δείγμα ΧΕΝ η ημερομηνία δειγματοληψίας, ο HIV-1 υπότυπος σύμφωνα με το εργαλείο REGA HIV-1 Subtyping Tool-Version 3.0 της βάσης δεδομένων Stanford University HIV Drug Resistance Database, καθώς και οι μεταλλάξεις που προσδίδουν αντοχή στα NNRTIs, NRTIs και PIs.

No	Χρονολογία δειγματοληψίας	Υπότυποι	Μεταλλάξεις RT		Μεταλλάξεις Πρωτεάσης
			NNRTIs	NRTIs	PIs
1	2017	A1	K103N		
2	2017	CRF35_AD			L76V
3	2017	CRF35_AD	K101E		
4	2018	Recomb. G,A1			I50L
5	2018	CRF14_BG	K103N		F53L
6	2018	Recomb. B,D	L100I, K101E	M184V	
7	2019	CRF14_BG		T215I	

RT: Reverse Transcriptase; NNRTIs: Non-Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors; NRTIs: Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors; PIs: Protease Inhibitors

Συνολικά εντοπίστηκαν 8 διαφορετικές μεταλλάξεις υπεύθυνες για την ανάπτυξη HIV-1 αντοχής, εκ των οποίων οι 5/8 (K103N, K101E, L100I, M184V, T215I) είναι μεταλλάξεις στο γονίδιο της RT και προσδίδουν αντοχή σε αναστολείς της αντίστροφης μεταγραφάσης, NNRTIs και NRTIs, ενώ οι υπόλοιπες 3/8 (L76V, I50L, F53L) είναι μεταλλάξεις στο γονίδιο της πρωτεάσης και προσδίδουν αντοχή στους αναστολείς της πρωτεάσης (PIs) (Εικόνα 4.7). Όπως φαίνεται και στον Πίνακα 4.1, η αντοχή σε NNRTIs παρουσιάστηκε σε μεγαλύτερο ποσοστό των XEN (N=4, 4,3%), η αντοχή σε NRTIs ήταν 2,1% (N=2) και σε PIs 3,2% (N=3). Οι πιο συχνές μεταλλαγές αντοχής σε NNRTIs που παρατηρήθηκαν ήταν η K101E (2,1%) και η K103N (2,1%). Δεν παρατηρήθηκε κάποια συσχέτιση μεταξύ των HIV-1 υποτύπων και της αντοχής στα αντιρετροϊκά φάρμακα.



Εικόνα 4.8: Ποσοστό μεταλλάξεων στο γονίδιο της πρωτεάσης και της αντίστροφης μεταγραφάσης (RT) που προκαλούν αντοχή στα αντιρετροϊκά φάρμακα.

Σύμφωνα με το διάγραμμα της Εικόνας 4.8, από τις μεταλλάξεις στο γονίδιο της πρωτεάσης που βρέθηκαν στις αλληλουχίες 79/93 δειγμάτων της συλλογής, 3 (L76V, I50L, F53L) είναι υπεύθυνες για την ανάπτυξη αντοχής σε αναστολείς της πρωτεάσης. Το μεγαλύτερο ποσοστό (96%) από αυτές δεν σχετίζεται με την δημιουργία αντοχής σε αντιρετροϊκά φάρμακα. Όσον αφορά τις μεταλλάξεις στο γονίδιο της RT, η πλειοψηφία των δειγμάτων (35/93) δεν εμφάνισε αντοχή σε φάρμακα της τάξης των αναστολέων της αντίστροφης μεταγραφάσης (NNRTIs, NRTIs). Από τις 17 μεταλλάξεις που εντοπίστηκαν στο γονίδιο της RT, οι 5 αποτελούν μεταλλάξεις που μπορούν να προσδώσουν αντοχή σε αναστολείς της αντίστροφης μεταγραφάσης.

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα τελευταία 20 χρόνια στην Ελλάδα, η πορεία της εμφάνισης αντοχής στα αντιρετροϊκά φάρμακα είναι ανοδική, βρίσκεται, όμως, σε χαμηλότερο επίπεδο σε σχέση με την υπόλοιπη Ευρώπη. Ο ρόλος των μη-θεραπευμένων νεοδιαγνωσθέντων ατόμων είναι κρίσιμος στη μετάδοση της αντοχής (Paraskevis et al., 2017; Paraskevis et al., 2014). Στην παρούσα εργασία, αναλύθηκαν δείγματα, τα οποία συλλέχθηκαν από μη-θεραπευμένους νεοδιαγνωσθέντες ΧΕΝ με σκοπό τη μελέτη των μεταλλάξεων που προκαλούν αντοχή σε αντιρετροϊκά φάρμακα σε HIV-1 αλληλουχίες και τη σύγκριση του πρωτογενούς επιπολασμού της αντοχής με τον αντίστοιχο της επιδημίας 2011-2012 στους ΧΕΝ στην Αθήνα.

Από την ανάλυση των γονιδίων της πρωτεάσης και του ενζύμου της RT σε 93 αλληλουχίες, διαπιστώθηκε αντοχή σε αντιρετροϊκά φαρμάκα σε σημαντικό ποσοστό (7,5%). Η εύρεση περισσότερων ανθεκτικών μεταλλάξεων στο γονίδιο του ενζύμου της RT σε σχέση με το γονίδιο της πρωτεάσης ήταν αναμενόμενη, παρόλο που στο γονίδιο της πρωτεάσης σχεδόν οι διπλάσιες αλληλουχίες είχαν εμφανίσει μετάλλαξη (**Εικόνα 4.8**). Όπως έχει μελετηθεί, ο επιπολασμός των μεταλλάξεων που προκαλούν αντοχή στους PIs είναι πολύ μικρός σε νεοδιαγνωσθέντα, μη-θεραπευμένα άτομα, πολύ πιθανόν εξαιτίας του υψηλού γενετικού εμποδίου των αναστολέων της πρωτεάσης (Luber, 2005). Ωστόσο, η εύρεση 3 μεταλλάξεων (L76V, I50L, F53L) σχετιζόμενων με αντοχή σε αναστολείς της πρωτεάσης, έρχεται σε αντίθεση με τους Kantzanou et al., οι οποίοι στη δική τους έρευνα για το διάστημα 2016-2019 δεν βρήκαν καμία PI-ανθεκτική μετάλλαξη (Kantzanou et al., 2021; Paraskevis et al., 2005; Paraskevis et al., 2017; Nikolopoulos et al., 2008).

Ακολούθως, οι μεταλλάξεις στο γονίδιο του ενζύμου της RT προκαλούν αντοχή κυρίως σε NNRTIs, παρά σε NRTIs, γεγονός που δεν προκαλεί έκπληξη, καθώς ο επιπολασμός της αντοχής στους NNRTIs είναι διαρκώς αυξανόμενος με τα χρόνια. Συγκεκριμένα, η αντοχή στους NRTIs είναι μικρότερη, ακόμα και από την αντοχή στους PIs, όπως επιβεβαιώνει η έρευνα των Paraskevis et al., το 2014. Η διπλή εμφάνιση των NNRTI-ανθεκτικών μεταλλάξεων K103N και K101E (**Πίνακας 4.1, Εικόνα 4.5**) ήταν αναμενόμενο εύρημα, διότι, οι συγκεκριμένες μεταλλάξεις παρατηρούνται όλο και περισσότερο σε άτομα της ομάδας των ΧΕΝ, σύμφωνα με μελέτες που έχουν γίνει στην

Ελλάδα. Για το λόγο αυτό, προτιμούνται αναστολείς της πρωτεάσης και νουκλεοσιδικοί αναστολείς της αντίστροφης μεταγραφάσης ως κλάσεις για την πρώτη γραμμή της αντιρετροϊκής θεραπείας (Paraskevis et al., 2005; Paraskevis et al., 2017; Kantzanou et al., 2021).

Από την άλλη, η μετάλλαξη E138A που αποτελεί μία από τις δύο κυρίαρχες ανθεκτικές μεταλλάξεις σε NNRTIs μαζί με την K103N, εμφανίστηκε σε 2 μόνο αλληλουχίες (**Εικόνα 4.5**), οι οποίες δεν παρουσίασαν αντοχή, ενώ σε πρόσφατη έρευνα που πραγματοποιήθηκε σε μη-θεραπευμένους νεοδιαγνωσθέντες είχε τον μεγαλύτερο επιπολασμό ανάμεσα στις NNRTI μεταλλάξεις (Paraskevis et al., 2017). Επιπροσθέτως, η μετάλλαξη E138Q, η οποία είχε διαρκώς συχνότερη παρουσία σε δείγματα κατά το διάστημα 2003-2013 και έχει συσχετιστεί άμεσα με την επιδημία στους ΧΕΝ το 2011-2012, δεν βρέθηκε καθόλου στα δείγματα που αναλύθηκαν. Παρομοίως, οι ανθεκτικές μεταλλάξεις που βρέθηκαν στο γονίδιο της πρωτεάσης (**Εικόνα 4.7**) δεν ταυτίζονται με εκείνες που κυριαρχούσαν τα τελευταία χρόνια στον ίδιο πληθυσμό (V82, L90) (Paraskevis et al., 2014). Αυτές οι παρατηρήσεις αποτελούν απόδειξη διαφορών στο μοτίβο και τις οδούς μετάδοσης του HIV-1 ανάμεσα στις ευπαθείς ομάδες και αλλαγών σε βάθος χρόνου συγκεκριμένα στην ομάδα των ΧΕΝ.

6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Συμπερασματικά, με βάση τα παραπάνω δεδομένα, η κλάση αντιρετροϊκών φαρμάκων στην οποία έχουν αναπτύξει αντοχή οι περισσότεροι μη-θεραπευμένοι νεοδιαγνωσθέντες ΧΕΝ είναι οι μη νουκλεοσιδικοί αναστολείς της αντίστροφης μεταγραφάσης. Η πρωτογενής αντοχή στους νεοδιαγνωσθέντες ΧΕΝ παρατηρήθηκε ότι είναι χαμηλή, αλλά σταθερή κατά το χρονικό διάστημα 2016-2019 στην Ελλάδα. Τέλος, η μετάδοση του HIV-1 και κατά συνέπεια των ανθεκτικών μεταλλάξεων, ανάμεσα στους ΧΕΝ, έγινε μέσω διαφορετικών δικτύων από εκείνα που είχαν μολύνει τα άτομα ΧΕΝ κατά την επιδημία του 2011-2012 στην Αθήνα, με εξαίρεση κάποιες μεταλλάξεις που εμφανίζονται με σταθερή συχνότητα τις τελευταίες δεκαετίες. Η παρούσα έρευνα κατέδειξε τη σημασία της μοριακής μελέτης και της επιδημιολογικής επιτήρησης της HIV-1 λοίμωξης ως επιτακτικές προσεγγίσεις για την πρόληψη και την αντιμετώπιση της λοίμωξης και κυρίως την επιλογή κατάλληλης αντιρετροϊκής θεραπείας.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η έξαρση του HIV στους χρήστες ενδοφλέβιων ουσιών το 2011 στο κέντρο της Αθήνας άλλαξε σημαντικά το επιδημιολογικό προφίλ της ασθένειας HIV/AIDS στην Ελλάδα. Η εμφάνιση μεταδιδόμενης αντοχής καθιστά δύσκολη την επιλογή αντιρετροϊκής θεραπείας και συνεισφέρει στη διασπορά του ιού, ιδιαίτερα στις ομάδες υψηλού κινδύνου. Στην παρούσα μελέτη, συλλέχθηκαν οι HIV-1 αλληλουχίες από 93 νεοδιαγνωσθέντες ΧΕΝ από την περιοχή της Αττικής, οι οποίοι δεν έχουν λάβει αντιρετροϊκή θεραπεία, προκειμένου να αναλυθούν για την παρουσία μεταλλάξεων που προσδίδουν αντοχή στη αντιρετροϊκή θεραπεία. Η συλλογή των πλασμάτων βρίσκεται στο Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών του Πανεπιστήμιου Δυτικής Αττικής, τα οποία συλλέχθηκαν το χρονικό διάστημα μεταξύ 11/2016 και 01/2019 και αποστάλθηκαν από το Εργαστήριο Υγιεινής, Επιδημιολογίας και Ιατρικής Στατιστικής της Ιατρικής Σχολής, ΕΚΠΑ. Στην ανάλυση περιλαμβάνεται η απομόνωση του RNA και η εφαρμογή αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης με αντίστροφη μεταγραφή (reverse transcription PCR, RT-PCR) και nested-PCR, στις περιοχές της πρωτεάσης (PR) και 2/3 της αντίστροφης μεταγραφάσης (RT). Από την ανάλυση προέκυψε ότι από 85/93 HIV-1 αλληλουχίες στις οποίες εντοπίστηκε οποιαδήποτε μετάλλαξη στο γονίδιο της πρωτεάσης ή/και της RT, οι 7/93 (8%) εμφάνισαν μεταλλάξεις που προσδίδουν αντοχή σε τουλάχιστον μία ή περισσότερες από τις τάξεις αντιρετροϊκών φαρμάκων. Συνεπώς, ο επιπολασμός της πρωτογενούς HIV-1 αντοχής στους μη-θεραπευμένους νεοδιαγνωσθέντες ΧΕΝ της συλλογής εκτιμήθηκε σε ποσοστό 7,5%. Κατά συνέπεια, η πρωτογενής αντοχή στους νεοδιαγνωσθέντες ΧΕΝ παρατηρήθηκε ότι είναι χαμηλή, αλλά σταθερή κατά το χρονικό διάστημα 2016-2019 στην Ελλάδα. Επιπλέον, οι ανθεκτικές μεταλλάξεις που εντοπίστηκαν ήταν κατά πλειοψηφία διαφορετικές από εκείνες της επιδημίας 2011-2012. Τέλος, η μετάδοση του HIV-1 και των ανθεκτικών μεταλλάξεων, ανάμεσα στους ΧΕΝ, έγινε μέσω διαφορετικών δικτύων από εκείνα που είχαν μολύνει τα άτομα ΧΕΝ κατά την επιδημία του 2011-2012 στην Αθήνα.

SUMMARY

The HIV-1 outbreak among intravenous drug users (IDUs) in 2011 in Athens significantly changed the HIV/AIDS epidemic in Greece. The emergence of transmitted drug resistance (Transmitted HIVDR) sets obstacles to control the epidemic and viral replication, contributing in ongoing dispersion of the virus, notably in high risk groups. In the present study, HIV-1 sequences were collected from 93 newly diagnosed IDUs from the Attica region who have not received antiretroviral therapy, in order to be analyzed for the presence of mutations that confer resistance to antiretroviral therapy. The collection of blood plasma is in the Department of Biomedical Sciences of the University of West Attica, which were collected between 11/2016 and 01/2019 and sent by the Laboratory of Hygiene, Epidemiology and Medical Statistics of the Medical School, NKUA. The analysis includes RNA isolation and the application of reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and nested-PCR, in the protease (PR) and 2/3 regions of reverse transcriptase (RT). The analysis showed that of 85/93 HIV-1 sequences in which any mutation in the protease and/or RT gene was detected, in 7/93 (8%) appeared mutations that confer resistance to at least one or more of the classes of antiretroviral drugs. Therefore, the prevalence of primary HIV-1 resistance in untreated newly diagnosed IDUs in the collection was estimated at 7.5%. Consequently, the primary resistance in the newly diagnosed IDUs was observed to be low, but stable during the period 2016-2019 in Greece. In addition, the resistant mutations detected were largely different from those of the 2011-2012 epidemic. Finally, the transmission of HIV-1 and resistant mutations among IDUs took place through different networks from those that had infected IDUs during the 2011-2012 epidemic in Athens.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Alessandri-Gradt, Elodie, Fabienne De Oliveira, Marie Leoz, Véronique Lemee, David L. Robertson, Felix Feyertag, Paul-Alain Ngoupo, Philippe Mauclere, François Simon, and Jean-Christophe Plantier. "HIV-1 Group P Infection: Towards a Dead-End Infection?" *AIDS* 32, no. 10 (June 19, 2018): 1317–22. https://doi.org/10.1097/QAD.0000000000001791.
2. Avert (2019). HIV Drug Resistance. https://www.avert.org/professionals/hiv-programming/treatment/drug-resistance. Accessed date: 05/12/2020.
3. Bandera, Alessandra, Andrea Gori, Mario Clerici, and Manuela Sironi. "Phylogenies in ART: HIV Reservoirs, HIV Latency and Drug Resistance." *Current Opinion in Pharmacology* 48 (October 2019): 24–32. https://doi.org/10.1016/j.coph.2019.03.003.
4. Bbosa, Nicholas, Pontiano Kaleebu, and Deogratius Ssemwanga. "HIV Subtype Diversity Worldwide." *Current Opinion in HIV and AIDS* 14, no. 3 (May 2019): 153–60. https://doi.org/10.1097/COH.0000000000000534.
5. Beloukas, Apostolos, Alexandros Psarris, Polina Giannelou, Evangelia Kostaki, Angelos Hatzakis, and Dimitrios Paraskevis. "Molecular Epidemiology of HIV-1 Infection in Europe: An Overview." *Infection, Genetics and Evolution* 46 (December 2016): 180–89. https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.06.033.
6. Castro, Hannah, Deenan Pillay, Patricia Cane, David Asboe, Valentina Cambiano, Andrew Phillips, David T. Dunn, et al. "Persistence of HIV-1 Transmitted Drug Resistance Mutations." *The Journal of Infectious Diseases* 208, no. 9 (November 1, 2013): 1459–63. https://doi.org/10.1093/infdis/jit345.
7. Center for Disease Control and Prevention (CDC) (2021). "About HIV". https://www.cdc.gov/hiv/basics/whatishiv.html#. Accessed date: 12/11/2020.
8. Center for Disease Control and Prevention (CDC) (2021). "AIDS and Opportunistic Infections". https://www.cdc.gov/hiv/basics/livingwithhiv/opportunisticinfections.html, Accessed date: 12/11/2020.
9. Center for Disease Control and Prevention (CDC) (2020). "HIV Transmission". https://www.cdc.gov/hiv/basics/transmission.html, Accessed date: 12/11/2020.
10. Cihlar, Tomas, and Marshall Fordyce. "Current Status and Prospects of HIV Treatment." *Current Opinion in Virology* 18 (June 2016): 50–56. https://doi.org/10.1016/j.coviro.2016.03.004.
11. Clavel, François and Hance, Allan J. "HIV Drug Resistance." *The New England Journal of Medicine*, 350:1023-1035, 2004, 13. https://doi.org/10.1056/NEJMra025195

12. De Clercq, Erik. "HIV resistance to reverse transcriptase inhibitors.", Biochemical Pharmacology, Volume 47, Issue 2, 1994, p. 155-169, ISSN 0006-2952. https://doi.org/10.1016/0006-2952(94)90001-9.
13. Deeks SG, Smith M, Holodniy M, Kahn JO. "HIV-1 Protease Inhibitors: A Review for Clinicians." *JAMA*, 1997; 277(2):145–153. https://doi.org/10.1001/jama.1997.03540260059037.
14. Esposito, Dominic, and Robert Craigie. "HIV Integrase Structure and Function." In *Advances in Virus Research*, 52:319–33. Elsevier, 1999. https://doi.org/10.1016/S0065-3527(08)60304-8.
15. Ferguson, Monique R, Daniel R Rojo, Jana J von Lindern, and William A O'Brien. "HIV-1 Replication Cycle." *Clinics in Laboratory Medicine* 22, no. 3 (September 2002): 611–35. https://doi.org/10.1016/S0272-2712(02)00015-X.
16. Fettig, Jade, Mahesh Swaminathan, Christopher S. Murrill, and Jonathan E. Kaplan. "Global Epidemiology of HIV." *Infectious Disease Clinics of North America* 28, no. 3 (September 2014): 323–37. https://doi.org/10.1016/j.idc.2014.05.001.
17. Frankel, Alan D., and John A. T. Young. "HIV-1: Fifteen Proteins and an RNA." *Annual Review of Biochemistry* 67, no. 1 (June 1998): 1–25. https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.67.1.1.
18. Freed, E.O. "HIV-1 Replication." *Somat Cell Mol Genet* 26, 13–33 (2001). https://doi.org/10.1023/A:1021070512287.
19. Freed, Eric O. "HIV-1 Assembly, Release and Maturation." *Nature Reviews Microbiology* 13, no. 8 (August 2015): 484–96. https://doi.org/10.1038/nrmicro3490.
20. Gao, F, L Yue, D L Robertson, S C Hill, H Hui, R J Biggar, A E Neequaye, T M Whelan, D D Ho, and G M Shaw. "Genetic Diversity of Human Immunodeficiency Virus Type 2: Evidence for Distinct Sequence Subtypes with Differences in Virus Biology." *Journal of Virology* 68, no. 11 (1994): 7433–47. https://doi.org/10.1128/JVI.68.11.7433-7447.1994.
21. "Genes and Genome of HIV-1." *Journal of Phylogenetics & Evolutionary Biology* 02, no. 01 (2014). https://doi.org/10.4172/2329-9002.1000126.
22. Goldschmidt, Valérie, Lisa M Miller Jenkins, Hugues de Rocquigny, Jean-Luc Darlix, and Yves Mély. "The Nucleocapsid Protein of HIV-1 as a Promising Therapeutic Target for Antiviral Drugs." *HIV Therapy* 4, no. 2 (March 2010): 179–98. https://doi.org/10.2217/hiv.10.3.
23. Greenwood, David, Slack, Richard, Peutherer, John and Barer, Mike. (2007) *"Medical Microbiology"*. 17th ed. Elsevier Inc, New York, USA.
24. Hemelaar, Joris. "The Origin and Diversity of the HIV-1 Pandemic." *Trends in Molecular Medicine* 18, no. 3 (March 2012): 182–92. https://doi.org/10.1016/j.molmed.2011.12.001.
25. Hill, Melissa, Gilda Tachedjian, and Johnson Mak. "The Packaging and Maturation of the HIV-1 Pol Proteins." *Current HIV Research* 3, no. 1 (January 1, 2005): 73–85. https://doi.org/10.2174/1570162052772942.

26. Kantzanou, Maria, Maria A. Karalexi, Helen Papachristou, Alexis Vasilakis, Chrysoula Rokka, and Antigoni Katsoulidou. “Transmitted Drug Resistance among HIV-1 Drug-Naïve Patients in Greece.” *International Journal of Infectious Diseases* 105 (April 2021): 42–48. https://doi.org/10.1016/j.ijid.2021.02.043.
27. Kim, R B, M F Fromm, C Wandel, B Leake, A J Wood, D M Roden, and G R Wilkinson. “The Drug Transporter P-Glycoprotein Limits Oral Absorption and Brain Entry of HIV-1 Protease Inhibitors.” *Journal of Clinical Investigation* 101, no. 2 (January 15, 1998): 289–94. https://doi.org/10.1172/JCI1269.
28. Kostaki, Evangelia-Georgia, Daniel Frampton, Dimitrios Paraskevis, Katerina Pantavou, Bridget Ferns, Jade Raffle, Paul Grant, et al. “Near Full-Length Genomic Sequencing and Molecular Analysis of HIVInfected Individuals in a Network-Based Intervention (TRIP) in Athens, Greece: Evidence That Transmissions Occur More Frequently from Those with High HIV-RNA.” *Current HIV Research* 16, no. 5 (March 1, 2019): 345–53. https://doi.org/10.2174/1570162X17666190130120757.
29. Kostaki, Evangelia Georgia, Maria Gova, Georgios Adamis, Georgios Xylomenos, Maria Chini, Nikos Mangafas, Marios Lazanas, et al. “A Nationwide Study about the Dispersal Patterns of the Predominant HIV-1 Subtypes A1 and B in Greece: Inference of the Molecular Transmission Clusters.” *Viruses* 12, no. 10 (October 19, 2020): 1183. https://doi.org/10.3390/v12101183.
30. Luber, Andrew D. “Genetic Barriers to Resistance and Impact on Clinical Response.” *Journal of the International AIDS Society* 7, no. 1 (February 2005): 69–69. https://doi.org/10.1186/1758-2652-7-3-69.
31. Malliori, M., et al. "HIV/AIDS among IDUs in Greece: report of a recent outbreak and initial response policies." *EMCDDA* (2011).
32. Margot, Nicolas A., Pamela Wong, Rima Kulkarni, Kirsten White, Danielle Porter, Michael E. Abram, Christian Callebaut, and Michael D. Miller. “Commonly Transmitted HIV-1 Drug Resistance Mutations in Reverse-Transcriptase and Protease in Antiretroviral Treatment–Naive Patients and Response to Regimens Containing Tenofovir Disoproxil Fumarate or Tenofovir Alafenamide.” *The Journal of Infectious Diseases* 215, no. 6 (March 15, 2017): 920–27. https://doi.org/10.1093/infdis/jix015.
33. Menéndez-Arias, Luis. “Targeting HIV: Antiretroviral Therapy and Development of Drug Resistance.” *Trends in Pharmacological Sciences* 23, no. 8 (August 2002): 381–88. https://doi.org/10.1016/S0165-6147(02)02054-0.
34. Mouzaki, Athanasia, Nikolaos Davanos, George Panos, and Charalambos Gogos. “HIV-1 Subtype Characteristics of Infected Persons Living in Southwestern Greece.” *HIV/AIDS - Research and Palliative Care*, December 2015, 277. https://doi.org/10.2147/HIV.S90755.
35. Nanfack, Aubin J., Andrew D. Redd, Jude S. Bimela, Genesis Ncham, Emmanuel Achem, Andrew N. Banin, Allison R. Kirkpatrick, et al. “Multimethod Longitudinal HIV Drug Resistance Analysis in Antiretroviral-Therapy-Naive Patients.” Edited by

Yi-Wei Tang. *Journal of Clinical Microbiology* 55, no. 9 (September 2017): 2785–2800. https://doi.org/10.1128/JCM.00634-17.

36. Nicholson, L., Yamazaki, T., Torchia, D. et al. "Flexibility and function in HIV-1 protease." Nat Struct Mol Biol 2, 274–280 (1995). https://doi.org/10.1038/nsb0495-274.
37. Nikolopoulos, G, D Paraskevis, and A Hatzakis. "HIV Epidemiology in Greece." *Future Microbiology* 3, no. 5 (October 2008): 507–16. https://doi.org/10.2217/17460913.3.5.507.
38. Nikolopoulos, Georgios K., Evangelia-Georgia Kostaki, and Dimitrios Paraskevis. "Overview of HIV Molecular Epidemiology among People Who Inject Drugs in Europe and Asia." *Infection, Genetics and Evolution* 46 (December 2016): 256–68. https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.06.017.
39. Paraskevis, D., E. Magiorkinis, A. Katsoulidou, E. Hatzitheodorou, A. Antoniadou, A. Papadopoulos, G. Poulakou, et al. "Prevalence of Resistance-Associated Mutations in Newly Diagnosed HIV-1 Patients in Greece." *Virus Research* 112, no. 1–2 (September 2005): 115–22. https://doi.org/10.1016/j.virusres.2005.03.004.
40. Paraskevis, Dimitrios, Emmanouil Magiorkinis, Gkikas Magiorkinis, Vana Sypsa, Vassilios Paparizos, Marios Lazanas, Panagiotis Gargalianos, et al. "Increasing Prevalence of HIV-1 Subtype A in Greece: Estimating Epidemic History and Origin." *The Journal of Infectious Diseases* 196, no. 8 (October 15, 2007): 1167–76. https://doi.org/10.1086/521677.
41. Paraskevis, Dimitrios, Georgios Nikolopoulos, Anastasios Fotiou, Chrissa Tsiara, Dimitra Paraskeva, Vana Sypsa, Marios Lazanas, et al. "Economic Recession and Emergence of an HIV-1 Outbreak among Drug Injectors in Athens Metropolitan Area: A Longitudinal Study." Edited by Rongge Yang. *PLoS ONE* 8, no. 11 (November 12, 2013): e78941. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0078941.
42. Paraskevis, Dimitrios, Assimina Zavitsanou, Emmanouil Magiorkinis, Panagiotis Gargalianos, Georgios Xylomenos, Marios Lazanas, Maria Chini, et al. "Patterns of Drug Resistance among Newly Diagnosed HIV-1 Infected Patients in Greece during the Last Decade: The Crucial Role of Transmission Networks." *Journal of the International AIDS Society* 17 (November 2014): 19742. https://doi.org/10.7448/IAS.17.4.19742.
43. Paraskevis, D., E. Kostaki, G. Magiorkinis, P. Gargalianos, G. Xylomenos, E. Magiorkinis, M. Lazanas, et al. "Prevalence of Drug Resistance among HIV-1 Treatment-Naive Patients in Greece during 2003–2015: Transmitted Drug Resistance Is Due to Onward Transmissions." *Infection, Genetics and Evolution* 54 (October 2017): 183–91. https://doi.org/10.1016/j.meegid.2017.07.003.
44. Paraskevis, Dimitrios, Georgios K. Nikolopoulos, Vana Sypsa, Mina Psichogiou, Katerina Pantavou, Evangelia Kostaki, Timokratis Karamitros, et al. "Molecular Investigation of HIV-1 Cross-Group Transmissions during an Outbreak among People Who Inject Drugs (2011–2014) in Athens, Greece." *Infection, Genetics and*

Evolution 62 (August 2018): 11–16. https://doi.org/10.1016/j.meegid.2018.04.010.

45. Paraskevis, Dimitrios, and Angelos Hatzakis. "Global Molecular Epidemiology of HIV-1: The Chameleon Challenge." *The Lancet Infectious Diseases* 19, no. 2 (February 2019): 114–15. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(18)30687-X.
46. Pavlopoulou, Ioanna D., Stavroula K. Dikalioti, Ilias Gountas, Vana Sypsa, Meni Malliori, Katerina Pantavou, Don Des Jarlais, Georgios K. Nikolopoulos, and Angelos Hatzakis. "High-Risk Behaviors and Their Association with Awareness of HIV Status among Participants of a Large-Scale Prevention Intervention in Athens, Greece." *BMC Public Health* 20, no. 1 (December 2020): 105. https://doi.org/10.1186/s12889-020-8178-y.
47. Pham, Quang D., David P. Wilson, Matthew G. Law, Anthony D. Kelleher, and Lei Zhang. "Global Burden of Transmitted HIV Drug Resistance and HIV-Exposure Categories: A Systematic Review and Meta-Analysis." *AIDS* 28, no. 18 (November 28, 2014): 2751–62. https://doi.org/10.1097/QAD.0000000000000494.
48. Plantier, Jean-Christophe, Marie Leoz, Jonathan E Dickerson, Fabienne De Oliveira, François Cordonnier, Véronique Lemée, Florence Damond, David L Robertson, and François Simon. "A New Human Immunodeficiency Virus Derived from Gorillas." *Nature Medicine* 15, no. 8 (August 2009): 871–72. https://doi.org/10.1038/nm.2016.
49. Pommier, Yves, Allison A. Johnson, and Christophe Marchand. "Integrase Inhibitors to Treat HIV/Aids." *Nature Reviews Drug Discovery* 4, no. 3 (March 2005): 236–48. https://doi.org/10.1038/nrd1660.
50. Rom, William N. and Markowicz, Steven B. (2007) "Environmental and Occupational Medicine". 4th ed. LIPPINKOTT WILLIAMS AND WILKINS, a Wolters Kluwer business, Philadelphia, USA.
51. Sandefur, Stephanie, Rita M. Smith, Vasundhara Varthakavi, and Paul Spearman. "Mapping and Characterization of the N-Terminal I Domain of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Pr55Gag." *Journal of Virology* 74, no. 16 (August 15, 2000): 7238–49. https://doi.org/10.1128/JVI.74.16.7238-7249.2000.
52. Santos, André F., and Marcelo A. Soares. "HIV Genetic Diversity and Drug Resistance." *Viruses* 2, no. 2 (February 2, 2010): 503–31. https://doi.org/10.3390/v2020503.
53. Sarafianos, Stefan G., Bruno Marchand, Kalyan Das, Daniel M. Himmel, Michael A. Parniak, Stephen H. Hughes, and Eddy Arnold. "Structure and Function of HIV-1 Reverse Transcriptase: Molecular Mechanisms of Polymerization and Inhibition." *Journal of Molecular Biology* 385, no. 3 (January 2009): 693–713. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.10.071.
54. Sebastian, Bonhoeffer, and A. Nowak Martin. "Pre–Existence and Emergence of Drug Resistance in HIV–1 Infection." *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 264, no. 1382 (May 22, 1997): 631–37. https://doi.org/10.1098/rspb.1997.0089.

55. Sharp, P. M., and B. H. Hahn. "Origins of HIV and the AIDS Pandemic." *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 1, no. 1 (September 1, 2011): a006841–a006841. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006841.
56. Sharp, Paul M., Elizabeth Bailes, Roy R. Chaudhuri, Cynthia M. Rodenburg, Mario O. Santiago, and Beatrice H. Hahn. "The Origins of Acquired Immune Deficiency Syndrome Viruses: Where and When?" Edited by W. Hamilton, R. A. Weiss, and S. Wain–Hobson. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 356, no. 1410 (June 29, 2001): 867–76. https://doi.org/10.1098/rstb.2001.0863.
57. The Stages of HIV Infection (2020). U.S. Department of Health & Human Services. https://hivinfo.nih.gov/understanding-hiv/fact-sheets/stages-hiv-infection. Accessed date: 12/11/2020.
58. Sundquist, W. I., and H.-G. Krausslich. "HIV-1 Assembly, Budding, and Maturation." *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 2, no. 7 (July 1, 2012): a006924–a006924. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006924.
59. Sypsa, Vana, Mina Psichogiou, Dimitrios Paraskevis, Georgios Nikolopoulos, Chrissa Tsiara, Dimitra Paraskeva, Katerina Micha, et al. "Rapid Decline of HIV Incidence among People Who Inject Drugs during a Fast-Track Combination Prevention Programme Following an HIV Outbreak in Athens." *The Journal of Infectious Diseases*, February 27, 2017. https://doi.org/10.1093/infdis/jix100.
60. Tang, Michele W., and Robert W. Shafer. "HIV-1 Antiretroviral Resistance: Scientific Principles and Clinical Applications." *Drugs* 72, no. 9 (June 2012): e1–25. https://doi.org/10.2165/11633630-000000000-00000.
61. Tortora, Gerard J., Funke, Berdell R. and Case, Christine L. (2016) *"Microbiology, An Introduction".* 12th ed. Pearson Education, Inc.
62. Turner, B. G., and Summers, M. F. "Structural biology of HIV." *Journal of Molecular Biology*, (1999); 285(1), 1–32. https://doi.org/https://doi.org/10.1006/jmbi.1998.2354.
63. UNAIDS (2020). Global HIV & AIDS Statistics – 2020 fact sheet. https://www.unaids.org/en/resources/fact-sheet.
64. Vuilleumier, Séverine, and Sebastian Bonhoeffer. "Contribution of Recombination to the Evolutionary History of HIV:" *Current Opinion in HIV and AIDS* 10, no. 2 (March 2015): 84–89. https://doi.org/10.1097/COH.0000000000000137.
65. Wensing, Annemarie M.J., Noortje M. van Maarseveen, and Monique Nijhuis. "Fifteen Years of HIV Protease Inhibitors: Raising the Barrier to Resistance." *Antiviral Research* 85, no. 1 (January 2010): 59–74. https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2009.10.003.
66. What are HIV and AIDS? (2020). U.S. Department of Health & Human Services. https://www.hiv.gov/hiv-basics/overview/about-hiv-and-aids/what-are-hiv-and-aids, accessed date: 10/10/2020.
67. Wittkop, Linda, Huldrych F Günthard, Frank de Wolf, David Dunn, Alessandro Cozzi-Lepri, Andrea de Luca, Claudia Kücherer, et al. "Effect of Transmitted Drug

Resistance on Virological and Immunological Response to Initial Combination Antiretroviral Therapy for HIV (EuroCoord-CHAIN Joint Project): A European Multicohort Study." *The Lancet Infectious Diseases* 11, no. 5 (May 2011): 363–71. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(11)70032-9.

68. Wyatt, Robert and Sodroski, Joseph. "The HIV-1 Envelope Glycoproteins: Fusogens, Antigens and Immunogens." *Science* , 19 Jun 1998, Vol. 280, Issue 5371, pp. 1884-1888. https://doi.org/10.1126/science.280.5371.1884.
69. Yeni, Patrick. "Update on HAART in HIV." *Journal of Hepatology* 44 (January 2006): S100–103. https://doi.org/10.1016/j.jhep.2005.11.021.
70. Zheng, Yong-Hui, Nika Lovsin, and B. Matija Peterlin. "Newly Identified Host Factors Modulate HIV Replication." *Immunology Letters* 97, no. 2 (March 2005): 225–34. https://doi.org/10.1016/j.imlet.2004.11.026.
71. ΕΟΔΥ (2010). «Επιδημιολογική επιτήρηση της HIV/AIDS λοίμωξης στην Ελλάδα – Δηλωθέντα στοιχεία έως 31.12.2010». https://eody.gov.gr/.
72. ΕΟΔΥ (2011). «Επιδημιολογική επιτήρηση της HIV/AIDS λοίμωξης στην Ελλάδα – Δηλωθέντα στοιχεία έως 31.12.2011» https://eody.gov.gr/.