



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΠΡΟΝΟΙΑΣ

**ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ**

**ΤΟΜΕΑΣ: ΙΑΤΡΙΚΑ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑ**

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ:

**Μελέτη περιστατικών χαμηλού επιπέδου ιαιμίας (low level viremia) σε άτομα που ζουν με τον ιό HIV-1 και λαμβάνουν αντιρετροϊκή θεραπεία**

**Μόφορη Νέλλη (ΑΜ: 19678190)**

Επιβλέπων: Απόστολος Μπελούκας (Αναπληρωτής Καθηγητής, Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών)

Αθήνα, 2024



UNIVERSITY OF WEST ATTICA

FACULTY OF HEALTH AND CARE SCIENCES

**DEPARTMENT OF BIOMEDICAL SCIENCES**

**DIVISION: MEDICAL LABORATORIES**

GRADUATE THESIS:

**A study of cases of low level viremia in people living  
with HIV-1 and receiving antiretroviral therapy**

Mofori Nelli (RN: 19678190)

Supervisor: Apostolos Beloukas (Associate Professor, Department of Biomedical  
Sciences)

Athens, 2024



# ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΠΡΟΝΟΙΑΣ

## ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

### ΤΟΜΕΑΣ: ΙΑΤΡΙΚΑ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑ

**Τίτλος εργασίας:** Μελέτη περιστατικών χαμηλού επιπέδου ιαιμίας (low level viremia) σε άτομα που ζουν με τον ιό HIV-1 και λαμβάνουν αντιρετροϊκή θεραπεία

#### Μέλη Εξεταστικής Επιτροπής συμπεριλαμβανομένου και του Εισηγητή

Η πτυχιακή/διπλωματική εργασία εξετάστηκε επιτυχώς από την κάτωθι Εξεταστική Επιτροπή:

A/α	ΟΝΟΜΑ ΕΠΩΝΥΜΟ	ΒΑΘΜΙΔΑ/ΙΔΙΟΤΗΤΑ	ΨΗΦΙΑΚΗ ΥΠΟΓΡΑΦΗ
1.	ΜΠΕΛΟΥΚΑΣ ΑΠΟΣΤΟΛΟΣ	Αναπληρωτής Καθηγητής - Αντιπρόεδρος του Τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών / Επιβλέπων Καθηγητής	
2.	ΒΟΓΙΑΤΖΑΚΗ ΧΡΥΣΑΝΘΗ	Επίκουρη Καθηγήτρια του Τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών	
3.	ΜΠΡΑΤΑΚΟΥ ΣΠΥΡΙΔΟΥΛΑ	Εργαστηριακό διδακτικό προσωπικό (ΕΔΙΠ)	

## ΔΗΛΩΣΗ ΣΥΓΓΡΑΦΕΑ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ/ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η κάτωθι υπογεγραμμένη Μόφορη Νέλλη του Γρηγορίου, με αριθμό μητρώου 19678190 φοιτήτρια του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής της Σχολής Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας του Τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών, 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

## Περιεχόμενα

Αφιέρωση .....	7
Ευχαριστίες.....	8
Συνομογραφίες .....	9
Περίληψη.....	11
Abstract .....	12
1. Εισαγωγή .....	13
1.1 Ο ιός HIV .....	13
1.1.1 Δομή HIV.....	13
1.1.2 Κύκλος Ζωής .....	14
1.2 Μετάδοση και Διάγνωση HIV λοίμωξης .....	16
1.2.1 Μετάδοση HIV λοίμωξης.....	16
1.2.2 Παθογένεια HIV λοίμωξης.....	16
1.2.3 Διάγνωση HIV λοίμωξης - χρήση ιικού φορτίου ως διαγνωστικός δείκτης.....	16
1.2.4 Χρήση ιικού φορτίου στην κάθετη μετάδοση.....	19
1.3 Εργαστηριακές Μέθοδοι Μέτρησης ιικού φορτίου .....	20
1.4 Άτομα που ζουν με τον ιό HIV .....	25
1.4.1 Αντιρετροϊκή θεραπεία – HAART .....	25
1.4.2 Μελέτες U=U .....	27
1.4.3 Μέτρηση ιικού φορτίου και CD4 + λεμφοκύτταρα.....	28
1.4.4 Αναμενόμενα ιικά φορτία και ART Vs. αποτυχίες ART .....	29
1.5 Χαμηλό επίπεδο αιμιάς.....	29
1.5.1 Λοίμωξη χαμηλού επιπέδου αιμιάς και θεραπεία .....	30
1.5.2 Κλινική ανταπόκριση .....	30
2. Πειραματικό Μέρος .....	32
2.1 Σκοπός .....	32
2.2 Υλικά-Εξοπλισμός .....	32
2.3 Συλλογή & Προετοιμασία Δειγμάτων .....	32
2.4 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης Πραγματικού Χρόνου (Real Time PCR).....	32
2.4.1 Σύστημα GeneXpert <sup>®</sup> Dx & Δοχείο ανάλυσης GeneXpert <sup>®</sup> .....	33
2.4.2 Απομόνωση Νουκλεϊκού Οξέος .....	34
2.4.3 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης Αντίστροφης Μεταγραφής (RT-PCR).....	34

2.4.4 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης Πραγματικού Χρόνου (Real Time PCR).....	35
2.4.5 Ερμηνεία Αποτελεσμάτων.....	37
2.5 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης Πραγματικού Χρόνου- Ενίσχυση μέσω Μεταγραφής (Real Time – TMA).....	38
2.5.1 Συλλογή Δείγματος για το σύστημα Panther® .....	38
2.5.2 Εντοπισμός Στόχου (Target Capture) .....	39
2.5.3 Ενίσχυση στόχου με ενίσχυση μέσω μεταγραφής (TMA).....	39
2.5.4 Ανίχνευση των προϊόντων ενίσχυσης (amplicons) με σημασμένους φθορίζοντες ανιχνευτές. ....	39
2.5.5 Ερμηνεία Αποτελεσμάτων.....	40
3. Αποτελέσματα .....	42
4. Συζήτηση – Συμπεράσματα .....	47
4.1 Επιδημιολογικά δεδομένα .....	47
4.2 Παρόμοιες μελέτες.....	49
Βιβλιογραφία .....	58

## **Αφιέρωση**

**Στους γονείς μου,  
Σας ευχαριστώ που πιστεύετε σε μένα.**

## Ευχαριστίες

Η παρούσα Διπλωματική Εργασία εκπονήθηκε στο Εθνικό Κέντρο Αναφοράς AIDS Νοτίου Ελλάδος – Ε.Κ.Α.Α.Ν.Ε του Εργαστηρίου Επιτήρησης Λοιμωδών Νοσημάτων (ΕΕΛΝΟ) του τμήματος Πολιτικών Δημόσιας Υγείας (Σχολή Δημόσιας Υγείας, Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής).

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Αναπληρωτή Καθηγητή του Τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών, κ. Απόστολο Μπελούκα, επιβλέποντα της διπλωματικής μου εργασίας, για την εξαιρετική συνεργασία και εμπιστοσύνη που μου έδειξε σε όλη την διάρκεια εκπόνησης αυτής της μελέτης .

Επιπλέον, οφείλω ένα τεράστιο ευχαριστώ στην Παναγιώτα Ρέστα (Μοριακή Βιολόγος και Γενετίστρια) για την συμβολή, την υποστήριξη, την βοήθεια και την καλή της διάθεση της σε όλη την διάρκεια της διπλωματικής μου εργασίας.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στην υπόλοιπη επιστημονική ομάδα του εργαστηρίου που έκαναν πιο ευχάριστη την καθημερινότητα μου στο εργαστήριο.

Τέλος, το μεγαλύτερο ευχαριστώ οφείλω στην οικογένεια μου και τους φίλους μου οι οποίοι με στηρίζουν και με εμπυχώνουν σε κάθε μου βήμα.



## Συντομογραφίες

<b>HIV</b>	Human Immunodeficiency Virus	Ιός της Επίκτητης Ανοσοανεπάρκειας
<b>AIDS</b>	Acquired Immune Deficiency Syndrome	Σύνδρομο Επίκτητης Ανοσοανεπάρκειας
<b>UNAIDS</b>	Joint United Nations Programme on HIV/AIDS	Κοινό Πρόγραμμα του ΟΗΕ για τον HIV/AIDS
<b>cDNA</b>	complementary DNA	Συμπληρωματικό DNA
<b>RT</b>	Reverse transcriptase	Αντίστροφη μεταγραφάση
<b>CA</b>	Capsid Protein	Πρωτεΐνη του καψιδίου
<b>MA</b>	Matrix Protein	Πρωτεϊνική μήτρα
<b>NC</b>	Nucleocapsid	Νουκλεοκαψίδιο
<b>Gag</b>	Group Specific Antigen	Ειδικό αντιγόνο ομάδας
<b>Pol</b>	Polymerase	Πολυμεράση
<b>Env</b>	Envelope	Φάκελος
<b>RTC</b>	Reverse Transcription Complex	Σύμπλεγμα αντίστροφης μεταγραφής
<b>PIC</b>	Pre-Integration Complex	Σύμπλεγμα προ-ενσωμάτωσης
<b>HSV</b>	Human Simplex Virus	Ιός του έρπητα
<b>DCs</b>	Dendritic Cells	Δενδριτικά κύτταρα
<b>PCR</b>	Polymerase Chain Reaction	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης
<b>ELISA</b>	Enzyme-linked Immunosorbent Assay	Ενζυμική δοκιμασία ανοσοπροσρόφησης
<b>NASBA</b>	Nucleid Acid Sequence-Based Amplification	Ενίσχυση νουκλεϊκών οξέων με βάση την αλληλουχία τους
<b>TMA</b>	Transcription-Mediated Amplification	Ενίσχυση με μεσολάβηση μεταγραφής
<b>DNA</b>	Deoxyribonucleic Acid	Δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ
<b>RNA</b>	Ribonucleic acid	Ριβονουκλεϊκό οξύ
<b>gp</b>	Glycoprotein	Γλυκοπρωτεΐνη
<b>HAART</b>	Highly Active Antiretroviral Therapy	Αντιρετροϊκή θεραπεία υψηλής δραστηριότητας
<b>ART</b>	Antiretroviral Therapy	Αντιρετροϊκή θεραπεία
<b>CCR5</b>	C-C Chemokine Receptor Type 5	Υποδοχέας Χημειοκίνης τύπου 5
<b>CXCR4</b>	C-X-C Chemokine Receptor Type 4	Υποδοχέας Χημειοκίνης τύπου 4
<b>mRNA</b>	messenger RNA	Αγγελιοφόρο RNA
<b>NRTIs</b>	Nucleotide Reverse Transcriptase Inhibitors	Νουκλεοτιδικοί αναστολείς αντίστροφης μεταγραφάσης
<b>NNRTIs</b>	Non Nucleotide Reverse Transcriptase Inhibitors	Μη νουκλεοσιδικοί αναστολείς αντίστροφης μεταγραφάσης
<b>PI</b>	Protease Inhibitors	Αναστολείς πρωτεάσης
<b>NIH</b>	National Institute of Health	Εθνικό Ινστιτούτο Υγείας
<b>MSM</b>	Men having sex with men	Άντρες που έχουν σεξουαλική επαφή με άντρες

<b>LOD</b>	Limit Of Detection	Όριο ανίχνευσης
<b>LOQ</b>	Limit Of Qualification	Όριο ποσοτικοποίησης
<b>pLLV</b>	persistent Low-Level Viremia	Επίμονη ιαιμία χαμηλού επιπέδου
<b>NSV</b>	Non Suppressible Viremia	Μη κατασταλτική ιαιμία
<b>LLV</b>	Low Level Viremia	Χαμηλό επίπεδο ιαιμίας
<b>VF</b>	Viral Failure	Ιική αποτυχία
<b>SVA</b>	Sample Volume Adequacy	Μάρτυρας επάρκειας όγκου δείγματος
<b>IQS-H</b>	Internal Quantitative Standard High	Εσωτερικό πρότυπο ποσοτικοποίησης: Υψηλό
<b>IQS-L</b>	Internal Quantitative Standard Low	Εσωτερικό πρότυπο ποσοτικοποίησης: Χαμηλό
<b>WHO</b>	World Health Organization	Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας
<b>LTRs</b>	Long Terminal Repeats	Μακριές τερματικές επαναλήψεις
<b>EKAANE</b>	Εθνικό Κέντρο Αναφοράς AIDS Νοτίου Ελλάδος	
<b>XEN</b>	Χρήστες Ενδοφλεβίων Ναρκωτικών	

## Περίληψη

Ο ιός HIV-1 (Human Immunodeficiency Virus) αποτελεί τον αιτιολογικό παράγοντα για το Σύνδρομο Επίκτητης Ανοσοανεπάρκειας AIDS (Acquired Immune Deficiency Syndrome) με τον συνολικό αριθμό των περιστατικών HIV/AIDS που έχουν διαγνωσθεί στην Ελλάδα να ανέρχεται σε 20.627. Η αντιρετροϊκή θεραπεία (ART-Antiretroviral therapy) έχει την δυνατότητα αποτελεσματικής καταστολής του ιικού πολλαπλασιασμού του ιού HIV, βελτιώνοντας την ποιότητα ζωής και αποκαθιστώντας το προσδόκιμο ζωής των ατόμων που ζουν με τον ιό του HIV. Παρόλα αυτά, υπάρχουν περιπτώσεις μη αποτελεσματικής καταστολής του ιικού φορτίου σε άτομα που λαμβάνουν αντιρετροϊκή θεραπεία. Πρόκειται για περιπτώσεις αιμίας χαμηλού επιπέδου και περιπτώσεις ικής αποτυχίας. Οι ικές αποτυχίες (VF-Viral Failure) περιλαμβάνουν μετρήσεις ιικού φορτίου >200 αντίγραφα/mL πλάσματος. Η αιμία χαμηλού επιπέδου (LLV-Low Level Viremia) περιλαμβάνει μετρήσεις ιικού φορτίου εντός του εύρους 40-199 αντίγραφα/mL πλάσματος και αντιστοιχούν στο 3% έως 10% των ασθενών. Ωστόσο, ανάλογα με την γεωγραφική περιοχή π.χ. σε Αφρικανικές χώρες το εύρος των μετρήσεων που ταξινομούνται ως LLV είναι διευρυμένο και αντιστοιχεί σε 40-999 αντίγραφα/mL πλάσματος. Η μέτρηση του ιικού φορτίου πραγματοποιείται με μοριακές τεχνικές PCR (Real-Time RT-PCR), αφού έχει προηγηθεί διάγνωση της λοίμωξης με Elisa 4<sup>ης</sup> γενιάς και επιβεβαίωση με τεχνικές γραμμικής ανοσοδοκιμασίας (*recomLine HIV-1& HIV-2 IgG*) ή με τεστ ανοσοχρωματογραφίας (*Geenius<sup>TM</sup>*). Στην παρούσα διπλωματική εργασία παρουσιάζονται δεδομένα από εξετάσεις που πραγματοποιήθηκαν στο Εθνικό Κέντρο Αναφοράς AIDS Νοτίου Ελλάδος (ΕΚΑΑΝΕ) και αφορούν εργαστηριακές παρακολουθήσεις ατόμων που λάμβαναν αντιρετροϊκή θεραπεία. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων ιικού φορτίου ανέδειξαν 150 περιπτώσεις ατόμων υπό την λήψη ART, που ανήκαν στο εύρος 40-999 αντίγραφα/mL πλάσματος. Από τις 150 περιπτώσεις, οι 105 χαρακτηρίστηκαν ως LLV (40-199 αντίγραφα/mL πλάσματος) και οι υπόλοιπες 45 θεωρήθηκαν ικές αποτυχίες (>200 αντίγραφα/mL πλάσματος).

**Λέξεις-Κλειδιά:** HIV, AIDS, εργαστηριακή παρακολούθηση, μέτρηση ιικού φορτίου, άτομα που ζουν με τον HIV, αιμία χαμηλού επιπέδου, Real-Time RT-PCR

## Abstract

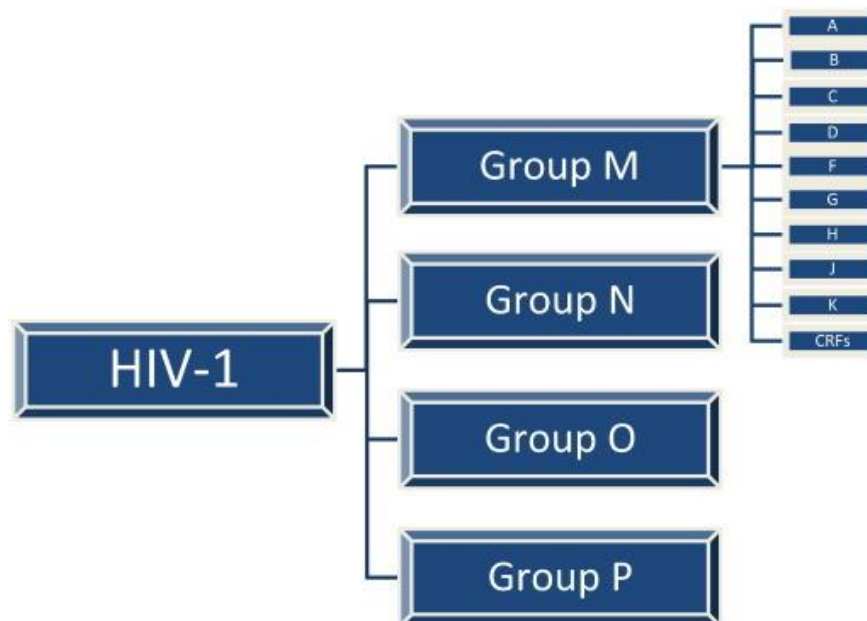
Human Immunodeficiency Virus type 1 (HIV-1) constitutes the causative factor of Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS), with the number of HIV/AIDS cases diagnosed in Greece reaching 20,627. Antiretroviral therapy (ART) has the ability to effectively suppress HIV viral replication. Improving the quality of life and restoring the life expectancy of individuals living with HIV. However, there are cases in which viral suppression is not effective in individuals receiving antiretroviral therapy. These cases include low-level viremia and viral failure. Viral failures (VF) include viral load measurements >200 copies/mL plasma. Low-level viremia (LLV) includes viral load measurements within the range of 40-199 copies/mL and accounts for 3% to 10% of patients. Although, depending on the geographic region, such as in African countries, the range of measurements classified as LLV is expanded and corresponds to 40-999 copies/mL plasma. Measurement of viral load is performed using molecular techniques such as PCR (Real-Time RT-PCR), after diagnosis of the infection with 4<sup>th</sup> generation Elisa and confirmation with linear immunoassay technique (*recomLine* HIV-1& HIV-2 IgG) or with tests based on lateral flow (Geenius<sup>TM</sup>). This thesis presents data collected at the National AIDS Reference Center of Southern Greece (NARCSG) and laboratory follow-ups of individuals receiving antiretroviral therapy. The results of viral load measurements identified 150 individuals on ART, with viral loads in the range of 40-999 copies/mL plasma. Out of these cases, 105 were classified as LLV (40-199 copies/mL plasma) and the remaining 45 were considered viral failures (>200 copies/mL plasma).

**Key-Words:** HIV, AIDS, laboratory monitoring, viral load measurement, individuals living with HIV, low-level viremia, Real-Time RT-PCR

## 1. Εισαγωγή

### 1.1 Ο ιός HIV

Ο ιός HIV (HIV- Human Immunodeficiency Virus) ανήκει στο γένος των Lentiviruses της οικογένειας των ρετροϊών. Όλοι οι ιοί που ανήκουν στην οικογένεια των ρετροϊών διαθέτουν πολύπλοκα γονιδιώματα και κωνικά πρωτεϊνικά καψίδια όπου εντοπίζεται το γονιδίωμα του εκάστοτε ιικού σωματιδίου. Τα στελέχη του HIV που έχουν απομονωθεί έως τώρα ταξινομούνται σε δύο τύπους, τον HIV- τύπου 1 (HIV-1) ο οποίος κατηγοριοποιήθηκε σε τέσσερις ομάδες (M,N,O,P) και τον HIV-τύπου 2 (HIV-2) **εικ.1**. Ο αιτιολογικός παράγοντας για το Επίκτητο Σύνδρομο Ανοσοανεπάρκειας (AIDS-Acquired Immune Deficiency Syndrome) σε παγκόσμια κλίμακα είναι ο HIV-1, με τον HIV-2 να περιορίζεται σε ορισμένες περιοχές της Δυτικής και Κεντρικής Αφρικής (1). Το γονιδίωμα του HIV αποτελείται από ριβονουκλεϊκό οξύ-RNA και μέσω του ενζύμου της ιικής αντίστροφης μεταγραφάσης (RT-Reverse Transcriptase) προκύπτει το συμπληρωματικό DNA (cDNA-complementary DNA) κατά την είσοδο του ιού σε ένα νέο κύτταρο ξενιστή (2).



**Εικόνα 1.** Ταξινόμηση υποτύπων HIV-1 (3).

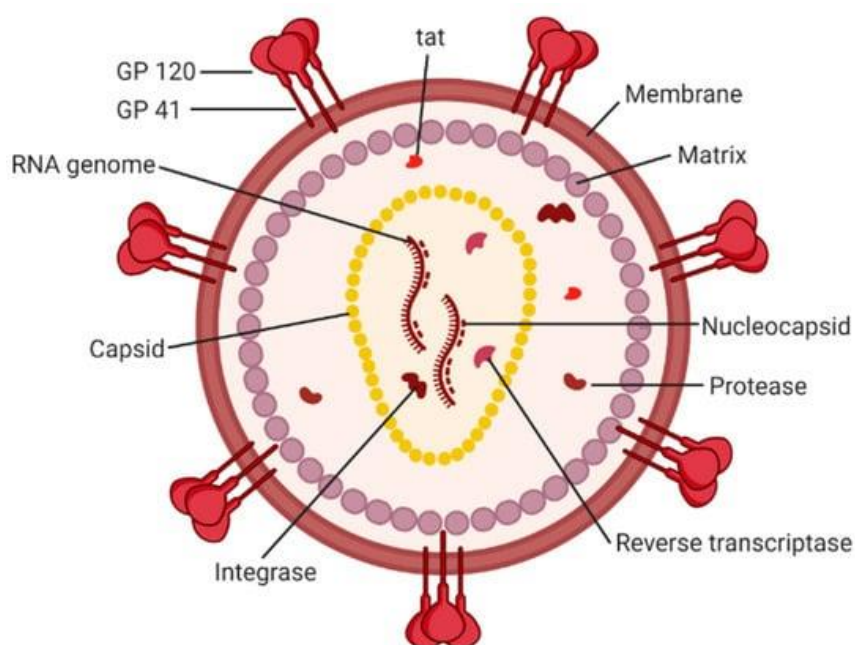
#### 1.1.1 Δομή HIV

Ένα τυπικό ιικό σωματίδιο του HIV έχει διάμετρο 100nm και περιβάλλεται από μια μεμβράνη-ικός φάκελος όπου περιλαμβάνει συστατικά από την κυτταροπλασματική μεμβράνη του ξενιστή κατά την εκβλάστηση. Ο φάκελος αποτελείται από μια λιπιδική διπλοστοιβάδα και περιλαμβάνει γλυκοπρωτεΐνες της εξωτερικής επιφάνειας gp120 και διαμεμβρανικές γλυκοπρωτεΐνες gp41 οι οποίες είναι οργανωμένες σε τριμερή (4) (1).

Επιπλέον, η λιπιδική διπλοστοιβάδα του ιού φέρει αρκετές πρωτεΐνες που έχουν απομονωθεί κατά την εκβλάστηση του ιοσωματίου από το μολυσμένο κύτταρο όπως πρωτεΐνες HLA της τάξης I και II, αντιγόνα ιστοσυμβατότητας (ακτίνη και ουβικιτίνη) αλλά και πρωτεΐνες προσκόλλησης όπως το ICAM-1 που διευκολύνουν πιθανά την σύνδεση του ιού σε άλλα κύτταρα στόχους. Εσωτερικά του φακέλου, βρίσκεται η πρωτεϊνική μήτρα

(matrix protein, MA) p17, η οποία περιβάλλει το κωνικό καψίδιο όπου και εντοπίζεται το γονιδίωμα του ιού. Η κύρια πρωτεΐνη του καψιδίου είναι η p24 (capsid protein, CA) (2).

Εντός του πρωτεϊνικού καψιδίου φυλάσσεται το γονιδίωμα του ιού που αποτελείται από δύο πανομοιότυπα αντίγραφα μονόκλωνων μορίων RNA, τα οποία σταθεροποιούνται ως σύμπλοκο ριβονουκλεοπρωτεΐνης μαζί την πρωτεΐνη του νουκλεοκαψιδίου (nucleocapsid, NC). Επίσης αποτελείται από τρεις βασικές γονιδιακές περιοχές gag, pol, env. Η γονιδιακή περιοχή gag κωδικοποιεί τις δομικές πρωτεΐνες του πυρήνα (p24, p7, p6) και της μήτρας (p17), η pol κωδικοποιεί τρία βασικά ένζυμα για τον κύκλο ζωής του ιού: η αντίστροφη μεταγραφάση (πολλαπλασιασμός ιικού γονιδιώματος), ιντεργκράση ( ενσωμάτωση του ιικού DNA στο γονιδίωμα του ξενιστή) και πρωτεάση (ένζυμο που διασπά πεπτιδικούς δεσμούς σε ορισμένες θέσεις αμινοξέων στις πρόδρομες πρωτεΐνες που προκύπτουν από τις περιοχές Gag και Pol) και την περιοχή env που κωδικοποιεί τις γλυκοπρωτεΐνες gp120 και gp41 του περιβλήματος του ιού, οι οποίες αναγνωρίζουν τους υποδοχείς της κυτταρικής επιφάνειας (1) (2).



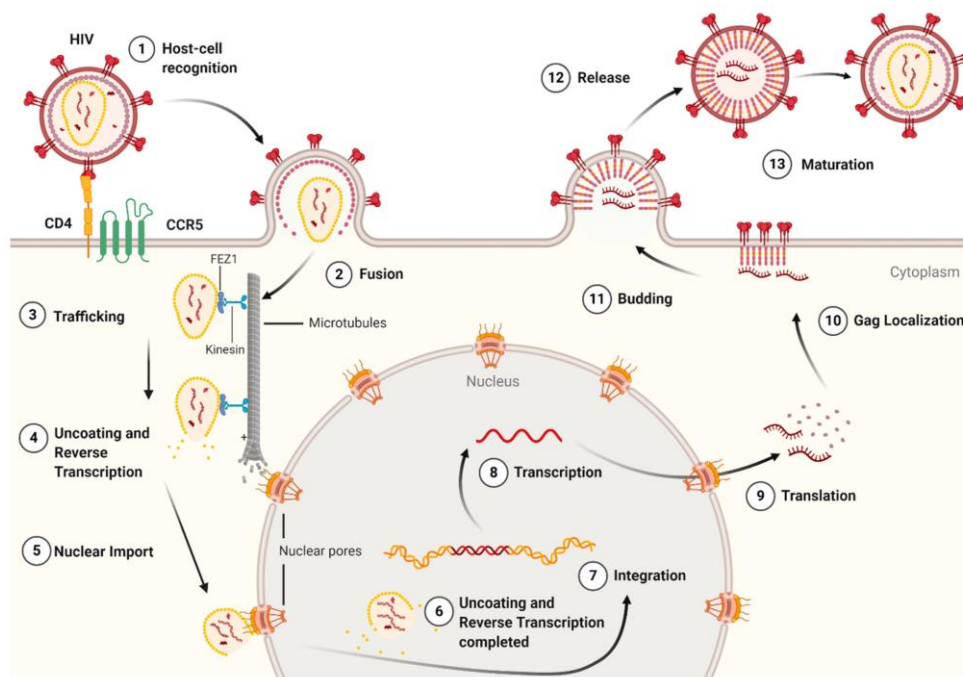
**Εικόνα 2.** Σχηματική απεικόνιση του ιοσωματίου του HIV-1 (4).

### 1.1.2 Κύκλος Ζωής

Ο κύκλος ζωής του HIV-1 μπορεί να αναλυθεί σε δύο στάδια: πρώιμο και όψιμο. Το πρώιμο στάδιο ξεκινά με την προσκόλληση ενός ιοσωματίου στο κύτταρο ξενιστή και καταλήγει με την ενσωμάτωση του ιικού γονιδιώματος στο DNA του ξενιστή. Το όψιμο στάδιο του κύκλου ζωής είναι η περίοδος ύστερα από την ενσωμάτωση του ιικού γονιδιώματος μέχρι και την ωρίμανση του ιού. Το πρώιμο στάδιο του κύκλου ζωής του HIV-1 ξεκινά με το σύμπλεγμα των γλυκοπρωτεϊνών του ιού (gp 41 και gp120) οι οποίες αλληλεπιδρούν με τους υποδοχείς των CD4 λεμφοκυττάρων και τους συν-υποδοχείς CCR5 ή CXCR4 του ξενιστή. Η συγκεκριμένη αλληλεπίδραση οδηγεί στην ενεργοποίηση ενός καταρράκτη δομικών αλλαγών του ιικού φακέλου που επιτρέπει την απελευθέρωση του ιικού γονιδιώματος στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου-στόχο (4).

Το σύμπλεγμα της καψιδιακής πρωτεΐνης και των περιεχομένων της αναφέρονται ως σύμπλεγμα αντίστροφης μεταγραφάσης (RTC-Reverse Transcription Complex). Η αντίστροφη μεταγραφή πραγματοποιείται εντός του πυρήνα του ισωματίου. Κατά την διάρκεια της αντίστροφης μεταγραφής, το καψίδιο διασπάται προκειμένου να απελευθερωθεί το ιικό DNA που δημιουργήθηκε (με το ιικό RNA να χρησιμοποιηθήκε ως καλούπι) και ύστερα να ενσωματωθεί στο γονιδίωμα του κυττάρου-ξενιστή. Την στιγμή που το σύμπλοκο της αντίστροφης μεταγραφής εισέλθει στον πυρήνα ονομάζεται σύμπλοκο προ-ενσωμάτωσης (PIC- Pre-Integration Complex). Η διαδικασία αποκάλυψης του καψιδίου και της αντίστροφης μεταγραφής ολοκληρώνεται μετά την είσοδο στον πυρήνα και πριν την ενσωμάτωση του ιικού γονιδιώματος. Το καψίδιο είναι υπεύθυνο για τον εντοπισμό του PIC σε ενεργά μεταγραφόμενες θέσεις της χρωματίνης προκειμένου να διευκολυνθεί η ενσωμάτωση του ιικού DNA στο DNA του κυττάρου ξενιστή (4).

Τα ιικά γονίδια μεταγράφονται από το κύτταρο ξενιστή και εξέρχονται από τον πυρήνα. Ένα ανώριμο ισωμάτιο εκκολάπτεται μέσω πολυπρωτεϊνών που προκύπτουν από την κωδικοποίηση της Gag περιοχής. Το τελικό στάδιο του κύκλου ζωής του ισωματίου είναι η ωρίμανση, η οποία οδηγεί στο σχηματισμό ενός πλήρους μολυσματικού ισωματίου. Το στάδιο της ωρίμανσης καταλύεται από την πρωτεάση του ιού όπου διασπά τους πεπτιδικούς δεσμούς μεταξύ των αμινοξέων μετατρέποντας έτσι την πολυπρωτεΐνη σε μικρότερα λειτουργικά πεπτίδια. Σε αυτό το στάδιο, το ιικό καψίδιο σχηματίζει ένα ώριμο και πλήρως μολυσματικό HIV-1 ισωμάτιο. Το νεοσχηματισμένο και ώριμο ισωμάτιο μπορεί να ξαναρχίσει τον κύκλο ζωής του HIV-1, μολύνοντας ένα άλλο κύτταρο ξενιστή (4).



**Εικόνα 3.** Ο κύκλος ζωής του HIV-1 (4).

## 1.2 Μετάδοση και Διάγνωση HIV λοίμωξης

### 1.2.1 Μετάδοση HIV λοίμωξης

Η πλειοψηφία των περιστατικών μετάδοσης του HIV-1 πραγματοποιούνται μέσω της έκθεσης των επιφανειών του βλεννογόνου του ορθού και των γεννητικών οργάνων σε μολυσμένα βιολογικά υγρά μέσω της απροφύλακτης σεξουαλικής επαφής. Αν και λιγότερο συχνός τρόπος μετάδοσης, η μετάδοση μέσω του στοματικού βλεννογόνου συμβαίνει κατά κύριο λόγο μέσω του θηλασμού από μητέρα θετική στον HIV. Επιπλέον, μια μητέρα η οποία έχει μολυνθεί από τον ιό μπορεί να προκαλέσει μόλυνση στο νεογνό είτε κατά την διάρκεια της κύησης είτε με κάθετη μετάδοση κατά τον τοκετό. (5) (6) (7). Αναφέρεται πως η λοίμωξη ενός ατόμου με τον HIV αυξάνει τον κίνδυνο παρουσίας άλλων σεξουαλικά μεταδιδόμενων νοσημάτων (ΣΜΝ) όπως είναι ο ιός του απλού έρπητα (HSV- Human Simplex Virus) (6).

### 1.2.2 Παθογένεια HIV λοίμωξης

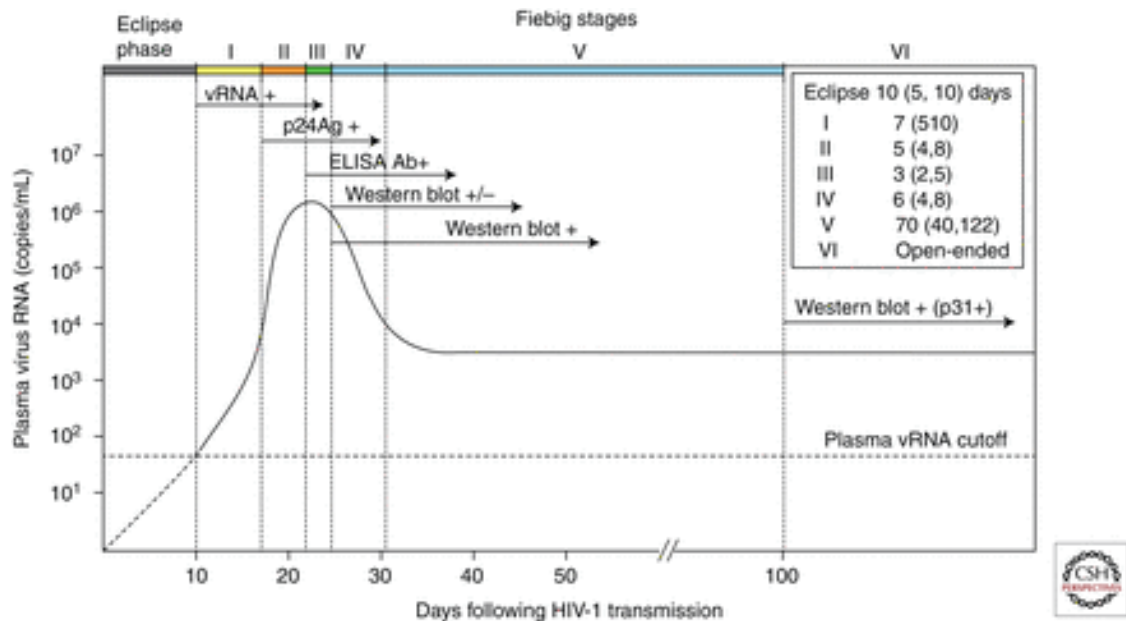
Το επιθήλιο αποτελεί την πρώτη γραμμή άμυνας ενάντια στα εισερχόμενα παθογόνα καθώς σε πρώτη φάση διαθέτει ένα αποτελεσματικό φράγμα κατά της μόλυνσης. Επιπλέον, εκτός από ένα ισχυρό φυσικό εμπόδιο, τα κύτταρα εντός του επιθηλίου παράγουν και εκκρίνουν παράγοντες που βοηθούν στην πρόληψη της μόλυνσης. Ωστόσο, ανεξάρτητα από τους παραπάνω μηχανισμούς πρόληψης και αντιμετώπισης της λοίμωξης το επιθήλιο δεν καθίσταται αδιαπέραστο και συνεπώς είναι ευαίσθητο στην μόλυνση από τον ιό του HIV. Από την στιγμή της διείσδυσης, ο ιός διαθέτει την μολυσματική ικανότητα να μολύνει διάφορα κύτταρα στόχους συμπεριλαμβανομένων των δενδριτικών κυττάρων (DCs- Dendritic Cells), των Τ λεμφοκυττάρων και των μακροφάγων. Αυτά τα κύτταρα εκφράζουν τον υποδοχέα CD4 και τους συνυποδοχείς CCR5 ή CXCR4 που είναι απαραίτητοι για την εγκαθίδρυση της HIV λοίμωξης. Τα δενδριτικά κύτταρα και τα μακροφάγα φέρουν επίσης υποδοχείς λεκτίνης τύπου C και άλλους υποδοχείς που ενισχύουν την προσκόλληση του ιού και την είσοδο του στα κύτταρα στόχους. Τα δενδριτικά κύτταρα διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην λοίμωξη του βλεννογόνου από τον ιό όχι μόνο μέσω της αλληλεπίδρασης τους με τα CD4+ Τ κύτταρα αλλά και επειδή μπορούν να λειτουργήσουν ως οχήματα για την μεταφορά του ιού (6) (8).

### 1.2.3 Διάγνωση HIV λοίμωξης - χρήση ιικού φορτίου ως διαγνωστικός δείκτης

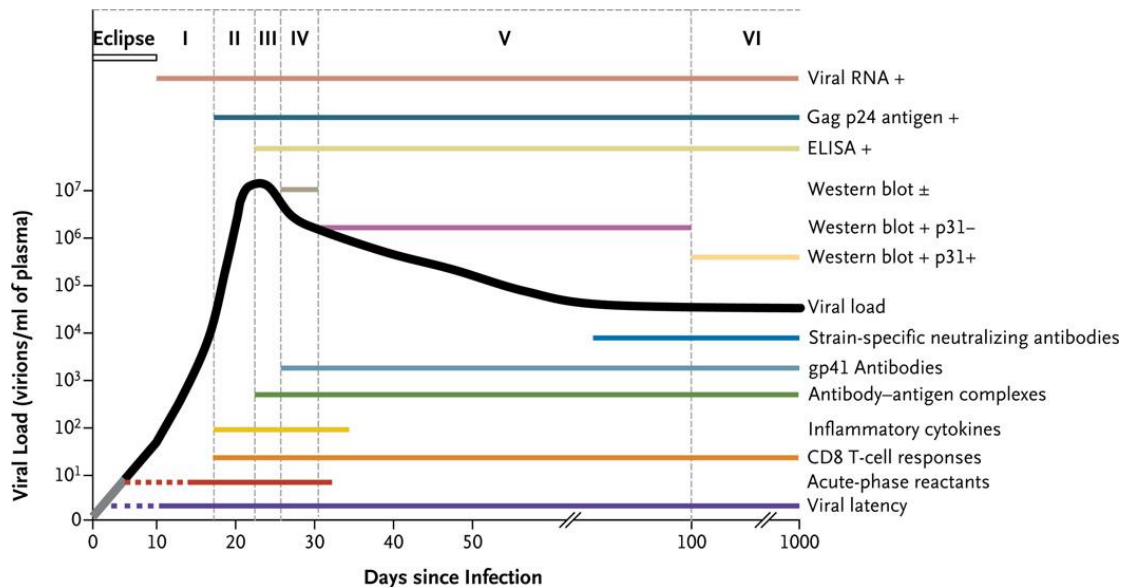
Η αρχική περίοδος μεταξύ της στιγμής που μολύνθηκε το πρώτο κύτταρο και της πρώτης ανίχνευσης του ιού στο αίμα ονομάζεται φάση έκλειψης (9) (7). Η διάρκεια αυτής της περιόδου είναι περίπου 7-21 ημέρες. Κατά την διάρκεια αυτής της φάσης ενώ η κλινική εικόνα παραμένει «σιωπηλή», ο ιός πολλαπλασιάζεται στα CD4+ Τ κύτταρα (7). Η εξέλιξη της λοίμωξης HIV-1 απεικονίζεται στην Εικόνα 4 ως έξι διακριτά στάδια τα οποία ορίζονται με βάση την χρήση τυπικών κλινικών εργαστηριακών δοκιμών ως διαγνωστικά εργαλεία. Τα στάδια βασίζονται στην διαδοχική εμφάνιση του ιικού RNA του HIV-1 στο πλάσμα το οποίο καθίσταται ανιχνεύσιμο εντός 12 ημερών μετά την έκθεση, ενώ τα επίπεδα παρουσίας του ιικού RNA κορυφώνονται μεταξύ 20 και 30 ημερών. Το αντιγόνο της καψιδιακής πρωτεΐνης p24 φτάνει σε ανιχνεύσιμα επίπεδα στο πλάσμα την 15<sup>η</sup> ημέρα και συνεχίζει να παρατηρείται για 25-40 ημέρες. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την παραγωγή αντισωμάτων τα οποία είναι σε θέση να αναγνωρίσουν το p24 αντιγόνο και να προσδεθούν με αυτό δημιουργώντας σύμπλοκο αντιγόνου-αντισώματος. Την 50<sup>η</sup> ημέρα το αντιγόνο



απομακρύνεται εξ ολοκλήρου από την κυκλοφορία του αίματος. (9). Τέλος, εμφανίζονται αντισώματα ειδικά στην αναγνώριση και άλλων HIV-1 πρωτεϊνών. Στις εικόνες που ακολουθούν, το σύμβολο συν υποδηλώνει θετικό αποτέλεσμα δοκιμής, το αρνητικό σύμβολο αφορά σε αρνητικό αποτέλεσμα και το σύμβολο συν-πλην ένα οριακό θετικό αποτέλεσμα. Οι γραμμές κάτω από την καμπύλη του ιικού φορτίου δείχνουν το χρονοδιάγραμμα των βασικών συμβάντων και των ανοσολογικών αποκρίσεων (10).



**Εικόνα 4.** Εργαστηριακή σταδιοποίηση και φυσική εξέλιξη οξείας και πρώιμης λοίμωξης HIV-1 (7).



**Εικόνα 5.** Φυσική εξέλιξη και ανοσοπαθγένεση της λοίμωξη HIV-1 (10).

## Εργαστηριακές Ανοσολογικές Μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για την διάγνωση του HIV:

### **α) ELISA ( Enzyme Linked Immunosorbent Assay) 4<sup>th</sup> generation:**

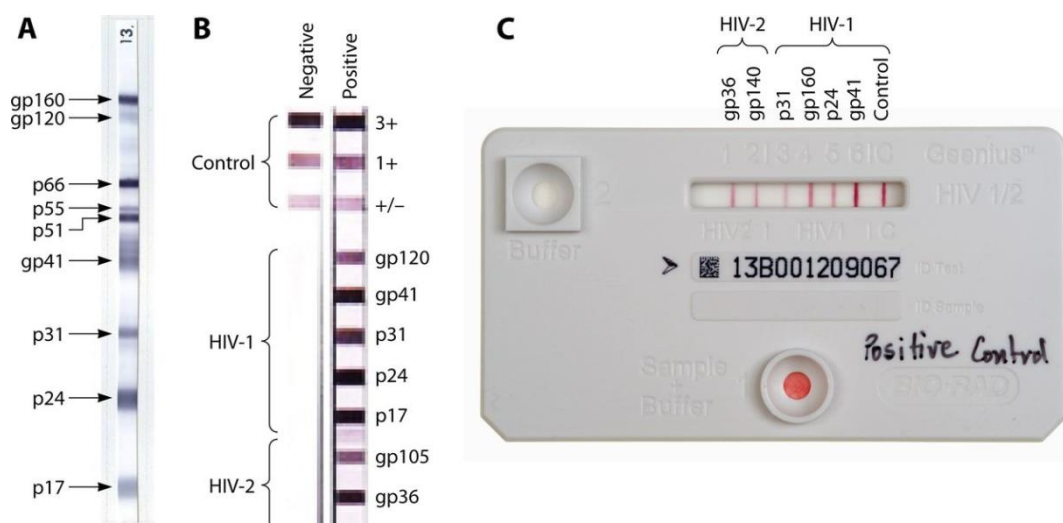
Από το 1985 έχουν γίνει διαθέσιμα πολλά εμπορικά τεστ με σκοπό την διάγνωση του HIV. Υπάρχουν κυρίως τρεις μορφές ELISA: έμμεση ELISA, δοκιμασία προσδιορισμού αντισωμάτων και ELISA σάντουιτς. Οι ELISA 4<sup>ης</sup> γενιάς είναι εμπορικά διαθέσιμες και συνδυάζουν σε μια μόνο δοκιμασία τον έλεγχο για την ύπαρξη αντιγόνων ή/και αντισωμάτων στο προς ανάλυση δείγμα ενώ συγχρόνως μειώνουν και την περίοδο του παραθύρου (11).

### **β) recomLine HIV-1& HIV-2 IgG:**

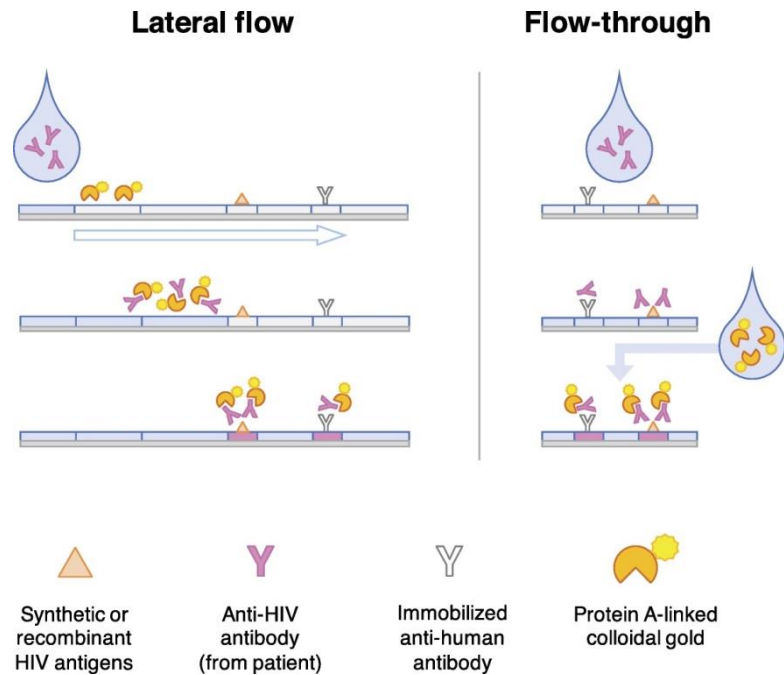
Πρόκειται για μια γραμμική ανοσοδοκιμασία που χρησιμοποιεί ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες HIV με σκοπό την ανίχνευση αντισωμάτων έναντι του ιού στο δείγμα που εξετάζεται. Η ανάλυση λειτουργεί με τις ειδικές για τον HIV-1 πρωτεΐνες gp120, gp41, p17, p51 και p31 και ειδικές πρωτεΐνες για τον HIV-2 gp105 και gp36 επιτρέποντας και την διαφοροποίηση μεταξύ HIV-1 και HIV-2 στελεχών. Η ανάλυση πραγματοποιείται με την χρήση Dynalab-Blot-Plus Strip Processor και recomScan για αυτοματοποιημένη ανάλυση και αξιολόγηση με την βοήθεια υπολογιστή. (12) (13).

### **γ) Geenius<sup>TM</sup> HIV 1/2 confirmatory assay:**

Η δοκιμασία Geenius αποτελεί ένα τεστ ανοσοχρωματογραφίας που περιλαμβάνει κασέτες πλευρικής ροής όπου βρίσκονται καθηλωμένα αντιγόνα του HIV-1 (gp160, gp41, p31 και p25) και του HIV-2 (gp140 και gp34) και στην περιοχή ελέγχου καθηλωμένα μόρια πρωτεΐνης A. Στην θέση προσθήκης του ρυθμιστικού διαλύματος υπάρχουν μόρια πρωτεΐνης A τα οποία είναι συζευγμένα με χρωμοφόρα σωματίδια κολλοειδούς χρυσού. Η συγκεκριμένη μέθοδος επιτρέπει την ανίχνευση αντισωμάτων έναντι του ιού του HIV και υπερτερεί συγκριτικά με άλλες μεθόδους επιβεβαίωσης καθώς απαιτεί μικρότερο χρόνο ανάλυσης. (14) (13).



**Εικόνα 6.** Απεικόνιση τριών επιβεβαιωτικών μεθόδων: Western blotting (WB) (A), Inno-LIA line blot (B) και κασέτα Geenius (C) (15).



**Εικόνα 7.** HIV rapid test (9).

Όπως αναφέρεται προηγουμένως, για την διάγνωση της HIV λοίμωξης πραγματοποιείται δοκιμασία ανοσοπροσρόφησης ELISA την οποία ακολουθεί επιβεβαιωτική μέθοδος που βασίζεται στην ανίχνευση ανασυνδυασμένων HIV πρωτεϊνών. Ωστόσο, αυτό το πρωτόκολλο μπορεί να έχει αρνητικά ή απροσδιόριστα αποτελέσματα, ειδικά τις πρώτες εβδομάδες της λοίμωξης.

Στους περισσότερους ασθενείς με λοίμωξη HIV, η αρχική ιαμμία εμφανίζεται εντός 4 έως 11 ημερών ύστερα από την έκθεση στον ιό. Κατά την διάρκεια της ορομετατροπής, το ιικό φορτίο είναι αυξημένο. Η εμφάνιση αυτών των υψηλών επιπέδων ιαμμίας κατά την διάρκεια της πρωτοπαθούς λοίμωξης HIV οδήγησε στην μέτρηση του ιικού φορτίου ως διαγνωστικό δείκτη της πρώιμης λοίμωξης από HIV, κυρίως σε ασθενείς υψηλού κινδύνου με αρνητικό αποτέλεσμα ELISA ή απροσδιόριστο αποτέλεσμα της επιβεβαιωτικής μεθόδου (16)

#### 1.2.4 Χρήση ιικού φορτίου στην κάθετη μετάδοση

Το ιικό φορτίο αποτελεί διαγνωστικό δείκτη για την λοίμωξη από τον ιό του HIV ανεξάρτητα από τον τρόπο μετάδοσης και μόλυνσης του ατόμου (9) (7).

Η παθητική μεταφορά των μητρικών αντισωμάτων ενάντια του HIV-1 από την μητέρα στο παιδί αποκλείει την χρήση ορολογικών τεστ για την διάγνωση της λοίμωξης HIV-1 σε βρέφη. Επομένως, η διάγνωση σε βρέφη πρέπει να βασίζεται στην ανίχνευση του ιού ή των ιικών σωματιδίων (17). Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας συνιστά την χρήση δοκιμών PCR που περιλαμβάνουν τεχνολογίες νουκλεϊκών οξέων (NAT- Nucleic Acid Technologies) για την επιβεβαίωση της λοίμωξης από τον ιό του HIV σε βρέφη και παιδιά ηλικίας κάτω των 18μηνών. Οι τεχνολογίες αυτές περιλαμβάνουν εργαστηριακές δοκιμές PCR αντίστροφης μεταγραφάσης (RT-PCR) που ανιχνεύουν το ιικό RNA (18).

Ο συνιστάμενος χρόνος για την έγκαιρη διάγνωση της λοίμωξης είναι στις 4-6 εβδομάδες ζωής. Επιπλέον, συνίσταται η διενέργεια πρόσθετων εξετάσεων συμπεριλαμβανομένου και του ορολογικού ελέγχου του HIV στην παιδική ηλικία προκειμένου να καθοριστεί η τελική κατάσταση του ιού HIV (17). Σε περίπτωση θετικού αποτελέσματος, το βρέφος ξεκινά διαβίου αντιρετροϊκή θεραπεία (18).

### 1.3 Εργαστηριακές Μέθοδοι Μέτρησης ιικού φορτίου

Η παρακολούθηση του ιικού φορτίου είναι ζωτικής σημασίας για την σταδιοποίηση και την θεραπεία της νόσου. Γενικότερα, ο έλεγχος του ιικού φορτίου αποτελεί μια μέθοδο που προτιμάται για την παρακολούθηση ασθενών με HIV αφού ξεκινήσουν αντιρετροϊκή θεραπεία. Τα υψηλά επίπεδα HIV που κυκλοφορούν στο αίμα υποδεικνύουν ότι ο ιός αναπαράγεται ενεργά και αυτά τα επίπεδα μπορούν να χρησιμοποιηθούν, με την βοήθεια μοριακών μεθόδων, προκειμένου να παρέχουν πληροφορίες σχετικά με την εξέλιξη της νόσου (19).

Με την εφαρμογή των τεχνικών μοριακής βιολογίας (δηλαδή PCR, RT-PCR, Real Time PCR) η μοριακή επιδημιολογία των ιών έχει επωφεληθεί σε μεγάλο βαθμό (20) και δεδομένου ότι τα τεστ αντισωμάτων, τα οποία είναι ευρέως διαθέσιμα στο εμπόριο στις αναπτυσσόμενες χώρες, δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παρακολούθηση και την εξέλιξη της νόσου, η μέτρηση του ιικού φορτίου αποτελεί το πρότυπο παρακολούθησης της νόσου του HIV. Πιο συγκεκριμένα, ο ποσοτικός έλεγχος ιικού φορτίου στο αίμα πραγματοποιείται με μοριακές τεχνικές και υπολογίζεται με βάση την συγκέντρωση του RNA HIV στο πλάσμα (19).

Για την μέτρηση του ιικού φορτίου του HIV-1 κατά καιρούς έχουν αναπτυχθεί ποικίλες ποσοτικές μέθοδοι όπως:

(i) δοκιμασίες βασισμένες σε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) όπως:

Από την ανακάλυψη της PCR στα μέσα της δεκαετίας του 1980, η χρήση αυτής της τεχνολογίας είναι εξαιρετικά πιο διαδεδομένη στα κλινικά εργαστήρια. Η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη μέθοδος για την μέτρηση του RNA του HIV είναι η ποσοτική ανάλυση PCR σε πραγματικό χρόνο. Οι περιοχές που στοχεύει η συγκεκριμένη τεχνολογία είναι διατηρημένες περιοχές του γονιδιώματος του HIV (pol) σχεδιάζοντας εκκινητές και ανιχνευτές για qPCR που πραγματοποιείται σε DNA το οποίο απομονώνεται από μονοκύτταρα του περιφερικού αίματος ή εμπλουτισμένα CD4+ T κύτταρα.

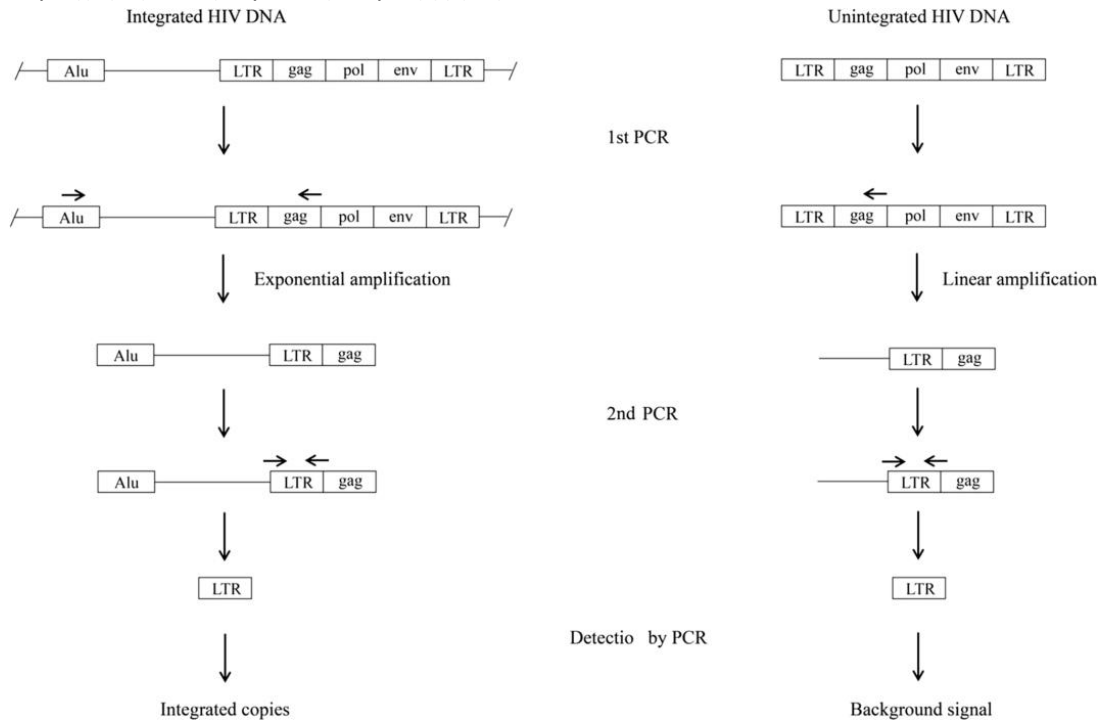
**α) Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης Αντίστροφης Μεταγραφής σε πραγματικό χρόνο-Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction σε πραγματικό χρόνο (Real Time RT-PCR):** Η τεχνική της RT-PCR βασίζεται στην ικανότητα του ενζύμου της αντίστροφης μεταγραφάσης να μετατρέπει το RNA σε συμπληρωματικό μόριο DNA (cDNA). Στην συνέχεια το cDNA ενισχύεται μέσω της κλασσικής τεχνικής PCR χρησιμοποιώντας ζεύγη ειδικών για τον HIV εκκινητών, που προέρχονται από συντηρημένες περιοχές του ιικού γονιδιώματος κυρίως της pol, προκειμένου να διευρυνθεί η ικανότητα ανίχνευσης των διαφόρων υποτύπων του HIV-1. Η ανίχνευση του DNA πραγματοποιείται σε πραγματικό χρόνο με την χρήση ειδικών

ως προς την επιθυμητή αλληλουχία φθοριζόντων ανιχνευτών και το ιικό φορτίο προσδιορίζεται με βάση την τυπική καμπύλη (15).

- β) Ενίσχυση Νουκλεϊκού Οξέος με βάση την αλληλούχηση- Nucleic Acid Sequence-Based Amplification (NASBA):** Πρόκειται για μια ισοθερμική δοκιμασία PCR η οποία βασίζεται στην ενίσχυση αλληλουχίας νουκλεϊκού οξέος η οποία παρακολουθείται σε πραγματικό χρόνο για την ποσοτικοποίηση του ιικού φορτίου HIV-1 (21). Περιλαμβάνει την χρήση τριών βασικών ενζύμων όπως η αντίστροφη μεταγραφάση (AMVRT, απομονώθηκε από τον ιό της μυελοβλάστωσης), RNase H και T7 RNA πολυμεράση. Ο εκκινητής που χρησιμοποιείται στοχεύει στην ενίσχυση της διατηρημένης περιοχής gag του ιικού γονιδιώματος. Τα αμπλικόνια που προκύπτουν υβριδοποιούνται με ειδικούς σημασμένους ανιχνευτές και υπολογίζονται μέσω ηλεκτροχημειοφωταύγειας (22).
- γ) Transcription-Mediated Amplification (TMA):** Η TMA σε αντίθεση με την κλασική με την PCR αποτελεί μια ισοθερμική διαδικασία επομένως δεν περιλαμβάνει θερμικούς κύκλους. Περιλαμβάνει τρία κύρια στάδια τα οποία λαμβάνουν χώρα στο ίδιο σωληνάριο : (1) Προετοιμασία του δείγματος, (2) Ενίσχυση της επιθυμητής αλληλουχίας RNA με TMA, (3) Ανίχνευση των προϊόντων της ενίσχυσης με ανιχνευτές χημιοφωταύγειας. Το στάδιο της ενίσχυσης περιλαμβάνει την αντίστροφη μεταγραφή του RNA με την χρήση δυο ενζύμων την αντίστροφη μεταγραφάση MMLV και την αντίστροφη πολυμεράση RNA T7. Μέσω της αντίστροφης μεταγραφάσης δημιουργείται ένα αντίγραφο του ιικού DNA (cDNA-complementary DNA), στο οποίο προσδέεται μια αλληλουχία εκκινητή η οποία συμβάλει στην λειτουργία της T7 πολυμεράσης δηλαδή την παραγωγή πολλαπλών μορίων RNA χρησιμοποιώντας ως εκμαγείο το ιικό DNA. Η ανίχνευση του αμπλικονίου επιτυγχάνεται με την χρήση μονόκλωνων ανιχνευτών νουκλεϊκού οξέος ειδικά κατασκευασμένοι για το HIV γονιδίωμα (23).
- δ) Alu-gag PCR:** Η πρόδρομη μορφή του HIV (πριν την ενσωμάτωση του ιικού γονιδιώματος στο γονιδίωμα του ξενιστή) έχει αποδειχθεί ότι προσβάλλει διάφορους τύπους κυττάρων όπως CD4+ T κύτταρα, μονοκύτταρα, μακροφάγα ή δενδριτικά κύτταρα τα οποία φέρουν το ιικό γονιδίωμα ενσωματωμένο στο γονιδίωμα του ξενιστή. Το στάδιο της ενσωμάτωσης είναι καθοριστικό για τον κύκλο ζωής του ιού καθώς επηρεάζει το στάδιο της μεταγραφής του γονιδιώματος, της αντιγραφής και της μετέπειτα μόλυνσης και εγκαθίδρυση της λοίμωξης από τον ιό. Το μη ενσωματωμένο DNA μπορεί να μεταγραφεί σε μικρά ποσοστά με αποτέλεσμα να μην προκαλείται ενεργή λοίμωξη από τον ιό του HIV. Για την ποσοτικοποίηση του ιικού γονιδιώματος ο διαχωρισμός μεταξύ του ενσωματωμένου και μη ιικού DNA είναι απαραίτητος. Η Alu-gag PCR αποτελεί μια τεχνική η οποία χρησιμοποιεί την γραμμική σχέση μεταξύ του ανθρώπινου DNA και της ενσωματωμένης HIV-1 LTR περιοχής προκειμένου να ενισχύσει, να υπολογίσει και να ανάγει το ιικό φορτίο του ενσωματωμένου DNA του HIV-1. Ο διαχωρισμός του ενσωματωμένου από το μη ενσωματωμένο DNA πραγματοποιείται με ειδικά σχεδιασμένους εκκινητές οι οποίοι επιτρέπουν την ενίσχυση του HIV DNA που έχει ενσωματωθεί. Η πρώτη δοκιμασία PCR χρησιμοποιεί έναν εκκινητή ο οποίος υβριδοποιεί τα στοιχεία Alu (επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες οι οποίες αποτελούν περίπου το 11% της συνολικής μάζας του ανθρώπινου γονιδιώματος),

(24) και ο δεύτερος εκκινητής υβριδοποιεί το γονίδιο gag για την ενίσχυση του ιικού DNA. Οι δύο περιοχές πρόσδεσης για αυτούς τους εκκινητές εμφανίζονται στο DNA στόχο μόνο όταν το γονιδίωμα του HIV έχει ενσωματωθεί στο ανθρώπινο γονιδίωμα. Ύστερα, ακολουθεί μια εξειδικευμένη Real Time PCR χρησιμοποιώντας εκκινητές για την περιοχή LTR (Long Terminal Repeat) προκειμένου να γίνει ποσοτικοποίηση του αριθμού των Alu-gag αντιγράφων τα οποία παράχθηκαν στον πρώτο κύκλο της PCR. Για την δημιουργία μιας σταθερής κα καμπύλης για την Alu-gag PCR, χρησιμοποιήθηκε DNA το οποίο περιέχει ενσωματωμένους προϊούς σε διάφορες

περιοχές εξαιτίας ιογενούς λοίμωξης (25).



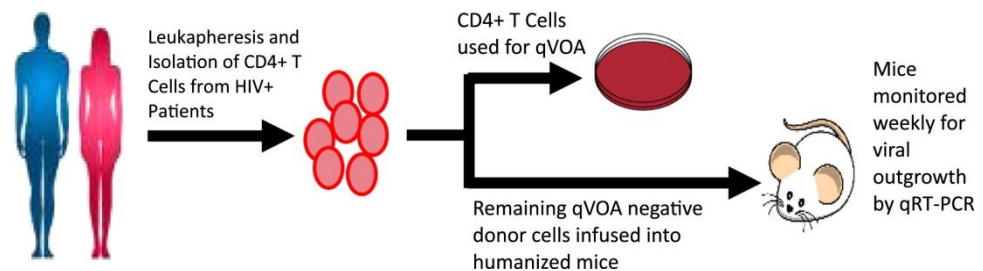
**Εικόνα 8.** Σχηματική απεικόνιση της Alu-gag PCR (25).

- ε) **Digital droplet PCR (ddPCR):** Η συγκεκριμένη δοκιμασία χρησιμοποιείται για την μέτρηση του ιικού φορτίου πριν από την κλασική δοκιμασία της PCR. Η ddPCR διαχωρίζει το μίγμα της αντίδρασης σε σταγονίδια δηλαδή το σύστημα αντίδρασης περιέχει μόρια νουκλεϊκού οξέος τα οποία χωρίζονται σε χιλιάδες σταγονίδια νανοκλίμακας. Κάθε σταγονίδιο περιέχει 0, 1 ή περισσότερα μόρια στόχους για ανίχνευση. Υπάρχουν δύο μορφές προετοιμασίας των σταγονιδίων είτε με γαλακτωματοποίηση του υδατικού μίγματος της PCR σε ένα θερμοσταθερό έλαιο είτε με την χρήση ενός τσιπ το οποίο θα διαθέτει προκατασκευασμένες οπές προκειμένου να ενισχυθεί το διάλυμα της αντίδρασης PCR. Τα μεμονωμένα σταγονίδια ενισχύονται με PCR και ύστερα πραγματοποιείται ανίχνευσή τους με φθορισμό προκειμένου να προσδιοριστεί η παρουσία ή η απουσία ενίσχυσης. Το ιικό φορτίο υπολογίζεται με βάση το θετικά σταγονίδια, γεγονός που καθιστά την συγκεκριμένη δοκιμασία μια αξιόπιστη μέθοδο για την ποσοτικοποίηση του ιικού φορτίου καθώς παρέχει ακριβή αριθμό αντιγράφων DNA και RNA του ιού. (25).

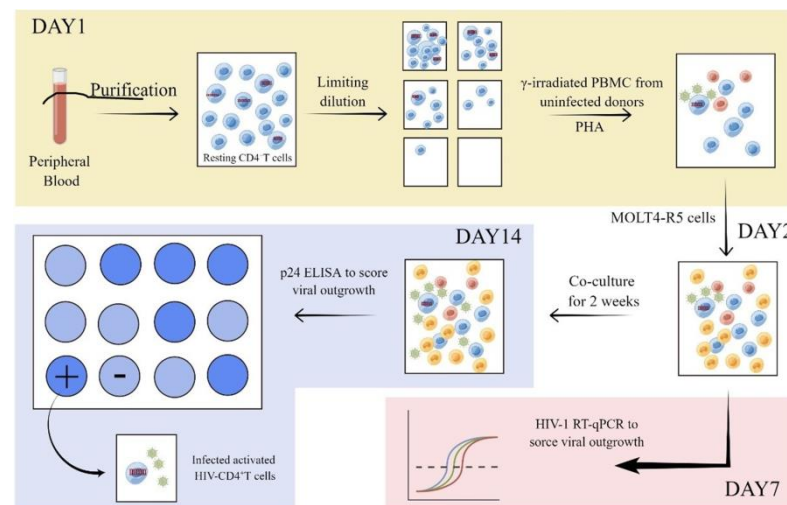
Για την μέτρηση του ιικού φορτίου χρησιμοποιείται κατά βάση η τεχνολογία της qRT-PCR ωστόσο το RNA του ιού μπορεί να προέλθει από διαφορετικές αφετηρίες. Η qRT-PCR αποτελεί μια μέθοδο η οποία συνεισφέρει στην ποσοτικοποίηση του ιικού φορτίου του ιού HIV όπου αυτό έχει απομονωθεί από in vitro καλλιέργειες του ιού (26).

Δοκιμασίες βασισμένες στην in vitro καλλιέργεια του ιού:

ο **Ποσοτική δοκιμασία ιογενούς ανάπτυξης (QVOA- Quantitative Viral Outgrowth Assay)** (25). Πρόκειται για μια ποσοτική δοκιμασία ανάπτυξης που χρησιμοποιήθηκε πρώτη φορά το 1990, η οποία χρησιμοποιήθηκε για την μέτρηση μολυσμένων από HIV-1 κυττάρων που βρίσκονται στην λανθάνουσα φάση ανιχνεύοντας την ανάπτυξη αυτών των μολυσμένων κυττάρων ανά εκατομμύρια κύτταρα (IUMP-Infectious Units Per Million cells) (27). Η μέτρηση αυτή βασίζεται στην in vitro επανεργοποίηση μολυσμένων CD4+ T κυττάρων τα οποία βρίσκονται σε ηρεμία, μέσω της καλλιέργειας με κύτταρα-στόχους προκειμένου να ενισχύσουν τα απελευθερωμένα ισωμάτια και με ενεργοποιητές προκειμένου να διεγείρουν τα μολυσμένα κύτταρα να απελευθερώσουν τα ισωμάτια. Μετά την επώαση των κυττάρων, η ανάπτυξη του ιού πραγματοποιούνται με την χρήση RT-PCR ειδική για τον HIV-1 (7 ημέρες) ή με ανοσοπροσοφητικό προσδιορισμό της πρωτεΐνης p24 (ELISA, 14 ημέρες) (25). Η συγκεκριμένη δοκιμασία αποτελεί μια ευαίσθητη μέθοδο ωστόσο έχει υψηλό κόστος, είναι χρονοβόρα και απαιτεί μεγάλη χρήση δειγμάτων ( 120-180mL ολικού αίματος).

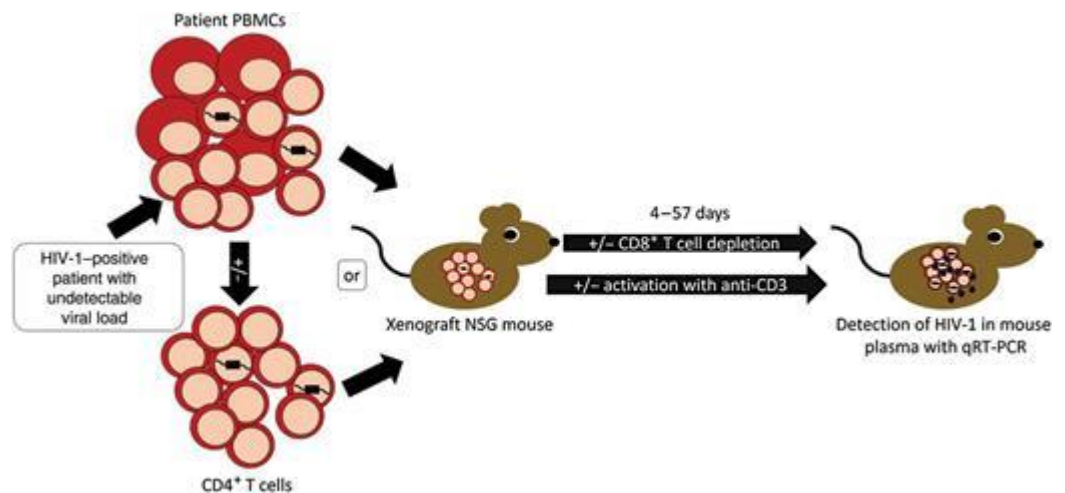


**Εικόνα 9.** Σχήμα πειραματικού σχεδιασμού (27).



**Εικόνα 10.** Σχηματική απεικόνιση μοντέλου QVOA (24).

ο **Δοκιμασία λανθάνουσας ανάπτυξης του ιού βάσει το μοντέλου του ποντικού (MVOA- Murine viral outgrowth assay)**. Η συγκεκριμένη δοκιμασία στόχευε στην ανίχνευση του ιού HIV-1 μέσω της μεταμόσχευσης ανθρώπινων CD4+ T λεμφοκυττάρων σε ποντίκια που είχαν επαρκές ανοσοποιητικό σύστημα. Τα απομονωμένα λεμφοκύτταρα προέρχονταν από άτομα τα οποία λάμβαναν αντιρετροϊκή θεραπεία και για ένα χρόνο είχαν μη ανιχνεύσιμο ιικό φορτίο. Σε ποντίκια λοιπόν με επαρκές ανοσοποιητικό σύστημα, εγχύθηκε μεγάλος αριθμός μονοπύρηνων κυττάρων από το περιφερικό αίμα ή CD4+ T κυττάρων σε ηρεμία από άτομα μολυσμένα με HIV. Τα ποντίκια παρακολουθήθηκαν για ιαμία μετά την εξάντληση των ανθρώπινων CD8+ T κυττάρων προκειμένου να ελαχιστοποιηθεί η αντικτική δράση. Σε ορισμένες περιπτώσεις, τα ποντίκια υποβλήθηκαν επίσης σε θεραπεία με αντίσωμα ενεργοποίησης αντι-CD3. Η ανίχνευση στην συγκεκριμένη δοκιμασία πραγματοποιείται με την εφαρμογή qRT-PCR. Η συγκεκριμένη δοκιμασία έχει υψηλότερη ευαισθησία από την QVOA, ωστόσο έχει υψηλότερο κόστος και η ευαισθησία επηρεάζεται από τον όγκο του πλάσματος (28) (25).

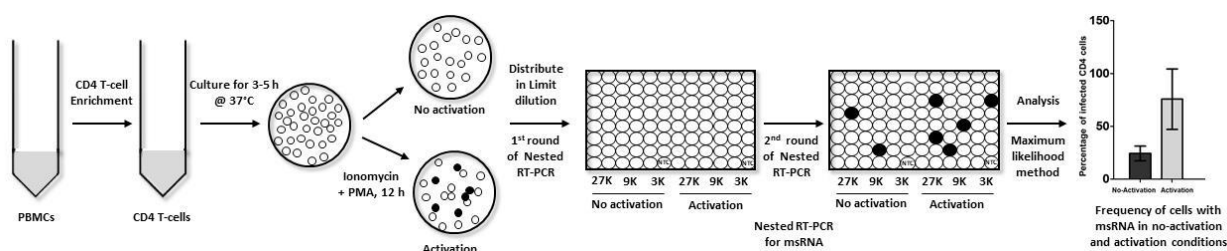


**Εικόνα 11.** Σχηματική απεικόνιση μοντέλου ποντικού MVOA (28).

ο **Προσδιορισμό των πρόδρομων πρωτεϊνών Tat/Rev με σειριακές αραιώσεις (TILDA- Tat/Rev Induced Limiting Dilution Assay)**. Η λανθάνουσα κατάσταση του ιού μπορεί να ρυθμιστεί όχι μόνο στο μεταγραφικό αλλά και σε πολλαπλά μετα-μεταγραφικά επίπεδα όπως είναι το μάτισμα του ιικού RNA. Το διαφορετικό μάτισμα του ιικού RNA δημιουργεί διάφορα είδη mRNA εκ των οποίων εντοπίζονται και τα πλήρως ματισμένα ιικά mRNA (~1.8kb) τα οποία κωδικοποιούν τρεις ιικές πρωτεΐνες Tat, Rev και Nef. Από τις προαναφερθείσες πρωτεΐνες οι Tat και Rev παίζουν κεντρικό ρόλο στον κύκλο ζωής του ιού, με την Tat να είναι ισχυρός ενεργοποιητής της μεταγραφής του ιού και την Rev να ρυθμίζει την εξαγωγή του μη ματισμένου RNA από τον πυρήνα. Η δοκιμασία TILDA αποτελεί ένα νέο προσδιορισμό που βασίζεται σε PCR και αποτελεί μια εναλλακτική προσέγγιση για τον εντοπισμό επανεργοποιημένων HIV-1 προϊόντων που διαθέτουν την ικανότητα πολλαπλασιασμού. Τα CD4+ T κύτταρα απομονώνονται αρχικά από το ολικό αίμα ατόμων με HIV-1 και στην συνέχεια προκαλείται το πολλαπλό μάτισμα και προκύπτουν tat/rev msRNAs (msRNA-multiple sliced RNA). Ύστερα, τα λεμφοκύτταρα



υπόκεινται σε σειριακές αραιώσεις σε πλάκα με 96 φρεάτια όπου έχει εφαρμοστεί το πρωτόκολλο για RT-qPCR επιτρέποντας έτσι την ταυτόχρονα αντίστροφη μεταγραφή και ενίσχυση του tat/rev msRNA. Η δοκιμασία TILDA έχει όριο ανίχνευσης ένα κύτταρο ανά εκατομμύριο CD4+ T κύτταρα τα οποία εκφράζουν tat/rev msRNA. Πρόκειται για μια μέθοδο πιο ακριβή από την PCR, απαιτεί μικρό όγκο αίματος, ωστόσο βασιζόμενοι στην ενίσχυση μόνο των περιοχών tat/rev δεν μπορούν να αναγνωριστούν όλοι οι υπότυποι του HIV (25).



**Εικόνα 12.** Σχηματική απεικόνιση του προσδιορισμού των πρόδρομων πρωτεϊνών Tat/Rev με σειριακές αραιώσεις (29).

## 1.4 Άτομα που ζουν με τον ιό HIV

### 1.4.1 Αντιρετροϊκή θεραπεία - HAART

Η αντιρετροϊκή θεραπεία (HAART- Highly Active Antiretroviral Therapy) άλλαξε το κλινικό προφίλ της HIV λοίμωξης από θανατηφόρα ασθένεια σε χρόνια νόσο. Επειδή η τρέχουσα θεραπεία δεν μπορεί να εξαλείψει την μόλυνση από τον ιό HIV, ο στόχος της αντιρετροϊκής θεραπείας είναι να επιτύχει και να διατηρήσει έναν αριθμό αντιγράφων HIV-RNA στο πλάσμα (ικό φορτίο) σε μη ανιχνεύσιμο επίπεδο χρησιμοποιώντας τις πιο ευαίσθητες διαθέσιμες αναλύσεις (<50 αντίγραφα/mL πλάσματος) (30).

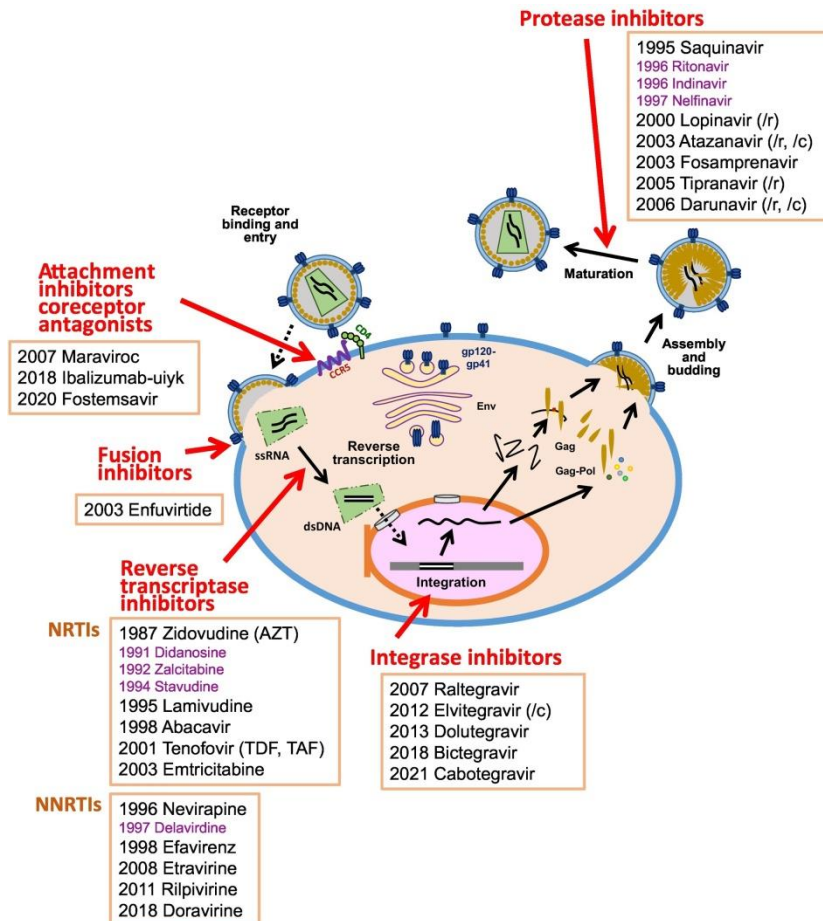
Για την επίτευξη της μείωσης του ικού φορτίου μέχρι αυτό να καθίσταται μη ανιχνεύσιμο, χρησιμοποιούνται αντιρετροϊκά φάρμακα δρουν με διάφορους μηχανισμούς, ενώ στοχεύουν τα διάφορα στάδια της αντιγραφής του HIV. Πιο αναλυτικά τα αντιρετροϊκά φάρμακα δρουν σε διαφορετικά στάδια της αντιγραφής του ιοσωματίου του HIV:

#### 1. Φάρμακα που εμποδίζουν την είσοδο του ιοσωματίου:

- Δέσμευση της γλυκοπρωτεΐνης gp120 του φακέλου του HIV με αποτέλεσμα να εμποδίζεται η προσκόλληση του ιού στα CD4+ T κύτταρα. Το συγκεκριμένο φάρμακο βρέθηκε να είναι αποτελεσματικό σε ασθενείς οι οποίοι εμφάνιζαν πολυανθεκτική λοίμωξη HIV-1 επομένως είχαν και περιορισμένες θεραπευτικές επιλογές (31).
- Αναστολή της δέσμευσης με τον κυτταρικό υποδοχέα CD4. Πρόκειται για ένα μη ανοσοκατασταλτικό εξανθρωπισμένο μονοκλωνικό αντίσωμα με ευρεία ειδικότητα που εξουδετερώνει πολλά στελέχη HIV-1 (31).
- Αλλοστερική ρύθμιση του υποδοχέα CCR5. Πρόκειται για μια μοναδική τεχνολογία αντιρετροϊκού φαρμάκου καθώς στοχεύει μια πρωτεΐνη του ξενιστή (31).
- Η gp41 περιοχή εμπλέκεται στην σύντηξη του περιβλήματος του ιού με την μεμβράνη του κυττάρου στόχου και έχουν σχεδιαστεί φάρμακα που στοχεύουν σε αυτή την περιοχή. Η ενφουβριτιδίδη αποτελεί ένα συνθετικό πεπτιδίδιο 36 αμινοξέων,

όπου αναστέλλει τις διαμορφωτικές αλλαγές που επηρεάζουν το σύμπλεγμα HIV gr120/gr41 και διευκολύνουν την σύντηξη μεταξύ του περιβλήματος του ιού και της μεμβράνης του κυττάρου ξενιστή (31). Επιπλέον, Η ενφουβιριτιδίη αποτελεί το μοναδικό φάρμακο αυτής της κατηγορίας που χορηγείται δύο φορές υποδορίως (30).

- 2. Αναστολείς της Αντίστροφης Μεταγραφάσης:** Δυο κατηγορίες φαρμάκων είναι ενεργές σε αυτό το ένζυμο του ιού. Οι νουκλεοσιδικοί (ή νουκλεοτιδικοί) αναστολείς αντίστροφης μεταγραφάσης (NRTIs-Nucleotide Reverse Transcriptase Inhibitors) και μη νουκλεοσιδικοί αναστολείς αντίστροφης μεταγραφάσης (NNRTIs-Non Nucleotide Reverse Transcriptase Inhibitors) (30). Αυτά τα μόρια εμποδίζουν την μετατροπή του ιικού μονόκλωνου RNA σε δίκλωνο DNA (dsDNA), μόριο απαραίτητο για την ενσωμάτωση στο γονιδιωματικό DNA του ξενιστή. (31).
- 3. Αναστολείς της Πρωτεάσης:** Η πρωτεάση του HIV διασπά τις πρόδρομες πολυπρωτεΐνες του ιού (δηλαδή gag και pol) για να δημιουργήσει τα ώριμα πρωτεϊνικά συστατικά του ιού HIV. Η πρωτεάση HIV-1 αποτελεί ένα ομοδιμερές που περιέχει υπομονάδες 99 αμινοξέων η κάθε μια. Σχεδόν όλοι οι εγκεκριμένοι αναστολείς της πρωτεάσης είναι πεπτιδο-μιμητικά που περιέχουν μη υδρολημένο πυρήνα υδροξυαιθυλενίου αντί για πεπτιδικό δεσμό που διαφορετικά θα διασπώνταν με υδρόλυση (32) (31). Η βιοδιαθεσιμότητα πολλών αναστολέων πρωτεάσης (PIs-Protease Inhibitors) αυξάνεται όταν χορηγούνται μικρές αλλά αποτελεσματικές δόσεις ριτοναβίρης, με αποτέλεσμα αυξημένη ισχύ και πιο βολική δοσολογία. (30).
- 4. Αναστολείς ιντεγκράσης:** Η ιντεγκράση είναι ένα απαραίτητο ένζυμο για την αντιγραφή του ιού του HIV καθώς καταλύει την ομοιοπολική ενσωμάτωση του dsDNA του ιού στο γονιδίωμα του ξενιστή. Ύστερα, τέσσερα πανομοιότυπα αντίγραφα της ιντεγκράσης δεσμεύουν τα δύο άκρα του ιικού DNA δημιουργώντας ένα σταθερό σύμπλεγμα που ονομάζεται ενδόσωμα (intasome). Το ενδόσωμα ενσωματώνεται στο κυτταρικό DNA και πραγματοποιεί αντίδραση ενσωμάτωσης (31). Ο πρώτος αναστολέας ιντεγκράσης που ανακαλύφθηκε ήταν η ραλτεγκραβίρη (raltegravir) ενώ έχουν εγκριθεί από τον FDA (Food and Drug Administration) για κλινική χρήση ακόμα πέντε αναστολείς ιντεγκράσης. Τα συγκεκριμένα εγκεκριμένα φάρμακα δρουν αναστέλλοντας την αντίδραση μεταφοράς του κλώνου της ιντεγκράσης στο γονιδίωμα του ξενιστή και αναφέρονται ως αναστολείς μεταφοράς κλώνου ιντεγκράσης (33) (34).



**Εικόνα 13.** Εγκεκριμένα αντιρετροϊκά φάρμακα και κύκλος αντιγραφής HIV (31).

### 1.4.2 Μελέτες U=U

Τα τελευταία χρόνια, ένας συντριπτικός όγκος κλινικών δοκιμασιών αποδεικνύουν ότι η θεραπεία για τον HIV είναι εξαιρετικά αποτελεσματική στην μείωση της μετάδοσης του ιού και καθιστούν ξεκάθαρο ότι τα άτομα που ζουν με τον ιό του HIV και διατηρούν μη ανιχνεύσιμο ιικό φορτίο -την ποσότητα του HIV στο αίμα- με την λήψη και την τήρηση της αντιρετροϊκής θεραπείας (HAART) δεν μπορούν να μεταδώσουν τον ιό του HIV σεξουαλικά. Τα παραπάνω ευρήματα συνοψίζονται σε μια έννοια που έχει καθιερωθεί τα τελευταία 20 χρόνια, Undetectable=Untransmittable (U=U) σύμφωνα με το Εθνικό Ινστιτούτο Υγείας (NIH-National Institute of Health) (35) (36).

Η ιστορική κλινική δοκιμή HPTN 052 η οποία χρηματοδοτήθηκε από το NIH και περιλάμβανε ετεροφυλόφιλα ζευγάρια εκ των οποίων ο ένας ζούσε με τον ιό του HIV και ο άλλος όχι, έδειξε ότι δεν σημειώθηκαν μεταδόσεις HIV μεταξύ των συντρόφων, όταν ο σύντροφος που ζούσε με τον ιό του HIV είχε ένα διαρκώς κατεσταλμένο ιικό φορτίο. Στην συνέχεια, οι μελέτες PARTNER και Opposites Attract επιβεβαίωσαν αυτά τα ευρήματα και τα επέκτειναν και σε ζευγάρια ανδρών (35).

Ο πρωταρχικός ρόλος της μελέτης PARTNER (Partners of People on ART- A New Evaluation of the Risks) ήταν να παρακολουθήσει ορο-διαφορετικά ζευγάρια, ετεροφυλόφιλα και άνδρες που κάνουν σεξ με άνδρες (MSM-Men having Sex with Men) οι οποίοι πραγματοποιούν διεισδυτική σεξουαλική επαφή χωρίς χρήση προφυλακτικών, στις οποίες

ο θετικός στον ιό σύντροφος λαμβάνει ART και φέρει RNA HIV-1 στο πλάσμα κάτω από 200 αντίγραφα/mL πλάσματος προκειμένου να μελετηθεί ο κίνδυνος μετάδοσης του HIV μέσω πρωκτικού και κολπικού σεξ απουσίας προφυλακτικού. Τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης μελέτης ήταν ότι η εκτίμηση του συνολικού ρυθμού μετάδοσης και του ρυθμού μετάδοσης για το πρωκτικό σεξ ήταν μηδενική (37).

### 1.4.3 Μέτρηση ιικού φορτίου και CD4 + λεμφοκύτταρα

Η χορήγηση αντιρετροϊκής θεραπείας έχει βελτιώσει το προσδόκιμο ζωής των ατόμων που ζουν με τον ιό του HIV καθώς αποσκοπεί στην καταστολή του ιού σε μη ανιχνεύσιμο επίπεδο και την αποκατάσταση του αριθμού των CD4+ λεμφοκυττάρων. Ως επαρκής ανταπόκριση στην θεραπεία ορίζεται η αύξηση του αριθμού των CD4+ κατά 50-150 κύτταρα/ mm<sup>3</sup> τον χρόνο, με την ταχεία αύξηση τους, τους τρεις πρώτους μήνες από την έναρξη της θεραπείας (38).

Το σύνηθες διάστημα εντός του οποίου επιτυγχάνεται η πλήρης καταστολή του ιού είναι περίπου 100 ημέρες. Γενικότερα οι ασθενείς με HIV/AIDS γενικά χρειάζονται περισσότερο χρόνο προκειμένου να φτάσουν έναν φυσιολογικό αριθμό CD4+ κυττάρων σε σύγκριση με τον χρόνο που απαιτείται προκειμένου να επιτύχουν μη ανιχνεύσιμο ιικό φορτίο. Σύμφωνα με τις πιο πρόσφατες οδηγίες του ΠΟΥ, οι ασθενείς οι οποίοι είναι σταθεροί στην ART η παρακολούθηση των CD4+ μπορεί να διακοπεί όταν ο αριθμός τους φτάσει πάνω από 350 κύτταρα/mm<sup>3</sup> και το ιικό φορτίο είναι μικρότερο από 1000 αντίγραφα/mL πλάσματος, στην περίπτωση που και οι δύο εξετάσεις διεξάγονται την ταυτόχρονα (38) (30).

Ωστόσο, ο αριθμός των CD4+ λεμφοκυττάρων παρέχει την καλύτερη άμεση μέτρηση της ανοσολογικής κατάστασης ενός ασθενούς και του κινδύνου για ευκαιριακές λοιμώξεις και αποτελεί σημαντικό εργαλείο στην λήψη διαγνωστικών αποφάσεων, ιδιαίτερα για ασθενείς με προχωρημένη HIV νόσο. Η χρήση του αριθμού των κυττάρων CD4 μπορεί να ανιχνεύσει ανοσοποιητικούς και μη ανταποκρινόμενους ασθενείς με ιογενή καταστολή, δεδομένα που συμβάλλουν στην αξιολόγηση της ανταπόκρισης στην ART (38) (39).

Διακρίνονται τέσσερις τύπου ανοσο-ιολογικών ανταποκρινόμενων στην κλινική πράξη:

1. **Ευνοϊκά ανταποκρινόμενοι:** αύξηση CD4+ και καταστολή ιικού φορτίου (40-60%)
2. **Δυσμενείς ανταποκριτές:** έλλειψη αύξησης αριθμού CD4+ και απουσία ιικής καταστολής (12-27,3%)
3. **Ιολογικές αποκρίσεις:** έλλειψη αύξησης CD4+ παρά την ιική καταστολή (7-48%)
4. **Ανοσολογικές αποκρίσεις:** καλή απόκριση των CD4+ με απουσία ιικής καταστολής (5-18%)

Ο προσδιορισμός της ανταπόκρισης στην θεραπεία αποτελεί κομβικό σημείο για την θεραπεία του ασθενούς, καθώς η ατελής καταστολή του ιικού πολλαπλασιασμού μπορεί να οδηγήσει σε απόκτηση αντοχής στην θεραπεία, σε αυξημένη νοσηρότητα, σε αύξηση του κινδύνου μετάδοσης και σε αύξηση της θνησιμότητας (39).

#### 1.4.4 Αναμενόμενα ιικά φορτία και ART Vs. αποτυχίες ART

Τα αντιρετροϊκά σχήματα που συνιστώνται για αρχική θεραπεία σε ασθενείς με HIV παρουσιάζουν υψηλό ποσοστό επιτυχίας και διατηρούν τα επίπεδα του ιικού RNA στο πλάσμα κάτω από το κατώτατο όριο ανίχνευσης (LLOD-Low Level Of Detection). Οι ασθενείς σε αντιρετροϊκή θεραπεία (ART) που δεν επιτυγχάνουν αυτόν τον θεραπευτικό στόχο ή που παρουσιάζουν ιολογική ανάκαμψη μπορεί να αναπτύξουν μεταλλάξεις αντοχής σε ένα ή περισσότερα συστατικά του σχήματος τους.

Ωστόσο, η τήρηση των αντιρετροϊκών σχημάτων μπορεί να είναι δύσκολη για ορισμένους ασθενείς και η κακή συμμόρφωση μπορεί να οδηγήσει σε ανιχνεύσιμα ιικά φορτία. Οι ακόλουθοι ορισμοί χρησιμοποιούνται για να περιγράψουν τα διαφορετικά επίπεδα ιολογικής απόκρισης στην ART.

- α) **Ιολογική καταστολή:** Επιβεβαιωμένο επίπεδο HIV-RNA κάτω από το LLOD των διαθέσιμων αναλύσεων.
- β) **Ιολογική αποτυχία:** Η αδυναμία επίτευξης ή διατήρησης της καταστολής της αντιγραφής του ιού σε επίπεδα HIV-RNA <200 αντίγραφα/mL πλάσματος.
- γ) **Ατελής ιολογική απόκριση:** Δύο διαδοχικά επίπεδα HIV-RNA στο πλάσμα  $\geq 200$  αντίγραφα/mL πλάσματος μετά από 24 εβδομάδες με σχήμα ART σε ασθενή που δεν έχει ακόμη τεκμηριωμένη ιολογική καταστολή. Το αρχικό επίπεδο HIV-RNA ενός ασθενούς μπορεί να επηρεάσει τη χρονική πορεία της ανταπόκρισης και ορισμένα σχήματα μπορεί να χρειαστούν περισσότερο από άλλα για την καταστολή των επιπέδων HIV-RNA.
- δ) **Ιολογική ανάκαμψη:** Μετά από ιολογική καταστολή, επιβεβαιωμένο επίπεδο HIV-RNA  $\geq 200$  αντίγραφα/mL πλάσματος
- ε) **Ιολογικό στιγμιότυπο:** Μετά την ιολογική καταστολή, ένα απομονωμένο ανιχνεύσιμο επίπεδο HIV-RNA που ακολουθείται από την επιστροφή στην ιολογική καταστολή.
- στ) **Ιαιμία χαμηλού επιπέδου:** Επιβεβαιωμένο ανιχνεύσιμο επίπεδο HIV-RNA <200 αντίγραφα/mL πλάσματος. (40).

#### 1.5 Χαμηλό επίπεδο ιαιμίας

Η μέτρηση του ιικού φορτίου αποτελεί gold standard για την παρακολούθηση της ανταπόκρισης στην αντιρετροϊκή θεραπεία του HIV με στόχο την διαρκή καταστολή της ιαιμίας. Καθώς η πρόσβαση στην παρακολούθηση της ART και ιικού φορτίου έχει αυξηθεί, δεδομένα από διάφορες μετρήσεις ικών φορτίων δείχνουν μια μικρή μειοψηφία ατόμων που ζουν με HIV και λαμβάνουν HAART παρουσιάζουν υψηλά ιικά φορτία και ακόμα λιγότεροι εμφανίζουν φορτία που είναι ανιχνεύσιμα αλλά κάτω από το όριο της ιολογικής αποτυχίας, δηλαδή <200 αντίγραφα/mL πλάσματος.

Η κλινική σημασία και η διαχείριση αυτής της ιαιμίας χαμηλού επιπέδου είναι ένα συνεχές θέμα συζήτησης. Σε ατομικό επίπεδο, η ιαιμία χαμηλού επιπέδου έχει συσχετιστεί με ιολογική ανεπάρκεια, αντίσταση στην αντιρετροϊκή θεραπεία και κατ' επέκταση σε μη ευνοϊκά κλινικά αποτελέσματα (41).

Από την άποψη της δημόσιας υγείας, η ιαιμία χαμηλού επιπέδου μπορεί επίσης να έχει επιπτώσεις στους κινδύνους μετάδοσης ασθενειών και επομένως να επηρεάζει τα μηνύματα για τα άτομα που ζουν με HIV, συμπεριλαμβανομένων και των εκστρατειών μη ανιχνεύσιμο=μη μεταδοτικό, U=U (41). Αν και είναι γενικά αποδεκτό ότι τα φορτία <200 αντίγραφα/mL πλάσματος σχετίζονται με μηδενικό κίνδυνο σεξουαλικής μετάδοσης, ο κίνδυνος για μετάδοση σε επίπεδα ιαιμίας >200 αντίγραφα/mL πλάσματος είναι αμφιλεγόμενος (41).

### 1.5.1 Λοίμωξη χαμηλού επιπέδου ιαιμίας και θεραπεία

Οι ασθενείς οι οποίοι λαμβάνουν αντιρετροϊκή θεραπεία και συνεχίζουν να παρουσιάζουν ιικό φορτίο από 50 έως 1000 αντίγραφα/mL πλάσματος θεωρήθηκαν ασθενείς με επίμονη ιαιμία χαμηλού επιπέδου (pLLV-persistent low-level viremia) (42). Προηγούμενες μελέτες που υποστηρίζουν την παρουσία ενεργού ιικού πολλαπλασιασμού έχουν αναφέρει πως η κατάσταση επίμονης ιαιμίας χαμηλού επιπέδου μπορεί να οδηγήσει σε μεταλλάξεις αντοχής στην αντιρετροϊκή θεραπεία (43).

Πιο συγκεκριμένα αναφέρουν πως η ιολογική ανεπάρκεια είναι πιο πιθανό να εμφανιστεί σε ασθενείς με ιικό φορτίο  $\geq 200$  αντίγραφα/mL πλάσματος από ότι σε αυτούς με χαμηλού επιπέδου ιαιμία δηλαδή από 50 έως 199 αντιγράφων/mL πλάσματος, ενώ άλλες μελέτες έχουν προτείνει ότι η ανιχνεύσιμη ιαιμία σε αυτό το επίπεδο (<200 αντίγραφα/mL πλάσματος) μπορεί να αποτελεί προγνωστικό δείκτη της ιολογικής αποτυχίας. Παρόμοιες μελέτες υποστηρίζουν ότι επίμονο επίπεδο HIV RNA  $\geq 200$  αντίγραφα/mL πλάσματος συχνά σχετίζεται με ενδείξεις ιικής εξέλιξης και συσσώρευσης μεταλλάξεων ανθεκτικότητας στα φάρμακα. Αυξημένη συχνότητα παρατηρείται όταν το επίπεδο HIV RNA είναι >500 αντίγραφα/mL πλάσματος. Επομένως, ασθενείς οι οποίοι έχουν επίμονο επίπεδο HIV RNA  $\geq 200$  αντίγραφα/mL πλάσματος θεωρείται ότι αντιμετωπίζουν ιολογική αποτυχία (40).

### 1.5.2 Κλινική ανταπόκριση

Το χαμηλό επίπεδο ιαιμίας σύμφωνα με την βιβλιογραφία συνδέεται στενά με την συνέπεια και την συμμόρφωση του ασθενή ως προς την αντιρετροϊκή θεραπεία. Ο θεράπων ιατρός του ασθενούς πριν προχωρήσει σε αλλαγή του σχήματος της ART, αποσκοπεί στην καλύτερη συμμόρφωση των ασθενών του με την αντιρετροϊκή τους θεραπεία. (44).

Ωστόσο, υπάρχουν και άλλοι παράγοντες που έχουν συσχετιστεί με την εμφάνιση LLV, όπως ένα αυξημένο ιικό φορτίο πριν από την έναρξη της ART (>10<sup>6</sup> αντίγραφα /mL πλάσματος), μειωμένος αριθμός CD4 λεμφοκυττάρων ή και η παρουσία πρωτογενών μεταλλάξεων αντοχής στα φάρμακα (45).

Ως επίμονη ιαιμία χαμηλού επιπέδου ορίζεται όταν υπάρχουν τουλάχιστον δύο διαδοχικές μετρήσεις ιικού φορτίου <200 αντίγραφα /mL πλάσματος (46). Οι περιπτώσεις LLV με ταυτόχρονη λήψη της ART μπορεί να σχετίζονται με την ανάπτυξη αντοχής στα φάρμακα και κατ' επέκταση την μείωση των θεραπευτικών επιλογών υποδηλώνουν πως η παρακολούθηση της αντοχής πρέπει να ξεκινήσει νωρίτερα προκειμένου να γίνει βελτιστοποίηση της ART. Η παρακολούθηση αυτή, περιλαμβάνει τον προσδιορισμό του γονοτύπου αντοχής σε ασθενείς με επίμονο LLV.

Η διαχείριση των περιστατικών σύμφωνα με επίσημους οργανισμούς:

- **Σύμφωνα με τις οδηγίες του Υπουργείου Υγείας και Ανθρωπίνων Υπηρεσιών των Ηνωμένων Πολιτειών το 2013:**
  - Σε επίμονη αιμία χαμηλού επιπέδου 200-1000 αντίγραφα/mL πλάσματος να πραγματοποιείται διεξαγωγή δοκιμασίας αντίστασης απέναντι στην αντιρετροϊκή θεραπεία.
  - Εξέταση για αλλαγή του σχήματος της ART σε περίπτωση εύρεσης αντοχής
  - Σε περίπτωση που δεν ανιχνευθεί μετάλλαξη αντίστασης, ο θεράπων ιατρός υποψιάζεται μη συμμόρφωση με την θεραπεία. Έτσι συνίσταται η συνέχιση του προηγούμενου σχήματος ART και επανάληψη δοκιμασίας αντοχής σε 2-4 εβδομάδες (46).
- **Σύμφωνα με τις οδηγίες της Βρετανικής Ένωσης HIV το 2012:**
  - Συνίσταται άμεση αλλαγή της θεραπείας ειδικά σε περίπτωση απουσίας αναστολέων πρωτεάσης (46).
- **Σύμφωνα με τις οδηγίες του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας το 2013 (αποκλειστικά για ιική αποτυχία):**
  - Σε περίπτωση επίμονου ιικού φορτίου >1000 αντίγραφα/mL πλάσματος, αξιολογείται η συμμόρφωση του ασθενούς με την ART και πραγματοποιείται επανέλεγχος σε 3-6 μήνες.
  - Σε περίπτωση επίμονου ιικού φορτίου <1000 αντίγραφα/mL πλάσματος, συνεχίζει ο ασθενής το ίδιο σχήμα ART. Εάν σε επόμενη μέτρηση εμφανίσει ικό φορτίο >1000 αντίγραφα/mL πλάσματος πραγματοποιείται αλλαγή του σχήματος (46).

Σε περίπτωση που η επίμονη αιμία χαμηλού επιπέδου δεν οφείλεται σε καμία από τις προαναφερθείσες αιτίες (συμμόρφωση στην θεραπεία, ανθεκτικότητα στα φάρμακα) τότε χρησιμοποιείται μια ο όρος μη κατασταλτική αιμία (NSV-non suppressible viremia). Η συγκεκριμένη ορολογία έχει προταθεί προκειμένου να ορίσει αυτή την κατάσταση, δηλαδή ότι η NSV προκύπτει από την παραγωγή του ιού από ένα ή λίγα κλωνικά κύτταρα τα οποία έχουν μολυνθεί με τον ιό του HIV και συνεχώς επεκτείνονται και όχι από την συνεχή αντιγραφή του ιού του HIV. Αυτός ο υποκείμενος μηχανισμός της αιμίας μπορεί να επηρεάσει ουσιαστικά την κλινική διαχείριση της LLV και εξαιτίας αυτού υπάρχει επιτακτική ανάγκη για τυποποίηση του ορισμού μιας τέτοιας κατάστασης προκειμένου να εξασφαλιστεί η καλύτερη διαχείριση των ασθενών με υποψία NSV (45).

## 2. Πειραματικό Μέρος

### 2.1 Σκοπός

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η μελέτη των περιστατικών χαμηλού επιπέδου ιαμίας (low level viremia) σε άτομα που ζουν με τον ιό HIV-1 και λαμβάνουν αντιρετροϊκή θεραπεία. Τα δείγματα που εξετάστηκαν στο Εθνικό Κέντρο Αναφοράς AIDS Ν. Ελλάδος (Ε.Κ.Α.Α.Ν.Ε) προήλθαν από τις Ειδικές Μονάδες Λοιμώξεων Νοσοκομείων εντός και εκτός Αττικής όπως, ΠΓΝ Αττικών, Γενικό Ογκολογικό Νοσοκομείο Κηφισίας “Οι Άγιοι Ανάργυροι”, Γενικό Νοσοκομείο Νοσημάτων Θώρακος Αθηνών «Η ΣΩΤΗΡΙΑ», Γενικό Νοσοκομείο Αθήνας- Γ. Γεννηματάς και εκτός Αττικής στο ΠΓΝΠ Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Πατρών. Η μέτρηση του ιικού φορτίου πραγματοποιήθηκε με το εμπορικά διαθέσιμο kit Xpert® HIV-1 Viral Load XC της Cepheid σε θερμοκυκλοποιητή I-CORE καθώς και με το εμπορικά διαθέσιμο kit Aptima® HIV-1 Quant Dx Assay του συστήματος του Panther®

### 2.2 Υλικά-Εξοπλισμός

- Πιπέτες (P1000, P200, P20, and P10) και tips με φίλτρο
- Σύστημα GeneXpert®Dx της Cepheid Xpert®
- Δοχείο Ανάλυσης GeneXpert® της Cepheid Xpert®
- Θερμοκυκλοποιητής I-CORE και Applied Biosystems MiniAmp Thermal Cyclers
- Kit Aptima® HIV-1 Quant Dx
- Σύστημα Panther της HOLOGIC®
- Σωληνάρια δείγματος Aptima Sample Aliquot Tube (SAT) της HOLOGIC®
- Φυγόκεντρος (FastGene High Speed Mini Centrifuge)

### 2.3 Συλλογή & Προετοιμασία Δειγμάτων

Για την μέτρηση του ιικού φορτίου χρησιμοποιήθηκαν αιμοληψίες με αντιπηκτικό παράγοντα (EDTA) απ’ όπου και απομονώθηκε το πλάσμα. Το ολικό αίμα φυγοκεντρήθηκε σε 3200rpm για 15 λεπτά και έπειτα απομονώθηκε το υπερκείμενο, δηλαδή το πλάσμα το οποίο μεταφέρθηκε σε ειδικά κρυσταλλίδια χωρητικότητας 2mL. Τα δείγματα φυλάσσονται στους -20°C για σύντομη αποθήκευση ή στους -80°C για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα (47).

### 2.4 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης Πραγματικού Χρόνου (Real Time PCR)

Η ποσοτικοποίηση του ιικού πραγματοποιήθηκε με την χρήση του εμπορικά διαθέσιμου kit Xpert® HIV-1 Viral Load XC της Cepheid. Το παρόν kit περιλαμβάνει αντιδραστήριο το οποίο παρέχει την δυνατότητα απομόνωσης νουκλεϊκού οξέος, αντίστροφης μεταγραφής και πραγματοποίησης Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης Πραγματικού Χρόνου (Real Time PCR) σε μια μόνο εξέταση.

Η πραγματοποίηση της συγκεκριμένης εξέτασης διενεργήθηκε εντός του κυκλοποιητή I-CORE, όπως φαίνεται παρακάτω.

Οι εκκίνητες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν σχεδιασμένοι να υβριδοποιούν της περιοχές του γονιδιώματος HIV-1 που ονομάζονται 5’ long terminal repeats (5’LTR) ανιχνεύοντας



αλληλουχίες των ομάδων M (με τους υπότυπους A,B,C,D,F,G,H,J,K,CRF-A/B, CRF-A/G, CRF-BC, CRF06), O, N και της ομάδας P (47).

#### 2.4.1 Σύστημα GeneXpert® Dx & Δοχείο ανάλυσης GeneXpert®

Το σύστημα της GeneXpert® επιτυγχάνει την αυτοματοποίηση της προετοιμασίας του δείγματος, την ενίσχυση του γενετικού υλικού και την ανίχνευση της επιθυμητής αλληλουχίας-στόχου η οποία στην συνέχεια θα υβριδοποιηθεί με την τεχνική της RT-PCR. Το σύστημα της GeneXpert® περιλαμβάνει το δοχείο ανάλυσης, τον θερμικό κυκλοποιητή GeneXpert GX-IV Instrument, τον σαρωτή γραμμικού κώδικα και τον φορητό Η/Υ όπως αναλύονται παρακάτω:

- Το δοχείο ανάλυσης είναι μιας χρήσης, περιέχει τα αντιδραστήρια για την εκτέλεση της Real Time PCR και σε ειδικό θάλαμο εισάγεται και το δείγμα προς εξέταση.

Πιο συγκεκριμένα κάθε δοχείο ανάλυσης περιέχει τα επιμέρους τμήματα:

1. Θάλαμοι επεξεργασίας: Αποθήκευση του αρχικού δείγματος, των αντιδραστηρίων, του επεξεργασμένου δείγματος και των αποβλήτων. Ξεχωριστός θάλαμος υπεύθυνος για την εξισορρόπηση της πίεσης στο δοχείο ανάλυσης.
  2. Σώμα βαλβίδας: Εξυπηρετεί την περιστροφή των υγρών που βρίσκονται στους θαλάμους εντός του σωληναρίου δοκιμασίας. Το δείγμα εντός του σώματος βαλβίδας παραμένει απομονωμένο, όπου και απενεργοποιούνται οι αναστολείς της PCR και το δείγμα υπόκειται σε λύση μέσω υπερήχων. Έπειτα το δείγμα μεταφέρεται στο σωληνάριο δοκιμασίας αναμιγμένο με τα αντιδραστήρια.
  3. Σωληνάριο δοκιμασίας: Ενεργοποιεί την γρήγορη θερμική κυκλοποίηση και την οπτική ανίχνευση του περιεχομένου του σωληναρίου. Με την είσοδο του δοχείου ανάλυσης στο θερμικό κυκλοποιητή, το σωληνάριο δοκιμασίας εισάγεται αυτόματα στην είσοδο I-CORE.
- Θερμικός κυκλοποιητής GeneXpert GX-IV Instrument: Στο εμπόριο υπάρχουν διαθέσιμα μοντέλα διαφόρων χωρητικότητων, ωστόσο στην παρούσα πειραματική διαδικασία χρησιμοποιήθηκε κυκλοποιητής τεσσάρων θέσεων, όπου σε κάθε θέση εισάγεται ένα δοχείο ανάλυσης που αντιστοιχεί σε ένα μόνο δείγμα ποσότητας 1,8mL.



**Εικόνα 14.** Κυκλοποιητής I-CORE της Cepheid (47).

- Φορητός ηλεκτρονικός υπολογιστής: όπου είναι εγκατεστημένο το λογισμικό της GeneXpert<sup>®</sup> για την μέτρηση του ιικού φορτίου της λοίμωξη HIV-1 καθώς και την βάση δεδομένων των αποτελεσμάτων

#### 2.4.2 Απομόνωση Νουκλεϊκού Οξέος

Προκειμένου να απομονωθεί το ικό γονιδίωμα (ριβονουκλεϊκό οξύ, RNA) από το εξεταζόμενο πλάσμα χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω αντιδραστήρια:

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

Για την απομόνωση νουκλεϊκού οξέος χρησιμοποιήθηκε μάρτυρας επάρκειας όγκου του δείγματος (Sample Volume Adequacy, SVA) ο οποίος ελέγχει και επιβεβαιώνει, εάν πραγματοποιήθηκε προσθήκη του σωστού όγκου πλάσματος με κατάλληλο τόπο στο δοχείο ανάλυσης (48).

#### 2.4.3 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης Αντίστροφης Μεταγραφής (RT-PCR)

Η μετατροπή του ιικού RNA σε συμπληρωματικό DNA (complementary DNA, cDNA) πραγματοποιείται με την χρήση της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης Αντίστροφης Μεταγραφής. Έπειτα, το μόριο cDNA που έχει προκύψει υπόκεινται σε Αλυσιδωτή Αντίδρασης Πολυμεράσης Πραγματικού Χρόνου. Προκειμένου να πραγματοποιηθεί η παραπάνω διαδικασία εντός του θαλάμου επεξεργασίας του δοχείου ανάλυσης του kit περιέχονταν: οι εκκινητές, το ρυθμιστικό διάλυμα, ιόντα μαγνησίου, δεοξυριβονουκλεοτίδια και το ένζυμο της αντίστροφης μεταγραφάσης (48).

Στην συγκεκριμένη αντίδραση προκειμένου να υπολογισθεί η συγκέντρωση του HIV-1 RNA και να ποσοτικοποιηθεί χρησιμοποιείται ένα εσωτερικό πρότυπο ελέγχου (Internal Quantitative Standard High and Low IQS-H and IQS-L). Τα IQS-H και IQS-L πρότυπα ελέγχου

έχουν βαθμονομηθεί με βάση τις οδηγίες του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (WHO) και χρησιμεύουν στην πρόβλεψη μιας πιθανής αποτυχίας της RT-PCR (48).

#### **2.4.4 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης Πραγματικού Χρόνου (Real Time PCR)**

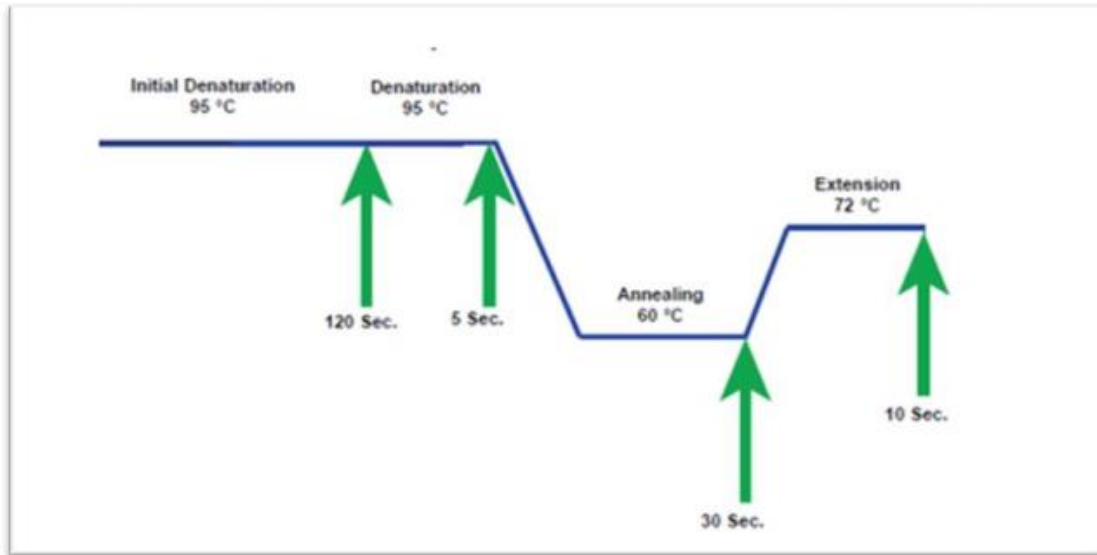
Κατά την διάρκεια της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης Πραγματικού Χρόνου η ποσότητα του cDNA που ενισχύεται μπορεί να οπτικοποιηθεί και να υπολογισθεί με την χρήση ειδικών φθορίζουσών ουσιών οι οποίες είναι προσδεδεμένες σε ειδικούς ανιχνευτές (probes). Ωστόσο, πέρα από την φθορίζουσα χρωστική, στους ειδικούς ανιχνευτές είναι προσδεδεμένη και μια ουσία που απορρόφα την εκπομπή φθορισμού της χρωστικής (quencher) (48).

Πιο συγκεκριμένα, η οπτικοποίηση της ενίσχυσης πραγματοποιείται μέσω της πρόσδεσης του ανιχνευτή στην αλληλουχία στόχο μέσω της τεχνολογίας της 5' νοκλεάσης, καθοδικά του εκκινήτη, με αποτέλεσμα να αυξάνει ταυτόχρονα και την ευαισθησία της μεθόδου. Κατά την επιμήκυνση της επιθυμητής αλληλουχίας του DNA η αλληλουχία του ανιχνευτή που έχει υβριδοποιήσει την αλληλουχία στόχο καταστρέφεται και απελευθερώνονται οι δυο ουσίες που ήταν προσδεδεμένες σε αυτόν, η φθορίζουσα αλλά και αυτή που απορροφά την εκπομπή φθορισμού. Η απελευθέρωση του σήματος της χρωστικής επιτρέπει την μέτρηση του σε πραγματικό χρόνο ενώ η εκπομπή του σήματος είναι ανάλογη του αριθμού των αντιγράφων που παράγονται κατά τον πολλαπλασιασμό επιτυγχάνοντας με αυτόν τον τρόπο την ποσοτικοποίηση του ιικού φορτίου (48).

Πριν ξεκινήσει η εξέταση, πραγματοποιείται ο έλεγχος των ανιχνευτών (Probe Check Control, PCC) προκειμένου να διασφαλίσει ότι το ολικό σύστημα της GeneXpert λειτουργεί κατάλληλα έτσι ώστε να ολοκληρωθεί η αντίδραση. Για αυτό το λόγο ελέγχονται το σήμα φθορισμού, η ενυδάτωση των αντιδραστηρίων τα οποία βρίσκονται υπό την μορφή σφαιριδίων, η πλήρωση του σωληναρίου δοκιμασίας και η ακεραιότητα του ανιχνευτή φθορισμού (48).

Τα βήματα της Αλυσιδωτής Αντίδραση Πολυμεράσης Πραγματικού Χρόνου είναι τα ακόλουθα:

1. Αρχική αποδιάταξη του δίκλωνου μορίου cDNA με αύξηση της θερμοκρασίας στους 95°C για 120 δευτερόλεπτα. Πραγματοποιείται μόνο μια φορά στην αρχή του πειράματος.
2. Αποδιάταξη στους 95°C για πέντε δευτερόλεπτα.
3. Υβριδοποίηση των εκκινήτων στους 60°C για τριάντα δευτερόλεπτα.
4. Επιμήκυνση της πολυνουκλεοτιδικής αλυσίδας στους 72°C για 10 δευτερόλεπτα.



**Εικόνα 15.** Αναπαράσταση της θερμικής κυκλοποίησης με αύξηση και μείωση της θερμοκρασίας για την αποδιάταξη του δίκλωνου μορίου cDNA, τον υβριδισμό και την επιμήκυνση των εκκινητών με σκοπό την σύνθεση νέας αλυσίδας DNA.

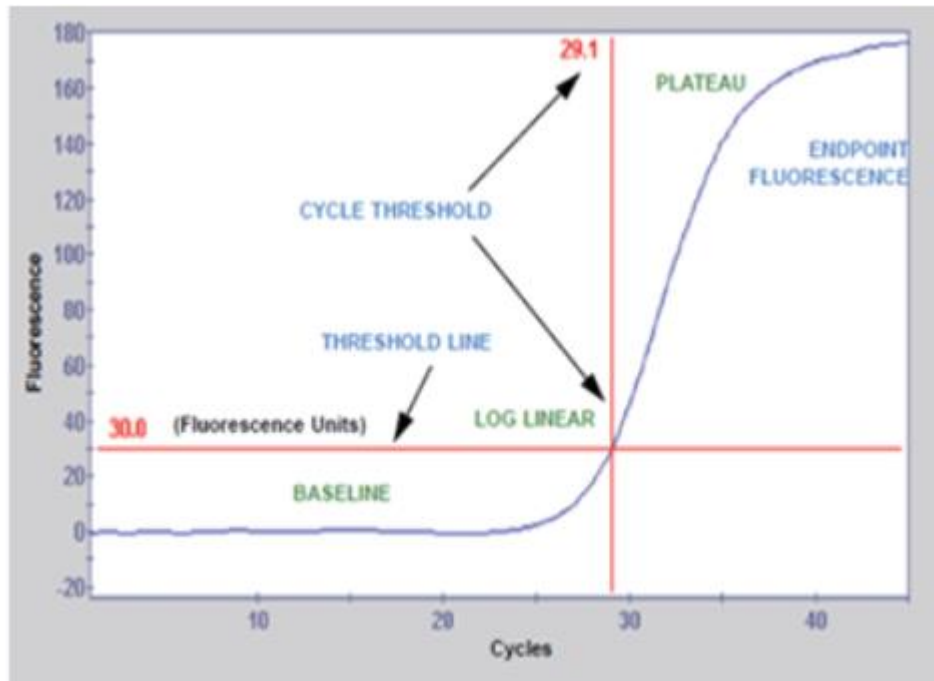
Τα βήματα 2 έως 4 επαναλαμβάνονται για 40 θερμικούς κύκλους

Η Real Time PCR για την ανίχνευση του συνόλου των αντιγράφων cDNA που παράγονται χρησιμοποιεί τον φθορισμό. Αυτό επιτρέπει την παρακολούθηση της πορείας της εξέτασης σε πραγματικό χρόνο.

Ο θερμικός κύκλος κατά τον οποίο το σήμα φθορισμού καθίσταται ανιχνεύσιμο ονομάζεται κατώφλι (cycle threshold, Ct). Σε αυτό το σημείο αρχίζει να αυξάνει η καμπύλη ανάπτυξης, εφόσον το ιικό φορτίο του HIV-1 είναι ανιχνεύσιμο, απαραίτητη για την ποσοτικοποίηση του ιικού φορτίου. Το σήμα του φθορισμού είναι ανάλογο του αριθμού των αντιγράφων της αλληλουχίας στόχου που έχουν παραχθεί κατά την κυκλοποίηση. Όταν το ολικό mRNA που εμπεριέχεται στο πλάσμα έχει μεταγραφεί σε cDNA και έχουν ολοκληρωθεί τα βήματα που αναφέρθηκαν παραπάνω προκείμενου να μετατραπεί σε δίκλωνο μόριο DNA, τότε η καμπύλη ανάπτυξης αρχίζει να γίνεται ευθύγραμμη. Με αυτό τον τρόπο καθορίζεται το αποτέλεσμα σε αριθμό αντιγράφων του γενετικού υλικού ανά mL πλάσματος (copies/mL) (48).

Τα αποτελέσματα της παραπάνω διαδικασίας αποτυπώνονται σε ένα διάγραμμα όπου αναγράφονται :

- κύκλοι αντιγραφής στο άξονα x
- φθορισμός στον άξονα y



**Εικόνα 16.** Καμπύλη ανάπτυξης Real -time RT-PCR

#### 2.4.5 Ερμηνεία Αποτελεσμάτων

Το όριο ανίχνευσης (Limit Of Detection, LOD) για την συγκεκριμένη εξέταση Real-Time RT-PCR αποτελεί το όριο πάνω από το οποίο το HIV-1 RNA γίνεται ανιχνεύσιμο. Ως LOD της εξέτασης ορίζονται τα 13,6 copies/mL πλάσματος. Το όριο ποσοτικοποίησης (Limit Of Qualification, LOQ) αποτελεί το όριο πάνω από το οποίο το HIV-RNA είναι ανιχνεύσιμο και ικανό να ποσοτικοποιηθεί. Το LOQ της εξέτασης ορίζεται στα 40 copies/mL πλάσματος.

Σύμφωνα με τα LOD και LOQ προκύπτουν τα εξής αποτελέσματα:

- ✓ Θετικό αποτέλεσμα-ακριβής αριθμός copies/mL πλάσματος. Το HIV-1 RNA είναι ανιχνεύσιμο και ποσοτικοποιήσιμο και βρίσκεται εντός του εύρους αναλυτικών μετρήσεων, ταυτόχρονα η καμπύλη βρίσκεται πάνω από το Ct.
- ✓ Θετικό αποτέλεσμα-ικό φορτίο  $> 1 \times 10^7$  copies/mL πλάσματος. Το HIV-1 RNA είναι ανιχνεύσιμο, αλλά μη ποσοτικοποιήσιμο και βρίσκεται πάνω από το εύρος των αναλυτικών μετρήσεων.
- ✓ Θετικό αποτέλεσμα-ικό φορτίο  $<40$  copies/mL πλάσματος. Το HIV-1 RNA είναι ανιχνεύσιμο, ωστόσο βρίσκεται κάτω του εύρους των αναλυτικών μετρήσεων, ταυτόχρονα η καμπύλη παραμένει κάτω από το Ct, επομένως το ικό φορτίο είναι μη ποσοτικοποιήσιμο και δεν είναι εφικτό να δοθεί ακριβής απάντηση για τον αριθμό των αντιγράφων/mL πλάσματος.
- ✓ Αρνητικό αποτέλεσμα-ικό φορτίο  $<13,6$  copies/mL πλάσματος, δηλαδή είναι μη ανιχνεύσιμο.

## 2.5 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης Πραγματικού Χρόνου- Ενίσχυση μέσω Μεταγραφής (Real Time - TMA)

Το εμπορικά διαθέσιμο kit της Artima® HIV-1 Quant Dx αποτελεί μια in vitro δοκιμασία ενίσχυσης νουκλεϊκού οξέος που στοχεύει στην ανίχνευση και την ποσοτικοποίηση του ιού HIV-1 εντός του πλήρως αυτοματοποιημένου συστήματος του Panther®.



**Εικόνα 17.** Αυτοματοποιημένο σύστημα Panther® (49).

Η συγκεκριμένη ανάλυση ποσοτικοποιεί τις ομάδες RNA του HIV-1 M,N και O σε εύρος από 30 έως 10.000.000 copies/mL πλάσματος. Πιο συγκεκριμένα, χρησιμοποιεί πολλαπλούς εκκινητές οι οποίοι στοχεύουν σε δύο περιοχές του γονιδιώματος του HIV-1 προκειμένου να αντισταθμίσουν το υψηλό ποσοστό μεταλλάξεών του. Στοχεύει δηλαδή στις περιοχές του γονιδιώματος ροΙ και LTR ανεξάρτητα. Οι αλληλουχίες αυτές συμβάλλουν στην ανίχνευση αλληλουχιών στις ομάδες M, N και O.

Η ανάλυση της της Artima® HIV-1 Quant Dx περιλαμβάνει τρία κύρια βήματα, τα οποία λαμβάνουν χώρα σε μεμονωμένους σωλήνες εντός του συστήματος του Panther®. Τα βήματα είναι τα εξής:

- ✓ Εντοπισμός Στόχου (Target Capture)
- ✓ Ενίσχυση στόχου με ενίσχυση μέσω μεταγραφής (TMA)
- ✓ Ανίχνευση των προϊόντων ενίσχυσης (amplicons) με σημασμένους φθορίζοντες ανιχνευτές.

### 2.5.1 Συλλογή Δείγματος για το σύστημα Panther®

Η συνθήκες διατήρησης του ολικού αίματος είναι οι αντίστοιχες με τα παραπάνω και στην συγκεκριμένη δοκιμασία. Ωστόσο, ύστερα από την μεταφορά του φυγοκεντρημένο πλάσματος στα κρυοφιαλίδια, πραγματοποιείται μεταφορά 700μL πλάσματος σε δευτερεύοντα φιαλίδια (Artima Sample Aliquot Tube-SAT) προκειμένου να είναι διαθέσιμα τα 500μL που απαιτούνται για την πειραματική διαδικασία. Με βάση τις οδηγίες του kit της Artima® HIV-1 Quant Dx, εφόσον γίνεται χρήση των SAT σωληναρίων απαιτούνται 0,2mL όγκου περίσσειας (dead volume) για αυτό και πραγματοποιείται μεταφορά 700μL.

Σε περίπτωση που δεν πραγματοποιηθεί απευθείας η πειραματική διαδικασία, τα σωληνάρια SAT που περιέχουν πλάσμα μπορούν να αποθηκευθούν στους  $-20^{\circ}\text{C}$  για σύντομη αποθήκευση ή στους  $-80^{\circ}\text{C}$  για μακροχρόνια φύλαξη (50).

### 2.5.2 Εντοπισμός Στόχου (Target Capture)

Κατά τον εντοπισμό του στόχου πραγματοποιείται απομόνωση των ιικών νουκλεϊκών οξέων από τα δείγματα. Το δείγμα υφίσταται επεξεργασία με απορρυπαντικό προκειμένου να διαλυτοποιηθεί το περίβλημα του ιού, να μετουσιωθούν οι πρωτεΐνες και ύστερα να απελευθερωθεί το ιικό γονιδιωματικό RNA. Τα ολιγονουκλεοτίδια σύλληψης (capture oligonucleotides) αναγνωρίζουν και υβριδοποιούν εξαιρετικά διατηρημένες περιοχές του ιικού γονιδιώματος του HIV-1 (target RNA) εφόσον υπάρχει στο δείγμα προς εξέταση. Αφού ολοκληρωθεί η υβριδοποίηση, η υβριδοποιημένη αλληλουχία στόχος προσκολλάται με τις συμπληρωματικές αλληλουχίες που διαθέτουν τα μαγνητικά μικροσωματίδια. Προκειμένου να γίνει διαχωρισμός της επιθυμητής αλληλουχίας από άλλες αλληλουχίες μη επιθυμητές, θραύσματα ή και πιθανούς αναστολείς ακλουθεί πλύση για την απομάκρυνση μη επιθυμητών συστατικών από το σωλήνα της αντίδρασης (50).

### 2.5.3 Ενίσχυση στόχου με ενίσχυση μέσω μεταγραφής (TMA)

Η ενίσχυση της αλληλουχίας στόχου λαμβάνει χώρα μέσω της μεταγραφής TMA (Transcription-Mediated Amplification). Για την μέθοδο ενίσχυσης χρησιμοποιούνται δύο ένζυμα:

- Αντίστροφη μεταγραφάση, η οποία έχει απομονωθεί από την ιό της λευχαιμίας των ποντικών Moloney (MMLV)
- T7 RNA πολυμεράση

Η αντίστροφη μεταγραφάση χρησιμοποιείται προκειμένου να δημιουργήσει ένα αντίγραφο cDNA της αλληλουχίας στόχου, το οποίο θα περιέχει και ένα κατάλληλο εκκινητή (promoter sequence) για την T7 RNA πολυμεράση. Η T7 RNA pol με την διαδικασία της μεταγραφής παράγει πολλά αντίγραφα αμπλικονίου RNA χρησιμοποιώντας σαν καλούπι το πρότυπο αντίγραφο cDNA. Η ανάλυση της Artima<sup>®</sup> HIV-1 Quant Dx χρησιμοποιεί την μέθοδο TMA προκειμένου να ενισχύσει δύο περιοχές του HIV-1 RNA (pol και LTR). Από κάθε ενισχυμένη περιοχή παράγεται ένα ανεξάρτητο σήμα, χρησιμοποιώντας ειδικούς εκκινητές οι οποίοι έχουν σχεδιαστεί προκειμένου να ενισχύσουν τον ιό του HIV-1 των ομάδων M με υπότυπους (A,B,C,D,F,G,CRF01\_AE, CRF02\_AG) N και O (50).

### 2.5.4 Ανίχνευση των προϊόντων ενίσχυσης (amplicons) με σημασμένους φθορίζοντες ανιχνευτές.

Κατά την διάρκεια της διαδικασίας TMA η ανίχνευση των επιθυμητών αλληλουχιών των RNA amplicons εντός του δείγματος επιτυγχάνεται με την χρήση μονόκλωνων νουκλεϊκών οξέων που φέρουν ειδικές φθορίζουσες ουσίες και λειτουργούν ως ανιχνευτές (probes) καθώς επίσης και μια ακόμη ουσία που απορροφά τον φθορισμό (quencher). Κάθε ανιχνευτής είναι εξειδικευμένος να υβριδοποιεί τα RNA αμπλικόνια επιτρέποντας τον υπολογισμό της εκπομπής της χρωστικής σε πραγματικό χρόνο. Όταν ο ανιχνευτής δεν υβριδοποιηθεί με την αλληλουχία στόχο τότε η φθορίζουσα ουσία βρίσκεται σε κοντινή απόσταση από την ουσία quencher (σχήμα φουρκέτας) με αποτέλεσμα να απορροφά την εκπομπή φθορισμού της χρωστικής. Ωστόσο, όταν ο ανιχνευτής υβριδοποιήσει την

αλληλουχία στόχο τότε οι δύο ουσίες απομακρύνονται και η χρωστική εκπέμπει σήμα σε συγκεκριμένο μήκος κύματος. Όσο περισσότερα RNA αμπλικόνια τόσο μεγαλύτερο σήμα εκπέμπεται.

Ο χρόνος που απαιτείται προκειμένου το σήμα φθορισμού να φτάσει σε ένα συγκεκριμένο κατώφλι (tTime- threshold Time) είναι ανάλογος της αρχικής συγκέντρωσης του HIV-1 στο δείγμα.

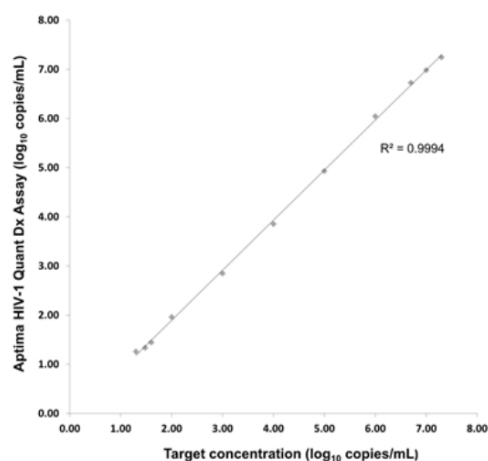
Κάθε δοκιμασία διαθέτει ένα εσωτερικό βαθμονομητή/ εσωτερικό μάρτυρα (internal control, IC ) όπου είναι υπεύθυνος για τον έλεγχο πιθανών διακυμάνσεων στην επεξεργασία, στην ενίσχυση και στην ανίχνευση του δείγματος. Για την ποσοτικοποίηση της αρχικής συγκέντρωσης του δείγματος, χρησιμοποιείται ο χρόνος που απαιτείται για να φτάσει το κατώφλι για τις δύο περιοχές του HIV-1 γονιδιώματος (pol και LTR) (50).

### 2.5.5 Ερμηνεία Αποτελεσμάτων

Το σύστημα του Panther<sup>®</sup> περιλαμβάνει βαθμονομητές (qHIV-1 positive calibrator) και μάρτυρες (qHIV-1 low positive control, qHIV-1 high positive control, and qHIV-1 negative control) οι οποίοι εξασφαλίζουν την αξιοπιστία της δοκιμασίας και των αποτελεσμάτων. Για την εξαγωγή έγκυρων αποτελεσμάτων, ο θετικός βαθμονομητής (qHIV-1 positive calibrator) θα υπολογισθεί εις τριπλούν κάθε φορά που χρησιμοποιείται ένα νέο kit αντιδραστηρίων και στην συνέχεια θα πραγματοποιηθεί τρέξιμο και των τριών control (high positive, low positive and negative control). Κάθε δείγμα έχει έναν εσωτερικό βαθμονομητή (IC-Internal Control), όπου με την σειρά του διασφαλίζει την ορθότητα των αποτελεσμάτων, αφού σε περίπτωση άκυρης (invalid) μέτρησης το δείγμα απαιτεί επανεξέταση για την εξαγωγή της σωστής μέτρησης.

Η ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων του συστήματος του Panther<sup>®</sup> αξιολογείται με την χρήση πλάσματος ως δείγμα ενώ για ποιοτικά αποτελέσματα μπορεί να χρησιμοποιηθεί δείγμα πλάσματος αλλά και ορού. Για τον καθορισμό της συγκέντρωσης του HIV-1 σε copies/mL το ανάλογο γράφημα το οποίο αποτελεί συνάρτηση:

- **log<sub>10</sub> copies/mL στον άξονα του y**
- **συγκέντρωση HIV-1 RNA (log<sub>10</sub> copies/mL) στον άξονα του x**



Εικόνα 18. Γραμμικότητα της δοκιμασίας Quant Dx Aptima HIV-1 (50).



Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, το kit της Aptima® HIV-1 Quant Dx στοχεύει σε δύο περιοχές του HIV-1 γονιδιώματος (pol και LTR). Ωστόσο η αναγραφόμενη συγκέντρωση του HIV-1 βασίζεται στην ενίσχυση της pol περιοχής, εκτός και αν δεν έχει πραγματοποιηθεί ενίσχυση, όπου σε αυτή την περίπτωση τα αποτελέσματα δίνονται με βάση την ενίσχυση της περιοχής LTR.

Το όριο ανίχνευσης (Limit Of Detection, LOD) αποτελεί το όριο πάνω από το οποίο το HIV-1 RNA γίνεται ανιχνεύσιμο. Ως LOD της εξέτασης ορίζονται τα 12 copies/mL στο πλάσμα και 8,9 copies/mL στον ορό. Το όριο ποσοτικοποίησης (Limit Of Qualification, LOQ) αποτελεί το όριο πάνω από το οποίο το HIV-RNA είναι ανιχνεύσιμο και ικανό να ποσοτικοποιηθεί. Το LOQ της εξέτασης ορίζεται στα 30 copies/mL πλάσματος.

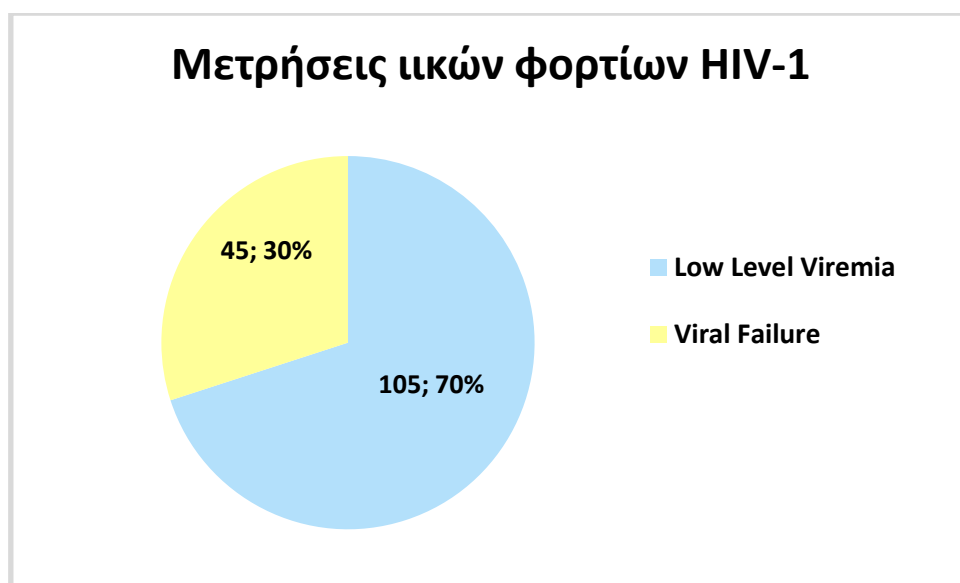
Το σύστημα του Panther® εξάγει με βάση τα παραπάνω τα εξής αποτελέσματα τα οποία απαιτούν ποιοτική ερμηνεία από τον χρήστη:

- ✓ Αρνητικό Αποτέλεσμα- ικό φορτίο <12 copies/mL πλάσματος, δηλαδή το RNA είναι μη ανιχνεύσιμο
- ✓ Θετικό Αποτέλεσμα-ικόν φορτίο < 30 copies/mL πλάσματος (ή < 1,47 log<sub>10</sub>copies/mL). Το HIV-1 RNA είναι ανιχνεύσιμο αλλά μη ποσοτικοποιήσιμο καθώς βρίσκεται κάτω από το κατώτατο όριο ποσοτικοποίησης (LLoQ-Low Level of Quantification), έτσι δεν είναι δυνατό να δοθεί ακριβής αριθμός των αντιγράφων/ mL πλάσματος.
- ✓ Θετικό Αποτέλεσμα - ικό φορτίο εντός του εύρους 30-10<sup>7</sup> copies/mL πλάσματος (ή 1,47-7,00 log<sub>10</sub>copies/mL). Το HIV-1 RNA είναι ανιχνεύσιμο και ποσοτικοποιήσιμο καθώς η συγκέντρωση του βρίσκεται εντός του γραμμικού εύρους των ποσοτικοποιήσιμων συγκεντρώσεων.
- ✓ Θετικό Αποτέλεσμα - ικό φορτίο >10<sup>6</sup>copies/mL πλάσματος (ή >7,00 log<sub>10</sub>copies/mL) Το HIV-1 RNA είναι ανιχνεύσιμο αλλά μη ποσοτικοποιήσιμο καθώς η συγκέντρωση του βρίσκεται πάνω από το ανώτατο όριο ποσοτικοποίησης (ULoQ-Upper Level of Quantification), έτσι δεν είναι δυνατό να δοθεί ακριβής αριθμός των αντιγράφων HIV-1 RNA.

### 3. Αποτελέσματα

Στην συγκεκριμένη εργασία για το διάστημα 01/07/2023 έως 31/06/2024 πραγματοποιήθηκαν 2910 μετρήσεις ιικού φορτίου εκ των οποίων οι 2813 αντιστοιχούν σε άτομα που λαμβάνουν αντιρετροϊκή θεραπεία. Από τις 2813, οι 150 μετρήσεις εντοπίζονταν εντός του εύρους 40-1000 αντίγραφα/mL πλάσματος και αντιστοιχούν σε άτομα που λαμβάνουν αντιρετροϊκή θεραπεία. Προκειμένου να συμπεριληφθούν στην συγκεκριμένη μελέτη τα παραπάνω περιστατικά χρησιμοποιήθηκε ως κριτήριο το ιικό φορτίο το οποίο παρουσίαζαν, να ανήκει στο εύρος από 40 έως <200 αντίγραφα/mL πλάσματος. Όπως έχει ήδη συζητηθεί στο κεφάλαιο της εισαγωγής το συγκεκριμένο εύρος ιικού φορτίου αναφέρεται ως χαμηλό επίπεδο ιαιμίας (LLV-Low Level Viremia). Τα δείγματα τα οποία εμφάνισαν ιικό φορτίο >200 αντίγραφα/mL πλάσματος κατατάσσονται, όπως έχει αναφερθεί στην εισαγωγή, στις ικές αποτυχίες. Επιπλέον, οι μετρήσεις οι οποίες θα ληφθούν υπόψη στην συγκεκριμένη μελέτη δεν θα πρέπει να αποτελούν αρχικό εργαστηριακό έλεγχο καθώς η μελέτη αφορά άτομα τα οποία έχουν ήδη διαγνωστεί και λαμβάνουν αντιρετροϊκή θεραπεία.

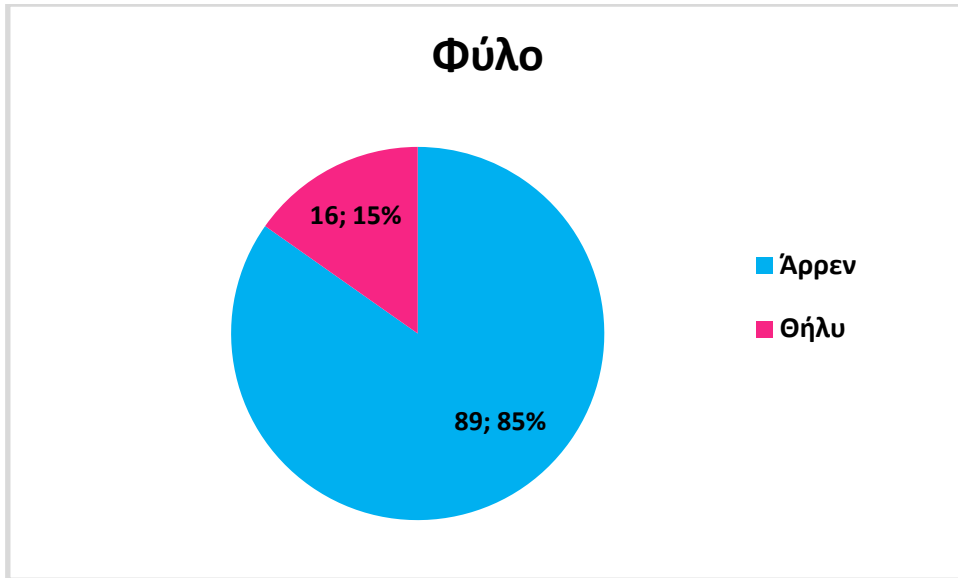
Με βάση τα παραπάνω δεδομένα στην έρευνα συμπεριλαμβάνονται 150 δείγματα, εκ των οποίων τα 105 δείγματα αφορούν μετρήσεις χαμηλού επιπέδου ιαιμίας και τα υπόλοιπα 45 δείγματα αποτελούν ικές αποτυχίες, όπως παρουσιάζονται στο **Γράφημα 1**.



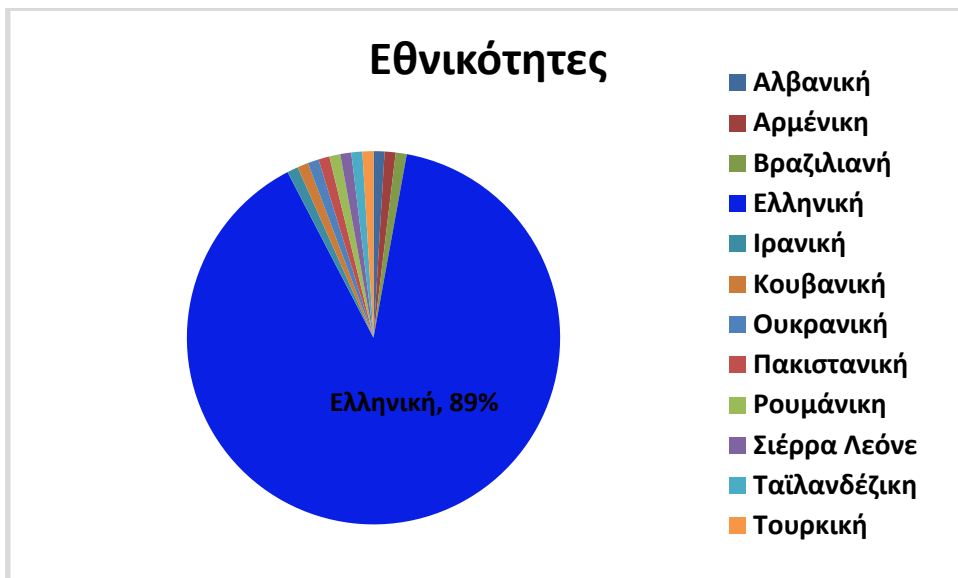
**Γράφημα 1.** Συνολικές μετρήσεις ιικού φορτίου εντός του εύρους 40-1000αντίγραφα/mL πλάσματος.

Δεδομένου ότι, η συγκεκριμένη μελέτη αφορά μετρήσεις χαμηλού επιπέδου ιαιμίας τα παρακάτω γραφήματα σχεδιάζονται με βάση τα 105 δείγματα που ανήκουν στο εύρος των low level viremia.

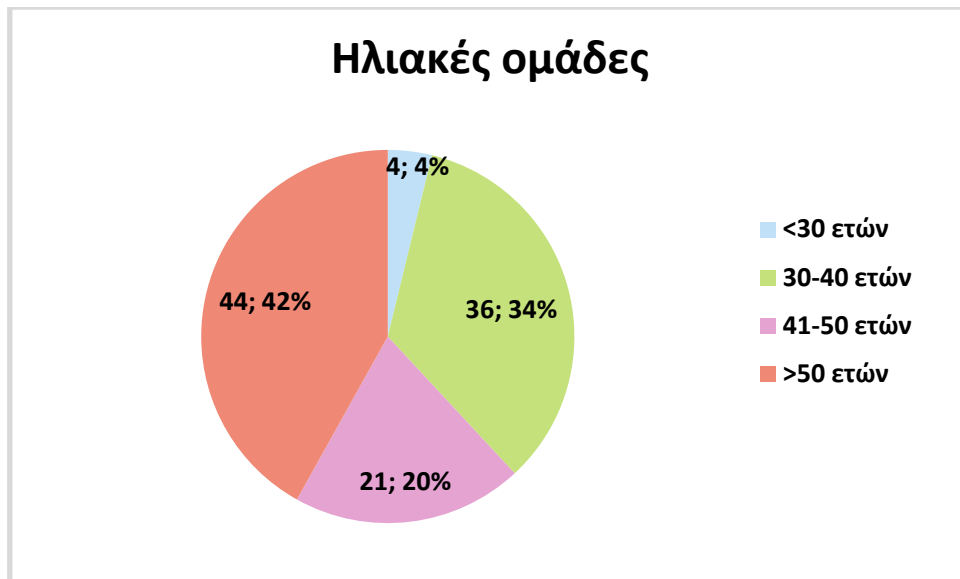
Όσον αφορά τα επιδημιολογικά στοιχεία των ασθενών παρατηρείται ότι η πλειοψηφία των ατόμων που εξετάστηκαν είναι άντρες, ημεδαποί και διάμεσης ηλικίας 48 έτη, όπως παρουσιάζονται στα παρακάτω γραφήματα.



**Γράφημα 2.** Φύλο ατόμων που συμπεριλήφθηκαν στην μελέτη.

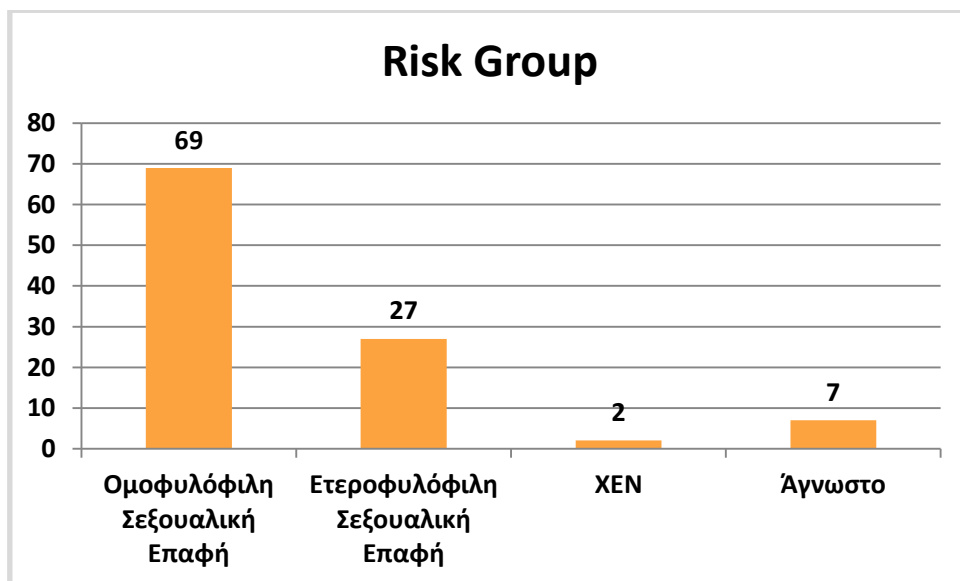


**Γράφημα 3.** Εθνικότητες ατόμων που συμπεριλήφθηκαν στην μελέτη.



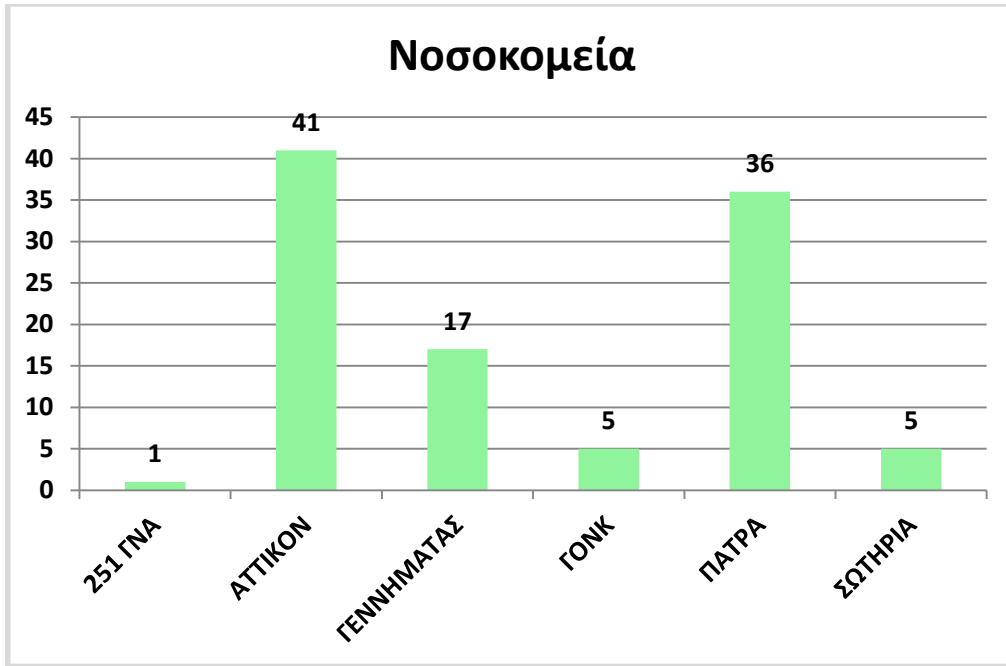
**Γράφημα 4.** Ηλικίες ατόμων που συμπεριλήφθηκαν στην μελέτη.

Επιπρόσθετα, παρατηρείται υψηλότερη συχνότητα εμφάνισης χαμηλών επιπέδων ιαιμίας σε ομοφυλόφιλη σεξουαλική επαφή όπως φαίνεται στο **Γράφημα 5**.



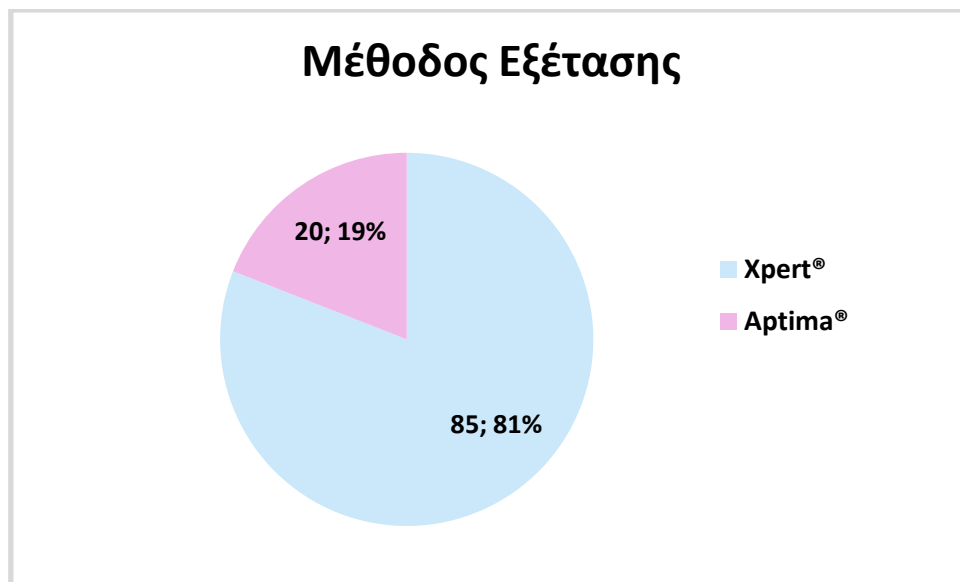
**Γράφημα 5.** Συχνότητα εμφάνισης χαμηλών επιπέδων ιαιμίας στα άτομα που συμπεριλήφθηκαν στην μελέτη.

Η πλειονότητα των δειγμάτων χαμηλού επιπέδου ιαιμίας <200 αντίγραφα/mL πλάσματος, όπως φαίνεται στο **Γράφημα 6** προήλθαν από νοσοκομεία εντός Αττικής και πιο συγκεκριμένα από το ΠΓΝ Αττικών (41 περιστατικά low level viremia) ενώ το δεύτερο σε σειρά νοσοκομείο βρίσκεται εκτός Αττικής και πρόκειται για το ΠΓΝΠ Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Πατρών (36 περιστατικά low level viremia).



**Γράφημα 6.** Συχνότητα εμφάνισης περιστατικών χαμηλού επιπέδου ιαμίας ανά Νοσοκομείο.

Όπως έχει αναφερθεί παραπάνω η συγκεκριμένη μελέτη περιλαμβάνει την μέτρηση του χαμηλού επιπέδου ιαμίας χρησιμοποιώντας δύο μεθόδους μέτρησης του ικού φορτίου, Xpert® HIV-1 Viral Load XC της Cepheid σε θερμοκυκλοποιητή I-CORE και Aptima® HIV-1 Quant Dx Assay με το σύστημα του Panther® αντίστοιχα όπως φαίνεται στο **Γράφημα 7**.



**Γράφημα 7.** Οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν για την μέτρηση ικού φορτίου

Μεταξύ των 105 περιστατικών χαμηλού επιπέδου ιαμίας υπήρχαν περιπτώσεις 16 οι οποίες αφορούσαν άτομα τα οποία είχαν πραγματοποιήσει παραπάνω από μια μετρήσεις του ικού τους φορτίου στο ΕΚΑΑΝΕ. Πρόκειται για 16 περιστατικά ατόμων των οποίων η πρωτοδιάγνωση και οι μετέπειτα μετρήσεις του ικού τους φορτίου παρουσιάζονται στον

**Πίνακα 1.** Λαμβάνοντας υπόψη τα δεδομένα του **Πίνακα 1**, παρατηρούμε αύξηση του ιικού φορτίου της πλειοψηφίας των περιστατικών, γεγονός που οφείλεται σε ατελή καταστολή του ιικού πολλαπλασιασμού, είτε εξαιτίας ελλιπούς συνέπειας στην λήψη της αντιρετροϊκής θεραπείας είτε λόγω εμφάνισης πιθανής μετάλλαξης αντοχής.

	ΜΕΘΟΔΟΣ ΕΞΕΤΑΣΗΣ	ΠΡΩΤΟΔΙΑΓΝΩΣΗ		1 <sup>ST</sup> FU		2 <sup>ND</sup> FU		3 <sup>RD</sup> FU		4 <sup>TH</sup> FU	
		ΗΜ/ΝΙΑ	COPIES/M L	ΗΜ/ΝΙΑ	COPIES/M L	ΗΜ/ΝΙΑ	COPIES/M L	ΗΜ/ΝΙΑ	COPIES/M L	ΗΜ/ΝΙΑ	COPIES/ ML
1.	Χpert	09/23	778.000	12/23	129	06/24	111	-	-	-	-
2.	Χpert	02/18	-	05/24	89	-	-	-	-	-	-
3.	Χpert	05/06	-	07/23	99	05/24	140	-	-	-	-
4.	Χpert	01/11	-	09/23	44	03/24	159	06/24	102	-	-
5.	Χpert	03/07	-	09/23	127	06/24	90	-	-	-	-
6.	Χpert	05/23	-	09/23	59	10/23	91	04/24	130	04/24	59
7.	Χpert	10/14	-	10/23	63	02/24	91	-	-	-	-
8.	Χpert	05/22	-	12/23	126	01/24	83	06/24	82	-	-
9.	Χpert	08/22	-	09/23	86	02/24	119	05/24	98	-	-
10.	Χpert	12/22	-	02/23	67	01/24	40	-	-	-	-
11.	Χpert	03/97	-	04/24	307	05/24	369	-	-	-	-
12.	Χpert	12/99	-	07/23	513	12/23	681	02/24	891	03/24	669
13.	Χpert	10/12	-	10/23	391	12/23	525	01/24	391	05/24	358
14.	Χpert	10/23	-	03/24	453	05/24	534	-	-	-	-
15.	Χpert/ Aptima	10/23	-	02/24	526	04/24	774	05/24	312	-	-
16.	Χpert/ Aptima	11/23	-	04/24	572	04/24	357	-	-	-	-

**Πίνακας 1.** Μετρήσεις ιικού φορτίου ,ανά διαστήματα, σε άτομα που λαμβάνουν αντιρετροϊκή θεραπεία στο πλαίσιο της εργαστηριακής παρακολούθησής τους.

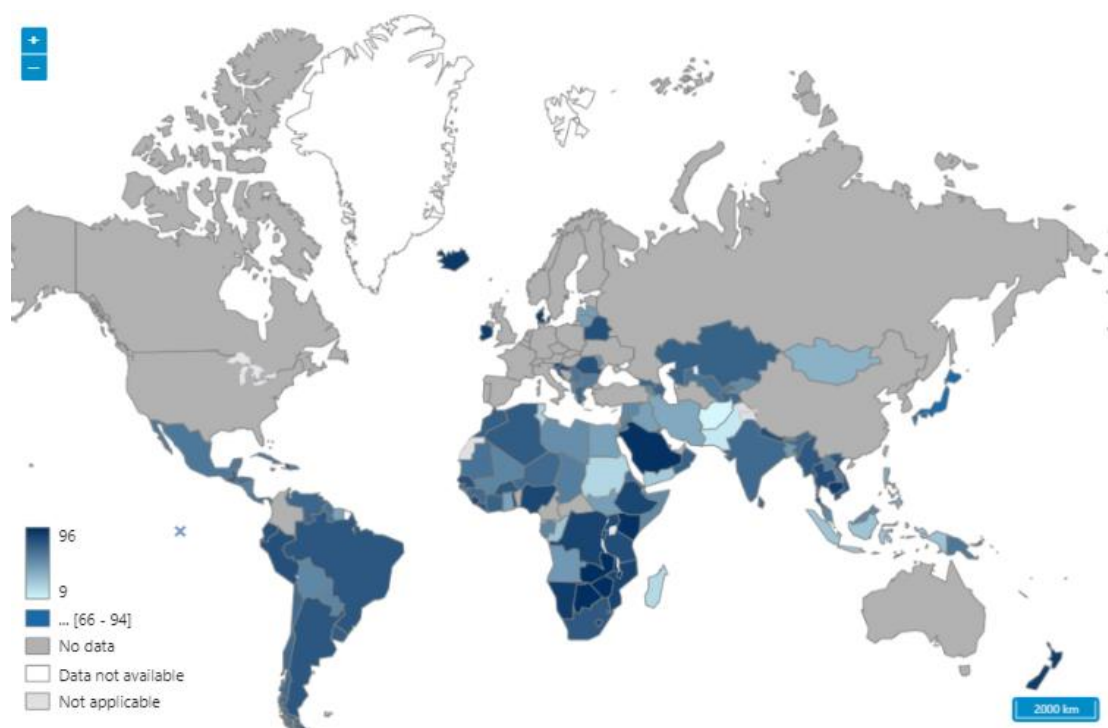
## 4. Συζήτηση – Συμπεράσματα

### 4.1 Επιδημιολογικά δεδομένα

Οι επαρκείς πόροι και η πρόοδος της επιστήμης στην πρόληψη, στην θεραπεία και στην εφαρμογή καθιστούν εφικτούς τους στόχους της Γενικής Συνέλευσης των Ηνωμένων Εθνών για την επίτευξη του 95-95-95. Πιο συγκεκριμένα, ο στόχος είναι να διασφαλιστεί ότι το 95% των ασθενών με HIV θα έχουν διαγνωστεί, το 95% των διαγνωσμένων ασθενών θα λαμβάνουν ART και το 95% αυτών που λαμβάνουν θεραπεία θα επιτυγχάνουν καταστολή ιικού φορτίου. Σε παγκόσμιο επίπεδο, τα ποσοστά HIV και θνησιμότητας παρουσιάζουν σταθερή μείωση. Ωστόσο, ορισμένες χώρες αναφέρουν ανοδική τάση στο ποσοστό των μολύνσεων, κυρίως εκεί όπου σημειώνονται πολιτικές ή άλλες αναταραχές ή σε περιοχές όπου ο ιός του HIV αποτελεί στίγμα. Με τις βελτιώσεις στην θεραπεία, ο αριθμός των ασθενών με HIV αυξάνεται, με περίπου 37,7 εκατομμύρια ασθενείς να έχουν διαγνωστεί το 2020 και 39 εκατομμύρια ασθενείς να έχουν διαγνωστεί το 2022 εκ των οποίων τα δύο τρίτα ζουν στην Αφρική (51). Σύμφωνα με την βιβλιογραφία περίπου το 5-30% του Δυτικού Κόσμου εμφανίζει ιαμμία χαμηλού επιπέδου (52).

#### Παγκόσμια Κλίμακα

Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας τα άτομα τα οποία ζουν με τον ιό του HIV ανέρχονται σε 39,9 εκατομμύρια το 2023, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, εκ των οποίων τα 30,7 εκατομμύρια λαμβάνουν αντιρετροϊκή θεραπεία για το 2023 (53).



**Εικόνα 19.** Παγκόσμια κατανομή ατόμων που λαμβάνουν αντιρετροϊκή θεραπεία (54).

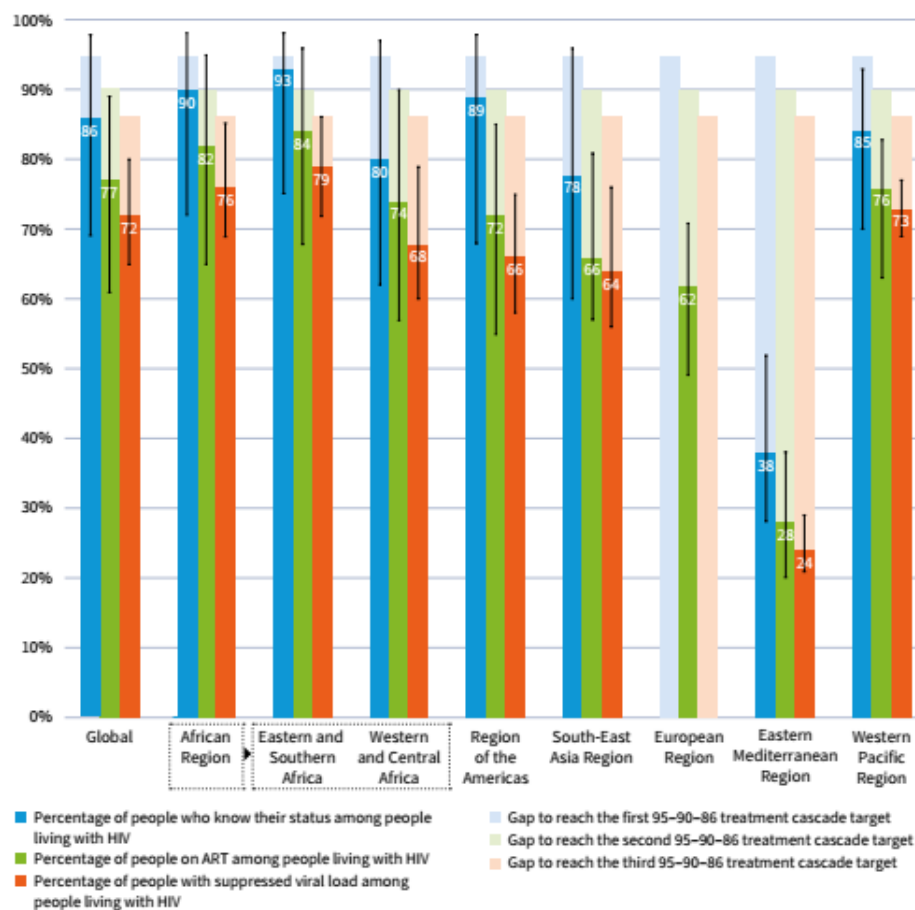
Το 2023, το 86% του συνόλου των ανθρώπων που ζούσαν με HIV γνώριζαν για την κατάσταση τους. Το 87% των ενηλίκων που ζουν με HIV γνώριζαν για την κατάσταση τους. Προκειμένου να επιτευχθεί έως το 2025 ο στόχος 95-95-95, πρέπει ακόμη 3,4 εκατομμύρια

άνθρωποι που ζουν με τον ιό του HIV να ενημερωθούν για την κατάσταση τους. Τα άτομα που λαμβάνουν θεραπεία αποτελούν το 77% των ατόμων που ζουν με τον ιό HIV, όπου το 72% εξ' αυτών έχουν επιτύχει ιική καταστολή για το 2023. Επομένως, υπολείπεται ένα ποσοστό της τάξης του 5% που ανήκει σε άτομα τα οποία λαμβάνουν αντιρετροϊκή θεραπεία χωρίς όμως να έχουν καταστείλει το ιικό τους φορτίο (53).

Προκειμένου να επιτευχθεί ο δεύτερος στόχος στον καταρράκτη δοκιμών, θεραπείας και καταστολής ιικού φορτίου (95-90-86), επιπλέον 5,4 εκατομμύρια άνθρωποι που ζουν με τον HIV και γνωρίζουν για την κατάστασή τους πρέπει να έχουν πρόσβαση στην αντιρετροϊκή θεραπεία (55).

Για να επιτευχθεί ο τρίτος στόχος στον καταρράκτη δοκιμών, θεραπείας και καταστολής ιικού φορτίου (95-90-86), επιπλέον 5,6 εκατομμύρια άνθρωποι που ζουν με HIV πρέπει να γνωρίζουν την κατάσταση τους, να έχουν πρόσβαση στην θεραπεία και να έχουν καταστολή του ιικού τους φορτίου.

**Fig 3. Progress towards achieving the HIV testing, treatment and viral load suppression cascades targets among people living with HIV, globally and by WHO region, 2023**

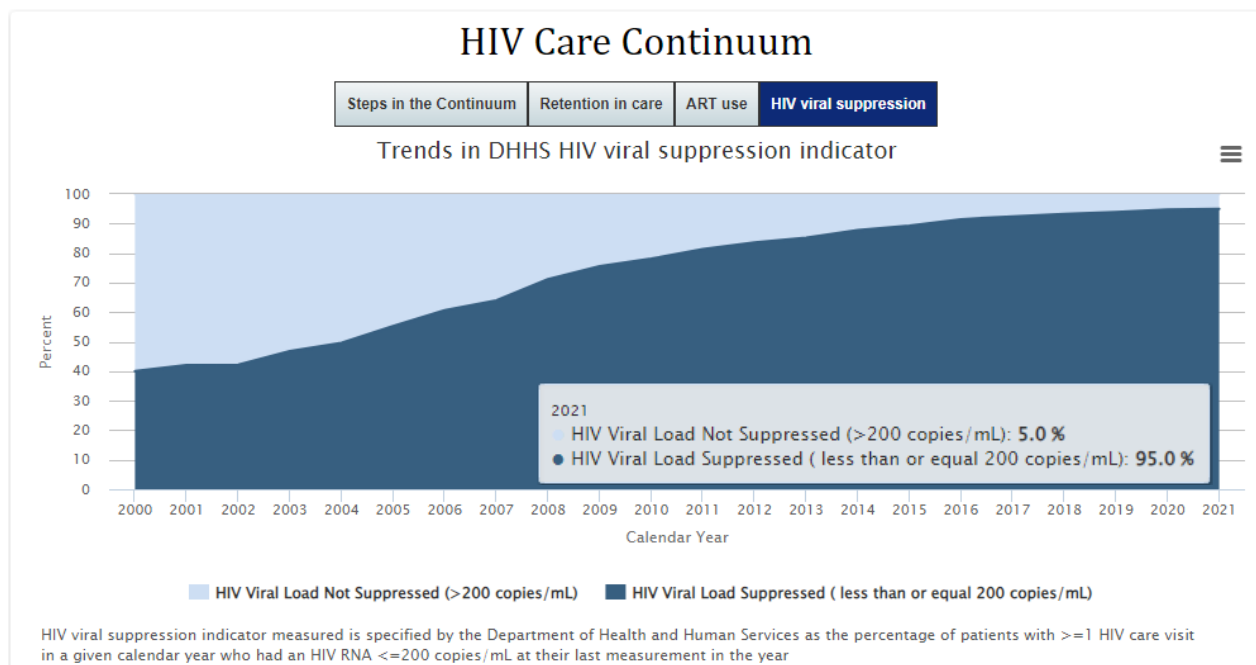


**Πίνακας 2.** Πρόοδος προς την επίτευξη των στόχων καταρράκτη για τις δοκιμές HIV, την θεραπεία και την καταστολή του ιικού φορτίου μεταξύ των ατόμων που ζουν με HIV, παγκοσμίως ανά περιοχή του ΠΟΥ, 2023 (55).



## Αμερική

Η North American AIDS Cohort Collaboration on Research and Design (NA-ACCORD) ξεκίνησε το 2006 ως εκπρόσωπος της Βόρειας Αμερικής για την διατήρηση των Διεθνών Βάσεων Επιδημιολογικών Δεδομένων Αξιολόγησης του AIDS. Από την συγκεκριμένη βάση δεδομένων προέκυψαν τα παρακάτω στατιστικά δεδομένα (56).



**Γράφημα 8.** Μέτρηση ιικού φορτίου HIV την χρονική περίοδο 2000-2021 (57).

Στο συγκεκριμένο γράφημα παρουσιάζεται η μέτρηση του ιικού φορτίου στις χώρες της Βορείου Αμερικής (Καναδάς και Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής) και παρατηρούμε ότι για το έτος 2021 το 95% των ατόμων που λάμβαναν αντιρετροϊκή θεραπεία εμφανίζουν ικό φορτίο  $200 \leq$  αντίγραφα/mL πλάσματος (57).

## Ευρωπαϊκή Κλίμακα

- Ηνωμένο Βασίλειο

Σύμφωνα με την Ένωση του HIV στο Ηνωμένο Βασίλειο (BHIVA-British HIV Association) ιαίμια χαμηλού επιπέδου παρατηρείται σε έως και το 8% των ατόμων. (58)

### 4.2 Παρόμοιες μελέτες

Στην συγκεκριμένη ενότητα παρουσιάζονται μελέτες οι οποίες εντοπίστηκαν στην βιβλιογραφία και μελετούν μεταξύ άλλων την ιαίμια χαμηλού επιπέδου σε άτομα που λαμβάνουν αντιρετροϊκή θεραπεία, σε παγκόσμιο επίπεδο. Για αυτό το λόγο, αποτελούν μέτρο σύγκρισης για την παρούσα ερευνητική εργασία, καθώς τα αποτελέσματα που εξάγονται από κάθε μια από αυτές μπορούν να συγκριθούν με τα τρέχοντα αποτελέσματα στο πλαίσιο μιας επιδημιολογικής μελέτης.

Στην βιβλιογραφία εντοπίστηκαν μελέτες από χώρες της Αφρικής, την Βόρεια Αμερική, την Αυστραλία, την Ευρώπη γενικότερα και πιο συγκεκριμένα από χώρες όπως η Γερμανία και η Σουηδία.

### Αφρική

Πιο συγκεκριμένα, μια μεγάλη μελέτη που παρουσιάστηκε στο «Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections» στο Κολοράντο ανέλυσε την ιαμμία σε άτομα που ζουν με HIV σε πέντε Αφρικανικές χώρες (Eswatini, Λεσότο, Μαλάουι, Ουγκάντα και Ζιμπάμπουε). Στην συγκεκριμένη μελέτη πραγματοποιήθηκε εξέταση του επιπολασμού των LLV, που ορίζεται ως HIV RNA >50 αντίγραφα/mL πλάσματος και <999 αντίγραφα/mL πλάσματος, μεταξύ ατόμων ηλικίας 15 ετών και άνω οι οποίοι λαμβάνουν τουλάχιστον ένα χρόνο αντιρετροϊκή θεραπεία. Πρόκειται για δυο διαδοχικές, αντιπροσωπευτικές αξιολογήσεις PHIA1 (2015-2019) και PHIA2 (2020-2021). Μεταξύ των 185.552 ατόμων που εγγράφηκαν στις 10 έρευνες, 27.202 ήταν εκείνοι που ζουν με τον ιό του HIV. Από αυτούς, οι 17.347 (58%) ανέφεραν ότι λαμβάνουν θεραπεία για τουλάχιστον 1 χρόνο, εκ των οποίων οι 15.978 (91%) εμφάνιζε ιικό φορτίο <1.000 αντίγραφα/mL πλάσματος. Μεταξύ των ατόμων με ιικό φορτίο <1.000 αντίγραφα/mL πλάσματος, οι 14.386 (89,2%) είχαν ιικό φορτίο <50 αντίγραφα/mL πλάσματος και 1.519 άτομα είχαν ιαμμία χαμηλού επιπέδου, δηλαδή το 10,8%. Συνολικά, από τα 1519 με LLV, το 70,4% είχαν τιμές >50 αντίγραφα/mL πλάσματος και <200 αντίγραφα/mL πλάσματος. Τα αποτελέσματα λοιπόν για τον επιπολασμό του LLV μεταξύ των ατόμων που ζουν με τον ιό του HIV με βάση τις δύο διαδοχικές έρευνες ήταν γενικά σταθερός και σχετικά χαμηλός, περίπου 10% (59).

Μια ακόμη μελέτη που δημοσιεύτηκε στο «eClinicalMedicine» το 2023 ασχολήθηκε με την μελέτη ιαμμίας χαμηλού επιπέδου μεταξύ ενηλίκων μολυσμένων με HIV-1 που λαμβάνουν ART στην Κένυα. Η συγκεκριμένη μελέτη ανέλυσε διαχρονικά δεδομένα από άτομα που ζουν με τον ιό του HIV και λαμβάνουν ART, στην Κένυα προκειμένου να κατανοήσουν τον επιπολασμό του LLV και τα ιολογικά αποτελέσματα. Υπολογίστηκαν τα ποσοστά ιολογικής καταστολής ( $\leq 50$  αντίγραφα/mL πλάσματος), LLV (51-999 αντίγραφα/mL πλάσματος), μη ιολογικής καταστολής ( $1000 \geq$  αντίγραφα/mL πλάσματος) και ιολογικής αποτυχίας ( $\geq 2$  διαδοχικά αποτελέσματα μη διαδοχικής καταστολής) μεταξύ ατόμων που ζουν με τον ιό του HIV, ηλικίας 15 ετών και άνω και που έλαβαν για τουλάχιστον 24 εβδομάδες ART κατά την περίοδο 2015-2021. Από τους 793.902 ασθενείς με τουλάχιστον μια μέτρηση ιικού φορτίου, το 18,5% εμφάνισε LLV (51-199 αντίγραφα/mL πλάσματος το 11,1%, 200-399 αντίγραφα/mL πλάσματος το 4,0% LLV, 400-499 αντίγραφα/mL πλάσματος το 3,4%) και το 9,2% εμφάνισε μη ιολογική καταστολή στην πρώτη μέτρηση. Μεταξύ όλων των μετρήσεων ιικού φορτίου που πραγματοποιήθηκαν, το 26,4% ήταν LLV (60).

Επιπλέον, σε μια αναδρομική μελέτη που διεξάχθηκε σε 18 πολιτείες στην Νιγηρία και δημοσιεύτηκε στο «Lancet Glob Health» το 2022, χρησιμοποιήθηκαν δεδομένα ασθενών τα οποία είχαν συλλεχθεί στο παρελθόν και υπολογίστηκαν τα ποσοστά ιολογικής καταστολής ( $\leq 50$  αντίγραφα/mL πλάσματος), ιαμμίας χαμηλού επιπέδου (51-999 αντίγραφα/mL πλάσματος), μη ιολογικής καταστολής ( $\geq 1000$  αντίγραφα/mL πλάσματος) και ιολογικής αποτυχίας ( $\geq 2$  διαδοχικά αποτελέσματα μη διαδοχικής καταστολής) μεταξύ ατόμων που λάμβαναν τουλάχιστον για 24 εβδομάδες ART. Στην πρώτη μέτρηση ιικού φορτίου σε

402.669 ασθενείς κατά την περίοδο 2016-21, η ιαμμία χαμηλού επιπέδου μετρήθηκε σε 64.480 άτομα (16,0%) και η μη ιολογική καταστολή σε 46.051 άτομα (11,4%) (61).

### **Αυστραλία**

Σε μελέτη που άντλησε δεδομένα από την Αυστραλιανή βάση επιτήρησης του HIV για το διάστημα 2010-2021, χρησιμοποιήθηκαν πληροφορίες για την διερεύνηση των ποσοστών ιικού στιγμιότυπου, ιικής αποτυχίας και ιαμμίας χαμηλού επιπέδου. Η ιαμμία χαμηλού επιπέδου ορίστηκε ως το κατώτατο όριο ποσοτικοποίησης της μεθόδου έως 200 αντίγραφα/mL πλάσματος. Μεταξύ των 2544 συμμετεχόντων που βρίσκονταν σε παρακολούθηση και λάμβαναν αντιρετροϊκή θεραπεία το 4,46% εμφάνισαν ιαμμία χαμηλού επιπέδου (62).

### **Ευρώπη**

Μια μελέτη των Schmidt, D., Kollan, C., Stoll, M. *et al* που διεξήχθη στη Γερμανία το διάστημα 1999-2018 άντλησε δεδομένα από δύο μεγάλες γερμανικές μελέτες σχετικά με την ιαμμία χαμηλού επιπέδου. Τα άτομα στα οποία πραγματοποιήθηκε μέτρηση ιικού φορτίου, λάμβαναν αντιρετροϊκή θεραπεία για περίπου 5.5 χρόνια, ανέρχονταν σε 22.120. Επειδή πρόκειται για μια μελέτη που πραγματοποιήθηκε για μεγάλο χρονικό διάστημα, σημειώνεται ότι τα άτομα τα οποία εμφάνισαν ιαμμία <200 αντίγραφα/mL πλάσματος υπήρξε αύξηση από 61,1% σε 96,5%. Για το συγκεκριμένο εύρος 50 έως <200 αντίγραφα/mL πλάσματος που αντιστοιχεί στην ιαμμία χαμηλού επιπέδου παρατηρήθηκε προοδευτική μείωση από 9,4% το έτος 1999 σε 3,2% το έτος 2018 (63).

Αντίστοιχη μελέτη στην Σουηδία, χρησιμοποίησε δεδομένα από το μητρώο του InfCareHIV (Μητρώο καταγραφής και βάση δεδομένων για τα άτομα που ζουν με τον HIV στην Σουηδία) σχετικά με τα άτομα που εμφανίζουν ιαμμία χαμηλού επιπέδου και έχουν πραγματοποιήσει έναρξη λήψης αντιρετροϊκής θεραπείας εντός του διαστήματος 2006-2017. Η παρακολούθηση των συμμετεχόντων ξεκίνησε 6 μήνες μετά την έναρξη της αντιρετροϊκής θεραπείας και οι συμμετέχοντες παρακολουθήθηκαν για 24 μήνες, χαρακτηρίζοντας την ιική καταστολή ως <50 αντίγραφα/mL πλάσματος και την ιαμμία χαμηλού επιπέδου ως τουλάχιστον δύο διαδοχικές μετρήσεις ιικού φορτίου εντός του εύρους 50-199 αντίγραφα/mL πλάσματος. Μεταξύ των 3383 συμμετεχόντων, οι 251 εμφάνισαν ιαμμία χαμηλού επιπέδου, δηλαδή το 7,4% (64).

Μεγάλη Ευρωπαϊκή έρευνα εξέτασε την ιολογικής αποτυχίας ύστερα από ιαμμία χαμηλού επιπέδου και ιικού στιγμιότυπου κατά την διάρκεια της αντιρετροϊκής θεραπείας. Στην συγκεκριμένη μελέτη αντλήθηκαν πληροφορίες από την ολοκληρωμένη βάση δεδομένων EuResist και συμπεριλήφθηκαν άτομα τα οποία ξεκίνησαν αντιρετροϊκή θεραπεία το 2005 ή αργότερα. Η ιαμμία χαμηλού επιπέδου ορίστηκε από 51 έως 199 αντίγραφα/mL πλάσματος με δύο οι περισσότερες μετρήσεις ιικού φορτίου εντός του συγκεκριμένου εύρους με διαφορά τουλάχιστον 30 ημερών. Συνολικά συμμετείχαν 22.523 άτομα εκ των οποίων LLV στην Ευρωπαϊκή Κλίμακα ήταν τα 1654, δηλαδή το 7,3% (65).

### Ευρώπη & Βόρεια Αμερική

Επιπλέον, μια ακόμη μελέτη χρησιμοποίησε δεδομένα από 18 έρευνες που έλαβαν χώρα στην Ευρώπη και στην Βόρεια Αμερική, σχετικά με την ιαιμία χαμηλού επιπέδου. Σύμφωνα με την συγκεκριμένη έρευνα, η ιαιμία χαμηλού επιπέδου ανήκει στο εύρος 50-199 αντίγραφα/mL πλάσματος (με δυο διαδοχικές μετρήσεις ιικού φορτίου να ανήκουν στο συγκεκριμένο εύρος). Τα αποτελέσματα έδειξαν πως από τα 17.902 άτομα που ζουν με τον ιό του HIV τα 624, δηλαδή το 3,5% ανήκουν στην κατηγορία low level viremia (66).

### Κίνα

Αναδρομική μελέτη που πραγματοποιήθηκε στο Πεκίνο στην Κίνα, περιλαμβάνει ενήλικες οι οποίοι έχουν μολυνθεί με τον ιό του HIV, είναι δηλωμένοι στην επιδημιολογική βάση δεδομένων για τον HIV της Κίνας, μεταξύ 01/01/2015 και 01/01/2020 και τους χορηγείται αντιρετροϊκή θεραπεία. Η ιαιμία χαμηλού επιπέδου ορίστηκε ως η εμφάνιση μιας τουλάχιστον μέτρησης ιικού φορτίου εντός του εύρους 51-999 αντίγραφα/mL πλάσματος, μετά από έξι μήνες λήψης αντιρετροϊκής θεραπείας. Με βάση τα ιικά φορτία που προέκυψαν, η ιαιμία χαμηλού επιπέδου χωρίστηκε σε τρεις κατηγορίες: **α.** 51-199 αντίγραφα/mL πλάσματος, **β.** 200-399 αντίγραφα/mL πλάσματος και **γ.** 400-999 αντίγραφα/mL πλάσματος. Συμπεριλήφθηκαν συνολικά 10.124 μολυσμένα άτομα εκ των οποίων ιαιμία χαμηλού επιπέδου (51-999 αντίγραφα/mL πλάσματος) εμφάνισαν οι 723 (8,3%) σε αντιρετροϊκή πρώτης γραμμής, οι 204 (10,9%) σε αντιρετροϊκή δεύτερης γραμμής και 53 (14,4%) σε αντιρετροϊκή τρίτης γραμμής. Ωστόσο, στο εύρος μετρήσεων ιικού φορτίου (51-199 αντίγραφα/mL πλάσματος) αντιστοιχούν 452 (5,2%) για ART 1<sup>ης</sup> γραμμής, 129 (6,9%) για ART 2<sup>ης</sup> γραμμής και 88 (5,7%) για ART 3<sup>ης</sup> γραμμής. Με βάση λοιπόν τα παραπάνω δεδομένα, η μέση τιμή των ατόμων που ανήκουν στο εύρος 51-199 αντίγραφα/mL πλάσματος αντιστοιχεί σε 6,0% (52).

Μελέτη που δημοσιεύτηκε στο περιοδικό "HIV Medicine" και έλαβε χώρα στην πόλη Shenyang στην Κίνα, σχετίζεται με τα αποτελέσματα της επίμονης ιαιμίας χαμηλού επιπέδου σε ασθενείς που λαμβάνουν αντιρετροϊκή θεραπεία. Η συγκεκριμένη μελέτη διεξήχθη το διάστημα μεταξύ Ιανουάριος 2011 έως Δεκέμβριος 2018 και πήρε έγκριση από το Συμβούλιο Δεοντολογίας του 1<sup>ου</sup> Συνεργαζόμενου Νοσοκομείου του Ιατρικού Πανεπιστημίου της Κίνας. Η ιαιμία χαμηλού επιπέδου (LLV) ορίστηκε από 50 έως 999 αντίγραφα/mL πλάσματος και ταξινομήθηκαν σε τέσσερις κατηγορίες: **α.** χωρίς LLV, **β.** 50-199 αντίγραφα/mL πλάσματος, **γ.** 200-499 αντίγραφα/mL πλάσματος και **δ.** 500-999 αντίγραφα/mL πλάσματος. Από τα 1288 άτομα που συμμετείχαν στην μελέτη τα 81 εμφάνισαν ιαιμία χαμηλού επιπέδου (50-999 αντίγραφα/mL πλάσματος) εκ των οποίων τα 53 άτομα είχαν ιικό φορτίο εντός του εύρους 50-199 αντίγραφα/mL πλάσματος, δηλαδή αποτελούν το 4,1% (67).

### Ευρύτερες μελέτες

Επιπρόσθετα, μελέτη των Fleming J. et al. που διεξήχθη το 2019, άντλησε δεδομένα από το Ερευνητικό Δίκτυο για τον HIV (HIV Research Network) σχετικά με τα άτομα που είχαν εγγραφεί μεταξύ 2005-2015, είχαν HIV-1 RNA >200 αντίγραφα/mL πλάσματος και είτε δεν είχαν λάβει ποτέ θεραπεία, είτε ήταν η πρώτη φορά, είτε ήταν χρόνιοι λήπτες της ART. Η

ιαιμία χαμηλού επιπέδου ορίστηκε εντός δύο εύρων μέτρησης 51-200 αντίγραφα/mL πλάσματος και 201-500αντίγραφα/mL πλάσματος. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι από τους 2795 ασθενείς εκ των οποίων το 88,8% λάμβαναν ART, οι 283 (10,1%) εμφάνισαν ιολογική αποτυχία, οι 152 (5,4%) εμφάνισαν LLV (51-200 αντίγραφα/mL πλάσματος ) και 110 (3,9%) LLV (201-500 αντίγραφα/mL πλάσματος ) (68).

Συγκριτικές Μελέτες	Σύνολο Μετρήσεων ιικού φορτίου σε άτομα που λαμβάνουν αντιρετροϊκή θεραπεία	Αριθμός περιστατικών με εύρος μέτρησης <u>40-1000 αντίγραφα/mL πλάσματος</u>	Αριθμός περιστατικών χαμηλού επιπέδου ιαιμίας (LLV) με εύρος μέτρησης <u>&gt;40 έως &lt;200 αντίγραφα/mL πλάσματος</u>	Ποσοστό περιστατικών χαμηλού επιπέδου ιαιμίας (LLV) , με εύρος μέτρησης <u>&gt;40 έως&lt;200 αντίγραφα/mL πλάσματος</u> ως προς το αρχικό σύνολο μετρήσεων
1. Justman, J. E. (2024). Low-Level Viremia Trends Among Persons With HIV: A 5-Country Analysis From 10 PHIA Surveys. <i>Using Data to Inform Interventions: Epidemiology of HIV, STIs, Mpox, and COVID-19</i> (59).	17.347	1.519	1.069	6,1%
2. Retrospective longitudinal analysis of low-level viremia among HIV-1 infected adults on antiretroviral therapy in Kenya. Aoko, Appolonia et al. <i>eClinicalMedicine</i> , Volume 63, 102166 (60).	793.902	146.872	88.123	11,1%
3. Low-level viraemia among people living with HIV in Nigeria: a retrospective longitudinal cohort study: Chun, Helen MEne, Uzoma et al. <i>The Lancet Global Health</i> , Volume 10,	402.669	64.480	40.438	10,0%

Issue 12, e1815 - e1824 <b>(61)</b> .				
4. Fleming, Juliaa; Mathews, W. Christopherb; Rutstein, Richard M.c; Aberg, Judithd; Somboonwit, Charurute; Cheever, Laura W.f; Berry, Stephen A.a; Gebo, Kelly A.a; Moore, Richard D.a for the HIV Research Network. Low-level viremia and virologic failure in persons with HIV infection treated with antiretroviral therapy. <i>AIDS</i> 33(13):p 2005-2012, November 1, 2019 (68).	<b>2.795</b>	-	<b>152</b>	<b>5,4%</b>
5. Han WM, Broom J, Bopage R, Templeton DJ, Edmiston N, Petoumenos K, et al. Investigating rates and predictors of viral blips, low-level viraemia and virological failure in the Australian HIV observational database. <i>Trop Med Int Health</i> . 2024; 29(1): 42–56 (62).	<b>2.544</b>	-	-	<b>4,4%</b>
6. Schmidt, D., Kollan, C., Stoll, M. <i>et al.</i> Everything counts - a method to determine viral suppression among people living with HIV using longitudinal data for the HIV care continuum - results of two large, German, multi-center real-life cohort studies over 20 years (1999–2018). <i>BMC Public Health</i> , 21(1) (63).	<b>22.120</b>	-	-	<b>3.2%</b>

<b>7.</b> The Antiretroviral Therapy Cohort Collaboration (ART-CC). Impact of low-level viremia on clinical and virological outcomes in treated HIV-1-infected patients. <i>AIDS</i> 29(3):p 373-383, January 28, 2015 (66)	<b>17.902</b>	-	<b>624</b>	<b>3,5%</b>
<b>8.</b> Brattgård H, Björkman P, Nowak P, Treutiger CJ, Gisslén M, et al. (2022) Factors associated with low-level viraemia in people with HIV starting antiretroviral therapy: A Swedish observational study. <i>PLOS ONE</i> 17(5): e0268540 (64).	<b>3.383</b>	-	<b>251</b>	<b>7,4%</b>
<b>9.</b> Bai, R., Lv, S., Hua, W., Su, B., Wang, S., Shao, Y., Li, Z., Liu, A., Sun, L., & Dai, L. (2022). Factors associated with human immunodeficiency virus-1 low-level viremia and its impact on virological and immunological outcomes: A retrospective cohort study in Beijing, China. <i>HIV medicine, 23 Suppl 1</i> , 72–83 (52).	<b>10.124</b>	-	-	<b>6,0%</b>
<b>10.</b> Ding, H., Xu, J., Liu, J., Wang, Q., Kang, J., Li, X., Zhang, Z., Han, X., Jiang, Y., Geng, W., & Shang, H. (2022). Outcomes of persistent low-level viremia among HIV patients on antiretroviral therapy: A prospective cohort study. <i>HIV medicine, 23 Suppl 1</i> , 64–71 (67).	<b>1288</b>	<b>81</b>	<b>53</b>	<b>4,1%</b>
<b>11.</b> Elvstam, O., Malmborn, K., Elén, S., Marrone, G., García, F.,	<b>22.523</b>	-	<b>1654</b>	<b>7,3%</b>

<p>Zazzi, M., Sönnnerborg, A., Böhm, M., Seguin-Devaux, C., &amp; Björkman, P. (2023). Virologic Failure Following Low-level Viremia and Viral Blips During Antiretroviral Therapy: Results From a European Multicenter Cohort. <i>Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America</i>, 76(1), 25–31 (65).</p>				
---	--	--	--	--

**Πίνακας 3.** Μελέτες σύγκρισης αποτελεσμάτων με την συγκεκριμένη έρευνα.

Τα αποτελέσματα της παρούσας έρευνας όπως αναφέρθηκαν παραπάνω έδειξαν ότι από τις 2.813 μετρήσεις ιικού φορτίου σε άτομα που λαμβάνουν ART, οι 150 εντοπίζονταν στο εύρος 40-1000 αντίγραφα/mL πλάσματος, δηλαδή αποτελούν το 5,3% των συνολικών μετρήσεων. Από τις 150 μετρήσεις, οι 105 εντοπίζονται εντός του εύρους των LLV (40 έως <200 αντίγραφα/mL πλάσματος) και οι 45 είναι >200 αντίγραφα/mL πλάσματος. Με βάση τα συγκεκριμένα αποτελέσματα προκύπτει ότι το ποσοστό των μετρήσεων LLV ως προς τις 2813 μετρήσεις αντιστοιχεί σε **3,7%**.

Λαμβάνοντας λοιπόν υπόψη τα αποτελέσματα από τις συγκριτικές μελέτες οι οποίες παρατέθηκαν και από την παρούσα μελέτη καταλήγουμε πως το ποσοστό των περιστατικών αιμίας χαμηλού επιπέδου θεωρείται χαμηλό αν λάβουμε υπόψη τις μελέτες που αφορούν χώρες της Αφρικής. Αυτό οφείλεται στο ότι οι διαθέσιμες συγκριτικές μελέτες στην βιβλιογραφία πραγματοποιήθηκαν σε χώρες της Αφρικής γι' αυτό και το εύρος των μετρήσεων που υποδηλώνουν αιμία χαμηλού επιπέδου είναι μεγαλύτερο (40-999 αντίγραφα/mL πλάσματος) συγκριτικά με αυτό που έχει αναφερθεί παραπάνω στην εισαγωγή (40-199 αντίγραφα/mL πλάσματος).

Ωστόσο, αν συγκρίνουμε τα αποτελέσματα της παρούσας έρευνας με άλλες συγκριτικές μελέτες από χώρες του Δυτικού κόσμου παρατηρούμε πως ο αριθμός των περιστατικών χαμηλού επιπέδου αιμίας που προέκυψε είναι αναμενόμενος. Πιο συγκεκριμένα, μελέτες που πραγματοποιήθηκαν στην Γερμανία, στην Ευρώπη γενικότερα, στην Αυστραλία, στην Κίνα και στην Βόρεια Αμερική εξάγουν αποτελέσματα πλησιέστερα στο 3,7% της παρούσας μελέτης. Επίσης, λαμβάνοντας υπόψη και άλλες μελέτες στην Ευρώπη και πιο συγκεκριμένα στην Σουηδία και στο Ηνωμένο Βασίλειο, μπορεί να προκύπτουν ποσοστά μεγαλύτερα του 3,7% καθιστώντας την συγκεκριμένη μέτρηση χαμηλή, ωστόσο κανένα από τα αποτελέσματα δεν πλησιάζει ούτε ξεπερνά τις μετρήσεις από τις Αφρικανικές Χώρες.

Η ετερογένεια των μελετών που προαναφέρθηκαν αρχικά οφείλεται στην μέθοδο με την οποία πραγματοποιήθηκε η μέτρηση του ιικού φορτίου, καθώς διαφέρει το κατώτατο όριο ποσοτικοποίησης του ιικού φορτίου, με άλλες μελέτες να θεωρούν κατώτατο όριο τα 40



αντίγραφα/mL πλάσματος και άλλες τα 50 αντίγραφα/mL πλάσματος. Επιπρόσθετα, η διαφορά στα αποτελέσματα που προκύπτουν επηρεάζονται από κοινωνικούς και οικονομικούς παράγοντες. Πιο συγκεκριμένα, η πρόσβαση στην αντιρετροϊκή θεραπεία και η συνέπεια στην λήψη των φαρμάκων, διαφέρει από χώρα σε χώρα και πόσο μάλλον από ήπειρο σε ήπειρο, ενώ διαδραματίζει καταλυτικό ρόλο στην μείωση του ιικού πολλαπλασιασμού και κατά συνέπεια της ιικής καταστολής.

Όσον αφορά την Ευρωπαϊκή κλίμακα, παρατηρούμε ότι υπάρχουν διακυμάνσεις του ποσοστού των ατόμων που εμφανίζουν ιαμμία χαμηλού επιπέδου με ταυτόχρονη λήψη αντιρετροϊκής θεραπείας. Αναλυτικότερα, σε χώρες όπως η Σουηδία και το Ηνωμένο Βασίλειο εμφανίζουν μεγαλύτερα ποσοστά LLV συγκριτικά με χώρες όπως είναι η Γερμανία και η Ελλάδα, αν λάβουμε υπόψη την παρούσα μελέτη.

Επιπλέον, με βάση την διαθέσιμη βιβλιογραφία δεν εντοπίστηκε κάποια παρόμοια μελέτη περιστατικών χαμηλού επιπέδου ιαμμίας σε άτομα που λαμβάνουν αντιρετροϊκή θεραπεία στην Ελλάδα, επομένως δεν είναι εφικτή η σύγκριση των αποτελεσμάτων με εγχώρια δεδομένα.

## Βιβλιογραφία

1. **Fanales-Belasio, E., Raimondo, M., Suligoj, B., & Buttò, S.** HIV virology and pathogenetic mechanisms of infection: a brief overview. *Annali dell'Istituto superiore di sanita*. January 4, 2010, Vol. 46.
2. **Turner, Brian G , Summers, Michael F.** Structural biology of HIV11Edited by P. E. Wright. *Journal of Molecular Biology*. 1999, Vol. 285, 1, pp. 1-32.
3. **Burchard, Paul R.,Abou Tayoun, Ahmad N.,Scherer, Axel,Tsongalis, Gregory J.** A rapid RT-PCR assay for the detection of HIV-1 in human plasma specimens. *Experimental and Molecular Pathology*. 2014, Vol. 97, 1, pp. 111-115.
4. **Rossi, E., Meuser, ME., Cunanan. CJ.,Cocklin, S.** Structure, Function, and Interactions of the HIV-1 Capsid Protein. *Life*. 2021, Vol. 11, 2.
5. ΕΟΔΥ. "HIV Λοίμωξη/AIDS". [Ηλεκτρονικό] 2024. <https://eody.gov.gr/disease/aids/>.
6. **Morrow, G., Vachot, L., Vagenas, P. et al.** Current concepts of HIV transmission. *Current HIV/AIDS Reports*. April 26, 2007, Vol. 4, 1, pp. 29-35.
7. **Shaw, George M.,Hunter, Eric.** HIV Transmission. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 2012, Vol. 2, 11.
8. **Simon, Viviana, Ho, David D., Abdool Karim, Quarraisha.** HIV/AIDS epidemiology, pathogenesis, prevention, and treatment. *The Lancet*. August 5, 2006, Vol. 368, 9534, pp. 489-504.
9. **Hurt, Christopher B.,Nelson, Julie A.E.,Hightow-Weidman, Lisa B.,Miller, William C.** Selecting an HIV Test: A Narrative Review for Clinicians and Researchers. *Sexually Transmitted Diseases*. 2017, Vol. 44, 12.
10. **Cohen, Myron S., Shaw,George M., McMichael, Andrew J., Haynes, Barton F.** Acute HIV-1 Infection. *New England Journal of Medicine*. 2011, Vol. 364, pp. 1943-1954.
11. **Yilmaz, Gülden.** Diagnosis of HIV infection and laboratory monitoring of its therapy. *Journal of Clinical Virology*. 2001, Vol. 31, pp. 187-196.
12. MICROGEN, DIAGNOSTICS. *recomLine HIV-1 & HIV-2 IgG*. [Online] <https://www.mikrogen.de/en/products-automation/product-finder/recomline-hiv-1-hiv-2-igg>.
13. **I. Friedrichs, C. Buus, A. Berger, O.T. Keppler, H.F. Rabenau.** Evaluation of two HIV antibody confirmatory assays: Geenius™ HIV1/2 Confirmatory Assay and the recomLine HIV-1 & HIV-2 IgG Line Immunoassay. *Journal of Virological Methods*. 2015, Vol. 224, pp. 91-94.
14. **Bio-Rad.** [Online] March 2017. [https://extranet.who.int/prequal/sites/default/files/whopr\\_files/170317\\_final\\_pq\\_report\\_pqdx\\_0181\\_031\\_00\\_v3.pdf](https://extranet.who.int/prequal/sites/default/files/whopr_files/170317_final_pq_report_pqdx_0181_031_00_v3.pdf).

15. **Bharat S. Parekh, Chin-Yih Ou, Peter N. Fonjungo, Mireille B. Kalou, Erin Rottinghaus, Adrian Puren, Heather Alexander, Mackenzie Hurlston Cox, John N. Nkengasong.** Diagnosis of Human Immunodeficiency Virus Infection. *Clinical Microbiology Reviews*. 2018, Vol. 32.
16. **Mylonakis, E., Paliou, M., Rich, JD.** Plasma viral load testing in the management of HIV infection. *American family physician*. February 1, 2001, 3, pp. 483-90, 495-6.
17. **Jean-Philippe, P., Spiegel, H., Gnanashanmugam, D., Fitzgibbon, J., D'Souza, P., Crawford, K. W., Jayashankar, L., Bacon, M. C., Essajee, S. M., Aldrovandi, G. M., Cotton, M., & Abrams, E. J.** HIV birth testing and linkage to care for HIV-infected infants. *AIDS*. 31, August 24, 2017, Vol. 13, pp. 1797–1807.
18. **Ochodo, EA, Guleid, F, Deeks, JJ, and Mallett, S.** Point-of-care tests detecting HIV nucleic acids for diagnosis of HIV-1 or HIV-2 infection in infants and children aged 18 months or less. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2021.
19. **Haleyur Giri Setty, Mohan Kumar and Hewlett, Indira K.** Point of Care Technologies for HIV. *AIDS Research and Treatment*. 2014, 2014.
20. **Paraskevis, D., Nikolopoulos, G.K., Magiorkinis, G., Hodges-Mameletzis, I., Hatzakis, A.** The application of HIV molecular epidemiology to public health. *Infection, Genetics and Evolution*. 46, 2016, pp. 159-168.
21. **Rouet, F., Foulongne, V., Viljoen, J., Steegen, K., Becquart, P., Valéa, D., Danaviah, S., Segondy, M., Verhofstede, C., Philippe {Van de Perre}.** Comparison of the Generic HIV Viral Load<sup>®</sup> assay with the Amplicor<sup>™</sup> HIV-1 Monitor v1.5 and Nuclisens HIV-1 EasyQ<sup>®</sup> v1.2 techniques for plasma HIV-1 RNA quantitation of non-B subtypes: The Kesho Bora preparatory study. *Journal of Virological Methods*. 2010, Vol. 163, 2, pp. 253-257.
22. **Gobbers, E., Fransen, K., Oosterlaken, T., Janssens, W., Heyndrickx, L., Ivens, T., Vereecken, K., Schoones, R., P. van de Wiel, G. van der Groen.** Reactivity and amplification efficiency of the NASBA HIV-1 RNA amplification system with regard to different HIV-1 subtypes. *Journal of Virological Methods*. 1997, Vol. 66, 2, pp. 293-301.
23. **Linnen, Jeffrey M., Gilker, J. Michael, Menez, A., Vaughn, A., Broulik, A., Dockter, J., Gillotte-Taylor, K., Greenbaum, K., Kolk, Daniel P., Mimms, Larry T., Giachetti, C.** Sensitive detection of genetic variants of HIV-1 and HCV with an HIV-1/HCV assay based on transcription-mediated amplification. *Journal of Virological Methods*. 2002, Vol. 102, 1-2, pp. 139-155.
24. **Zhang, L., Chen, J. G., & Zhao, Q.** Regulatory roles of Alu transcript on gene expression. *Experimental cell research*. October 15, 2015, pp. 113-118.
25. **Zhang, X., Chen, J.** HIV Reservoir: How to Measure It? *Current HIV/AIDS Reports*. April 1, 2024, Vol. 20, 2.
26. **Bollmann, F., Casper, I., Henke, J. et al.** qRT-PCR: a method and its difficulties. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. October 1, 2012, Vol. 385, 10.

27. **Charlins, P., Schmitt, K., Remling-Mulder, L., Hogan, L. E., Hanhauser, E., Hobbs, K. S., Hecht, F., Deeks, S. G., Henrich, T. J., & Akkina, R.** A humanized mouse-based HIV-1 viral outgrowth assay with higher sensitivity than in vitro qVOA in detecting latently infected cells from individuals on ART with undetectable viral loads. *Virology*. April 19, 2017, pp. 135-139.
28. **Metcalf Pate, Kelly A. and Pohlmeier, Christopher W. and Walker-Sperling, Victoria E. and Foote, Jeremy B. and Najarro, Kevin M. and Cryer, Catherine G. and Salgado, Maria and Gama, Lucio and Engle, Elizabeth L. and Shirk, Erin N. and Queen, Suzanne E. an.** A Murine Viral Outgrowth Assay to Detect Residual HIV Type 1 in Patients With Undetectable Viral Loads. *The Journal of Infectious Diseases*. April 2015, Vol. 212, 9, pp. 1387-1396.
29. **Mishra, S., Gohil, Y., Mehta, K., D'silva, A., Amanullah, A., Selvam, D., Pargain, N., Nala, N., Sanjeeva, G. N., & Ranga, U.** An Optimized Tat/Rev Induced Limiting Dilution Assay for the Characterization of HIV-1 Latent Reservoirs. *Bio-protocol*. April 22, 2022, Vol. 12, 8.
30. **Yeni, P.** Update on HAART in HIV. *Journal of hepatology*. 2006.
31. **Menéndez-Arias, L., Delgado, R.** Update and latest advances in antiretroviral therapy. *Trends in Pharmacological Sciences*. January 1, 2022, Vol. 43, 1.
32. **Ghosh, Arun K., Osswald, Heather L., Prato, Gary.** Recent Progress in the Development of HIV-1 Protease Inhibitors for the Treatment of HIV/AIDS. *Journal of Medicinal Chemistry*. June 9, 2016, Vol. 59, 11.
33. **Wang, Yue, Gu, Shuang-Xi, He, Qiuqin, Fan, Renhua.** Advances in the development of HIV integrase strand transfer inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2021, Vol. 225.
34. **Prada, N., & Markowitz, M.** Novel integrase inhibitors for HIV. *Expert Opinion on Investigational Drugs*. 2010, Vol. 19, 9, pp. 1087–1098.
35. **Eisinger, Robert W., Dieffenbach, Carl W., Fauci, Anthony S.** HIV Viral Load and Transmissibility of HIV Infection: Undetectable Equals Untransmittable. *JAMA*. 2019, Vol. 321, pp. 451-452.
36. UNAIDS. *Undetectable=Untransmittable*. [Online] July 20, 2018. <https://www.unaids.org/en/resources/presscentre/featurestories/2018/july/undetectable-untransmittable>.
37. **Rodger AJ, Cambiano V, Bruun T, et al.** Sexual Activity Without Condoms and Risk of HIV Transmission in Serodifferent Couples When the HIV-Positive Partner Is Using Suppressive Antiretroviral Therapy. *JAMA*. 2016, Vol. 316, pp. 171-181.
38. **Ford, N., Meintjes, G., Vitoria, M., Greene, G., & Chiller, T.** The evolving role of CD4 cell counts in HIV care. *Current opinion in HIV and AIDS*. March 12, 2017, Vol. 12, 2, pp. 123-128.
39. **Thate, Ranjana N., Ingole, Dr Nayana, Solanke-Surase, Vaishali, Joshi, Kavita, Bajpayi, Smrati, Acharya, Shrikala, Nataraj, Gita.** Role of CD4 count estimation in the era of HIV-1 viral load among PLHIV. *Indian Journal of Medical Microbiology*. November 1, 2023.

40. clinicalinfo.hiv.gov. *Guidelines for the Use of Antiretroviral Agents in Adults and Adolescents With HIV*. [Online] May 26, 2023. <https://clinicalinfo.hiv.gov/en/guidelines/hiv-clinical-guidelines-adult-and-adolescent-arv/virologic-failure-and-antiretroviral#:~:text=Virologic%20Response%20Definitions&text=Virologic%20suppression%3A%20A%20confirmed%20HIV,level%20%3C200%20copies%2FmL>.
41. **Broyles, Laura N., Luo, Robert, Boeras, Debi, Vojnov, Lara.** The risk of sexual transmission of HIV in individuals with low-level HIV viraemia: a systematic review. *The Lancet*. August 5, 2023, Vol. 402, 10400.
42. **Crespo-Bermejo, C., de Arellano, E. R., Lara-Aguilar, V., Valle-Millares, D., Gómez-Lus, M. L., Madrid, R., Martiin-Carbonero, L., Briz, V.** Persistent low-Level viremia in persons living with HIV undertreatment: An unresolved status. *Virulence*. December 2021, 2021, Vol. 12, 1.
43. **Mohammadi, A., Etemad, B., Zhang, X. et al.** Viral and host mediators of non-suppressible HIV-1 viremia. *Nature Medicine*. December 1, 2023, Vol. 29, 12.
44. **Goupil de Bouillé, J., Collignon, M., Capsec, J., Guillon, L., Le Moal, G., Barin, F., Gras, G. et al.** Low-level HIV viremia is associated with low antiretroviral prescription refill rates and social deprivation. *AIDS Care*. August 20, 2020, Vol. 33, pp. 1445-1450.
45. **Esteban-Cantos, A., Montejano, R., Pinto-Martínez, A., Rodríguez-Centeno, J., Pulido, F., Arribas, J. R.** Non-suppressible viraemia during HIV-1 therapy: a challenge for clinicians. *The Lancet HIV*. May 1, 2024, Vol. 11, 5.
46. **Ryscavage, P., Kelly, S., Li, J. Z., Harrigan, P. R., & Taiwo, B.** Significance and clinical management of persistent low-level viremia and very-low-level viremia in HIV-1-infected patients. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2014, Vol. 58, pp. 3585-3598.
47. Cepheid. *Xpert® HIV-1 Viral Load XC*. [Online] 2024. <https://www.cepheid.com/en-GR/tests/blood-virology-womens-health-sexual-health/xpert-hiv-1-viral-load-xc.html>.
48. **Ρέστα, Π.** *Επιδημιολογική Επιτήρηση του ιικού φορτίου και του γονοτύπου του ιού HIV-1 σε νεοδιαγνωσθείσες λοιμώξεις*. ΔΗΜΟΚΡΙΤΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΡΑΚΗΣ & ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ. Αθήνα : s.n., 2023.
49. HOLOGIC. *Aptima® Virology*. [Online] <https://www.hologic.com/hologic-products/diagnostic-solutions/aptima-virology>.
50. **HOLOGIC.** *www.hologic.com. Aptima HIV-1 Quant Dx Assay*. [Online] 2021.
51. **Swinkels, H.M., Justiz Vaillant A.A., Nguyen A.D., et al.** *HIV and AIDS*. s.l. : StatPearls, 2024.
52. **Bai, R., Lv, S., Hua, W., Su, B., Wang, S., Shao, Y., Li, Z., Liu, A., Sun, L., & Dai, L.** Factors associated with human immunodeficiency virus-1 low-level viremia and its impact on virological and immunological outcomes: A retrospective cohort study in Beijing, China. *HIV medicine*. March 15, 2022, pp. 72-83.

53. UNAIDS. *Global HIV & AIDS statistics — Fact sheet*. [Online] August 2, 2024.
54. WHO. *The Global Health Observatory*. [Online] 2023. [https://www.who.int/data/gho/data/indicators/indicator-details/GHO/estimated-antiretroviral-therapy-coverage-among-people-living-with-hiv-\(-\)](https://www.who.int/data/gho/data/indicators/indicator-details/GHO/estimated-antiretroviral-therapy-coverage-among-people-living-with-hiv-(-)).
55. WHO. *HIV data and statistics*. [Online] 2024. [https://cdn.who.int/media/docs/default-source/hq-hiv-hepatitis-and-stis-library/j0482-who-ias-hiv-statistics\\_aw-1\\_final\\_ys.pdf?sfvrsn=61d39578\\_3](https://cdn.who.int/media/docs/default-source/hq-hiv-hepatitis-and-stis-library/j0482-who-ias-hiv-statistics_aw-1_final_ys.pdf?sfvrsn=61d39578_3).
56. IeDEA International epidemiology Databases to Evaluate AIDS. *NA-ACCORD*. [Online] 2024.
57. **NA-ACCORD**. The North American AIDS Cohort Collaboration on Research and Design (NA-ACCORD). *HIV Care Continuum*. [Online] 2021. <https://naaccord.org/monitoring>.
58. **Rapid Response Service**. Low-level HIV viremia: Definitions, predictors, mechanisms, and clinical outcomes. [ed.] Jean Bacon. *Toronto, ON: The Ontario HIV Treatment Network*. January 2022.
59. *Low-Level Viremia Trends Among Persons With HIV: A 5-Country Analysis From 10 PHIA Surveys*. **Justman, Jessica E.** 2024. Using Data to Inform Interventions: Epidemiology of HIV, STIs, Mpox, and COVID-19.
60. **Aoko, A., Pals, S., Ngugi, T., Katiku, E., Joseph, R., Basiye, F., Kimanga, D., Kimani, M., Masamaro, K., Ngugi, E., Musingila, P., Nganga, L., Ondondo, R., Makory, V., Ayugi, R., Momanyi, L., Mambo, B., Bowen, N., Okutoyi, S., & Chun, H. M.** Retrospective longitudinal analysis of low-level viremia among HIV-1 infected adults on antiretroviral therapy in Kenya. *EClinicalMedicine*. September 2023, Vol. 63.
61. **Chun, H. M., Abutu, A., Milligan, K., Ehoche, A., Shiraishi, R. W., Odafe, S., Dalhatu, I., Onotu, D., Okoye, M., Oladipo, A., Gwamna, J., Ikpeazu, A., Akpan, N. M., Ibrahim, J., Aliyu, G., Akanmu, S., Boyd, M. A., Swaminathan, M., Ellerbrock, T., Staffor.** Low-level viraemia among people living with HIV in Nigeria: a retrospective longitudinal cohort study. *The Lancet*. December 2022, Vol. 10, 12.
62. **Han, Win Min and Broom, Jennifer and Bopage, Rohan and Templeton, David J. and Edmiston, Natalie and Petoumenos, Kathy and the Australian HIV Observational Database.** Investigating rates and predictors of viral blips, low-level viraemia and virological failure in the Australian HIV observational database. *Tropical Medicine & International Health*. November 27, 2023, Vol. 29, 1, pp. 42-56.
63. **Schmidt, D., Kollan, C., Stoll, M. et al.** Everything counts - a method to determine viral suppression among people living with HIV using longitudinal data for the HIV care continuum - results of two large, German, multi-center real-life cohort studies over 20 years (1999–2018). *BMC Public Health*. January 22, 2021, Vol. 21, 1.

64. **Brattgård H, Björkman P, Nowak P, Treutiger CJ, Gisslén M, et al.** Factors associated with low-level viraemia in people with HIV starting antiretroviral therapy: A Swedish observational study. *PLOS ONE*. May 17, 2022, Vol. 17, 5, pp. 1-11.
65. **Elvstam, O., Malmborn, K., Elén, S., Marrone, G., García, F., Zazzi, M., Sönnnerborg, A., Böhm, M., Seguin-Devaux, C., & Björkman, P.** Virologic Failure Following Low-level Viremia and Viral Blips During Antiretroviral Therapy: Results From a European Multicenter Cohort. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. January 1, 2023, Vol. 76, 1, pp. 25-31.
66. **(ART-CC), The Antiretroviral Therapy Cohort Collaboration.** Impact of low-level viremia on clinical and virological outcomes in treated HIV-1-infected patients. *AIDS*. January 28, 2015, Vol. 29, 3, pp. 373-383.
67. **Ding, H., Xu, J., Liu, J., Wang, Q., Kang, J., Li, X., Zhang, Z., Han, X., Jiang, Y., Geng, W., & Shang, H.** Outcomes of persistent low-level viremia among HIV patients on antiretroviral therapy: A prospective cohort study. *HIV medicine*. March 15, 2022, Vol. 23, S1, pp. 64-71.
68. **Fleming, J., Mathews, W. C., Rutstein, R. M., Aberg, J., Somboonwit, C., Cheever, L. W., Berry, S. A., Gebo, K. A., Moore, R. D., & HIV Research Network.** Low-level viremia and virologic failure in persons with HIV infection treated with antiretroviral therapy. *AIDS*. November 1, 2019, Vol. 33, 13.