

OTKA 48917

KUTATÁSI ZARÓJELENTÉS

HIV variánsok genotípus meghatározása: gyógyszer-rezisztens HIV mutánsok kimutatása nem kezelt HIV fertőzöttekben

Dr.Nagy Károly

A pályázat célja volt , hogy antiretrovirális gyógyszerekkel még nem kezelt (ún.terápia naív), primer HIV fertőzött egyénekben replikálódó HIV variánsok reverz transzkriptáz ill. proteáz génjeinek gyógyszer rezisztenciához vezető mutációit molekuláris biológiai módszerekkel felderítsük, abból a célból, hogy ezek alapján optimalizált, individualizált gyógyszeres stratégiák kidolgozása és alkalmazása váljon lehetővé.

A vírusoknak minden más szervezethez hasonlóan szükségük van az adaptációra, hogy túléljék a változó környezetet és olyan változatos mechanizmusokat fejlesszenek ki, amelyek a *genetikai diverzitást* idézik elő. A víruspopuláció szelektív gyógyszernyomás hiányában is számos genetikai variánst tartalmaz, olyan mutációkkal, amelyek gyógyszer rezisztenciához társulnak és mint egyedi ritka esetek fordulnak elő egy nagy populációban. Az antivirális gyógyszer jelenléte megváltoztatja a víruspopulációra gyakorolt szelektív nyomást. Bármelyik előzetesen meglévő „rezisztens variáns” így előnybe kerül a vad típusú versenytársaihoz képest (relatív fitness emelkedés). A rezisztens vírusok száma megnövekszik a vad típusú vírusokhoz képest és végezetül olyan populációt eredményez, amelyek *elsősorban* gyógyszer rezisztens vírusokból állnak. A gyógyszer-rezisztencia olyan vírusok megjelenésével jár, amelyek kikerülnek a kombinációs kezeléseket és az AIDS progressziójához vezetnek

A HIV genom mutációs rátája magas, mivel a HIV RT nem rendelkezik DNS „*proof-reading*” aktivitással, következésképpen nagy hibaszázalékkal dolgozik. A HIV genom kb.10 ezer nukleotid bázist tartalmaz és becslések szerint a mutációs ráta 1/10.000 nukleotid replikációs ciklusonként. A fontos vírusfehérjéket érintő néhány mutáció hatása a következő lehet:

- a vírus virulenciáját érintheti (a vírus azon képességét, hogy betegséget okoz)
- a fitnesszt érintheti (a vírus azon képességét, hogy replikálódik és a populációban lévő más vírusokkal vetélkedik)
- retrovirális gyógyszerekkel szemben rezisztenciát alakít ki.

Nagyon sok egymásra ható tényező befolyásolja a gyógyszer rezisztens HIV-variánsok kialakulását klinikai körülmények között. Jelenleg mintegy 30 az engedélyezett antiretrovirális gyógyszerek száma. Laboratóriumokban már az összes ilyen gyógyszerre rezisztens HIV-variáns izolálásra kerül, ezek nagysága a klinikai anyagból változó. A rezisztens variánsok klinikai jelentősége még nem teljesen tisztázott, de úgy véljük, hogy az antivirális gyógyszerekkel szembeni rezisztencia az elsődleges oka a HIV fertőzésnél fellépő ún. „terápiás kudarcoknak” .

A HIV populáció egy fertőzött paciensben olyan genetikailag eltérő vírus variánsokból áll, amelyeket „quasi species”-eknek nevezünk és amelyek a kezdeti fertőző anyagból fejlődtek ki.

A HIV genetikai összetételének vizsgálata a tradicionális epidemiológia eszközeiből fontos klinikai eljárássá vált a HIV betegség progressziójának menedzselésében. A HIV genotipizálás elsődleges célja, hogy olyan specifikus mutációkat detektáljon a HIV 1 genomon belül a reverz transzkriptáz (RT) és proteáz (PR) gének jól körülírt régióiban, amelyek az anti-retrovirális gyógyszerekkel szembeni rezisztenciához társulnak. A HIV genotipizálás segít abban is, hogy egyénre szabottan állapítsuk meg az antiretrovirális kezelést abból a célból, hogy maximális vírusszuppressziót érjünk el és a páciens életkilátásait meghosszabbítsuk.

Anyagok és Módszerek

Beteganyag

A betegek savóiból ill. lymphocytaiból izolált HIV vírusok genomjában nem a már antivirális szerekkel (HAART) kezeltékben kívántuk kimutatni a kezeléssel szelekciós nyomás során kialakult gyógyszer rezisztencia mutációkat, hanem a még ilyen szerekkel nem kezelt, ún. terápia naív, primer HIV fertőzöttekben. E mellett olyan primer HIV fertőzötteket is vizsgáltunk, akik a vírus fertőzést külföldi, elsősorban Afrikai szexuális partnereiktől kapták. A beteganyagainkra vonatkozó vizsgálataink protokollját a Semmelweis Egyetem Regionális, Intézményi Tudományos és Kutatásaitikai Bizottsága **TUKEB 88/2008** engedélye alapján végeztük.

A vizsgálatokhoz 68 primer HIV fertőzött betegtől származó vérmintát gyűjtöttünk. A betegektől alvadásgátolt vért vetünk, és vérplazmát állítunk elő 4 órán belül, s feldolgozásig -80°C -n tárolunk.

Egyidejűleg Ficoll grádiensen szeparáltuk a lymphocytaikat is amelyeket DMSO-ban folyékony nitrogénben tárolunk.

Lymphocytá tipizálás Flow cytometriás módszerrel meghatározzuk a CD4 és CD8 lymphocyták számát és arányát. A legtöbb esetben a HIV RNS vírus kópia szám meghatározás eredménye is rendelkezésre áll. A pontos eredményhez olyan plazma mintákat használtunk, ahol a vírus mennyiség nagyobb, mint 1000 HIV RNS kópia/ml.

Szerológiai vizsgálatok

A betegek vérplazmájában ill. vérsavójában 4. generációs microplate Elisa módszerrel (HIV-1/2 Ag/Ab BioMérieux) detektáltuk a HIV specifikus ellenanyagokat. A pozitív esetek megerősítésére, ill. a HIV ellenanyag mintázat minőségi elemzésére Western blot eljárást alkalmazunk (Diagnostics Biotechnology).

DNS előállítás: egyidejűleg a betegek szeparált lymphocytaiból ill teljes (alvadásgátolt) vérmintáiból közvetlenül DNS-t tisztítunk (Gentra kit). A DNS-eket -20°C -n tároljuk.

Molekuláris biológiai kimutatási eljárások

CCR5 HIV coreceptor-gén polymorphismus kimutatása: A HIV-1 vírus csak azokat a sejteket képes fertőzni, amelyek a megfelelő sejt felszíni receptorral rendelkeznek. A HIV fertőzés szempontjából elsődleges receptornak számít a CD4 receptor, de a produktív fertőzéshez másodlagos receptorok egyidejű jelenlétére is szükség van. Ilyen másodlagos receptorok a kemokin receptorok. A primer HIV fertőzések döntő többségét okozó, makrofág

tróp vírusok a CCR5 kemokin receptorokat használják. A CCR5 gén mutációját, polymorfizmusát ill. a heterozygóta allél frekvenciát vizsgáljuk PCR technikával, az általunk tervezett primerek felhasználásával. Mivel e gén által kódolt kemokin receptor intaktsága befolyásolja a vírus fertőzőképességét ill. a betegség progresszióját is, addicionális szerepet játszik a specifikus gyógyszer rezisztenciához vezető mutációval rendelkező HIV variánsok replikációjában is .

HIV genotipizálás immobilizált reverz DNS hibridizációval (HIV-1 InnoLIPA)

A rendszer a reverz hibridizáció koncepcióján alapul, ahol a biotinilált RT-PCR termék a membrán csíkokon immobilizált specifikus oligo-nukleotidokhoz hibridizálódik. Az eljárás elve a biotinilált PCR fragment reverz hibridizációján alapul, amely fragment a HIV-1 genom RT és PR megfelelő szakaszaiból származik. E szakaszokat a betegek sejtjeinek provirális DNS-éből a megfelelő specifikus primer párokkal való PCR amplifikációval állítjuk elő. A rövid oligo-nukleotid próbák mint párhuzamos csíkok vannak immobilizálva a membránon. Ezek az oligo-nukleotid próbák mind a vad típusú mind pedig a HIV-1 RT és PR gén egybázisú mutációs helyeit tartalmazzák, amelyek az antiretrovirális gyógyszerekkel szembeni specifikus rezisztencia fenotípusának felelnek meg. Az amplikonokat biotinnal jelöljük és e célszekvenciákat hibridizáltatjuk ezekkel az immobilizált oligo-nukleotid próbákkal. A hibridizáció színreakcióval detektálható. E színes jelek lokalizációja és sorrendje határozza meg a specifikus vad típusú, kevert vagy mutáns codonok jelenlétét.

RT-PCR - PCR: A HIV fertőzöttek plazmájából az ismert módszerekkel RNS-t tisztítunk majd a HIV-1 RNS RT-PCR-ja segítségével complemeter DNS-t (cDNS) állítunk elő. Ezt követően a HIV reverz transzkriptáz (RT) gén két szakaszát kijelölő szenz és aniszenz primer párral (RT 39/RT142, ill. RT142/RT241) egy 103 és 99 bp hosszúságú szakaszt amplifikálunk, amely az RT 5' végét reprezentálja. Ugyanilyen PCR amplifikációt végzünk a HIV proteáz (PR) gén középső szakaszán, két, átfedő régió megsokszorozásával PR1-PR46 – PR99 primerek segítségével.

DNS szekvenálás: A PCR amplikonokat a szokásos módon fluoresceinnel jelöljük, és nukleotid szekvenciájukat DNS szekvenátorral (Applied Biosystem) határozzuk meg. A kapott nukleotid sorrendet (szekvenciákat) a különböző adatbázisokban rendelkezésre álló HIV-1 RT és PR konszenzus szekvenciákkal hasonlítjuk össze.

A közvetlen szekvenálás a legpontosabb és automatizálható eljárás a DNS fragmentek polimorfizmusának és mutációinak a feltérképezésére. A számos fluorescein alapú PCR termék szekvenálási lehetőség közül a Taq DNS polimerázzal és a festékkel jelölt di-deoxi láncterminációval történő szekvenálás a legsokoldalúbb, mivel ez eliminálja a speciális modifikált szekvenálási primerek iránti igényt. Ugyanaz a primer használható a PCR-reakcióban és mint szekvenáló primer is. Mivel a különböző fluorescein festékek mind a négy dideoxid-nukleotidba beépülnek, a szekvenálási reakciót egyetlen egy csőben lehet végrehajtani. A végtermék a HIV genom egy olyan fragmentje, amelyik 4 fluorescens festékkel van megjelölve, mind a négy fajta nukleotid eggyel-eggyel. A poli-akrilamid gél elektroforézis során a fluoresceinnel jelzett termékek aktiválással detektálhatók és a szekvencia információk közvetlen komputerben tárolhatók. Ennek alapján mindkét enzim génjének 4-4 átfedő szakaszát jelöltük ki, szintetizáltattunk hozzájuk 4-4- primer párt (a kijelölt szakaszok:RT: 2069-2991 bp; 2147-2982 bp; 2245-2981 bp; 2255-2937 bp, ill. PR: 2788-3635 bp; 2820-3593 bp; 2825-3634 bp és 2872-3595bp). A fragmentek DNS amplifikálását Corbett CG-1 optimalizáló thermocycler berendezéssel végeztük, ahol a gén

amplifikáció optimalizálása a ciklus számra, a cikluson belüli időre és az annealing hőmérsékletre terjedt ki. Ez utóbbi 51,55,59,és 63 C-fok skálájú volt. A HIV RT gén esetében az optimális amplifikáció a külső primer párral 40 ciklus, belső primer párral 35 ciklus, és a végső 723 bp fragment a leghatékonyabban 59C-fokos annealing mellett volt amplifikálható. A HIV PR gén esetében szintén a külső primerekkel 40 ciklus, belső primerekkel 35 ciklus, és a 682 bp-nyi végső fragment 51 C-fokos annealingnél volt optimálisan amplifikálható. Az egy betűs kódot ez után össze lehet hasonlítani a génbankból származó HIV típusok konszenzus szekvenciáival, amely a Stanford HIV Drug-resistance Database alkalmazásával történt (<http://hivdb.stanford.edu>).A gyógyszer rezisztens mutációk jelenléte az analizált régió specifikus codonján azonosítható, a szekvencia eredmények vizuális megtekintésével.

Trugene HIV-1 Genotipizáló Rendszer

A HIV-1 RT és PR gének gyógyszer rezisztenciához vezető mutációit a Trugene HIV-1 Genotipizáló készlettel és az OpenGene Sequencing System (Siemens) segítségével határozzuk meg, a gyártó előírását betartva. Röviden: A plasmából (200 μ l) izoláltuk a vírus RNS-eket (Qiamp, Quiagene). Az RNS extraktumot az RT-PCR reagensekkel hoztuk össze (RNase inhibitor, Taq polymerase, deoxyoligonucleotidok, detergens, magnesium). Az RT PCR a teljes protease gént amplifikálja és a reverse transcriptase gén első 250 codonját. Az RT-PCR terméket 16 szekvencia reakcióhoz adtuk ezután, ahol a DNS amplifikáció és szekvenálás egy csőben történt (CLIP elv). A szekvencia termékeket 6%-os polyacrylamide-urea-Tris-borate-EDTA gel electrophoresis után UV fény mellett vizualizáltuk.

HIV-1 RT és PR gén szekvencia analízis

A DNS szekvenciákat automatikus valós-idejű DNS szekvenátorral határoztuk meg (Siemens OpenGene Sequencing System), a HIV-1 B altípus (HIV-1_{LAI}) vad típusú referens szekvenciával való összehasonlítással.(*Kanizsai Sz. et al. Acta Microbiologica 2010*)

HIV-1 altípus meghatározás

A HIV-1 vírus izolátumok altípusmeghatározása szekvenciájuknak referens szekvenciákkal való összehasonlításával történt a Stanford HIV Drug Resistance Database (<http://hivdb.stanford.edu>) alkalmazásával.

Vírus izolálási és sejtenyésztési eljárások

A betegek HIV vírusainak izolálására a betegekből szeparált lymphocytákat MT-2 humán permanens lymphoid sejtekkel (American Type and Tissue Culture) ko-kultiváljuk. Az MT-2 sejteket 10^5 sejt / mélyedés (2 cm², 2 ml) sűrűségben 24-lyukú sejtenyésztő tálcára ültetjük ki. Ezekhez adjuk a betegek lymphocytáit (10^5 sejt) A tápközeg 20% FCS –el kiegészített RPMI 1640 médium. A sejtenyésztő tálcákat 37°C-on, 5% CO₂ atmoszféra mellett inkubáljuk. A vírusok cytopátiás hatását 3 nap múlva a keletkezett többmagvú óriássejtek (szincíciumok) megjelenése és száma alapján ítéljük meg.

A gyógyszer rezisztens HIV variánsok jellemzése

A mutációk és a gyógyszer rezisztencia összefüggésének számítógépes analízisével megállapíthatók az elsődleges és másodlagos mutációk. Az *elsődleges mutációk* azok, amelyek megváltoztatják a gyógyszernek a célmolekulához való kötődését, amely így annak a gyógyszernek a megnövekedett mennyiségéhez vezet, amely szükséges az enzim gátlásához.

A *másodlagos mutációk* megemelik a rezisztencia szintet azáltal, hogy fokozzák az elsődleges mutációt hordozó vírusok fitnessét. Általában a másodlagos mutációknak kis hatásuk van, vagy egyáltalán nincs hatásuk a rezisztenciára az elsődleges mutáció hiányában. Az ismert codonokon kimutatható mutációk alapján megállapítottuk a hozzájuk rendelt, rájuk *specifikus gyógyszer rezisztenciát, kereszt rezisztenciát, multi-drug rezisztenciát*, ill. a lehetséges *gyógyszer érzékenységet*.

EREDMÉNYEK

A gyors HIV repilkáció során nagyszámú genetikai mutáció lép fel, amelyek gyógyszer-rezisztens HIV variánsokat eredményeznek. Ezek a mutációk a HIV genomon belül azon enzim-géneket érintik, amelyek elsődleges támadáspontjai a jelenlegi AIDS-ellenes gyógyszereknek: a reverz transzkriptáz (RT) enzim és a polimeráz (PI) enzim. Vizsgálatainkban a pol (RT/PR) gén olyan mutációit kerestük gyógyszerrel nem kezelt primer HIV fertőzöttekből izolált HIV vírusok genomjaiban, amelyek gyógyszer-rezisztenciához társulnak.

Az integrálódott HIV provirális DNS-eket a fertőzött páciensek lymphocytaiból tisztítottuk. Fészkés PCR-t alkalmaztunk a HIV pol szekvenciák amplifikálására. A gyógyszer rezisztens genotípusokat a HIV RT gén mutáció analízisével (in situ DNS hybridizáció) határoztuk meg Line Probe assayben. Ennek során a HIV RT mintákat szilárd fázishoz kötött 20 olyan oligonukleotiddal hibridizáltattuk amelyek gyógyszer rezisztens mutációkat tartalmaztak. A vizsgált egyének 15%-ában olyan vírus variánsokat mutattunk ki, amelyek a pol génben a következő gyógyszer-rezisztenciával összefüggő mutációkat tartalmazták: M41, T69R, K70R, M184V, T215Y. Az M184V és a T215Y volt a leggyakoribb, jelezve az RT inhibitorokkal - zidovudine (AZT), stavudine (D4T), lamivudine (3TC) és emtricitabine (FTC) – szembeni rezisztenciát.

A nukleozid RT gátlókra rezisztens HIV mutánsokat a 2000. év előtt fertőződött esetek 10%-ában, míg a 2000. év után fertőződöttek ~ 20%-ában mutattunk ki. Többszörös gyógyszer-rezisztens vírusok (2-3 gyógyszerre) a vizsgáltak 3.5%-ában voltak jelen, elsősorban a frissebben fertőzöttek között. Ezek az eredmények a gyógyszer-rezisztencia bizonyos evolúcióját mutatják, amelyek a hazai kombinációs terápiák bevezetésének idejével (időpontjával) korrelálnak.

Az in situ DNS hybridizációs eljárással és a direkt DNS szekvenálással kapott rezisztencia eredményeket több hazai és nemzetközi konferencián tartott előadásban és egy angol nyelvű **közleményben** (Juhász E, Ghidán A, Kemény B, Nagy K.: *Emergence of antiretroviral drug resistance in therapy-naïve HIV infected patients in Hungary*. Acta Microbiol. Immunol. Hung. 55(4), 383-394, 2008.) foglaltuk össze.

A HIV-1 pol génen belül az RT és PR géneken lévő, gyógyszer rezisztenciához vezető mutációkat teljes genotypizálással 28 olyan magyar HIV fertőzöttben (13 férfi és 15 nő) vizsgáltuk, akik külföldi szexuális partner(ei)k révén fertőződtek meg. A nemi partnerek 60.5%-a afrikai országokból (Elefántcsontpart, Ghana, Kamrun, Nigéria, Szudán és Uganda) származott, 36%-a európai országokból, elsősorban Romániából és Németországból, és 3.5%-a Ázsiából (Vietnam).

A HIV-fertőzés leggyakoribb formája a vizsgáltak között a heteroszexuális transzmisszió volt (67.8%), ezt követte a homoszexuális átadódás (21.4%), míg az intravénás fertőződés 7.2% volt, a nozokomiális pedig 3.6%.

A HIV-1 Truegene genotipizálással az RT és PR gének 72 codonját elemeztük, amelyek közül 64 speciális rezisztencia codon volt. Ezek 6 nukleozid reverz transzkriptáz inhibitor (NRTI), 2 nem-nukleozid reverz transzkriptáz inhibitor (NNRTI) és 6 proteínáz inhibitor (PRI) reprezentáltak. Össességében a vizsgáltak 145-ében tudunk valamilyen antivirális szerrel szembeni rezisztenciát kimutatni. Az egyes inhibitor csoportokkal szembeni rezisztencia a következő volt: NRTI: 8% (férfiak 14%, nők 5%), NNRTI: 5% (de a homoszexuális kapcsolatok során átadódó vírusok 25%-a! NNRTI rezisztens volt). A PR inhibitorokkal szembeni rezisztencia átlagosan 12% volt (férfiak 16%, nők 8%).

Az összes vizsgáltak 14%-a fertőződött legalább egyfajta gyógyszerre rezisztens vírussal, míg 11%-uk kétféle, és 7%-uk háromféle gyógyszer-csoportra volt rezisztens. Egyolyan fertőzöttet találtunk, aki 12 fajta HIV antiretrovirális gyógyszerre rezisztens vírussal rendelkezett.

HIV-1 altípus elemzések

A vizsgált személyekből izolált HIV variánsok több mint 71%-a nem az Európában leggyakoribb ill. hazánkban is az eddigi fertőzések döntő többségét kiváltó HIV-1 B altípusba (Nagy K., Barabás É., Várkonyi V., Horváth A.: Determination of HIV-1 subtype in Hungary by synthetic peptides representing the V3 loop of *env* Pathol.Oncol.Res. 2:268-271 (1996)) tartozott. A nem európai altípusok közül a A, C (10.7%), E, F1 (7.2%), G (3.6%), J and K volt kimutatható. A domináns keringő rekombináns formák (CRF) közül a CRF02_AG (28.5%), CRF06_cpx(17.8%) and CRF11_cpx(3.6%) volt megtalálható, jelezve a nem-B altípusú és Afrikai rekombináns törzsek nemrég történt penetrációját Magyarországon.

A komplett genotipizálási vizsgálatok és non-B altípus elemzések eredményeit számos hazai és nemzetközi konferencián tartott előadásban és egy, magyar és egy angol nyelvű közleményben foglaltuk össze (Nagy K., Horváth A.: *A HIV vírus 25 éve* Orv.Hetil. 151(4):133-137 (2010), és Kanizsai Sz., Ghidán Á., Újhelyi E., Bánhegyi D., Nagy K.: *Monitoring drug resistance in therapy-naive HIV infected patients and detection of African HIV subtypes in Hungary* Acta Microbiol. Immunol. Hung. 57(1), 2010.) foglaltuk össze.

Az eredményekből levonható következtetések, és vizsgálataink gyakorlati haszna

A HIV fertőzés ill. az AIDS a fejlett országokban már jól kézben tartható, krónikus, kezelhető betegséggé változott. Továbbra sem vagyunk képesek gyógyítani a betegséget, de a jelenleg rendelkezésre álló antiretrovirális terápiával (HAART) a fertőzöttek nagy része remisszióban tartható, és sok évvel meghosszabbíthatók minőségi életkilátásaik. A vírus ellenes szerekekkel való nagyfokú kezelés azonban egyre több gyógyszer rezisztens mutáns vírus kialakulásához vezet.

Mind gyakoribb az olyan HIV fertőzött egyén, akik annak ellenére, hogy nem kaptak antiretrovirális kezelést, mégis olyan vírusokat hordoznak, amelyek egy vagy több antiretrovirális ágenssel szemben rezisztensek. E szignifikáns hordozási szint bizonyos populációkban azt jelzi, hogy a fertőzés eleve rezisztens vírussal történt. Ilyen gyógyszer-rezisztens HIV-1 variánsokat mutattunk ki nem kezelt magyar fertőzöttek 14%-ában. Ez az arány magasabb mint a legtöbb európai országban, ahol az átlag kb. 12%. (Kivéve Angliát, ahol 16%).

Kutatási pályázatunk egyedisége és ezért erőssége, hogy terápia naív primer HIV fertőzöttekben lemeztük az azoknak a vírus mutációknak az előfordulását és gyakoriságát amelyek a jelenlegi RT és PR inhibitorokkal szembeni gyógyszer rezisztenciához vezetnek. Ilyen jellegű virológiai kutatások még nem történtek Magyarországon. Vizsgálataink során új ismereteket nyertünk a gyógyszer rezisztenciához vezető mutációkkal rendelkező vírusok replikációs tulajdonságairól, a mutáns vírus – sejt ill. a vírus és a szervezet immunrendszere közötti kölcsönhatásokról.

A tudományos érdekesség és újdonság mellett e kutatómunkának jelentős gyakorlati értéke is van, mivel ennek alapján a hazai klinikusoknak tanácsot tudunk adni arra vonatkozóan, hogy amikor már a HIV/AIDS kezelésre kerül sor, milyen gyógyszerrel *ne* próbálkozzanak, mert a beteg HIV vírusai arra rezisztensek. Mivel egy HIV fertőzött/AIDS –es személy évi kezelési költsége átlagban 10.000 Euro, nem kell hangsúlyozni, hogy eljárásunk a tudományos eredmények mellett milyen közvetlen haszonnal ill. megtakarítással jár.

Munkánk eredményeként a HIV-1 rezisztencia tesztek bevezetését javasoltuk a HIV fertőzöttek kezelését ellátó Szt.László kórház orvosainak, ahol ma már a klinikai gyakorlat részét képezik.

Kutatómunkánk alapján, annak eredményeire támaszkodva az Országos Epidemiológiai Intézet országos HIV-1 gyógyszer-rezisztencia monitoring rendszert vezetett be.

Az Orvosi Mikrobiológiai Szakmai Kollégium pedig felvette a HIV-1 gyógyszer rezisztencia eljárásokat (genotipizálás) a legújabb – HIV laboratóriumi diagnosztikája – irányelvekbe.

A rezisztencia teszt adatok alapján kivitelezett terápiás döntéseknek óriási jelentőségük van. A részletes rezisztencia profil, amelyeket ezen új nagy specificitású és érzékenységgű rezisztencia tesztek nyújtanak, nagy mértékben hozzájárulnak a racionális kezelési döntésekhez, részei lesznek az egyénre szabott terápiának mind annak kezdetén, mind esetleges kudarca során.

A lehetséges felhasználási módok:

- az eleve meglévő rezisztens vírusok felismerése. A HIV fertőzött egyének gyógyszer rezisztens variánsokkal fertőződhetnek a kezelés megkezdése előtt, mert pl. olyan valakitől kapták a fertőzést, akiben nagymennyiségű gyógyszer rezisztens vírus replikálódott.
- foglalkozási baleset esetén az egészségügyi dolgozóknál lehetséges a szóban forgó páciens HIV-rezisztencia profiljának a meghatározása és ennek alapján eldönteni a leghatékonyabb fertőzés utáni profilaktikus kezelést.
- a horizontális terjedés mellett rezisztens vírusok vertikálisan is anyáról gyermekekre is átadódhatnak, s a rezisztencia teszt életmentő lehet

Összefoglalva az antiretrovirális terápia végső célja, hogy olyan kezelési eljárásokat ismerjünk föl, amelyek teljes mértékben meggátolják a vírus replikációt. Hogy ezt elérjük, szükséges hogy kitégítsük a tudásunkat a terápiás kudarcokról az antiretrovirális szerekekkel szembeni gyógyszerérzékenységről és azokról a folyamatokról, amelyek során rezisztenciához vezető mutációk egymásra hatnak, abból a célból, hogy a leghatékonyabb kombinációs lehetőségeket fejlesszük ki.