

ΠΜΣ ΒΙΟΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΤΜΗΜΑ ΜΑΘΗΜΑΤΙΚΩΝ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΚΟΣΚΕΡΙΔΗΣ ΦΩΤΙΟΣ

Τίτλος:

**Εκτίμηση της κατηγορίας μετάδοσης για τους HIV-
οροθετικούς με άγνωστη κατηγορία μετάδοσης με μεθό-
δους μοριακής επιδημιολογίας**

ΑΘΗΝΑ, 2018

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο πλαίσιο των σπουδών για την απόκτηση του Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης στη

ΒΙΟΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ

που απονέμει η Ιατρική Σχολή και το Τμήμα Μαθηματικών του Εθνικού & Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών

Εγκρίθηκε την..... από την εξεταστική επιτροπή:

ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ

ΒΑΘΜΙΔΑ

ΥΠΟΓΡΑΦΗ

Δ. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗΣ (Επιβλέπων)

ΕΠ. ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

.....

Β. ΣΥΨΑ

ΕΠ. ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ

.....

Γ. ΜΑΓΙΟΡΚΙΝΗΣ

ΕΠ. ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

.....

*Στην Κατίνα
που αγαπάει με όλη της την καρδιά*

*Στη μικρή Εμέλια
που γεμίζει τον κόσμο μας με χαρά*

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά το Δρ. Δημήτρη Παρασκευή που ανέλαβε την επίβλεψη της διπλωματικής μου εργασίας και για την πολύτιμη καθοδήγησή του καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησής της. Επίσης, θα ήθελα να του εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου που μου πρόσφερε τη δυνατότητα να έρθω σε επαφή και να ασχοληθώ με ένα τόσο ενδιαφέρον επιστημονικό πεδίο.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω την υποψήφια Διδάκτορα Ευαγγελία-Γεωργία Κωστάκη για την σημαντική βοήθεια που μου πρόσφερε, ιδιαίτερα κατά την επαφή μου με τις τεχνικές της φυλογενετικής.

Ακόμη, ευχαριστώ πολύ τη Δρ. Βασιλική-Αναστασία Σύψα και το Δρ. Γκίκα Μαγιορκίνη για την τιμή που μου έκαναν να αποτελέσουν μέλη της εξεταστικής επιτροπής της διπλωματικής μου εργασίας, καθώς, επίσης, και για τις χρήσιμες παρατηρήσεις τους.

Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ, εκ βάθους καρδιάς, στην οικογένειά μου και ιδιαίτερα στους γονείς μου για όλη τη συναισθηματική, πνευματική και υλική υποστήριξη που μου έχουν προσφέρει.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Εισαγωγή	xv
Σκοπός	xvii
Γενικό Μέρος	1
Κεφάλαιο 1	3
1. Εισαγωγή στον Ιό της Ανθρώπινης Ανοσοανεπάρκειας (HIV)	3
1.1. Ιοί	3
1.1.1. <i>Η Δομή των Ιών</i>	3
1.1.2. <i>Ο Κύκλος Ζωής των Ιών</i>	4
1.1.3. <i>Η Ταξινόμηση των Ιών</i>	7
1.1.4. <i>Η Επιδημιολογία των Ιών</i>	7
1.1.5. <i>Η Ανακάλυψη, η Εξέλιξη και οι Θεωρίες Προέλευσης των Ιών</i>	8
1.2. Ρετροϊοί	9
1.2.1. <i>Η Δομή των Ρετροϊών</i>	9
1.2.2. <i>Ο Κύκλος Ζωής των Ρετροϊών</i>	10
1.2.3. <i>Η Ταξινόμηση των Ρετροϊών</i>	11
1.2.4. <i>Η Επιδημιολογία των Ρετροϊών</i>	12
1.3. Ο Ιός της Ανθρώπινης Ανοσοανεπάρκειας (HIV)	12
1.3.1. <i>Η Δομή του HIV</i>	13
1.3.2. <i>Ο Κύκλος Ζωής του HIV</i>	15
1.3.3. <i>Το Σύνδρομο Επίκτητης Ανοσολογικής Ανεπάρκειας (AIDS)</i>	17
1.3.4. <i>Η Ταξινόμηση και οι Υπότυποι του HIV</i>	18
1.3.5. <i>Η Επιδημιολογία του HIV</i>	19
1.3.6. <i>Η Ανακάλυψη, η Εξέλιξη και οι Θεωρίες Προέλευσης του HIV</i>	28
Κεφάλαιο 2	31
2. Εισαγωγή στη Μοριακή Επιδημιολογία	31
2.1. Μοριακή Εξέλιξη	31
2.1.1. <i>Το γενετικό υλικό: η πηγή όλης της πληροφορίας</i>	32
2.1.2. <i>Γενετική Απόσταση & Εξελικτικά Μοντέλα</i>	33
2.2. Φυλογενετική	36
2.2.1. <i>Στοιχισή Αλληλουχιών</i>	37
2.2.2. <i>Φυλογενετικά δέντρα</i>	37
2.3. Φυλογεωγραφία	39

Ειδικό Μέρος	41
Κεφάλαιο 3	43
3. Υλικό & Μέθοδοι	43
3.1. Επιλογή Δείγματος – Δεδομένων	43
3.2. Μέθοδος Φυλογενετικής Ανάλυσης	44
3.3. Μέθοδος Ανάλυσης Φυλογεωγραφίας	44
3.4. Μέθοδος Εκτίμησης Κατηγορίας Μετάδοσης	44
3.5. Εκτίμηση Αξιοπιστίας της Μεθόδου	45
3.6. Δευτερεύουσες Στατιστικές Αναλύσεις	45
Κεφάλαιο 4	47
4. Αποτελέσματα	47
4.1. Περιγραφικά Στοιχεία των Δεδομένων	47
4.2. Αξιοπιστία Μεθόδου	48
4.3. Κύρια Ανάλυση	53
4.4. Δευτερεύουσες Στατιστικές Αναλύσεις	59
Κεφάλαιο 5	61
5. Συζήτηση - Συμπεράσματα	61
5.1. Συζήτηση	61
5.2. Συμπεράσματα	62
Περίληψη	63
Abstract	65
Βιβλιογραφία	67

ΛΙΣΤΑ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1.1	Ταξινόμηση καταγεγραμμένων ιών από την Παγκόσμια Επιτροπή Ταξινόμησης των Ιών (ICTV)	7
Πίνακας 1.2	Ταξινόμηση καταγεγραμμένων ρετροϊών από την Παγκόσμια Επιτροπή Ταξινόμησης των Ιών (ICTV).....	12
Πίνακας 1.3	Ορισμένες σημαντικές πρωτεΐνες των γονιδίων του HIV και η λειτουργία τους	15
Πίνακας 1.4	Τα κλινικά στάδια της HIV/AIDS λοίμωξης με βάση τον αριθμό των CD4 ⁺ κυττάρων ανά mm ³ αίματος και ο βαθμός των συμπτωμάτων ανά στάδιο	18
Πίνακας 1.5	Συστηματική ταξινόμηση του HIV-1 και HIV-2.....	18
Πίνακας 1.6	Αριθμός νέων HIV λοιμώξεων και η αντίστοιχη επίπτωση για το έτος 2017, ανά γεωγραφική περιοχή, σύμφωνα με στοιχεία του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (WHO)	21
Πίνακας 1.7	Νέες διαγνώσεις της HIV λοίμωξης στην Ελλάδα για το 2017, κατά ηλικιακή ομάδα και κατά φύλο, σύμφωνα με στοιχεία του Κέντρου Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων (ΚΕ.ΕΛ.Π.ΝΟ.).....	23
Πίνακας 1.8	Σύνολο διαγνώσεων της HIV λοίμωξης στην Ελλάδα από την αρχή της επιδημίας μέχρι και το 2017, κατά κατηγορία μετάδοσης και κατά φύλο, σύμφωνα με στοιχεία του Κέντρου Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων (ΚΕ.ΕΛ.Π.ΝΟ.)	25
Πίνακας 2.1	Πίνακας Q που αναπαριστά τον στιγμιαίο ρυθμό νουκλεοτιδικής αντικατάστασης από το νουκλεοτίδιο i στο j σε μοντέλο αναστρέψιμου χρόνου	34
Πίνακας 4.1	Συχνότητες ανά φύλο και ανά κατηγορία μετάδοσης για τους 1495 HIV-οροθετικούς υπότυπου A1	47
Πίνακας 4.2	Αποτελέσματα των 86, από τις 100 τυχαία επιλεγμένες αλληλουχίες, για τις οποίες προέκυψε απόφαση κατηγορίας μετάδοσης κάνοντας εφαρμογή της μεθόδου, ανά εκτιμημένη κατηγορία μετάδοσης και ανά κριτήριο μεθόδου με βάση το οποίο έγινε η εκτίμηση	52
Πίνακας 4.3	Αποτελέσματα των 86, από τις 100 τυχαία επιλεγμένες αλληλουχίες, για τις οποίες προέκυψε απόφαση κατηγορίας μετάδοσης κάνοντας εφαρμογή της μεθόδου, ανά κατηγορία μετάδοσης από την εκτίμηση της μεθόδου και ανά δηλωθείσα κατηγορία μετάδοσης στο ΚΕ.ΕΛ.Π.ΝΟ.	52

Πίνακας 4.4	Αποτελέσματα των 171 αλληλουχιών με ακαθόριστη κατηγορία μετάδοσης ανά εκτιμημένη κατηγορία μετάδοσης και ανά κριτήριο μεθόδου με βάση το οποίο έγινε η εκτίμηση.....	57
Πίνακας 4.5	Συχνότητες ανά φύλο και ανά κατηγορία μετάδοσης για τους 1470 HIV-οροθετικούς υπότυπου A1	58
Πίνακας 4.6	Συχνότητες των κατηγοριών μετάδοσης για τις 1299 αλληλουχίες γνωστής κατηγορίας μετάδοσης και για τις 171 αλληλουχίες που εκτιμήθηκε η κατηγορία μετάδοσης μέσω της μεθόδου	59

ΛΙΣΤΑ ΓΡΑΦΗΜΑΤΩΝ

Γράφημα 1.1	Αριθμός οροθετικών με πρόσβαση σε αντιρετροϊκή θεραπεία από το 2003 μέχρι το 2012, σύμφωνα με στοιχεία του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (WHO).....	22
Γράφημα 1.2	Διαγνώσεις HIV λοίμωξης ανά 100.000 πληθυσμού στην Ελλάδα (2004-2017), σύμφωνα με στοιχεία του Κέντρου Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων (ΚΕ.ΕΛ.Π.ΝΟ.).....	22
Γράφημα 1.3	Θάνατοι σε άτομα με AIDS στην Ελλάδα για το έτος 2017, κατά έτος θανάτου και κατά φύλο, σύμφωνα με στοιχεία του Κέντρου Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων (ΚΕ.ΕΛ.Π.ΝΟ.).....	24
Γράφημα 1.4	Σύνολο διαγνώσεων της HIV λοίμωξης στην Ελλάδα από την αρχή της επιδημίας μέχρι και το 2017, κατά κατηγορία μετάδοσης (εξαιρουμένων των οροθετικών με ακαθόριστη κατηγορία μετάδοσης), σύμφωνα με στοιχεία του Κέντρου Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων (ΚΕ.ΕΛ.Π.ΝΟ.).....	26
Γράφημα 1.5	Νέες διαγνώσεις της HIV λοίμωξης στην Ελλάδα, για το χρονικό διάστημα 2010-2017, κατά κατηγορία μετάδοσης και κατά έτος διάγνωσης, σύμφωνα με στοιχεία του Κέντρου Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων (ΚΕ.ΕΛ.Π.ΝΟ.).....	26
Γράφημα 2.1	Διάφορες μορφές της Γ-κατανομής.....	36
Γράφημα 4.1	Κατανομή κατηγορίας μετάδοσης του δείγματος σε 1495 ασθενείς.....	48
Γράφημα 4.2	Πρώτο φυλογενετικό δέντρο χρωματισμένο σύμφωνα με την εκτίμηση της φυλογεωγραφικής ανάλυσης και χρωματισμένο μόνο για τις 100 τυχαίες αλληλουχίες που επιλέχθηκαν για τον έλεγχο της αξιοπιστίας της μεθόδου.....	49
Γράφημα 4.3	Δεύτερο φυλογενετικό δέντρο χρωματισμένο σύμφωνα με την εκτίμηση της φυλογεωγραφικής ανάλυσης και χρωματισμένο μόνο για τις 100 τυχαίες αλληλουχίες που επιλέχθηκαν για τον έλεγχο της αξιοπιστίας της μεθόδου.....	50
Γράφημα 4.4	Τρίτο φυλογενετικό δέντρο χρωματισμένο σύμφωνα με την εκτίμηση της φυλογεωγραφικής ανάλυσης και χρωματισμένο μόνο για τις 100 τυχαίες αλληλουχίες που επιλέχθηκαν για τον έλεγχο της αξιοπιστίας της μεθόδου.....	51
Γράφημα 4.5	Κατανομή των 86, από τις 100 τυχαία επιλεγμένες αλληλουχίες, ως προς την κατηγορία μετάδοσης που προέκυψε από την εφαρμογή της μεθόδου, καθώς επίσης και ως προς την συμφωνία ή μη των ευρημάτων που προέκυψαν από τη μέθοδο με τη δηλωθείσα κατηγορία στο ΚΕ.ΕΛ.Π.ΝΟ. (HCDCP).....	53
Γράφημα 4.6	Πρώτο φυλογενετικό δέντρο χρωματισμένο σύμφωνα με την εκτίμηση της φυλογεωγραφικής ανάλυσης και χρωματισμένο μόνο για τις 196 αλληλουχίες με ακαθόριστη κατηγορία μετάδοσης.....	54

Γράφημα 4.7	Δεύτερο φυλογενετικό δέντρο χρωματισμένο σύμφωνα με την εκτίμηση της φυλογεωγραφικής ανάλυσης και χρωματισμένο μόνο για τις 196 αλληλουχίες με ακαθόριστη κατηγορία μετάδοσης.....	55
Γράφημα 4.8	Τρίτο φυλογενετικό δέντρο χρωματισμένο σύμφωνα με την εκτίμηση της φυλογεωγραφικής ανάλυσης και χρωματισμένο μόνο για τις 196 αλληλουχίες με ακαθόριστη κατηγορία μετάδοσης.....	56
Γράφημα 4.9	Κατανομή των 171 αλληλουχιών με ακαθόριστη κατηγορία μετάδοσης ως προς την εκτιμημένη κατηγορία μετάδοσης	57
Γράφημα 4.10	Κατανομή της δηλωθείσας κατηγορίας μετάδοσης και του συνδυασμού δηλωθείσας-εκτιμημένης κατηγορίας μετάδοσης	58
Γράφημα 4.11	Κατανομή της δηλωθείσας κατηγορίας μετάδοσης και της εκτιμημένης κατηγορίας μετάδοσης	59

ΛΙΣΤΑ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1.1	Δομή τεσσάρων διαφορετικών τύπων ιού σε τρισδιάστατη απεικόνιση και σε φωτογραφία ηλεκτρονικού μικροσκοπίου	4
Εικόνα 1.2	Μόλυνση του κυττάρου	5
Εικόνα 1.3	Τα βασικά βήματα του κύκλου ζωής ενός ιού	6
Εικόνα 1.4	Δομή ενός τυπικού ρετροϊού.....	10
Εικόνα 1.5	Σχηματική Απεικόνιση του κύκλου ζωής ενός τυπικού ρετροϊού	11
Εικόνα 1.6	Δομή Γονιδιώματος HIV-1	14
Εικόνα 1.7	Δομή ενός στελέχους HIV	14
Εικόνα 1.8	Σχηματική απεικόνιση του κύκλου ζωής του HIV.....	17
Εικόνα 1.9	Σχήμα ταξινόμησης των HIV-1 και HIV-2 με τις αντίστοιχες ομάδες, υπότυπους και ανασυνδυασμένες μορφές του ιού	19
Εικόνα 1.10	Επιπολασμός του HIV ανά γεωγραφική περιοχή σε οροθετικούς ηλικίας 15-49, για το έτος 2017, σύμφωνα με στοιχεία του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (WHO).....	20
Εικόνα 1.11	Αριθμός ανθρώπων που εκτιμάται ότι ζούσαν με HIV για το έτος 2017, ανά γεωγραφική περιοχή, σύμφωνα με στοιχεία του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (WHO)	20
Εικόνα 1.12	Αριθμός ανθρώπων που εκτιμάται ότι έχουν πεθάνει από αίτια σχετικά με την HIV λοίμωξη για το έτος 2017, ανά γεωγραφική περιοχή, σύμφωνα με στοιχεία του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (WHO)	21
Εικόνα 1.13	Επιπολασμός υποτύπων και ανασυνδυασμών του HIV-1 ανά την υφήλιο.....	27
Εικόνα 1.14	Σχηματική απεικόνιση της γενετικής ετερογένειας του HIV και της πολλαπλής μετάδοσης στον άνθρωπο από διαφορετικά είδη πιθήκου	29
Εικόνα 2.1	Σχηματική ιεράρχηση των σημαντικότερων μοντέλων νουκλεοτιδικής αντικατάστασης	35
Εικόνα 2.2	Αναπαράσταση ενός φυλογενετικού δέντρου και των δομικών στοιχείων του.....	38
Εικόνα 2.3	Φυλογεωγραφική ανάλυση ενός ιού με φυλογενετικό δέντρο χρωματισμένο σύμφωνα με την πιο πιθανή γεωγραφική προέλευση των υποθετικών προγόνων των ταξινομικών μονάδων και με αναπαράσταση της γεωγραφικής διασποράς του ιού	40

Η επιδημία HIV/AIDS παραμένει ένα σημαντικό πρόβλημα δημόσιας υγείας παγκοσμίως. Σύμφωνα με στοιχεία του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (ΠΟΥ), εκτιμάται ότι μέχρι τα τέλη του 2015 περίπου 37,6 εκατομμύρια άνθρωποι, παγκοσμίως, ζούσαν με HIV-λοίμωξη. Το μέγεθος και τα χαρακτηριστικά της επιδημίας διαφέρουν σημαντικά ανά την υφήλιο. Η Υποσαχάρια Αφρική είναι η περιοχή με τον υψηλότερο επιπολασμό HIV παγκοσμίως, γεγονός που επιφέρει σημαντικές συνέπειες σε όλες τις πτυχές της ανθρώπινης ζωής. Στην Ελλάδα όπως και στην υπόλοιπη Δυτική Ευρώπη, η αρχική εξάπλωση της επιδημίας συνέβη κυρίως, μεταξύ ανδρών που είχαν σεξουαλικές επαφές με άνδρες (ΑΣΑ), ενώ οι ετεροφυλικές μεταδόσεις παρουσίασαν αύξηση κατά τις αρχές της δεκαετίας του 1990. Συνολικά, η σεξουαλική επαφή μεταξύ ανδρών αποτελεί μέχρι σήμερα τον κυριότερο τρόπο μετάδοσης του HIV στην Ελλάδα. Συγκεκριμένα, το 46.2% των περιπτώσεων HIV λοίμωξης που έχουν δηλωθεί στο Κέντρο Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων (ΚΕ.ΕΛ.Π.ΝΟ.), μέχρι τα τέλη του 2014, ήταν άνδρες που ανέφεραν ότι μολύνθηκαν μέσω της σεξουαλικής επαφής με άλλους άνδρες.

Το 2011 (n=266) και το 2012 (n=551) καταγράφηκε μία δραματική αύξηση των μεταδόσεων-HIV στους χρήστες ενδοφλέβιων ναρκωτικών (XEN), σε σχέση με τα προηγούμενα έτη (2003-2010), που ο αριθμός των διαγνώσεων σε XEN διακυμάνθηκε μεταξύ 9 και 16 περιστατικών. Το 2013, ο αριθμός των περιστατικών HIV στην ομάδα των XEN παρέμεινε υψηλός (n=272) αλλά με σαφή υποχώρηση σε σχέση με το 2012. Το 2014 (n=106) συνεχίστηκε η πτωτική τάση, όπως επίσης και το 2015 (n=71, μέχρι τον 10/2015). Επιπλέον μέχρι τα τέλη του 2014, είχαν δηλωθεί στο ΚΕΕΛΠΝΟ 235 (1,6%) πολυμεταγγιζόμενοι/ες με παράγωγα αίματος, 101 (0,7%) μεταγγισθέντες/είσες, και 65 (0,5%) άτομα με κάθετη μετάδοση.

Επιπλέον των παραπάνω κατηγοριών μετάδοσης στο σύστημα επιτήρησης έχει δηλωθεί και ένας μεγάλος αριθμός HIV-οροθετικών (n=2.727) με ακαθόριστη ομάδα. Ο αριθμός αυτός αντιστοιχεί στο 18,9% του συνόλου των δηλωθέντων HIV-οροθετικών. Αυτό αποτελεί ένα σημαντικό μειονέκτημα στο Εθνικό σύστημα επιδημιολογικής επιτήρησης. Η γνώση της κατηγορίας μετάδοσης έχει ιδιαίτερη σημασία για την πληρέστερη κατανόηση των χαρακτηριστικών της επιδημίας, προκειμένου η πρόληψη εξάπλωσης του HIV να είναι όσο το δυνατόν πιο αποτελεσματική. Συγκεκριμένα, η έλλειψη τεκμηριωμένης πληροφορίας αναφορικά με την κατηγορία μετάδοσης για περίπου 20% των HIV-οροθετικών ανά έτος αποτελεί ένα σημαντικό κενό αναφορικά με τον τρόπο διασποράς της επιδημίας, καθώς και της δυνατότητας αξιολόγησης προγραμμάτων πρόληψης.

ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η εύρεση της κατηγορίας μετάδοσης για τους HIV-οροθετικούς υπότυπου A1 με ακαθόριστη κατηγορία μετάδοσης και η ανάδειξη της σημασίας των μεθόδων μοριακής επιδημιολογίας στην επιδημιολογική επιτήρηση. Συγκεκριμένα, θα εκτιμηθεί με μεθόδους μοριακής επιδημιολογίας η πιθανή ομάδα μετάδοσης των HIV-οροθετικών που έχουν δηλωθεί στο ΚΕΕΛΠΝΟ με ακαθόριστη κατηγορία μετάδοσης για το διάστημα 2003-6/2015. Η μελέτη της εκτίμησης της κατηγορίας μετάδοσης αποτελεί πρωτότυπη έρευνα και θα βασιστεί σε συνδυασμό μεθόδων αιχμής μοριακής επιδημιολογίας.

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΟΝ ΙΟ ΤΗΣ ΑΝΘΡΩΠΙΝΗΣ ΑΝΟΣΟΑΝΕΠΑΡΚΕΙΑΣ (HIV)

1.1. Ιοι

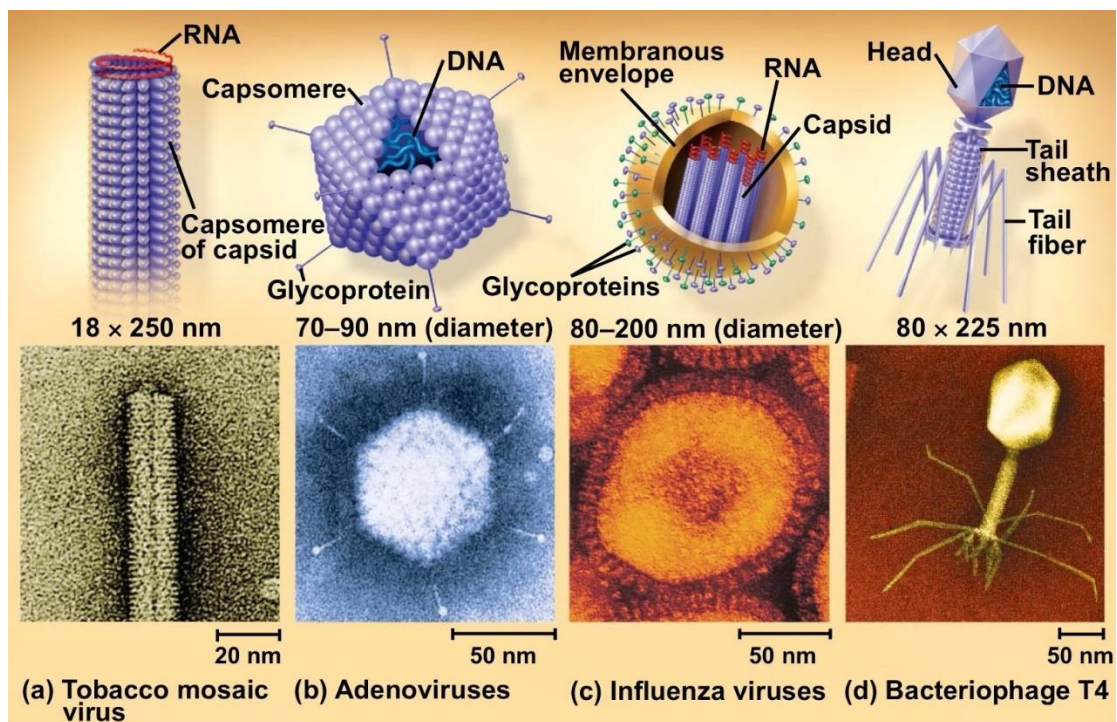
Οι ιοί είναι μικρές, ακυτταρικές μορφές ζωής, οι οποίοι χαρακτηρίζονται από την απουσία δικών τους μεταβολικών μηχανισμών. Γι' αυτό το λόγο, έχουν αναπτύξει εξειδικευμένους μηχανισμούς που τους επιτρέπουν να μολύνουν συγκεκριμένα κύτταρα-στόχους, τα οποία λειτουργούν ως ξενιστές τους. Έτσι, επιτάσσουν τους μεταβολικούς μηχανισμούς των κυττάρων-ξενιστών προς όφελός τους, προκειμένου να πραγματοποιήσουν τις απαραίτητες βιολογικές τους λειτουργίες, όπως να αναπαραχθούν. Εξαιτίας αυτής της ιδιότητας που έχουν, χαρακτηρίζονται ως *υποχρεωτικώς ενδοκυτταρικά παράσιτα* [1].

Οι ιοί είναι η πιο ευρέως διαδεδομένη ομάδα οργανισμών στον πλανήτη, ικανοί να μολύνουν οποιονδήποτε ζωντανό οργανισμό, από τα μονοκύτταρα βακτήρια και πρωτόζωα μέχρι τους πιο σύνθετους φυτικούς και ζωικούς οργανισμούς. Παρουσιάζουν εξειδίκευση και επιλεκτικότητα τόσο ως προς τον οργανισμό που μολύνουν, αλλά και ως προς τα κύτταρα που μολύνουν, δηλαδή κάθε είδος ιού είναι ικανός να μολύνει μόνο συγκεκριμένους τύπους κυττάρων ή κυτταρικών ιστών. Επιπλέον, εμφανίζουν μεγάλη ποικιλία ως προς τη δομή τους, τον κύκλο ζωής τους, αλλά και την πολυπλοκότητα των λειτουργιών τους [2].

1.1.1. Η ΔΟΜΗ ΤΩΝ ΙΩΝ

Οι ιοί είναι πολύ μικροί σε μέγεθος (20-300 nm) και γι' αυτό οι περισσότεροι από αυτούς είναι ορατοί μόνο με τη βοήθεια ηλεκτρονικού μικροσκοπίου. Κάθε ιικό στέλεχος αποτελείται από έναν τύπο νουκλεϊκού οξέος, το οποίο περιβάλλεται από μία πρωτεϊνική θήκη, το *καψίδιο*. Ανάλογα με το είδος του ιού, το νουκλεϊκό οξύ μπορεί να είναι είτε DNA ή RNA, γραμμικό ή κυκλικό, μονόκλωνο ή δίκλωνο και περιέχει όλη την απαραίτητη γενετική πληροφορία που χρειάζεται για την επιβίωσή τους. Το καψίδιο αποτελείται από δομικές πρωτεϊνικές υπομονάδες ενός τύπου ή λίγων τύπων που ονομάζονται *καψομερίδια* και σχηματίζουν ένα ή δύο πρωτεϊνικά στρώματα. Το σχήμα του καψιδίου είναι συνήθως συμμετρικό και ακολουθεί κατά κανόνα τις εξής διατάξεις: ελικοειδή συμμετρία, εικοσαεδρική συμμετρία ή κάποια περισσότερο σύνθετη διάταξη με συνδυασμό και των δύο (*Εικόνα 1.1*). Ο λειτουργικός ρόλος του καψιδίου είναι διπλός, αφενός να παρέχει προστατευτικό ρόλο στο γενετικό υλικό του ιού από διάφορα πεπτικά ένζυμα, όπως οι νουκλεάσες και αφετέρου να επιτρέπει την προσκόλληση του ιού στους ειδικούς υποδοχείς της κυτταρικής μεμβράνης του κατάλληλου κυττάρου-ξενιστή, προκειμένου να επιτευχθεί η μόλυνση. Το ιικό γονιδίωμα πακετάρεται με τη βοήθεια πρωτεϊνών μέσα στο καψίδιο, σχηματίζοντας το *νουκλεοκαψίδιο* [3].

Ορισμένοι ιοί εμφανίζουν ένα επιπλέον περίβλημα, το *φάκελο* ή *έλυτρο*, το οποίο, συνήθως, προέρχεται από τμήματα της κυτταρικής μεμβράνης των κυττάρων-ξενιστών και μπορεί να θεωρηθεί ως ένα επιπλέον προστατευτικό κάλυμμα του ιικού γενετικού υλικού. Ο φάκελος αποτελείται από διπλή στιβάδα φωσfolιπιδίων και σε ορισμένες περιπτώσεις περιέχει και μόρια χοληστερόλης, ενώ στηρίζεται πάνω σε ένα *εσωτερικό πλαίσιο (matrix)* από δομικές πρωτεΐνες. Από την επιφάνεια της εξωτερικής στιβάδας του φακέλου εκφύονται γλυκοπρωτεΐνες, δηλαδή μόρια πρωτεϊνών ενωμένα με υδατάνθρακες, οι οποίες παίζουν σημαντικό ρόλο στην πρόσδεση του ιού στους υποδοχείς που βρίσκονται εκτεθειμένοι στην εξωτερική επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης των αντίστοιχων κυττάρων-στόχων, καθώς επίσης και στην είσοδο του ιικού γενετικού υλικού στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου (Εικόνα 1.1) [1, 3].



Εικόνα 1.1

Δομή τεσσάρων διαφορετικών τύπων ιού σε τρισδιάστατη απεικόνιση (επάνω) και σε φωτογραφία ηλεκτρονικού μικροσκοπίου (κάτω) [4]

- (a) Ιός του μωσαϊκού του καπνού (ελικοειδές καψίδιο χωρίς φάκελο)
- (b) Αδενοϊός (πολυεδρικό καψίδιο χωρίς φάκελο)
- (c) Ιός της γρίπης (πολλαπλά ελικοειδή καψίδια που περιβάλλονται από φάκελο)
- (d) Βακτηριοφάγος T4 (σύνθετη δομή καψιδίου)

1.1.2. Ο ΚΥΚΛΟΣ ΖΩΗΣ ΤΩΝ ΙΩΝ

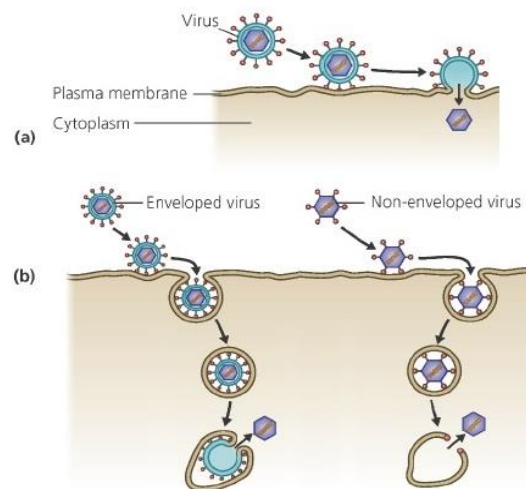
Οι ιοί εμφανίζουν μεγάλη ποικιλία ως προς τον κύκλο ζωής τους, η οποία αντανακλά τη μεγάλη προσαρμοστικότητά τους και προκύπτει από την εξειδίκευση και επιλεκτικότητά τους ως προς τα διάφορα κύτταρα-στόχους που είναι ικανοί να μολύνουν, ανάλογα με το είδος του ιού. Οι ιοί, ως υποχρεωτικώς ενδοκυτταρικά παράσιτα, δεν έχουν δικό τους μεταβολισμό και γι' αυτό πρέπει να μολύνουν τα κατάλληλα κύτταρα για να αναπαραχθούν και να

ολοκληρώσουν ένα κύκλο ζωής. Παρόλες τις διαφοροποιήσεις, όμως, ο κύκλος ζωής κάθε είδους ιού μπορεί να συνοψισθεί σε 3 γενικευμένα και αλληλεπικαλυπτόμενα βήματα:

- i. Η **Μόλυνση** του κυττάρου από τον ιό αρχίζει με την πρόσδεση του ιού στην εξωτερική επιφάνεια του κυττάρου. Η πρόσδεση επιτυγχάνεται χάρη στη χημική συγγένεια που εμφανίζουν οι γλυκοπρωτεΐνες της ιικής εξωτερικής επιφάνειας με τους πρωτεϊνικούς υποδοχείς της κυτταρικής εξωτερικής επιφάνειας. Ουσιαστικά, αυτή η χημική συγγένεια είναι που περιορίζει την ικανότητα των ιών να μολύνουν περιορισμένο τύπο κυττάρων. Μετά την πρόσδεση, ακολουθεί η **διείσδυση**, δηλαδή η είσοδος του ιικού γενετικού υλικού στο κύτταρο. Η διείσδυση, συνήθως, πραγματοποιείται με **ενδοκύττωση** του ιού στο κυτταρόπλασμα, ενώ σε ορισμένους ιούς με φάκελο παρατηρείται **σύντηξη** της μεμβράνης του φακέλου με την κυτταρική μεμβράνη. Το πρώτο βήμα του κύκλου ζωής ολοκληρώνεται με την απελευθέρωση του ιικού νουκλεϊκού οξέος από το καψίδιο στο κυτταρόπλασμα, μια διαδικασία που ονομάζεται **αποκάλυψη (uncoating)** (Εικόνα 1.2).

- ii. Η **Αντιγραφή και Έκφραση** του ιικού γενετικού υλικού αποτελούν το δεύτερο βήμα του κύκλου ζωής των ιών. Υπάρχουν διάφορες στρατηγικές αντιγραφής του ιικού γονιδιώματος ανάμεσα στις διαφορετικές οικογένειες των ιών, με τον κάθε μηχανισμό αντιγραφής να αποτελεί χαρακτηριστικό γνώρισμα της κάθε οικογένειας. Ωστόσο, όλοι οι ιοί, ανεξάρτητα από την οικογένεια στην οποία ανήκουν, χρησιμοποιούν τα ριβοσώματα του κυττάρου-ξενιστή, προκειμένου να πραγματοποιήσουν πρωτεϊνοσύνθεση. Οι σημαντικότερες στρατηγικές αντιγραφής συνοψίζονται ανάλογα με τον τύπο του γενετικού τους υλικού ως εξής:

- a. Οι «**θετικοί**» RNA ιοί έχουν την πολικότητα (προσανατολισμό) ενός mRNA και μπορούν να προσδεθούν απευθείας στα ριβοσώματα και να μεταφραστούν σε ιικές πρωτεΐνες. Οι **ρετροϊοί** αποτελούν ειδική περίπτωση αυτής της κατηγορίας και ακολουθούν διαφορετικό μηχανισμό (Κεφάλαιο 1.2).
- b. Οι «**αρνητικοί**» RNA ιοί έχουν πολικότητα (προσανατολισμό) συμπληρωματική ως προς ένα mRNA και γι' αυτό πρέπει να συνθέσουν πρώτα συμπληρωματικά αντίγραφα του RNA γονιδιώματος με τη βοήθεια ενός ιικού ενζύμου, της RNA-εξαρτώμενης RNA πολυμεράσης. Έτσι, προκύπτουν mRNA που προσδένονται και μεταφράζονται στα ριβοσώματα του κυττάρου.

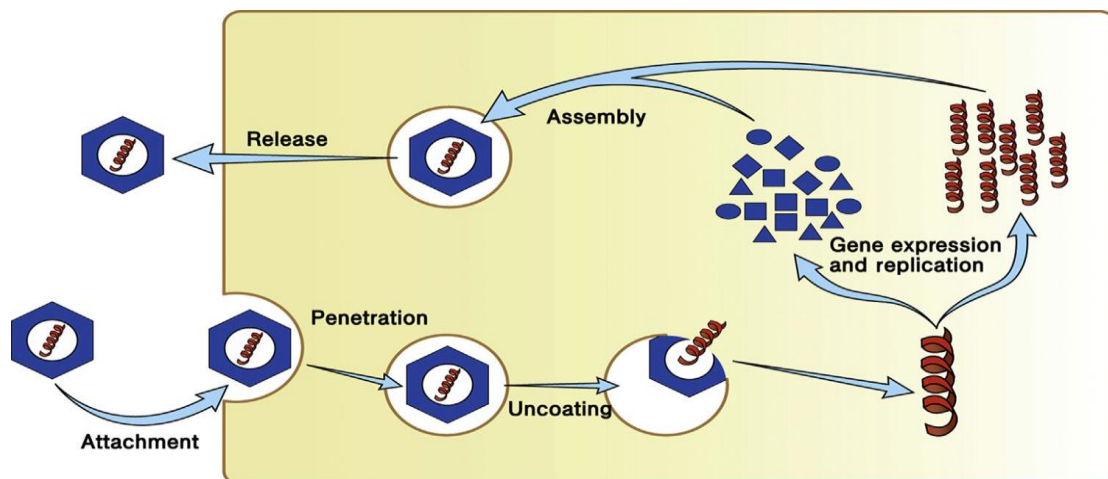


Εικόνα 1.2

Μόλυνση του κυττάρου [2]

- (a) Σύντηξη των μεμβρανών του κυττάρου με αυτές του ιικού φακέλου
- (b) Ενδοκύττωση ιού με φάκελο (αριστερά) και χωρίς φάκελο (δεξιά)

- c. Οι *δίκλωνοι RNA* ιοί μεταγράφουν το γενετικό τους υλικό σε mRNA με τη βοήθεια μιας ικής RNA-εξαρτώμενης RNA πολυμεράσης που μπορεί να αναγνωρίσει τα δίκλινα μόρια RNA και να προσδεθεί σε αυτά
 - d. Οι *δίκλωνοι DNA* ιοί χρησιμοποιούν παρόμοιο μηχανισμό με τους δίκλωνους RNA ιούς, με τη διαφορά ότι χρησιμοποιούν το ένζυμο DNA-εξαρτώμενη RNA πολυμεράση.
 - e. Οι *μονόκλωνοι DNA* ιοί αρχικά μετατρέπουν το DNA τους σε δίκλινο με τη βοήθεια της DNA πολυμεράσης. Στη συνέχεια, η RNA πολυμεράση μεταγράφει το DNA γενετικό υλικό σε mRNA, το οποίο με τη σειρά του προσδένεται στα ριβοσώματα.
- ii. Η **Έξοδος** των νέων ιών από το κύτταρο ξεκινάει με τη *συναρμολόγηση* του καψιδίου. Κατά τη φάση αυτή, οι νεοσυντιθέμενες ικές πρωτεΐνες σχηματίζουν τα καψίδια των νέων ιών, όπου πακετάρονται τα νέα αντίγραφα ιικού γονιδιώματος. Μετά τη συναρμολόγηση ακολουθεί η *απελευθέρωση* των νέων στελεχών του ιού από το μολυσμένο κύτταρο. Στην περίπτωση των ιών χωρίς φάκελο, η απελευθέρωση γίνεται, συνήθως, με απλή κυτταρική λύση, δηλαδή με καταστροφή της κυτταροπλασματικής μεμβράνης. Αντιθέτως, σε περιπτώσεις ιών με φάκελο, πριν την απελευθέρωση των ιών, προηγείται ο σχηματισμός του φακέλου, συνήθως από τμήματα της κυτταροπλασματικής μεμβράνης ή σε ορισμένους τύπους ιών από τμήματα άλλων μεμβρανών του κυττάρου, όπως του ενδοπλασματικού δικτύου, του συστήματος Golgi ή ακόμα και της πυρηνικής μεμβράνης. Στη συνέχεια, οι περισσότεροι ιοί με φάκελο απελευθερώνονται από το κύτταρο με *εκβλάστηση* ή *εξωκύττωση*, δηλαδή την αντίθετη διαδικασία της ενδοκύττωσης. Σε ορισμένους ιούς, μετά την απελευθέρωση από το κύτταρο ακολουθεί η φάση της *‘ωρίμανσης’* του ιού, δηλαδή η μορφολογική αλλαγή ορισμένων πρωτεϊνών του, έτσι ώστε ο ιός να είναι ικανός να μολύνει εκ νέου άλλο κύτταρο και να ξεκινήσει νέο κύκλο αναπαραγωγής [5-7].



Εικόνα 1.3

Τα βασικά βήματα του κύκλου ζωής ενός ιού [7]

1.1.3. Η ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΤΩΝ ΙΩΝ

Η ταξινόμηση των ιών γίνεται επίσημα από την Παγκόσμια Επιτροπή Ταξινόμησης των Ιών (International Committee on Taxonomy of Virus, ICTV)¹. Οι ταξινομικές μονάδες των ιών που αναγνωρίζονται από την ICTV είναι: Τάξη, Οικογένεια, Υπο-οικογένεια, Γένος και Είδος [8]. Ωστόσο, η ταξινόμηση των ιών δεν αποτελεί μια εύκολη διαδικασία, αλλά αντιθέτως, απαιτεί να ληφθούν υπόψιν αρκετά χαρακτηριστικά των ιικών στελεχών, όπως ο τύπος του ιικού γενετικού υλικού, μορφολογικά χαρακτηριστικά του ιού (σχήμα και η συμμετρία του καψιδίου, παρουσία ή απουσία φακέλου, το μέγεθος του ιικού στελέχους, κλπ), η θέση που έχει ο ιός κατά την αντιγραφή στο κύτταρο, κ.ά. [2, 6]. Τα τελευταία χρόνια, σημαντικό ρόλο στην ταξινόμηση των ιών έχει παίξει η ανάπτυξη της βιοπληροφορικής και συγκεκριμένα, ειδικών λογιστικών προγραμμάτων που επιτρέπουν τη στοιχίση αλληλουχιών και κατασκευή φυλογενετικών δέντρων [2]. Με βάση την τελευταία μέχρι τώρα ανακοίνωση της ICTV για την ταξινόμηση των ιών (2017 Release, EC 49, Singapore, July 2017), έχουν καταγραφεί 4853 είδη ιών, τα οποία ταξινομούνται σε 803 γένη, 131 οικογένειες και ανήκουν σε 9 μεγάλες τάξεις (Πίνακας 1.1) [9].

Πίνακας 1.1

Ταξινόμηση καταγεγραμμένων ιών από την Παγκόσμια Επιτροπή Ταξινόμησης των Ιών (ICTV). Απεικονίζονται οι 9 τάξεις των ιών και ο αριθμός οικογενειών, υπο-οικογενειών, γενών και ειδών των ιών που περιέχουν βάσει της πιο πρόσφατης μέχρι σήμερα καταγραφής (2017 Release, EC 49, Singapore, July 2017) [10]

ΤΑΞΗ	ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΕΣ	ΥΠΟ-ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΕΣ	ΓΕΝΗ	ΕΙΔΗ
<i>Bunyavirales</i>	9	0	13	160
<i>Caudovirales</i>	4	22	241	1028
<i>Herpesvirales</i>	3	3	19	104
<i>Ligamenvirales</i>	2	0	4	11
<i>Mononegavirales</i>	8	0	42	224
<i>Nidovirales</i>	4	2	13	64
<i>Ortervirales</i>	5	2	25	212
<i>Picornavirales</i>	6	1	58	229
<i>Tymovirales</i>	5	2	23	198
Ακαθόριστα	85	14	365	2623
Σύνολο	131	46	803	4853

1.1.4. Η ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ ΤΩΝ ΙΩΝ

Η επιδημιολογία είναι ο επιστημονικός κλάδος της ιατρικής που μελετά τους παράγοντες που επηρεάζουν τη συχνότητα εμφάνισης οποιασδήποτε ασθένειας σε ένα πληθυσμό. Ορισμένοι ιοί προσβάλλουν φυτά, άλλοι ζώα, άλλοι βακτήρια κ.ά. Πολλοί ιοί θεωρούνται υπεύθυνοι για την πρόκληση διαφόρων ασθενειών, άλλες λιγότερο και άλλες περισσότερο επιβλαβείς για την υγεία του ξενιστή. Μερικές από τις πιο κοινές ασθένειες που προκαλούν στον άνθρωπο είναι η γρίπη, το κοινό κρυολόγημα, η ανεμοβλογιά και ο έρπης, ενώ στις

¹ International Committee on Taxonomy of Virus (ICTV) <https://talk.ictvonline.org>

πιο σοβαρές ανήκουν το AIDS, οι ηπατίτιδες και η νόσος που προκαλεί ο ιός Έμπολα. Οι επιβλαβείς ιοί αναφέρονται συνήθως και ως παθογόνοι [11].

Η μετάδοση του ιού μπορεί να είναι είτε *οριζόντια*, όταν γίνεται από έναν οργανισμό σε άλλον, είτε *κάθετη*, δηλαδή από τη μητέρα στο παιδί πριν, κατά τη διάρκεια ή αμέσως μετά τη γέννα. Η οριζόντια μετάδοση μπορεί να είναι *ομόλογη*, όταν γίνεται ανάμεσα σε οργανισμούς του ίδιου είδους ή *ετερόλογη*, όταν γίνεται ανάμεσα σε διαφορετικά είδη, πχ από ζώο σε άνθρωπο. Επίσης, η μετάδοση μπορεί να είναι *άμεση*, όταν γίνεται απ' ευθείας από τον έναν ξενιστή στον άλλο, μέσω άμεσης επαφής, ή *έμμεση*, όπως μέσω μολυσμένων τροφίμων και νερού, κοινόχρηστων αντικειμένων ή τσιμπήματος εντόμου. Ο ξενιστής έχει την τάση να αναπτύσσει φυσική ανοσία απέναντι στα στελέχη των ιών από τα οποία έχει μολυνθεί. Επίσης, υπάρχουν παρεμβατικές μέθοδοι αντιμετώπισης ή εξάπλωσης σοβαρών ασθενειών μέσω θεραπείας με αντιικά φάρμακα ή μέσω μέτρων πρόληψης, όπως τα εμβόλια. Σε κάθε περίπτωση, είναι πολύ σημαντικό να γνωρίζουμε τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά του κάθε είδους του ιού που αντιμετωπίζουμε, ώστε να αποτρέψουμε τη μετάδοση λοιμώξεων και επιδημιών [3, 6, 11].

1.1.5. Η ΑΝΑΚΑΛΥΨΗ, Η ΕΞΕΛΙΞΗ ΚΑΙ ΟΙ ΘΕΩΡΙΕΣ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ ΤΩΝ ΙΩΝ

Η ανακάλυψη των ιών έγινε στις αρχές του 20^{ου} αιώνα, ενώ η ιδέα της ύπαρξης μολυσματικών παραγόντων μικρότερου μεγέθους από τα μέχρι τότε γνωστά μικρόβια ξεκίνησε στα τέλη του 19^{ου} αιώνα. Το 1892, ο Ρώσος βοτανολόγος Dimitri Ivanowski και το 1898, ο Ολλανδός μικροβιολόγος Marinus Beijerinck έδειξαν ότι η ασθένεια του μωσαϊκού του καπνού προκαλείται από ένα παράγοντα σημαντικά μικρότερου μεγέθους από αυτό των βακτηρίων. Το 1915, ο Άγγλος βακτηριολόγος Frederick Twort και το 1917, ο Γαλλο-Καναδός μικροβιολόγος Félix d'Hérelle είχαν ισχυρές ενδείξεις για την ανακάλυψη των βακτηριοφάγων. Με την εφεύρεση του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου το 1931 έγινε εφικτή η απεικόνιση και οπτική παρατήρηση των ιών [2, 7, 12].

Ο ρυθμός εξέλιξης των ιών ποικίλει και μπορεί να είναι πολύ γρήγορος ή πολύ αργός, ανάλογα με το είδος του ιού. Η ειδογένεση και η εξέλιξη των ιών οφείλεται κυρίως σε δύο μηχανισμούς που δρουν αλλάζοντας το γονιδίωμά τους, τις *μεταλλάξεις* και το *γενετικό ανασυνδυασμό*. Ο γενετικός ανασυνδυασμός αφορά ανταλλαγή τμημάτων του γενετικού υλικού και μπορεί να συμβεί είτε ενδομοριακά ανάμεσα σε τμήματα του ίδιου μορίου είτε ανάμεσα σε διαφορετικά στελέχη. Ο ρυθμός μετάλλαξης των RNA ιών είναι συνήθως αρκετά μεγαλύτερος από αυτόν των DNA ιών, γιατί δεν υπάρχει κάποιος επιδιορθωτικός μηχανισμός για τα «λάθη» που κάνει η RNA-πολυμεράση, αντίθετα με την DNA-πολυμεράση. Έτσι, ενώ αρχικά ο ρυθμός των «λαθών» που κάνουν τα δύο ένζυμα είναι περίπου ίδιος (1 ανά 10^3 - 10^5 βάσεις), τελικά ο αριθμός των «λαθών» της DNA-πολυμεράσης που θα παραμείνουν είναι αρκετά περιορισμένος σε σχέση με τον αρχικό (1 ανά 10^9 - 10^{10}), χάρη στον επιδιορθωτικό μηχανισμό. Οι περισσότερες μεταλλάξεις είναι βλαβερές και μη βιώσιμες για τον ιό, ενώ ο γενετικός ανασυνδυασμός πραγματοποιείται ανάμεσα σε οργανισμούς που είναι προσαρμοσμένοι στις απαιτήσεις της φυσικής επιλογής. Αν οι γενετικές αλλαγές οδηγήσουν στη δημιουργία ενός διαφορετικού φαινότυπου, τότε η επιβίωση του νέου ιού εξαρτάται από τη φυσική επιλογή. Έτσι, μέσω του γενετικού ανασυνδυασμού αυξάνεται η πιθανότητα να προκύψουν νέα στελέχη που θα ευνοηθούν από τη φυσική επιλογή, ενώ

μέσω του μηχανισμού των μεταλλάξεων υπάρχει μεγαλύτερη πιθανότητα να προκύψει ένα καινούριο φαινοτυπικό χαρακτηριστικό που δεν υπήρχε μέχρι τότε στα προγονικά στελέχη. Συνήθως, οι ιοί αφήνουν μεγάλο αριθμό απογόνων κατά τον κύκλο αναπαραγωγής τους και επομένως, με αυτόν τον τρόπο αυξάνεται η πιθανότητα να προκύψει κάποιος απόγονος που το γενετικό του προφίλ θα ευνοηθεί από τη φυσική επιλογή [2, 3].

Η προέλευση των ιών θεωρείται ένα από τα πιο δύσκολα πεδία διερεύνησης, καθώς χρονολογούνται από τόσο παλιά, ίσως και πριν ακόμα την εμφάνιση της κυτταρικής ζωής, που οι περισσότερες πληροφορίες που μπορούμε να πάρουμε μέσω της φυλογενετικής ανάλυσης έχουν σε μεγάλο βαθμό χαθεί. Παρόλα αυτά, έχουν προταθεί τρεις θεωρίες σχετικά με την προέλευση των ιών, έχοντας, όμως, όλες βασικές αδυναμίες:

- i. *Θεωρία συνεξέλιξης*, οι ιοί προϋπήρχαν της εμφάνισης των κυττάρων και πιθανότατα συνέβαλαν στην αρχιτεκτονική των κυττάρων
- ii. *Θεωρία κυτταρικής προέλευσης*, δημιουργήθηκαν μετά την εμφάνιση της κυτταρικής δομής από τμήματα κυτταρικού γενετικού υλικού που ανεξαρτητοποιήθηκαν, απέκτησαν πρωτεϊνικό περίβλημα και την ικανότητα να αναπαράγονται αυτόνομα.
- iii. *Οπισθοδρομική θεωρία*, οι ιοί προήλθαν από παρασιτικά κύτταρα που σταδιακά έχασαν όσα γονίδια παρέχονταν από τον ξενιστή [1]

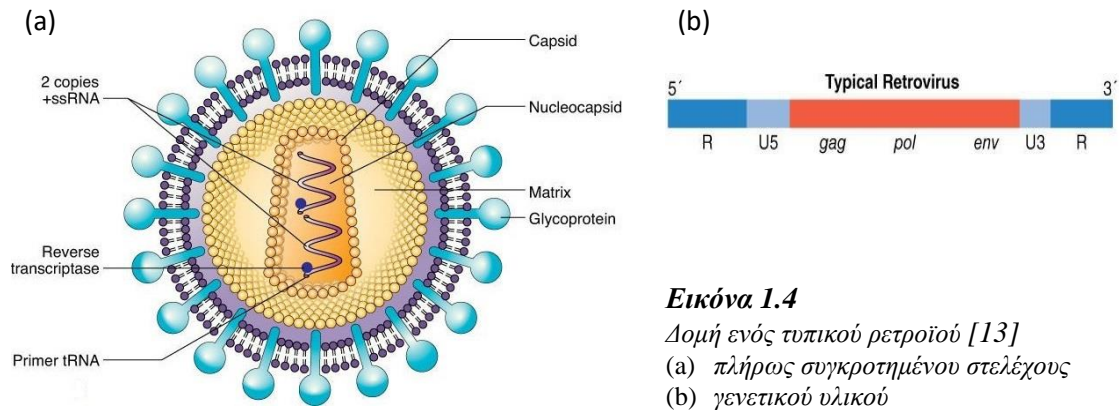
1.2. ΡΕΤΡΟΪΟΙ

Οι ρετροϊοί (οικογένεια *Retroviridae*) αποτελούν μία μεγάλη και διακριτή ομάδα ιών που εξειδικεύονται στη μόλυνση των σπονδυλωτών και χαρακτηρίζονται από έναν ιδιαίτερο κύκλο ζωής. Κατέχουν σημαντικό ρόλο στη μοριακή βιολογία, αλλά και σε άλλα επιστημονικά πεδία, όπως η μοριακή ογκολογία, η βιοχημεία, εξελικτική βιολογία, κ.α. [1].

1.2.1. Η ΔΟΜΗ ΤΩΝ ΡΕΤΡΟΪΩΝ

Το στέλεχος ενός απλού ρετροϊού έχει σφαιρική δομή και περιβάλλεται από φάκελο με διάμετρο περίπου 100 nm. Ο φάκελος προέρχεται από την κυτταροπλασματική μεμβράνη του κυττάρου-ξενιστή και φέρει γλυκοπρωτεΐνες. Η εσωτερική επιφάνεια του φακέλου εφαρμόζει πάνω σε ένα πλέγμα δομικών πρωτεϊνών (matrix), δίνοντας το τελικό σχήμα στον ιό. Το γενετικό του υλικό αποτελείται από δύο γραμμικά, μονόκλωνα και πανομοιότυπα μεταξύ τους αντίγραφα RNA, τα οποία έχουν ίδιο προσανατολισμό με ένα mRNA (θετική πολικότητα) και καθένα από αυτά έχει μήκος περίπου 9-13 kb. Κατά κανόνα, όλοι οι ρετροϊοί φέρουν στο γενετικό τους υλικό τα γονίδια Gag, Pol και Env, τα οποία είναι υπεύθυνα για τη σύνθεση απαραίτητων πρωτεϊνών για τον αναπαραγωγικό τους κύκλο.

Το πρωτεϊνικό καψίδιο των ρετροϊών εμφανίζει εικοσαεδρική συμμετρία και περιβάλλει, εκτός από το γενετικό υλικό, τις ιικές πρωτεΐνες *αντίστροφη μεταγραφάση* (συμβάλλει στη μεταγραφή του RNA σε DNA), *πρωτεάση* (πεπτικό ένζυμο) και *ιντεγκράση* (συμμετέχει στην ενσωμάτωση του ιικού γενετικού υλικού στο DNA του ξενιστή) (Εικόνα 1.4) [1, 3, 7].



Εικόνα 1.4

Δομή ενός τυπικού ρετροϊού [13]

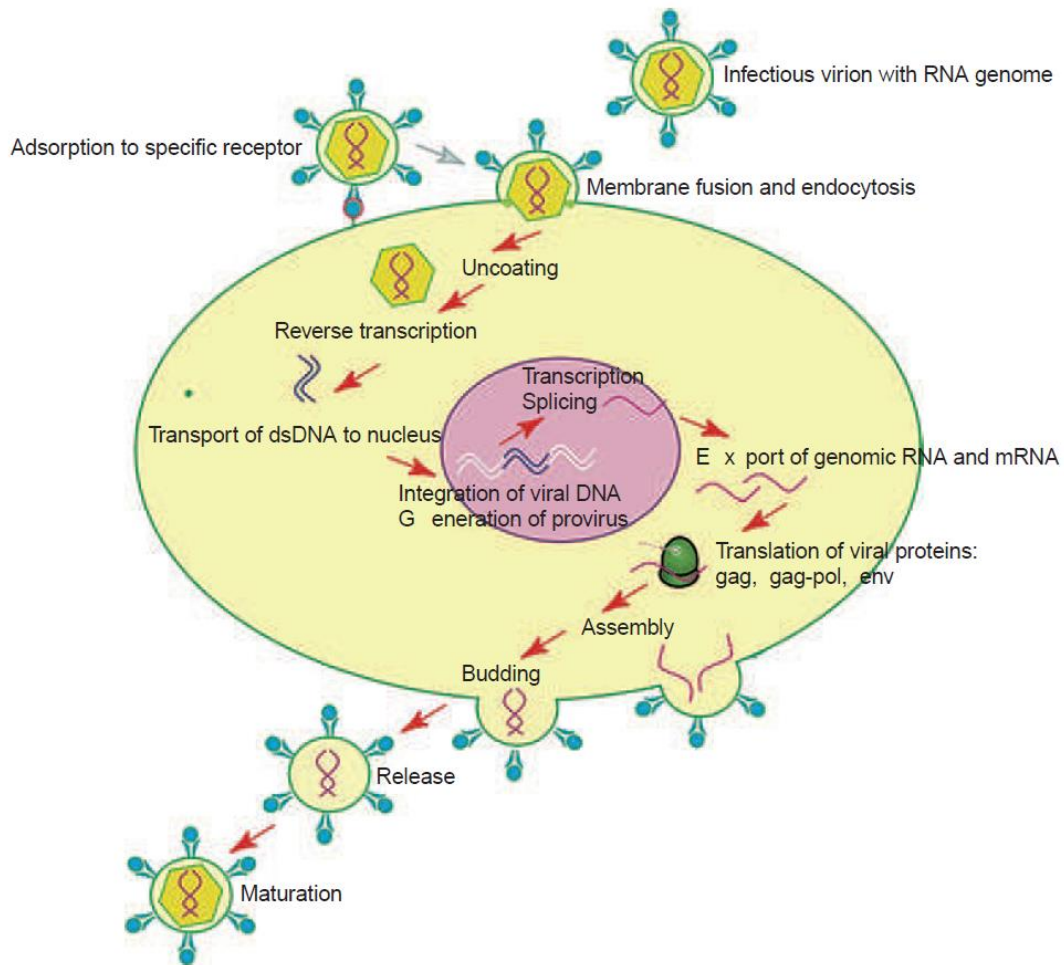
- (a) πλήρως συγκροτημένου στελεχούς
- (b) γενετικού υλικού

1.2.2. Ο ΚΥΚΛΟΣ ΖΩΗΣ ΤΩΝ ΡΕΤΡΟΪΩΝ

Ο κύκλος ζωής ενός ρετροϊού πραγματοποιείται εν μέρει στον πυρήνα του κυττάρου-ξενιστή και εν μέρει στην κυτταροπλασματική του μεμβράνη. Η είσοδος του ρετροϊού στο κύτταρο, αφού προηγηθεί η πρόσδεσή του στους κατάλληλους υποδοχείς, μπορεί να γίνει είτε με ενδοκύττωση, είτε με άμεση σύντηξη. Στη συνέχεια, ακολουθεί η αποκάλυψη του ιικού γονιδιώματος και η ταυτόχρονη μεταφορά του προς τον πυρήνα του κυττάρου. Παράλληλα με αυτή τη μεταφορά, πραγματοποιείται και η διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής, δηλαδή, η σύνθεση δίκλωνου γραμμικού μορίου DNA, το οποίο περιέχει την ίδια γενετική πληροφορία με το RNA του ρετροϊού.

Το νεοσυντιθέμενο ρετροϊκό μόριο DNA εισέρχεται στον πυρήνα του κυττάρου και ενσωματώνεται στο DNA του ξενιστή, σχηματίζοντας τον *προϊό*, δηλαδή ένα χρωμοσωμικό αντίγραφο του ρετροϊικού DNA. Στη συνέχεια, ο προϊός μεταγράφεται σε μόρια RNA, τα οποία έχουν διπλό ρόλο. Πρώτον, μπορούν να λειτουργήσουν ως «μήτρα», πάνω στο οποίο θα σχηματιστεί η συμπληρωματική του αλυσίδα και θα προκύψει δίκλωνο μόριο RNA, το οποίο θα αποτελέσει το γενετικό υλικό των νέων ρετροϊικών στελεχών και δεύτερον, μπορούν να λειτουργήσουν ως mRNA, τα οποία θα μεταφερθούν στα ριβοσώματα του κυττάρου για να μεταφραστούν και να συντεθούν οι πρωτεΐνες του ρετροϊού. Από τις πρωτεΐνες και τα μόρια RNA που σχηματίστηκαν, συγκροτούνται νέα στελέχη ρετροϊών στο κυτταρόπλασμα και απελευθερώνονται έξω από το κύτταρο. Κατά τη διαδικασία της απελευθέρωσης, σχηματίζεται ο φάκελος των νέων στελεχών και έπειτα, ακολουθεί η ωρίμανσή τους έξω από το κύτταρο (Εικόνα 1.5) [7].

Ορισμένοι ρετροϊοί έχουν «χάσει», εξελικτικά, την ικανότητά τους να μολύνουν νέα κύτταρα και παραμένουν σε μόνιμο στάδιο προϊού. Αυτοί οι προϊοί, που ονομάζονται *ενδογενείς ρετροϊοί*, κληρονομούνται από το μητρικό κύτταρο στο θυγατρικό, όπως ακριβώς και τα γονίδια του κυτταρικού γονιδιώματος. Συνήθως, το γενετικό υλικό των ενδογενών ρετροϊών παραμένει σε ανενεργή μορφή ή σε μορφή *ψευδογονιδίου*, δηλαδή μη λειτουργικού γονιδίου. Παρόλα αυτά, φαίνεται πως οι ενδογενείς ρετροϊοί επηρεάζουν την γονιδιακή έκφραση του κυττάρου, αν και ο ακριβής ρόλος τους δεν έχει εξακριβωθεί πλήρως [3].



Εικόνα 1.5

Σχηματική Απεικόνιση του κύκλου ζωής ενός τυπικού ρετροϊού [1]

1.2.3. Η ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΤΩΝ ΡΕΤΡΟΪΩΝ

Η οικογένεια των ρετροϊών (*Retroviridae*) χαρακτηρίζεται από την υποχρεωτική συμμετοχή του ενζύμου αντίστροφη μεταγραφή (reverse transcription – RT) στον κύκλο ζωής τους. Πήρε το όνομά της από την λατινική λέξη *retro* που σημαίνει αντίστροφα, επειδή μεταγράφουν υποχρεωτικά το RNA γενετικό υλικό τους σε DNA, προκειμένου να ολοκληρώσουν τον κύκλο ζωής τους [12]. Οι ρετροϊοί μπορούν να διακριθούν σε δύο μεγάλες ομάδες, του απλούς ρετροϊούς και τους σύνθετους ρετροϊούς [7].

Σύμφωνα με την ICTV² (2017 Release, EC 49, Singapore, July 2017), η οικογένεια των ρετροϊών ανήκει στην τάξη *Ortervirales* και διακρίνεται σε δύο υπο-οικογένειες, την *Orthoretrovirinae* και την *Spumaretrovirinae*. Συνολικά, έχουν καταγραφεί 68 είδη ρετροϊών, τα οποία ταξινομούνται σε 11 γένη (Πίνακας 1.2) [10].

² International Committee on Taxonomy of Virus (ICTV) <https://talk.ictvonline.org>

Πίνακας 1.2

Ταξινόμηση καταγεγραμμένων ρετροϊών από την Παγκόσμια Επιτροπή Ταξινόμησης των Ιών (ICTV) Απεικονίζονται οι 2 υπο-οικογένειες, τα 11 γένη και ο αριθμός των ειδών ανά γένος ρετροϊού, βάσει της πιο πρόσφατης μέχρι σήμερα καταγραφής (2017 Release, EC 49, Singapore, July 2017) [10]

ΥΠΟ-ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΕΣ	ΓΕΝΗ	ΕΙΔΗ
<i>Orthoretrovirinae</i>	<i>Alpharetrovirus</i>	9
	<i>Betaretrovirus</i>	5
	<i>Deltaretrovirus</i>	4
	<i>Epsilonretrovirus</i>	3
	<i>Gammaretrovirus</i>	18
	<i>Lentivirus</i>	10
<i>Spumaretrovirinae</i>	<i>Bovispumavirus</i>	1
	<i>Equispumavirus</i>	1
	<i>Felispumavirus</i>	2
	<i>Prosimiispumavirus</i>	1
	<i>Simiispumavirus</i>	14
Σύνολο	11	68

1.2.4. Η ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ ΤΩΝ ΡΕΤΡΟΪΩΝ

Οι ρετροϊοί είναι ικανοί να μολύνουν πολλούς και διαφορετικούς ζωικούς οργανισμούς, συμπεριλαμβανομένου και του ανθρώπου, προκαλώντας πολλές φορές διάφορες ασθένειες, όπως νευρολογικές και ανοσολογικές διαταραχές ή ακόμα και καρκινογένεση. Οι ρετροϊοί εντοπίζονται, συνήθως, στα υγρά του σώματος του ξενιστή και ο τρόπος μετάδοσής τους μπορεί να είναι είτε οριζόντιος, μέσω έκθεσης σε μολυσμένο αίμα, σάλιο ή παράγωγα υγρά σεξουαλικής επαφής, είτε κάθετος, από τη μητέρα στο παιδί [14].

Οι πιο επικίνδυνοι για την υγεία του ανθρώπου ρετροϊοί είναι ο ιός της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας (Human Immunodeficiency Virus, HIV) και ο ανθρώπινος λεμφοτροπικός ιός τύπου I (Human T-cell Leukemia Virus - type I, HTLV-I) και τύπου II (HTLV-II). Οι συγκεκριμένοι ρετροϊοί μολύνουν τα ανθρώπινα λεμφοκύτταρα και μπορεί να οδηγήσουν σε νόσους με θανατηφόρα κατάληξη για τον άνθρωπο. Ο HTLV μπορεί να προκαλέσει λευχαιμία, ενώ ο HIV μπορεί να προκαλέσει το Σύνδρομο της Επίκτητης Ανοσοανεπάρκειας (Acquired Immune Deficiency Syndrome, AIDS) (Κεφάλαιο 1.3.3) [3].

1.3. Ο ΙΟΣ ΤΗΣ ΑΝΘΡΩΠΙΝΗΣ ΑΝΟΣΟΑΝΕΠΑΡΚΕΙΑΣ (HIV)

Ο ιός της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας (Human Immunodeficiency Virus, HIV) είναι ένας σύνθετος ρετροϊός που μολύνει και καταστρέφει τα ανθρώπινα CD4+ T λεμφοκύτταρα, τα οποία έχουν σημαντικό ρόλο στην ανοσοαπόκριση του οργανισμού. Ο HIV είναι υπεύθυνος για το Σύνδρομο της Επίκτητης Ανοσολογικής Ανεπάρκειας (Acquired Immune Deficiency Syndrome, AIDS), δηλαδή το καταληκτικό στάδιο της HIV λοίμωξης, κατά το οποίο το ανοσοποιητικό σύστημα αδυνατεί να αντιμετωπίσει ορισμένες μολύνσεις και καρκινογενέσεις και μπορεί να οδηγήσει σε θάνατο.

Ο ιός έχει την ικανότητα να ενσωματώνεται και να παραμένει στο ανθρώπινο γονιδίωμα, χωρίς απαραίτητα να προκαλεί την εκδήλωση κλινικών συμπτωμάτων. Ένας άνθρω-

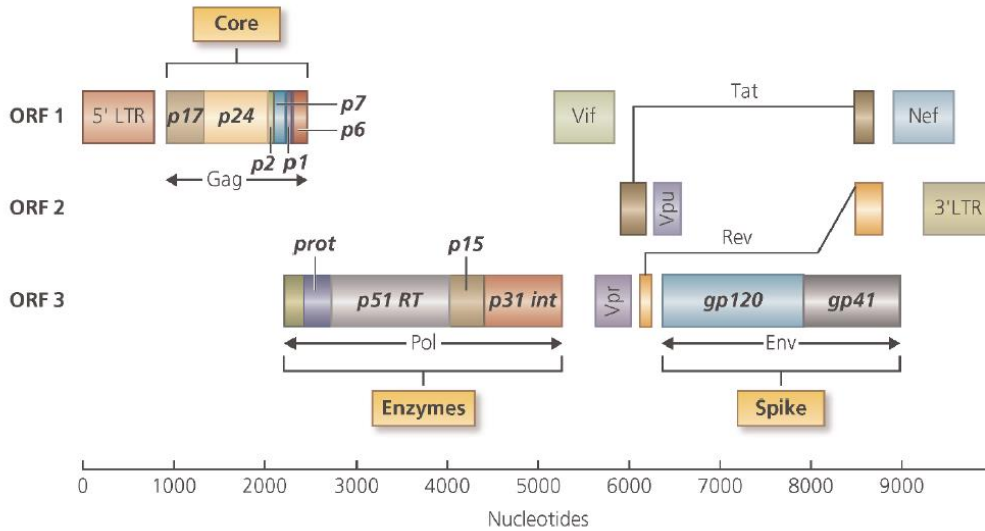
πος που έχει μολυνθεί από HIV, καλείται «HIV οροθετικός» και κρίνεται απαραίτητο να λάβει έγκαιρα την κατάλληλη αντιρετροϊκή θεραπεία. Δεν υπάρχει, μέχρι σήμερα, θεραπεία για την εκρίζωση του HIV από τον οργανισμό του οροθετικού. Ωστόσο, οι υπάρχουσες αντιρετροϊκές θεραπείες είναι ικανές να επιβραδύνουν και να περιορίσουν την εξάπλωση του ιού στον οργανισμό, αυξάνοντας σημαντικά το προσδόκιμο και βελτιώνοντας την ποιότητα ζωής των οροθετικών, καθιστώντας την HIV λοίμωξη ως μια ανίατη μεν, αλλά χρόνια και μη θανατηφόρα νόσο. Επίσης, τα αντιρετροϊκά φάρμακα μειώνουν τη συγκέντρωση του ιού στα μολυσματικά υγρά του οροθετικού και έτσι, μειώνεται η πιθανότητα μετάδοσης σε άλλα άτομα [15].

Ο HIV διακρίνεται σε δύο τύπους, τον HIV-1 και τον HIV-2, οι οποίοι διαχωρίζονται σε επί μέρους ομάδες (Κεφάλαιο 1.3.4). Πρώτος ανακαλύφθηκε ο HIV-1, ο οποίος εμφανίζει μεγαλύτερο επιπολασμό και μολυσματικότητα και είναι ο κύριος υπεύθυνος για την παγκόσμια HIV επιδημία, σε αντίθεση με τον HIV-2 που εντοπίζεται κατά κύριο λόγο σε περιοχές της Δυτικής Αφρικής [7, 16].

1.3.1. Η ΔΟΜΗ ΤΟΥ HIV

Ένα τυπικό στέλεχος του HIV έχει σφαιρικό σχήμα με διάμετρο 100-150 nm [12]. Το γενετικό του υλικό αποτελείται από δύο μονόκλωνα και πανομοιότυπα αντίγραφα RNA θετικής πολικότητας, μήκους περίπου 9-10 kb [5, 7, 12]. Το γονιδίωμα του HIV-1 φέρει συνολικά εννέα γονίδια, εκ των οποίων τα Gag, Pol και Env που βρίσκονται σε όλους τους ρετροϊούς, ενώ τα υπόλοιπα έξι (Tat, Rev, Vif, Vpr, Vpru και Nef) χαρακτηρίζουν αποκλειστικά τα στελέχη του HIV-1 και εντοπίζονται ανάμεσα στα γονίδια Pol και Env (Εικόνα 1.6). Πρόκειται για έξι γονίδια που παράγουν ρυθμιστικές πρωτεΐνες, οι οποίες ελέγχουν τον κύκλο ζωής του HIV-1 [2]. Το γονίδιο Gag είναι υπεύθυνο για την παραγωγή δομικών πρωτεϊνών του καψιδίου, ενώ το γονίδιο Env για την παραγωγή πρωτεϊνών που θα διαμορφώσουν τις γλυκοπρωτεΐνες του φακέλου. Το γονίδιο Pol κωδικοποιεί τα ένζυμα πρωτεάση (*protease*), αντίστροφη μεταγραφάση (*reverse transcription*) και ιντεγκράση (*integrase*) [2]. Η πρωτεάση είναι ένα πρωτεολυτικό ένζυμο, δηλαδή προκαλεί υδρόλυση των πεπτιδικών δεσμών, η αντίστροφη μεταγραφάση είναι το ένζυμο που δημιουργεί μόρια DNA, χρησιμοποιώντας ως καλούπι RNA και η ιντεγκράση είναι υπεύθυνη για την ενσωμάτωση του ιικού γονιδιώματος στο γονιδίωμα του ξενιστή. Η δομή του γονιδιώματος του HIV-2 είναι σχεδόν πανομοιότυπη με αυτή του HIV-1, αλλά αντί του γονιδίου Vpru, φέρει το γονίδιο Vpx [7].

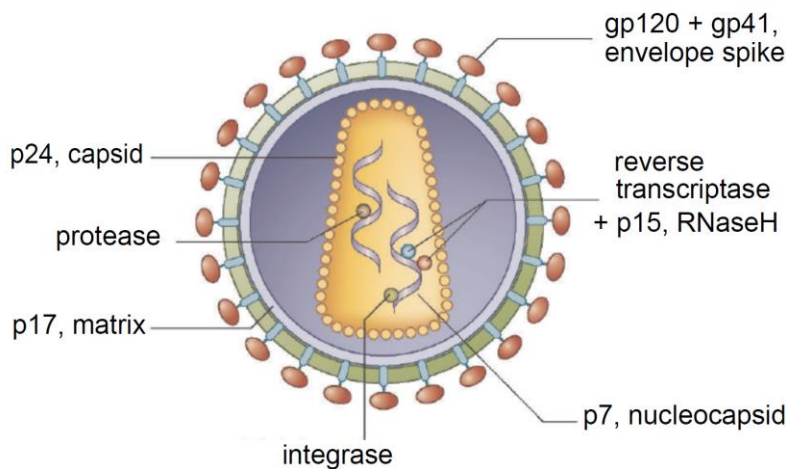
Τα δύο αντίγραφα ιικού γονιδιώματος περιβάλλονται από καψίδιο κωνικού σχήματος, το οποίο συγκροτείται από την πρωτεΐνη p24 που κωδικοποιείται από το Gag [2]. Εκτός του γονιδιώματος, εντός του καψιδίου περιέχονται και τα ένζυμα πρωτεάση, αντίστροφη μεταγραφάση και ιντεγκράση. Για τον τελικό σχηματισμό του νουκλεοκαψιδίου συμμετέχουν και άλλες πρωτεΐνες, όπως οι p6 και p7, οι οποίες κωδικοποιούνται, επίσης, από το γονίδιο Gag (Εικόνα 1.7) [12].



Εικόνα 1.6

Δομή Γονιδιώματος HIV-1 [2]

Το καψίδιο περιβάλλεται από φάκελο διπλής λιπιδικής στιβάδας, ο οποίος προέρχεται από την κυτταρική μεμβράνη του ανθρώπινου λεμφοκυττάρου που χρησιμοποίησε ο ιός ως ξενιστή κατά το σχηματισμό του. Ο φάκελος περιέχει ορισμένες γλυκοπρωτεΐνες του ξενιστή, αλλά και περίπου 72 ικές γλυκοπρωτεΐνες ακιδωτής μορφής (spikes). Κάθε μία από αυτές τις γλυκοπρωτεΐνες αποτελείται από δύο υπομονάδες, τη διαμεμβρανική (transmembrane) gp41 και την στρογγυλής μορφής gp120, η οποία είναι τελείως έξω από το φάκελο και στηρίζεται πάνω στην πρώτη (Εικόνα 1.7). Τα πολυπεπίδια και των δύο υπομονάδων κωδικοποιούνται από το γονίδιο Env [2, 12]. Η εσωτερική επιφάνεια του φακέλου στηρίζεται πάνω σε ένα εικοσαεδρικό εσωτερικό πλαίσιο (matrix), το οποίο σχηματίζεται από την πρωτεΐνη p17 που κωδικοποιείται από το γονίδιο Gag [12].



Εικόνα 1.7

Δομή ενός στελέχους HIV [2]

Πίνακας 1.3

Ορισμένες σημαντικές πρωτεΐνες των γονιδίων του HIV και η λειτουργία τους [12]

Γονίδιο	Πρωτεΐνη HIV	Λειτουργία
Δομικά		
<i>Gag</i>	p17	Δόμηση εσωτερικού πλαισίου
	p24	Δόμηση καψιδίου
	p6, p7	Δόμηση νουκλεοκαψιδίου
<i>Pol</i>	p12	Ένζυμο πρωτεάση
	p66, p51	Ένζυμο αντίστροφη μεταγραφάση
	p32	Ένζυμο ιντεγκράση
<i>Env</i>	p120	Δόμηση γλυκοπρωτεϊνών φακέλου
Ρυθμιστικά		
<i>Tat</i>	p14	Ρύθμιση μεταγραφής
<i>Rev</i>	p19	Μεταφορά mRNA στο κυτταρόπλασμα
<i>Vif</i>	p24	Πρόσδεση ιού σε υποδοχείς κυττάρου
<i>Nef</i>	p27	Πρόσδεση ιού σε υποδοχείς κυττάρου
<i>Vpr</i>	p16	Απελευθέρωση ιού από κύτταρο
<i>Vpr</i>	p15	Είσοδος ιού στον πυρήνα του κυττάρου
<i>Vpx</i>	p14	Αντιγραφή ιού

1.3.2. Ο ΚΥΚΛΟΣ ΖΩΗΣ ΤΟΥ HIV

Ο HIV, όπως όλοι οι ιοί, δεν διαθέτει μεταβολικούς μηχανισμούς και γι' αυτό είναι δεν μπορεί να αναπαραχθεί, χωρίς προηγουμένως να μολύνει το κατάλληλο κύτταρο. Ο συγκεκριμένος ιός είναι ικανός να μολύνει κύτταρα τα οποία εκθέτουν στην επιφάνειά τους ειδικούς πρωτεϊνικούς υποδοχείς CD4. Αυτοί οι υποδοχείς υπάρχουν κατά κύριο λόγο στα βοηθητικά Τ-λεμφοκύτταρα (ή CD4⁺ λεμφοκύτταρα), αλλά και σε μακροφάγα, μονοκύτταρα και δενδριτικά (νευρογλοιακά) κύτταρα.

Η είσοδος στο κύτταρο ξεκινάει με την πρόσδεση των gp120 γλυκοπρωτεϊνών του ιικού φακέλου με τους CD4 υποδοχείς που είναι εκτεθειμένοι στην εξωτερική επιφάνεια του κυττάρου, σχηματίζοντας ένα σύμπλοκο. Για να προχωρήσει η είσοδος, θα πρέπει το σύμπλοκο αυτό να συνδεθεί με έναν επιπρόσθετο πρωτεϊνικό συν-υποδοχέα της κυτταρικής επιφάνειας, είτε τον CCR5 ή τον CXCR4, οι οποίοι είναι υποδοχείς κυτοκινών. Αυτή η σύνδεση επάγει την σύντηξη της κυτταρικής μεμβράνης με τον ιικό φάκελο και έτσι, επιτυγχάνεται η είσοδος του καψιδίου στο κυτταρόπλασμα.

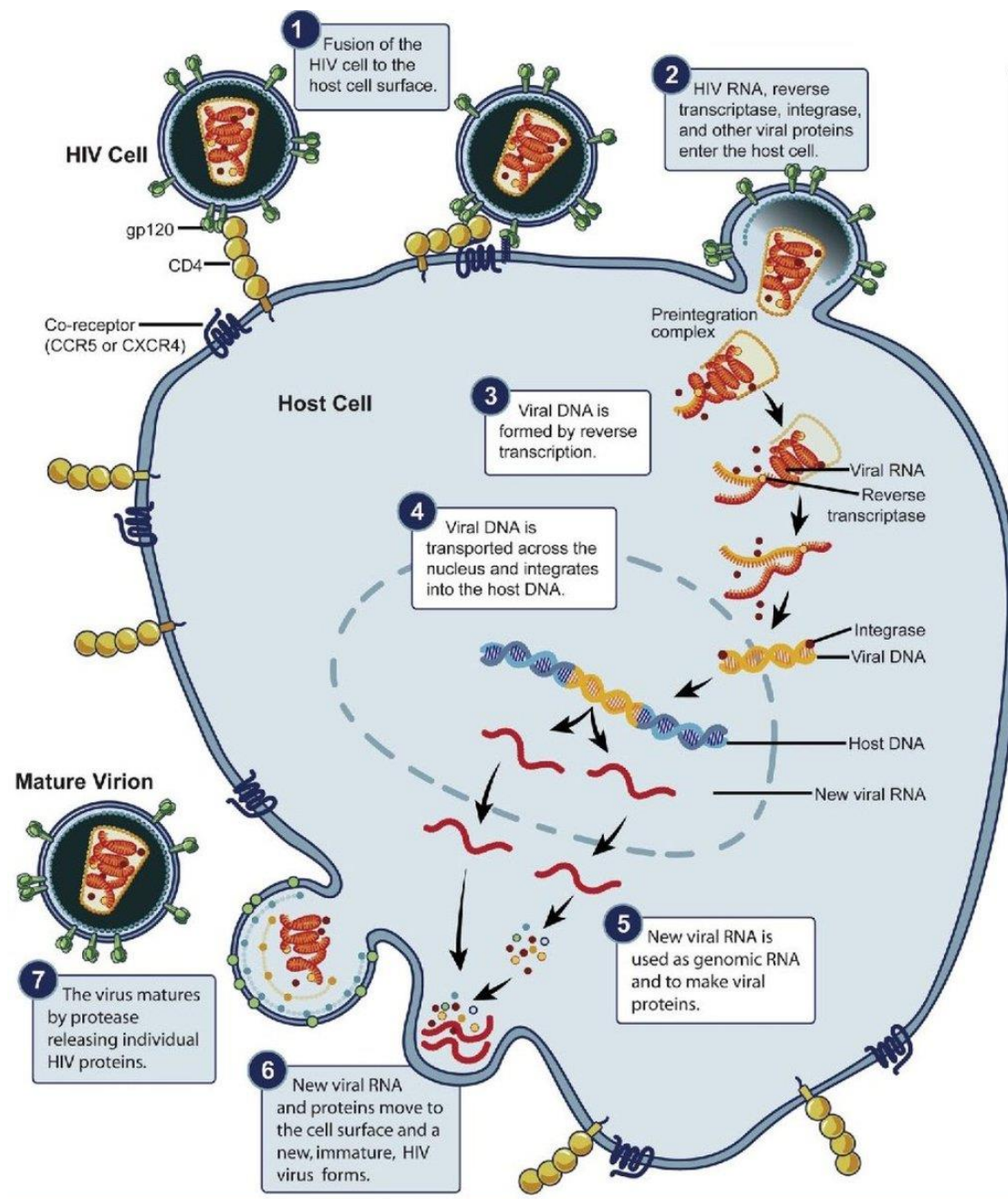
Το γενετικό υλικό και τα ένζυμα του ιού απελευθερώνονται από το καψίδιο στο εσωτερικό του κυττάρου και η αντίστροφη μεταγραφάση ξεκινάει τη μεταγραφή του RNA γενετικού υλικού του ιού σε δίκλωνο DNA. Σε πρώτο βήμα, η αντίστροφη μεταγραφάση δρα

πάνω στο RNA του ιού και συνθέτει ένα συμπληρωματικό DNA κλώνο, δημιουργώντας ένα υβριδικό μόριο DNA-RNA. Στη συνέχεια, οι δύο κλώνοι του υβριδικού μορίου διαχωρίζονται και η μονόκλωνη αλυσίδα DNA χρησιμοποιείται ως μήτρα, πάνω στην οποία θα δράσει η DNA πολυμεράση, για να συνθέσει τη συμπληρωματική της θυγατρική αλυσίδα, σχηματίζοντας ένα δίκλωνο μόριο DNA. Το νεοσυντιθέμενο μόριο DNA που περιέχει τις γενετικές πληροφορίες του ιού, μαζί με τα ιικά ένζυμα μεταφέρονται στον πυρήνα του κυττάρου, στον οποίο εισέρχεται μέσω πόρων της πυρηνικής μεμβράνης.

Στον πυρήνα, το DNA του ιού ενσωματώνεται στο γονιδίωμα του κυττάρου-ξενιστή με τη δράση του ιικού ενζύμου ιντεγκράση και αρχίζει να μεταγράφεται σε μόρια mRNA. Αρχικά, τα πρόδρομα mRNAs πέπτονται από ένζυμα σε αρκετά σημεία, υφίστανται, δηλαδή, μια διαδικασία ωρίμανσης που ονομάζεται *μάτισμα*, με αποτέλεσμα να προκύπτουν μόρια mRNAs μικρότερου μήκους (περίπου 2000 νουκλεοτιδίων). Αυτά, μεταφέρονται στα ριβοσώματα του κυτταροπλάσματος και κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες των γονιδίων Tat, Rev και Nef. Η Tat πρωτεΐνη επιστρέφει στον πυρήνα και λειτουργεί ως μεταγραφικός παράγοντας που αυξάνει το ρυθμό μεταγραφής του ιικού γονιδιώματος, αλλά και ως καταστολέας του μάτισματος των ιικών mRNA. Έτσι, προκύπτουν mRNAs μεγαλύτερου μήκους (περίπου 4000 νουκλεοτιδίων), από τα οποία κωδικοποιούνται οι πρωτεΐνες των γονιδίων Env, Vif, Vpr και Vpr, αλλά και RNAs πλήρους μήκους, τα οποία μπορεί να έχουν ρόλο mRNA που κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες των γονιδίων Gag και Gag-Pol ή να αποτελέσουν τα RNA γονιδιώματα των νέων ιικών στελεχών. Η Rev πρωτεΐνη επιστρέφει κι αυτή στον πυρήνα και συμβάλλει καταλυτικά στη μεταφορά των mRNAs μεγαλύτερου μήκους στα ριβοσώματα του κυτταροπλάσματος [6].

Μέσω της πρωτεϊνοσύνθεσης του ιού θα σχηματιστούν όλες οι απαραίτητες πρωτεΐνες για τη συγκρότηση των νέων στελεχών. Οι πρωτεΐνες του καψιδίου, του νουκλεοκαψιδίου και του εσωτερικού πλαισίου κωδικοποιούνται από το γονίδιο Gag, ενώ τα ένζυμα πρωτεάση, αντίστροφη μεταγραφάση και ιντεγκράση από το γονίδιο Pol. Οι πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από το γονίδιο Env μεταφράζονται στα ριβοσώματα του ενδοπλασματικού δικτύου, όπου ενώνονται με μόρια υδατανθράκων για να σχηματίσουν τις γλυκοπρωτεΐνες του φακέλου gp120 και gp41 και στη συνέχεια μεταφέρονται στην επιφάνεια του κυττάρου [17].

Οι περισσότερες από τις ιικές συντιθέμενες πρωτεΐνες χρειάζονται την ενεργή δράση της πρωτεάσης, προκειμένου να ωριμάσουν και να γίνουν λειτουργικές. Στη συνέχεια, ξεκινάει η διαδικασία συναρμολόγησης των νέων στελεχών του HIV. Οι πρωτεΐνες p24 συναρμολογούν τα νέα καψίδια και σε κάθε ένα από αυτά, εσωκλείονται δύο μόρια RNA που φέρουν το γονιδίωμα του ιού, τα οποία συσπειρώνονται και πακετάρονται με τη βοήθεια πρωτεϊνών, όπως η p6 και p7, σχηματίζοντας το νουκλεοκαψίδιο. Επίσης, μέσα στο καψίδιο συγκεντρώνονται σημαντικά ιικά ένζυμα, όπως πρωτεάση, αντίστροφη μεταγραφάση και ιντεγκράση. Αφού σχηματιστεί το εσωτερικό πλαίσιο, ακολουθεί η φάση της απελευθέρωσης, κατά την οποία τα νέα στελέχη του ιού εξέρχονται από το κύτταρο. Κατά την έξοδο αποσχίζεται ένα κομμάτι της κυτταρικής μεμβράνης, το οποίο στη συνέχεια σχηματίζει το φάκελο που περιβάλλει τον ιό. Ο φάκελος φέρει τις ιικές γλυκοπρωτεΐνες, οι οποίες είχαν ήδη μεταφερθεί στην κυτταροπλασματική μεμβράνη πριν την απελευθέρωση και διάφορες πρωτεΐνες της εξωτερικής επιφάνειας του κυττάρου-ξενιστή [6].



Εικόνα 1.8

Σχηματική απεικόνιση του κύκλου ζωής του HIV [18]

1.3.3. Το ΣΥΝΔΡΟΜΟ ΕΠΙΚΤΗΤΗΣ ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΝΕΠΑΡΚΕΙΑΣ (AIDS)

Το Σύνδρομο της Επίκτητης Ανοσολογικής Ανεπάρκειας (Acquired Immune Deficiency Syndrome, AIDS) είναι η νόσος του ανθρώπινου ανοσοποιητικού συστήματος που προκαλείται από τον ιό της Ανθρώπινης Ανοσοανεπάρκειας (Human Immunodeficiency Virus, HIV). Η νόσος δρα στο ανοσοποιητικό σύστημα, καθιστώντας άτομα που πάσχουν από AIDS ευάλωτα σε ευκαιριακές λοιμώξεις και καρκινικούς όγκους, που το ανοσοποιητικό σύστημα υγιών ατόμων θα αντιμετώπιζε αποτελεσματικά με σχετική ευκολία [19].

Ένας φορέας του ιού HIV θεωρείται ότι έχει αναπτύξει τη νόσο AIDS όταν η συγκέντρωση των CD4⁺ κυττάρων του στον ορό του αίματος είναι μικρότερη των 200 CD4⁺/μL ή όταν εμφανίσει συγκεκριμένες νόσους που σχετίζονται με προχωρημένο στάδιο της HIV λοίμωξης, όπως πνευμονία, σάρκωμα Kaposi (KS), σύνδρομο απίσχυσης (απώλεια βάρους), βλάβες μνήμης, καντιντίαση, κα [20].

Η HIV/AIDS λοίμωξη διακρίνεται σε 4 κλινικά στάδια, σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (World Health Organization, WHO), τα οποία διαχωρίζονται με βάση τον αριθμό CD4⁺ κυττάρων στο αίμα, αλλά και με βάση την εμφάνιση ορισμένων συμπτωμάτων (Πίνακας 1.4) [21].

Πίνακας 1.4

Τα κλινικά στάδια της HIV/AIDS λοίμωξης με βάση τον αριθμό των CD4⁺ κυττάρων ανά mm³ αίματος και ο βαθμός των συμπτωμάτων ανά στάδιο [21]

Κλινικό Στάδιο	Αριθμός CD4 ⁺ /mm ³ αίματος	Βαθμός Συμπτωμάτων
I	> 500	Χωρίς συμπτώματα
II	350 - 499	Ήπια συμπτώματα
III	200 - 349	Προχωρημένα συμπτώματα
IV ή AIDS	< 200	Σοβαρά συμπτώματα

1.3.4. Η ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΚΑΙ ΟΙ ΥΠΟΤΥΠΟΙ ΤΟΥ HIV

Δύο είδη του HIV έχουν καταγραφεί, ο HIV-1 και ο HIV-2, τα οποία, σύμφωνα με την ταξινόμηση της ICTV³, ανήκουν στο γένος των *Lentivirus* της οικογένειας των ρετροϊών (*Retroviridae*) (Πίνακας 1.5) [10].

Πίνακας 1.5

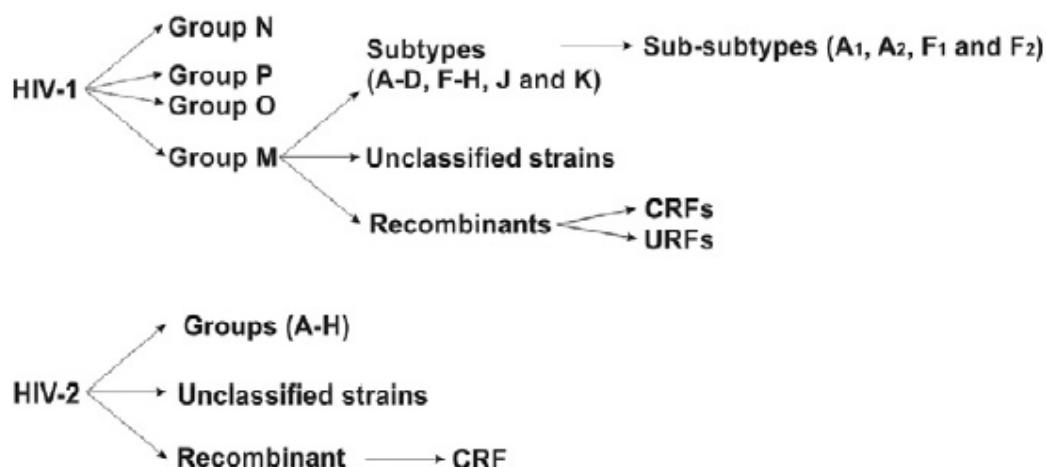
Συστηματική ταξινόμηση του HIV-1 και HIV-2 [10]

Τάξη	Ortervirales
Οικογένεια	Retroviridae
Υπο-οικογένεια	Orthoretrovirinae
Γένος	<i>Lentivirus</i>
Είδος	<i>Human Immunodeficiency Virus 1, HIV-1</i> <i>Human Immunodeficiency Virus 2, HIV-2</i>

Ο HIV εμφανίζει μεγάλο βαθμό ετερογένειας, ο οποίος οφείλεται στον υψηλό ρυθμό του κύκλου ζωής του, στο μεγάλο αριθμό απογόνων που γεννιούνται σε κάθε αναπαραγωγικό κύκλο και στην απουσία επιδιορθωτικού ελέγχου της αντίστροφης μεταγραφάσης [16]. Επίσης, σημαντικό μέρος της γενετικής ετερογένειας του ιού οφείλεται στο *γενετικό ανασυνδυασμό*, δηλαδή έναν μηχανισμό ανταλλαγής γενετικού υλικού, ανάμεσα σε δύο διαφορετικά μόρια ιικού γονιδιώματος που μπορεί να συμβεί κατά το στάδιο της αντίστροφης μεταγραφής του ιικού RNA [22].

³ International Committee on Taxonomy of Virus (ICTV) <https://talk.ictvonline.org>

Λόγω της μεγάλης ετερογένειας, ο HIV διακρίνεται σε δύο τύπους, τον HIV-1 και HIV-2, καθένας από τους οποίους, διακρίνεται σε επί μέρους ομάδες. Πιο συγκεκριμένα, ο HIV-1 διακρίνεται σε 4 ομάδες, τις M (main), N (non-M), O (outlier) και P, ενώ ο HIV-2, σε 8 ομάδες, από τις οποίες οι πιο επικρατείς είναι οι A και B. Η ομάδα M του HIV-1 εμφανίζει τη μεγαλύτερη ετερογένεια και διακρίνεται επί πλέον σε 9 υπότυπους (A-D, F-H, J και K) και 49 ανασυνδυασμένες μορφές (Circulating Recombinant Forms, CRF) των υποτύπων (Εικόνα 1.9) [1, 16, 23].



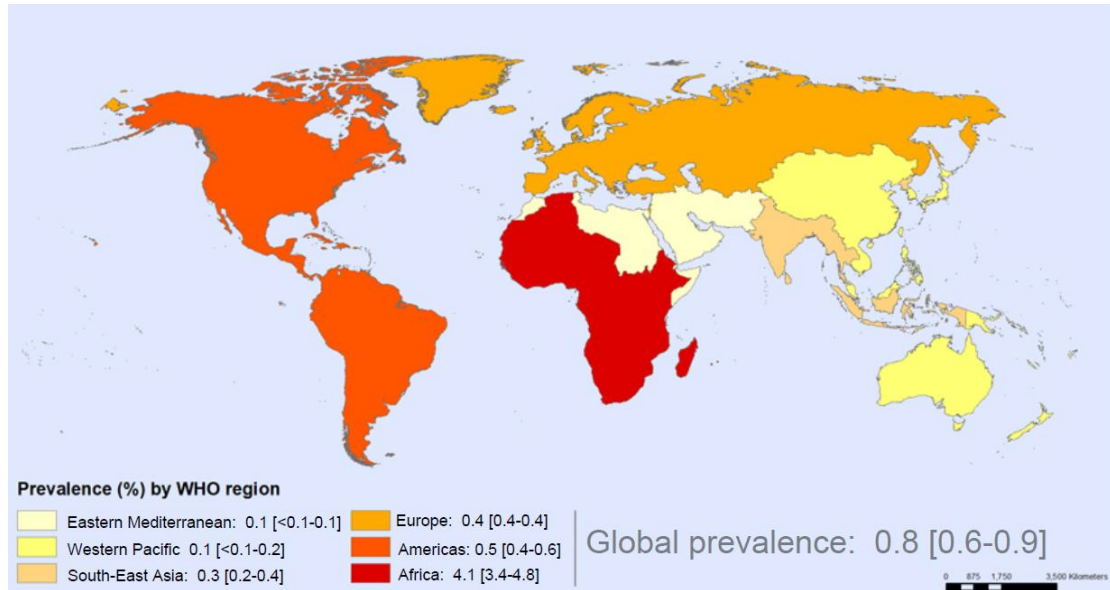
Εικόνα 1.9

Σχήμα ταξινόμησης των HIV-1 και HIV-2 με τις αντίστοιχες ομάδες, υπότυπους και ανασυνδυασμένες μορφές του ιού [24]

1.3.5. Η ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ HIV

Από την αρχή της επιδημίας HIV/AIDS μέχρι και σήμερα, εκτιμάται ότι 77,3 εκ. (59,9 εκ. – 100 εκ.) άνθρωποι έχουν μολυνθεί από τον ιό και 35,4 εκ. (25 εκ. – 49,9 εκ.) άνθρωποι έχουν πεθάνει από κάποια ασθένεια που σχετίζεται με το AIDS. Ο αριθμός των ανθρώπων παγκοσμίως, συμπεριλαμβανομένου όλων των ηλικιών, που ζούσαν το 2017 με HIV ήταν 36,9 εκ. (31,1 εκ.– 43,9 εκ.) και από αυτούς, το 1,8 εκ. ήταν παιδιά κάτω των 15 ετών. Ο συνολικός αριθμός θανάτων, για το 2017, εξαιτίας της HIV/AIDS λοίμωξης ήταν 0,94 εκ. (0,67 εκ. – 1,3 εκ.) και αντίστοιχα, η θνησιμότητα ήταν περίπου 12,7 θάνατοι ανά 100 χιλιάδες, ενώ η θνητότητα 25 θάνατοι ανά 1000 ασθενείς [25].

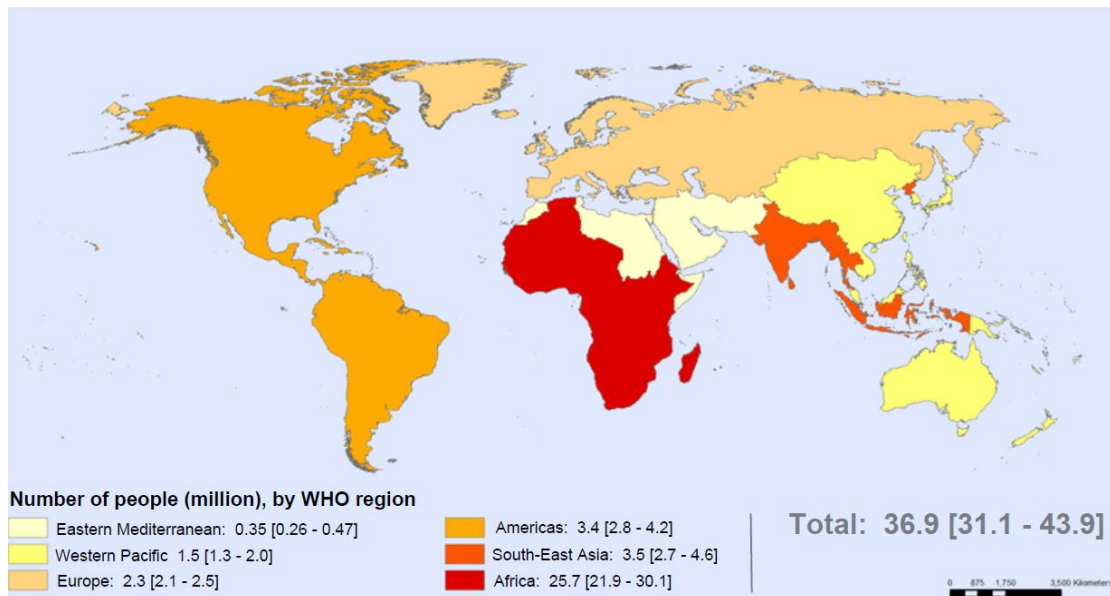
Σύμφωνα με τις εκτιμήσεις του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (World Health Organization, WHO) για το 2017, ο παγκόσμιος επιπολασμός της επιδημίας για τις ηλικίες 15-49 ήταν 0,8% (0,6% - 0,9%). Ο υψηλότερος επιπολασμός της επιδημίας, στις αντίστοιχες ηλικίες, παρουσιάζεται στην Υποσαχάρια Αφρική και εκτιμάται στο 4,1% (3,4%-4,8%), ενώ για τις υπόλοιπες ηπείρους, ο επιπολασμός εκτιμάται πως δεν ξεπερνάει το 0,5% ανά ήπειρο (Εικόνα 1.10) [26].



Εικόνα 1.10

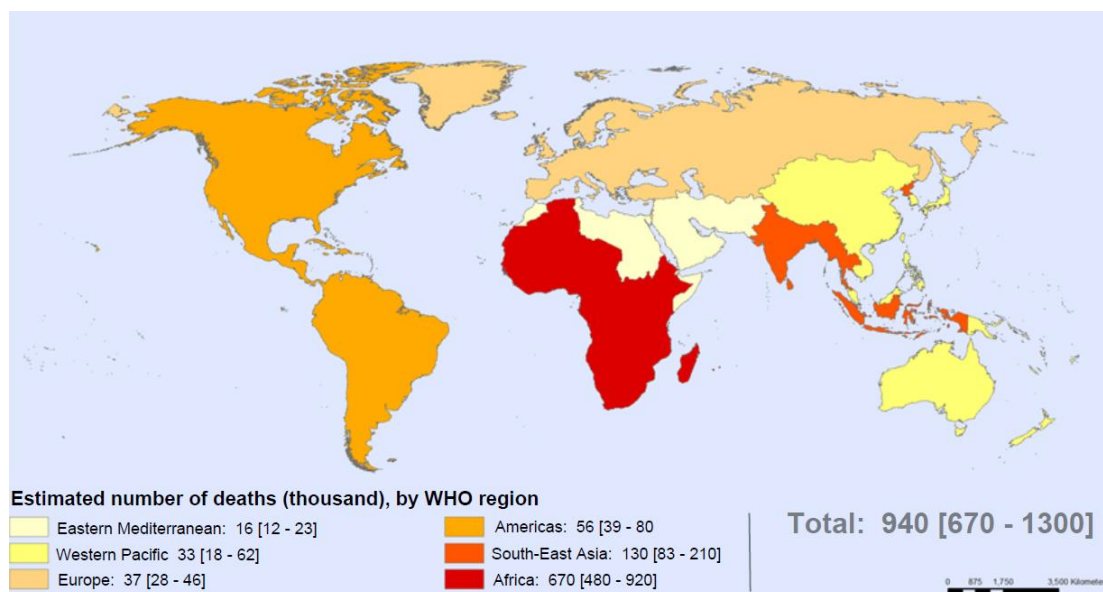
Επιπολασμός του HIV ανά γεωγραφική περιοχή σε οροθετικούς ηλικίας 15-49, για το έτος 2017, σύμφωνα με στοιχεία του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (WHO) [26]

Ακόμη, εκτιμάται ότι 25,7 εκ. (21,9 εκ – 30,1 εκ.) οροθετικοί, δηλαδή το 69,6% του παγκόσμιου αριθμού λοιμώξεων και το 71,3% του συνολικού αριθμού θανάτων που οφείλονται στην HIV/AIDS λοίμωξη, δηλαδή 0,67 εκ. (0,48 εκ. – 0,92 εκ.) θάνατοι, εντοπίζονται στην Υποσαχάρια Αφρική (Εικόνα 1.11 & Εικόνα 1.12) [26].



Εικόνα 1.11

Αριθμός ανθρώπων που εκτιμάται ότι ζούσαν με HIV για το έτος 2017, ανά γεωγραφική περιοχή, σύμφωνα με στοιχεία του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (WHO) [26]



Εικόνα 1.12

Αριθμός ανθρώπων που εκτιμάται ότι έχουν πεθάνει από αίτια σχετικά με την HIV λοίμωξη για το έτος 2017, ανά γεωγραφική περιοχή, σύμφωνα με στοιχεία του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (WHO) [26]

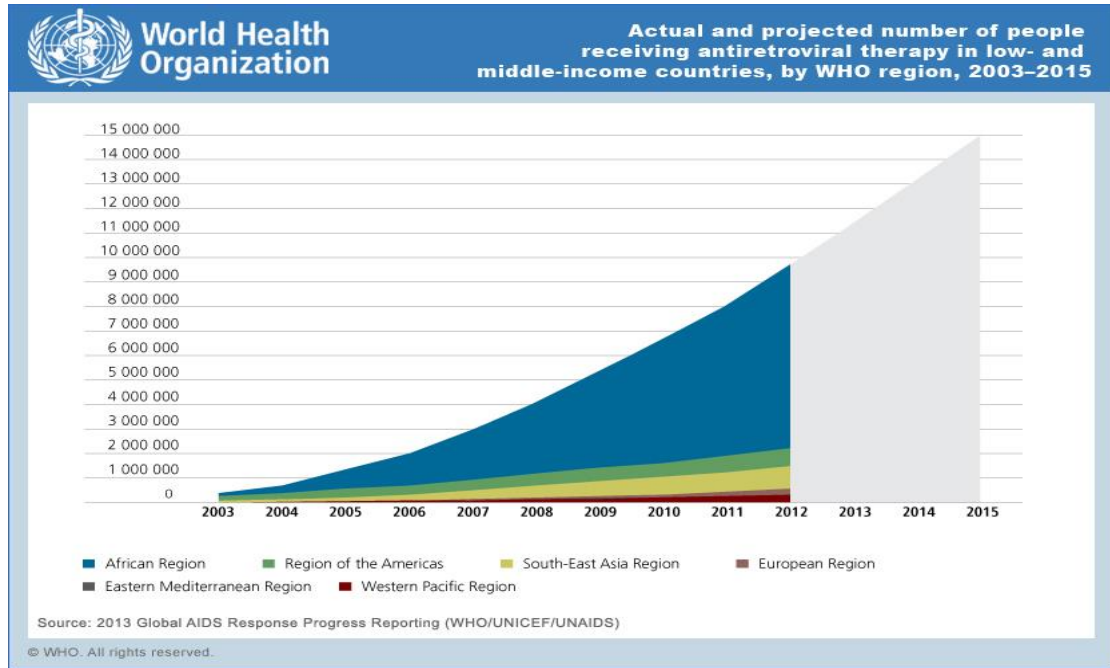
Ο αριθμός των νέων λοιμώξεων για το έτος 2017, σε παγκόσμιο επίπεδο, εκτιμάται πως ήταν 1,8 εκ. (1,4 εκ. – 2,4 εκ.) και η αντίστοιχη επίπτωση 0,25 (0,19 – 0,33) νέες HIV λοιμώξεις ανά 1000 ανθρωποέτη. Στην Υποσαχάρια περιοχή της Αφρικής εκτιμάται ότι υπήρξαν 1,2 εκ. νέες λοιμώξεις για το ίδιο έτος, που αντιστοιχούν σε επίπτωση 1,22 (0,9 – 1,64) λοιμώξεις ανά 1000 ανθρωποέτη (Πίνακας 1.6) [26]

Πίνακας 1.6

Αριθμός νέων HIV λοιμώξεων και η αντίστοιχη επίπτωση για το έτος 2017, ανά γεωγραφική περιοχή, σύμφωνα με στοιχεία του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (WHO) [26]

	Αριθμός νέων HIV λοιμώξεων σε χιλιάδες (95% ΔΕ)	Επίπτωση σε 1000 ανθρωποέτη (95% ΔΕ)
Αφρική	1200 (880 – 1600)	1,22 (0,9 – 1,64)
Αμερική	160 (120 – 210)	0,16 (0,12 – 0,21)
Νότιο-ανατολική Ασία	160 (100 – 240)	0,08 (0,05 – 0,13)
Ευρώπη	160 (140 – 180)	0,18 (0,17 – 0,20)
Ανατολική Μεσόγειος	37 (26 – 55)	0,06 (0,05 – 0,13)
Δυτικός Ειρηνικός	100 (84 – 130)	0,06 (0,04 – 0,07)
Παγκόσμια	1800 (1400 – 2400)	0,25 (0,19 – 0,33)

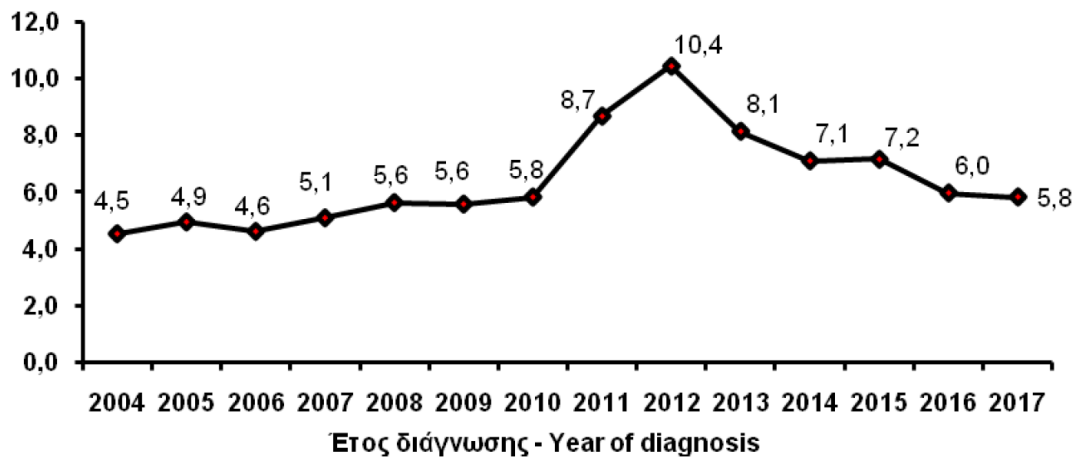
Ο αριθμός των νέων HIV λοιμώξεων παρουσιάζει πτωτική τάση τα τελευταία χρόνια και έχει σχεδόν υποδιπλασιαστεί, με 47% μείωση, σε σχέση με το 1996. Κάτι ανάλογο ισχύει και με τον αριθμό θανάτων που έχουν σχέση με το AIDS, αφού έχουν μειωθεί περισσότερο από 51% συγκριτικά με το 2004, γεγονός που οφείλεται σε μεγάλο βαθμό και στην αύξηση του αριθμού των οροθετικών που έχουν πρόσβαση σε αντιρετροϊκή θεραπεία (Γράφημα 1.1) [25].



Γράφημα 1.1

Αριθμός οροθετικών με πρόσβαση σε αντιρετροϊκή θεραπεία από το 2003 μέχρι το 2012, σύμφωνα με στοιχεία του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (WHO) [26]

Στην Ελλάδα, μέχρι και το 2017, έχουν δηλωθεί στο εθνικό σύστημα επιδημιολογικής επιτήρησης, συνολικά, 16.669 HIV οροθετικά άτομα, από τους οποίους το 82,84% ήταν άντρες, το 2,82% γυναίκες, ενώ για το 0,24% δεν δηλώθηκε φύλο [27].



Γράφημα 1.2

Διαγνώσεις HIV λοίμωξης ανά 100.000 πληθυσμού στην Ελλάδα (2004-2017), σύμφωνα με στοιχεία του Κέντρου Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων (ΚΕ.ΕΛ.Π.ΝΟ.) [27]

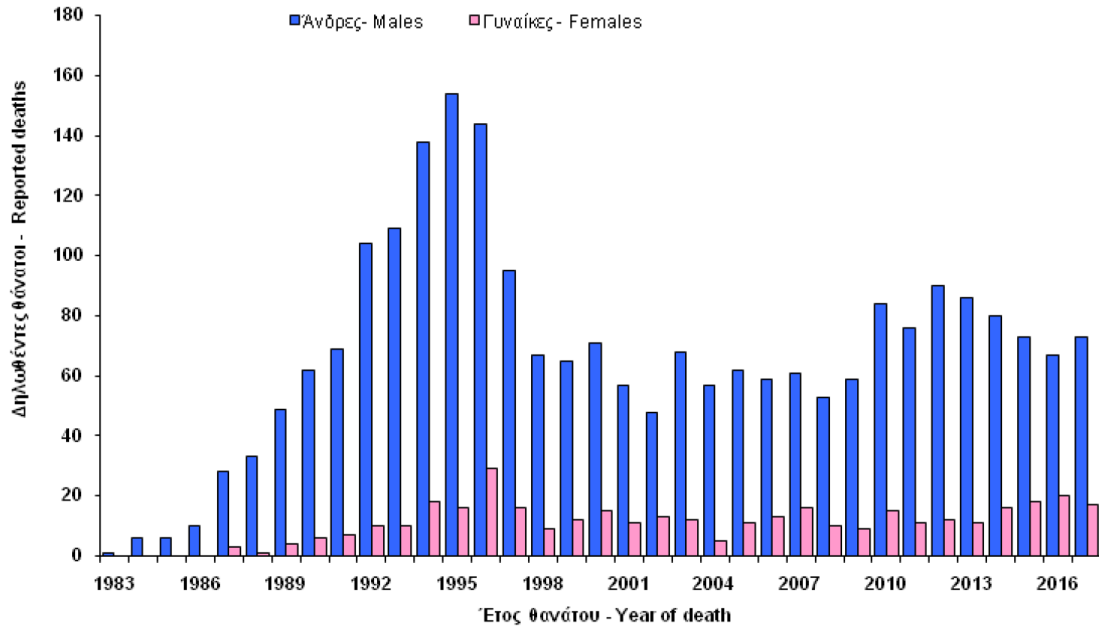
Η πρώτη HIV λοίμωξη στην Ελλάδα διαγνώστηκε το 1981 και τα επόμενα χρόνια η επιδημία ακολούθησε αυξητική τάση μέχρι το 2012, με εξαίρεση την περίοδο 1999-2003, κατά την οποία υπήρξε μια μείωση και σταθεροποίηση στον αριθμό των νέων μολύνσεων. Ο μεγαλύτερος αριθμός νέων λοιμώξεων ανά έτος εμφανίστηκε το 2012 με 1157 νέες διαγνώσεις, ενώ στη συνέχεια, υπήρξε μια μειωτική τάση, φτάνοντας το 2017 να έχουν διαγνωστεί 628 νέες λοιμώξεις, με επίπτωση 5,8 ανά 100.000 ανθρωποέτη (Γράφημα 1.2). Οι περισσότεροι HIV οροθετικοί με πρώτη ημερομηνία διάγνωσης το 2017 ήταν ηλικίας 30-39 ετών (n=225) και ακολουθούσαν αυτοί με ηλικία 40-49 ετών (n=163) (Πίνακας 1.7) [27].

Πίνακας 1.7

Νέες διαγνώσεις της HIV λοίμωξης στην Ελλάδα για το 2017, κατά ηλικιακή ομάδα και κατά φύλο, σύμφωνα με στοιχεία του Κέντρου Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων (ΚΕ.ΕΛ.Π.ΝΟ.) [27]

Ηλικιακή ομάδα Age group	Άνδρες** Males**		Γυναίκες Females		Σύνολο Total	
	N	(%)	N	(%)	N	(%)
< 15 ετών - years old	1	(0,2)	0	(0,0)	1	(0,2)
15 – 19 ετών - years old	6	(1,2)	4	(3,8)	10	(1,6)
20 – 24 ετών - years old	31	(5,9)	7	(6,6)	38	(6,1)
25 – 29 ετών - years old	66	(12,6)	14	(13,2)	80	(12,7)
30 – 39 ετών - years old	192	(36,8)	33	(31,2)	225	(35,8)
40 – 49 ετών - years old	139	(26,6)	24	(22,6)	163	(26,0)
50+ ετών - years old	87	(16,7)	24	(22,6)	111	(17,6)
Άγνωστη - Unknown	0	(0,0)	0	(0,0)	0	(0,0)
Σύνολο - Total	522	100,0	106	100,0	628	100,0

Ο συνολικός αριθμός των ασθενών στην Ελλάδα που νόσησαν από AIDS από την εμφάνιση της επιδημίας μέχρι και το 2017 ήταν 4.094 άτομα, εκ των οποίων το 83,6% ήταν άνδρες και το 16,4% γυναίκες. Το πρώτο περιστατικό AIDS που διαγνώστηκε στην Ελλάδα ήταν το 1981 και από τότε μέχρι και το 1996 η νόσος εμφάνιζε αυξητική τάση ως προς τον αριθμό διαγνώσεων, φτάνοντας τα 236 περιστατικά. Από το 1997 μέχρι και το 2001, παρατηρήθηκε μια σημαντική μείωση στην επίπτωση του AIDS, η οποία αποδίδεται στην ευρεία χορήγηση αποτελεσματικών αντιρετροϊκών φαρμάκων. Τα νέα περιστατικά AIDS στην Ελλάδα για το 2017 ήταν 112, από τα οποία το 75,9% αφορούσε σε άντρες και σε άτομα ηλικίας μεγαλύτερης των 30 ετών. Οι συχνότερα εμφανιζόμενες ενδεικτικές νόσοι κατά τη διάγνωση του AIDS για το 2017 ήταν η πνευμονία από *Pneumocystis jirovecii* (35,7%), το σύνδρομο απίσχυσης (17%) και η καντιντίαση οισοφάγου (12,5%). Ο συνολικός αριθμός θανάτων σε ασθενείς με AIDS το 2017 ήταν 90 άτομα (Γράφημα 1.3) [27].



Γράφημα 1.3

Θάνατοι σε άτομα με AIDS στην Ελλάδα για το έτος 2017, κατά έτος θανάτου και κατά φύλο, σύμφωνα με στοιχεία του Κέντρου Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων (ΚΕ.ΕΛ.Π.ΝΟ.) [27]

1.3.5.1. ΟΙ ΤΡΟΠΟΙ ΜΕΤΑΔΟΣΗΣ ΤΟΥ HIV

Ο HIV βρίσκεται σε υψηλές συγκεντρώσεις στα υγρά του σώματος, όπως το αίμα και τα σπερματικά ή κολπικά υγρά. Γι' αυτό το λόγο, η μετάδοση του HIV μπορεί να γίνει μέσω τριών κύριων οδών.

1. Έκθεση σε μολυσματικά σπερματικά ή κολπικά υγρά μέσω σεξουαλικής επαφής (κυρίως χωρίς τη χρήση προφυλακτικού). Η μετάδοση μπορεί να πραγματοποιηθεί, κατά τη διάρκεια της σεξουαλικής επαφής, είτε από μολυσμένο CD4⁺ T-λεμφοκύτταρο ή από ελεύθερο ιό στα μολυσματικά σπερματικά/κολπικά υγρά [2]. Το ικό φορτίο του οροθετικού παίζει σημαντικό ρόλο στον κίνδυνο μετάδοσης του ιού και έτσι, η μολυσματικότητα ενός οροθετικού ατόμου είναι σημαντικά υψηλότερη κατά το πρώτο χρονικό διάστημα της λοίμωξης, λόγω της υψηλής συγκέντρωσης ικού φορτίου [28].
2. Έκθεση σε μολυσμένο αίμα ή παράγωγά του, το οποίο μπορεί να πραγματοποιηθεί από μεταγγίσεις μολυσμένου αίματος, χρήση κοινής σύριγγας, χρήση μη αποστειρωμένων ιατρικών οργάνων, κλπ. [6].
3. Κάθετη μετάδοση από μητέρα σε παιδί, κατά τη διάρκεια της κυοφορίας, του τοκετού ή του θηλασμού. Ο κίνδυνος μόλυνσης μέσω της συγκεκριμένης οδού μπορεί να περιοριστεί σημαντικά αν η οροθετική μητέρα λαμβάνει αντιρετροϊκή θεραπεία κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης και του τοκετού, με αποτέλεσμα να μειωθεί το ικό της φορτίο [2].

1.3.5.2. ΟΙ ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΜΕΤΑΔΟΣΗΣ ΤΟΥ HIV

Ορισμένες ομάδες ανθρώπων εμφανίζουν αυξημένο κίνδυνο μόλυνσης από τον HIV, κυρίως, λόγω συγκεκριμένων παραγόντων κινδύνου που αυξάνουν την πιθανότητα έκθεσης στον ιό, όπως επικίνδυνη σεξουαλική συμπεριφορά ή κοινή χρήση βελόνας, σύριγγας ή άλλων ενδοφλέβιων εξαρτημάτων [29]. Κάθε ομάδα κινδύνου, ή συνώνυμα κατηγορία μετάδοσης, διακρίνεται από ορισμένα χαρακτηριστικά που πληροφορούν για τον τρόπο που πραγματοποιήθηκε η μετάδοση. Η γνώση των παραγόντων συμπεριφοράς της κάθε ομάδας έχει ιδιαίτερη επιδημιολογική σημασία, καθώς συμβάλει στην πληρέστερη κατανόηση των χαρακτηριστικών της επιδημίας και στη λήψη αποτελεσματικότερων μέτρων πρόληψης.

Στην Ελλάδα, το Κέντρο Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων (ΚΕ.ΕΛ.Π.ΝΟ.) κατατάσσει όλες τις HIV λοιμώξεις στις εξής κατηγορίες μετάδοσης:

- ❖ Σεξουαλική επαφή μεταξύ ανδρών
- ❖ Ετεροφυλοφιλική σεξουαλική επαφή
- ❖ Ενέσιμη χρήση εξαρτησιογόνων ουσιών
- ❖ Πολυμεταγγιζόμενοι/ες με παράγωγα αίματος
- ❖ Μετάγγιση
- ❖ Κάθετη μετάδοση
- ❖ Ακαθόριστο

Ο κυριότερος τρόπος μετάδοσης του HIV, από την αρχή της επιδημίας μέχρι σήμερα, στην Ελλάδα είναι η απροφύλακτη σεξουαλική επαφή μεταξύ ανδρών με ποσοστό 48,4% και ακολουθούν η απροφύλακτη ετεροφυλοφιλική επαφή (21,5%), η χρήση ενέσιμων εξαρτησιογόνων ουσιών (11,5%), ενώ με μικρές συχνότητες η μόλυνση μέσω πολυμετάγγισης παράγωγων του αίματος (1,4%), μετάγγισης αίματος (0,6%) και μέσω κάθετης μετάδοσης (0,4%). Σημαντικό μειονέκτημα του εθνικού συστήματος επιδημιολογικής επιτήρησης αποτελεί ένα σχετικά υψηλό ποσοστό, που αντιστοιχεί σε HIV οροθετικούς για τους οποίους δεν είναι γνωστός ο τρόπος με τον οποίο μολύνθηκαν από τον ιό και έχουν δηλωθεί στο ΚΕ.ΕΛ.Π.ΝΟ. με ακαθόριστη κατηγορία μετάδοσης (16,2%) (Πίνακας 1.8) [27].

Πίνακας 1.8

Σύνολο διαγνώσεων της HIV λοίμωξης στην Ελλάδα από την αρχή της επιδημίας μέχρι και το 2017, κατά κατηγορία μετάδοσης και κατά φύλο, σύμφωνα με στοιχεία του Κέντρου Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων (ΚΕ.ΕΛ.Π.ΝΟ.) [27]

Κατηγορία μετάδοσης	Ανδρες*		Γυναίκες		Σύνολο **		Transmission group
	N	(%)	N	(%)	N	(%)	
Σεξουαλική επαφή μεταξύ ανδρών	8.076	(58,5)	-	-	8.076	(48,4)	Sex between men
Ετεροφυλοφιλική σεξουαλική επαφή	1.666	(12,1)	1.914	(67,9)	3.584	(21,5)	Heterosexual contact
Ενέσιμη χρήση εξαρτησιογόνων ουσιών	1.581	(11,4)	319	(11,3)	1.900	(11,5)	Injecting drug use
Πολυμεταγγιζόμενοι/ες με παράγωγα αίματος	220	(1,6)	16	(0,6)	236	(1,4)	Multitransfusion of blood and blood products
Μετάγγιση	59	(0,4)	43	(1,5)	102	(0,6)	Transfusion
Κάθετη μετάδοση	36	(0,3)	32	(1,1)	69	(0,4)	Mother to child
Ακαθόριστο	2.170	(15,7)	496	(17,6)	2.702	(16,2)	Undetermined
Σύνολο	13.808	100,0	2.820	32,1	16.669	100,0	Total

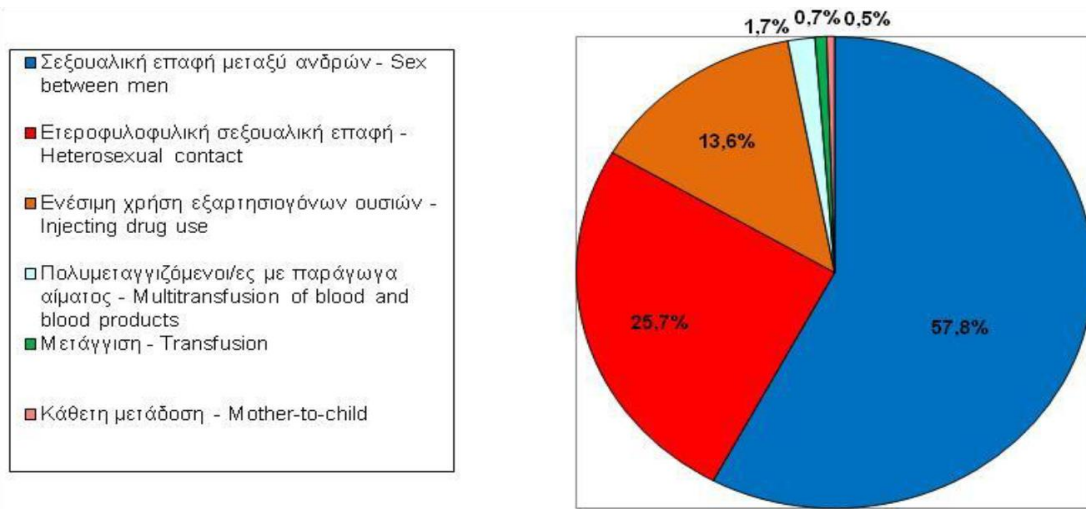
* Περιλαμβάνονται 8 διεμφυλικές γυναίκες (γυναίκες των οποίων το φύλο κατά τη γέννηση ήταν άρρεν)

* Including 8 transgender women (women assigned male at birth)

** Περιλαμβάνονται άτομα ακαθόριστου φύλου

** Including cases of undetermined sex

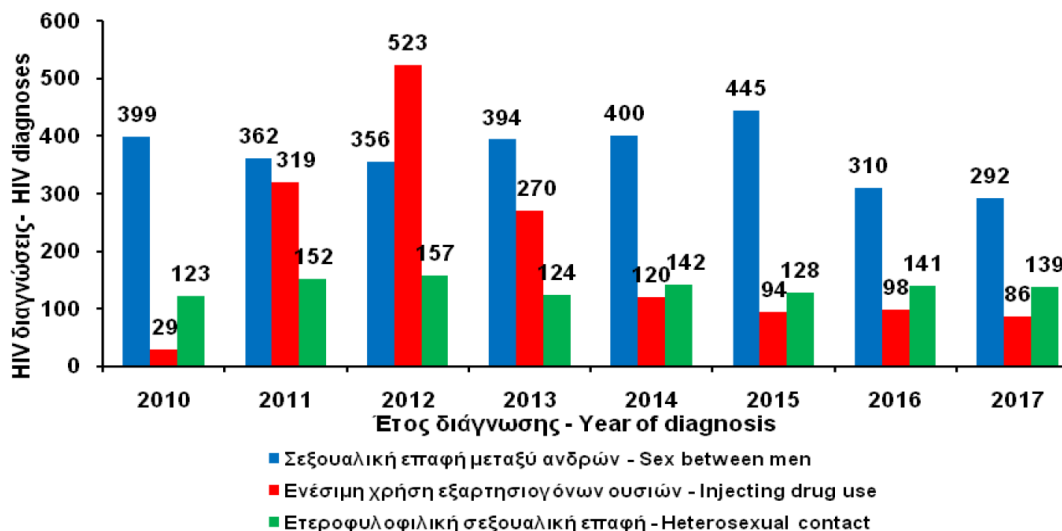
Αν δεν ληφθούν υπόψιν οι οροθετικοί ακαθόριστης κατηγορίας μετάδοσης, το ποσοστά διαμορφώνεται σε 57,8% για τους άντρες με σεξουαλική επαφή με άλλους άντρες, 25,7% για τους ετεροφυλόφιλους και 13,6% για τους χρήστες ενδοφλέβιων ναρκωτικών (Γράφημα 1.4) [27].



Γράφημα 1.4

Σύνολο διαγνώσεων της HIV λοίμωξης στην Ελλάδα από την αρχή της επιδημίας μέχρι και το 2017, κατά κατηγορία μετάδοσης (εξαιρουμένων των οροθετικών με ακαθόριστη κατηγορία μετάδοσης), σύμφωνα με στοιχεία του Κέντρου Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων (ΚΕ.ΕΛ.Π.ΝΟ.) [27]

Τα έτη 2011 και 2012, παρουσιάστηκε μια μεγάλη αύξηση στον αριθμό των νέων λοιμώξεων που αφορούσε κυρίως σε άτομα που έκαναν χρήση ενέσιμων εξαρτησιογόνων ουσιών [30]. Τα τελευταία χρόνια, οι περισσότερες νέες HIV διαγνώσεις ανά χρόνο αφορούσαν κυρίως σε άντρες που είχαν σεξουαλική επαφή με άντρες, με εξαίρεση το 2012 που αφορούσαν σε χρήστες ενδοφλέβιων ναρκωτικών (Γράφημα 1.5) [27].

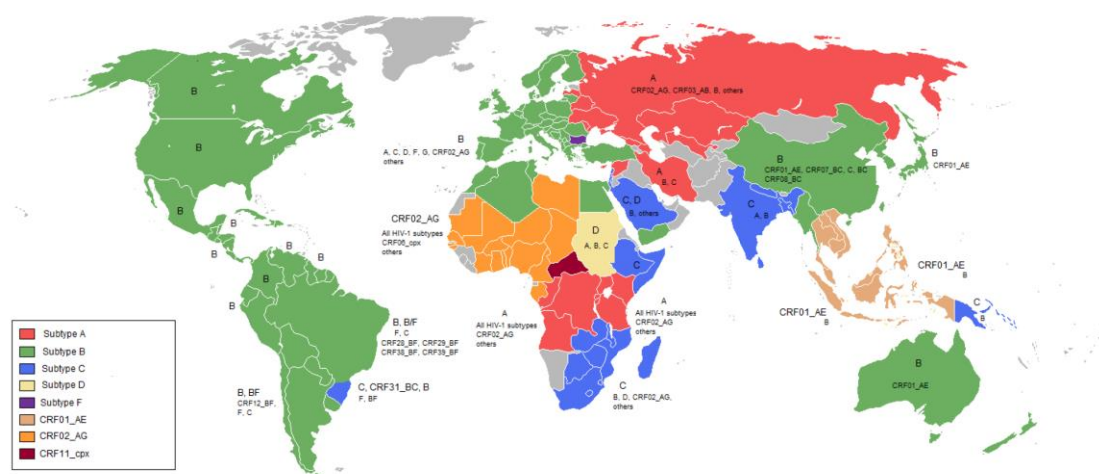


Γράφημα 1.5

Νέες διαγνώσεις της HIV λοίμωξης στην Ελλάδα, για το χρονικό διάστημα 2010-2017, κατά κατηγορία μετάδοσης και κατά έτος διάγνωσης, σύμφωνα με στοιχεία του Κέντρου Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων (ΚΕ.ΕΛ.Π.ΝΟ.) [27]

1.3.5.3. Η ΜΟΡΙΑΚΗ ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ HIV ΚΑΙ Ο ΥΠΟΤΥΠΟΣ A1

Η παγκόσμια επιδημία του HIV οφείλεται κατά κύριο λόγο στον HIV-1 και ιδιαίτερα στην ομάδα M. Οι διάφοροι υπότυποι της ομάδας M εμφανίζουν διαφορετική συχνότητα στις διάφορες γεωγραφικές περιοχές της υφής. Ο υπότυπος A παρουσιάζει το μεγαλύτερο επιπολασμό σε χώρες της Κεντρικής Αφρικής, της Ανατολικής Ευρώπης και της Κεντρικής Ασίας με τον υπο-υπότυπο A1 να είναι ο πιο κοινός. Ο υπότυπος B εμφανίζει τον μεγαλύτερο επιπολασμό στην Αμερική, τη Δυτική Ευρώπη, Ιαπωνία και Αυστραλία, ενώ ο υπότυπος C στην Νότια και Ανατολική Αφρική και την Ινδική χερσόνησο (Εικόνα 1.13) [16].



Εικόνα 1.13

Επιπολασμός υποτύπων και ανασυνδυασμών του HIV-1 ανά την υφήλιο [31]

Ο επιπολασμός και η γεωγραφική κατανομή των διάφορων υποτύπων του HIV-1 στην Ευρώπη εμφανίζει μεγάλη ετερογένεια. Οι περισσότερες χώρες της Δυτικής και Κεντρικής Ευρώπης εμφανίζουν σε μεγαλύτερο ποσοστό τον υπότυπο B, λόγω εισαγωγής από την Αμερικανική ήπειρο [32], ενώ σε σημαντικά ποσοστά συναντώνται και άλλοι υπότυποι, όπως ο C, ο F, και ο G, αλλά και διάφοροι ανασυνδυασμοί. Στις περισσότερες χώρες της Ανατολικής Ευρώπης επικρατεί κυρίως ο υπότυπος A, αλλά στη Ρουμανία επικρατέστερος υπότυπος είναι ο F [24].

Στην Ελλάδα, τον υψηλότερο επιπολασμό εμφανίζει ο υπότυπος B με 35,5% και ακολουθεί ο A με 28,2%, ενώ οι υπόλοιποι έχουν αρκετά μικρότερα ποσοστά. Επίσης, έχουν βρεθεί ορισμένοι ανασυνδυασμένοι τύποι, με συχνότερο τον CRF14_BG, που έχει προκύψει από τους υπότυπους B και G (Πίνακας 1.9) [33]. Η Ελληνική HIV-1 επιδημία εμφανίζει μεγάλη ετερογένεια που οφείλεται, τουλάχιστον κατά ένα μέρος, στη μεγάλη κινητικότητα και μετανάστευση ενός σημαντικού αριθμού του ελληνικού πληθυσμού, αλλά και στη γεωγραφική θέση που καταλαμβάνει η Ελλάδα, καθώς αποτελεί σταυροδρόμι μεταξύ Ευρώπης, Ασίας και Αφρικής [34].

Προηγούμενες φυλογενετικές αναλύσεις (Κεφάλαιο 2.2), έχουν δείξει ότι η ελληνική επιδημία του υποτύπου A έχει ξεκινήσει από μεμονωμένη είσοδο του συγκεκριμένου υποτύπου στη χώρα, πιθανότατα από την Ανατολική Αφρική, που ακολουθήθηκε από τοπι-

κή διασπορά εντός της χώρας, αλλά και σε γειτονικές χώρες, όπως η Αλβανία. Το χρονικό διάστημα 1984-2004, ο επιπολασμός του υπότυπου Α παρουσίασε μια πολύ μεγάλη αύξηση κατά τη δεκαετία 1990-2000, ενώ άρχισε να σταθεροποιείται στα τέλη της δεκαετίας του '90, που οφείλεται, εν μέρει, σε χορήγηση αντιρετροϊκής θεραπείας. Το 2004, ο υπότυπος Α έγινε ο πιο κοινός της Ελλάδας, λόγω της μεγάλης αύξησης που είχε εμφανίσει το προηγούμενο χρονικό διάστημα [35]. Σήμερα, ο υπότυπος Α είναι ο δεύτερος πιο κοινός υπότυπος με ποσοστό 28,2% [33].

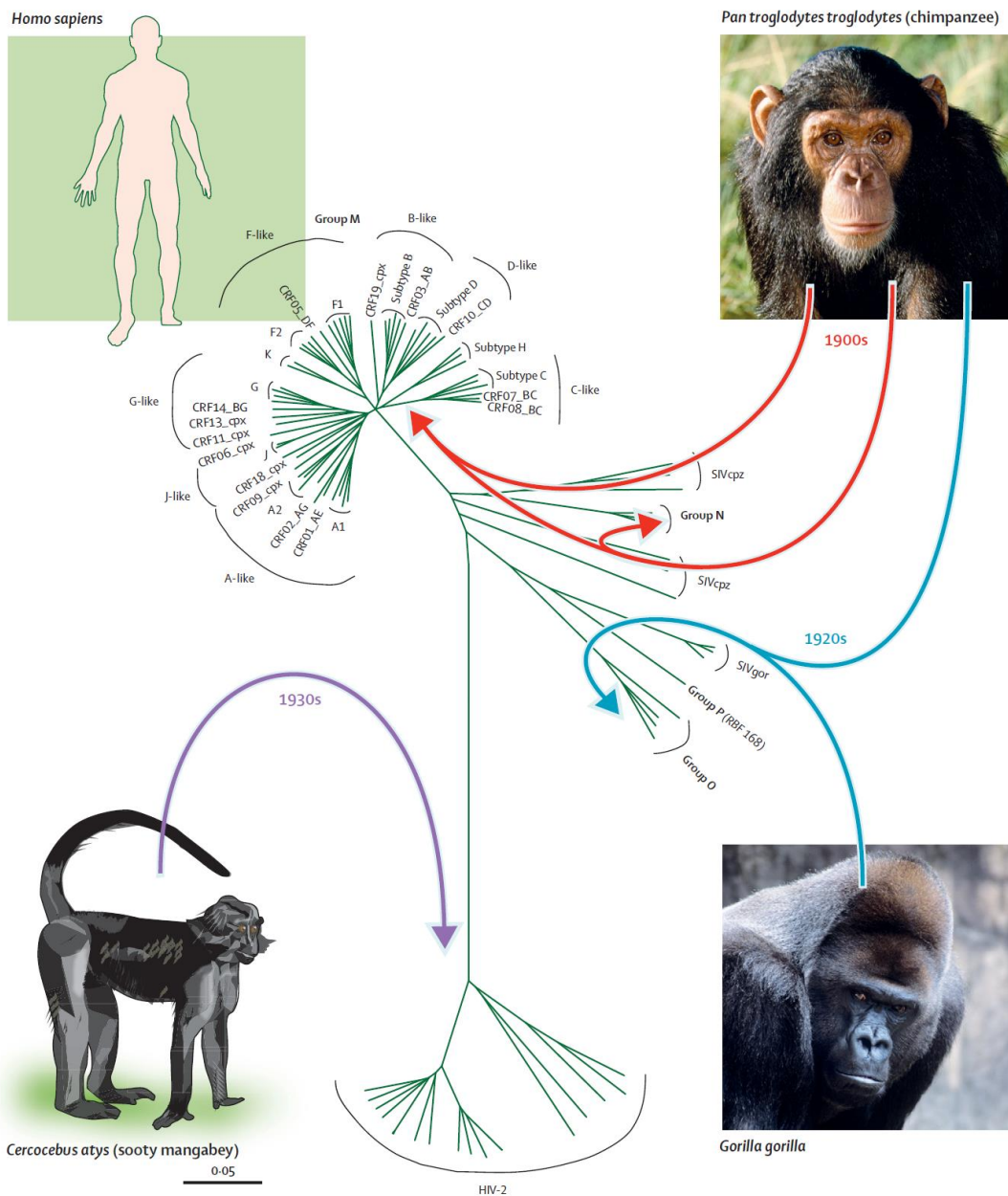
1.3.6. Η ΑΝΑΚΑΛΥΨΗ, Η ΕΞΕΛΙΞΗ ΚΑΙ ΟΙ ΘΕΩΡΙΕΣ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ ΤΟΥ HIV

Τα πρώτα σημάδια της HIV επιδημίας ξεκίνησαν το 1981, όταν στις Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής έγινε επίσημη αναφορά ενός συνόλου νέων ομοφυλόφιλων ανδρών που παρουσίασαν συμπτώματα πνευμονίας από *Pneumocystis carinii* (PCP), που αποτελεί σπάνια και ευκαιριακή λοίμωξη. Σύντομα, εμφανίστηκαν αρκετές νέες περιπτώσεις ανθρώπων που ανέπτυξαν ασθένειες που προκαλούνται από ευκαιριακές λοιμώξεις, οι οποίες ήταν συχνά θανατηφόρες και ο όρος AIDS χρησιμοποιήθηκε για να περιγράψει αυτές τις κλινικές καταστάσεις [2]. Παράλληλα με τους ομοφυλόφιλους, αναφέρθηκαν περιπτώσεις με σύνδρομο AIDS σε χρήστες ενδοφλέβιων ναρκωτικών, αιμορροφιλικούς και χρήστες που είχαν κάνει μετάγγιση αίματος και έτσι, οι ομάδες αυτές, αναγνωρίστηκαν ως υψηλού κινδύνου [7].

Το 1983, δύο ανεξάρτητες ερευνητικές ομάδες, μία στο Παρίσι με επικεφαλής τον Luc Montagnier και μία στο Μέριλαντ των Ηνωμένων Πολιτειών με επικεφαλής τον Robert Gallo, κατάφεραν να απομονώσουν από το αίμα ασθενών ένα ρετροϊό, ο οποίος, στη συνέχεια, ονομάστηκε HIV και αναγνωρίστηκε ως ο αιτιολογικός παράγοντας του AIDS [5].

Σήμερα, έχουν απομονωθεί και αναγνωριστεί πολλά στελέχη του HIV που ανήκουν σε διαφορετικές ομάδες και υπότυπους. Ο HIV, παρόλο που πιθανολογείται ότι είναι σχετικά πρόσφατος ιός, εμφανίζει μεγάλη ετερογένεια, η οποία οφείλεται στον υψηλό εξελικτικό του ρυθμό. Ο τελευταίος είναι αποτέλεσμα ορισμένων χαρακτηριστικών του κύκλου ζωής του και ιδιαίτερα της έλλειψης ενζυμικού επιδιορθωτικού μηχανισμού κατά το στάδιο της αντίστροφης μεταγραφής του γενετικού του υλικού, με αποτέλεσμα να προκύπτουν απόγονοι με συσσωρευμένες μεταλλάξεις στο γενετικό τους υλικό. Ο μεγάλος αριθμός μεταλλάξεων, σε συνδυασμό με τον μεγάλο αριθμό απογόνων που δημιουργούνται και τον μηχανισμό του γενετικού ανασυνδυασμού που λαμβάνει χώρα κατά τον αναπαραγωγικό κύκλο, αυξάνουν πολύ την πιθανότητα να δημιουργηθούν στελέχη με διαφορετικά χαρακτηριστικά από το προγονικό στέλεχος, με αποτέλεσμα ο ιός να εξελίσσεται με πολύ ταχύ ρυθμό [16].

Ο HIV εκτιμάται ότι γεννήθηκε στην Αφρική στις αρχές του 20^{ου} αιώνα και πρόγονος του HIV θεωρείται ο Ιός της Ανοσοανεπάρκειας των Πιθηκοειδών (Simian Immunodeficiency Virus, SIV) που ανήκει στο γένος των Lentiviruses. Πιο συγκεκριμένα, ο HIV-1 προέκυψε από τον SIV(crz) που μολύνει χιμπατζήδες [36], ενώ ο HIV-2 από τον SIV(smm) που μολύνει τον πίθηκο του είδους *Cercopithecus alyd alyd* [37]. Πιθανολογείται ότι ο SIV έχει περάσει από τον πίθηκο στον άνθρωπο σε πολλές διαφορετικές περιπτώσεις και οδήγησε σε πολλά αποκλίνοντα στελέχη (Εικόνα 1.14) [16].



Εικόνα 1.14

Σχηματική απεικόνιση της γενετικής ετερογένειας του HIV και της πολλαπλής μετάδοσης στον άνθρωπο από διαφορετικά είδη πιθήκων [16]

ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΗ ΜΟΡΙΑΚΗ ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ

Η μοριακή επιδημιολογία είναι κλάδος της επιδημιολογίας με κύριο στόχο τη διεξαγωγή επιδημιολογικών συμπερασμάτων ως προς την αιτιολογία, την κατανομή και την πρόληψη νοσημάτων, κάνοντας χρήση ανιχνεύσιμων σε μοριακό επίπεδο δεικτών που αφορούν γενετικούς και περιβαλλοντικούς παράγοντες. Η μοριακή επιδημιολογία ουσιαστικά εφαρμόζει τις τεχνικές μεθόδους της μοριακής βιολογίας με χρήση βιολογικών δεικτών ή μετρήσεων σε επιδημιολογικές μελέτες. Οι μοριακές τεχνικές έχουν συμβάλει σημαντικά στην αύξηση της ακρίβειας των βιολογικών μετρήσεων προσφέροντας μεγαλύτερη ικανότητα να ανιχνεύονται πιθανές συσχετίσεις και συνεπώς καλύτερα και πιο αξιόπιστα στοιχεία για την ανακάλυψη και την κατανόηση της αιτιολογίας μιας νόσου [38].

2.1. ΜΟΡΙΑΚΗ ΕΞΕΛΙΞΗ

Η μοριακή εξέλιξη αποτελεί πεδίο της εξελικτικής βιολογίας, δηλαδή της επιστήμης που μελετά την προέλευση και τη διαδικασία μεταβολής όλων των ζωντανών οργανισμών στο πέρασμα του χρόνου, από την πρωτοεμφάνιση της ζωής έως και σήμερα, αλλά και τους μηχανισμούς που δρουν για να πραγματοποιηθεί αυτή η μεταβολή. Η μοριακή εξέλιξη αξιοποιεί όλη τη διαθέσιμη πληροφορία που βρίσκεται στο γενετικό υλικό των οργανισμών. Αυτή η πληροφορία του γενετικού υλικού έχει την ιδιότητα να αποθηκεύεται με τη μορφή νουκλεοτιδίων (DNA ή RNA για ορισμένους ιούς), να κληρονομείται στους απογόνους και να ελέγχει την ανάπτυξη του αντίστοιχου οργανισμού που τη φέρει. Καθώς αυτή η γενετική πληροφορία κληρονομείται και “περνάει” από γενιά σε γενιά συσσωρεύει έναν αριθμό μεταλλάξεων, ικανών να οδηγήσουν σε μικρότερες ή μεγαλύτερες μεταβολές στη δομή του οργανισμού. Επομένως, οι νέες μεταλλάξεις που τελικά θα κληρονομηθούν από τους απογόνους θα αποτελέσουν την πηγή της γενετικής ποικιλότητας, πάνω στην οποία βασίζεται η μοριακή εξέλιξη. Η μοριακή εξέλιξη περιλαμβάνει δύο βασικά, αλλά αλληλεπικαλυπτόμενα πεδία:

- i. τη μελέτη των μεταλλάξεων που γίνονται στο γενετικό υλικό, του ρυθμού εμφάνισης των μεταλλάξεων και του μοντέλου που ακολουθούν αυτές οι μεταλλάξεις στην πορεία του χρόνου
- ii. της **μοριακής φυλογένειας**, στην οποία χρησιμοποιούνται μοριακά δεδομένα (πχ μόρια DNA) για να κατασκευαστούν φυλογενετικά δέντρα με κύριο στόχο την κατανόηση και αναπαράσταση της εξελικτικής ιστορίας των οργανισμών

Ο ρυθμός εμφάνισης και επικράτησης μεταλλάξεων ποικίλει ανάμεσα στα διάφορα είδη οργανισμών. Ο ιός της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας (HIV) εμφανίζει πολύ υψηλό ρυθμό μεταλλάξεων, έτσι ώστε να συσσωρεύεται, εντός σχετικά μικρού χρονικού διαστή-

ματος, ικανός αριθμός μεταλλάξεων για να μπορεί να τεκμηριωθεί επιδημιολογική σχέση ανάμεσα σε πιθανό δότη και δέκτη.[39]

2.1.1. ΤΟ ΓΕΝΕΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ: Η ΠΗΓΗ ΟΛΗΣ ΤΗΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΑΣ

Το νουκλεϊκό οξύ είναι το βιομόριο που εμπεριέχει το σύνολο της γενετικής πληροφορίας σε όλους τους οργανισμούς και διακρίνεται σε δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ (DNA) και ριβονουκλεϊκό οξύ (RNA). Είναι υπεύθυνο για τη διατήρηση, την αποθήκευση και τη μεταβίβαση της γενετικής πληροφορίας από γενιά σε γενιά. Στη μεγάλη πλειονότητα των οργανισμών, η γενετική πληροφορία οργανώνεται σε μορφή DNA, ενώ εξαίρεση αποτελούν ορισμένοι ιοί, όπως οι ρετροϊοί, στους οποίους η γενετική πληροφορία είναι σε μορφή RNA [40].

2.1.1.1. Η ΔΟΜΗ ΤΟΥ ΓΕΝΕΤΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ

Το νουκλεϊκό οξύ είναι ένα πολυμερές βιομόριο, του οποίου τα μονομερή ονομάζονται νουκλεοτίδια. Κάθε νουκλεοτίδιο αποτελείται από μία πεντόζη ενωμένη με μία αζωτούχο βάση και μία φωσφορική ομάδα. Υπάρχουν δύο κατηγορίες πεντοζών, η δεοξυριβόζη που συναντάται στο DNA και η ριβόζη που βρίσκεται στο RNA. Επίσης, υπάρχουν δύο κατηγορίες αζωτούχων βάσεων, οι πουρίνες και οι πυριμιδίνες. Στις πουρίνες ανήκουν η αδενίνη (A) και η γουανίνη (G), ενώ στις πυριμιδίνες η κυτοσίνη (C), η θυμίνη (T) και η ουρακίλη (U). Κάθε νουκλεοτίδιο του DNA (δεοξυριβονουκλεοτίδιο) αποτελείται από μία δεοξυριβόζη, φωσφορικό οξύ και μία από τις ακόλουθες βάσεις: αδενίνη (A), γουανίνη (G), κυτοσίνη (C) ή θυμίνη (T). Η χημική σύσταση του RNA είναι παρόμοια με αυτή του DNA, αλλά διαφέρουν στα εξής: το RNA αποτελείται από ριβόζη αντί για δεοξυριβόζη και περιέχει ουρακίλη (U) αντί για θυμίνη (T). Τα νουκλεοτίδια ενώνονται με 3'-5' φωσφοδιεστερικό δεσμό σχηματίζοντας μία πολυνουκλεοτιδική αλυσίδα και η αλληλουχία των νουκλεοτιδίων καθορίζει την γενετική πληροφορία που περιέχει το νουκλεϊκό οξύ.

Το DNA κατά κανόνα έχει τη μορφή ενός δίκλωνου μορίου, αποτελούμενο από δύο πολυνουκλεοτιδικές αλυσίδες, οι οποίες ενώνονται μεταξύ τους με δεσμούς υδρογόνου, σχηματίζοντας συνήθως δεξιόστροφη έλικα. Οι δεσμοί υδρογόνου αναπτύσσονται ανάμεσα στις βάσεις της μίας αλυσίδας με αυτές της άλλης και συγκεκριμένα ανάμεσα στις βάσεις A-T και C-G. Έτσι, απέναντι από A συναντάται αποκλειστικά T και το αντίστροφο και απέναντι από C συναντάται αποκλειστικά G και το αντίστροφο. Γι'αυτό το λόγο, οι δύο πολυνουκλεοτιδικές αλυσίδες του DNA καλούνται συμπληρωματικές. Το γενετικό υλικό πολλών οργανισμών αποτελείται από δύο ή πολλαπλά μόρια DNA που καλούνται χρωμοσώματα (πχ. 46 χρωμοσώματα στον άνθρωπο).

Το RNA απαντάται στα κύτταρα κυρίως ως μονόκλωνο. Εξαίρεση αποτελεί το γονιδίωμα ορισμένων ιών, όπου ως γενετικό υλικό μπορεί να έχουν είτε DNA ή RNA, μονόκλωνο ή δίκλωνο (Κεφάλαιο 1.1.1) [41].

2.1.1.2. ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ ΤΟΥ ΓΕΝΕΤΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ

Οποιαδήποτε ποιοτική ή ποσοτική αλλαγή που συμβαίνει στο γενετικό υλικό καλείται μετάλλαξη. Οι μεταλλάξεις είναι τυχαία λάθη που συμβαίνουν στο γενετικό υλικό και μπορεί να οδηγήσουν σε παραγωγή διαφορετικής μορφής πρωτεΐνης. Αν η μετάλλαξη συμβεί σε γεννητικά κύτταρα, που μεταβιβάζουν τη γενετική πληροφορία σε θυγατρικά, τότε ο από-

γονος μπορεί να διαφέρει φαινοτυπικά από τους γονείς, λόγω αυτής της μετάλλαξης. Οι μεταλλάξεις διακρίνονται σε *σημειακές* (point mutations), όταν η αλλαγή αφορά τη νουκλεοτιδική αλληλουχία ή τον αριθμό λίγων νουκλεοτιδίων και σε *χρωμοσωματικές* (chromosomal disorders), όταν επηρεάζουν τη δομή ή τον αριθμό των χρωμοσωμάτων. Οι σημειακές μεταλλάξεις μπορεί να αφορούν την αντικατάσταση, την προσθήκη ή την απαλοιφή ενός νουκλεοτιδίου. Αν η αλλαγή αυτή οδηγεί σε κωδικοποίηση του ίδιου αμινοξέος, τότε η μετάλλαξη καλείται *συνώνυμη* ή *σιωπηλή* (synonymous or silent), ενώ αν οδηγεί σε διαφορετικό αμινοξύ, *μη συνώνυμη* (non-synonymous). Μεταλλάξεις, λόγω προσθήκης ή απαλοιφής νουκλεοτιδίων, που οδηγούν σε αλλαγή της αλληλουχίας όλων των επόμενων αμινοξέων της πεπτιδικής αλυσίδας ονομάζονται *μεταλλάξεις τροποποίησης του αναγνωστικού πλαισίου* (frameshift mutations).

Οι μεταλλάξεις είναι, συνήθως, βλαβερές για τον οργανισμό και μπορεί να οδηγήσουν σε θάνατο. Γι' αυτό όλα τα κύτταρα διαθέτουν *ενζυμικούς επιδιορθωτικούς μηχανισμούς* του γενετικού τους υλικού, οι οποίοι εντοπίζουν και επιδιορθώνουν ορισμένα «λάθη» του γενετικού υλικού. Έτσι, ο αριθμός μεταλλάξεων που θα συμβούν, στην πραγματικότητα, είναι πολύ μεγαλύτερος από αυτό που, εν τέλει, θα επικρατήσουν στο κύτταρο.

Οι μεταλλάξεις αποτελούν την κύρια πηγή της γενετικής ποικιλότητας. Αν μια μετάλλαξη είναι ευνοϊκή για τον οργανισμό και βελτιώνει τις πιθανότητές του να επιβιώσει και να αφήσει απογόνους, τότε η μετάλλαξη αυτή θα επικρατήσει και θα συμβάλει στη βιολογική εξέλιξη του οργανισμού, ειδάλως, θα οδηγήσει σε μικρότερη πιθανότητα επιβίωσης του οργανισμού και των απογόνων του και θα εξαλειφθεί [42].

2.1.2. ΓΕΝΗΤΙΚΗ ΑΠΟΣΤΑΣΗ & ΕΞΕΛΙΚΤΙΚΑ ΜΟΝΤΕΛΑ

2.1.2.1. ΓΕΝΗΤΙΚΗ ΑΠΟΣΤΑΣΗ

Η εξελικτική διαδικασία που αποτυπώνεται στο γενετικό υλικό των οργανισμών έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία οργανισμών με διαφορετικά νουκλεοτίδια για τις ίδιες θέσεις πάνω στο γονίδιωμά τους. Όσο δρα ο χρόνος πάνω στο γενετικό υλικό των οργανισμών μέσω του μηχανισμού των μεταλλάξεων, τόσο τείνει το γενετικό υλικό των οργανισμών αυτών να διαφοροποιείται ως προς την αλληλουχία των νουκλεοτιδίων τους. Αυτή η διαφοροποίηση μπορεί να ποσοτικοποιηθεί μέσω της γενετικής απόστασης, η οποία αποτελεί ένα πολύ βασικό ποσοτικό μέγεθος και χρησιμοποιείται ευρέως στη μοριακή εξέλιξη.

Η γενετική απόσταση προκύπτει με βάση τον αριθμό των θέσεων που είναι διαφορετικές ανάμεσα σε δύο ή περισσότερες αλληλουχίες βιομορίων και προσπαθεί να εκτιμήσει τον πραγματικό αριθμό νουκλεοτιδικών αντικαταστάσεων που έχουν συμβεί μέσα σε ορισμένο χρονικό διάστημα. Ουσιαστικά, ο ποσοτικός αριθμός που υποδηλώνει τη γενετική απόσταση αντανάκλα το βαθμό της εξελικτικής αλλαγής που έχει υποστεί το γενετικό υλικό των υπό μελέτη οργανισμών. Εκτός από το βαθμό διαφοροποίησης ανάμεσα σε δύο ή περισσότερους οργανισμούς, παρέχει επιπλέον πληροφορίες που αφορούν το ρυθμό εξέλιξης των οργανισμών, αλλά και το χρόνο απόκλισης από τον κοινό τους πρόγονο και γι' αυτό αποτελεί βασικό εργαλείο σε μελέτες που αξιοποιούν μεθοδολογία φυλογενετικής συμπερασματολογίας.[39, 43]

2.1.2.2. ΕΞΕΛΙΚΤΙΚΑ ΜΟΝΤΕΛΑ

Η γενετική απόσταση θα ήταν λάθος να υπολογιστεί αποκλειστικά και μόνο από την παρατηρούμενη ετερογένεια που εμφανίζουν οι αλληλουχίες των υπό μελέτη οργανισμών και αυτό γιατί ο παρατηρούμενος αριθμός των διαφορετικών νουκλεοτιδίων που αφορούν την ίδια θέση είναι κατά κανόνα υποεκτιμημένος σε σχέση με τον πραγματικό. Αυτό συμβαίνει διότι είναι πιθανό να συμβούν μεταλλάξεις οι οποίες θα οδηγήσουν σε μείωση της παρατηρούμενης ετερογένειας (σύγκλιση). Γι' αυτό το λόγο προέκυψε η ανάγκη δημιουργίας εξελικτικών μοντέλων νουκλεοτιδικής αντικατάστασης, τα οποία παρέχουν, σε μικρότερο ή μεγαλύτερο βαθμό, τη δυνατότητα καλύτερης εκτίμησης του πραγματικού αριθμού νουκλεοτιδικών αντικαταστάσεων.

Τα εξελικτικά μοντέλα νουκλεοτιδικής αντικατάστασης, που χρησιμοποιούνται για τη διόρθωση της παρατηρούμενης γενετικής απόστασης, είναι γνωστά ως *ομοιογενή και συνεχή στο χρόνο στάσιμα Μαρκοβιανά μοντέλα* (*time-homogeneous time-continuous stationary Markov models*) που προϋποθέτουν τις εξής παραδοχές:

1. Ο ρυθμός νουκλεοτιδικής αντικατάστασης από i σε j , σε κάθε θέση και σε οποιαδήποτε χρονική στιγμή, είναι ανεξάρτητος από το νουκλεοτίδιο που υπήρχε στη συγκεκριμένη θέση πριν το i (ιδιότητα Markov)
2. Οι ρυθμοί νουκλεοτιδικής αντικατάστασης δεν μεταβάλλονται με το χρόνο (ομοιογένεια)
3. Οι σχετικές συχνότητες των νουκλεοτιδίων A,C,G,T είναι σε ισορροπία (στασιμότητα)

Η διαδικασία της νουκλεοτιδικής αντικατάστασης ενός μοντέλου αναστρέψιμου χρόνου (time reversible model) μπορεί να γενικευτεί σε μια Μαρκοβιανή διαδικασία που χρησιμοποιεί έναν πίνακα Q , ο οποίος καθορίζει όλες τις παραμέτρους του εξελικτικού μοντέλου (Εικόνα [44]).

Πίνακας 2.1

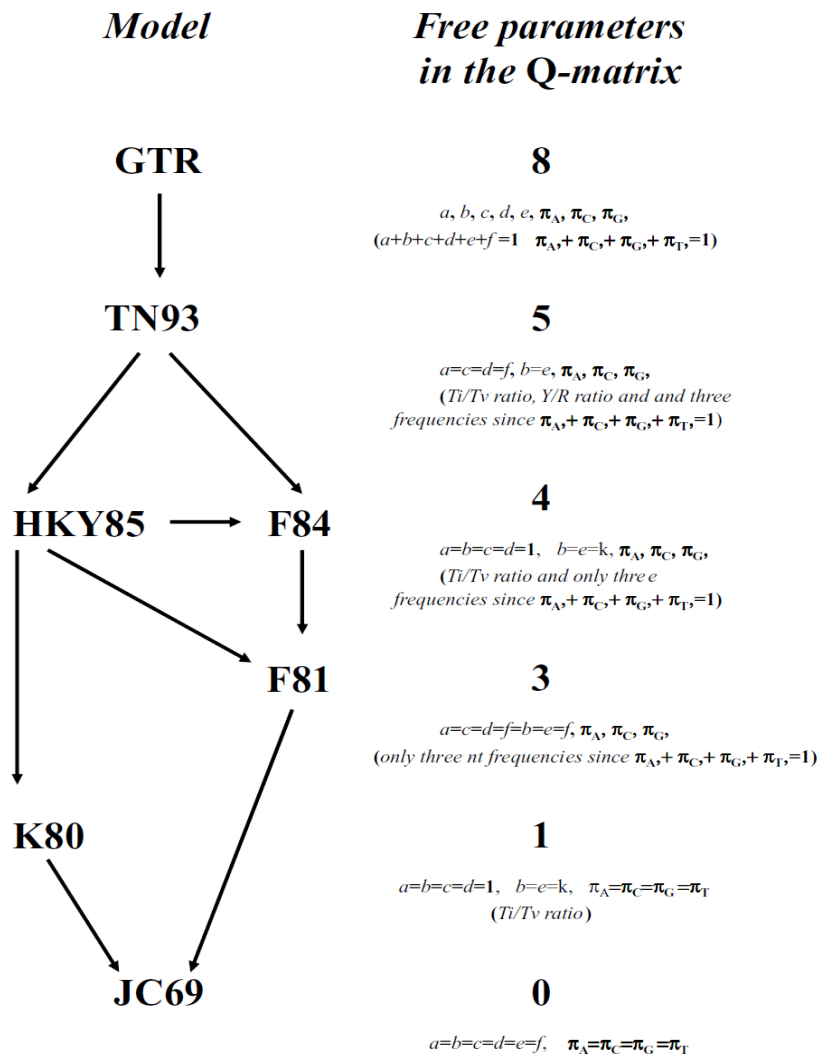
Πίνακας Q που αναπαριστά τον στιγμιαίο ρυθμό νουκλεοτιδικής αντικατάστασης από το νουκλεοτίδιο i στο j σε μοντέλο αναστρέψιμου χρόνου

Τα στοιχεία της διαγώνιου επιλέχθηκαν έτσι ώστε κάθε σειρά του πίνακα να ισούται με μηδέν [44]

Επεξήγηση: A: Αδενίνη, C: Κυτοσίνη, G: Γουανίνη, T: Θυμίνη, μ : μέσος στιγμιαίος ρυθμός αντικατάστασης, a : ρυθμός αντικατάστασης από A σε T και αντίστροφα, b : από A σε G και αντίστροφα, c : από A σε T και αντίστροφα, d : από C σε G και αντίστροφα, e : από C σε T και αντίστροφα, f : από G σε T και αντίστροφα, π_A : συχνότητα A, π_C : συχνότητα C, π_G : συχνότητα G, π_T : συχνότητα T

$$Q = \begin{pmatrix} \text{A} & \text{C} & \text{G} & \text{T} \\ \begin{matrix} -\mu(a\pi_C + b\pi_G + c\pi_T) \\ a\mu\pi_A \\ b\mu\pi_A \\ c\mu\pi_A \end{matrix} & \begin{matrix} a\mu\pi_C \\ -\mu(a\pi_A + d\pi_G + e\pi_T) \\ d\mu\pi_C \\ e\mu\pi_C \end{matrix} & \begin{matrix} b\mu\pi_G \\ d\mu\pi_G \\ -\mu(b\pi_A + d\pi_C + f\pi_T) \\ f\mu\pi_G \end{matrix} & \begin{matrix} c\mu\pi_T \\ e\mu\pi_T \\ f\mu\pi_T \\ -\mu(c\pi_A + e\pi_C + f\pi_G) \end{matrix} \end{pmatrix}$$

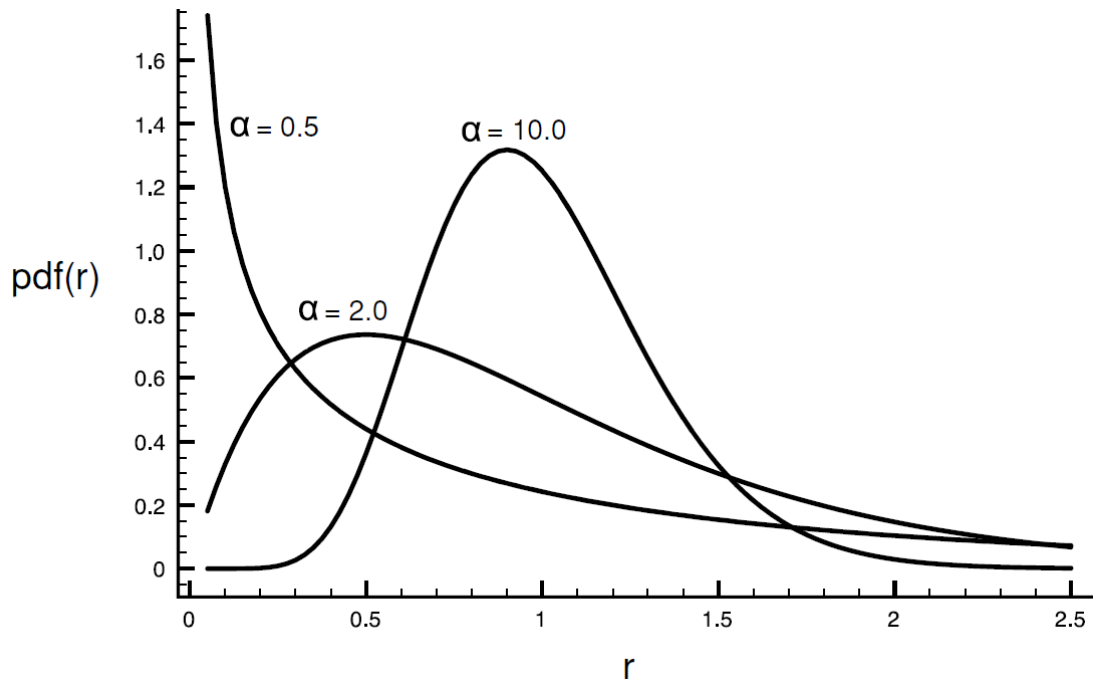
Ο πίνακας Q επιτρέπει ελευθερία οχτώ παραμέτρων και έτσι προκύπτει το γενικό μοντέλο αντιστρέψιμου χρόνου (*General Time Reverse model, GTR*). Οι ελεύθερες παράμετροι μπορούν να μειωθούν και να προκύψουν εναλλακτικά μοντέλα με επιπλέον παραδοχές, όπως, το μοντέλο των Tamura-Nei (TN93) που προϋποθέτει ένα ρυθμό αντικατάστασης για όλες τις μεταβάσεις (transitions, Ts), δηλαδή αντικατάσταση πουρίνης με πουρίνη ή πυριμιδίνης με πυριμιδίνη και ένα για όλες τις μεταπτώσεις (transversion, Tv), δηλαδή από πουρίνη σε πυριμιδίνη και το αντίστροφο [45]. Έτσι, το μοντέλο TN93 προϋποθέτει πέντε παραμέτρους, το λόγο μεταβάσεων προς μεταπτώσεων (Ts/Tv ratio), το λόγο του ρυθμού μετάβασης προς το ρυθμό μετάπτωσης και τις συχνότητες τριών νουκλεοτιδίων. Το πιο απλό μοντέλο είναι αυτό των Jukes and Cantor (JC69), το οποίο θεωρεί πως ο ρυθμός νουκλεοτιδικών αντικαταστάσεων είναι ίδιος προς οποιαδήποτε κατεύθυνση. Άλλα μοντέλα που έχουν προταθεί είναι το μοντέλο Kimura (K80), το Felsenstein (F81) και αυτό των Hasegawa, Kishino και Yano (HKY85) (Εικόνα 2.1) [46].



Εικόνα 2.1

Σχηματική ιεράρχηση των σημαντικότερων μοντέλων νουκλεοτιδικής αντικατάστασης [44]

Ο ρυθμός νουκλεοτιδικής αντικατάστασης μπορεί να διαφέρει ανάλογα με τη θέση που έχει το νουκλεοτίδιο πάνω στην αλληλουχία, λόγω διαφορετικής εξελικτικής πίεσης. Έτσι, αν το νουκλεοτίδιο αντιστοιχεί στο τρίτο νουκλεοτίδιο μιας τριπλέτας νουκλεοτιδίων που μεταφράζεται σε ένα αμινοξύ, τότε ο ρυθμός αντικατάστασης της συγκεκριμένης θέσης μπορεί να είναι μεγαλύτερος από τον αντίστοιχο ενός νουκλεοτιδίου που αντιστοιχεί στο πρώτο νουκλεοτίδιο της τριπλέτας, αφού, βάσει της ιδιότητας του εκφυλισμού του γενετικού κώδικα, η αλλαγή του τρίτου νουκλεοτιδίου οδηγεί, συνήθως, στη μετάφραση του ίδιου αμινοξέος, ενώ η αλλαγή του πρώτου νουκλεοτιδίου, κατά κανόνα, οδηγεί σε μετάφραση διαφορετικού αμινοξέος. Η ετερογένεια στο διαφορετικό ρυθμό νουκλεοτιδικής αντικατάστασης μπορεί να διορθωθεί με μια διακριτή συνάρτηση Γ-κατανομής. Για $\alpha > 1$, η κατανομή παίρνει το σχήμα κωδωνοειδούς μορφής και οι περισσότερες θέσεις παρουσιάζουν παρόμοιους ρυθμούς αντικατάστασης, ενώ για $\alpha < 1$, η κατανομή έχει σχήμα L (Γράφημα 2.1) και ο ρυθμός αντικατάστασης διαφέρει σημαντικά ανάμεσα στις διαφορετικές θέσεις [44].



Γράφημα 2.1

Διάφορες μορφές της Γ-κατανομής

Ανάλογα με την τιμή της παραμέτρου α αλλάζει η μορφή της συνάρτησης. Για $\alpha < 1$, η συνάρτηση παίρνει σχήμα L, ενώ για $\alpha > 1$ παίρνει κωδωνοειδή μορφή [44]

2.2. ΦΥΛΟΓΕΝΕΤΙΚΗ

Η φυλογενετική είναι κλάδος της βιολογίας και συγκεκριμένα της γενετικής που μελετά τις γενετικές σχέσεις μεταξύ των ειδών και την αναπαράσταση της εξελικτικής ιστορίας ενός είδους. Ένα σημαντικό εργαλείο της φυλογενετικής είναι η ταξινόμηση των οργανισμών, δηλαδή η απεικόνισή τους σε εξειδικευμένα διαγράμματα (κλαδογράμματα ή φυλογενετικά δέντρα), έτσι ώστε να γίνονται κατανοητές οι εξελικτικές σχέσεις ανάμεσα στους μελετώμε-

νους οργανισμούς. Η ταξινόμηση των οργανισμών στηρίζεται κατά κύριο λόγο σε τρεις μεγάλες σχολές:

- i. Την φαινετική, με την παραδοχή πως όσο μεγαλύτερος είναι ο βαθμός ομοιότητας ανάμεσα σε δύο οργανισμούς, τόσο κοντινότεροι είναι και εξελικτικά
- ii. Την κλαδιστική ή φυλογενετική, στην οποία η ομαδοποίηση γίνεται με κριτήριο την κοινή καταγωγή από τον πλησιέστερο κοινό πρόγονο
- iii. Την εξελικτική, η οποία αποτελεί ένα συνδυασμό των δύο παραπάνω σχολών

Η κλαδιστική ταξινόμηση θεωρείται η πιο αξιόπιστη μέθοδος από τις τρεις και ιδιαίτερα όταν χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με γενετικά και μοριακά δεδομένα μπορεί να εκτιμήσει αρκετά ρεαλιστικά τις πραγματικές φυλογενετικές σχέσεις των οργανισμών. Βασικό χαρακτηριστικό της φυλογενετικής έρευνας είναι η αξιοποίηση των «ομόλογων» χαρακτηριστικών, δηλαδή των κοινών χαρακτηριστικών που έχουν κληρονομηθεί από κάποιον κοινό πρόγονο τους. Αυτές οι ομολογίες διακρίνονται σε προγονικές, όταν έχουν κληρονομηθεί από κάποιον κοινό πρόγονο χωρίς να έχουν εξελιχθεί και σε παράγωγες, όταν έχουν εξελιχθεί σε σχέση με το αντίστοιχο χαρακτηριστικό του κοινού προγόνου. Στη φυλογενετική είναι πιο πληροφοριακοί οι παράγωγοι χαρακτήρες, αφού εμπεριέχουν επιπλέον και εξελικτική πληροφορία. Η εφαρμογή της φυλογενετικής μεθοδολογίας απαιτεί περίπλοκους αλγόριθμους και ειδικά λογισμικά προγράμματα [42].

2.2.1. ΣΤΟΙΧΙΣΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΩΝ

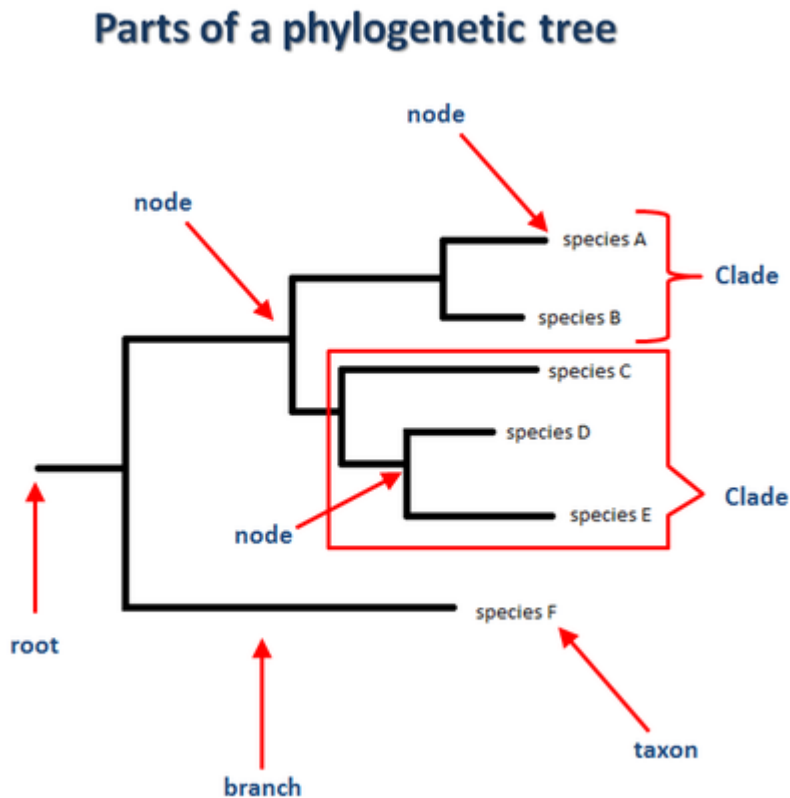
Η στοίχιση αλληλουχιών είναι μία πολύ σημαντική διαδικασία, η οποία είναι απαραίτητη προκειμένου να γίνει σύγκριση αλληλουχιών νουκλεοτιδίων ή αμινοξέων. Στην πραγματικότητα, μέσω αυτής της διαδικασίας επιχειρείται να βρεθούν οι ομόλογες περιοχές των αλληλουχιών, δηλαδή αυτές που έχουν κοινή εξελικτική προέλευση. Για αυτή τη διαδικασία έχουν αναπτυχθεί διάφοροι αλγόριθμοι στοίχισης, οι οποίοι στην πραγματικότητα κάνουν μία υπόθεση για την ομολογία των συγκρινόμενων αλληλουχιών.

Προκειμένου να βρεθεί η καλύτερη δυνατή στοίχιση, υπολογίζεται μία τιμή (ένας βαθμός) που εκτιμάει την ποιότητα της στοίχισης μέσω μίας σχέσης κόστους-κέρδους. Καλύτερη στοίχιση θεωρείται αυτή που μεγιστοποιεί το κέρδος ή ελαχιστοποιεί το κόστος. Στοίχιση μπορεί να γίνει τόσο σε ένα ζεύγος αλληλουχιών, αλλά και σε πολλαπλές αλληλουχίες νουκλεοτιδίων ή αμινοξέων χρησιμοποιώντας κυρίως αλγόριθμους δυναμικού προγραμματισμού (dynamic programming), γενετικών αλγορίθμων (genetic algorithms), κρυμμένων Μαρκοβιανών μοντέλων (Hidden Markov Models) και προοδευτικών αλγορίθμων (progressive algorithms) [39, 47].

2.2.2. ΦΥΛΟΓΕΝΕΤΙΚΑ ΔΕΝΤΡΑ

Τα φυλογενετικά δέντρα αποτελούν γραφικές αναπαραστάσεις της φυλογένειας, δηλαδή των εξελικτικών σχέσεων μιας ομάδας οργανισμών και έχουν τη μορφή δέντρων. Τα φυλογενετικά δέντρα εκτιμώνται βάση αλληλουχιών DNA ή πρωτεϊνών και αντικειμενικός στόχος της κατασκευής τους μπορεί να είναι η αναπαράσταση των πραγματικών γενεαλογικών σχέσεων των οργανισμών ή ακόμη και η χρονολόγηση της διάσπασης των οργανισμών από τον πιο πρόσφατο κοινό τους πρόγονο [42].

Το δέντρο αποτελείται από κλαδιά (*branches*) και κόμβους (*nodes*). Κάθε εξωτερικός κόμβος (*terminal node*) αντιστοιχεί σε μια αλληλουχία των δεδομένων, ενώ οι εσωτερικοί κόμβοι (*internal nodes*) αναπαριστούν τους υποθετικούς προγόνους των αλληλουχιών του δέντρου. Το μήκος των κλαδιών (όταν αυτό εκτιμάται κατά τη φυλογενετική ανάλυση) αναπαριστά τον αριθμό των εξελικτικών αλλαγών που έχουν συμβεί στην αλληλουχία από τη στιγμή που διασπάστηκε από τον υποθετικό πρόγονό της, δηλαδή το βαθμό απόκλισης της αλληλουχίας από τον πρόγονό της. Ένα δέντρο μπορεί να έχει ρίζα (*root*), η οποία αναπαριστά τον κοινό πρόγονο όλων των αλληλουχιών ή να μην έχει (*unrooted*) και επομένως να μην υπάρχει η πληροφορία για τον κοινό πρόγονο όλων των αλληλουχιών. Το πρότυπο κλαδοποίησης του δέντρου, δηλαδή ο τρόπος με τον οποίο οι ταξινομικές μονάδες συνδέονται μεταξύ τους, αποτελεί την *τοπολογία* (*topology*) του δέντρου. Μια ομάδα αλληλουχιών με κοινή εξελικτική ιστορία που περιέχει όλους τους απογόνους ενός κοινού προγόνου χαρακτηρίζεται ως *μονοφυλετική ομάδα* (*monophyletic group* ή *clade*) (Εικόνα 2.2) [39].



Εικόνα 2.2

Αναπαράσταση ενός φυλογενετικού δέντρου και των δομικών στοιχείων του [48]

Η κατασκευή ενός φυλογενετικού δέντρου μπορεί να γίνει χρησιμοποιώντας διάφορες μεθόδους. Όλες, όμως, οι μέθοδοι μπορούν να διακριθούν σε δύο μεγάλες κατηγορίες, την κατηγορία των μεθόδων αποστάσεων, οι οποίες υπολογίζουν την εξελικτική απόσταση βάσει του αριθμού νουκλεοτιδικών ή αμινοξικών αντικαταστάσεων και την κατηγορία των μεθόδων χαρακτήρων, οι οποίες υπολογίζουν την εξελικτική απόσταση κάνοντας

ανάλυση των χαρακτήρων, δηλαδή των νουκλεοτιδίων ή αμινοξέων σε συγκεκριμένες θέσεις της αλληλουχίας.

Οι σημαντικότερες από τις μεθόδους εκτίμησης αποστάσεων είναι η **UPGMA (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic mean)** και η **μέθοδος γειτονικών ζευγαριών (Neighbor-joining)**. Η UPGMA αποτελεί την απλούστερη μέθοδο κατασκευής φυλογενετικού δέντρου και εκτιμάει τις εξελικτικές σχέσεις των ταξινομικών μονάδων βάσει ενός εξελικτικού μοντέλου, προϋποθέτοντας ότι όλες οι ταξινομικές μονάδες εμφανίζουν κοινό και σταθερό ρυθμό εξέλιξης. Η μέθοδος Neighbor-joining βασίζεται, επίσης, σε ένα εξελικτικό μοντέλο, χωρίς, ωστόσο, να κάνει παραδοχή για σταθερό ρυθμό εξέλιξης και γι' αυτό χρησιμοποιείται συχνότερα από την UPGMA.

Από τις μεθόδους χαρακτήρων, ξεχωρίζει η **μέθοδος της μέγιστης φειδωλότητας (maximum parsimony)** και η **μέθοδος της μέγιστης πιθανοφάνειας (maximum likelihood)**. Η μέθοδος της μέγιστης φειδωλότητας δεν βασίζεται σε κάποιο εξελικτικό μοντέλο, αλλά εκτιμάει την τοπολογία του φυλογενετικού δέντρου για την οποία απαιτείται ο μικρότερος δυνατός αριθμός εξελικτικών αντικαταστάσεων και συνεπώς, δεν είναι σε θέση να διορθώσει για πολλαπλές αντικαταστάσεις ή να υπολογίσει το βαθμό των εξελικτικών αποστάσεων (μήκη κλαδιών). Παρόλα αυτά, είναι ικανή να εκτιμήσει μια αρκετά αξιόπιστη τοπολογία.

Η μέθοδος της μέγιστης πιθανοφάνειας υπολογίζει την τοπολογία του δέντρου, το μήκος των κλαδιών και τις παραμέτρους του εξελικτικού μοντέλου που μεγιστοποιούν την πιθανοφάνεια L , δηλαδή την πιθανότητα να παρατηρηθούν τα υπό μελέτη δεδομένα x , κάτω από μία συγκεκριμένη τοπολογία τ και τις παραμέτρους ενός εξελικτικού μοντέλου θ .

$$L(\tau, \theta) = Prob(x|\tau, \theta)$$

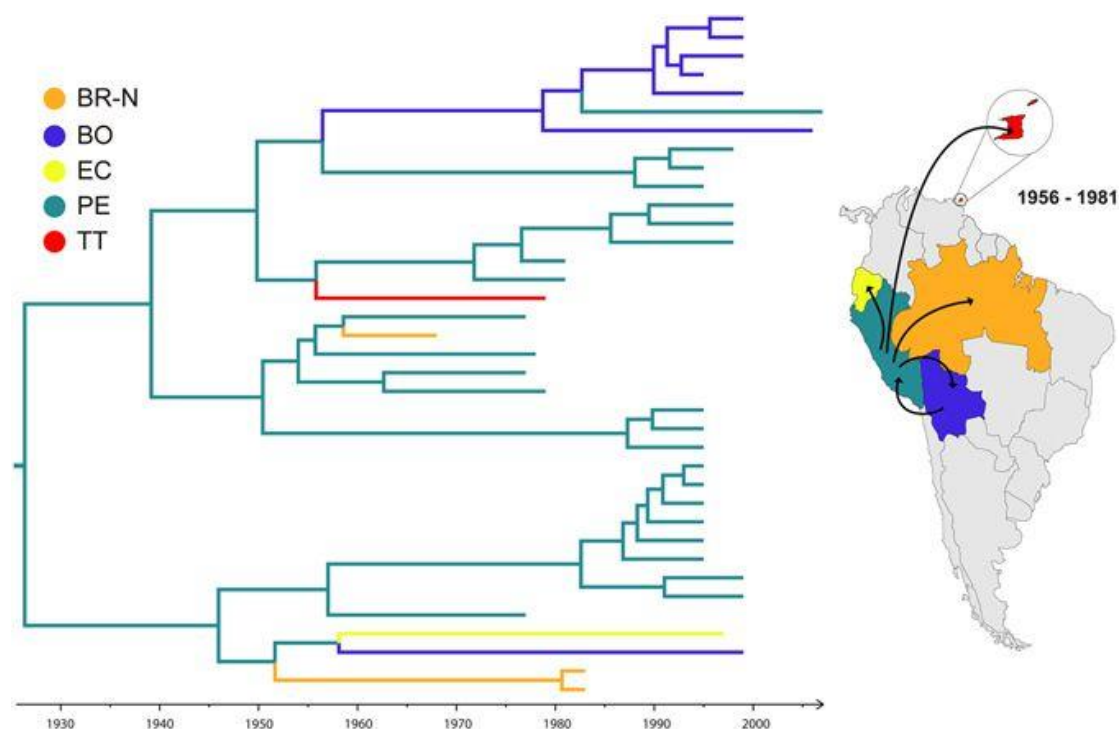
Οι μέθοδοι χαρακτήρων έχουν τη δυνατότητα εκτίμησης όλων των πιθανών τοπολογιών, καταλήγοντας στην τοπολογία που μεγιστοποιεί ένα κριτήριο και γι' αυτό θεωρούνται πιο αξιόπιστες συγκριτικά με τις μεθόδους απόστασης, οι οποίες υπολογίζουν μία και μόνο τοπολογία. Παρόλα αυτά, οι μέθοδοι απόστασης είναι αρκετά πιο γρήγορες και μπορούν να εκτιμήσουν τη φυλογενετική τοπολογία σε σχετικά σύντομο χρονικό διάστημα [39].

2.3. ΦΥΛΟΓΕΩΓΡΑΦΙΑ

Η φυλογεωγραφία είναι το επιστημονικό πεδίο που μελετά τις ιστορικές και εξελικτικές διεργασίες που είναι υπεύθυνες για την παλαιότερη και σύγχρονη γεωγραφική κατανομή των οργανισμών, συνδυάζοντας στοιχεία της γενετικής, της γενετικής πληθυσμών, της εξέλιξης, της φυλογενετικής, της παλαιοντολογίας και της γεωλογίας [49]. Η φυλογεωγραφία είναι ένα χρήσιμο εργαλείο στην προσπάθεια διερεύνησης της καταγωγής και κατανομής των οργανισμών και μπορεί να εφαρμοστεί σε μελέτες μοριακής επιδημιολογίας, παρέχοντας σημαντικές πληροφορίες την πληρέστερη κατανόηση του τρόπου διασποράς και της εξελικτικής ιστορίας ενός παθογόνου μικροοργανισμού [50].

Η μέθοδος της φυλογεωγραφίας μπορεί να συνδυαστεί με τη μέθοδο της φυλογενετικής, ώστε να προκύψει ένα φυλογενετικό δέντρο επεξεργασμένο από τη φυλογεωγραφική ανάλυση, το οποίο παρέχει συνδυαστικές πληροφορίες, τόσο ως προς την τοπολογία

των ταξινομικών μονάδων, όσο και ως προς την γεωγραφική προέλευση των υποθετικών προγόνων που ανακατασκευάστηκαν από τη μέθοδο (Εικόνα 2.3).



Εικόνα 2.3

Φυλογεωγραφική ανάλυση ενός ιού με φυλογενετικό δέντρο χρωματισμένο σύμφωνα με την πιο πιθανή γεωγραφική προέλευση των υποθετικών προγόνων των ταξινομικών μονάδων (αριστερά) και με αναπαράσταση της γεωγραφικής διασποράς του ιού (δεξιά) [51]

Η μέθοδος της φυλογεωγραφίας μπορεί να επεκταθεί και σε άλλους χαρακτήρες, εκτός της γεωγραφικής προέλευσης, όπως για παράδειγμα την κατηγορία μετάδοσης που αποτελεί και στόχο της συγκεκριμένης εργασίας. Σε αυτή την περίπτωση, η μέθοδος αντί να εκτιμάει την πιθανή γεωγραφική προέλευση των ανακατασκευασμένων κοινών προγόνων, εκτιμάει την πιθανή κατηγορία μετάδοσης στην οποία ανήκαν.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΥΛΙΚΟ & ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1. ΕΠΙΛΟΓΗ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ – ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ

Για να πραγματοποιηθεί η παρούσα μελέτη, προηγήθηκε δειγματοληψία γενετικού υλικού που είχε απομονωθεί από HIV-οροθετικά άτομα στα πλαίσια του ελέγχου αντοχής. Το γενετικό υλικό αντιστοιχεί στην περιοχή του γονιδίου *pol* του HIV ιού και συγκεκριμένα στο τμήμα της πρωτεάσης (PR) και της αντίστροφης μεταγραφάσης (RT). Το δείγμα αφορούσε HIV-οροθετικούς υπότυπου A1 με ημερομηνία διάγνωσης το χρονικό διάστημα 1/2003 - 6/2015 για τους οποίους υπήρχε διαθέσιμη η πληροφορία της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας. Δεν υπάρχουν διαθέσιμες νουκλεοτιδικές αλληλουχίες για νεοδιαγνωσθείσες HIV-λοιμώξεις πριν το 2003, γι' αυτό και όλοι οι ασθενείς που διαγνώστηκαν πριν το 2003 αποκλείστηκαν από τη μελέτη. Το τελικό δείγμα ανέρχεται σε 1756 οροθετικά άτομα και αντιστοιχεί περίπου στο 20% του συνόλου των ατόμων με HIV-λοίμωξη που έχουν διαγνωσθεί το αντίστοιχο διάστημα, συμπεριλαμβανομένων όλων των υποτύπων.

Τα δεδομένα του δείγματος που συλλέχθηκαν για τις ανάγκες της παρούσας μελέτης διακρίνονται σε μοριακά (αλληλουχίες γενετικού υλικού) και σε δημογραφικά (φύλο και κατηγορία μετάδοσης). Η κατηγοριοποίηση σχετικά με τον τρόπο μετάδοσης προέκυψε με βάση αυτήν που ακολουθείται από το ΚΕ.ΕΛ.Π.ΝΟ. [15], δηλαδή:

- Άντρες που έχουν σεξουαλική επαφή με άλλους άντρες
- Ετεροφυλόφιλοι/ες
- Χρήστες ενδοφλέβιων ναρκωτικών
- Πολυμεταγγιζόμενοι/ες με παράγωγα αίματος
- Μεταγγισθέντες/είσες
- Κάθετη μετάδοση
- Ακαθόριστοι/ες

Οι κατηγορίες μετάδοσης: πολυμεταγγιζόμενοι/ες με παράγωγα αίματος, μεταγγισθέντες/είσες και κάθετη μετάδοση ενοποιήθηκαν σε μία κατηγορία («Άλλο») λόγω της πολύ μικρής συχνότητας εμφάνισής τους.

Από το τελικό δείγμα, επιλέχθηκαν όλοι οι HIV-οροθετικοί με ακαθόριστη κατηγορία μετάδοσης βάσει του ΚΕ.ΕΛ.Π.ΝΟ, προκειμένου να ερευνηθεί και να εκτιμηθεί η πιθανή κατηγορία μετάδοσης στην οποία ανήκουν. Οι αλληλουχίες για τις οποίες ήταν ελλείπουσα η πληροφορία για την κατηγορία μετάδοσης, συμπεριλήφθηκαν στην φυλογενετική ανάλυση, αλλά δεν έγινε εφαρμογή της μεθόδου για την εκτίμηση της κατηγορίας μετάδοσης.

3.2. ΜΕΘΟΔΟΣ ΦΥΛΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ

Σε πρώτο στάδιο της φυλογενετικής ανάλυσης έγινε στοίχιση των 1756 νουκλεοτιδικών αλληλουχιών του τελικού δείγματος σε συνδυασμό με 1500 αλληλουχίες αναφοράς, παγκόσμιας δειγματοληψίας, χρησιμοποιώντας τον αλγόριθμο MUSCLE [52] και διόρθωση της συστοιχίας με άμεση παρατήρηση με το πρόγραμμα MEGA5 [53]. Η υποτύπηση των αλληλουχιών εκτιμήθηκε με τη μέθοδο COMET [54] και επιβεβαιώθηκε με φυλογενετική ανάλυση. Στη συνέχεια, εκτιμήθηκε η φυλογενετική τοπολογία με μέθοδο μέγιστης πιθανοφάνειας με το πρόγραμμα RAxML-HPC BlackBox [55], προϋποθέτοντας ότι ισχύει το general time-reversible (GTR) μοντέλο νουκλεοτιδικής αντικατάστασης σε συνδυασμό με διακριτή Γ-κατανομή για το ρυθμό ετερογένειας μεταξύ των θέσεων του γενετικού υλικού. Η συγκεκριμένη μέθοδος εκτίμησης φυλογενετικού δέντρου ενδείκνυται για την ανάλυση μεγάλου αριθμού αλληλουχιών [55].

3.3. ΜΕΘΟΔΟΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΦΥΛΟΓΕΩΓΡΑΦΙΑΣ

Η ανάλυση της φυλογεωγραφίας πραγματοποιήθηκε πάνω στα φυλογενετικά δέντρα που προέκυψαν από τη φυλογενετική ανάλυση με το πρόγραμμα Mesquite [56] και είναι μια μέθοδος κατά την οποία εκτιμάται η γεωγραφική προέλευση των μεταδόσεων. Στην προκειμένη περίπτωση αντί της γεωγραφικής περιοχής χρησιμοποιήθηκε η κατηγορία μετάδοσης ως εκτιμώμενη παράμετρος και οι προγονικοί χαρακτήρες των αλληλουχιών ανακατασκευάστηκαν με βάση το κριτήριο της μέγιστης φειδωλότητας [57]. Σε κάθε κατηγορία μετάδοσης αποδόθηκε ένας χρωματικός χαρακτήρας και τα κλαδιά των φυλογενετικών δέντρων χρωματίστηκαν με τέτοιο τρόπο, ώστε να πληροφορούν για την πιθανή κατηγορία μετάδοσης από την οποία προέρχεται η κάθε αλληλουχία.

3.4. ΜΕΘΟΔΟΣ ΕΚΤΙΜΗΣΗΣ ΚΑΤΗΓΟΡΙΑΣ ΜΕΤΑΔΟΣΗΣ

Κατασκευάστηκαν 3 φυλογενετικά δέντρα, κάθε ένα από τα οποία περιείχε τις 1756 αλληλουχίες του τελικού δείγματος και 1500, διαφορετικές για κάθε δέντρο, αλληλουχίες αναφοράς που έχουν συλλεγεί από διάφορες περιοχές της υφελίου, ώστε να περιοριστεί η πιθανότητα τυχαίου σφάλματος στην τοπολογία. Για να εκτιμηθεί η κατηγορία μετάδοσης στους HIV-οροθετικούς με ακαθόριστη κατηγορία μετάδοσης, εφαρμόστηκαν τα παρακάτω τρία κριτήρια σε κάθε έναν από αυτούς με την εξής σειρά:

1. **Η γενετική απόσταση από την πλησιέστερη αλληλουχία στο φυλογενετικό δέντρο και συμφωνία της τοπολογίας ανάμεσα στα τρία δέντρα.** Για κάθε ασθενή ακαθόριστης κατηγορίας μετάδοσης εντοπίστηκε ο πλησιέστερος ασθενής που ομαδοποιήθηκε μαζί του σε κάθε ένα από τα τρία φυλογενετικά δέντρα, όπως προέκυψε από την εκτίμηση της φυλογενετικής ανάλυσης. Στη συνέχεια, αν υπήρχε συμφωνία και στα τρία φυλογενετικά δέντρα ως προς την τοπολογία, υπολογιζόταν η γενετική τους απόσταση με τις παραμέτρους του TN93 μοντέλου των Tamura-Nei [45], μέσω του προγράμματος MEGA7 [58]. Αν η γενετική απόσταση ήταν μικρότερη των 0,015 νουκλεοτιδικών αντικαταστάσεων/θέση, τότε η κατηγορία μετάδοσης του ασθενή ακαθόριστης κατηγορίας μετάδοσης θεωρούνταν ότι ήταν η ίδια με αυτήν του ασθενή που ομαδοποιήθηκε στο φυλογενετικό δέντρο. Αν, όμως, η γενετική απόσταση ήταν μεγαλύτερη των 0,015 νου-

κλεοτιδικών αντικαταστάσεων/θέση, τότε γινόταν χρήση του δεύτερου κριτηρίου. Το όριο των 0,015 νουκλεοτιδικών αντικαταστάσεων/θέση ορίστηκε βάσει πρότασης άλλης μελέτης [59].

2. **Το αποτέλεσμα της εκτίμησης της ανάλυσης της φυλογεωγραφίας.** Αν υπήρχε συμφωνία και στα τρία δέντρα ως προς την εκτίμηση της κατηγορίας μετάδοσης από την οποία προήλθε ο διερευνώμενος ασθενής ακαθόριστης κατηγορίας, τότε ως κατηγορία μετάδοσής του θεωρούνταν αυτή που εκτιμούσε η ανάλυση φυλογεωγραφίας. Σε περίπτωση διαφωνίας ανάμεσα στα τρία δέντρα, γινόταν χρήση του τρίτου κριτηρίου.
3. **Ανακατασκευή φυλογενετικού δέντρου περιλαμβάνοντας μόνο τις μικρότερης γενετικά απόστασης αλληλουχίες.** Σε περίπτωση που δεν προέκυπτε κάποια απόφαση για κάποιον ασθενή ακαθόριστης κατηγορίας μετάδοσης από τα δύο παραπάνω κριτήρια, πραγματοποιούνταν αναζήτηση μέσω της εφαρμογής του HIV-BLAST [60] των 10 και 25 πιο «συγγενικών» αλληλουχιών βάσει της γενετικής απόστασης και πραγματοποιούνταν εκ νέου φυλογενετική και φυλογεωγραφική ανάλυση με τις ίδιες παραμέτρους που αναφέρονται παραπάνω. Τέλος, σε κάθε ένα από τα δύο νέα φυλογενετικά δέντρα που προέκυπταν, γινόταν εφαρμογή των δύο πρώτων κριτηρίων.

Στα παραπάνω κριτήρια, συνυπολογιζόταν και η παράμετρος του φύλου του ασθενή. Οι γυναίκες ασθενείς που βάση των παραπάνω κριτηρίων κατέληγαν στην ομάδα των αντρών που είχαν σεξουαλική επαφή με άλλους άντρες, θεωρούνταν ότι ανήκουν στην κατηγορία των ετεροφυλόφιλων.

3.5. ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΑΞΙΟΠΙΣΤΙΑΣ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Η αξιοπιστία της μεθόδου εκτιμήθηκε, με εφαρμογή της παραπάνω μεθόδου, σε δείγμα 100 ασθενών γνωστής κατηγορίας μετάδοσης με τυφλή ανάλυση. Πραγματοποιήθηκε φυλογενετική και φυλογεωγραφική ανάλυση, κατασκευάζοντας τρία φυλογενετικά δέντρα, χρησιμοποιώντας αλληλουχίες της ελληνικής επιδημίας και τις ίδιες αλληλουχίες αναφοράς με την κύρια ανάλυση. Στη συνέχεια, επιλέχθηκαν 100 τυχαίοι ασθενείς γνωστής κατηγορίας μετάδοσης, για τους οποίους εφαρμόστηκε τυφλότητα ως προς τον ερευνητή κατά την διαδικασία της εκτίμησης της αξιοπιστίας και εκτιμήθηκε η κατηγορία μετάδοσης των 100 αυτών ασθενών εφαρμόζοντας τα τρία κριτήρια, όπως αναφέρονται παραπάνω. Τέλος, υπολογίστηκε το ποσοστό των ασθενών που η μέθοδος κατέληξε στην ίδια κατηγορία μετάδοσης με αυτή που έχει δηλωθεί στο ΚΕ.ΕΛ.Π.ΝΟ.

3.6. ΔΕΥΤΕΡΕΥΟΥΣΕΣ ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ

Πραγματοποιήθηκε έλεγχος χ^2 καλής προσαρμογής (goodness of fit) σε επίπεδο σημαντικότητας $\alpha=0,05$, ώστε να διαπιστωθεί αν η κατανομή των κατηγοριών μετάδοσης διέφερε ανάμεσα σε αλληλουχίες γνωστής και ακαθόριστης κατηγορίας μετάδοσης. Συνεπώς, διερευνήθηκε αν η μη δήλωση της κατηγορίας μετάδοσης ενός ασθενή επηρεάζεται από την κατηγορία μετάδοσης στην οποία ανήκει. Οι υποθέσεις που ελέγχθηκαν είναι:

H_0 : Οι δύο πληθυσμοί προήλθαν από την ίδια κατανομή

H_1 : Οι δύο πληθυσμοί προήλθαν από διαφορετικές κατανομές

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1. ΠΕΡΙΓΡΑΦΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΤΩΝ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ

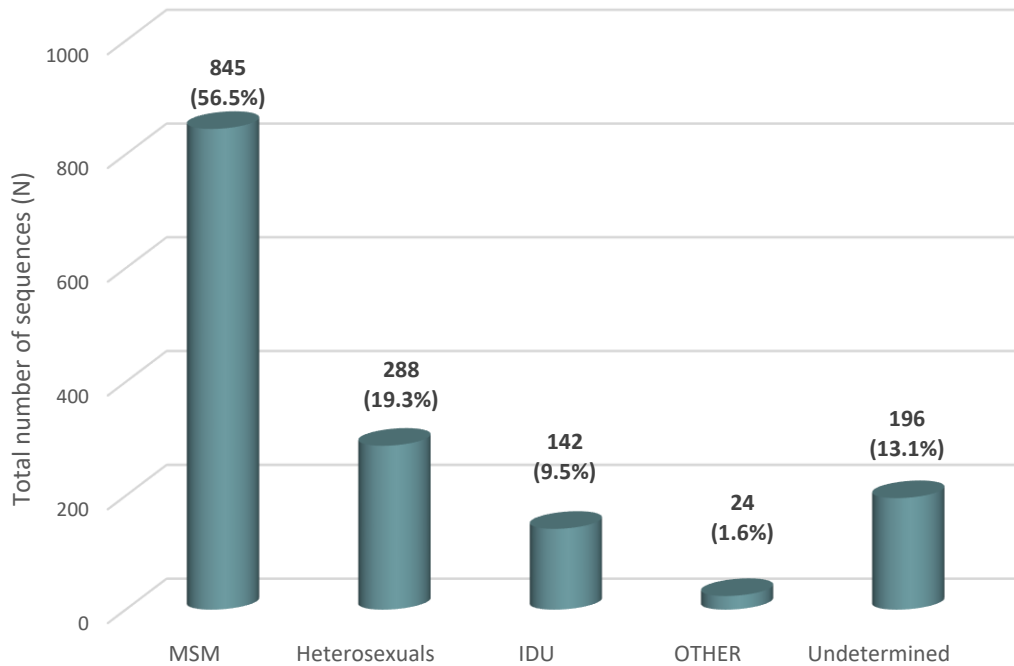
Ο αριθμός του δείγματος που αντιστοιχεί σε HIV-οροθετικούς υπότυπου A1 της ελληνικής επιδημίας που χρησιμοποιήθηκαν στη φυλογενετική ανάλυση είναι 1756 άτομα, από τα οποία υπήρχε διαθέσιμη πληροφορία για το φύλο για τους 1227 ασθενείς. Από αυτούς, οι 1041 (84,8%) ήταν άντρες και οι 186 (15,2%) γυναίκες.

Όσον αφορά την κατηγορία μετάδοσης, από τους 1756 ασθενείς, υπήρχε διαθέσιμη πληροφορία για τους 1495 ασθενείς, βάσει της κατηγοριοποίησης που χρησιμοποιεί το ΚΕ.ΕΛ.Π.ΝΟ., ενώ για τους υπόλοιπους 261 δεν υπήρχε η πληροφορία. Το μεγαλύτερο μέρος του δείγματος αφορούσε άντρες που είχαν σεξουαλική επαφή με άλλους άντρες (MSM) σε ποσοστό 56,5%, ενώ ακολουθούσαν οι ετεροφυλόφιλοι/ες (19,3%), οι χρήστες ενδοφλέβιων ναρκωτικών (9,5%) και τέλος όσοι μολύνθηκαν με κάποιο διαφορετικό τρόπο από τους παραπάνω (1,6%). Τέλος, οι ασθενείς ακαθόριστης κατηγορίας μετάδοσης ήταν 196 (13,1%) (Πίνακας 4.1 & Γράφημα 4.1). Από τους 1495 ασθενείς, πραγματοποιήθηκε εφαρμογή της μεθόδου για την εκτίμηση της κατηγορίας μετάδοσης στους 196 που είχαν δηλωθεί ως ασθενείς ακαθόριστης κατηγορίας μετάδοσης.

Πίνακας 4.1

Συχνότητες ανά φύλο και ανά κατηγορία μετάδοσης για τους 1495 HIV-οροθετικούς υπότυπου A1

Κατηγορία Μετάδοσης	Άντρες	Γυναίκες	Άγνωστο	Σύνολο
	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)
Ετεροφυλόφιλοι/ες	126 (10.7%)	136 (73.1%)	26 (20.5%)	288 (19.3%)
Χρήστες Ενδοφλέβιων Ναρκωτικών	108 (9.1%)	15 (8.1%)	19 (15%)	142 (9.5%)
Άντρες που κάνουν σεξ με άντρες	845 (71.5%)	0 (0%)	0 (0%)	845 (56.5%)
Άλλο	6 (0.5%)	9 (4.8%)	9 (7.1%)	24 (1.6%)
Ακαθόριστοι/ες	97 (8.2%)	26 (14%)	73 (57.5%)	196 (13.1%)
Σύνολο	1182 (100%)	186 (100%)	127 (100%)	1495 (100%)



Γράφημα 4.1

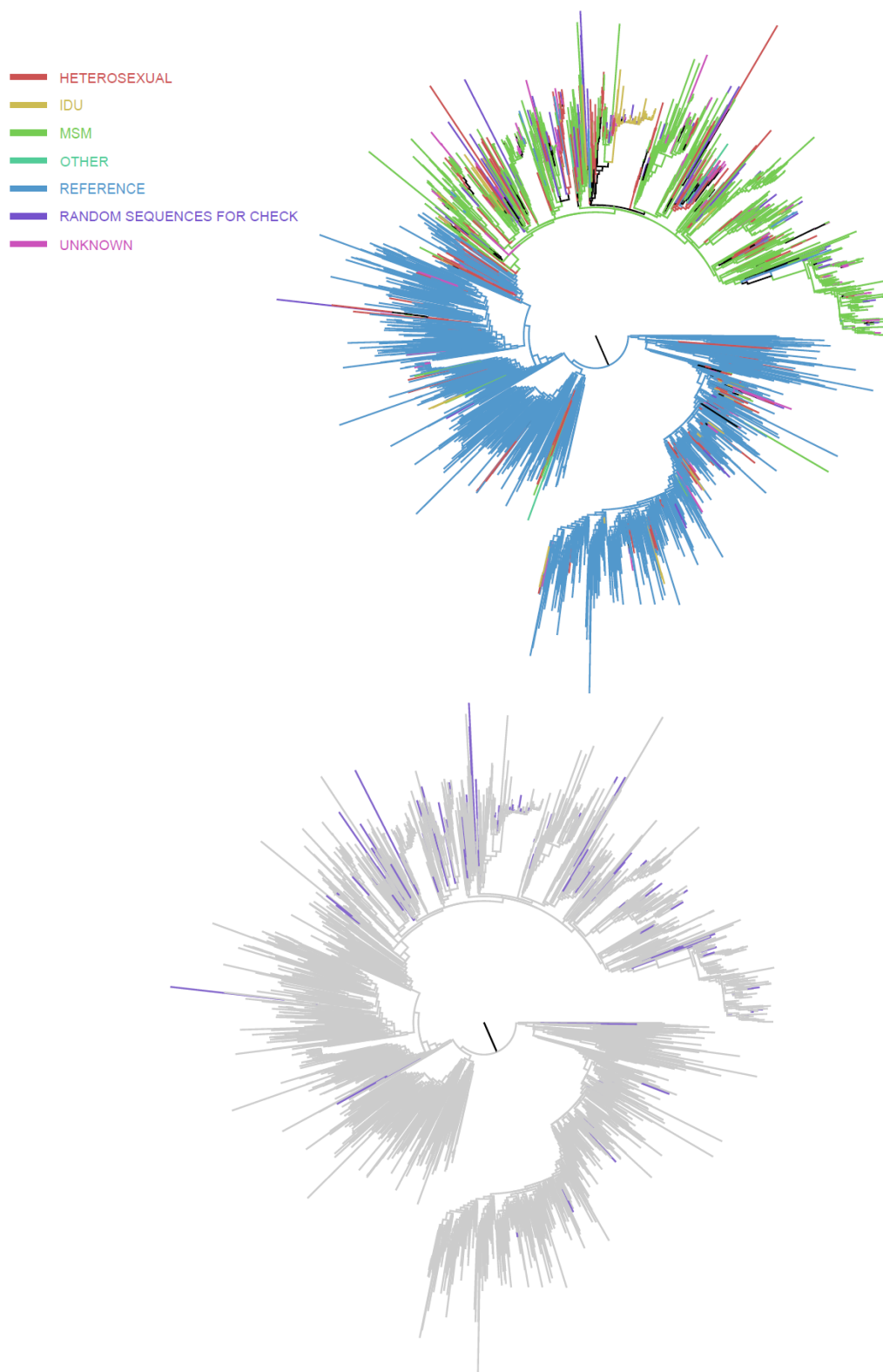
Κατανομή κατηγορίας μετάδοσης του δείγματος σε 1495 ασθενείς

Επεξήγηση: Heterosexuals: Ετεροφυλόφιλοι/ες, IDU: Χρήστες ενδοφλέβιων ναρκωτικών, MSM: Άντρες που κάνουν σεξ με άλλους άντρες, Other: Άλλο, Undetermined: Ακαθόριστοι/ες

4.2. ΑΞΙΟΠΙΣΤΙΑ ΜΕΘΟΔΟΥ

Η αξιοπιστία της μεθόδου βασίστηκε στην κατασκευή τριών φυλογενετικών δέντρων, τα οποία περιείχαν 1230 αλληλουχίες από HIV-οροθετικά άτομα εντός Ελλάδας και 1500 αλληλουχίες αναφοράς, διαφορετικές για κάθε δέντρο, που έχουν συλλεγεί από διάφορες περιοχές του κόσμου. Και στα τρία δέντρα παρατηρήθηκε ομαδοποίηση του μεγαλύτερου μέρους των ελληνικών αλληλουχιών σε ένα μεγάλο μονοφυλετικό κλαδί. Εντός αυτού του κλαδιού, παρατηρήθηκαν επί μέρους αρκετές μονοφυλετικές ομάδες αντρών που είχαν σεξουαλική επαφή με άλλους άντρες και μία ξεχωριστή και διακριτή μονοφυλετική ομάδα με το μεγαλύτερο μέρος των χρηστών ενδοφλέβιων ναρκωτικών. (Γραφήματα 4.2-4.4).

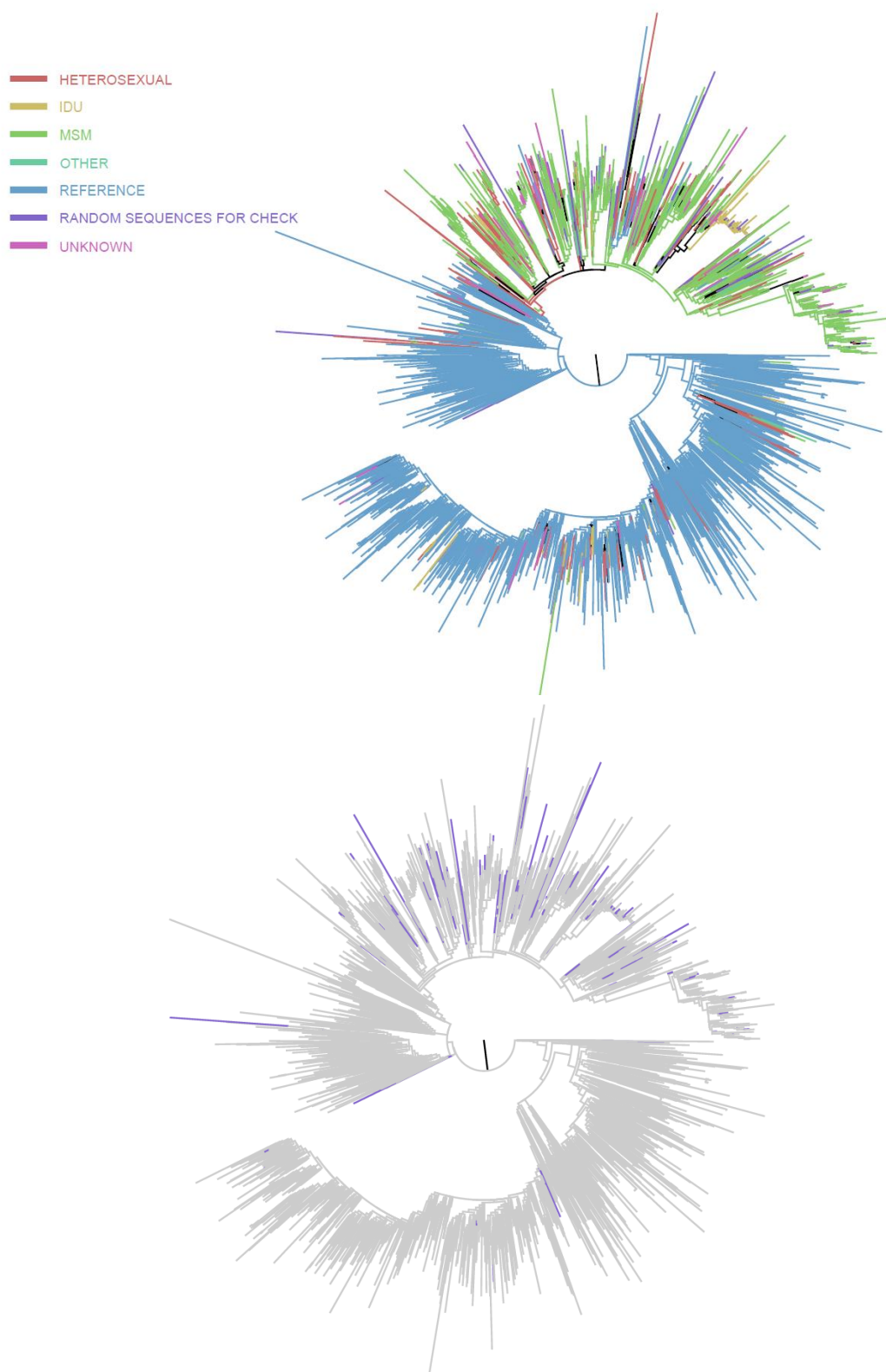
Επιλέχθηκαν τυχαία 100 αλληλουχίες γνωστής κατηγορίας μετάδοσης για να υπολογιστεί η αξιοπιστία της μεθόδου, εφαρμόζοντας τυφλότητα για τον ερευνητή. Από τους 100 τυχαία επιλεγμένους HIV-οροθετικούς, οι 19 ήταν γυναίκες και οι 81 άντρες. Για κάθε έναν από αυτούς έγινε εκτίμηση της κατηγορίας μετάδοσης και στα τρία φυλογενετικά δέντρα. Στα άνω δέντρα των γραφημάτων 4.2-4.4, διακρίνονται τα αποτελέσματα της φυλογενετικής και φυλογεωγραφικής ανάλυσης, όπου παρατηρείται ότι η συντριπτική πλειοψηφία των αλληλουχιών από την ελληνική επιδημία (όλα εκτός του κυανού χρώματος) ομαδοποιήθηκαν μαζί, δείχνοντας πως πρόκειται κυρίως για επιδημία με τοπική διασπορά και ιδιαίτερα σε άντρες που είχαν σεξουαλική επαφή με άλλους άντρες (πράσινο χρώμα). Στα κάτω δέντρα των ίδιων γραφημάτων, διακρίνεται με μωβ χρώμα η κατανομή των 100 τυχαία επιλεγμένων αλληλουχιών με το μεγαλύτερο ποσοστό αυτών (88%) να ομαδοποιείται εντός της ελληνικής επιδημίας.



Γράφημα 4.2

Πρώτο φυλογενετικό δέντρο χρωματισμένο σύμφωνα με την εκτίμηση της φυλογεωγραφικής ανάλυσης (πάνω) και χρωματισμένο μόνο για τις 100 τυχαίες αλληλουχίες που επιλέχθηκαν για τον έλεγχο της αξιοπιστίας της μεθόδου (κάτω)

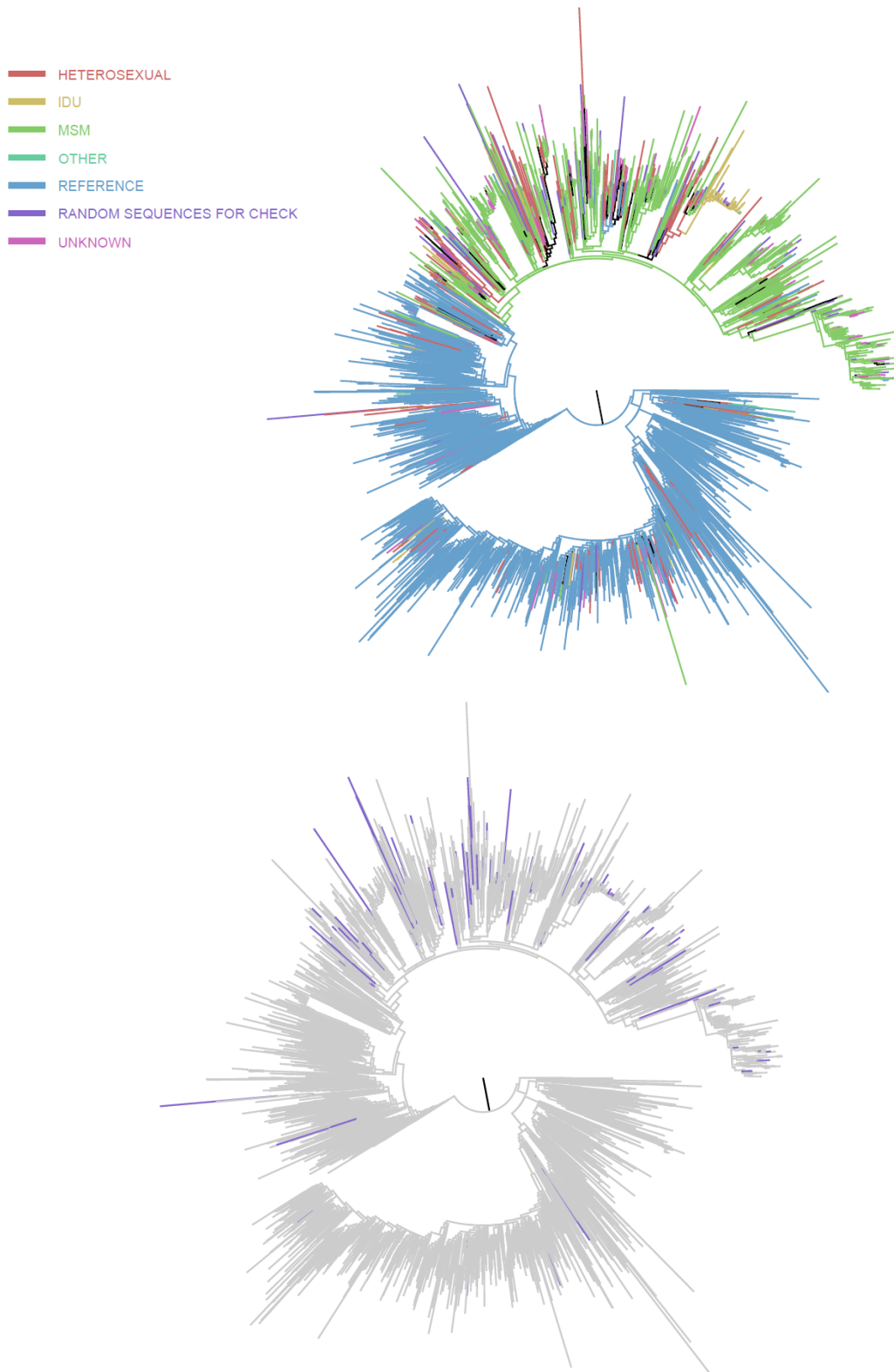
Επεξήγηση: Heterosexuals: Ετεροφυλόφιλοι/ες, IDU: Χρήστες ενδοφλέβιων ναρκωτικών, MSM: Άντρες που κάνουν σεξ με άλλους άντρες, Other: Άλλο, Random Sequences for Check: Τυχαία επιλεγμένες αλληλουχίες γνωστής κατηγορίας μετάδοσης, Reference: Αλληλουχίες αναφοράς από διάφορες περιοχές ανά την υφήλιο, Undetermined: Ακαθόριστοι/ες



Γράφημα 4.3

Δεύτερο φυλογενετικό δέντρο χρωματισμένο σύμφωνα με την εκτίμηση της φυλογεωγραφικής ανάλυσης (πάνω) και χρωματισμένο μόνο για τις 100 τυχαίες αλληλουχίες που επιλέχθηκαν για τον έλεγχο της αξιοπιστίας της μεθόδου (κάτω)

Επεξήγηση: Heterosexuals: Ετεροφυλόφιλοι/ες, IDU: Χρήστες ενδοφλέβιων ναρκωτικών, MSM: Άντρες που κάνουν σεξ με άλλους άντρες, Other: Άλλο, Random Sequences for Check: Τυχαία επιλεγμένες αλληλουχίες γνωστής κατηγορίας μετάδοσης, Reference: Αλληλουχίες αναφοράς από διάφορες περιοχές ανά την υφήλιο, Undetermined: Ακαθόριστοι/ες



Γράφημα 4.4

Τρίτο φυλογενετικό δέντρο χρωματισμένο σύμφωνα με την εκτίμηση της φυλογεωγραφικής ανάλυσης (πάνω) και χρωματισμένο μόνο για τις 100 τυχαίες αλληλουχίες που επιλέχθηκαν για τον έλεγχο της αξιοπιστίας της μεθόδου (κάτω)

Επεξήγηση: Heterosexuals: Ετεροφυλόφιλοι/ες, IDU: Χρήστες ενδοφλέβιων ναρκωτικών, MSM: Άντρες που κάνουν σεξ με άλλους άντρες, Other: Άλλο, Random Sequences for Check: Τυχαία επιλεγμένες αλληλουχίες γνωστής κατηγορίας μετάδοσης, Reference: Αλληλουχίες αναφοράς από διάφορες περιοχές ανά την υφήλιο, Undetermined: Ακαθόριστοι/ες

Τα αποτελέσματα της ανάλυσης ευαισθησίας της μεθόδου έδειξαν ότι η κατηγορία μετάδοσης εκτιμήθηκε στο 86% των περιπτώσεων, ενώ για 14 αλληλουχίες δεν προέκυψε κάποια απόφαση. Η ευαισθησία της μεθόδου ήταν 88,4%, αφού από τις 86 αλληλουχίες, οι 76 εκτιμήθηκαν ότι ανήκαν στην ίδια κατηγορία μετάδοσης με αυτή που έχει δηλωθεί στο ΚΕ.ΕΛ.Π.ΝΟ. Από τις 86 αλληλουχίες που προέκυψε κάποια απόφαση εφαρμόζοντας τη μέθοδο, οι 40 εκτιμήθηκαν με βάση το κριτήριο της γενετικής απόστασης (πρώτο κριτήριο της μεθόδου), οι 29 με βάση το κριτήριο της φυλογεωγραφικής ανάλυσης (δεύτερο κριτήριο) και οι υπόλοιπες 17 εφαρμόζοντας το κριτήριο της αναζήτησης μέσω του HIV-BLAST (τρίτο κριτήριο). Συνολικά από τα 86 άτομα, βρέθηκε ότι τα 17 (19,8%) ήταν ετεροφυλόφιλοι, τα 12 (14%) χρήστες ενδοφλέβιων ναρκωτικών, τα 56 (65%) άντρες που είχαν σεξουαλική επαφή με άλλους άντρες και 1 (1,2%) μολύνθηκε με άλλο τρόπο (Πίνακας 4.2).

Πίνακας 4.2

Αποτελέσματα των 86, από τις 100 τυχαία επιλεγμένες αλληλουχίες, για τις οποίες προέκυψε απόφαση κατηγορίας μετάδοσης κάνοντας εφαρμογή της μεθόδου, ανά εκτιμημένη κατηγορία μετάδοσης και ανά κριτήριο μεθόδου με βάση το οποίο έγινε η εκτίμηση

Κριτήρια μεθόδου	Γενετική απόσταση	Φυλογεωγραφία	HIV-BLAST	Σύνολο
Ετεροφυλόφιλοι/ες	6	6	5	17
Χρήστες Ενδοφλέβιων Ναρκωτικών	8	4	0	12
Άντρες που κάνουν σεξ με άντρες	25	19	12	56
Άλλο	1	0	0	1
Σύνολο	40	29	17	86

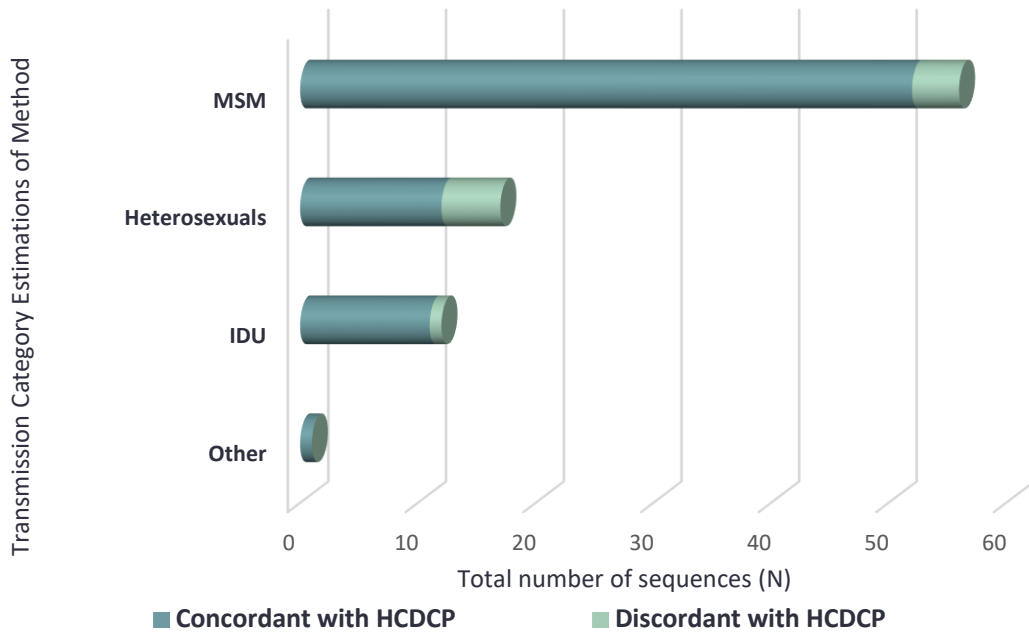
Από τους 76 HIV-οροθετικούς που εκτιμήθηκαν από τη μέθοδο ότι ανήκαν στην ίδια κατηγορία μετάδοσης με αυτή που δηλώθηκε στο ΚΕ.ΕΛ.Π.ΝΟ., οι 12 ήταν ετεροφυλόφιλοι, οι 11 χρήστες ενδοφλέβιων ναρκωτικών, οι 52 άντρες που είχαν σεξουαλική επαφή με άντρες και 1 ανήκε σε άλλη κατηγορία μετάδοσης (Πίνακας 4.3 & Γράφημα 4.5).

Πίνακας 4.3

Αποτελέσματα των 86, από τις 100 τυχαία επιλεγμένες αλληλουχίες, για τις οποίες προέκυψε απόφαση κατηγορίας μετάδοσης κάνοντας εφαρμογή της μεθόδου, ανά κατηγορία μετάδοσης από την εκτίμηση της μεθόδου και ανά δηλωθείσα κατηγορία μετάδοσης στο ΚΕ.ΕΛ.Π.ΝΟ.

Στη διαγώνιο του πίνακα παρουσιάζεται ο αριθμός των αλληλουχιών για τις οποίες η μέθοδος συμφωνεί με τη δηλωθείσα κατηγορία μετάδοσης στο ΚΕ.ΕΛ.Π.ΝΟ.

Εκτιμημένη κατηγορία μετάδοσης	Δηλωθείσα κατηγορία μετάδοσης στο ΚΕ.ΕΛ.Π.ΝΟ.				Σύνολο
	Ετεροφυλόφιλοι/ες	Χρήστες Ενδοφλέβιων Ναρκωτικών	Άντρες που κάνουν σεξ με άντρες	Άλλο	
Ετεροφυλόφιλοι/ες	12	1	4	0	17
Χρήστες Ενδοφλέβιων Ναρκωτικών	1	11	0	0	12
Άντρες που κάνουν σεξ με άντρες	2	1	52	1	56
Άλλο	0	0	0	1	1
Σύνολο	15	13	56	2	86



Γράφημα 4.5

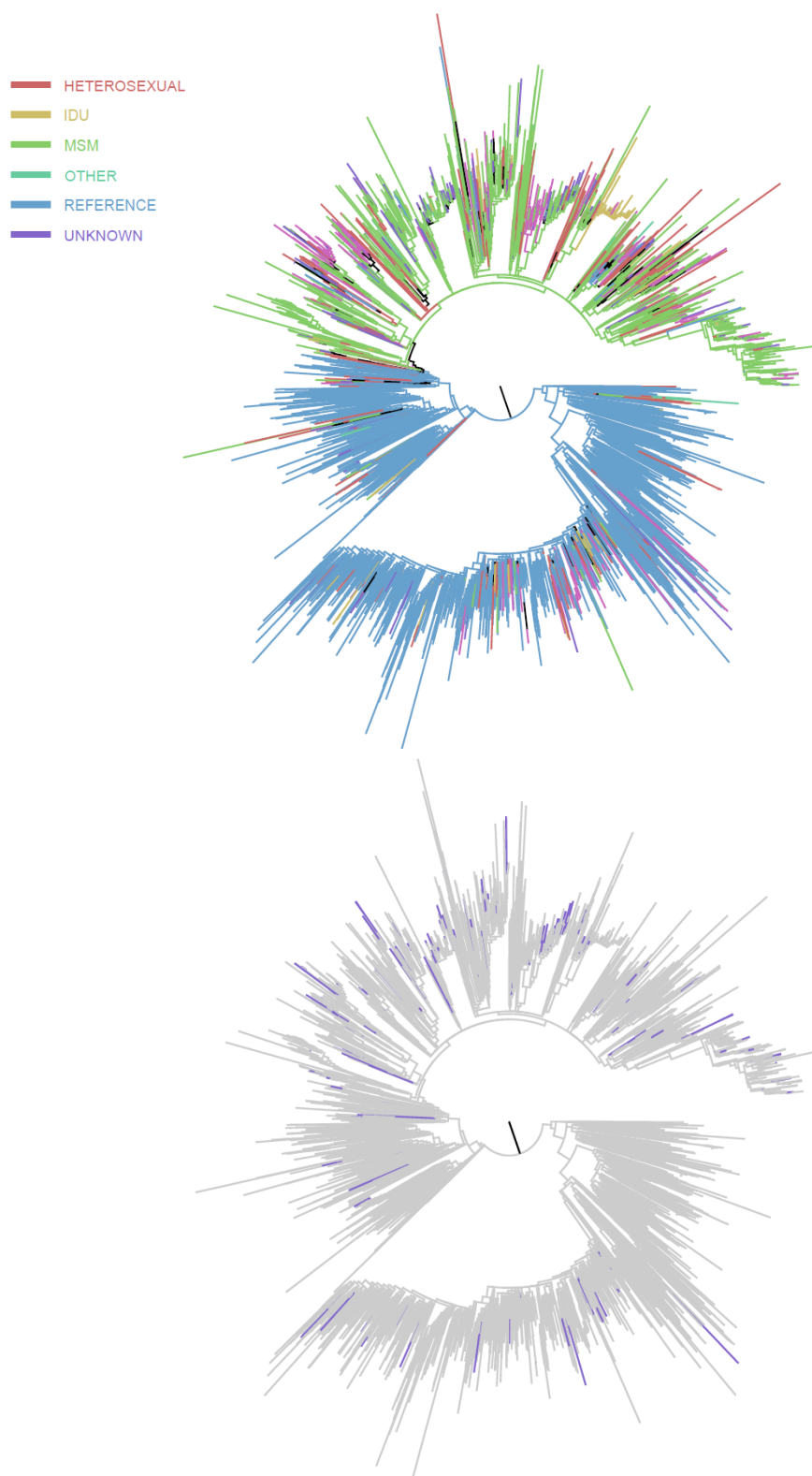
Κατανομή των 86, από τις 100 τυχαία επιλεγμένες αλληλουχίες, ως προς την κατηγορία μετάδοσης που προέκυψε από την εφαρμογή της μεθόδου, καθώς επίσης και ως προς την συμφωνία ή μη των ευρημάτων που προέκυψαν από τη μέθοδο με τη δηλωθείσα κατηγορία στο ΚΕ.ΕΛ.Π.ΝΟ. (HCDCP).

Επεξήγηση: Heterosexuals: Ετεροφυλόφιλοι/ες, IDU: Χρήστες ενδοφλέβιων ναρκωτικών, MSM: Άντρες που κάνουν σεξ με άλλους άντρες, Other: Άλλο

4.3. ΚΥΡΙΑ ΑΝΑΛΥΣΗ

Η εύρεση της κατηγορίας μετάδοσης των HIV-οροθετικών με άγνωστη κατηγορία μετάδοσης στηρίχθηκε στα ίδια μεθοδολογικά βήματα που ακολουθήθηκαν και στον υπολογισμό της αξιοπιστίας της μεθόδου (Κεφάλαιο 4.2). Κατασκευάστηκαν τρία φυλογενετικά δέντρα, από 1756 αλληλουχίες HIV-οροθετικών ατόμων εντός Ελλάδας και 1500 αλληλουχίες αναφοράς, διαφορετικές για κάθε δέντρο, που συλλέχθηκαν ανά την υφήλιο. Οι περισσότερες ελληνικές αλληλουχίες ομαδοποιήθηκαν εντός ενός μεγάλου μονοφυλετικού κλαδιού και στα τρία δέντρα, όπου παρατηρήθηκε μία μεγάλη μονοφυλετική ομάδα χρηστών ενδοφλέβιων ναρκωτικών και αρκετές μονοφυλετικές ομάδες αντρών που είχαν σεξουαλική επαφή με άλλους άντρες (Γραφήματα 4.6-4.8).

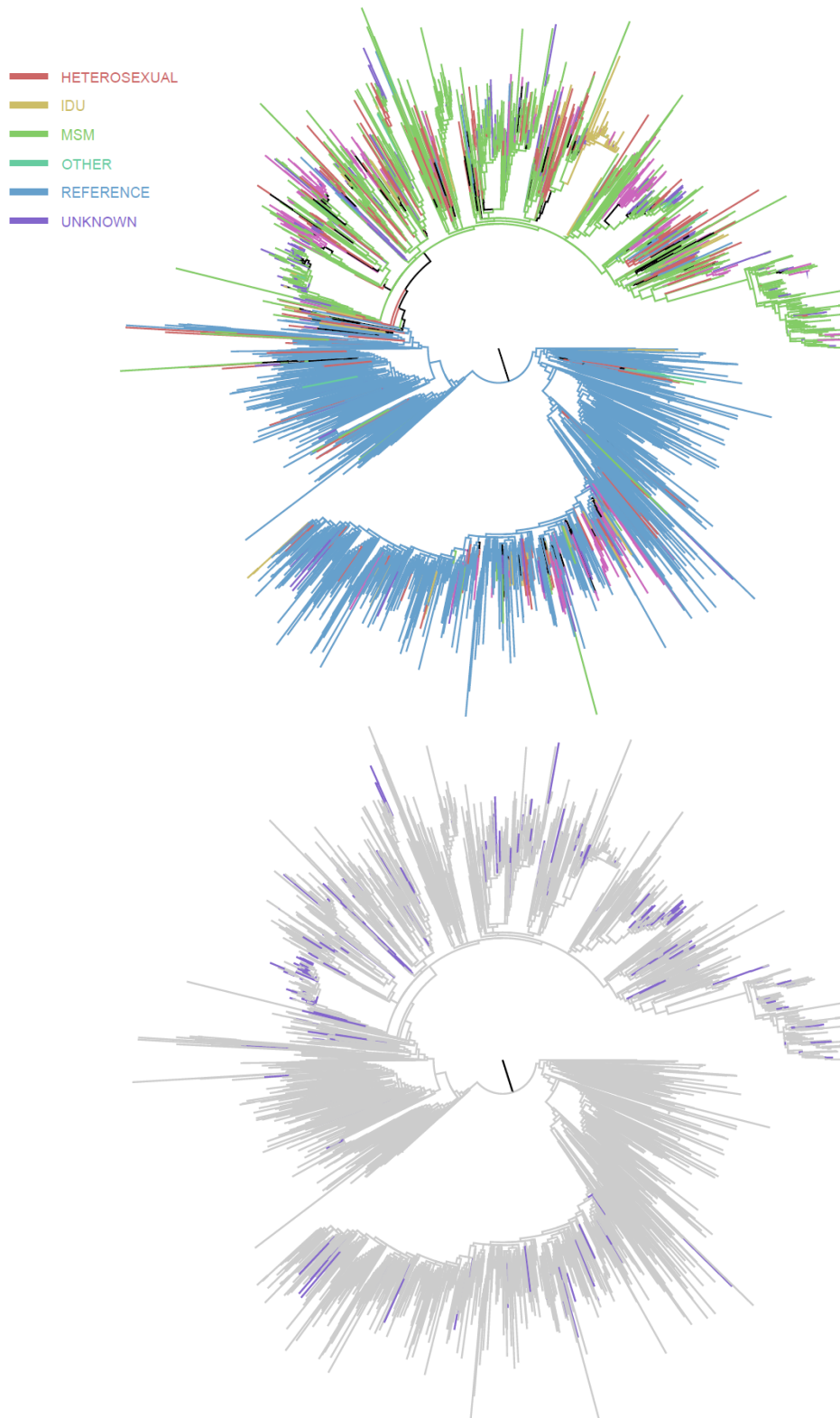
Η εκτίμηση της κατηγορίας μετάδοσης πραγματοποιήθηκε σε 196 HIV-οροθετικά άτομα, 97 άντρες και 26 γυναίκες, ενώ για τους υπόλοιπους δεν υπήρχε διαθέσιμη πληροφορία για το φύλο. Στα γραφήματα 4.6-4.8, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της φυλογενετικής και φυλογεωγραφικής ανάλυσης (επάνω δέντρα), με την ελληνική επιδημία να ξεχωρίζει ως μονοφυλετικό κλαδί (όλα εκτός του κυανού χρώματος), με χαρακτήρα τοπικής διασποράς ιδιαίτερα σε άντρες που είχαν σεξουαλική επαφή με άλλους άντρες (πράσινο χρώμα). Επίσης, διακρίνεται με μωβ χρώμα η κατανομή των 196 αλληλουχιών με το μεγαλύτερο ποσοστό αυτών (83,2%) να ομαδοποιείται εντός της ελληνικής επιδημίας.



Γράφημα 4.6

Πρώτο φυλογενετικό δέντρο χρωματισμένο σύμφωνα με την εκτίμηση της φυλογεωγραφικής ανάλυσης (πάνω) και χρωματισμένο μόνο για τις 196 αλληλουχίες με ακαθόριστη κατηγορία μετάδοσης (κάτω)

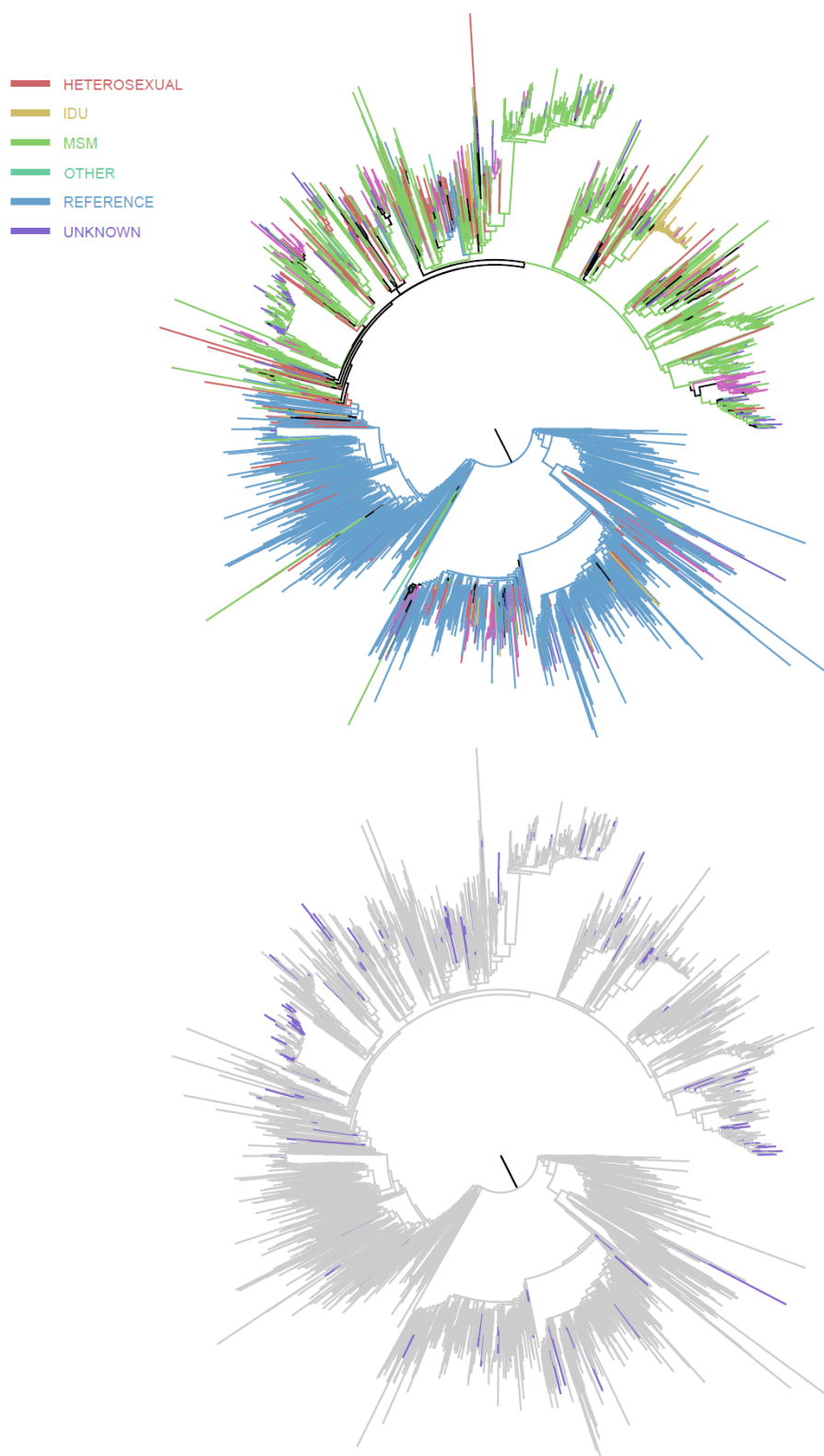
Επεξήγηση: Heterosexuals: Ετεροφυλόφιλοι/ες, IDU: Χρήστες ενδοφλέβιων ναρκωτικών, MSM: Άντρες που κάνουν σεξ με άλλους άντρες, Other: Άλλο, Reference: Αλληλουχίες αναφοράς από διάφορες περιοχές ανά την υφήλιο, Undetermined: Ακαθόριστοι/ες



Γράφημα 4.7

Δεύτερο φυλογενετικό δέντρο χρωματισμένο σύμφωνα με την εκτίμηση της φυλογεωγραφικής ανάλυσης (πάνω) και χρωματισμένο μόνο για τις 196 αλληλουχίες με ακαθόριστη κατηγορία μετάδοσης (κάτω)

Επεξήγηση: Heterosexuals: Ετεροφυλόφιλοι/ες, IDU: Χρήστες ενδοφλέβιων ναρκωτικών, MSM: Άντρες που κάνουν σεξ με άλλους άντρες, Other: Άλλο, Reference: Αλληλουχίες αναφοράς από διάφορες περιοχές ανά την υφήλιο, Undetermined: Ακαθόριστοι/ες



Γράφημα 4.8

Τρίτο φυλογενετικό δέντρο χρωματισμένο σύμφωνα με την εκτίμηση της φυλογεωγραφικής ανάλυσης (πάνω) και χρωματισμένο μόνο για τις 196 αλληλουχίες με ακαθόριστη κατηγορία μετάδοσης (κάτω)

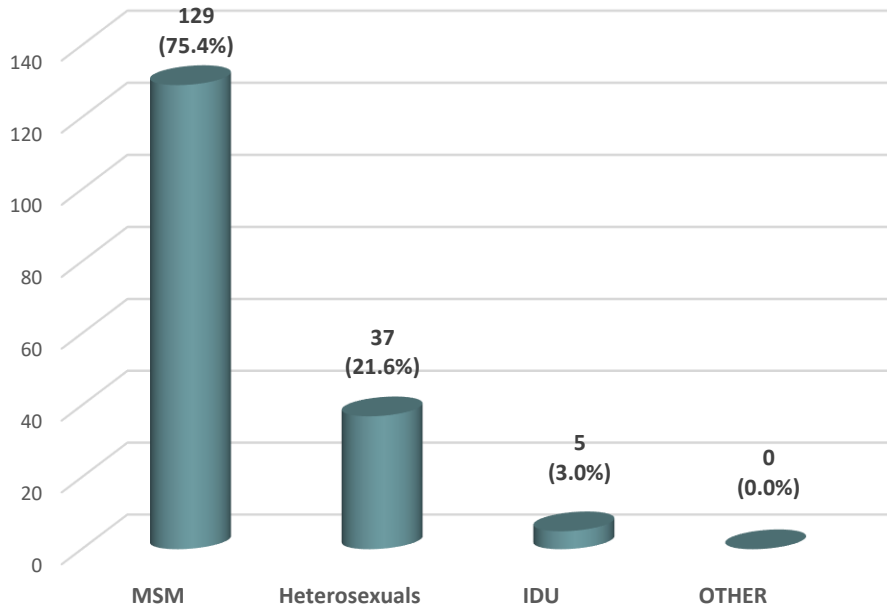
Επεξήγηση: Heterosexuals: Ετεροφυλόφιλοι/ες, IDU: Χρήστες ενδοφλέβιων ναρκωτικών, MSM: Άντρες που κάνουν σεξ με άλλους άντρες, Other: Άλλο, Reference: Αλληλουχίες αναφοράς από διάφορες περιοχές ανά την υφήλιο, Undetermined: Ακαθόριστοι/ες

Η κατηγορία μετάδοσης των HIV-οροθετικών με ακαθόριστη κατηγορία μετάδοσης εκτιμήθηκε για τα 171 άτομα (87,2%). Για αυτές τις 171 αλληλουχίες, οι 83 (48,5%) εκτιμήθηκαν με βάση το κριτήριο της γενετικής απόστασης (πρώτο κριτήριο της μεθόδου), οι 62 (36,3%) με βάση το κριτήριο της φυλογεωγραφικής ανάλυσης (δεύτερο κριτήριο) και οι υπόλοιπες 26 (15,2%) εφαρμόζοντας το κριτήριο της αναζήτησης μέσω του HIV-BLAST (τρίτο κριτήριο) (Πίνακας 4.4). Συνολικά, βρέθηκε ότι οι 129 (75,4%) HIV-οροθετικοί ήταν άντρες που είχαν σεξουαλική επαφή με άλλους άντρες, οι 37 (21,6%) ήταν ετεροφυλόφιλοι/ες και οι 5 (3%) χρήστες ενδοφλέβιων ναρκωτικών (Πίνακας 4.4 & Γράφημα 4.9).

Πίνακας 4.4

Αποτελέσματα των 171 αλληλουχιών με ακαθόριστη κατηγορία μετάδοσης ανά εκτιμημένη κατηγορία μετάδοσης και ανά κριτήριο μεθόδου με βάση το οποίο έγινε η εκτίμηση

Κατηγορία μετάδοσης	Γενετική απόσταση	Φυλογεωγραφία	HIV-BLAST	Σύνολο
Ετεροφυλόφιλοι/ες	25	3	9	37
Χρήστες Ενδοφλέβιων Ναρκωτικών	5	0	0	5
Άντρες που κάνουν σεξ με άντρες	53	59	17	129
Άλλο	0	0	0	0
Σύνολο	83	62	26	171



Γράφημα 4.9

Κατανομή των 171 αλληλουχιών με ακαθόριστη κατηγορία μετάδοσης ως προς την εκτιμημένη κατηγορία μετάδοσης

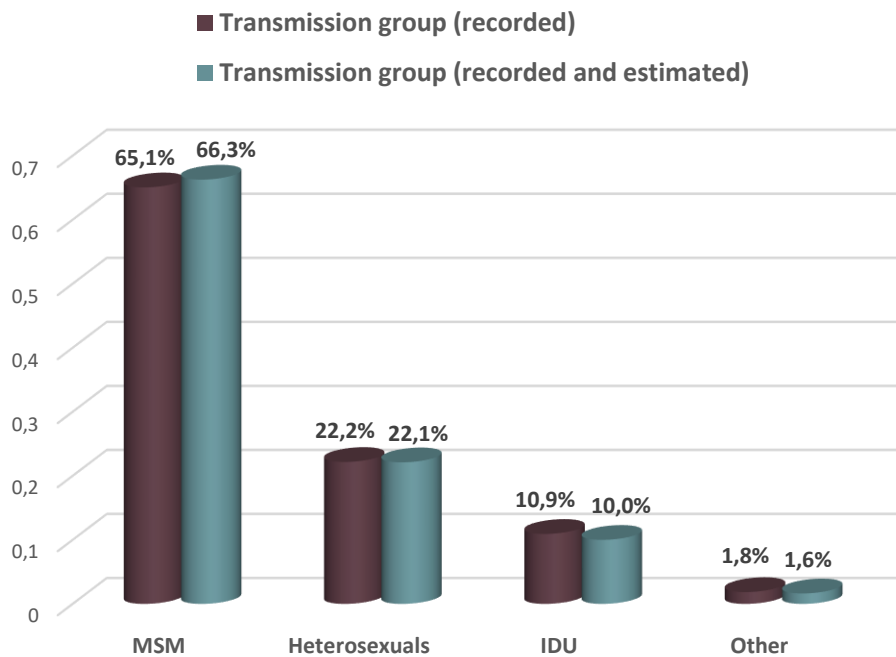
Επεξήγηση: Heterosexuals: Ετεροφυλόφιλοι/ες, IDU: Χρήστες ενδοφλέβιων ναρκωτικών, MSM: Άντρες που κάνουν σεξ με άλλους άντρες, Other: Άλλο, Undetermined: Ακαθόριστοι/ες

Η νέα κατανομή της κατηγορίας μετάδοσης για τον υπότυπο A1, συμπεριλαμβανομένου και των οροθετικών με την εκτιμημένη κατηγορία μετάδοσης, είναι 325 (22,1%) ετεροφυλόφιλοι/ες, 147 (10%) χρήστες ενδοφλέβιων ναρκωτικών, 974 (66,3%) άντρες που κάνουν σεξ με άντρες και 24 (1,6%) οροθετικοί που μολύνθηκαν με κάποιον άλλο τρόπο (Πίνακας 4.5 & Γράφημα 4.10).

Πίνακας 4.5

Συχνότητες ανά φύλο και ανά κατηγορία μετάδοσης για τους 1470 HIV-οροθετικούς υπότυπου A1

Κατηγορία Μετάδοσης	Σύνολο
	N (%)
Ετεροφυλόφιλοι/ες	325 (22,1%)
Χρήστες Ενδοφλέβιων Ναρκωτικών	147 (10,0%)
Άντρες που κάνουν σεξ με άντρες	974 (66,3%)
Άλλο	24 (1,6%)
Σύνολο	1470 (100%)



Γράφημα 4.10

Κατανομή της δηλωθείσας κατηγορίας μετάδοσης (αριστερά) και του συνδυασμού δηλωθείσας-εκτιμημένης κατηγορίας μετάδοσης (δεξιά)

Επεξήγηση: Heterosexuals: Ετεροφυλόφιλοι/ες, IDU: Χρήστες ενδοφλέβιων ναρκωτικών, MSM: Άντρες που κάνουν σεξ με άλλους άντρες, Other: Άλλο, Undetermined: Ακαθόριστοι/ες

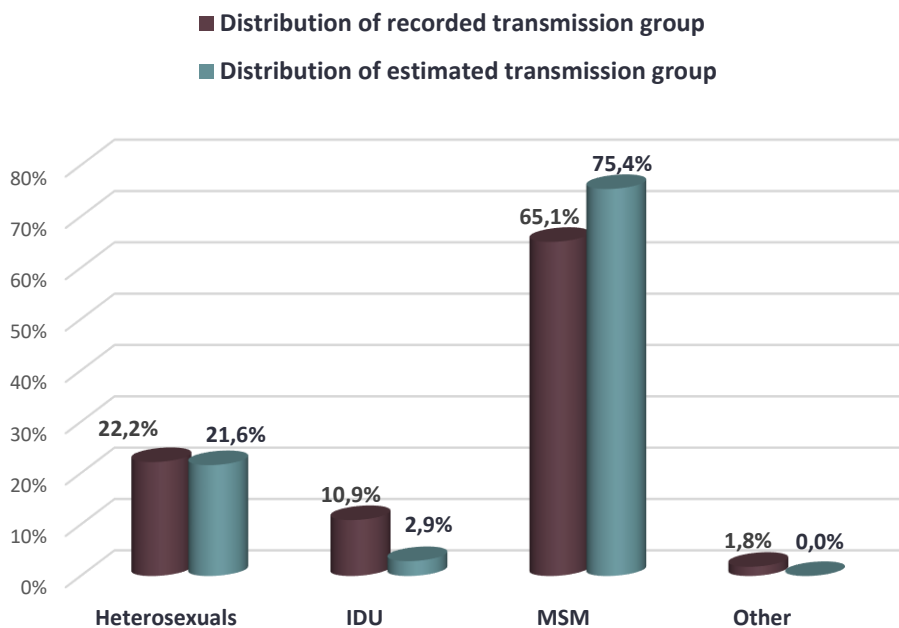
4.4. ΔΕΥΤΕΡΕΥΟΥΣΕΣ ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ

Πραγματοποιήθηκε έλεγχος χ^2 καλής εφαρμογής ανάμεσα στην κατηγορία μετάδοσης, όπως εκτιμήθηκε από τη μέθοδο, των 171 αλληλουχιών και αυτή των υπόλοιπων 1299 αλληλουχιών με γνωστή κατηγορία μετάδοσης. Βρέθηκε ότι οι κατανομές των δύο αυτών πληθυσμών διέφεραν μεταξύ τους, δηλαδή υπήρχε στατιστικά σημαντική σχέση ($p=1,19 \cdot 10^{-3}$) ανάμεσα στην κατηγορία μετάδοσης και τη μη δήλωσή της (Πίνακας 4.5 & Γράφημα 4.1).

Πίνακας 4.6

Συχνότητες των κατηγοριών μετάδοσης για τις 1299 αλληλουχίες γνωστής κατηγορίας μετάδοσης και για τις 171 αλληλουχίες που εκτιμήθηκε η κατηγορία μετάδοσης μέσω της μεθόδου

	Δηλωθείσα κατηγορία μετάδοσης N (%)	Εκτιμημένη κατηγορία μετάδοσης N (%)
Ετεροφυλόφιλοι/ες	288 (22,2%)	37 (21,6%)
Χρήστες Ενδοφλέβιων Ναρκωτικών	142 (10,9%)	5 (2,9%)
Άντρες που κάνουν σεξ με άντρες	845 (65,1%)	129 (75,4%)
Άλλο	24 (1,8%)	0 (0,0%)
Σύνολο	1299 (100%)	171 (100%)



Γράφημα 4.11

Κατανομή της δηλωθείσας κατηγορίας μετάδοσης (αριστερά) και της εκτιμημένης κατηγορίας μετάδοσης (δεξιά)

Επεξήγηση: Heterosexuals: Ετεροφυλόφιλοι/ες, IDU: Χρήστες ενδοφλέβιων ναρκωτικών, MSM: Άντρες που κάνουν σεξ με άλλους άντρες, Other: Άλλο, Undetermined: Ακαθόριστοι/ες

ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

5.1. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ένα σημαντικό μειονέκτημα του ελληνικού συστήματος επιτήρησης αποτελεί το αρκετά μεγάλο ποσοστό των HIV-οροθετικών με ακαθόριστη κατηγορία μετάδοσης. Η γνώση της κατηγορίας μετάδοσης αποτελεί σημαντική πληροφορία για την καλύτερη κατανόηση των χαρακτηριστικών της επιδημίας, για την εφαρμογή αποτελεσματικότερων μέτρων πρόληψης για τον περιορισμό της, αλλά και για καλύτερη αξιολόγηση των ήδη εφαρμοσμένων μέτρων πρόληψης.

Ο υπότυπος A1 παρουσιάζει αρκετά υψηλό επιπολασμό στην Ελλάδα και εμφανίζει χαρακτηριστικά επιδημίας με τοπική διασπορά. Στην παρούσα μελέτη, έγινε εκτίμηση της κατηγορίας μετάδοσης των HIV-οροθετικών ατόμων με ακαθόριστη κατηγορία μετάδοσης που έχουν μολυνθεί από τον υπότυπο A1. Η εκτίμηση της κατηγορίας μετάδοσης βασίστηκε σε μεθόδους αιχμής της μοριακής επιδημιολογίας και συνολικά συνιστά μια πρωτότυπη έρευνα. Αναλύθηκαν φυλογενετικά και φυλογεωγραφικά 1756 αλληλουχίες που απομονώθηκαν από HIV-οροθετικούς υπότυπου A1 το χρονικό διάστημα από 1/2003 έως 6/2015 στην Ελλάδα. Η μέθοδος εκτίμησης της κατηγορίας μετάδοσης εφαρμόστηκε σε 196 ασθενείς ακαθόριστης κατηγορίας μετάδοσης. Κατασκευάστηκαν τρία φυλογενετικά δέντρα στα οποία εντοπίστηκαν οι αλληλουχίες που αντιστοιχούσαν σε HIV-οροθετικά άτομα ακαθόριστης κατηγορίας μετάδοσης. Σε αυτούς του ασθενείς, εφαρμόστηκαν τρία κριτήρια που βασίζονταν στη γενετική απόσταση της πλησιέστερης αλληλουχίας που προέκυπτε από τη φυλογενετική τοπολογία, στην εκτίμηση της φυλογεωγραφικής ανάλυσης και στη μηχανή αναζήτησης HIV-BLAST, για την εύρεση των ομοιότερων γενετικά αλληλουχιών από αυτή με την άγνωστη κατηγορία μετάδοσης.

Επίσης, εκτιμήθηκε το ποσοστό αξιοπιστίας της συγκεκριμένης μεθόδου με ανάλυση ευαισθησίας σε 100 HIV-οροθετικούς γνωστής κατηγορίας μετάδοσης, αλλά με τυφλότητα για τον ερευνητή. Από τις 100 αλληλουχίες, εκτιμήθηκε η κατηγορία μετάδοσης για ένα αρκετά μεγάλο ποσοστό (86%), ενώ ένας σημαντικός λόγος που δεν προέκυψε εκτίμηση για τις υπόλοιπες από τη μέθοδο ήταν πως η τοπολογία τους βρέθηκε να είναι εκτός της ελληνικής μονοφυλετικής ομάδας και κατά συνέπεια, ομαδοποιήθηκαν κυρίως με αλληλουχίες παγκόσμιας δειγματοληψίας άγνωστης κατηγορίας που χρησιμοποιήθηκαν στη φυλογενετική ανάλυση ως αλληλουχίες αναφοράς. Η αξιοπιστία της μεθόδου βρέθηκε πως ήταν ικανοποιητική, αφού για τους 76 ασθενείς, η εκτίμηση της κατηγορίας μετάδοσης ήταν ίδια με αυτή που έχει δηλωθεί στο ΚΕ.ΕΛ.Π.ΝΟ.

Ένας περιορισμός της παρούσας έρευνας αποτελεί το γεγονός πως η συγκεκριμένη μέθοδος έχει εφαρμοστεί αποκλειστικά και μόνο για τον υπότυπο A και δεν έχει επεκταθεί

και σε άλλους υπότυπους, όπως ο B που βάσει των μέχρι τώρα επιδημιολογικών δεδομένων παρουσιάζει το μεγαλύτερο επιπολασμό στην Ελλάδα [33]. Παρόλα αυτά, ο σχεδιασμός της συγκεκριμένης μεθόδου επιτρέπει την εφαρμογή της και σε άλλους υπότυπους.

Ένα επιπλέον μειονέκτημα αποτελεί ο τρόπος που συλλέχθηκε η πληροφορία της κατηγορίας μετάδοσης για τους HIV-οροθετικούς, καθώς βασίζεται σε αυτό-αναφορές των ασθενών. Όπως είναι γνωστό, κάτι τέτοιο αυξάνει την πιθανότητα για σφάλμα δυσταξινόμησης του πληθυσμού στις διάφορες κατηγορίες μετάδοσης, χωρίς όμως, να υπάρχει εφικτή δυνατότητα για διαφορετικό τρόπο συλλογής της συγκεκριμένης πληροφορίας.

5.2. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα ευρήματα της παρούσας μελέτης ενισχύουν τα μέχρι τώρα δεδομένα αναφορικά με τα χαρακτηριστικά της HIV/AIDS επιδημίας στην Ελλάδα, με τον υψηλότερο κίνδυνο μόλυνσης από τον ιό HIV να παρουσιάζουν άντρες που είχαν σεξουαλική επαφή με άλλους άντρες. Σύμφωνα με τα ευρήματά μας, οι 3 στους 4 HIV-οροθετικούς που δηλώθηκαν στο σύστημα επιτήρησης με ακαθόριστη κατηγορία μετάδοσης ήταν άντρες που είχαν σεξουαλική επαφή με άλλους άντρες, γεγονός που υποδηλώνει ότι υπάρχει αδυναμία του συστήματος στην πλήρη καταγραφή της συγκεκριμένης κατηγορίας.

Ακόμη, βρέθηκε πως η καταγραφή των χρηστών ενδοφλέβιων ναρκωτικών είναι ικανοποιητική για τους φορείς υπότυπου A1, αφού το ποσοστό των HIV-οροθετικών με ακαθόριστη κατηγορία μετάδοσης που εκτιμήθηκε ότι ανήκει στους χρήστες ενδοφλέβιων ναρκωτικών ήταν μικρότερο από 3%. Αυτό είναι λογικό λόγω του ότι οι χρήστες ενδοφλέβιων ναρκωτικών μπορούν να ανιχνευθούν κατά τη διάγνωση.

Σύμφωνα με τα ευρήματα των δευτερευουσών στατιστικών αναλύσεων της μελέτης, προέκυψε πως η κατανομή των HIV-οροθετικών ως προς την κατηγορία μετάδοσης που ανήκουν διαφέρει ανάμεσα σε αυτούς με γνωστή και ακαθόριστη κατηγορία μετάδοσης και επομένως, η πιθανότητα ενός HIV-οροθετικού να δηλωθεί ως ακαθόριστος/η φαίνεται να επηρεάζεται από την κατηγορία μετάδοσης στην οποία ανήκει. Οι άντρες που είχαν σεξουαλική επαφή με άλλους άντρες είχαν μεγαλύτερη πιθανότητα να μην δηλώσουν την κατηγορία που ανήκουν συγκριτικά με τις υπόλοιπες κατηγορίες μετάδοσης.

Η επιδημία HIV/AIDS παραμένει ακόμα και σήμερα ένα σημαντικό πρόβλημα της δημόσιας υγείας, τόσο σε παγκόσμιο όσο και εθνικό επίπεδο. Ο κίνδυνος μόλυνσης από τον HIV διαφέρει ανάμεσα σε άτομα που ανήκουν σε διαφορετικές κατηγορίες μετάδοσης και επομένως, η γνώση του τρόπου με τον οποίο μεταδόθηκε ο ιός έχει ιδιαίτερη σημασία, καθώς συμβάλει, αφενός, στη βαθύτερη κατανόηση των επιδημιολογικών χαρακτηριστικών της λοίμωξης και αφετέρου, στη λήψη αποτελεσματικότερων μέτρων πρόληψης για τον περιορισμό νέων λοιμώξεων. Παρόλα αυτά, σημαντικό μειονέκτημα στο Εθνικό σύστημα επιδημιολογικής επιτήρησης αποτελεί το μεγάλο ποσοστό των HIV-οροθετικών με ακαθόριστη ομάδα μετάδοσης (18,9%). Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η εκτίμηση της κατηγορίας μετάδοσης των HIV-οροθετικών υπότυπου A1 με ακαθόριστη κατηγορία μετάδοσης.

Μελετήθηκαν, συνολικά, 1756 νουκλεοτιδικές αλληλουχίες, που απομονώθηκαν από HIV οροθετικά άτομα υπότυπου A1, με ημερομηνία διάγνωσης τη χρονική περίοδο 1/2003-6/2015. Από αυτούς, επιλέχθηκαν όλοι οι ασθενείς με ακαθόριστη κατηγορία μετάδοσης (n=196) προκειμένου να διερευνηθεί η πιθανή κατηγορία στην οποία ανήκουν, μέσω μεθόδων φυλογενετικής και φυλογεωγραφικής ανάλυσης

Η φυλογενετική τοπολογία βασίστηκε σε μεθόδους μέγιστης πιθανοφάνειας με παραμετροποίηση GTR και διακριτή Γ-κατανομή, ενώ η ανάλυση φυλογεωγραφίας στο κριτήριο της μέγιστης φειδωλότητας. Η εκτίμηση της κατηγορίας μετάδοσης βασίστηκε στην εφαρμογή τριών κριτηρίων, Το πρώτο από αυτά πληρούνταν όταν η γενετική απόσταση ανάμεσα στην αλληλουχία ακαθόριστης κατηγορίας μετάδοσης με την πλησιέστερή της αλληλουχία στο φυλογενετικό δέντρο ήταν μικρότερη των 0,015 νουκλεοτιδικών αντικαταστάσεων ανά θέση νουκλεοτιδίου και επομένως, οι ασθενείς που αντιστοιχούσαν στις δύο αυτές αλληλουχίες θεωρούνταν ότι ανήκουν στην ίδια κατηγορία μετάδοσης. Το δεύτερο κριτήριο αφορούσε την εκτίμηση της φυλογεωγραφικής ανάλυσης, θεωρώντας ότι η κατηγορία μετάδοσης του διερευνώμενου ασθενή είναι ίδια με αυτή που προέκυψε από την εκτίμηση της φυλογεωγραφίας για τον πιο πρόσφατο πρόγονο στον πλησιέστερο κόμβο του φυλογενετικού δέντρου. Σε περίπτωση που δεν πληρούνταν τα δύο προηγούμενα κριτήρια, πραγματοποιούνταν αναζήτηση μέσω του HIV-BLAST των 10 και 25 πιο όμοιων γενετικά αλληλουχιών και πραγματοποιούνταν νέα φυλογενετική και φυλογεωγραφική ανάλυση με εφαρμογή των ίδιων κριτηρίων.

Η μέθοδος επαναλήφθηκε σε τρία φυλογενετικά δέντρα, διαφορετικά ως προς τις αλληλουχίες αναφοράς, για να περιοριστεί η πιθανότητα εσφαλμένης τοπολογίας. Η αξιοπιστία της μεθόδου, εκτιμήθηκε με τυφλή ανάλυση ευαισθησίας σε 100 τυχαία επιλεγμένους ασθενείς γνωστής ομάδας κινδύνου. Επίσης, ελέγχθηκε, με χ^2 καλής εφαρμογής, αν η μη δήλωση της ομάδας κινδύνου ενός ασθενούς επηρεάζεται από την κατηγορία μετάδοσης στην οποία ανήκει.

Τα αποτελέσματα της ανάλυσης ευαισθησίας έδειξαν ότι η ομάδα κινδύνου εκτιμήθηκε στο 86% των περιπτώσεων με ευαισθησία 88,4%. Κατά την κύρια ανάλυση, η κατηγορία μετάδοσης διερευνήθηκε για 196 HIV οροθετικούς και η μέθοδος έδωσε εκτίμηση για το 87,2% των ασθενών, από τους οποίους το 75,44% εκτιμήθηκε ως άντρες με σεξουαλικές επαφές με άνδρες (MSM), το 21,64% ετεροφυλόφιλοι άντρες/γυναίκες και το 2,92% χρήστες ενδοφλέβιων ναρκωτικών. Υπήρχε στατιστικά σημαντική σχέση ($p=1,19*10^{-3}$) ανάμεσα στην κατηγορία μετάδοσης και τη μη δήλωσή της.

Η κατηγορία μετάδοσης των HIV οροθετικούς υπότυπου A1 με ακαθόριστη κατηγορία μετάδοσης εκτιμήθηκε για ένα αρκετά μεγάλο ποσοστό με ικανοποιητική αξιοπιστία. Η συγκεκριμένη μέθοδος αποτελεί μια πρωτότυπη έρευνα που βασίστηκε σε μεθόδους αιχμής της μοριακής επιδημιολογίας.

Τα ευρήματα ενισχύουν τα μέχρι τώρα δεδομένα ότι η επιδημιολογία του HIV στην Ελλάδα αφορά κυρίως MSM και επίσης, βρέθηκε ότι η καταγραφή της ομάδας κινδύνου των χρηστών ενδοφλέβιων ναρκωτικών είναι ικανοποιητική. Τέλος, βρέθηκε ότι η πιθανότητα ένας HIV οροθετικός να δηλωθεί στο εθνικό σύστημα επιδημιολογικής επιτήρησης με ακαθόριστη κατηγορία μετάδοσης φαίνεται πως επηρεάζεται από την κατηγορία μετάδοσης στην οποία ανήκει.

ABSTRACT

HIV/AIDS epidemic still remains a hot issue in the field of both global and local public health. The risk of transmission differs among persons of different transmission groups and thus, the knowledge of transmission route of each patient leads to deeper understanding of viral epidemiology and better preventing measures. Notwithstanding, the percentage of HIV-positive people with undetermined transmission group remains too high (18.9%) in the Hellenic Center for Disease Control and Prevention (HCDCP). The objective of this study was to estimate the transmission group of all HIV-positive patients with undetermined transmission group, who were infected by HIV-1 subtype A1.

1756 nucleic acid sequences were analyzed corresponding to HIV-positive persons of subtype A1, who had been diagnosed from January 2003 to June 2015. All patients with undetermined transmission group (n=196) were selected in order to estimate their true transmission group, using phylogenetic and phylogeographic methods.

The phylogenetic topology was based on maximum likelihood methods, using GTR evolutionary model and parameters of discrete Gamma-distribution and the phylogeography on maximum parsimony method. Three criteria were used to estimate the transmission group; the first one included the genetic distance between the sequence of undetermined transmission group and its pair on the phylogenetic topology. If the distance was less than 0.015 substitutes per position, then the patients corresponding to these two sequences were considered to be at the same transmission group. According to the second criterion, the transmission group of the investigated patient was given by the estimation of phylogeography at the point of closest node of the sequence. The final criterion included a search of 10 and 25, respectively, genetically closest sequences through HIV-BLAST. Then, a novel phylogenetic and phylogeographic analysis was made implementing the same criteria as before.

To reduce the possibility of biased topology, the method was replicated by constructing three phylogenetic trees with different reference sequences. To estimate the reliability of the method, a blinded sensitivity analysis was performed on a sample of 100 patients with known transmission group. A chi-square test was also performed, in order to investigate the association between the transmission group of a patient and its record to the HCDCP.

According to the sensitivity analysis results, 88.6% of the transmission group of patients with undetermined transmission group was estimated with 88.4% sensitivity. According to the main analysis results, the transmission group of patients with undetermined transmission group was investigated for 196 HIV-positive individuals and estimated for the 87.2% of them. The 75.44% was estimated as man having sex with men (MSM), the 21.64% as heterosexuals and the 2.92% as injecting drug users (IDU). There was statistically significant association ($p=1.19 \times 10^{-3}$) between transmission group and its record to HCDCP.

A high percent of the transmission group of HIV-positive individuals, infected by sub-subtype A1, with undetermined transmission group was estimated with sufficient reliability. This

Abstract

study forms an innovative researching method based on frontline methods of molecular epidemiology.

The study results confirm that the HIV/AIDS epidemic in Greece, mostly, concerns MSM community and that the transmission group recording of IDU is sufficient. Finally, it seems that the probability of an HIV-positive individual to be recorded to HCDCP with undetermined transmission group differs among transmission groups.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Knipe, D.M. and P.M. Howley, *Fields virology*. 2013, Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins Health: Philadelphia, PA. p. 2 volumes.
2. Dimmock, N.J., A.J. Easton, and K.N. Leppard, *Introduction to modern virology*. 2016, Wiley Blackwell: Chichester, West Sussex ; Hoboken, NJ,. p. xviii, 519 pages.
3. Baron, S., *Medical microbiology*. 4th ed. 1996, Galveston, Tex.: University of Texas Medical Branch at Galveston. xvii, 1273 p.
4. Pearson Education Inc, *Virus structures*, in *Internet*. 2008: http://player.slideplayer.com/72/12230990/slides/slide_3.jpg.
5. Acheson, N.H., *Fundamentals of molecular virology*. 2nd ed. 2011, Hoboken, NJ: John Wiley & Sons. xxv, 500 p.
6. Modrow, S., *Molecular virology*. 2013, New York: Springer. pages cm.
7. Ryu, W.-S., *Molecular virology of human pathogenic viruses*. 2017, Amsterdam: Academic Press. xv, 423 pages.
8. International Committee on Taxonomy of Virus (ICTV). *ICTV Taxonomy*. 2017 [cited 2018 April]; Available from: <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/w/ictv-taxonomy>.
9. International Committee on Taxonomy of Virus (ICTV). *Taxonomy Release History*. 2017 [cited 2018 April]; Available from: https://talk.ictvonline.org/taxonomy/p/taxonomy_releases.
10. International Committee on Taxonomy of Virus (ICTV). *Virus Taxonomy: 2017 Release*. 2017 [cited 2018 April]; Available from: <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>.
11. Wikipedia. *Εισαγωγή στους ιούς*. [cited 2018 April]; Available from: https://el.wikipedia.org/wiki/Εισαγωγή_στους_ιούς#cite_note-47.
12. Collier, L.H. and J.S. Oxford, *Human virology : a text for students of medicine, dentistry, and microbiology*. 3rd ed. 2006, Oxford ; New York: Oxford University Press. xviii, 303 p.
13. BasicmedicalKey. *Viruses and Cancer*. 2017 [cited 2018 June]; Available from: <https://i1.wp.com/basicmedicalkey.com/wp-content/uploads/2017/07/image02233-1.jpeg?resize=698%2C687>.
14. Coffin, J.M., S.H. Hughes, and H. Varmus, *Retroviruses*. 1997, Plainview, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press. xv, 843 p.
15. Κέντρο Ελέγχου & Πρόληψης Νοσημάτων (ΚΕ.ΕΛ.Π.ΝΟ.). [cited 2018; Available from: <http://www.keelpno.gr>.
16. Tebit, D.M. and E.J. Arts, *Tracking a century of global expansion and evolution of HIV to drive understanding and to combat disease*. *Lancet Infect Dis*, 2011. **11**(1): p. 45-56.
17. Hallenberger, S., et al., *Inhibition of furin-mediated cleavage activation of HIV-1 glycoprotein gp160*. *Nature*, 1992. **360**(6402): p. 358-61.
18. Pau, A.K. and J.M. George, *Antiretroviral therapy: current drugs*. *Infect Dis Clin North Am*, 2014. **28**(3): p. 371-402.
19. Sepkowitz, K.A., *AIDS--the first 20 years*. *N Engl J Med*, 2001. **344**(23): p. 1764-72.
20. Bennett, J.E., R. Dolin, and M.J. Blaser, *Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases*. Eighth edition. ed. 2015, Philadelphia, PA: Elsevier/Saunders. 2 volumes.

21. World Health Organization (WHO), *WHO case definitions of HIV for surveillance and revised clinical staging and immunological classification of HIV-related disease in adults and children*. 2007.
22. Hu, W.S. and H.M. Temin, *Retroviral recombination and reverse transcription*. Science, 1990. **250**(4985): p. 1227-33.
23. Plantier, J.C., et al., *A new human immunodeficiency virus derived from gorillas*. Nat Med, 2009. **15**(8): p. 871-2.
24. Beloukas, A., et al., *Molecular epidemiology of HIV-1 infection in Europe: An overview*. Infect Genet Evol, 2016. **46**: p. 180-189.
25. UNAIDS. *Global HIV & AIDS statistics - 2018 fact sheet*. 2018 [cited 2018; Available from: <http://www.unaids.org/en/resources/fact-sheet>].
26. World Health Organization (WHO). *Number of people (all ages) living with HIV, Estimates by WHO region*. 2017 [cited 2018; Available from: <http://apps.who.int/gho/data/view.main.22100WHO?lang=en>].
27. Κέντρο Ελέγχου & Πρόληψης Νοσημάτων (ΚΕ.ΕΛ.Π.ΝΟ.), *Επιδημιολογική Επιτήρηση της HIV/AIDS λοίμωξης στην Ελλάδα, Δηλωθέντα Στοιχεία έως 31.12.2017*, Υπουργείο Υγείας, Editor. 2017.
28. Dosekun, O. and J. Fox, *An overview of the relative risks of different sexual behaviours on HIV transmission*. Curr Opin HIV AIDS, 2010. **5**(4): p. 291-7.
29. Centers for Disease Control and Prevention. *HIV by Group*. [cited 2018; Available from: <https://www.cdc.gov>].
30. Paraskevis, D., et al., *Economic recession and emergence of an HIV-1 outbreak among drug injectors in Athens metropolitan area: a longitudinal study*. PLoS One, 2013. **8**(11): p. e78941.
31. Santos, A.F. and M.A. Soares, *HIV Genetic Diversity and Drug Resistance*. Viruses, 2010. **2**(2): p. 503-31.
32. Magiorkinis, G., et al., *The global spread of HIV-1 subtype B epidemic*. Infect Genet Evol, 2016. **46**: p. 169-179.
33. Paraskevis, D., et al., *Prevalence of drug resistance among HIV-1 treatment-naive patients in Greece during 2003-2015: Transmitted drug resistance is due to onward transmissions*. Infect Genet Evol, 2017. **54**: p. 183-191.
34. Nikolopoulos, G., D. Paraskevis, and A. Hatzakis, *HIV epidemiology in Greece*. Future Microbiol, 2008. **3**(5): p. 507-16.
35. Paraskevis, D., et al., *Increasing prevalence of HIV-1 subtype A in Greece: estimating epidemic history and origin*. J Infect Dis, 2007. **196**(8): p. 1167-76.
36. Gao, F., et al., *Origin of HIV-1 in the chimpanzee Pan troglodytes troglodytes*. Nature, 1999. **397**(6718): p. 436-41.
37. Reeves, J.D. and R.W. Doms, *Human immunodeficiency virus type 2*. J Gen Virol, 2002. **83**(Pt 6): p. 1253-65.
38. Foxman, B. and L. Riley, *Molecular epidemiology: focus on infection*. Am J Epidemiol, 2001. **153**(12): p. 1135-41.
39. Παρασκευής Δ, et al., *Βασικές αρχές μοριακής εξέλιξης και φυλογενετικής ανάλυσης*, in *Σημειώσεις μαθήματος*. 2017, Ιατρική Σχολή, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών: Αθήνα.
40. Αλαχιώτης, Σ., *Εισαγωγή στη Γενετική*. 2005, Αθήνα: Ελληνικά γράμματα.
41. Μαρμάρας, Β. and Μ. Λαμπροπούλου-Μαρμάρα, *Βιολογία Κυττάρου Μοριακή Προσέγγιση*. 5η ed. 2005, Πάτρα: Εκδόσεις Τυρογάμα. 63-65.
42. Αλαχιώτης, Σ., *Εισαγωγή στην Εξέλιξη*. 2007, Αθήνα: Εκδοτικός Οίκος ΛΙΒΑΝΗ.
43. Kaehler, B.D., et al., *Genetic distance for a general non-stationary markov substitution process*. Syst Biol, 2015. **64**(2): p. 281-93.

44. Salemi, M., A.-M. Vandamme, and P. Lemey, *The phylogenetic handbook : a practical approach to phylogenetic analysis and hypothesis testing*. 2nd ed. 2009, Cambridge, UK ; New York: Cambridge University Press. xxvi, 723 p.
45. Tamura, K. and M. Nei, *Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees*. *Mol Biol Evol*, 1993. **10**(3): p. 512-26.
46. Rzhetsky, A. and M. Nei, *Tests of applicability of several substitution models for DNA sequence data*. *Mol Biol Evol*, 1995. **12**(1): p. 131-51.
47. Rosenberg, M.S., *Sequence alignment : methods, models, concepts, and strategies*. 2009, Berkeley: University of California Press.
48. *Understanding phylogenetic trees*. [cited 2018; Available from: <http://pulvermachergen677s13.weebly.com/uploads/1/6/8/8/16888814/2964821.png?462>.
49. Avise, J.C., *Phylogeography : the history and formation of species*. 2000, Cambridge, Mass.: Harvard University Press. viii, 447 p.
50. Paraskevis, D., et al., *Tracing the HIV-1 subtype B mobility in Europe: a phylogeographic approach*. *Retrovirology*, 2009. **6**: p. 49.
51. Mir, D., et al., *Phylodynamics of Yellow Fever Virus in the Americas: new insights into the origin of the 2017 Brazilian outbreak*. *Sci Rep*, 2017. **7**(1): p. 7385.
52. Edgar, R.C., *MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput*. *Nucleic Acids Res*, 2004. **32**(5): p. 1792-7.
53. Hall, B.G., *Building phylogenetic trees from molecular data with MEGA*. *Mol Biol Evol*, 2013. **30**(5): p. 1229-35.
54. Struck, D., et al., *COMET: adaptive context-based modeling for ultrafast HIV-1 subtype identification*. *Nucleic Acids Res*, 2014. **42**(18): p. e144.
55. Stamatakis, A., *RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies*. *Bioinformatics*, 2014. **30**(9): p. 1312-3.
56. Maddison, W.P. and D.R. Maddison, *Mesquite: a modular system for evolutionary analysis*. 2018: <http://www.mesquiteproject.org>.
57. Slatkin, M. and W.P. Maddison, *A cladistic measure of gene flow inferred from the phylogenies of alleles*. *Genetics*, 1989. **123**(3): p. 603-13.
58. Kumar, S., G. Stecher, and K. Tamura, *MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets*. *Mol Biol Evol*, 2016. **33**(7): p. 1870-4.
59. Wertheim, J.O., et al., *Social and Genetic Networks of HIV-1 Transmission in New York City*. *PLoS Pathog*, 2017. **13**(1): p. e1006000.
60. Carla Kuiken and Bette Korber, *Sequence Quality Control*. pp. III-80-90 in *Human Retroviruses and AIDS 1998*: p. Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, NM.