



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΤΟΜΕΑΣ ΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ

Α' ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ

ΔΙΕΥΘΥΝΤΡΙΑ: ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΕΛΕΝΗ Ι. ΓΚΟΓΚΑ

ΔΙΑΤΕΛΕΣΑΣ ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ (2015 - 2018): ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ Λ. ΔΑΪΚΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΕΥΑΓΓΕΛΙΑ-ΓΕΩΡΓΙΑ ΚΩΣΤΑΚΗ

Εκτίμηση των χαρακτηριστικών της επιδημίας του HIV-1 στην Ελλάδα
με μεθόδους μοριακής επιδημιολογίας

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ: ΑΝ. ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ ΠΑΡΑΣΚΕΥΗΣ

ΑΘΗΝΑ, 2019

ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Ημερομηνία αίτησης: 09/12/2015

Ημερομηνία ορισμού τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 02/02/2016

Μέλη τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Δημήτριος Παρασκευής (επιβλέπων) Αναπληρωτής Καθηγητής

Γεώργιος Δαΐκος Καθηγητής

Μήνα Ψυχογιού Επίκουρη Καθηγήτρια

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 20/04/2016

Ημερομηνία κατάθεσης: 21/11/2019

Ημερομηνία ορισμού επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής: 22/11/2019

Ημερομηνία υπεράσπισης: 19/12/2019

Μέλη επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής:

Δημήτριος Παρασκευής (επιβλέπων) Αναπληρωτής Καθηγητής

Γεώργιος Δαΐκος Καθηγητής

Μήνα Ψυχογιού Επίκουρη Καθηγήτρια

Παγώνα Λάγιου Καθηγήτρια

Ελένη Γκόγκα Καθηγήτρια

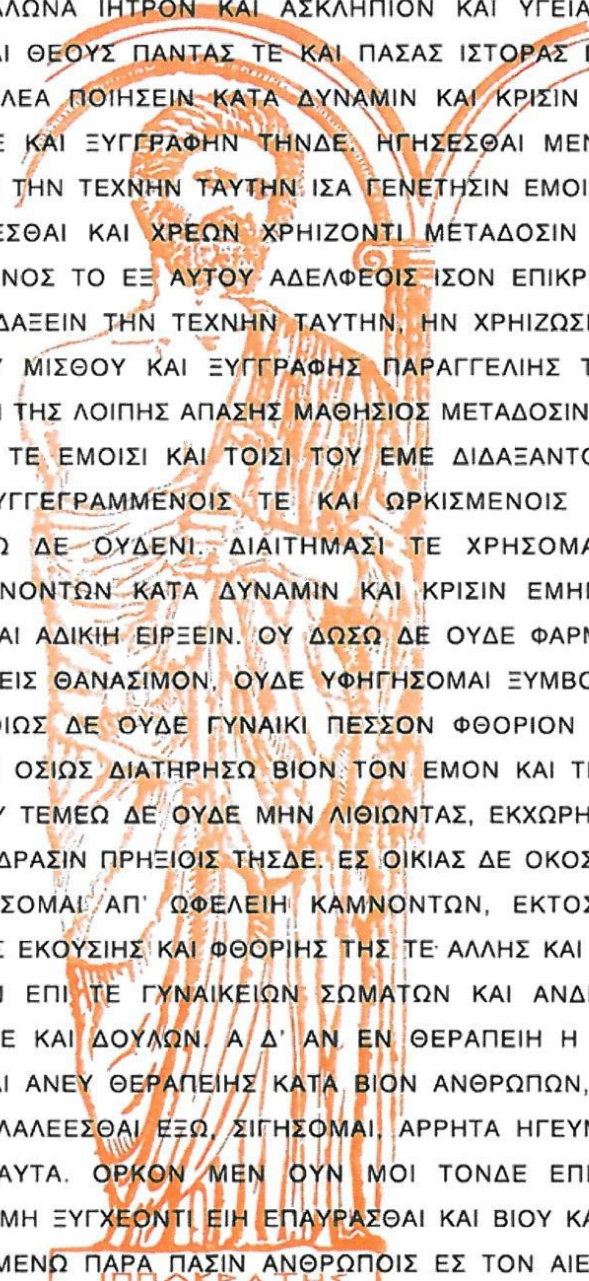
Μιχαήλ Σαμάρκος Αναπληρωτής Καθηγητής

Βασιλική-Αναστασία Σύψα Αναπληρώτρια Καθηγήτρια

Πρόεδρος Ιατρικής Σχολής: Καθηγητής Πέτρος Σφηκάκης

Βαθμός: Άριστα

ΙΠΠΟΚΡΑΤΕΙΟΣ ΟΡΚΟΣ ΚΕΙΜΕΝΟ



ΟΜΝΥΜΙ ΑΠΟΛΛΩΝΑ ΙΗΤΡΟΝ ΚΑΙ ΑΣΚΛΗΠΙΟΝ ΚΑΙ ΥΓΕΙΑΝ ΚΑΙ ΠΑΝΑΚΕΙΑΝ ΚΑΙ ΘΕΟΥΣ ΠΑΝΤΑΣ ΤΕ ΚΑΙ ΠΑΣΑΣ ΙΣΤΟΡΑΣ ΠΟΙΕΥΜΕΝΟΣ, ΕΠΙΤΕΛΕΑ ΠΟΙΗΣΕΙΝ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ ΕΜΗΝ ΟΡΚΟΝ ΤΟΝΔΕ ΚΑΙ ΞΥΓΓΡΑΦΗΝ ΤΗΝΔΕ. ΗΓΗΣΕΣΘΑΙ ΜΕΝ ΤΟΝ ΔΙΔΑΞΑΝΤΑ ΜΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΤΑΥΤΗΝ. ΙΣΑ ΓΕΝΕΤΗΣΙΝ ΕΜΟΙΣΙ, ΚΑΙ ΒΙΟΥ ΚΟΙΝΩΣΕΣΘΑΙ ΚΑΙ ΧΡΕΩΝ ΧΡΗΖΟΝΤΙ ΜΕΤΑΔΟΣΙΝ ΠΟΙΗΣΕΣΘΑΙ ΚΑΙ ΓΕΝΟΣ ΤΟ ΕΞ ΑΥΤΟΥ ΑΔΕΛΦΕΟΙΣ ΙΣΟΝ ΕΠΙΚΡΙΝΕΕΙΝ ΑΡΡΕΣΙ ΚΑΙ ΔΙΔΑΞΕΙΝ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΤΑΥΤΗΝ, ΗΝ ΧΡΗΖΩΣΙ ΜΑΝΘΑΝΕΙΝ, ΑΝΕΥ ΜΙΣΘΟΥ ΚΑΙ ΞΥΓΓΡΑΦΗΣ ΠΑΡΑΓΓΕΛΙΗΣ ΤΕ ΚΑΙ ΑΚΡΟΗΣΙΟΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΛΟΙΠΗΣ ΑΠΑΣΗΣ ΜΑΘΗΣΙΟΣ ΜΕΤΑΔΟΣΙΝ ΠΟΙΗΣΕΣΘΑΙ ΥΙΟΙΣΙ ΤΕ ΕΜΟΙΣΙ ΚΑΙ ΤΟΙΣΙ ΤΟΥ ΕΜΕ ΔΙΔΑΞΑΝΤΟΣ ΚΑΙ ΜΑΘΗΤΑΙΣΙ ΞΥΓΓΕΓΡΑΜΜΕΝΟΙΣ ΤΕ ΚΑΙ ΩΡΚΙΣΜΕΝΟΙΣ ΝΟΜΩ ΙΗΤΡΙΚΩ ΑΛΛΩ ΔΕ ΟΥΔΕΝΙ. ΔΙΑΙΤΗΜΑΣΙ ΤΕ ΧΡΗΣΟΜΑΙ ΕΠ' ΩΦΕΛΕΙΗ ΚΑΜΝΟΝΤΩΝ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ ΕΜΗΝ, ΕΠΙ ΔΗΛΗΣΕΙ ΔΕ ΚΑΙ ΑΔΙΚΗΝ ΕΙΡΞΕΙΝ. ΟΥ ΔΩΣΩ ΔΕ ΟΥΔΕ ΦΑΡΜΑΚΟΝ ΟΥΔΕΝΙ ΑΙΤΗΘΕΙΣ ΘΑΝΑΣΙΜΟΝ. ΟΥΔΕ ΥΦΗΓΗΣΟΜΑΙ ΞΥΜΒΟΥΛΙΗΝ ΤΟΙΗΝΔΕ ΟΜΟΙΩΣ ΔΕ ΟΥΔΕ ΓΥΝΑΙΚΙ ΠΕΣΣΟΝ ΦΘΟΡΙΟΝ ΔΩΣΩ. ΑΓΝΩΣ ΔΕ ΚΑΙ ΟΣΙΩΣ ΔΙΑΤΗΡΗΣΩ ΒΙΟΝ ΤΟΝ ΕΜΟΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΗΝ ΤΗΝ ΕΜΗΝ. ΟΥ ΤΕΜΕΩ ΔΕ ΟΥΔΕ ΜΗΝ ΛΙΘΙΩΝΤΑΣ, ΕΚΧΩΡΗΣΩ ΔΕ ΕΡΓΑΤΗΣΙΝ ΑΝΔΡΑΣΙΝ ΠΡΗΞΙΟΙΣ ΤΗΣΔΕ. ΕΣ ΟΙΚΙΑΣ ΔΕ ΟΚΟΣΑΣ ΑΝ ΕΣΙΩ, ΕΞΕΛΕΥΣΟΜΑΙ ΑΠ' ΩΦΕΛΕΙΗ ΚΑΜΝΟΝΤΩΝ, ΕΚΤΟΣ ΕΩΝ ΠΑΣΗΣ ΑΔΙΚΗΣ ΕΚΟΥΣΙΗΣ ΚΑΙ ΦΘΟΡΙΗΣ ΤΗΣ ΤΕ ΑΛΛΗΣ ΚΑΙ ΑΦΡΟΔΙΣΙΩΝ ΕΡΓΩΝ ΕΠΙ ΤΕ ΓΥΝΑΙΚΕΙΩΝ ΣΩΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΑΝΔΡΕΙΩΝ, ΕΛΕΥΘΕΡΩΝ ΤΕ ΚΑΙ ΔΟΥΛΩΝ. Α Δ' ΑΝ ΕΝ ΘΕΡΑΠΕΙΗ Η ΙΔΩ Η ΑΚΟΥΣΩ, Η ΚΑΙ ΑΝΕΥ ΘΕΡΑΠΕΙΗΣ ΚΑΤΑ ΒΙΟΝ ΑΝΘΡΩΠΩΝ, Α ΜΗ ΧΡΗ ΠΟΤΕ ΕΚΛΑΛΕΕΣΘΑΙ ΕΞΩ. ΣΙΓΗΣΟΜΑΙ. ΑΡΡΗΤΑ ΗΓΕΥΜΕΝΟΣ ΕΙΝΑΙ ΤΑ ΤΟΙΑΥΤΑ. ΟΡΚΟΝ ΜΕΝ ΟΥΝ ΜΟΙ ΤΟΝΔΕ ΕΠΙΤΕΛΕΑ ΠΟΙΕΟΝΤΙ ΚΑΙ ΜΗ ΞΥΓΧΕΟΝΤΙ ΕΙΗ ΕΠΑΥΡΑΣΘΑΙ ΚΑΙ ΒΙΟΥ ΚΑΙ ΤΕΧΝΗΣ, ΔΟΞΑΖΟΜΕΝΩ ΠΑΡΑ ΠΑΣΙΝ ΑΝΘΡΩΠΟΙΣ ΕΣ ΤΟΝ ΑΙΕΙ ΧΡΟΝΟΝ ΠΑΡΑΒΑΙΝΟΝΤΙ ΔΕ ΚΑΙ ΕΠΙΟΡΚΕΟΝΤΙ, ΤΑΛΑΝΤΙΑ ΤΟΥΤΕΩΝ.

ΙΠΠΟΚΡΑΤΕΙΟΣ ΟΡΚΟΣ

ΝΕΑ ΕΛΛΗΝΙΚΗ

Ορκίζομαι στον Απόλλωνα τον Ιατρό και στον Ασκληπιό και στην Υγεία και στην Πανάκεια και σε όλους τους Θεούς επικαλούμενος τη μαρτυρία τους, να τηρήσω πιστά κατά τη δύναμη και την κρίση μου αυτόν τον όρκο και το συμβόλαιό μου αυτό. Να θεωρώ αυτόν που μου δίδαξε αυτήν την τέχνη ίσο με τους γονείς μου και να μοιραστώ μαζί του τα υπάρχοντά μου και τα χρήματά μου αν έχει ανάγκη φροντίδας. Να θεωρώ τους απογόνους του ίσους με τα αδέρφια μου και να τους διδάξω την τέχνη αυτή αν θέλουν να τη μάθουν, χωρίς αμοιβή και συμβόλαιο και να μεταδώσω με παραγγελιές, οδηγίες και συμβουλές όλη την υπόλοιπη γνώση μου και στα παιδιά μου και στα παιδιά εκείνου που με δίδαξε και στους άλλους μαθητές που έχουν κάνει γραπτή συμφωνία μαζί μου και σε αυτούς που έχουν ορκιστεί στον ιατρικό νόμο και σε κανέναν άλλο και να θεραπεύω τους πάσχοντες κατά τη δύναμή μου και κατά την κρίση μου χωρίς ποτέ, εκουσίως, να τους βλάψω ή να τους αδικήσω. Και να μη δώσω ποτέ σε κανένα, έστω και αν μου το ζητήσει, θανατηφόρο φάρμακο, ούτε να δώσω ποτέ τέτοια συμβουλή, ομοίως, να μη δώσω ποτέ σε γυναίκα φάρμακο για να αποβάλει. Να διατηρήσω δε τη ζωή μου καθαρή και αγνή, και να μη χειρουργήσω πάσχοντες από λίθους, αλλά να αφήσω την πράξη αυτή για τους ειδικούς και σε όποια σπίτια κι αν μπω, να μπω για την ωφέλεια των πασχόντων αποφεύγοντας κάθε εκούσια αδικία και βλάβη και κάθε γενετήσια πράξη και με γυναίκες και με άνδρες, ελεύθερους και δούλους. Και ό,τι δω ή ακούσω κατά την άσκηση του επαγγέλματός μου, ή και εκτός, για τη ζωή των ανθρώπων, που δεν πρέπει ποτέ να κοινοποιηθεί, να σιωπήσω και να το κρατήσω μυστικό. Αν τον όρκο μου αυτό τηρήσω πιστά και δεν τον αθετήσω, είτε να απολαύσω για πάντα την εκτίμηση όλων των ανθρώπων για τη ζωή μου και για την τέχνη μου, αν όμως παραβώ και αθετήσω τον όρκο μου να υποστώ τα αντίθετα από αυτά.

Δεν αρκεί να ονειροπολούμε με τους στίχους.

Είναι λίγο.

(...)

Εάν η ποίηση παρέχει μια διαβεβαίωση

*και δη στους καιρούς τους *durftiger* είναι ακριβώς αυτή:*

ότι η μοίρα μας παρ' όλ' αυτά βρίσκεται στα χέρια μας.

.....

Οδυσσέας Ελύτης

Απονομή βραβείου Νομπέλ Λογοτεχνίας

Στοκχόλμη, 1979

Αφιέρωση

Στους γονείς μου

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θερμές ευχαριστίες θα ήθελα να απευθύνω σε όλους εκείνους που συνέβαλαν στην εκπόνηση της διατριβής μου, χωρίς τους οποίους η ολοκλήρωσή της θα ήταν αδύνατη. Πρωτίστως, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στα μέλη της τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής, Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Δημήτριο Παρασκευή, Καθηγητή κ. Γεώργιο Δαΐκο και Επίκουρη Καθηγήτρια κα. Μήνα Ψυχογιού, για την άποψη συνεργασία και συνεννόηση. Επιπρόσθετα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής, Καθηγήτρια κα. Παγώνα Λάγιου, Καθηγήτρια κα. Ελένη Γκόγκα, Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Μιχαήλ Σαμάρκο και Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κα. Βασιλική-Αναστασία Σύψα, για την τιμή που μου έκαναν να συμμετάσχουν στην επιτροπή διαθέτοντας μέρος από τον πολύτιμο χρόνο τους.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Καθηγητή κ. Γεώργιο Δαΐκο, πρόην Διευθυντή της Α' Παθολογικής Κλινικής, και την Καθηγήτρια κα. Ελένη Γκόγκα, Διευθύντρια της Α' Παθολογικής Κλινικής, που μου έδωσαν τη δυνατότητα να εκπονήσω τη διατριβή μου στην Κλινική τους, καθώς και για τα εποικοδομητικά τους σχόλια. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την Καθηγήτρια κα. Παγώνα Λάγιου, Διευθύντρια του Εργαστηρίου Υγιεινής, Επιδημιολογίας και Ιατρικής Στατιστικής, για τις πολύτιμες υποδείξεις και τη συνεχή υποστήριξή της.

Η παρούσα διατριβή πραγματοποιήθηκε υπό την επίβλεψη, τη συνεχή καθοδήγηση και την ανεκτίμητη συμβολή του Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Δημήτριου Παρασκευή, στον οποίο οφείλω ιδιαίτερες ευχαριστίες για τις προσπάθειες που κατέβαλε για να με εισαγάγει στον επιστημονικό τρόπο σκέψης, αλλά, κυρίως, για την αμέριστη υποστήριξη και εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπό μου σε όλα τα στάδια της ακαδημαϊκής μου πορείας και της συνεργασίας μας.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερώς την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κα. Βασιλική-Αναστασία Σύψα και την Επίκουρη Καθηγήτρια κα. Μήνα Ψυχογιού για την ουσιαστική συμβολή τους, καθώς και για τη στήριξη και την καθοδήγησή τους καθ' όλη τη διάρκεια της συνεργασίας μας.

Επίσης, ευχαριστώ θερμά τον Καθηγητή κ. Άγγελο Χατζάκη, με τον οποίο είχα τη χαρά και την τιμή να συνεργάζομαι αυτά τα χρόνια, για την υποστήριξη, τις συμβουλές, τις εύστοχες παρατηρήσεις και, γενικότερα, για τη συμβολή του στη διατριβή μου.

Οφείλω επίσης να ευχαριστήσω θερμά τον Επίκουρο Καθηγητή της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Κύπρου κ. Γεώργιο Νικολόπουλο και τον Dr. Samuel R. Friedman, Διευθυντή του Ινστιτούτου Έρευνας Λοιμωδών Νοσημάτων (Institute of Infectious Disease Research – IIDR) των Εθνικών Ινστιτούτων Ανάπτυξης και Έρευνας (National Development and Research Institutes – NDRI) των Η.Π.Α., για την άψογη συνεργασία και την υποστήριξή τους στα πλαίσια του προγράμματος «TRIP».

Ο ακαδημαϊκός κύκλος των ευχαριστιών μου δε θα μπορούσε να κλείσει χωρίς να ευχαριστήσω όλο το προσωπικό του Εργαστηρίου Υγιεινής, Επιδημιολογίας και Ιατρικής Στατιστικής για τη δημιουργία φιλικής ατμόσφαιρας και τις εποικοδομητικές συζητήσεις καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της διατριβής μου, καθώς και την εταιρεία Gilead Sciences για την υποστήριξη ορισμένων εκ των μελετών που πραγματοποιήθηκαν στα πλαίσια αυτής.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω από καρδιάς τους αγαπημένους μου ανθρώπους, που στάθηκαν δίπλα μου με υπομονή και κατανόηση και με στήριξαν σε όλη τη διάρκεια της προσπάθειάς μου. Ένα βαθύ και θερμό «ευχαριστώ» οφείλω στους γονείς μου, Χρήστο και Κωνσταντίνα, για την αγάπη, την ηθική υποστήριξη και την αμέριστη συμπαράστασή τους όλο αυτό το διάστημα.

Αθήνα 2019,

Ευαγγελία-Γεωργία Κωστάκη

ΣΥΝΤΟΜΟ ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

Όνοματεπώνυμο: *Ευαγγελία-Γεωργία Κωστάκη*
Όνομα πατρός: *Χρήστος*
Ημερομηνία γέννησης: *16 Ιανουαρίου 1985*
Τόπος γέννησης: *Αθήνα*
E-mail: ekostakh@med.uoa.gr
Scopus ID: *56463035500*
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-3346-0930>
Research Gate Profile: http://www.researchgate.net/profile/Evangelia_Kostaki
LinkedIn Profile: <https://www.linkedin.com/in/evangelia-georgia-kostaki-44b93460/>

Διεύθυνση Εργασίας: *Εργαστήριο Υγιεινής, Επιδημιολογίας και Ιατρικής Στατιστικής, Ιατρική Σχολή, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών (Μικράς Ασίας 75, Τ.Κ. 115 27, Γουδή, τηλ. 2107462075)*

ΣΠΟΥΔΕΣ

- *Φεβ. 2016 - σήμερα:* Υποψήφια για διδακτορικό δίπλωμα (Ph.D.c.) στην Επιδημιολογία Ιογενών Λοιμώξεων, Α΄ Παθολογική Κλινική, Τμήμα Ιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών
- *Ιαν. 2015:* Μεταπτυχιακό δίπλωμα ειδίκευσης (M.Sc.) στη Βιοστατιστική, Τμήματα Ιατρικής και Μαθηματικών, Σχολές Επιστημών Υγείας και Θετικών Επιστημών, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών
- *Δεκ. 2012:* Προπτυχιακός τίτλος σπουδών (B.Sc.) στα Μαθηματικά, Τμήμα Μαθηματικών, Σχολή Θετικών Επιστημών, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

ΞΕΝΕΣ ΓΛΩΣΣΕΣ

- *Αγγλικά:* Certificate of Proficiency in English (ECPE), University of Michigan-C2

ΕΡΓΑΣΙΑΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

- *Νοε. 2015 - σήμερα:* Επιστημονικός συνεργάτης, Εργαστήριο Υγιεινής, Επιδημιολογίας και Ιατρικής Στατιστικής, Τμήμα Ιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών
- *Απρ. 2015 - Απρ. 2018:* Επιστημονικός συνεργάτης στην Ελληνική Επιστημονική Εταιρεία Έρευνας AIDS και Σεξουαλικά Μεταδιδόμενων Νοσημάτων με έδρα την Αθήνα

ΔΙΔΑΚΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

- Συμμετοχή στη διδασκαλία διδακτικών ενοτήτων και πρακτικών ασκήσεων των μαθημάτων «Μοριακή Επιδημιολογία» και «Συλλογή, καταχώρηση και αξιοποίηση βιοϊατρικών δεδομένων» του μεταπτυχιακού προγράμματος Επιδημιολογία - Μεθοδολογία Έρευνας στις Βιοϊατρικές Επιστήμες, την Κλινική Πράξη και τη Δημόσια Υγεία της Ιατρικής Σχολής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών (*Μάρτιος 2020 - Μάιος 2020*)
- Συμμετοχή στη διδασκαλία διδακτικών ενοτήτων και πρακτικών ασκήσεων των μαθημάτων «Μοριακή Επιδημιολογία: Βασικές αρχές μοριακής εξέλιξης και φυλογενετικής ανάλυσης» (*Ιούνιος 2015, Μάιος 2017 - Ιούλιος 2017*) και «Γενετική & Μοριακή Επιδημιολογία» (*Νοέμβριος 2019*) του μεταπτυχιακού προγράμματος Βιοστατιστικής των Τμημάτων Ιατρικής και Μαθηματικών του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών

ΕΠΙΒΛΕΨΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΕΡΓΑΣΙΩΝ

- Συμμετοχή στην επίβλεψη 9 διπλωματικών εργασιών μεταπτυχιακών φοιτητών και μίας πτυχιακής εργασίας προπτυχιακού φοιτητή (όλες ολοκληρώθηκαν με επιτυχία)

ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΣΕ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΑ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΑ

- Συμμετοχή ως ερευνητής σε 10 χρηματοδοτούμενα εθνικά & διεθνή προγράμματα

ΑΛΛΕΣ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΕΣ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΕΣ

- Μέλος της Επιστημονικής Επιτροπής της 7ης Πανελλήνιας Συνάντησης AIDS & Ηπατίτιδες (Αθήνα, 19 - 21 Σεπτεμβρίου 2019)
- Συμμετοχή με πρόσκληση από την επιστημονική εταιρεία «European AIDS Clinical Society (EACS)» σε Πανευρωπαϊκό πρόγραμμα για την ανασκόπηση των εθνικών κατευθυντήριων οδηγιών (Project title: “HIV Indicator Condition Guidelines Review”) (Μάιος 2019 - σήμερα)
- Συμβουλευτική υποστήριξη περιλήψεων για τα διεθνή συνέδρια «23rd International AIDS Conference (AIDS 2020)», «10th IAS Conference on HIV Science (IAS 2019)» και «22nd International AIDS Conference (AIDS 2018)»
- Αξιολόγηση άρθρων για τα επιστημονικά περιοδικά «Frontiers in Microbiology» (Σεπ. 2019 - σήμερα), «PLOS ONE» (Ιουλ. 2018 - σήμερα) και «Scientific Reports-Nature» (Αυγ. 2017 - σήμερα)
- Μέλος της Ελληνικής Εταιρείας Μελέτης Ήπατος (ΕΕΜΗ) (Ιουλ. 2018 - σήμερα) και της Ελληνικής Εταιρείας Μελέτης και Αντιμετώπισης του AIDS (ΕΕΜΑΑ) (Φεβ. 2018 - σήμερα)
- Μέλος του επιστημονικού κέντρου «European Virus Bioinformatics Center (EVBC)» (Μαρ. 2018 - σήμερα)
- Μέλος των επιστημονικών εταιρειών «European AIDS Clinical Society (EACS)» (Νοε. 2017 - σήμερα), «International AIDS Society (IAS)» (Φεβ. 2017 - σήμερα) και «European Society for Antiviral Resistance (ESAR)» (Ιουν. 2016 - σήμερα)

ΥΠΟΤΡΟΦΙΕΣ

- Υποτροφία νέου ερευνητή στο πλαίσιο της Πράξης «Υποστήριξη ερευνητών με έμφαση στους νέους ερευνητές - Β΄ κύκλος» του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού, Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση» (ΕΣΠΑ 2014-2020). Με βάση τη βαθμολογία που έλαβε, η πρόταση κατατάχθηκε 54η σε σύνολο 398 που υποβλήθηκαν στο πεδίο «Ιατρικές και Βιολογικές Επιστήμες» και 4η στις 14 προτάσεις από το Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών που προκρίθηκαν στο πεδίο αυτό (Μάιος 2019).

ΒΡΑΒΕΙΑ-ΤΙΜΗΤΙΚΕΣ ΔΙΑΚΡΙΣΕΙΣ

- 23 βραβεία (προφορικών και αναρτημένων ανακοινώσεων) - τιμητικές διακρίσεις σε διεθνή και εθνικά συνέδρια

ΥΠΟΤΡΟΦΙΕΣ ΓΙΑ ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

1. New Investigator Scholarship για συμμετοχή στο συνέδριο «2020 Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (CROI)», Βοστώνη, Η.Π.Α. (*Μαρ. 2020*)
2. Conference participation grant award για το συνέδριο «Translational research in viral hepatitis: Addressing the gaps for cure (EASL Viral Hepatitis 2020)», Αθήνα, Ελλάδα (*Ιαν. 2020*)
3. Early-career travel grand από το περιοδικό eLife για συμμετοχή στο συνέδριο «European Scientific Conference on Applied Infectious Disease Epidemiology 2019 (ESCAIDE 2019)», Στοκχόλμη, Σουηδία (*Νοε. 2019*)
4. Conference participation grant award για το συνέδριο «17th European AIDS Conference (EACS 2019)», Βασιλεία, Ελβετία (*Νοε. 2019*)
5. Τιμητική διάκριση - Ενίσχυση νέου ερευνητή από την Ελληνική Εταιρεία Μελέτης Ήπατος (ΕΕΜΗ) για συμμετοχή στο συνέδριο «International Liver Congress 2019 (ILC 2019)», Βιέννη, Αυστρία (*Απρ. 2019*)
6. Conference participation grant award για το συνέδριο «HIV Drug Therapy Glasgow 2018 (HIV Glasgow 2018)», Γλασκώβη, Ηνωμένο Βασίλειο (*Οκτ. 2018*)
7. Conference participation grant award για το συνέδριο «16th European Meeting on HIV & Hepatitis - Treatment Strategies & Antiviral Drug Resistance», Ρώμη, Ιταλία (*Μάιος 2018*)
8. Conference participation grant award για το συνέδριο «International Symposium on HIV and Emerging Infectious Diseases 2018 (ISHEID 2018)», Μασσαλία, Γαλλία (*Μάιος 2018*)
9. Συμμετοχή με πρόσκληση στο συνέδριο «European AIDS Clinical Society Young Investigators Conference 2018 (YING 2018)», Βρυξέλλες, Βέλγιο (*Απρ. 2018*)
10. Conference participation grant award για το συνέδριο «16th European AIDS Conference (EACS 2017)», Μιλάνο, Ιταλία (*Οκτ. 2017*)

11. Conference participation grant award για το συνέδριο «15th European Meeting on HIV & Hepatitis - Treatment Strategies & Antiviral Drug Resistance», Ρώμη, Ιταλία (Ιουν. 2017)
12. Conference participation grant award για το συνέδριο «14th European Meeting on HIV & Hepatitis - Treatment Strategies & Antiviral Drug Resistance», Ρώμη, Ιταλία (Μάιος 2016)

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΤΟΝ ΕΝΤΥΠΟ ΤΥΠΟ

1. Αύγ.2018: Δημοσίευση άρθρου στην εφημερίδα «Η βραδυνή» με τίτλο: «Τα νέα δεδομένα για την προέλευση και χαρτογράφηση του ιού της ηπατίτιδας Β» (Ημερ/νια έκδοσης: 18-19/08/2018 - Αριθμός φύλλου: 1.080 - σελίδα: 26)
2. Αύγ. 2018: Δημοσίευση άρθρου στην εφημερίδα «Η ΚΑΘΗΜΕΡΙΝΗ» με τίτλο: «Έλληνες «χαρτογραφούν» την ηπατίτιδα Β» (Ημερ/νια έκδοσης: 08/08/2018 - Αριθμός φύλλου: 29.893 - σελίδα: 7) (<http://www.kathimerini.gr/978938/article/epikairothta/ellada/ellhnes-xartografoyn-thn-hpatitida-v>)
3. Σεπ. 2017: Δημοσίευση άρθρου στην εφημερίδα «Η ΚΑΘΗΜΕΡΙΝΗ» με τίτλο: «Η ηπατίτιδα Β, «εργαλείο» για τη γενετική αρχαιολογία» (Ημερ/νια έκδοσης: 15/09/2017 - Αριθμός φύλλου: 29.635 - σελίδα: 7) (<http://www.kathimerini.gr/926705/article/yegeia/yegeia-epikairothta/h-hpatitida-v-ergaleio-gia-th-genetikh-arxaiologia?platform=hootsuite>)

ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΣΕ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΑ ΣΥΝΕΔΡΙΑ, ΣΕΜΙΝΑΡΙΑ ΚΑΙ WORKSHOPS

- 53 παρουσιάσεις (προφορικές και αναρτημένες ανακοινώσεις) σε διεθνή συνέδρια
- 53 παρουσιάσεις (διαλέξεις, εισηγήσεις κατόπιν πρόσκλησης, προφορικές και αναρτημένες ανακοινώσεις) σε εθνικά συνέδρια
- Συμμετοχή σε εκπαιδευτικό εισαγωγικό σεμινάριο στη Βιοστατιστική, Αθήνα, Ελλάδα (Διοργάνωση: MYO Health Policy Advisors Ltd εκ μέρους της φαρμακευτικής εταιρείας Novo Nordisk ΕΛΛΑΣ Ε.Π.Ε.) (Ιουλ. 2019)

- Συμμετοχή στο διεθνές workshop με τίτλο «Taming the BEAST workshop», Oberägeri, Ελβετία (Ιουν. 2018)

ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΣΕ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ-ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

1. Serdari D, Kostaki E-G, Paraskevis D, Stamatakis A, Kapli P. Automated, phylogeny-based genotype delimitation of the Hepatitis Viruses HBV and HCV. *PeerJ*. 2019 Oct 25;7:e7754. doi: 10.7717/peerj.7754
2. Kostaki EG, Flampouris A, Karamitros T, Chueca N, Alvarez M, Casas P, Alejos B, Hatzakis A, Garcia F, Paraskevis D and CoRIS. Spatiotemporal characteristics of the largest HIV-1 CRF02_AG outbreak in Spain: evidence for onward transmissions. *Front Microbiol*. 2019 Mar 11;10:370. doi: 10.3389/fmicb.2019.00370
3. Kostaki EG, Frampton D, Paraskevis D, Pantavou K, Ferns B, Raffle J, Grant P, Kozlakidis Z, Hadjickou A, Pavlitina E, Williams LD, Hatzakis A, Friedman SR, Nastouli E, Nikolopoulos GK. Near full-length genomic sequencing and molecular analysis of HIV-infected individuals in a network-based intervention (TRIP) in Athens, Greece: Evidence that transmissions occur more frequently from those with high HIV-RNA. *Curr HIV Res*. 2019 Jan 30. doi: 10.2174/1570162X17666190130120757
4. Williams LD, Korobchuk A, Pavlitina E, Nikolopoulos GK, Skaathun B, Schneider J, Kostaki EG, Smyrnov P, Vasylyeva TI, Psychogiou M, Paraskevis D, Morgan E, Hadjickou A, Downing Jr MJ, Hatzakis A, Friedman SR. Experiences of stigma and support reported by participants in a network intervention to reduce HIV transmission in Athens, Greece; Odessa, Ukraine, and Chicago, Illinois. *AIDS Behav*. 2019 Jan 24. doi: 10.1007/s10461-019-02402-1
5. Kramvis A, Kostaki EG, Hatzakis A, Paraskevis D. Immunomodulatory Function of HBeAg Related to Short-sighted Evolution, Transmissibility and Clinical Manifestation of Hepatitis B Virus. *Front Microbiol*. 2018 Oct 24;9:2521. doi: 10.3389/fmicb.2018.02521
6. Williams LD, Kostaki EG, Pavlitina E, Paraskevis D, Hatzakis A, Schneider J, Smyrnov P, Hadjickou A, Nikolopoulos GK, Psychogiou M, Friedman SR. Pockets of HIV Non-infection Within Highly-Infected Risk Networks in Athens, Greece. *Front Microbiol*. 2018 Aug 24;9:1825. doi: 10.3389/fmicb.2018.01825

7. Kostaki EG, Karamitros T, Stefanou G, Mamais I, Angelis K, Hatzakis A, Paraskevis D. Unravelling the history of hepatitis B virus genotypes A and D infection using a full-genome phylogenetic and phylogeographic approach. *Elife*. 2018 Aug 7;7. doi: 10.7554/eLife.36709
8. Friedman SR, Williams L, Young AM, Teubl J, Paraskevis D, Kostaki E, Latkin C, German D, Mateu-Gelabert P, Guarino H, Vasylyeva TI, Skaathun B, Schneider J, Korobchuk A, Smyrnov P, Nikolopoulos G. Network Research Experiences in New York and Eastern Europe: Lessons for the Southern US in Understanding HIV Transmission Dynamics. *Curr HIV/AIDS Rep*. 2018 Jun;15(3):283-292. doi: 10.1007/s11904-018-0403-2
9. Kostaki EG, Nikolopoulos GK, Pavlitina E, Williams L, Magiorkinis G, Schneider J, Skaathun B, Morgan E, Psychogiou M, Daikos GL, Sypsa V, Smyrnov P, Korobchuk A, Malliori M, Hatzakis A, Friedman SR, Paraskevis D. Molecular analysis of HIV-1 infected individuals in a network-based intervention (TRIP): Phylogenetics identify HIV-1 infected individuals with social links. *J Infect Dis*. 2018 Apr 24. doi: 10.1093/infdis/jiy239
10. Kostrikis LG, Hezka J, Stylianou DC, Kostaki E, Andreou M, Kousiappa I, Paraskevis D, Demetriades I. HIV-1 transmission networks across Cyprus (2010-2012). *PLoS One*. 2018 Apr 23;13(4):e0195660. doi: 10.1371/journal.pone.0195660
11. Paraskevis D, Nikolopoulos GK, Sypsa V, Psychogiou M, Pantavou K, Kostaki E, Karamitros T, Paraskeva D, Schneider J, Malliori M, Friedman SR, Des Jarlais DC, Daikos GL, Hatzakis A. Molecular investigation of HIV-1 cross-group transmissions during an outbreak among people who inject drugs (2011-2014) in Athens, Greece. *Infect Genet Evol*. 2018 Apr 10;62:11-16. doi: 10.1016/j.meegid.2018.04.010
12. Kostaki EG, Karamitros T, Bobkova M, Oikonomopoulou M, Magiorkinis G, Garcia F, Hatzakis A, Paraskevis D. Spatiotemporal characteristics of the HIV-1 CRF02_AG/CRF63_02A1 epidemic in Russia and Central Asia. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2018 Apr 5. doi: 10.1089/AID.2017.0233
13. Kostaki E, Magiorkinis G, Psychogiou M, Flampouris A, Iliopoulos P, Papachristou E, Daikos GL, Bonovas S, Otelea D, Friedman SR, Hatzakis A, Paraskevis D. Detailed molecular surveillance of the HIV-1 outbreak among people who inject drugs (PWID) in Athens during a period of four years. *Curr HIV Res*. 2017;15(6):396-404. doi: 10.2174/1570162X15666171120104048

14. Paraskevis D*, Kostaki E*, Gargalianos P, Xylomenos G, Lazanas M, Chini M, Skoutelis A, Papastamopoulos V, Paraskeva D, Antoniadou A, Papadopoulos A, Psychogiou M, Daikos GL, Chrysos G, Paparizos V, Kourkounti S, Sambatakou H, Sipsas NV, Lada M, Panagopoulos P, Maltezos E, Drimis S, Hatzakis A. Transmission dynamics of HIV-1 drug resistance among treatment-naïve individuals in Greece: The added value of molecular epidemiology to public health. *Genes (Basel)*. 2017 Nov 13;8(11). pii: E322. doi: 10.3390/genes8110322 (**contributed equally to this work*)
15. Paraskevis D*, Kostaki E*, Nikolopoulos GK, Sypsa V, Psychogiou M, Del Amo J, Hodges-Mameletzis I, Paraskeva D, Skoutelis A, Malliori M, Williams L, Friedman SR, Daikos GL, Hatzakis A. Molecular tracing of the geographical origin of Human Immunodeficiency Virus Type 1 infection and patterns of epidemic spread among migrants who inject drugs in Athens. *Clin Infect Dis*. 2017 Nov 29;65(12):2078-2084. doi: 10.1093/cid/cix717 (**contributed equally to this work*)
16. Paraskevis D, Kostaki E, Magiorkinis G, Gargalianos P, Xylomenos G, Magiorkinis E, Lazanas M, Chini M, Nikolopoulos G, Skoutelis A, Papastamopoulos V, Antoniadou A, Papadopoulos A, Psychogiou M, Daikos GL, Oikonomopoulou M, Zavitsanou A, Chrysos G, Paparizos V, Kourkounti S, Sambatakou H, Sipsas NV, Lada M, Panagopoulos P, Maltezos E, Drimis S, Hatzakis A. Prevalence of drug resistance among HIV-1 treatment-naïve patients in Greece during 2003-2015: Transmitted drug resistance is due to onward transmissions. *Infect Genet Evol*. 2017 Oct;54:183-191. doi: 10.1016/j.meegid.2017.07.003
17. Beloukas A, Psarris A, Giannelou P, Kostaki E, Hatzakis A, Paraskevis D. Molecular epidemiology of HIV-1 infection in Europe: An overview. *Infect Genet Evol*. 2016 Dec;46:180-189. doi: 10.1016/j.meegid.2016.06.033
18. Nikolopoulos GK, Kostaki EG, Paraskevis D. Overview of HIV molecular epidemiology among people who inject drugs in Europe and Asia. *Infect Genet Evol*. 2016 Dec;46:256-268. doi: 10.1016/j.meegid.2016.06.017
19. Paraskevis D, Angelis K, Magiorkinis G, Kostaki E, Ho SYW, Hatzakis A. Dating the origin of hepatitis B virus reveals higher substitution rate and adaptation on the branch leading to F/H genotypes. *Mol Phylogenet Evol*. 2015 Dec;93:44-54. doi: 10.1016/j.ympev.2015.07.010

20. Paraskevis D, Kostaki E, Beloukas A, Cañizares A, Aguilera A, Rodríguez J, Grandal M, Pernas B, Castro-Iglesias A, Mena A, Pedreira JD, Poveda E. Molecular characterization of HIV-1 infection in Northwest Spain (2009-2013): Investigation of the subtype F outbreak. *Infect Genet Evol.* 2015 Mar;30:96-101. doi: 10.1016/j.meegid.2014.12.012

ΠΟΛΥΣΥΓΓΡΑΦΙΚΑ ΒΙΒΛΙΑ

1. Συμμετοχή στη συγγραφή κεφαλαίου με τίτλο «Classification, Genetic Diversity and Global Distribution of Hepatitis C Virus (HCV) Genotypes and Subtypes», D. Paraskevis, E.-G. Kostaki, A. Kramvis, G. Magiorkinis. *Epidemiology, Prevention, Management and Elimination of Hepatitis C - Volume I Epidemiology and Prevention*. On behalf of Springer edited by A. Hatzakis, 2019
2. Συμμετοχή στη συγγραφή κεφαλαίου με τίτλο «Χρονολογώντας την προέλευση και τη διασπορά της μόλυνσης από τον ιό της ηπατίτιδας Β στους ανθρώπους και τα πρωτεύοντα», Δ. Παρασκευής, E. Κωστάκη, Α. Χατζάκης, σελίδες 657-669. Αφιερωματικός τόμος προς τιμήν του κ. Εμμανουήλ Καναβάκη, Ομότιμου Καθηγητή - Διευθυντή του Εργαστηρίου Ιατρικής Γενετικής, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Ιατρική Σχολή, Χωρέμειο Ερευνητικό Εργαστήριο, Νοσοκομείο Παίδων "Αγία Σοφία", BROKEN HILL PUBLISHERS LTD, 2016

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

	Σελίδα
Εισαγωγή - Σκοπός Διδακτορικής Διατριβής	29
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	35
Κεφάλαιο 1ο Εισαγωγή στους Ιούς	37
Κεφάλαιο 2ο Εισαγωγή στους Ρετροϊούς	43
Κεφάλαιο 3ο Εισαγωγή στον HIV	47
3.1 Δομή του HIV	49
3.2 Κύκλος ζωής του HIV	52
3.3 Γενετική ετερογένεια και ταξινόμηση του HIV	53
3.4 Προέλευση και χρονικό πλαίσιο του HIV	56
3.5 Θεραπεία του HIV	60
Κεφάλαιο 4ο Επιδημιολογικά Δεδομένα της HIV-1 Λοίμωξης	63
4.1 Υφήλιος	65
4.1.1 Επιδημιολογία της HIV-1 λοίμωξης ανά τον κόσμο	65
4.1.2 Μοριακή επιδημιολογία της HIV-1 λοίμωξης ανά τον κόσμο	70
4.1.3 Επιπολασμός των HIV-1 υπότυπων ανά τον κόσμο	71
4.2 Ευρώπη	75
4.2.1 Επιδημιολογία της HIV-1 λοίμωξης στην Ευρώπη	75
4.2.2 Μοριακή επιδημιολογία της HIV-1 λοίμωξης στην Ευρώπη	77
4.2.3 Επιπολασμός των HIV-1 υπότυπων στην Ευρώπη	78
4.2.4 Προέλευση των μη Β HIV-1 υπότυπων και CRFs στην Ευρώπη	82
4.2.5 Επιπολασμός των HIV-1 υπότυπων σε μετανάστες στην Ευρώπη	82
4.2.6 Επιπολασμός των HIV-1 υπότυπων σε XEN στην Ευρώπη και την Ασία	83
4.2.6.1 Επιδημιολογία της HIV-1 λοίμωξης στους XEN	84
4.2.6.2 Μοριακή επιδημιολογία της HIV-1 λοίμωξης στους XEN	85
4.2.6.3 Χώρες πρώην Ένωσης Σοβιετικών Σοσιαλιστικών Δημοκρατιών (Ε.Σ.Σ.Δ.)	85
4.2.6.4 Χώρες της Δυτικής και Κεντρικής Ευρώπης	86
4.2.6.5 Χώρες της Ασίας	89
4.2.6.5.1 Χρυσό Τρίγωνο (Golden Triangle)	89
4.2.6.5.2 Χρυσή Ημισέληνος (Golden Crescent)	90
4.2.6.5.3 Άλλες χώρες της Νότιας και Νοτιοανατολικής Ασίας	91

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

	Σελίδα
4.3 Ελλάδα	92
4.3.1 Επιδημιολογία της HIV-1 λοίμωξης στην Ελλάδα	92
4.3.2 Μοριακή επιδημιολογία της HIV-1 λοίμωξης στην Ελλάδα	96
Κεφάλαιο 5ο Εισαγωγή στις μεθόδους μοριακής επιδημιολογίας	101
5.1 Φυλογενετική ανάλυση	107
5.2 Φυλοδυναμική ανάλυση	115
5.3 Φυλογεωγραφική ανάλυση	120
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	125
Κεφάλαιο 6ο Διαχρονική εκτίμηση του επιπολασμού των HIV-1 υπότυπων και ανασυνδυασμένων τύπων στην Ελληνική επικράτεια μεταξύ 1999 και 2015	127
6.1 Εισαγωγή-Σκοπός	129
6.2 Υλικό-Μέθοδοι	130
6.2.1 Βάση δεδομένων HIV-1 αλληλουχιών	130
6.2.2 Στοίχιση και διόρθωση HIV-1 αλληλουχιών	131
6.2.3 Υποτύπωση HIV-1 αλληλουχιών	131
6.3 Αποτελέσματα	132
6.3.1 Δημογραφικά χαρακτηριστικά του πληθυσμού	132
6.3.2 Αποτελέσματα HIV-1 υποτύπωσης	132
6.3.3 Διαχρονική εκτίμηση του επιπολασμού των HIV-1 υπότυπων	133
6.3.4 Χαρακτηριστικά των PLHIV που είχαν μολυνθεί με διαφορετικά HIV-1 στελέχη	135
6.4 Συμπεράσματα	135
Κεφάλαιο 7ο Μελέτη διασποράς των HIV-1 υπότυπων A1 και B στην Ελληνική επικράτεια: Εκτίμηση σημαντικών τοπικών δικτύων μετάδοσης και χαρακτηρισμός τους	149
7.1 Εισαγωγή-Σκοπός	151
7.2 Υλικό-Μέθοδοι	152
7.2.1 Διερεύνηση τρόπου διασποράς υπότυπων A1 και B	152
7.2.2 Εκτίμηση σημαντικών τοπικών δικτύων μετάδοσης υπότυπων A1 και B	153
7.2.3 Εκτίμηση παραγόντων που σχετίζονται με τοπική διασπορά υπότυπων A1 και B	154
7.3 Αποτελέσματα	154
7.3.1 Πρότυπα διασποράς και τοπικά δίκτυα μετάδοσης υπότυπων A1 και B	154
7.3.2 Χαρακτηριστικά πληθυσμού που σχετίζονται με τοπική διασπορά των υπότυπων A1 και B	156

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

	Σελίδα
7.4 Συμπεράσματα	156
Κεφάλαιο 8ο Μοριακή επιτήρηση της επιδημίας του HIV-1 στους χρήστες ενδοφλεβίων ναρκωτικών στην Αθήνα το χρονικό διάστημα 2011-2014	165
8.1 Εισαγωγή-Σκοπός	167
8.2 Υλικό-Μέθοδοι	168
8.2.1 Ταυτοποίηση σημαντικότερων δικτύων διασποράς XEN	168
8.2.2 Φυλοδυναμική ανάλυση και εκτίμηση επιδημιολογικών χαρακτηριστικών	169
8.3 Αποτελέσματα	171
8.3.1 Τρόπος διασποράς στους XEN και μεταδόσεις σε άλλες ομάδες κινδύνου	171
8.3.2 Επιδημιολογικά χαρακτηριστικά των επιμέρους επιδημιών	173
8.4 Συμπεράσματα	176
Κεφάλαιο 9ο Μοριακή εκτίμηση της γεωγραφικής προέλευσης της HIV-1 λοίμωξης και των προτύπων διασποράς του ιού στους χρήστες ενδοφλέβιων ναρκωτικών με μη Ελληνική εθνικότητα στην Αθήνα	183
9.1 Εισαγωγή-Σκοπός	185
9.2 Υλικό-Μέθοδοι	186
9.2.1 Εκτίμηση πιθανής προέλευσης HIV-1 λοίμωξης σε μετανάστες XEN	186
9.2.2 Διερεύνηση τρόπου διασποράς σε τοπικά δίκτυα διασποράς XEN (φυλοεθνική ανάλυση)	187
9.3 Αποτελέσματα	189
9.3.1 Τοπικά δίκτυα διασποράς XEN	189
9.3.2 Πιθανή προέλευση HIV-1 λοίμωξης σε μετανάστες XEN	190
9.3.3 Τρόπος μετάδοσης μεταξύ XEN διαφορετικών εθνικοτήτων	190
9.3.3.1 Αποτελέσματα φυλοεθνικής ανάλυσης	190
9.3.3.2 Εκτίμηση πιθανής προέλευσης HIV-1 λοίμωξης μέσω γενετικών αποστάσεων	193
9.4 Συμπεράσματα	193
Κεφάλαιο 10ο Μοριακή ανάλυση HIV-1 σε χρήστες ενδοφλέβιων ναρκωτικών στα πλαίσια προγράμματος παρέμβασης σε κοινωνικά δίκτυα στην Αθήνα (Transmission Reduction Intervention Project – TRIP)	201
10.1 Εισαγωγή-Σκοπός	203
10.2 Υλικό-Μέθοδοι	204
10.2.1 Μελέτη κοινωνικών δικτύων συμμετεχόντων του «TRIP»	207
10.2.2 Εκτίμηση δικτύων μετάδοσης XEN συμμετεχόντων του «TRIP»	207
10.2.3 Εκτίμηση ποσοστού XEN σε δίκτυα μετάδοσης με κοινή κοινωνική δικτύωση	208

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

	Σελίδα
10.3 Αποτελέσματα	208
10.3.1 Δίκτυα μετάδοσης XEN (μέθοδος αλληλούχισης Sanger)	208
10.3.2 Συσχέτιση τρόπου μετάδοσης και κοινωνικής δικτύωσης XEN (μέθοδος αλληλούχισης Sanger)	210
10.3.3 Δίκτυα μετάδοσης XEN (μέθοδος αλληλούχισης NGS)	212
10.3.4 Συσχέτιση τρόπου μετάδοσης και κοινωνικής δικτύωσης XEN (μέθοδος αλληλούχισης NGS)	214
10.4 Συμπεράσματα	215
Κεφάλαιο 11ο Διερεύνηση με μοριακές μεθόδους αν οι μεταδόσεις HIV-1 συμβαίνουν πιο συχνά σε χρήστες ενδοφλέβιων ναρκωτικών με υψηλό ιικό φορτίο στην Αθήνα (Transmission Reduction Intervention Project – TRIP)	221
11.1 Εισαγωγή-Σκοπός	223
11.2 Υλικό-Μέθοδοι	223
11.2.1 Διερεύνηση μόλυνσης XEN με υψηλό ιικό φορτίο σε δίκτυα μετάδοσης	224
11.2.2 Διερεύνηση υπόθεσης συχνότερης HIV-μετάδοσης μεταξύ XEN με υψηλό ιικό φορτίο	224
11.3 Αποτελέσματα	225
11.3.1 Δίκτυα μετάδοσης XEN με υψηλό ιικό φορτίο	225
11.3.2 Υπόθεση συχνότερης HIV-μετάδοσης μεταξύ XEN με υψηλό ιικό φορτίο	227
11.4 Συμπεράσματα	228
Κεφάλαιο 12ο Εκτίμηση επιπολασμού, τρόπου διασποράς και δυναμικής των HIV-1 στελεχών με αντοχή σε αντιρετροϊκά φάρμακα σε μη θεραπευμένα άτομα που ζουν με HIV-1 στη Νότια/Κεντρική Ελλάδα το χρονικό διάστημα 2003-2015	233
12.1 Εισαγωγή-Σκοπός	235
12.2 Υλικό-Μέθοδοι	236
12.2.1 Εκτίμηση επιπολασμού πρωτογενούς αντοχής σε μη θεραπευμένους PLHIV	237
12.2.2 Διερεύνηση τρόπου διασποράς ανθεκτικών στελεχών στους επικρατέστερους HIV-1 υπότυπους	237
12.2.3 Εκτίμηση παραγόντων που σχετίζονται με πρωτογενή αντοχή σε διαφορετικές κατηγορίες φαρμάκων	238
12.2.4 Εκτίμηση επιδημιολογικών δεικτών επιμέρους επιδημιών ανθεκτικών στελεχών	238
12.3 Αποτελέσματα	240
12.3.1 Επιπολασμός πρωτογενούς αντοχής σε μη θεραπευμένους PLHIV	240
12.3.2 Τοπικά δίκτυα μετάδοσης ανθεκτικών στελεχών υπότυπων A1 και B	242

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

	Σελίδα
12.3.3 Παράγοντες που σχετίζονται με πρωτογενή ανοχή σε διαφορετικές κατηγορίες φαρμάκων	245
12.3.4 Επιδημιολογικά χαρακτηριστικά επιμέρους επιδημιών A1 στελεχών με μεταλλαγές ανοχής σε NNRTIs (E138A και K103N)	245
12.4 Συμπεράσματα	251
Επίλογος - Συμπεράσματα Διδακτορικής Διατριβής	265
Περίληψη	269
Abstract	273
Βιβλιογραφία	277

Εισαγωγή - Σκοπός Διδακτορικής Διατριβής

Ο ιός της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας (Human Immunodeficiency Virus – HIV) έχει προκαλέσει μία από τις πιο σοβαρές επιδημίες σε παγκόσμιο επίπεδο. Ο συγκεκριμένος ιός αποτελεί ένα ιδιαίτερα σημαντικό πρόβλημα δημόσιας υγείας. Σύμφωνα με στοιχεία του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (Π.Ο.Υ.) εκτιμάται ότι μέχρι τα τέλη του 2018 περίπου 38 εκατομμύρια άνθρωποι, παγκοσμίως, ζουν με HIV-λοίμωξη (WHO/UNAIDS, 2019). Ένα από τα κυριότερα χαρακτηριστικά του ιού είναι η εκτενής γενετική του ετερογένεια, που οφείλεται στον υψηλό ρυθμό μεταλλαγών και στον υψηλό ρυθμό αναπαραγωγής και ανασυνδυασμού του (Preston et al., 1988; Coffin, 1995; Onafuwa-Nuga et al., 2009). Ο εξελικτικός του ρυθμός εκτιμάται ότι είναι περίπου ένα εκατομμύριο φορές πιο γρήγορος από τον αντίστοιχο στο ανθρώπινο γενετικό υλικό (Drummond et al., 2002; Drummond et al., 2003; Rambaut et al., 2004). Ως συνέπεια των παραπάνω χαρακτηριστικών του, ο HIV διακρίνεται σε δυο τύπους, τον HIV-1 και τον HIV-2. Ο HIV-1 είναι ο πιο διαδεδομένος και διακρίνεται σε 4 ομάδες: την ομάδα M, την ομάδα O, την ομάδα N και την πιο πρόσφατα προσδιορισθείσα ομάδα P (Plantier et al., 2009; Peeters et al., 1989). Η ομάδα M είναι η επικρατέστερη ανά τον κόσμο και διακρίνεται περαιτέρω σε εννέα διακριτούς κλάδους (υπότυποι) A-D, F-H, J και K, σε υπο-υπότυπους (A1-A4, A6, F1, F2) και ανασυνδυασμένους τύπους του ιού (Circulating Recombinant Forms – CRFs, Unique Recombinant Forms – URFs) (Peeters et al., 2013; Foley et al., 2016). (www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/CRFs/CRFs.html).

Η παγκόσμια κατανομή των HIV-1 υπότυπων και ανασυνδυασμένων τύπων παρουσιάζει σημαντικές διαφορές στην πορεία του χρόνου. Το χρονικό διάστημα 2010-2015 ο C ήταν ο επικρατέστερος HIV-1 υπότυπος σε παγκόσμιο επίπεδο, με το 46,6% του συνόλου των HIV-1 λοιμώξεων να οφείλονται σε αυτόν. Οι υπότυποι B και A ακολουθούσαν με ποσοστά 12,1% και 10,3% αντίστοιχα. Ο επιπολασμός του υπότυπου B βρέθηκε να αυξάνεται, των A και D να παραμένει σχεδόν σταθερός, ενώ των C, G και CRF02_AG να μειώνεται διαχρονικά. Οι υπόλοιποι ανασυνδυασμένοι τύποι (CRFs και URFs) παρουσίασαν συνεχή σταδιακή αύξηση του επιπολασμού τους στην πορεία του χρόνου (Hemelaar et al., 2012).

Τα στελέχη του HIV-1 έχουν επικρατήσει σε διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές ανά τον κόσμο (Hemelaar, 2012; Hemelaar et al., 2018). Η μεγαλύτερη γενετική ετερογένεια του ιού εντοπίζεται στην κεντρική Υποσαχάρια Αφρική όπου, αν και οι υπότυποι A και C είναι οι επικρατέστεροι, έχουν αναφερθεί όλοι οι υπότυποι και πολλοί από τους ανασυνδυασμένους τύπους του ιού. Το χρονικό διάστημα 2010-2015, η Κεντρική Αφρική είχε το υψηλότερο ποσοστό URFs (21,3%) από οποιαδήποτε άλλη περιοχή στον κόσμο. Ο υπότυπος A είναι εκείνος με τον υψηλότερο επιπολασμό στις χώρες και της Κεντρικής και Ανατολικής Αφρικής, καθώς και στις χώρες της Ανατολικής Ευρώπης και της Κεντρικής Ασίας. Αντίθετα, ο υπότυπος B επικρατεί σε Δυτική και Κεντρική Ευρώπη, Βόρεια Αμερική, καθώς και σε πολλές χώρες της Λατινικής Αμερικής, της Καραϊβικής, της Αυστραλίας, της Βόρειας Αφρικής και της Μέσης Ανατολής. Ο C είναι ο κυρίαρχος HIV-1 υπότυπος στη Νότια και Ανατολική Αφρική και την Ινδική Χερσόνησο. Στη Δυτική Αφρική επικρατεί ο ανασυνδυασμένος τύπος CRF02_AG, ενώ ο CRF01_AE εντοπίζεται σε υψηλά ποσοστά στην Ανατολική και Νοτιοανατολική Ασία (Buonaguro et al., 2007; Hemelaar et al., 2018; Beloukas et al., 2016).

Όσον αφορά στην Ελλάδα, σύμφωνα με στοιχεία του εθνικού συστήματος επιδημιολογικής επιτήρησης της HIV/AIDS λοίμωξης (Εθνικός Οργανισμός Δημόσιας Υγείας – Ε.Ο.Δ.Υ., πρώην Κέντρο Ελέγχου & Πρόληψης Νοσημάτων – ΚΕ.ΕΛ.Π.ΝΟ.), ο συνολικός αριθμός των ατόμων που έχουν προσβληθεί από τον ιό (συμπεριλαμβανομένων και των περιπτώσεων AIDS) και είχαν δηλωθεί μέχρι την 31η Δεκεμβρίου 2018 ανέρχεται σε 17.389 (ΚΕ.ΕΛ.Π.ΝΟ., 2018). Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι οι A και B είναι οι επικρατέστεροι HIV-1 υπότυποι στην Ελλάδα και, επιπρόσθετα, παρουσιάζουν ιδιαίτερα υψηλό ποσοστό τοπικής διασποράς (Nikolopoulos et al., 2008; Paraskevis et al., 2007). Επίσης, έχουν παρατηρηθεί υψηλά ποσοστά των ανασυνδυασμένων τύπων CRF14_BG και CRF35_AD στους χρήστες ενδοφλέβιων ναρκωτικών (XEN) (Paraskevis et al., 2011; Paraskevis et al., 2013; Sypsa et al., 2015). Τέλος, στην Ελλάδα έχουν εντοπιστεί και νέοι ανασυνδυασμένοι τύποι, όπως οι CRF04_cpx και CRF02/B (Paraskevis et al., 2001).

Σε αρκετές χώρες ανά τον κόσμο έχουν αναφερθεί HIV-1 επιδημίες σε ειδικούς πληθυσμούς, όπως οι XEN (Nikolopoulos et al., 2016a). Πρόσφατα σε Ελλάδα και Ρουμανία μεταδόσεις του ιού μεταξύ XEN οδήγησαν σε επιμέρους επιδημίες των υπότυπων A, B και F1, και των ανασυνδυασμένων τύπων CRF14_BG και CRF35_AD (Nikolopoulos et al., 2015; Paraskevis et al., 2013; Paraskevis et al., 2015; Niculescu et al., 2015). Μερικές δεκαετίες πριν, σε Ρωσία, Ουκρανία και άλλες χώρες της πρώην Ένωσης Σοβιετικών Σοσιαλιστικών Δημοκρατιών (Ε.Σ.Σ.Δ.) εκδηλώθηκαν HIV-1 επιδημίες που πήραν μεγάλες διαστάσεις, οι οποίες οφείλονταν σε μεταδόσεις στελεχών υπότυπου A (που ονομάστηκε, αρχικά, AFSU και μετέπειτα A₆) μεταξύ XEN (Friedman et al., 2009; Strathdee et al., 2006; UNODC, 2014). Τέλος, η Κίνα, η Μυανμάρ, το Λάος, η Ταϊλάνδη και άλλες χώρες της Νότιας και Νοτιοανατολικής Ασίας έχουν μετατραπεί σε περιοχές δημιουργίας νέων ανασυνδυασμένων τύπων λόγω της ταυτόχρονης μόλυνσης των XEN με πολλαπλά στελέχη του ιού (Lau et al., 2013).

Δεδομένων όλων των παραπάνω, ο σκοπός της διατριβής ήταν η μελέτη της επιδημίας του HIV-1 στην Ελλάδα χρησιμοποιώντας μεθόδους μοριακής επιδημιολογίας, και συγκεκριμένα μεθόδους φυλογενετικής, φυλογεωγραφικής και φυλοδυναμικής ανάλυσης. Αναλυτικότερα, τα ζητήματα στα οποία επικεντρώθηκε η παρούσα διατριβή ήταν τα εξής:

- i) Η διαχρονική εκτίμηση του επιπολασμού των HIV-1 υπότυπων και ανασυνδυασμένων τύπων στην Ελληνική επικράτεια το χρονικό διάστημα μεταξύ 1999 και 2015.
- ii) Η μελέτη των προτύπων διασποράς των επικρατέστερων HIV-1 υπότυπων (A και B) στην Ελληνική επικράτεια μέσω εκτίμησης των σημαντικών τοπικών δικτύων μετάδοσης και χαρακτηρισμό τους.
- iii) Η μοριακή επιτήρηση της επιδημίας του HIV-1 στους XEN στην Αθήνα το χρονικό διάστημα 2011-2014 μέσω διερεύνησης του τρόπου διασποράς και της

πιθανής ύπαρξης μεταδόσεων από τους XEN σε άλλες ομάδες κινδύνου, και μέσω εκτίμησης επιδημιολογικών χαρακτηριστικών της επιδημίας όπως ο χρόνος προέλευσης και η δυναμική της μετάδοσης.

- iv) Η εύρεση της γεωγραφικής προέλευσης της HIV-1 λοίμωξης για τους XEN με μη Ελληνική εθνικότητα στην Αθήνα και η διερεύνηση της υπόθεσης ότι η συχνότητα των μεταδόσεων του ιού είναι μεγαλύτερη στους XEN με μη Ελληνική εθνικότητα.
- v) Η μελέτη των κοινωνικών δικτύων των XEN στην Αθήνα και η διερεύνηση πιθανής ύπαρξης συσχέτισης μεταξύ τρόπου μετάδοσης του HIV-1 και κοινωνικής δικτύωσης.
- vi) Η διερεύνηση της υπόθεσης ότι οι μεταδόσεις HIV-1 συμβαίνουν πιο συχνά σε XEN με υψηλό ιικό φορτίο στην Αθήνα.
- vii) Η εκτίμηση του επιπολασμού, του τρόπου διασποράς, του χρόνου προέλευσης και της δυναμικής της μετάδοσης των HIV-1 στελεχών με αντοχή σε αντιρετροϊκά φάρμακα σε μη θεραπευμένα άτομα που ζουν με HIV-1 στη Νότια/Κεντρική Ελλάδα το χρονικό διάστημα 2003-2015.

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

Εισαγωγή στους Ιούς

Οι ιοί είναι ακυτταρικές μορφές ζωής οι οποίες παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές από τους υπόλοιπους μικροοργανισμούς και προκαλούν λοιμώξεις. Αρκετές θεωρίες υποστηρίζουν ότι οι συγκεκριμένες μορφές ζωής προϋπήρχαν ακόμη και της εμφάνισης της κυτταρικής ζωής. Με μέγεθος ιικού σωματιδίου που κυμαίνεται από 20 έως 300nm, θεωρούνται οι μικρότεροι λοιμογόνοι παράγοντες. Οι ιοί χαρακτηρίζονται από απλή δομική οργάνωση και απουσία μεταβολικών μηχανισμών. Εξαιτίας της απουσίας μεταβολισμού δεν μπορούν να αναπαραχθούν αυτόνομα. Προκειμένου λοιπόν να πραγματοποιήσουν τις βιολογικές λειτουργίες που απαιτούνται για την αναπαραγωγή τους, χρησιμοποιούν τους μεταβολικούς μηχανισμούς των κυττάρων που μολύνουν (ξενιστές), και γι' αυτό χαρακτηρίζονται υποχρεωτικά ως ενδοκυτταρικά παράσιτα (Kayser et al., 2005; Knipe et al., 2013; Dimmock et al., 2016).

Η μετάδοση των ιών μπορεί να είναι οριζόντια, δηλαδή μετάδοση από το έναν οργανισμό στον άλλον, ή κάθετη, δηλαδή από τη μητέρα στο παιδί. Επίσης, μπορεί να είναι άμεση, δηλαδή να πραγματοποιείται απ' ευθείας από τον έναν ξενιστή στον άλλο, ή έμμεση, όπως για παράδειγμα να πραγματοποιείται μέσω τσιμπημάτων. Οι ιοί μπορούν να προσβάλουν ζώα, φυτά, ακόμα και βακτήρια, ενώ προκαλούν λιγότερο ή περισσότερο επιβλαβείς για την υγεία του ξενιστή ασθένειες, με τους επιβλαβείς να αναφέρονται ως παθογόνοι (Baron, 1996; Modrow, 2013).

Οι ιοί διαφοροποιούνται σημαντικά μεταξύ τους ως προς τη δομή, τον κύκλο ζωής και την πολυπλοκότητα των λειτουργιών τους. Αναφορικά με τη δομή τους, το ιικό σωματίδιο αποτελείται από γενετικό υλικό. Το γενετικό υλικό έχει ένα συγκεκριμένο τύπο νουκλεϊκού οξέος (DNA ή RNA), το οποίο είναι ένα πολυμερές βιομόριο όπου διατηρείται το σύνολο της γενετικής πληροφορίας που είναι απαραίτητη για την επιβίωση του ιού. Τα μονομερή του νουκλεϊκού οξέος ονομάζονται νουκλεοτίδια και καθένα από αυτά αποτελείται από μία πεντόζη (δεοξυριβόζη στο DNA, ριβόζη στο RNA), μία αζωτούχο βάση [αδενίνη (A), γουανίνη (G), κυτοσίνη (C), θυμίνη (T), ουρακίλη (U)] και μία φωσφορική ομάδα. Οι πρώτες τρεις είναι κοινές και στα RNA και στα DNA μόρια, ενώ η θυμίνη (T) εμφανίζεται μόνο σε μόρια DNA και η ουρακίλη (U) μόνο σε μόρια RNA. Τα νουκλεοτίδια σχηματίζουν μία αλυσίδα και η αλληλουχία με την οποία εμφανίζονται στην αλυσίδα αυτή καθορίζει τη γενετική

πληροφορία που περιέχει το νουκλεϊκό οξύ. Το DNA είναι συνήθως δίκλωνο και αποτελείται από δύο συμπληρωματικές αλυσίδες που σχηματίζουν μία έλικα. Αντίθετα, το RNA είναι μονόκλωνο. Το νουκλεϊκό οξύ περιβάλλεται από το καψίδιο, το οποίο είναι μια πρωτεϊνική θήκη που αποτελείται από πρωτεϊνικές υπομονάδες, τα καψομερίδια. Κάποιοι ιοί εμφανίζουν ένα επιπλέον προστατευτικό κάλυμμα του γενετικού τους υλικού, το φάκελο ή έλυτρο, το οποίο αποτελείται από διπλή στιβάδα φωσφολιπιδίων (Knipe et al., 2013; Dimmock et al., 2016; Baron, 1996).

Όσον αφορά στον κύκλο ζωής των ιών, αυτός μπορεί να περιγραφεί εν συντομία σε τρία βήματα. Το πρώτο βήμα αφορά στη μόλυνση του κυττάρου-ξενιστή από τον ιό, η οποία ξεκινά με την πρόσδεση του ιού στην εξωτερική επιφάνεια του κυττάρου, συνεχίζει με τη διείσδυση του ιικού γενετικού υλικού στο κύτταρο και ολοκληρώνεται με την απελευθέρωση του ιικού νουκλεϊκού οξέος από το καψίδιο στο κυτταρόπλασμα. Σε δεύτερο βήμα ακολουθεί η αντιγραφή και η έκφραση του ιικού γενετικού υλικού. Το βασικό χαρακτηριστικό γνώρισμα του κάθε ιού είναι ο μηχανισμός αντιγραφής που χρησιμοποιεί. Στο τρίτο και τελευταίο βήμα, η όλη διαδικασία ολοκληρώνεται με τη συναρμολόγηση των καψιδίων των νέων ιών και την απελευθέρωση των νέων στελεχών του ιού από το μολυσμένο κύτταρο (Acheson, 2011; Ryu, 2017).

Οι ιοί ταξινομούνται με βάση τα μορφολογικά τους χαρακτηριστικά, τη χημική τους σύνθεση και τον τρόπο αντιγραφής τους σε: τάξη, οικογένεια, υπο-οικογένεια, γένος και είδος (International Committee on Taxonomy of Virus – ICTV) (ICTV Taxonomy, 2017; Baron, 1996). Μέχρι σήμερα έχουν καταγραφεί 4.853 είδη ιών, τα οποία ταξινομούνται σε 803 γένη, 131 οικογένειες και 9 τάξεις (ICTV Taxonomy Release History, 2017). Ανάλογα με το είδος και τους μηχανισμούς που δρουν και αλλάζουν το γονιδιώμά τους (γενετικός ανασυνδυασμός, μεταλλάξεις), οι ιοί μπορούν να εξελίσσονται γρήγορα ή αργά. Η ανταλλαγή τμημάτων του γενετικού υλικού καλείται γενετικός ανασυνδυασμός, ενώ μία ποιοτική ή ποσοτική αλλαγή στο γενετικό υλικό καλείται μεταλλαγή. Οι μεταλλάξεις μπορούν να δημιουργήσουν σοβαρά προβλήματα σε έναν οργανισμό και γι' αυτόν το λόγο τα κύτταρα διαθέτουν ενζυμικούς επιδιορθωτικούς μηχανισμούς. Οι RNA ιοί μεταλλάσσονται γρηγορότερα

συγκριτικά με τους DNA ιούς λόγω της έλλειψης επιδιορθωτικού μηχανισμού (Dimmock et al., 2016; Baron, 1996).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

Εισαγωγή στους Ρετροϊούς

Το κύριο χαρακτηριστικό των ρετροϊών είναι ότι το γενετικό τους υλικό είναι RNA. Οι συγκεκριμένοι ιοί ανήκουν στην οικογένεια ιών «Retroviridae», η οποία ανήκει στην τάξη «Ortervirales» που διακρίνεται σε δύο υπο-οικογένειες, την «Orthoretrovirinae» και την «Spumaretrovirinae» (ICTV Taxonomy, 2017). Μέχρι σήμερα υπάρχουν 68 καταγεγραμμένα είδη ρετροϊών (ICTV Taxonomy Release History, 2017).

Ο κύκλος ζωής των ρετροϊών διαφέρει σημαντικά από εκείνον των υπολοίπων ιών λόγω της απαραίτητης συμμετοχής του ενζύμου της αντίστροφης μεταγραφάσης στη μετατροπή του RNA του ρετροϊού σε DNA. Αναλυτικότερα, το καψίδιο των ρετροϊών περιβάλλει το γενετικό τους υλικό (δύο αντίγραφα RNA) και τις ικές πρωτεΐνες (πρωτεάση, ιντεγκράση, αντίστροφη μεταγραφάση). Όταν ένας ρετροϊός εισαχθεί στο κύτταρο-ξενιστή, και κατά τη διάρκεια της μεταφοράς του προς τον πυρήνα του κυττάρου-ξενιστή, το RNA του μετατρέπεται σε δίκλωνο μόριο DNA (διαδικασία αντίστροφης μεταγραφής). Το μόριο DNA που δημιουργείται, το οποίο εμπεριέχει την ίδια γενετική πληροφορία με το RNA του ρετροϊού, εισέρχεται στον πυρήνα του κυττάρου-ξενιστή, ενσωματώνεται στο DNA του ξενιστή και πολλαπλασιάζεται μαζί με αυτό. Στη συνέχεια, μέσω της διαδικασίας της μεταγραφής, από το ικό DNA παράγεται RNA το οποίο θα αποτελεί το γενετικό υλικό των νέων ρετροϊικών στελεχών που θα απελευθερωθούν έξω από το κύτταρο (Knipe et al., 2013; Baron, 1996; Ryu, 2017; Coffin et al., 1997).

Η μόλυνση από ρετροϊό προκαλεί ασθένειες που μπορούν να οδηγήσουν μέχρι και στο θάνατο του ξενιστή. Ως πιο επικίνδυνοι έχουν χαρακτηριστεί ο ανθρώπινος λεμφοτροπικός ιός (Human T-cell Leukemia Virus – HTLV) και ο ιός της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας (HIV). Ο HTLV μπορεί να προκαλέσει λευχαιμία, ενώ ο HIV είναι ο αιτιολογικός παράγοντας του Σύνδρομο Επίκτητης Ανοσοανεπάρκειας (Acquired Immune Deficiency Syndrome – AIDS) (Baron, 1996).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

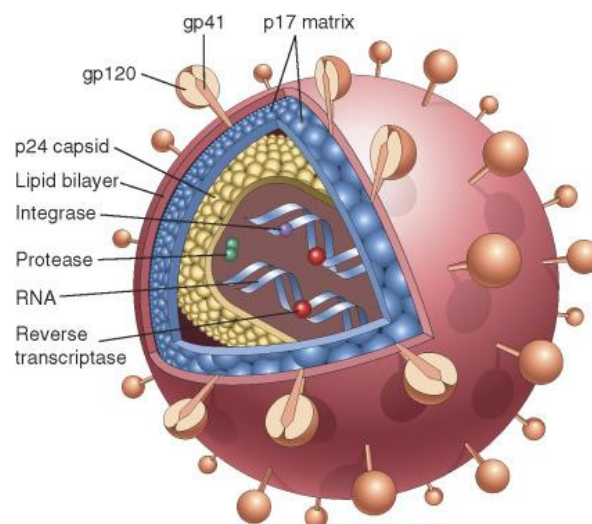
Εισαγωγή στον HIV

Σύμφωνα με την ICTV, ο HIV ανήκει στο γένος των Φακοϊών (Lentivirus), της οικογένειας των Ρετροϊών (Retroviridae) και διαχωρίζεται σε δύο τύπους, τον HIV-1 (HIV τύπου 1) και τον HIV-2 (HIV τύπου 2). Ο συγκεκριμένος ρετροϊός προσβάλλει τα Τ λεμφοκύτταρα, τα μακροφάγα και τα δενδριτικά κύτταρα, και δρα στο ανοσοποιητικό σύστημα του ανθρώπου. Ένα βασικό χαρακτηριστικό του είναι η ικανότητα του να ενσωματώνεται και να παραμένει στο ανθρώπινο γονιδίωμα χωρίς απαραίτητα να προκαλεί την εκδήλωση κλινικών συμπτωμάτων. Σύμφωνα με τον Π.Ο.Υ., ο HIV έχει τρία κλινικά στάδια τα οποία καθορίζονται από τον αριθμό των CD4 κυττάρων στο αίμα του φορέα. Το τελικό στάδιο της HIV λοίμωξης είναι το AIDS, κατά το οποίο η συγκέντρωση των CD4 κυττάρων στον ορό του αίματος είναι μικρότερη από 200 CD4/μL και το ανοσοποιητικό σύστημα του φορέα αδυνατεί να αντιμετωπίσει ακόμη και απλές μολύνσεις ή λοιμώξεις (Serkowitz, 2001; Bennett et al., 2015).

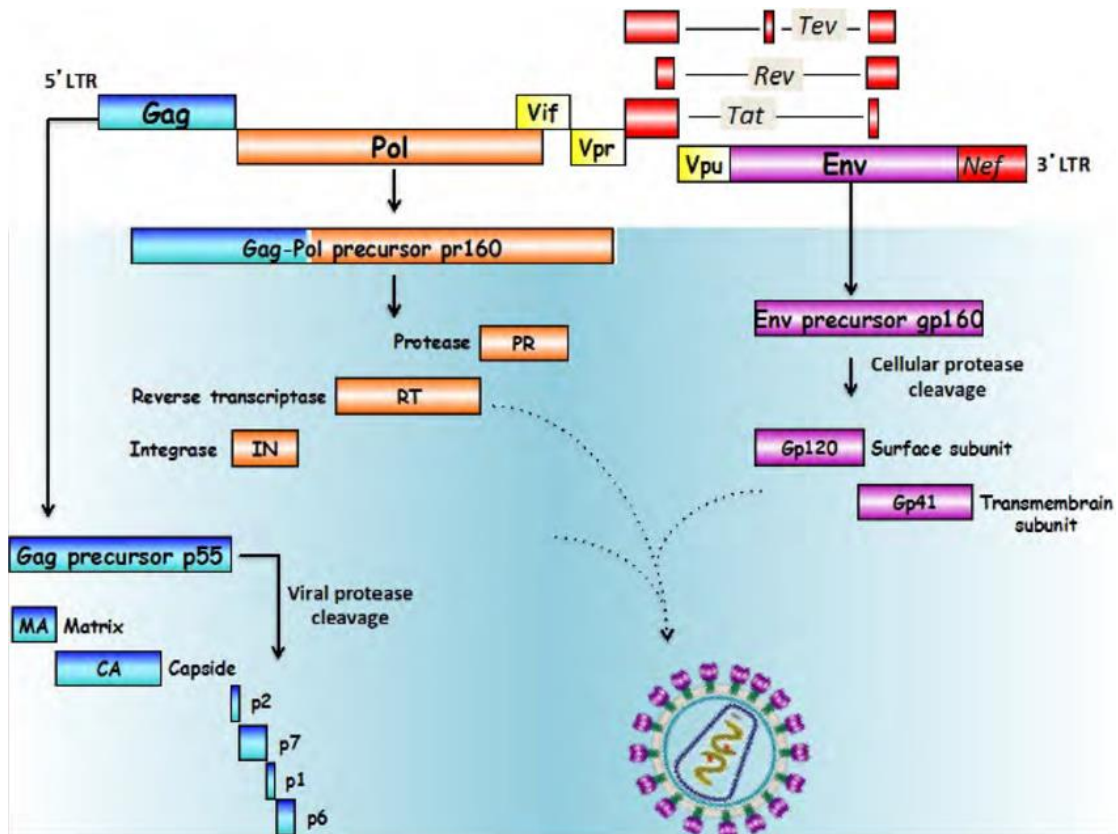
3.1 Δομή του HIV

Ο συγκεκριμένος ιός παρουσιάζει σημαντικές διαφορές από τους υπόλοιπους ρετροϊούς ως προς τη δομή και το γονιδίωμα. Συγκεκριμένα, το σύνθετο γονιδίωμα του HIV του δίνει τη δυνατότητα να κωδικοποιεί παραπάνω πρωτεΐνες. Ένα τυπικό HIV στέλεχος έχει σχεδόν σφαιρικό σχήμα διαμέτρου περίπου 120nm. Το στέλεχος αυτό αποτελείται από ένα κωνικό καψίδιο που συγκροτείται από 2.000 αντίγραφα της πρωτεΐνης p24. Μέσα στο καψίδιο υπάρχει το νουκλεοκαψίδιο, το οποίο περιέχει τα δυο αντίγραφα του ιικού γονιδιώματος (*Εικόνα 1*). Το γονιδίωμα του HIV-1 απαρτίζεται από δυο αντίγραφα θετικής μονής έλικας RNA, μήκους περίπου 9,7 Kb, και αποτελείται συνολικά από εννέα γονίδια. Εκ των εννέα γονιδίων, τα τρία (Gag, Pol, Env) είναι βασικά και κωδικοποιούν δομικές πρωτεΐνες και ένζυμα σε όλους τους ρετροϊούς, ενώ τα υπόλοιπα έξι (Tat, Rev, Vif, Vpr, Vpu, Nef) είναι βοηθητικά, εντοπίζονται αποκλειστικά στα HIV-1 στέλεχη και συντελούν στην παραγωγή ρυθμιστικών και βοηθητικών πρωτεϊνών οι οποίες ελέγχουν τον κύκλο ζωής του ιού (*Εικόνες 2 και 3*). Η δομή του γονιδιώματος του HIV-2 είναι σχεδόν πανομοιότυπη με αυτή του HIV-1, με μοναδική διαφορά την ύπαρξη του γονιδίου Vpx αντί του γονιδίου Vpu (*Εικόνα 3*). Αναφορικά με τα βασικά γονίδια του ιού, το γονίδιο Gag κατευθύνει

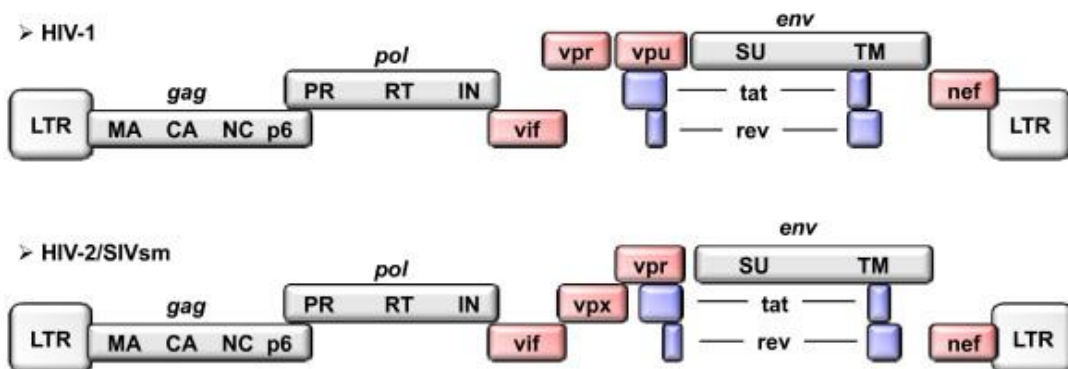
το σχηματισμό των δομικών πρωτεϊνών του καψιδίου (CA, p24) και του νουκλεοκαψιδίου (NC, p7). Το γονίδιο *Env* είναι υπεύθυνο για το σχηματισμό των πρωτεϊνών που θα διαμορφώσουν τις γλυκοπρωτεΐνες του φακέλου (gp160, gp120, gp41), ενώ το γονίδιο *Pol* κωδικοποιεί τα ιικά ένζυμα πρωτεάση (protease - PR, p10), αντίστροφη μεταγραφάση (reverse transcription - RT, p51) και ιντεγκράση (integrase - IN, p31). Η πρωτεάση είναι ένα πρωτεολυτικό ένζυμο το οποίο προκαλεί υδρόλυση των πεπτιδικών δεσμών. Η αντίστροφη μεταγραφάση δημιουργεί μόρια DNA αντιγράφοντας το γονιδίωμα του RNA ιού, και αποτελεί το πιο ιδιαίτερο σημείο στον κύκλο ζωής του HIV. Και, τέλος, η ιντεγκράση ενσωματώνει το αντίγραφο DNA του HIV γονιδιώματος στο DNA του ξενιστή. Το κωνικό καψίδιο περιβάλλεται από μία διπλή λιπιδική στιβάδα, το φάκελο, ο οποίος περιέχει γλυκοπρωτεΐνες που αποτελούνται από τις υπομονάδες gp41 και gp120 (Εικόνα 1). Τα πολυπεπτίδια και των δύο υπομονάδων κωδικοποιούνται από το γονίδιο *Env*. Στο εσωτερικό του φακέλου βρίσκεται ένα εικοσαεδρικό εσωτερικό πλαίσιο (matrix) που αποτελείται από 2.000 αντίγραφα της πρωτεΐνης p17 που κωδικοποιείται, όπως και οι πρωτεΐνες του καψιδίου και του νουκλεοκαψιδίου, από το γονίδιο *Gag* (Εικόνα 1) (Acheson, 2013; Ryu, 2017; Collier et al., 2006; Hallenberger et al., 1992; Seitz, 2016; Turner et al., 1999; King, 1994; Mushahwar, 2006; Feng et al., 1996; Deng et al., 1996; Gottlinger et al., 1989).



Εικόνα 1 Δομή του HIV (Robbins and Cotran, 2004).



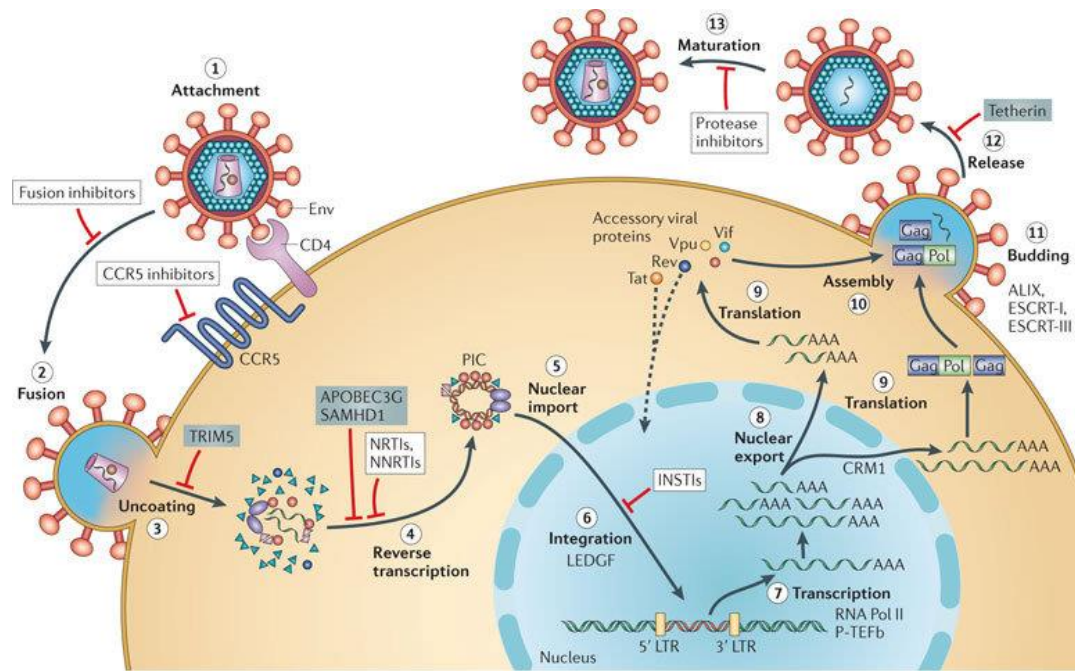
Εικόνα 2 Γονιδίωμα του HIV-1 (Ben Haij et al., 2011).



Εικόνα 3 Γονιδίωμα των HIV-1 και HIV-2 (Ayinde et al., 2010).

3.2 Κύκλος ζωής του HIV

Ο κύκλος ζωής του HIV ξεκινά με τον τροπισμό, δηλαδή τη διαδικασία κατά την οποία ο ιός προσπαθεί να μολύνει τα κύτταρα-ξενιστή. Ανάλογα με τα κύτταρα που προσπαθεί να προσβάλει ο ιός, η διαδικασία αυτή διαφοροποιείται σε Μ και Τ τροπισμό. Στην αρχή του τροπισμού ο ιός προσπαθεί να προσδεθεί στο κύτταρο ξενιστή μέσω των gp120 γλυκοπρωτεϊνών και να σχηματίσει ένα σύμπλοκο. Εφόσον σχηματισθεί το σύμπλοκο, αυτό προσπαθεί να συνδεθεί με έναν επιπρόσθετο πρωτεϊνικό συν-υποδοχέα της κυτταρικής επιφάνειας, ώστε να επιτευχθεί η σύντηξη της κυτταρικής μεμβράνης με τον ιικό φάκελο και το καψίδιο του ιού να εισέλθει στο κυτταρόπλασμα. Στον Μ τροπισμό τα ιικά στελέχη προσβάλλουν, κυρίως, τα μακροφάγα κύτταρα χρησιμοποιώντας τον CCR5 πρωτεϊνικό συν-υποδοχέα, ενώ στον Τ τροπισμό, κυρίως, τα Τ λεμφοκύτταρα χρησιμοποιώντας τον CXCR4 πρωτεϊνικό συν-υποδοχέα. Ορισμένα ιικά στελέχη εμφανίζουν διπλό τροπισμό, και για την είσοδό τους στο κύτταρο-ξενιστή χρησιμοποιούν και τους δυο υποδοχείς. Στη συνέχεια, και αφού το γενετικό υλικό και τα ένζυμα του ιού απελευθερωθούν στο εσωτερικό του κυττάρου, αρχίζει η διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής όπου το RNA γενετικό υλικό του ιού μεταγράφεται σταδιακά σε ένα δίκλωνο μόριο DNA. Το μόριο DNA μεταφέρεται στον πυρήνα του κυττάρου, ενσωματώνεται στο γονιδίωμα του κυττάρου-ξενιστή και αρχίζει να μεταγράφεται σε μόρια mRNA. Τα πρώτα μόρια mRNA έχουν περιορισμένο μήκος λόγω του ότι υπόκεινται σε μια διαδικασία ωρίμανσης («μάτισμα»). Τα μόρια αυτά μεταφέρονται στα ριβοσώματα του κυτταροπλάσματος και κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες των γονιδίων Tat, Rev και Nef. Η πρωτεΐνη Tat θα λειτουργήσει ως καταστολέας του «ματίσματος» ούτως ώστε να προκύψουν νέα μόρια mRNA με μεγαλύτερο μήκος, τα οποία εν συνεχεία θα κωδικοποιήσουν τις πρωτεΐνες των γονιδίων Env, Vif, Vpr και Vpru. Η πρωτεΐνη Rev θα επιστρέψει στον πυρήνα του κυττάρου και θα βοηθήσει στη μεταφορά των νέων μορίων στα ριβοσώματα του κυτταροπλάσματος. Τέλος, με τη βοήθεια των πρωτεϊνών p24, p6 και p7 θα αρχίσει η συναρμολόγηση των νέων HIV στελεχών, και αφού ολοκληρωθεί, τα στελέχη θα απελευθερωθούν από το κύτταρο (Modrow, 2013) (Εικόνα 4).



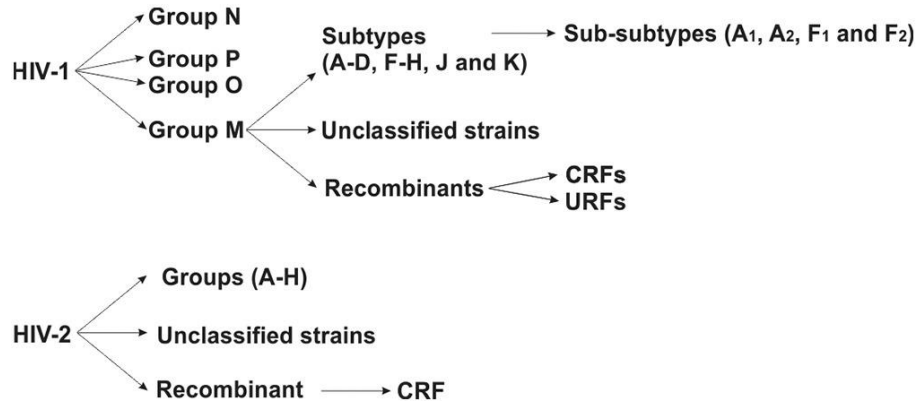
Εικόνα 4 Απεικόνιση του κύκλου ζωής του HIV (Musumeci et al., 2015).

3.3 Γενετική ετερογένεια και ταξινόμηση του HIV

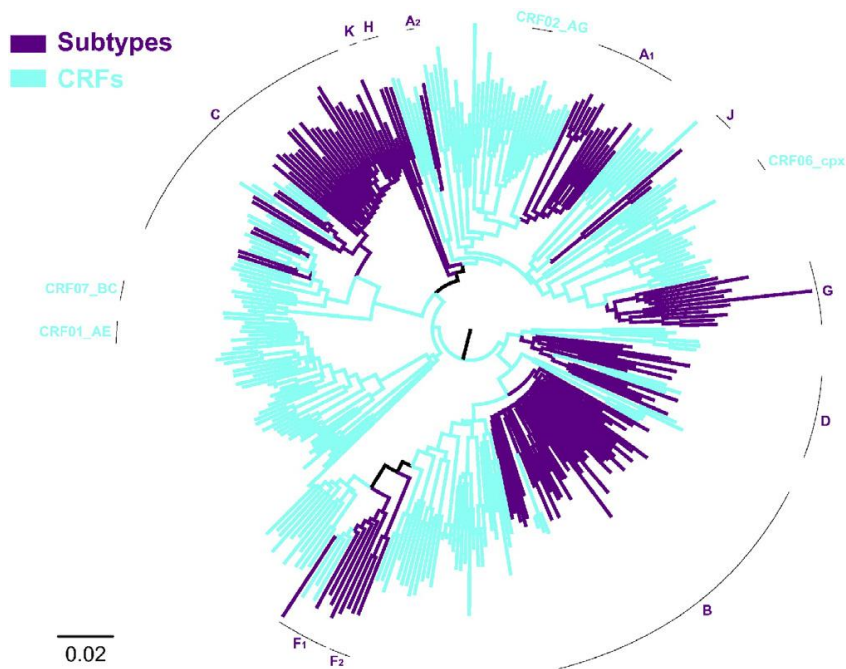
Ένα από τα κύρια χαρακτηριστικά του HIV είναι η εκτενής γενετική του ετερογένεια, η οποία αποτελεί συνέπεια του υψηλού ρυθμού μεταλλαγών, του υψηλού ρυθμού αναπαραγωγής και ανασυνδυασμού του (Tebit et al., 2011; Paraskevis et al., 1999; Paraskevis et al., 2014). Ο HIV θεωρείται ένα από τα ταχύτερα μεταλασσόμενα ανθρώπινα παθογόνα. Η υψηλή ετερογένεια του ιού οδήγησε στο γενετικό διαχωρισμό του σε δύο τύπους, τον HIV-1 και τον HIV-2, με τον HIV-2 να αποκλίνει γενετικά από τον HIV-1 κατά 55% και να είναι λιγότερο παθογόνος (Ryu, 2017; Tebit et al., 2011).

Σε αντίθεση με τον HIV-1, ο οποίος παρουσιάζει παγκόσμια εξάπλωση, ο HIV-2 εντοπίζεται μέχρι σήμερα κυρίως στη Δυτική Αφρική, όπου έχει προσβάλλει περίπου 1-2 εκατομμύρια ανθρώπους, και σε χώρες που συνδέονται ιστορικά ή πολιτικά με την περιοχή αυτή. Η επίπτωση και ο επιπολασμός του HIV-2 παρουσιάζουν διαχρονική πτωτική τάση (Campbell-Yesufu et al., 2011; Soriano et al., 2000; Tienen et al., 2010; Ryu, 2017; Tebit et al., 2011).

Τα στελέχη των HIV-1 και HIV-2 διακρίνονται περαιτέρω, με τον HIV-1 να διαχωρίζεται σε τέσσερις ομάδες [ομάδα M (Main), ομάδα O (outlier), ομάδα N (non-M, non-O) και ομάδα P] και τον HIV-2 σε οκτώ ομάδες (A-H) και μία ανασυνδυασμένη μορφή (HIV2_CRF01_AB). Οι ομάδες A και B έχουν ενεργό ρόλο στην επιδημία του HIV-2, ενώ οι υπόλοιπες έχουν εντοπιστεί σε περιορισμένο αριθμό ασθενών. Η ομάδα M του HIV-1 είναι υπεύθυνη για την πανδημία του HIV, και κατηγοριοποιείται σε 9 διακριτούς υπότυπους (A-D, F-H, J και K), σε υπο-υπότυπους (A1-A4, A6, F1, F2) και σε ανασυνδυασμένες μορφές του ιού (*Εικόνες 5 και 6*). Οι υπότυποι και οι υπο-υπότυποι του HIV-1 εκτιμάται ότι προέκυψαν ως αποτελέσματα του φαινομένου του ιδρυτή σε διαφορετικές χρονικές στιγμές κατά το παρελθόν. Ανασυνδυασμένες μορφές του ιού προκύπτουν από την ταυτόχρονη μόλυνση ενός ανθρώπου με διαφορετικά ιικά στελέχη. Οι μορφές αυτές μπορούν να αφορούν στελέχη με μοναδικό πρότυπο ανασυνδυασμού χωρίς εκτενή διασπορά, άρα μεμονωμένες περιπτώσεις (URFs), ή στελέχη με ταυτόσημο πρότυπο ανασυνδυασμού που εντοπίζονται σε τουλάχιστον τρία άτομα τα οποία δε συνδέονται μεταξύ τους επιδημιολογικά (CRFs). Μέχρι σήμερα έχουν αναφερθεί 103 CRFs. Επίσης, στελέχη των ομάδων O, N και P έχουν εντοπιστεί μόνο σε μικρό αριθμό ασθενών στην Αφρική (Καμερούν, Γκαμπόν, Ισημερινή Γουινέα) (Knipe et al., 2013; Tebit et al., 2011; Plantier et al., 2009; Beloukas et al., 2016; Sharp et al., 2011; Carr et al., 1998; Reis et al., 2017; Peeters, 2000; Taylor et al., 2008; Van der Kuyl et al., 2007; Robertson et al., 2000).



Εικόνα 5 Ταξινόμηση των HIV-1 και HIV-2 (Beloukas et al., 2016).

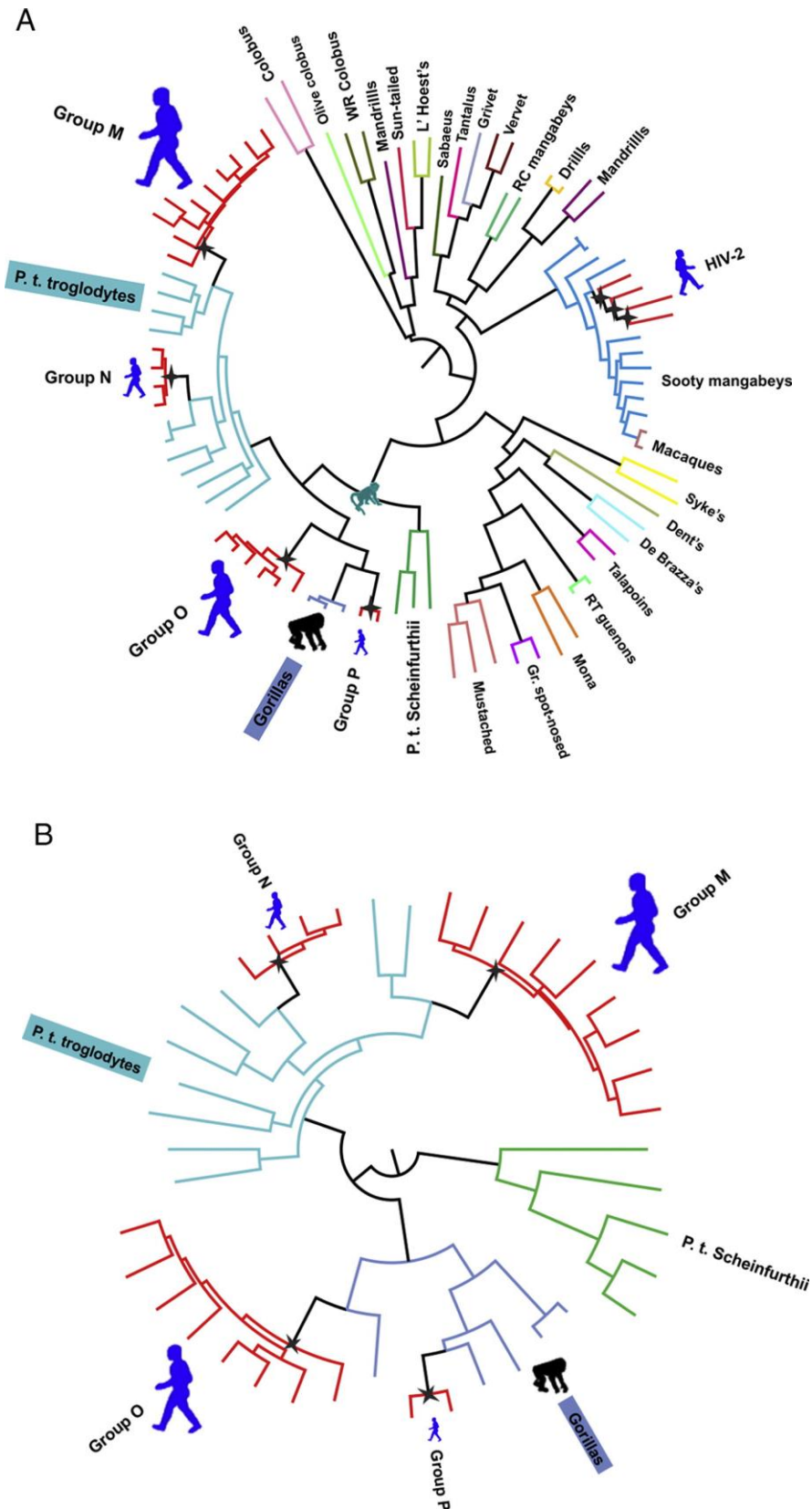


Εικόνα 6 Φυλογένεια του HIV-1 (Paraskevis et al., 2016).

3.4 Προέλευση και χρονικό πλαίσιο του HIV

Ο HIV εκτιμάται ότι προήλθε από την Αφρική στις αρχές του 20ου αιώνα ως αποτέλεσμα ανεξάρτητων μεταδόσεων διαφορετικών στελεχών του ιού της ανοσοανεπάρκειας των πρωτεύοντων (Simian Immunodeficiency Virus – SIV) στον άνθρωπο. Η μετάδοση του SIV στον άνθρωπο εκτιμάται ότι έγινε μέσω ζωνοσογώνων μολύνσεων που πιθανότατα προκλήθηκαν λόγω έκθεσης σε μολυσμένο αίμα ζώου. Ως ζωνόσος ορίζεται μια ασθένεια ζώων που μπορεί να μεταδοθεί στον άνθρωπο κάτω από φυσικές συνθήκες. Ως εκ τούτου, ο HIV αποτελεί ανθρώπινη νόσο ζωνοσοικής προέλευσης και όχι ζωνόσος.

Συγκεκριμένα, ο HIV-1 εκτιμάται ότι προήλθε από ένα SIV στέλεχος που προσβάλλει χιμπατζήδες του υποείδους *Pantroglodytes troglodytes* [SIV(cpz)] στο Καμερούν και εισήλθε τουλάχιστον δυο φορές στον ανθρώπινο οργανισμό μέσω ζωνοσογώνων μολύνσεων. Η πρώτη μετάδοση, η οποία και οδήγησε στη δημιουργία της ομάδας M, εκτιμάται ότι συνέβη στη Λαϊκή Δημοκρατία του Κονγκό στις αρχές της δεκαετίας του 1920. Ο ιός πιθανότατα μεταδόθηκε αρχικά εκεί σε τοπικό επίπεδο και στη συνέχεια εξαπλώθηκε στην Κινσάσα, απ' όπου πιθανόν ξεκίνησε και η πανδημία του HIV (Faria et al., 2014). Η δεύτερη μετάδοση του SIV(cpz) στον άνθρωπο πιθανότατα πραγματοποιήθηκε στο Καμερούν, και ήταν εκείνη που οδήγησε στη δημιουργία της ομάδας N. Αναφορικά με τις ομάδες O και P, εκτιμάται ότι η προέλευση τους ήταν από SIV στελέχη που μολύνουν γορίλλες (*Gorilla gorilla*) [SIV(gor)] (Εικόνα 7 A, B) (Gao et al., 1999; Takebe et al., 2008). Αναφορικά με τον HIV-2, εκτιμάται ότι προήλθε από διαφορετικά SIV στελέχη που μολύνουν πιθήκους του είδους *Sooty Mangabeys* (*Cercocebus atys*) [SIV(sm)] στη Δυτική Αφρική (Εικόνα 7 A) (Reeves et al., 2002; Tebit et al., 2011; Keele et al., 2006; Sharp et al., 2001; Van Heuverswyn et al., 2006).



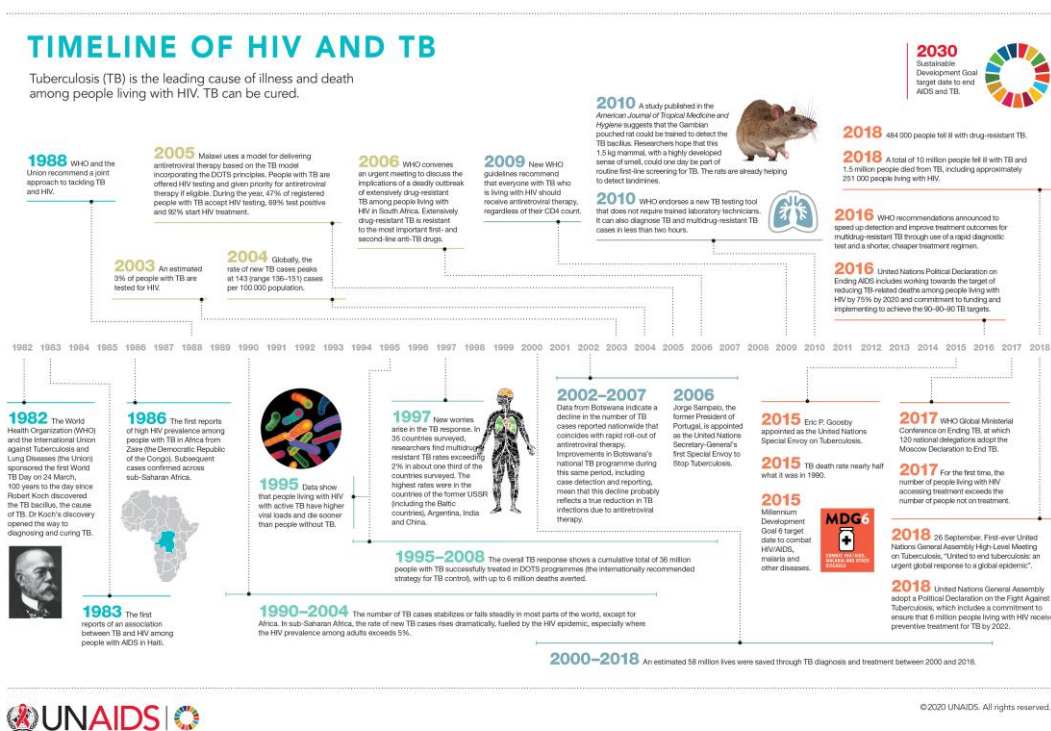
Εικόνα 7 Προέλευση των HIV-1 και HIV-2 (Beloukas et al., 2016).

Εστιάζοντας στην ομάδα M (στην οποία αποδίδεται η συντριπτική πλειοψηφία των HIV-1 μεταδόσεων παγκοσμίως), εκτιμάται ότι από τα μέσα της δεκαετίας του 1940 υπήρχαν ενεργές τοπικές επιδημίες του HIV-1 στην Κινσάσα (Faria et al., 2014). Η παγκόσμια εξάπλωση του HIV-1 εκτιμάται ότι ξεκίνησε στις αρχές της δεκαετίας του 1960, όταν επαγγελματίες από την Αϊτή που διέμεναν στην Αφρική και είχαν μολυνθεί με τον ιό επέστρεψαν στην Καραϊβική (Junqueira et al., 2016; Gilbert et al., 2007). Η Αϊτή τη δεκαετία του 1960 αποτελούσε χώρα δημοφιλή στους πολίτες των Ηνωμένων Πολιτειών Αμερικής (Η.Π.Α.) για σεξουαλικό τουρισμό, γεγονός το οποίο εξηγεί τόσο το μετέπειτα υψηλό επιπολασμό του HIV-1 στους άνδρες που κάνουν σεξ με άνδρες (Men who have Sex with Men – MSM), όσο και τη γρήγορη εισαγωγή του ιού στις Η.Π.Α. (Paraskevis et al., 2009; Beyrer et al., 2013), η οποία χρονολογείται στα τέλη της δεκαετίας του 1960 (εκτίμηση: 1969, 95% διάστημα αξιοπιστίας: 1966-1972) (Junqueira et al., 2016; Gilbert et al., 2007).

Μέχρι το 1980 ο HIV εκτιμάται ότι είχε προσβάλει ήδη 100.000 - 300.000 άτομα, παγκοσμίως. Παρόλο αυτά, λόγω του ότι ο συγκεκριμένος ιός παραμένει για μεγάλο διάστημα ασυμπτωματικός, μέχρι και το 1980 παρέμενε άγνωστος. Το 1981 καταγράφηκαν στο Λος Άντζελες των Η.Π.Α. τα πρώτα κλινικά περιστατικά AIDS, τα οποία αφορούσαν νέους MSM με συμπτώματα σπάνιας πνευμονικής λοίμωξης «Pneumocystis Carinii Pneumonia – PCP» (Εικόνα 8). Σε σύντομο χρονικό διάστημα παρατηρήθηκε αυξημένη επίπτωση περιστατικών από PCP και σάρκωμα Kaposi τόσο σε MSM όσο και σε XEN, αιμορροφιλικούς και μεταγγιζόμενους (Sepkowitz Kent, 2001; Michael, 1981; Friedman-Kien et al., 1982; Masur et al., 1981; Dimmock et al., 2016; Ryu, 2017; CDC, 1981; Friedman-Kien, 1981).

Το 1982 τα Κέντρα Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων των Η.Π.Α. (Centers for Disease Control and Prevention – CDC) έδωσαν στο συγκεκριμένο νόσημα την ονομασία AIDS (CDC, 1982). Το 1983 δύο ανεξάρτητες ερευνητικές ομάδες από τις Η.Π.Α. (επικεφαλής: Robert Gallo) και το Παρίσι (επικεφαλής: Luc Montagnier) κατάφεραν να απομονώσουν από το αίμα των ασθενών έναν καινούριο ρετροϊό, τον οποίο αρχικά η ομάδα του Gallo ονόμασε HTLV-III λόγω της παραπλήσιας μορφολογίας του με τον HTLV (Gallo et al., 1983), και στη συνέχεια η ομάδα του

Montagnier ονόμασε LAV (Lymphadenopathy - Associated Virus) (Barre-Sinoussi et al., 1983). Ακολούθησε ο Jay A. Levy το 1984 στο Σαν Φρανσίσκο, όπου μετά από έρευνα έδωσε στον ιό το όνομα ARV-2 (AIDS - associated retrovirus) (Levy et al., 1984). Τέλος, το 1986, και έπειτα από πολλές μελέτες, απεδείχθη ότι οι Gallo, Montagnier και Levy μελετούσαν τον ίδιο ιό, και έτσι ο ιός πήρε το σημερινό του όνομα, HIV, και αναγνωρίστηκε ως ο αιτιολογικός παράγοντας του AIDS (Εικόνα 8) (Acheson, 2011; Basavapathruni et al., 2007).



Εικόνα 8 Χρονικό πλαίσιο του HIV (<https://www.unaids.org/>).

3.5 Θεραπεία του HIV

Η HIV λοίμωξη αντιμετωπίζεται μέσω της δια βίου χορήγησης συνδυασμού αντιρετροϊκών φαρμάκων υψηλής δραστηριότητας (Antiretroviral Therapy – ART). Η ART δεν οδηγεί σε εκρίζωση του ιού αλλά αυξάνει σημαντικά το προσδόκιμο επιβίωσης των ανθρώπων που ζουν με HIV (People Living with HIV – PLHIV) επιβραδύνοντας και περιορίζοντας σημαντικά την εξάπλωσή του. Επιπρόσθετα, τα αντιρετροϊκά φάρμακα μειώνουν τη συγκέντρωση του ιού στα βιολογικά υγρά του φορέα, με αποτέλεσμα να επιτυγχάνουν μείωση της πιθανότητας μετάδοσής του σε άλλα άτομα. Μέσω της ART ο HIV αποτελεί σήμερα μια χρόνια και μη θανατηφόρα νόσο. Επιπρόσθετα, η θεραπεία ως πρόληψη (Treatment as Prevention – TasP) και η προφύλαξη πριν από την έκθεση (Pre Exposure Prophylaxis – PrEP) αποτελούν υποσχόμενες προσεγγίσεις πρόληψης για την εξάλειψη της πανδημίας του HIV (Cohen et al., 2011a; Grant et al., 2010; McCormack et al., 2015; Molina et al., 2015). Ειδικά η TasP αποτελεί έναν από τους τρεις κύριους πυλώνες του προγράμματος του Π.Ο.Υ. για την επίτευξη του παγκόσμιου στόχου 90-90-90 και τη μείωση της επίπτωσης του HIV παγκοσμίως.

Υπάρχουν έξι κατηγορίες αντιρετροϊκών φαρμάκων: 1) νουκλεοσιδικοί αναστολείς αντίστροφης μεταγραφάσης (Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors – NRTIs), 2) μη νουκλεοσιδικοί αναστολείς αντίστροφης μεταγραφάσης (Non-Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors – NNRTIs), 3) αναστολείς πρωτεάσης (Protease Inhibitors – PIs), 4) αναστολείς σύντηξης, 5) αναστολείς εισόδου και 6) αναστολείς σύντηξης ιντεγκράσης. Αναλυτικότερα, η πρώτη κατηγορία αντιρετροϊκών φαρμάκων που αναπτύχθηκε ήταν τα NRTIs, τα οποία αποτρέπουν την αντιγραφή του ιού διακόπτοντας τη διαδικασία αντιγραφής του DNA. Ακολούθησαν χρονικά τα PIs, τα οποία αποτρέπουν την αντιγραφή του ιού αναστέλλοντας τη δραστηριότητα του ενζύμου της πρωτεάσης. Και, τέλος, αναπτύχθηκαν τα NNRTIs, τα οποία μέσω συνδέσεων που δημιουργούν με το ένζυμο της αντίστροφης μεταγραφάσης εμποδίζουν την παραγωγή του ιικού DNA (Stolk et al., 2004).

Ένα από τα μειονεκτήματα της ART είναι η πιθανότητα ανάπτυξης αντοχής του ιού που μειώνει την ανασταλτική δράση της θεραπείας. Συγκεκριμένα, ως αντοχή στην αντιρετροϊκή θεραπεία ορίζεται η μείωση στην ανασταλτική επίδραση της θεραπείας στον ιικό πολλαπλασιασμό. Σε PLHIV που λαμβάνουν θεραπεία αλλά δεν έχει επιτευχθεί πλήρης καταστολή του ιού και ο πολλαπλασιασμός του συνεχίζεται ακόμα και σε χαμηλά επίπεδα, μπορούν να αναπτυχθούν στον ιό μεταλλαγές που συνδέονται με την ανάπτυξη αντοχής στα αντιρετροϊκά φάρμακα. Ως γενετικός φραγμός (genetic barrier) ορίζεται ο ελάχιστος αριθμός μεταλλαγών που απαιτούνται για την ανάπτυξη αντοχής. Σε αντίθεση με τις υπόλοιπες κατηγορίες φαρμάκων, τα PIs έχουν υψηλό γενετικό φραγμό (Beerenwinkel et al., 2005; Lanier et al., 2004). Ένα χαρακτηριστικό των ανθεκτικών στελεχών είναι το ότι μπορούν να μεταδοθούν (Keele et al., 2008; Pingen et al., 2011). Το υψηλότερο ποσοστό μεταδιδόμενης αντοχής (Transmitted Drug Resistance - TDR) εντοπίζεται στα NNRTIs, ενώ ακολουθούν τα NRTIs και τα PIs (Hofstra et al., 2016). Η επιδημιολογική επιτήρηση της αντοχής έχει ιδιαίτερη σημασία, ειδικά στους μη θεραπευμένους PLHIV, προκειμένου να βελτιστοποιηθεί η αποτελεσματικότητα του πρώτου θεραπευτικού σχήματος.

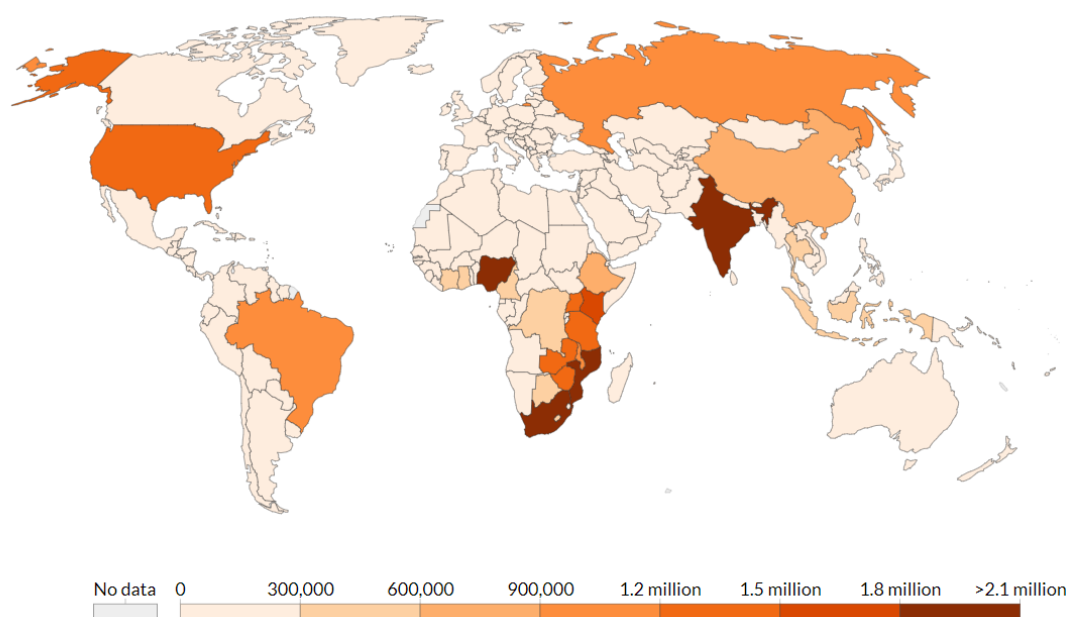
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

Επιδημιολογικά Δεδομένα της HIV-1 Λοίμωξης

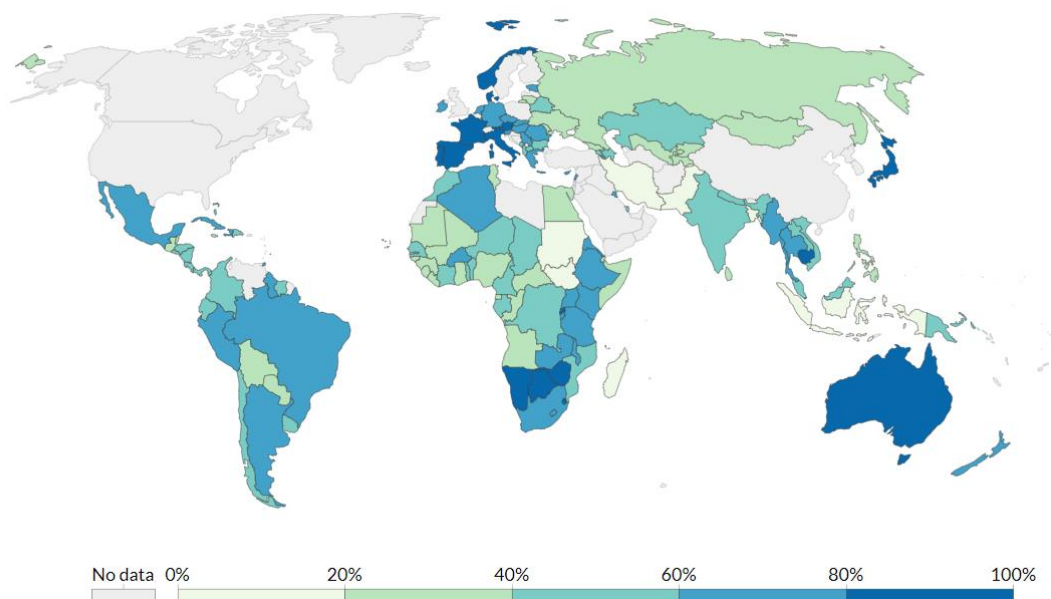
4.1 Υφήλιος

4.1.1 Επιδημιολογία της HIV-1 λοίμωξης ανά τον κόσμο

Ο HIV-1 έχει προκαλέσει την πανδημία του HIV και μέχρι σήμερα εξακολουθεί να αποτελεί ένα σημαντικό πρόβλημα δημόσιας υγείας. Σύμφωνα με τον Π.Ο.Υ., παγκοσμίως, 74,9 εκατομμύρια άνθρωποι έχουν μολυνθεί με HIV-1 και 32 εκατομμύρια έχουν πεθάνει από AIDS από την αρχή της επιδημίας. Εκτιμάται ότι μέχρι τα τέλη του 2018, 37,9 εκατομμύρια άνθρωποι ζουν με HIV-1 λοίμωξη. Εξ αυτών το 45,9% είναι άνδρες, το 49,6% γυναίκες και το 4,5% παιδιά με ηλικία μικρότερη των 15 ετών. Το μεγαλύτερο ποσοστό των PLHIV εντοπίζεται στην Αφρική (67,8%, 25,7 εκατομμύρια), ενώ μικρότερα ποσοστά εντοπίζονται σε Νοτιοανατολική Ασία (10%, 3,8 εκατομμύρια), Αμερική (9,2%, 3,5 εκατομμύρια) και Ευρώπη (6,6%, 2,5 εκατομμύρια) (Εικόνα 9). Επίσης, από το σύνολο των PLHIV μέχρι τα τέλη του 2018, 23,3 εκατομμύρια (61,5%) λαμβάνουν αντιρετροϊκή θεραπεία (Εικόνα 10) (WHO/UNAIDS, 2019).

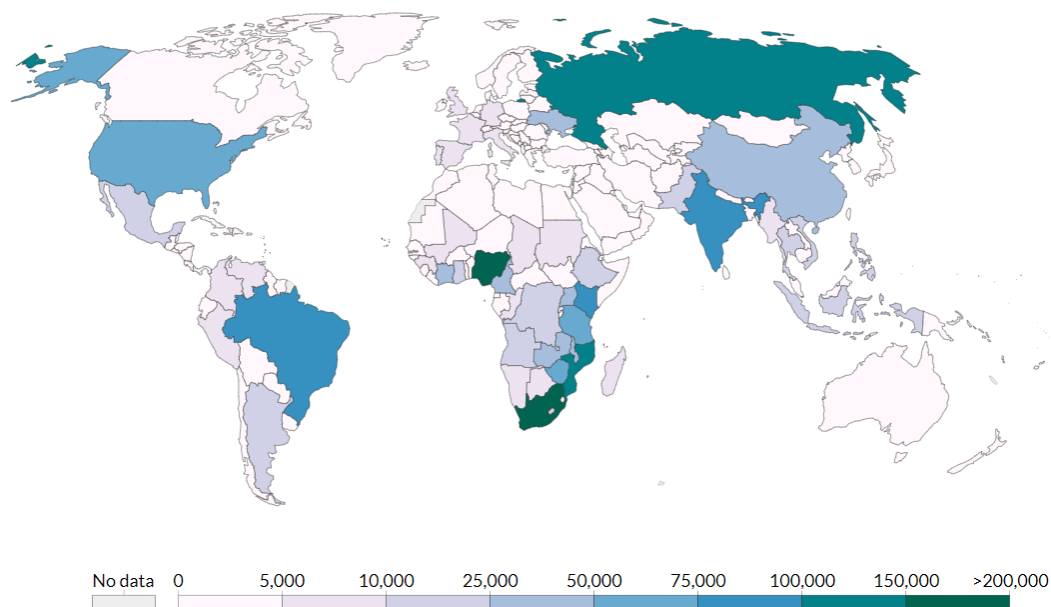


Εικόνα 9 Αριθμός ανθρώπων που ζουν με HIV-1 το χρονικό διάστημα 1990-2017 (IHME, *Global Burden of Disease*, 2019)



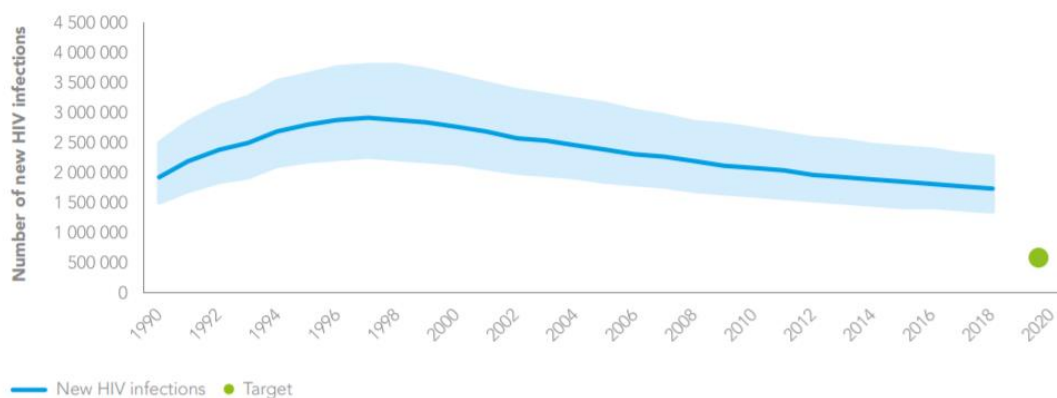
Εικόνα 10 Ποσοστό ανθρώπων που ζουν με HIV-1 και λαμβάνουν αντιρετροϊκή θεραπεία το χρονικό διάστημα 1990-2017 (WHO/UNAIDS, 2018)

Η αποτελεσματικότητα των μέτρων δημόσιας υγείας που εφαρμόζονται για την εξάλειψη της πανδημίας του HIV αξιολογούνται μέσω εκτίμησης του αριθμού των νέων HIV-1 μεταδόσεων και του αριθμού των θανάτων από AIDS. Το 2018 δηλώθηκαν 1,7 εκατομμύρια νέες HIV-1 μεταδόσεις παγκοσμίως. Το μεγαλύτερο ποσοστό εξ αυτών (64,7%, 1,1 εκατομμύρια) προέρχονταν από την Αφρική, ενώ αρκετά μικρότερα ποσοστά προέρχονταν από Νοτιοανατολική Ασία (10%, 170.000), Ευρώπη (10%, 170.000) και Αμερική (9,4%, 160.000) (Εικόνα 11). Παρατηρώντας διαχρονικά τον ετήσιο αριθμό νέων HIV-1 μεταδόσεων, αυτός βρέθηκε να παρουσιάζει πτωτική τάση της τάξης του 40% από το 1997 (2,9 εκατομμύρια) μέχρι το 2018 (1,7 εκατομμύρια) (Εικόνα 12) (WHO/UNAIDS, 2019).

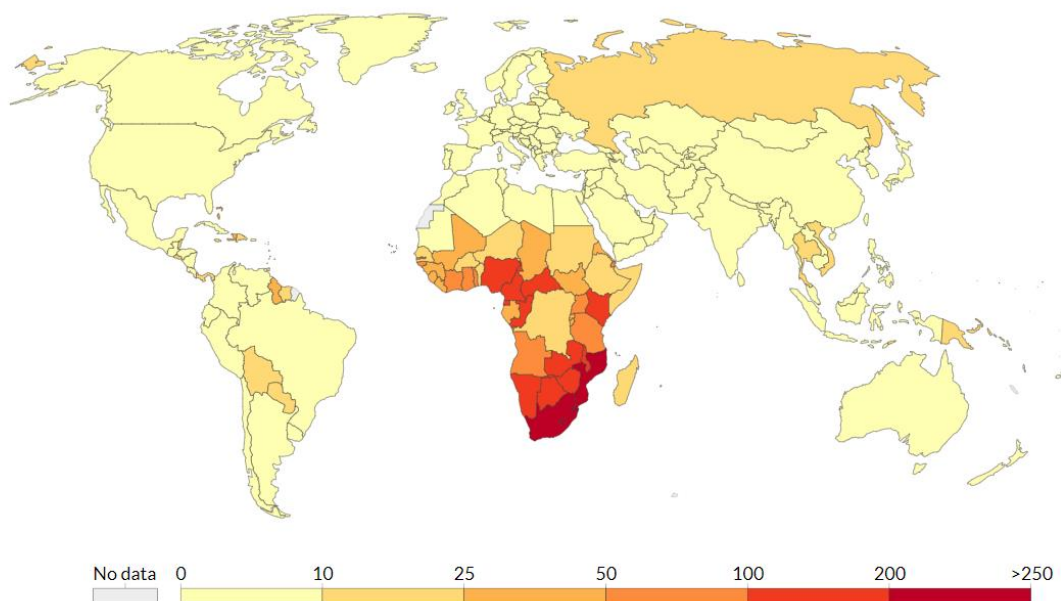


4

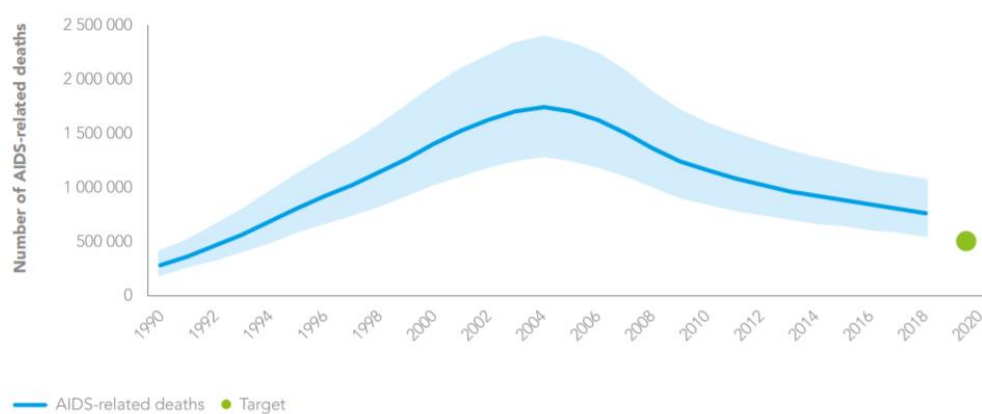
Εικόνα 11 Ετήσιος αριθμός νέων HIV-1 μεταδόσεων το χρονικό διάστημα 1990-2017 (IHME, *Global Burden of Disease*, 2019)



Εικόνα 12 Αριθμός νέων HIV-1 μεταδόσεων σε παγκόσμιο επίπεδο το χρονικό διάστημα 1990-2018 (WHO/UNAIDS, 2019)



Εικόνα 13 Ρυθμός θανάτων (αριθμός θανάτων ανά 100.000 άτομα) από AIDS το χρονικό διάστημα 1990-2017 (IHME, *Global Burden of Disease*, 2019)



Εικόνα 14 Αριθμός θανάτων από AIDS σε παγκόσμιο επίπεδο το χρονικό διάστημα 1990-2018 (WHO/UNAIDS, 2019)

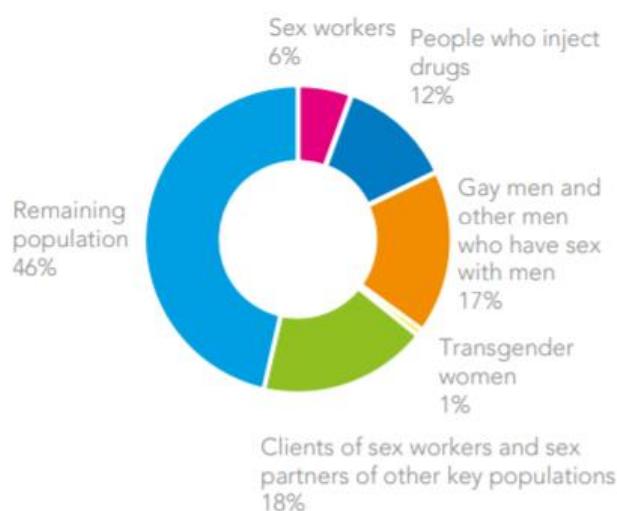
Αναφορικά με τους θανάτους από AIDS, το 2018 δηλώθηκαν 770.000 θάνατοι ανά την υφήλιο (Εικόνα 13). Όπως και ο ετήσιος αριθμός νέων HIV-1 μεταδόσεων, έτσι και ο ετήσιος αριθμός θανάτων από AIDS χαρακτηρίζεται από μείωση της τάξης του 55% από το 2004 (1,7 εκατομμύρια) μέχρι το 2018 (770.000). Η μείωση αυτή οφείλεται σε μεγάλο βαθμό στη χορήγηση αντιρετροϊκής θεραπείας (Εικόνα 14) (WHO/UNAIDS, 2019).

Παρόλο που οι ειδικοί πληθυσμοί αποτελούν ένα μικρό ποσοστό του γενικού πληθυσμού, διατρέχουν ιδιαίτερα υψηλό κίνδυνο για μόλυνση με HIV-1. Συγκεκριμένα, το 2018 περισσότερες από τις μισές (54%) νέες HIV-1 διαγνώσεις σε παγκόσμιο επίπεδο αφορούσαν ανθρώπους που ανήκουν σε ειδικούς πληθυσμούς (εκδιδόμενα άτομα, XEN, MSM, διαφυλικά άτομα, φυλακισμένους) και τους συντρόφους τους (Εικόνα 15). Επιπρόσθετα, εκτιμήθηκε ότι ο κίνδυνος μόλυνσης με HIV-1 των MSM είναι 22 φορές υψηλότερος συγκριτικά με άλλους ενήλικες άνδρες. Αντίστοιχα, βρέθηκε ότι υψηλότερο κίνδυνο μόλυνσης με HIV-1 διατρέχουν οι XEN (22 φορές υψηλότερο), τα εκδιδόμενα άτομα (21 φορές υψηλότερο) και τα διαφυλικά άτομα (12 φορές υψηλότερο) (WHO/UNAIDS, 2019).

Εικόνα 15

Κατανομή νέων HIV-1 διαγνώσεων ανά πληθυσμιακή ομάδα ατόμων ηλικίας 15-49 ετών το 2018

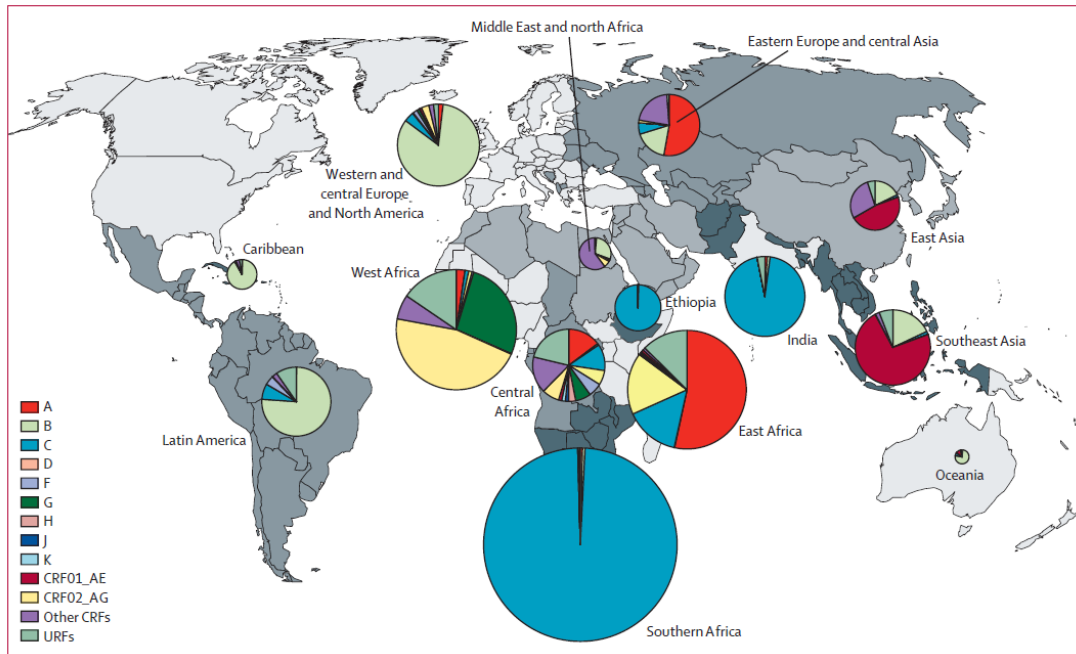
(WHO/UNAIDS, 2019)



4.1.2 Μοριακή επιδημιολογία της HIV-1 λοίμωξης ανά τον κόσμο

Ένα από τα κύρια χαρακτηριστικά της πανδημίας του HIV είναι η εκτενής γενετική ετερογένεια που παρουσιάζει σε παγκόσμια κλίμακα, η οποία οφείλεται στο γεγονός ότι τα HIV-1 στελέχη εξελίσσονται. Το χαρακτηριστικό αυτό του ιού αποτελεί σημαντικό εμπόδιο στην ανάπτυξη εμβολίου κατά του HIV-1, αυξάνει τους ρυθμούς εξέλιξης της νόσου και διαφοροποιεί τα πρότυπα αντοχής στα αντιρετροϊκά φάρμακα (Abecasis et al., 2006; Baeten et al., 2007; Brenner et al., 2003; Renjifo et al., 2004; Stephenson et al., 2013). Η πιο πρόσφατη συστηματική ανασκόπηση των Hemelaar και συνεργατών εκτίμησε τον επιπολασμό και την κατανομή των υπότυπων και ανασυνδυασμένων τύπων του ιού σε παγκόσμιο επίπεδο, χρησιμοποιώντας 383.519 δείγματα τα οποία συλλέχτηκαν ανά την υφήλιο το χρονικό διάστημα μεταξύ 1990 και 2015 (Hemelaar et al., 2018; Paraskevis et al., 2019).

Σύμφωνα με τους Hemelaar και συνεργάτες, τα στελέχη του HIV-1 έχουν επικρατήσει σε διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές ανά τον κόσμο (*Εικόνα 16*). Η μεγαλύτερη γενετική ετερογένεια του ιού εντοπίζεται στην κεντρική Υποσαχάρια Αφρική, όπου, παρά το γεγονός ότι έχουν αναφερθεί όλοι οι HIV-1 υπότυποι και πολλοί από τους ανασυνδυασμένους τύπους του ιού, οι υπότυποι A και C παρουσιάζουν τον υψηλότερο επιπολασμό. Επιπρόσθετα, το χρονικό διάστημα μεταξύ 2010 και 2015, το υψηλότερο ποσοστό URFs (21,3%) ανά τον κόσμο εντοπίστηκε στην Κεντρική Αφρική. Ο υπότυπος A βρέθηκε να επικρατεί στις χώρες της Κεντρικής και Ανατολικής Αφρικής, καθώς και στις χώρες της Ανατολικής Ευρώπης και της Κεντρικής Ασίας. Αντίθετα, ο υπότυπος B βρέθηκε να επικρατεί σε Δυτική και Κεντρική Ευρώπη, Βόρεια Αμερική, καθώς και σε πολλές χώρες της Λατινικής Αμερικής, της Καραϊβικής, της Αυστραλίας, της Βόρειας Αφρικής και της Μέσης Ανατολής. Ο υπότυπος C είχε ιδιαίτερα υψηλό επιπολασμό σε Νότια και Ανατολική Αφρική, και Ινδική Χερσόνησο. Τέλος, ο ανασυνδυασμένος τύπος CRF02_AG βρέθηκε να κυριαρχεί στη Δυτική Αφρική, ενώ ο ανασυνδυασμένος τύπος CRF01_AE εντοπίστηκε σε υψηλά ποσοστά στην Ανατολική και Νοτιοανατολική Ασία (Buonaguro et al., 2007; Hemelaar et al., 2018).

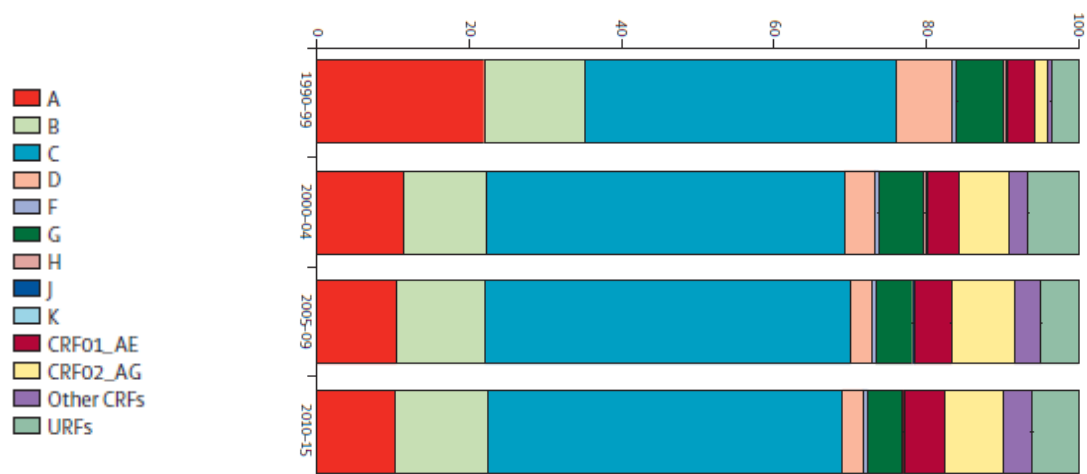
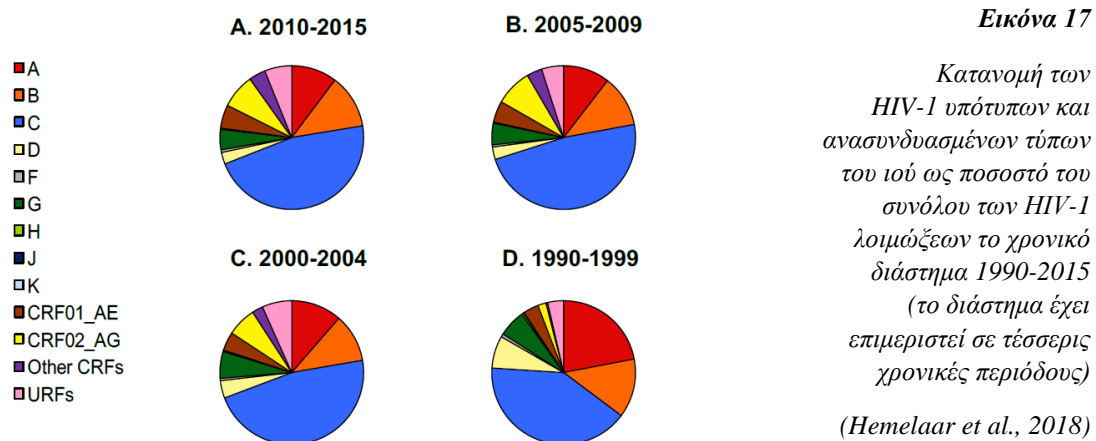


Εικόνα 16 Κατανομή των HIV-1 υπότυπων και ανασυνδυασμένων τύπων του ιού το χρονικό διάστημα 2010-2015 (Hemelaar et al., 2018)

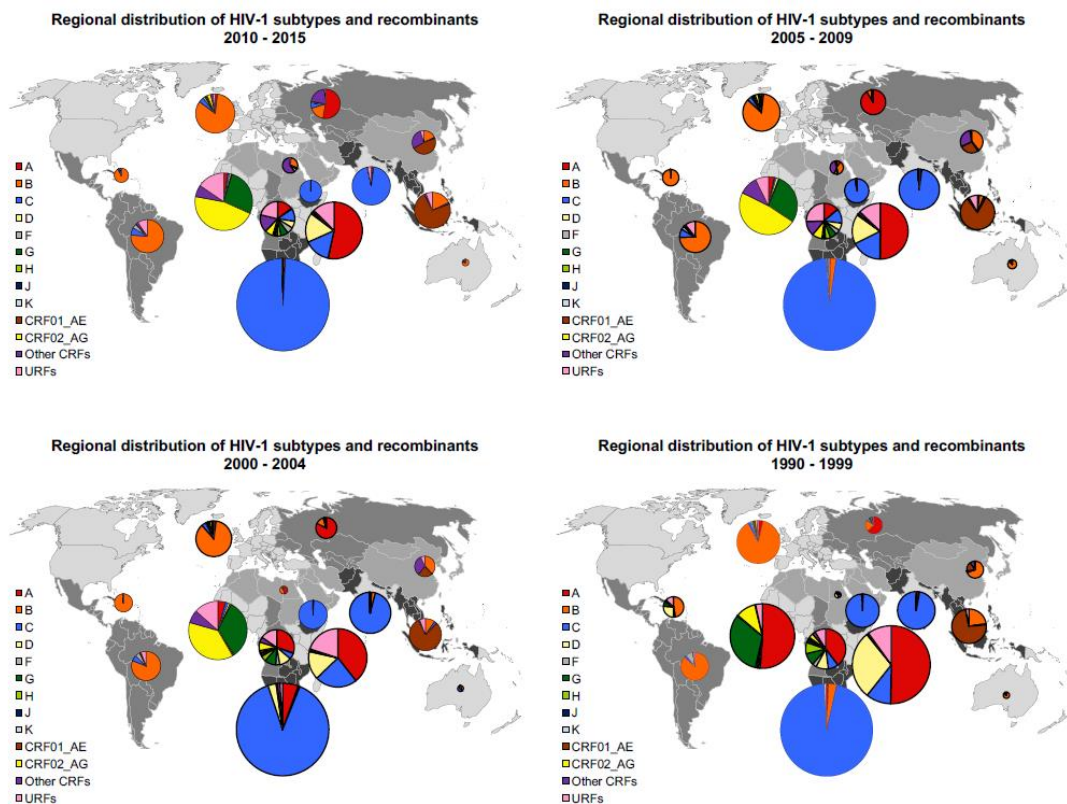
4.1.3 Επιπολασμός των HIV-1 υπότυπων ανά τον κόσμο

Το χρονικό διάστημα μεταξύ 2010 και 2015, ο επικρατέστερος HIV-1 υπότυπος παγκοσμίως ήταν ο C (46,6% του συνόλου των HIV-1 λοιμώξεων). Ακολουθούσαν με μικρότερα ποσοστά οι υπότυποι B (12,1%), A (10,3%), CRF02_AG (7,7%), CRF01_AE (5,3%), G (4,6%) και D (2,7%). Ο υπότυποι F, H, J και K εντοπίστηκαν με επιπολασμό 0,9% και οι ανασυνδυασμένοι τύποι του ιού (CRFs και URFs) με 22,8% αντίστοιχα (Hemelaar et al., 2018; Paraskevis et al., 2019). Η κατανομή των HIV-1 στελεχών αντανακλά τον επιπολασμό του ιού σε τοπικό επίπεδο. Το γεγονός ότι ο υπότυπος C έχει τον υψηλότερο επιπολασμό παγκοσμίως είναι αναμενόμενο δεδομένου ότι ο συγκεκριμένος υπότυπος κυριαρχεί στη Νότια Αφρική, όπου και εντοπίζεται το υψηλότερο ποσοστό PLHIV (Εικόνα 17) (Paraskevis et al., 2019).

Αναλυτικότερα, ο επιπολασμός του υπότυπου C παρουσίασε πτωτική τάση το χρονικό διάστημα 2010-2015 συγκριτικά με το διάστημα 2000-2009 (Εικόνα 17). Το διάστημα 2000-2015, το ποσοστό των μεταδόσεων που οφείλονταν στους υπότυπους A, D και G μειώθηκε, σε αντίθεση με τον επιπολασμό του υπότυπου B ο οποίος αυξήθηκε (Εικόνα 17) (Hemelaar et al., 2018; Paraskevis et al., 2019). Παρόλο που ο υπότυπος B ήταν υπεύθυνος σχεδόν για το σύνολο των HIV-1 λοιμώξεων στις χώρες μέτριου ή υψηλού κοινωνικοοικονομικού προφίλ (high-income countries) (δείκτης ανάπτυξης) κατά τα αρχικά στάδια της επιδημίας (Magiorkinis et al., 2016), οι Hemelaar και συνεργάτες έδειξαν ότι το διάστημα 2010-2015 ο επιπολασμός του υπότυπου B μειώθηκε στη Δυτική και Κεντρική Ευρώπη, καθώς και στην Αμερική (Εικόνα 18) (Hemelaar et al., 2018; Paraskevis et al., 2019).



Σημαντικές διαφορές εντοπίστηκαν και ως προς την κατανομή των HIV-1 υπότυπων στην Ανατολική Ευρώπη και την Κεντρική Ασία, όπου ο επιπολασμός του υπότυπου A μειώθηκε από 91,3% το διάστημα 2005-2009 σε 52,8% το διάστημα 2010-2015, ενώ ο επιπολασμός των υπότυπων B, C και των CRFs αυξήθηκε (Εικόνα 18). Η αύξηση που παρατηρήθηκε στον επιπολασμό των CRFs οφείλονταν κυρίως στον αυξημένο αριθμό μεταδόσεων του CRF63_02A1 στους ΧΕΝ της Κεντρικής Ασίας και της Ρωσίας. Ο επιπολασμός των CRFs (και κυρίως του CRF35_AD) βρέθηκε να αυξάνεται και στη Μέση Ανατολή και τη Βόρεια Αφρική, ενώ η Νοτιοανατολική Ασία ήταν η περιοχή με το υψηλότερο ποσοστό CRF01_AE (72,8%) το χρονικό διάστημα 2010-2015 (Εικόνα 18) (Hemelaar et al., 2018; Paraskevis et al., 2019).



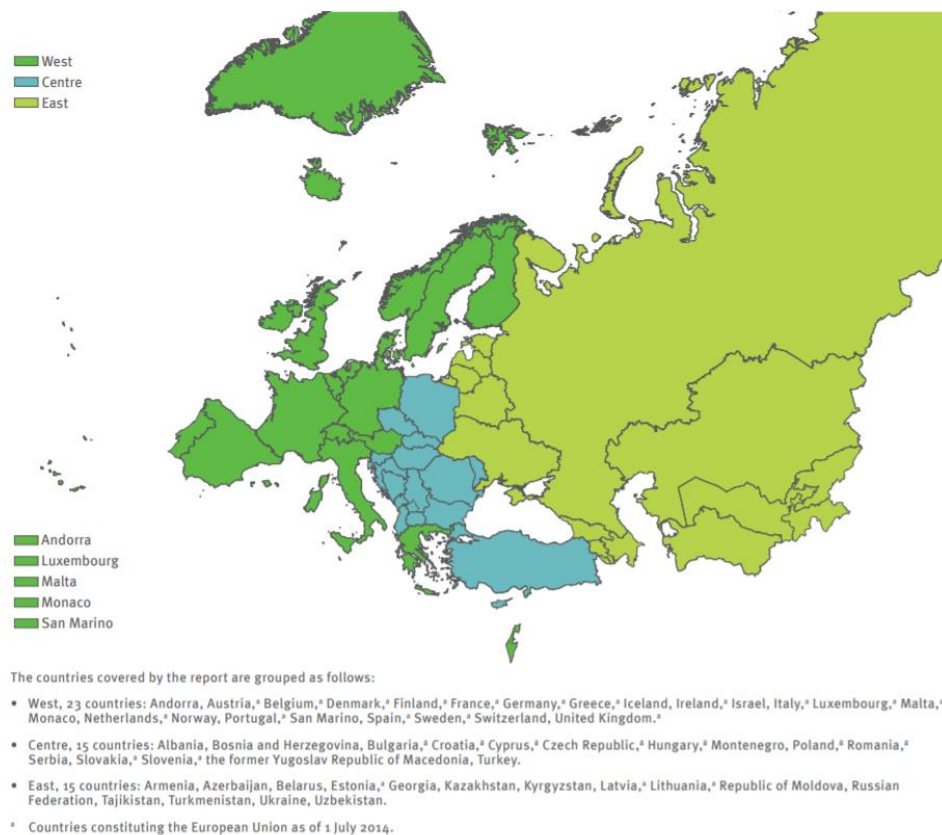
Εικόνα 18 Κατανομή των HIV-1 υπότυπων και ανασυνδυασμένων τύπων του ιού το χρονικό διάστημα 1990-2015 (ανά επιμέρους χρονικές περιόδους) (Hemelaar et al., 2018)

Παρόλο που η παγκόσμια κατανομή των HIV-1 υπότυπων εξαρτάται από πολλούς παράγοντες – επιπολασμός του HIV-1, μετακινήσεις ανθρώπινων πληθυσμών, κοινωνικοοικονομικοί παράγοντες, διαφορές στα χαρακτηριστικά των στελεχών του ιού, διαφορές στην πρόσβαση στην αντιρετροϊκή θεραπεία και τη κλινική φροντίδα – σε αρκετές περιπτώσεις το ποσοστό των ανασυνδυασμένων τύπων του ιού αυξήθηκε συγκριτικά με άλλους υπότυπους. Η αύξηση αυτή θα μπορούσε να οφείλεται και σε διαφορές μεταξύ των ανασυνδυασμένων στελεχών και των υπότυπων του ιού ως προς τη μεταδοτικότητα (Kiwanuka et al., 2009; Paraskevis et al., 2019). Τέλος, το γεγονός ότι μειώθηκε ο παγκόσμιος επιπολασμός του υπότυπου C, ο οποίος αποτελεί το κυρίαρχο HIV-1 στέλεχος στη Νότια Αφρική, εγείρει ελπίδες για επίτευξη του παγκόσμιου στόχου 90-90-90 του Π.Ο.Υ. και τον περιορισμό της επιδημίας (Paraskevis et al., 2019).

4.2 Ευρώπη

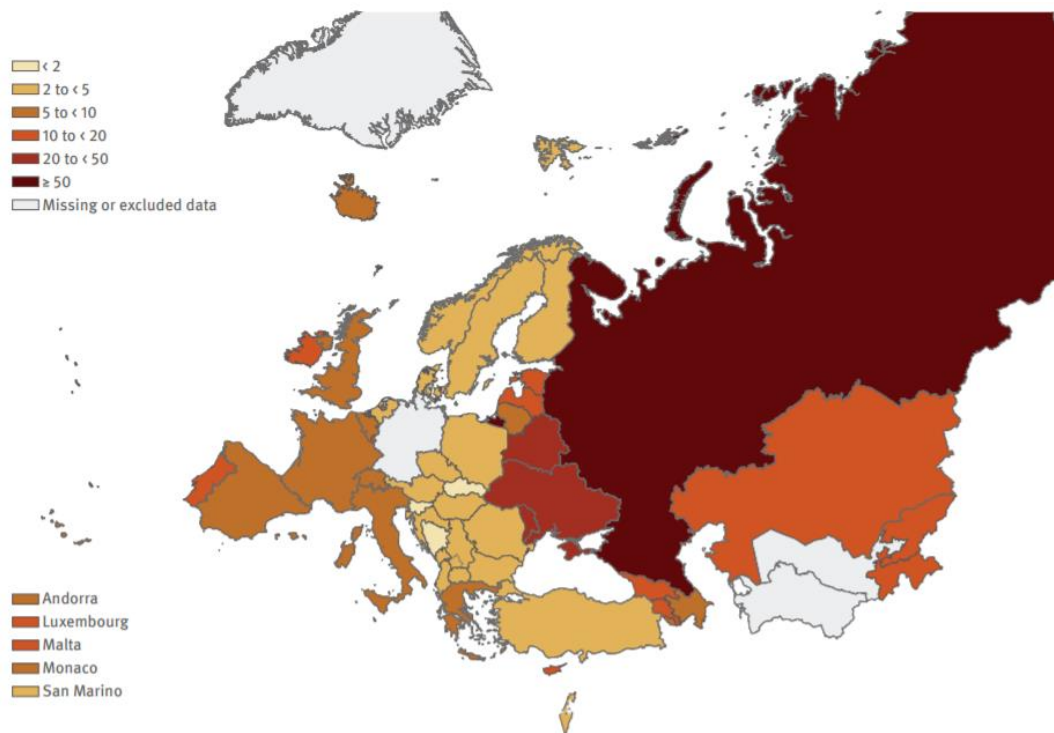
4.2.1 Επιδημιολογία της HIV-1 λοίμωξης στην Ευρώπη

Μέχρι το τέλος του 2017, ο συνολικός αριθμός των HIV-1 διαγνώσεων στην Ευρώπη (Ευρωπαϊκή Ένωση, Ευρωπαϊκή Οικονομική Κοινότητα, Ρωσία και χώρες της πρώην Ε.Σ.Σ.Δ., *Εικόνα 19*) από την αρχή της επιδημιολογικής επιτήρησης ήταν 2.332.391, με τις μισές (52%) από αυτές να εντοπίζονται στη Ρωσία. Το ίδιο έτος (2017) οι νέες HIV-1 διαγνώσεις ήταν 159.420, με το 82% εξ αυτών να προέρχεται από την Ανατολική, το 14% από τη Δυτική και το 4% από την Κεντρική Ευρώπη. Επιπρόσθετα, η επίπτωση του ιού εκτιμήθηκε στην Ανατολική Ευρώπη 8 φορές υψηλότερη συγκριτικά με τη Δυτική (51,1 έναντι 6,9 ανά 100.000 άτομα) και 16 φορές υψηλότερη συγκριτικά με την Κεντρική Ευρώπη (51,1 έναντι 3,2 ανά 100.000 άτομα) (ECDC, 2018).



Εικόνα 19 Επιμερισμός της Ευρώπης σε Δυτική, Ανατολική και Κεντρική με βάση γεωγραφικά και επιδημιολογικά κριτήρια (ECDC, 2018)

Τα τελευταία 10 χρόνια, παρά τις στρατηγικές παρέμβασης και τα εκτεταμένα προγράμματα πρόληψης που έχουν εφαρμοστεί στην Ευρώπη για την εξάλειψη των νέων HIV-1 λοιμώξεων, ο ρυθμός των νέων μολύνσεων αυξήθηκε κατά 37%, και συγκεκριμένα από 14,6 ανά 100.000 το 2008 σε 20,0 ανά 100.000 το 2017. Η αύξηση αυτή οφείλεται κατά κύριο λόγο στην ανοδική τάση του ρυθμού των νέων μολύνσεων στην Ανατολική Ευρώπη, όπου από 30,4 το 2008 αυξήθηκε σε 51,1 το 2017 (Εικόνα 20). Ενδιαφέρον προκαλεί το γεγονός ότι περισσότερο από το ένα τρίτο των νέων μολύνσεων είναι μεταξύ μεταναστών. Ο κύριος τρόπος μετάδοσης του ιού στην Ευρώπη είναι η σεξουαλική επαφή χωρίς προφύλαξη μεταξύ ανδρών, με εξαίρεση τις χώρες της Ανατολικής Ευρώπης όπου οι μεταδόσεις πραγματοποιούνται κυρίως μέσω ετεροφυλοφιλικών επαφών χωρίς προφύλαξη και χρήσης ενδοφλέβιων ναρκωτικών (ECDC, 2018).



Εικόνα 20 Νέες HIV-1 διαγνώσεις ανά 100.000 πληθυσμού (ECDC, 2018)

4.2.2 Μοριακή επιδημιολογία της HIV-1 λοίμωξης στην Ευρώπη

Μελέτες μοριακής ανάλυσης έδειξαν ότι η εισαγωγή του HIV-1 στην Ευρώπη πραγματοποιήθηκε στις αρχές της δεκαετίας του 1980 (Brunet et al., 1984; Glauser et al., 1984; Melbye et al., 1984; Robbins et al., 2003). Την εποχή εκείνη οι περισσότερες μεταδόσεις του ιού σχετίζονταν με στελέχη υπότυπου B και αφορούσαν κυρίως MSM, ετεροφυλόφιλους, αιμορροφιλικούς και XEN (Brunet et al., 1984; Melbye et al., 1984).

Τα τελευταία 15 χρόνια η γεωγραφική κατανομή των HIV-1 υπότυπων και CRFs στην Ευρώπη έχει διαφοροποιηθεί σημαντικά και, πλέον, χαρακτηρίζεται από υψηλή ετερογένεια (Abecasis et al., 2013; Hemelaar et al., 2011; Hemelaar et al., 2018). Παρόλο που από την αρχή της επιδημίας μέχρι και σήμερα ο B αποτελεί τον κυρίαρχο HIV-1 υπότυπο στις χώρες της Δυτικής και Κεντρικής Ευρώπης, πλέον η κάθε χώρα έχει τα δικά της χαρακτηριστικά αναφορικά με τη μοριακή επιδημιολογία του HIV-1. Το γεγονός αυτό οφείλεται, κυρίως, στο ότι στελέχη μη B υπότυπων και CRFs εισήχθησαν στην Ευρώπη μέσω μεταναστευτικών κυμάτων από χώρες στις οποίες εντοπίζονταν με υψηλό επιπολασμό, και στη συνέχεια διαδόθηκαν μεταξύ των τοπικών πληθυσμών των χωρών της Δυτικής και Κεντρικής Ευρώπης (Abecasis et al., 2013; de Oliveira et al., 2010; Fabeni et al., 2015; Fox et al., 2010; Hemelaar et al., 2011; Hoenigl et al., 2016; Simonetti et al., 2014; Tamalet et al., 2015). Σε αντίθεση με τη Δυτική και την Κεντρική, στην Ανατολική Ευρώπη κυριαρχεί ο υπότυπος A από τα μέσα περίπου της δεκαετίας του 1990 (Abecasis et al., 2013; Hemelaar et al., 2011). Τα στελέχη του συγκεκριμένου υπότυπου διαδόθηκαν με μεγάλη ταχύτητα μεταξύ των XEN στις χώρες της πρώην Ε.Σ.Σ.Δ., προκαλώντας μία από τις πιο γρήγορα εξελισσόμενες επιδημίες στον κόσμο (Bobkova, 2013). Λόγω του τρόπου διασποράς χαρακτηρίστηκαν ως ένας νέος υπό-υπότυπος με την ονομασία A_{FSU}, αρχικά, και A₆ μεταγενέστερα (Bobkov et al., 1997; Bobkov et al., 2004; Bobkova, 2013).

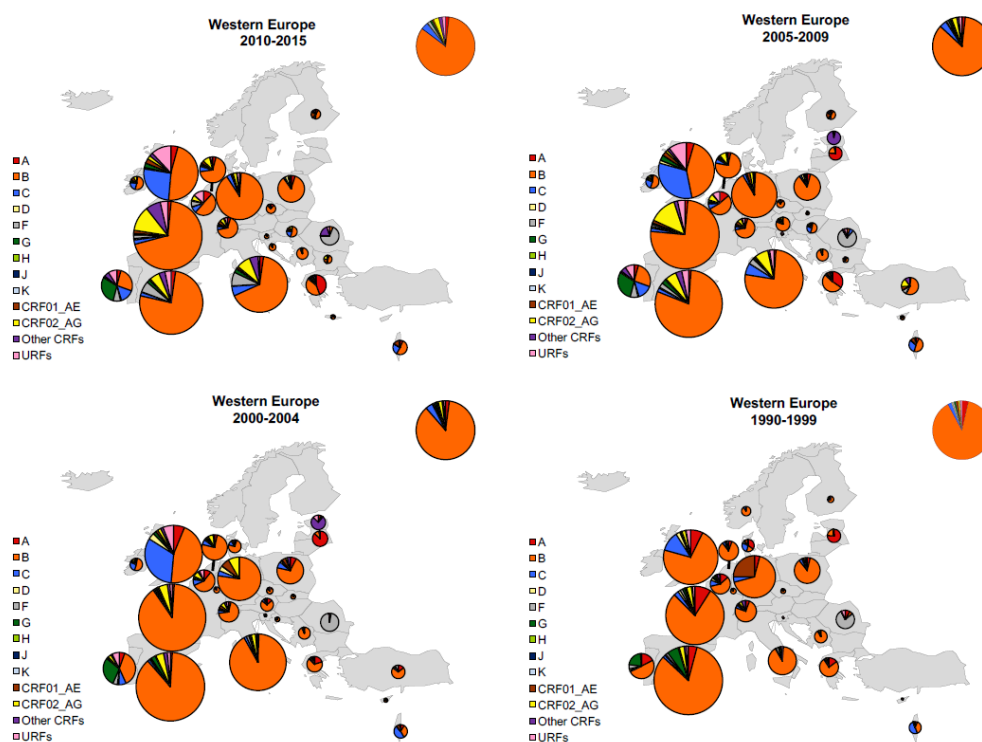
4.2.3 Επιπολασμός των HIV-1 υπότυπων στην Ευρώπη

Οι Beloukas και συνεργάτες περιέγραψαν την εξέλιξη της επιδημίας του HIV-1 στην Ευρώπη δίνοντας ιδιαίτερη έμφαση στον επιπολασμό των στελεχών του ιού και στις αλλαγές του στην πορεία του χρόνου (Beloukas et al., 2016). Στα πλαίσια της παραπάνω μελέτης χρησιμοποιήθηκαν δεδομένα από τη μελέτη κοόρτης SPREAD (Strategy to Control Spread of HIV Drug Resistance) (Abecasis et al., 2013), από μία δημοσιευμένη ανασκόπηση των Hemelaar και συνεργατών (Hemelaar et al., 2011) και από τη βάση δεδομένων του HIV (Los Alamos HIV Sequences Database, www.hiv.lanl.gov).

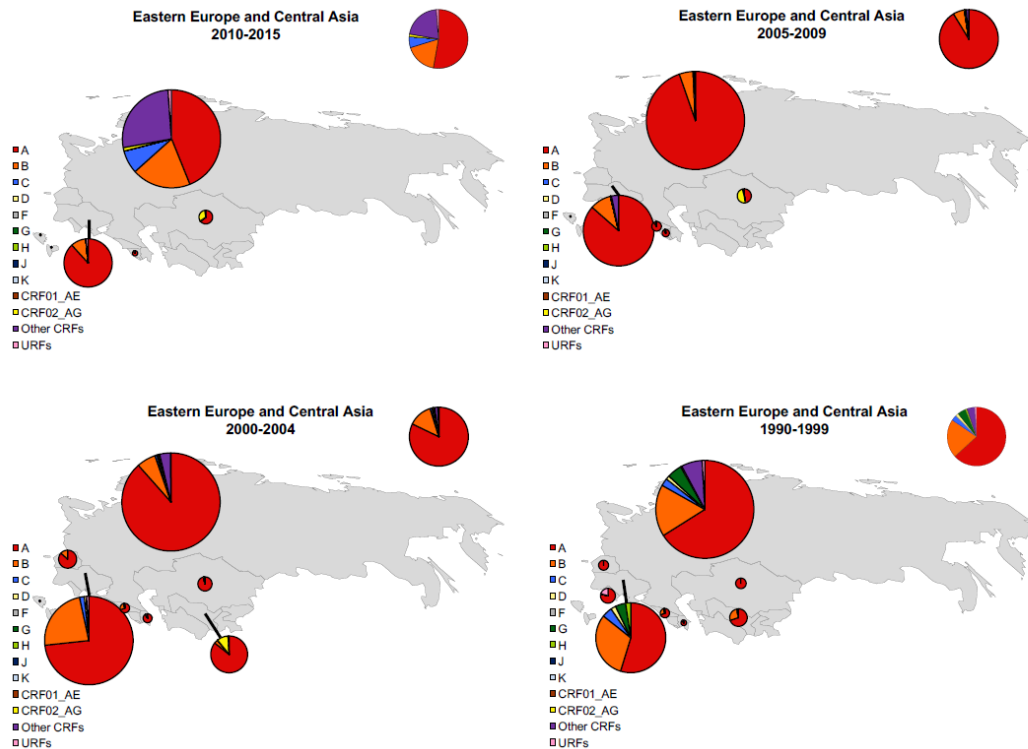
Τα δεδομένα της κοόρτης SPREAD, τα οποία προήλθαν από 20 Ευρωπαϊκές χώρες και το Ισραήλ, έδειξαν ότι ο πιο συχνός υπότυπος μεταξύ των πρόσφατα διαγνωσμένων PLHIV στην Ευρώπη είναι ο B (70,2%), ενώ ακολουθούν οι υπότυποι C, CRF02_AG, G και A με ποσοστά 5,0%, 4,9%, 4,8% και 3,6% αντίστοιχα. Παρόλο αυτά, εντοπίστηκαν χώρες, όπως η Πορτογαλία, η Κύπρος, η Σουηδία και η Ελλάδα, όπου ο υπότυπος B είναι λιγότερο συχνός μεταξύ των νέων διαγνώσεων (<50%), και άλλες, όπως η Τσεχία, η Γερμανία, η Ισπανία, η Σλοβενία και η Πολωνία, όπου ο επιπολασμός του συγκεκριμένου υπότυπου ξεπερνά το 80%. Βρέθηκε, επίσης, ότι στελέχη των υπότυπων A και G έχουν προκαλέσει διασπορά μεταξύ του τοπικού πληθυσμού σε Ελλάδα και Πορτογαλία αντίστοιχα. Μοναδική περίπτωση βρέθηκε να αποτελεί η Ρουμανία, όπου ο F είναι ο επικρατέστερος υπότυπος από την αρχή της επιδημίας στη χώρα και οι μη F υπότυποι αντιστοιχούν στο 23% (ποσοστό που πριν το 2007 ήταν μόλις 5%).

Τα ευρήματα της ανασκόπησης των Hemelaar και συνεργατών (Hemelaar et al., 2011), τα οποία αφορούσαν εκτιμήσεις για το χρονικό διάστημα 2004-2007, επιβεβαίωσαν εκείνα που προήλθαν από την κοόρτη SPREAD. Συγκεκριμένα, σύμφωνα με τους Hemelaar και συνεργάτες, το διάστημα 2004-2007 ο υπότυπος B επικρατούσε στο σύνολο των μεταδόσεων του ιού σε Δυτική και Κεντρική Ευρώπη με ποσοστό 85,2%. Μεταξύ των μη B υπότυπων οι πιο συχνοί ήταν οι CRF02_AG (4,5%),

C (1,91%) και A (1,76%) (Hemelaar et al., 2011). Τα παραπάνω ευρήματα επιβεβαιώθηκαν περαιτέρω από την πιο πρόσφατη μελέτη των Hemelaar και συνεργατών, από την οποία αναδείχτηκε ότι, αν και ο επιπολασμός του υπότυπου B στη Δυτική και Κεντρική Ευρώπη μειώθηκε το χρονικό διάστημα 2010-2015, ο B παραμένει το επικρατέστερο HIV-1 στέλεχος (Εικόνα 21) (Hemelaar et al., 2018). Επιπρόσθετα, η πιο πρόσφατη μελέτη των Hemelaar και συνεργατών ανέδειξε την ύπαρξη σημαντικών διαφορών στην κατανομή των HIV-1 υπότυπων στην Ανατολική Ευρώπη και την Κεντρική Ασία, όπου ο επιπολασμός του υπότυπου A μειώθηκε από 91,3% το χρονικό διάστημα 2005-2009 σε 52,8% το διάστημα 2010-2015, και ο επιπολασμός των υπότυπων B και C, καθώς και των CRFs αυξήθηκε (Εικόνα 22) (Hemelaar et al., 2018). Η αύξηση που παρατηρήθηκε στον επιπολασμό των CRFs οφείλονταν κυρίως στον αυξημένο αριθμό μεταδόσεων του CRF63_02A1 στους XEN της Κεντρικής Ασίας και της Ρωσίας.



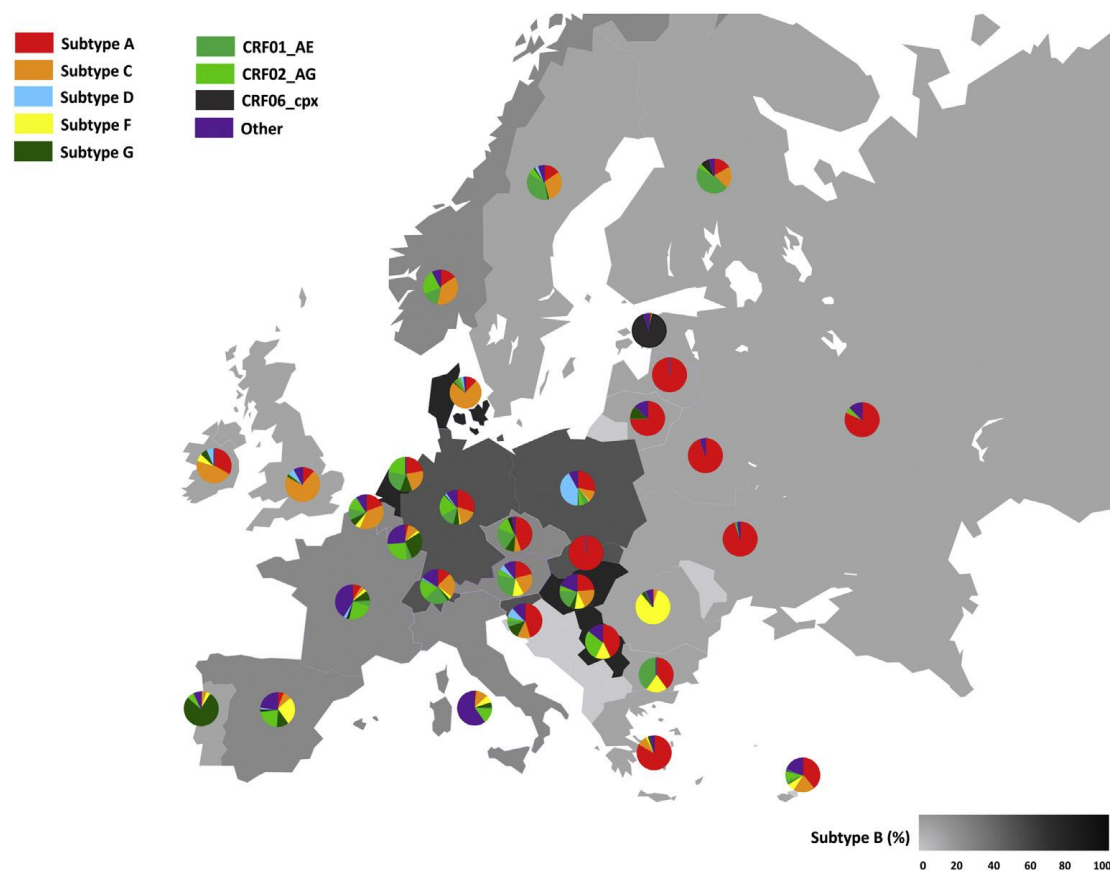
Εικόνα 21 Κατανομή των HIV-1 υπότυπων και ανασυνδυασμένων τύπων του ιού το χρονικό διάστημα 1990-2015 (ανά επιμέρους χρονικές περιόδους) σε Δυτική και Κεντρική Ευρώπη (Hemelaar et al., 2018)



Εικόνα 22 Κατανομή των HIV-1 υπότυπων και ανασυνδυασμένων τύπων του ιού το χρονικό διάστημα 1990-2015 (ανά επιμέρους χρονικές περιόδους) σε Ανατολική Ευρώπη και Κεντρική Ασία (Hemelaar et al., 2018)

Τέλος, οι Beloukas και συνεργάτες έδειξαν ότι οι εκτιμήσεις που προήλθαν από δεδομένα της βάσης δεδομένων του HIV (Los Alamos HIV Sequences Database) για τη Δυτική και την Κεντρική Ευρώπη συμπίπτουν με εκείνες από τα δεδομένα της κοόρτης SPREAD (Beloukas et al., 2016). Συγκεκριμένα, ο υπότυπος B εντοπίστηκε σε ποσοστό 69,4%, ο C 7,0%, ο A 3,5%, ο CRF02_AG 3,2%, ο F 3,0%, ο G 2,9%, ο CRF06_cpx 2,8% και ο CRF01_AE 1,7%. Η Ρουμανία (85,4%), η Ιρλανδία (68,2%), το Λουξεμβούργο (67,2%), η Πορτογαλία (63,0%), η Βουλγαρία (62,5%), η Κύπρος (61,1%), η Φιλανδία (57,1%), η Ελλάδα (54,0%), το Ηνωμένο Βασίλειο (50,4%) και η Σουηδία (49,2%) βρέθηκαν να έχουν τα υψηλότερα ποσοστά μη B υπότυπων (Εικόνα 23). Ο υπότυπος A ήταν ο επικρατέστερος μη B υπότυπος σε Σλοβενία, Τσεχία, Πολωνία, Ελλάδα και Κύπρο, ο C σε Ηνωμένο Βασίλειο και Δανία, και ο G στην Πορτογαλία (Εικόνα 23). Πολλαπλά στελέχη του ιού εντοπίστηκαν σε υψηλά ποσοστά

σε Ελβετία (A, C, CRF01_AE, CRF02_AG), Ιταλία (C, F, G, CRF02_AG), Σουηδία (C, CRF01_AE), Γαλλία (A, G, CRF01_AE, CRF02_AG) και Ισπανία (A, C, F, G, CRF02_AG) (Εικόνα 23). Αναφορικά με την Ανατολική Ευρώπη, παρατηρήθηκε αυξητική τάση των μη A υπότυπων. Αναλυτικότερα, στη Ρωσία και τις υπόλοιπες χώρες της πρώην Ε.Σ.Σ.Δ. κυριαρχεί ο υπότυπος A, με μοναδική εξαίρεση την Εσθονία όπου ο πιο συχνός υπότυπος είναι ο CRF06_cpx. Επίσης, στη Ρωσία εντοπίστηκαν με χαμηλότερα ποσοστά οι υπότυποι B (6,5%), CRF63_02A1 (8,9%), CRF02_AG (4,0%) και C (1,4%) (Εικόνα 23). Παρόλο αυτά, είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι οι συγγραφείς επισήμαναν ότι αν και τα δεδομένα από τη βάση δεδομένων του HIV είναι πιο πρόσφατα, οι εκτιμήσεις που προήλθαν από αυτά μπορούν να χρησιμοποιηθούν μόνο ως αδρές, και πρέπει να ερμηνευτούν με ιδιαίτερη προσοχή δεδομένου του ότι ενδέχεται να μην αντιπροσωπεύουν τον πραγματικό πληθυσμό των PLHIV στην Ευρώπη (Beloukas et al., 2016).



Εικόνα 23 Γεωγραφική κατανομή των πιο συχνών μη B HIV-1 υπότυπων και CRFs στην Ευρώπη (Beloukas et al., 2016)

4.2.4 Προέλευση των μη B HIV-1 υπότυπων και CRFs στην Ευρώπη

Οι μη B υπότυποι και CRFs στην Ευρώπη εντοπίζονται κυρίως σε μετανάστες και ετεροφυλόφιλους. Η προέλευση των στελεχών αυτών μπορεί να περιγραφεί από τα παρακάτω πρότυπα: i) Μεταδόσεις μεταξύ ηπείρων: τα μη B στελέχη εισάγονται στη Δυτική Ευρώπη μέσω μεταναστευτικών κυμάτων πληθυσμών, κυρίως από Αφρική και σε μικρότερο βαθμό από Νοτιοανατολική Ασία και Νότια Αμερική. ii) Μεταδόσεις μεταξύ χωρών της Δυτικής Ευρώπης: σε αρκετές περιπτώσεις έχει βρεθεί ότι τα μη B στελέχη που εντοπίζονται σε χώρες της Δυτικής Ευρώπης έχουν προέλευση από άλλες χώρες της Δυτικής Ευρώπης. Για παράδειγμα, τα στελέχη του υπότυπου G στο Λουξεμβούργο και την Ισπανία είχαν προέλευση την Πορτογαλία, και του CRF14_BG στην Ισπανία, επίσης, την Πορτογαλία. iii) Μεταδόσεις μεταξύ γεωγραφικών περιοχών της Ευρώπης: πολλά μη B στελέχη τα οποία εντοπίστηκαν στην Ανατολική Ευρώπη έχει βρεθεί ότι προήλθαν από χώρες της Κεντρικής και της Δυτικής Ευρώπης. Επιπρόσθετα, ένας σημαντικός αριθμός στελεχών υπότυπου A από την Ανατολική Ευρώπη έχει εντοπιστεί σε χώρες της Κεντρικής και της Δυτικής Ευρώπης (Beloukas et al., 2016).

4.2.5 Επιπολασμός των HIV-1 υπότυπων σε μετανάστες στην Ευρώπη

Τις τελευταίες δυο περίπου δεκαετίες, τα μεταναστευτικά κύματα πληθυσμών, κυρίως, από Αφρική και Ασία έχουν αλλάξει τη σύνθεση του πληθυσμού των Ευρωπαϊκών χωρών, και σε αρκετές περιπτώσεις η ύπαρξη τους έχει συνδεθεί με επιδημίες λοιμωδών νοσημάτων όπως του HIV-1 (Kentikelenis et al., 2015). Σύμφωνα με το επιδημιολογικό δελτίο του Ευρωπαϊκού Κέντρου Πρόληψης και Ελέγχου Νοσημάτων (European Centre for Disease Prevention and Control – ECDC), το 2017 το 41% των νέων HIV-1 μεταδόσεων εντοπίστηκε σε μετανάστες, δηλαδή σε άτομα τα οποία είχαν γεννηθεί εκτός της χώρας διαμονής τους. Συγκεκριμένα, το 18% των νέων HIV-1 μεταδόσεων εντοπίστηκε σε άτομα από χώρες της Υποσαχάριας Αφρικής, το 8% από χώρες της Λατινικής Αμερικής και της Καραϊβικής, το 6% από χώρες της

Κεντρικής και της Ανατολικής Ευρώπης και το 4% από χώρες της Δυτικής Ευρώπης (ECDC, 2018).

Δεδομένου ότι το μεγαλύτερο ποσοστό των μεταναστών έχει μολυνθεί με μη Β στελέχη, το πιθανότερο σενάριο είναι ένα ποσοστό των ατόμων αυτών να είχε μολυνθεί στη χώρα προέλευσής του και στη συνέχεια να προκάλεσε περαιτέρω μετάδοση των στελεχών αυτών στην Ευρώπη. Το σενάριο αυτό επιβεβαιώνεται από την κατάσταση που επικρατεί σήμερα στη Δυτική Ευρώπη, όπου τα μη Β στελέχη εντοπίζονται με υψηλό επιπολασμό μεταξύ των μη Ευρωπαίων. Φυσικά υπάρχουν και εξαιρέσεις, όπως η Ελλάδα και η Πορτογαλία, όπου οι μεταδόσεις των μη Β στελεχών πραγματοποιούνται σε τοπικό επίπεδο μέσω σεξουαλικών επαφών χωρίς προφύλαξη (Thomson et al., 2007). Στην Κεντρική Ευρώπη η κατάσταση είναι διαφορετική. Τα μη Β στελέχη μεταδίδονται κυρίως μέσω ετεροφυλοφιλικών επαφών και δε σχετίζονται με μεταδόσεις μεταξύ μεταναστών. Τέλος, τα πρότυπα διασποράς των μη Β στελεχών παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές μεταξύ των χωρών της Ανατολικής Ευρώπης. Συγκεκριμένα, στις χώρες της πρώην Ε.Σ.Σ.Δ. η μετάδοσή τους σχετίζεται με τοπική διασπορά σε ΧΕΝ, ενώ στη Ρωσία με ετεροφυλοφιλικές επαφές μεταξύ μεταναστών σε τοπικά δίκτυα. Με βάση τα παραπάνω, είναι ξεκάθαρο ότι τα μεταναστευτικά κύματα πληθυσμών από χώρες εκτός Ευρώπης έχουν συμβάλει σημαντικά στη διαμόρφωση της γενετικής ετερογένειας της επιδημίας του HIV-1 στη Δυτική Ευρώπη, η οποία έχει υψηλότερο αριθμό εισροών μεταναστών συγκριτικά με την Κεντρική και την Ανατολική Ευρώπη.

4.2.6 Επιπολασμός των HIV-1 υπότυπων σε ΧΕΝ στην Ευρώπη και την Ασία

Ένας από τους κύριους λόγους εξαιτίας του οποίου αλλάζουν τα γεωγραφικά πρότυπα διασποράς και η κατανομή των HIV-1 υπότυπων στην πορεία του χρόνου (Hemelaar et al., 2018) είναι η δημιουργία επιμέρους επιδημιών που προκαλούνται από μεμονωμένες εισαγωγές του ιού και διασπορά μεταξύ ειδικών πληθυσμών, όπως οι ΧΕΝ. Τις περισσότερες φορές οι ΧΕΝ έχουν συλλοιμώξεις με ηπατίτιδα Β ή C, ενώ παράλληλα βρίσκονται σε υψηλό κίνδυνο λόγω λήψης υπερβολικής δόσης

(Kamarulzaman et al., 2015). Επιπρόσθετα, οι XEN συχνά λειτουργούν ως ενδιάμεσοι πληθυσμοί μετάδοσης του ιού σε άλλους ειδικούς πληθυσμούς και στο γενικό πληθυσμό. Όλα αυτά τους καθιστούν έναν ευάλωτο πληθυσμό με ιδιαίτερα χαρακτηριστικά, τα οποία και δυσχεραίνουν τον έλεγχο της HIV-1 λοίμωξης (Kamarulzaman et al., 2015; Larsen et al., 2010; Murray et al., 2012; Weber et al., 2015).

4.2.6.1 **Επιδημιολογία της HIV-1 λοίμωξης στους XEN**

Ένα άτομο που ζει με HIV μπορεί να μεταδώσει τον ιό σε κάποιο άλλο ευάλωτο άτομο, συνήθως, μέσω σεξουαλικής επαφής χωρίς προφύλαξη, κοινής χρήσης βελονών/συρίγγων και κάθετης μετάδοσης από τη μητέρα στο παιδί κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης, του τοκετού ή του θηλασμού (Cohen et al., 2011b). Η κοινή χρήση εργαλείων ενδοφλέβιας χρήσης αποτελεί επικίνδυνη πρακτική, η οποία σχετίζεται με υψηλό κίνδυνο μόλυνσης με HIV-1. Συγκεκριμένα, ο εκτιμώμενος κίνδυνος μόλυνσης από τον ιό μέσω κοινής χρήσης βελονών/συρίγγων με κάποιο άτομο που ζει με HIV, είναι 0,63% (Patel et al., 2014). Η συστηματική ανασκόπηση των Mathers και συνεργατών εκτίμησε ότι περίπου 16 (11-21) εκατομμύρια άνθρωποι κάνουν χρήση ναρκωτικών, παγκοσμίως (Mathers et al., 2008). Εξ αυτών, 4 (3-5) εκατομμύρια ζουν στην Ανατολική και Νοτιοανατολική Ασία, 3,5 (2,5-4,5) εκατομμύρια στην Ανατολική Ευρώπη, 2,2 (1,6-3,1) εκατομμύρια στον Καναδά και τις Η.Π.Α., 2 (1,5-2,5) εκατομμύρια στη Λατινική Αμερική, 1,8 (0,5-3) εκατομμύρια στην Υποσαχάρια Αφρική και 1 (0,8-1,3) εκατομμύριο στη Δυτική Ευρώπη (Mathers et al., 2008).

Έχει εκτιμηθεί ότι περίπου το 10% του συνόλου των HIV-1 λοιμώξεων οφείλεται στην ενδοφλέβια χρήση ναρκωτικών (Mathers et al., 2008; Strathdee et al., 2010). Συγκεκριμένα, σχεδόν 3 εκατομμύρια (0,8-6,6) XEN έχουν μολυνθεί με HIV-1, με τους περισσότερους εξ αυτών να ζουν στην Ανατολική Ευρώπη (~1 εκατομμύριο), την Ανατολική και Νοτιοανατολική Ασία (0,7 εκατομμύρια) και τη Λατινική Αμερική (0,6 εκατομμύρια). Μικρότερο ποσοστό XEN που ζουν με HIV εντοπίζεται σε Καναδά και Η.Π.Α. (0,35 εκατομμύρια), Υποσαχάρια Αφρική (0,2 εκατομμύρια) και Δυτική Ευρώπη (0,1 εκατομμύρια) (Mathers et al., 2008). Επίσης, έχει δειχθεί ότι οι XEN που

έχουν μολυνθεί με HIV-1 διατρέχουν τριπλάσιο κίνδυνο θανάτου συγκριτικά με τους υπόλοιπους XEN (Mathers et al., 2013).

4.2.6.2 Μοριακή επιδημιολογία της HIV-1 λοίμωξης στους XEN

Στην πιο πρόσφατη συστηματική ανασκόπηση των Nikolopoulos και συνεργατών έγινε μια λεπτομερής περιγραφή των HIV-1 στελεχών που μεταδίδονται μεταξύ των XEN σε Ευρώπη και Ασία (Nikolopoulos et al., 2016a). Συγκεκριμένα, οι συγγραφείς επικεντρώθηκαν τόσο στις μεγάλες HIV-1 επιδημίες στους XEN της Ουκρανίας και της Ρωσίας όσο και σε πρόσφατες και παλαιότερες επιδημίες στους XEN, αλλά και σε χώρες όπου οι μεταδόσεις του ιού μεταξύ των XEN οδηγούν στη δημιουργία νέων ανασυνδυασμένων στελεχών του ιού (Nikolopoulos et al., 2016a).

4.2.6.3 Χώρες πρώην Ένωσης Σοβιετικών Σοσιαλιστικών Δημοκρατιών (Ε.Σ.Σ.Δ.)

Η πτώση της Ε.Σ.Σ.Δ. οδήγησε σε οικονομική αστάθεια, ανεργία και εξάπλωση των κυκλωμάτων διακίνησης ναρκωτικών. Όλα τα παραπάνω συνέβαλαν στην αύξηση του αριθμού των XEN και στη δημιουργία μίας μεγάλης επιδημίας HIV-1 μεταξύ των ατόμων αυτού του ειδικού πληθυσμού (Nikolopoulos et al., 2016a).

Πριν τις αρχές της δεκαετίας του 1990, οι διαγνώσεις HIV-1 στις χώρες της πρώην Ε.Σ.Σ.Δ. ήταν περιορισμένες και αφορούσαν, κυρίως, σεξουαλικές επαφές χωρίς προφύλαξη που πραγματοποιούνταν εκτός Ε.Σ.Σ.Δ.. Η μεγάλη επιδημία του HIV-1 στους XEN ξεκίνησε στην Ουκρανία τα μέσα της δεκαετίας του 1990 και ήταν αποτέλεσμα δυο μεμονωμένων εισαγωγών στελεχών υπότυπου A1 (A_{FSU}/A₆) και B (B_{FSU}). Ο υπότυπος A_{FSU} (A₆) είχε προέλευση την Αφρική και εξαπλώθηκε ραγδαία μέσω μεταδόσεων μεταξύ των XEN αρχικά στην Ουκρανία και στη συνέχεια σε Ρωσία, Λευκορωσία, Καζακστάν, Ουζμπεκιστάν, Γεωργία, Λετονία, Λιθουανία, Αζερμπαϊτζάν, Τατζικιστάν, Αρμενία, Κιργιστάν και Μολδαβία. Ο συγκεκριμένος υπότυπος παραμένει ο κυρίαρχος HIV-1 τύπος στους XEN και σε όσους μολύνονται

μέσω ετεροφυλικών επαφών χωρίς προφύλαξη σε όλες τις παραπάνω χώρες (*Εικόνα 24*), με επιπολασμό της τάξης του 50-94%. Ο υπότυπος B_{FSU} αποτελεί διαφορετικό στέλεχος από εκείνο του B που κυριαρχεί στη Δυτική Ευρώπη, και η προέλευση του παραμένει μέχρι και σήμερα άγνωστη. Παρόλο που ο B_{FSU} αποτελεί συχνό στέλεχος στην Ουκρανία, τα στελέχη του διαδόθηκαν με σχετικά μικρό και σταθερό ρυθμό μεταξύ των MSM, ενώ δεν κατάφερε να εξαπλωθεί εκτός της χώρας, παρά μόνο σε ελάχιστες περιπτώσεις όπως στο Βλαδιβοστόκ της Ρωσίας (*Εικόνα 24*) (Nikolopoulos et al., 2016a).

Οι γενετικός συνδυασμός των A_{FSU} (A₆) και B_{FSU} οδήγησε στη δημιουργία ενός καινούργιου ανασυνδυασμένου τύπου, του CRF03_AB. Ο συγκεκριμένος τύπος μόλυνε περισσότερους από 2.000 XEN στο Καλίνινγκραντ της Ρωσίας στα τέλη της δεκαετίας του 1990, και πλέον εντοπίζεται και σε χώρες εκτός Ρωσίας, όπως η Λευκορωσία και η Λιθουανία (*Εικόνα 24*) (Nikolopoulos et al., 2016a).

Στους XEN που ζουν στις χώρες της πρώην Ε.Σ.Σ.Δ. εντοπίζονται και άλλοι υπότυποι και ανασυνδυασμένοι τύποι εκτός από τον A_{FSU} (A₆). Συγκεκριμένα, στην Εσθονία εντοπίζεται σε υψηλά ποσοστά ο CRF06_cpx και στο Κιργιστάν ο CRF02_AG (*Εικόνα 24*). Επίσης, νέοι ανασυνδυασμένοι τύποι του ιού που προέκυψαν από γενετικό ανασυνδυασμό των A_{FSU} (A₆) και CRF06_cpx, αλλά και των A_{FSU} (A₆) και CRF02_AG (CRF63_02A1) εντοπίζονται πλέον σε χώρες της Κεντρικής Ασίας (Ουζμπεκιστάν, Κιργιστάν, Καζακιστάν) (*Εικόνα 24*) (Nikolopoulos et al., 2016a).

4.2.6.4 Χώρες της Δυτικής και Κεντρικής Ευρώπης

Στους XEN στην Ευρώπη ο επικρατέστερος HIV-1 υπότυπος είναι ο B (70%), ενώ ακολουθούν οι G (10%), A1 (5%) και CRF02_AG (3%) (*Εικόνα 24*). Ο υπότυπος B της Ευρώπης προήλθε από τις Η.Π.Α., αρχικά μεταδίδονταν μεταξύ των MSM, και μεταγενέστερα, μέσω των δικτύων των MSM, μεταδόθηκε και στους XEN. Τα τελευταία χρόνια σε πολλές Ευρωπαϊκές χώρες ο HIV-1 έχει προκαλέσει επιμέρους επιδημίες σε XEN (Nikolopoulos et al., 2016a).

Στην Ισπανία και την Πορτογαλία αναφέρθηκαν πρόσφατα HIV-1 επιδημίες σε XEN. Στις χώρες αυτές κατά τη διάρκεια της δεκαετίας του 1990 ο υπότυπος G ήταν αρκετά συχνός στους XEN. Το συγκεκριμένο στέλεχος πιθανότατα εισήχθει στην Πορτογαλία στις αρχές της δεκαετίας του 1980 μέσω μεταναστευτικών κυμάτων πληθυσμών από τις Αφρικανικές αποικίες της χώρας. Στη συνέχεια, ο γενετικός ανασυνδυασμός των υπότυπων B και G οδήγησε στη δημιουργία του ανασυνδυασμένου στελέχους CRF14_BG, το οποίο και έγινε σύντομα το επικρατέστερο ανασυνδυασμένο HIV-1 στέλεχος σε Ισπανία και Πορτογαλία (*Εικόνα 24*) (Nikolopoulos et al., 2016a).

Η Ελλάδα και η Ρουμανία (και συγκεκριμένα η Αθήνα και το Βουκουρέστι) αποτελούν ένα ακόμα παράδειγμα Ευρωπαϊκών χωρών όπου εκδηλώθηκαν πρόσφατα HIV-1 επιδημίες σε XEN. Στην Ελλάδα, πιθανότατα λόγω της οικονομικής κρίσης, αυξήθηκε δραματικά ο αριθμός των νέων HIV-1 διαγνώσεων σε XEN μετά το 2011. Επιπρόσθετα, εντοπίστηκαν τέσσερις επιμέρους επιδημίες του ιού σε XEN (CRF14_BG, CRF35_AD, B, A) με διαφορετική χρονική και γεωγραφική προέλευση (*Εικόνα 24*). Συγκεκριμένα, εκτιμήθηκε ότι οι επιμέρους επιδημίες των CRF14_BG και CRF35_AD ξεκίνησαν το χρονικό διάστημα μεταξύ 2010 και 2011 και είχαν προέλευση από την Ρουμανία και το Αφγανιστάν/Ιράκ αντίστοιχα. Οι επιμέρους επιδημίες των A και B εκτιμήθηκε ότι ήταν προγενέστερες και είχαν προέλευση από την Ελλάδα. Αναφορικά με την Ρουμανία, η επιδημία του HIV-1 στη χώρα αυτή αποτελεί μοναδική περίπτωση για τα Ευρωπαϊκά δεδομένα. Ενώ αρχικά οι μεταδόσεις του ιού αφορούσαν στελέχη υπο-υπότυπου F1, τα οποία διαδόθηκαν μεταξύ νεογέννητων και παιδιών μικρής ηλικίας σε ορφανοτροφεία λόγω χρήσης μολυσμένων βελονών/συρίγγων που χρησιμοποιούνταν για θεραπευτικούς λόγους, το χρονικό διάστημα μεταξύ 2011 και 2013 έγινε αντιληπτή μία επιδημία HIV-1 σε XEN στο Βουκουρέστι. Συγκεκριμένα, εντοπίστηκαν επιμέρους επιδημίες στελεχών υπο-υπότυπου F1 και CRF14_BG, οι οποίες είχαν προέλευση τη Ρουμανία και την Ισπανία/Πορτογαλία αντίστοιχα και ξεκίνησαν το χρονικό διάστημα μεταξύ 2008 και 2010 (*Εικόνα 24*) (Nikolopoulos et al., 2016a).

Εκτός από τις παραπάνω χώρες υπάρχει και ένας μεγάλος αριθμός Ευρωπαϊκών χωρών οι οποίες είχαν αναφέρει την ύπαρξη HIV-1 επιδημιών σε ΧΕΝ κατά το παρελθόν. Μεταξύ αυτών η Φιλανδία (επιμέρους επιδημία του CRF01_AE), η Σουηδία (επιμέρους επιδημία του CRF01_AE), η Ιταλία (επιμέρους επιδημία του υπότυπου G) και η Ελβετία (επιμέρους επιδημία του CRF11_cpx) (Εικόνα 24) (Nikolopoulos et al., 2016a).



Εικόνα 24 Κατανομή των HIV-1 στελεχών μεταξύ χρηστών ενδοφλέβιων ναρκωτικών σε Ευρώπη και Κεντρική Ασία (Nikolopoulos et al., 2016a).

4.2.6.5 Χώρες της Ασίας

Η χρήση ενδοφλέβιων ναρκωτικών τροφοδοτεί την επιδημία του HIV-1 σε πολλές χώρες της Ασίας, και ιδιαίτερα σε δυο από τις μεγαλύτερες περιοχές καλλιέργειας οπίου στον κόσμο: 1) Χρυσό Τρίγωνο (Golden Triangle): περιοχή μεταξύ Μυανμάρ, Λάος, Βιετνάμ και Ταϊλάνδης. 2) Χρυσή Ημισέληνος (Golden Crescent): περιοχή μεταξύ Αφγανιστάν, Ιράν και Πακιστάν (*Εικόνα 25*) (Nikolopoulos et al., 2016a).

4.2.6.5.1 Χρυσό Τρίγωνο (Golden Triangle)

Στην Ταϊλάνδη, οι επικρατέστεροι HIV-1 υπότυποι στους XEN είναι ο B (ή B' όπως καθιερώθηκε) και ο CRF01_AE, ο οποίος μεταδόθηκε από την Ταϊλάνδη σε πολλές άλλες Ασιατικές και Ευρωπαϊκές χώρες (Angelis et al., 2015). Η ταυτόχρονη μόλυνση ενός σημαντικού αριθμού XEN στην Ταϊλάνδη από τους B και CRF01_AE οδήγησε στη δημιουργία νέων ανασυνδυασμένων μορφών του ιού, όπως οι CRF15_01B και CRF34_01B (*Εικόνα 25*) (Nikolopoulos et al., 2016a).

Στην Μυανμάρ, οι XEN μολύνονται κυρίως με στελέχη υπότυπου B, CRF01_AE και διάφορες ανασυνδυασμένες μορφές του ιού (CRF01_AE/B'/C, CRF01_AE/C) (*Εικόνα 25*). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον από επιδημιολογική άποψη παρουσιάζει το βόρειο τμήμα της χώρας που συνορεύει με την κινεζική επαρχία Γιουνάν, όπου το 85% των XEN έχουν μολυνθεί με ανασυνδυασμένα στελέχη. Ένα μεγάλο ποσοστό XEN τόσο της Μυανμάρ όσο και της Κίνας είναι φορείς ανασυνδυασμένων στελεχών, κυρίως λόγω του ότι τα άτομα αυτά μολύνονται με πολλαπλά στελέχη του ιού ενώ μετακινούνται μεταξύ των συνόρων των δύο αυτών χωρών για να διακινήσουν και να κάνουν χρήση ναρκωτικών (Nikolopoulos et al., 2016a).

Στο Βιετνάμ, ο κυρίαρχος υπότυπος στους XEN είναι ο CRF01_AE, ο οποίος έχει εισαχθεί στη χώρα από την Ταϊλάνδη. Μελέτες έχουν δείξει την ύπαρξη περαιτέρω μετάδοσης του CRF01_AE στην Κίνα (*Εικόνα 25*) (Nikolopoulos et al., 2016a).

4.2.6.5.2 Χρυσή Ημισέληνος (Golden Crescent)

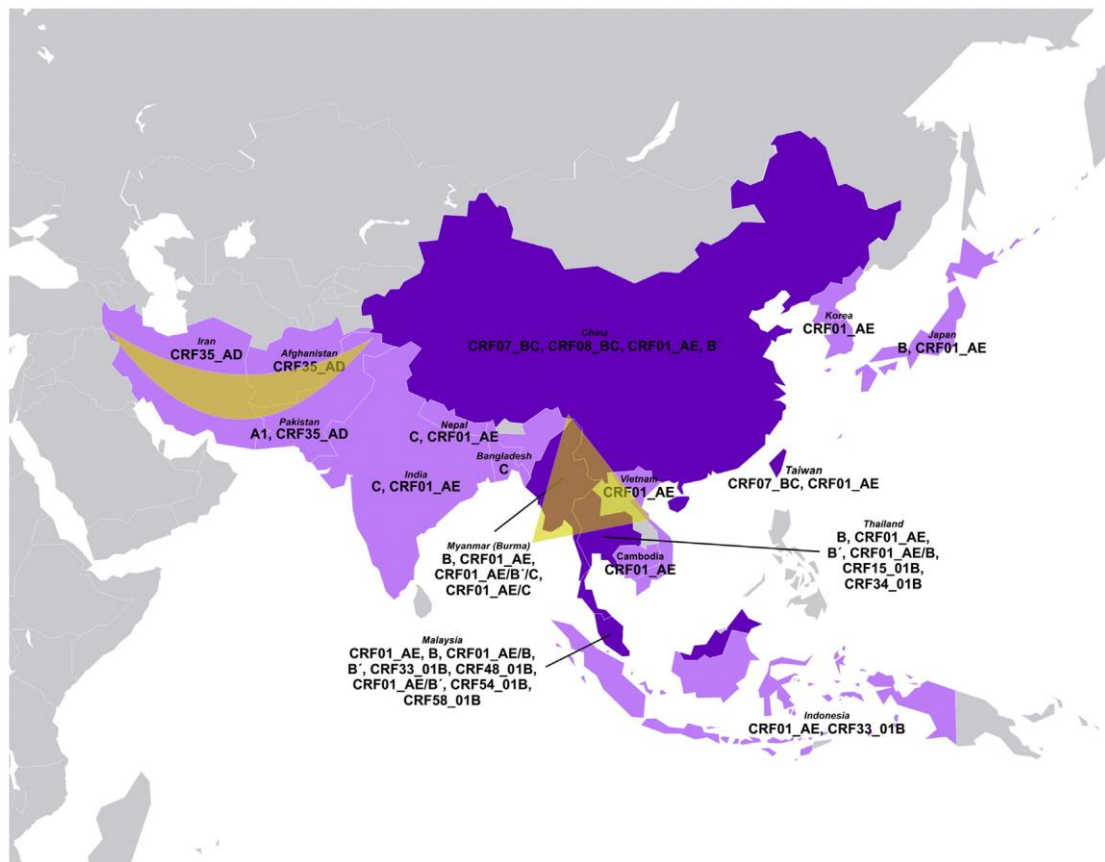
Στο Ιράν, ο κύριος τρόπος μετάδοσης του HIV-1 είναι η ενδοφλέβια χρήση ναρκωτικών (~70% των διαγνώσεων του ιού). Το επικρατέστερο στέλεχος στους XEN είναι ο CRF35_AD, ενώ ο CRF01_AE εντοπίζεται σπάνια σε αυτήν την πληθυσμιακή ομάδα (*Εικόνα 25*) (Nikolopoulos et al., 2016a).

Παρόλο που το Αφγανιστάν αποτελεί τον κύριο παραγωγό οπίου παγκοσμίως, ο επιπολασμός του HIV-1 στα μέσα της δεκαετίας του 2000 ήταν της τάξης του 2-3%. Την ίδια δεκαετία, στο Αφγανιστάν έκανε την εμφάνισή του ένα νέο στέλεχος του ιού (CRF35_AD), το οποίο κυριάρχησε στους XEN (*Εικόνα 25*). Τα στελέχη του CRF35_AD που εντοπίζονται στο Αφγανιστάν παρουσιάζουν υψηλή γενετική ομοιότητα με εκείνα που εντοπίζονται στο Ιράν, υποδηλώνοντας μεταδόσεις του ιού μεταξύ των XEN των δυο αυτών χωρών, οι οποίες δικαιολογούνται πλήρως από το γεγονός ότι μέσω του Ιράν πραγματοποιείται η διακίνηση των ναρκωτικών από το Αφγανιστάν στην Ευρώπη (Nikolopoulos et al., 2016a).

Ο επιπολασμός του HIV-1 στους XEN στο Πακιστάν παρουσιάζει συνεχιζόμενη αύξηση (2006: 15%, 2011: 30%). Το επικρατέστερο HIV-1 στέλεχος σε αυτήν την πληθυσμιακή ομάδα είναι ο A1, ενώ ακολουθεί ο CRF35_AD (*Εικόνα 25*) (Nikolopoulos et al., 2016a).

4.2.6.5.3 Άλλες χώρες της Νότιας και Νοτιοανατολικής Ασίας

Υψηλά ποσοστά HIV-1 σε XEN έχουν παρατηρηθεί και σε άλλες χώρες της Ασίας. Για παράδειγμα, στη Μαλαισία, οι CRF01_AE και B', αλλά και ανασυνδυασμένοι τύποι που έχουν προκύψει από αυτούς (CRF33_01B, CRF48_01B, CRF54_01B, CRF58_01B), εντοπίζονται σε υψηλά ποσοστά σε XEN. Στην Κίνα, οι CRF01_AE, CRF07_BC και CRF08_BC, οι οποίοι αποτελούν ανασυνδυασμένα στελέχη που προέκυψαν από τους υπότυπους B' και C, επικρατούν στους XEN. Αξίζει βέβαια να σημειωθεί ότι σημαντικό ρόλο στην εξάπλωση του ιού μεταξύ των XEN στην Κίνα διαδραμάτισε η επαρχία Γιουνάν που συνορεύει με αρκετές χώρες του Χρυσού Τριγώνου. Στους XEN σε Ινδία, Νεπάλ και Μπαγκλαντές επικρατεί ο υπότυπος C, ενώ σε Ιαπωνία, Ινδονησία και Καμπότζη οι XEN μολύνονται κυρίως με στελέχη υπότυπου CRF01_AE (Εικόνα 25) (Nikolopoulos et al., 2016a).



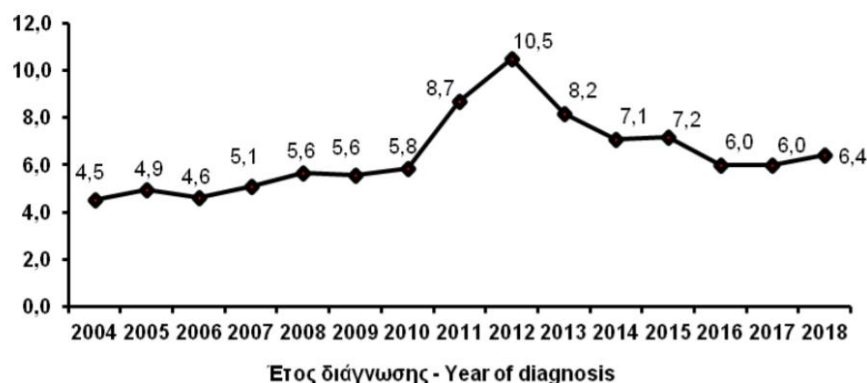
Εικόνα 25 Κατανομή των HIV-1 στελεχών μεταξύ χρηστών ενδοφλέβιων ναρκωτικών στην Ασία (Nikolopoulos et al., 2016a).

4.3 Ελλάδα

4.3.1 Επιδημιολογία της HIV-1 λοίμωξης στην Ελλάδα

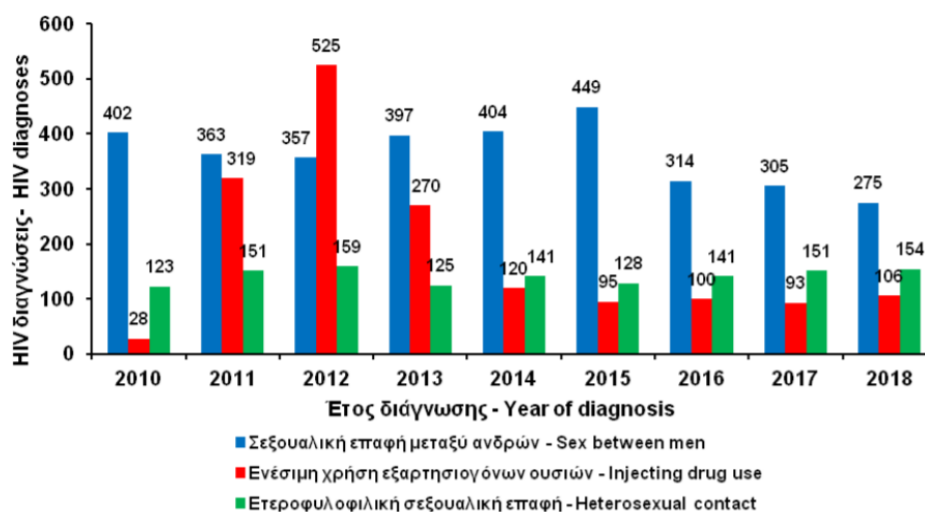
Σύμφωνα με τα πιο πρόσφατα δεδομένα από το εθνικό σύστημα επιδημιολογικής επιτήρησης της HIV/AIDS λοίμωξης στην Ελλάδα, μέχρι την 31η Δεκεμβρίου του 2018 είχαν συνολικά προσβληθεί από τον ιό και δηλωθεί 17.389 άτομα (συμπεριλαμβανομένων και των περιπτώσεων AIDS), εκ των οποίων το 82,8% ήταν άνδρες, το 17,0% γυναίκες, ενώ για το 0,2% δεν είχε δηλωθεί το φύλο. Τα άτομα που εμφάνισαν AIDS ανέρχονταν συνολικά σε 4.210, ενώ από το 1997 και μετά έχει παρατηρηθεί μεγάλη μείωση στην επίπτωση του AIDS και στον αριθμό των θανάτων από AIDS λόγω της εισαγωγής και της ευρείας χορήγησης της ART (ΚΕ.ΕΛ.Π.ΝΟ., 2018).

Η επιδημία του HIV-1 στην Ελλάδα ακολούθησε αυξητική πορεία μέχρι και το 2012, όπου και καταγράφηκε ο μεγαλύτερος αριθμός νέων HIV-1 διαγνώσεων (1.157 νέες διαγνώσεις). Στη συνέχεια παρουσίασε πτωτική τάση μέχρι το 2017, ενώ το 2018 σημείωσε μικρή αύξηση (Εικόνα 26). Συγκεκριμένα, το 2018 δηλώθηκαν 687 νέες HIV-1 διαγνώσεις, εκ των οποίων 561 (81,7%) αφορούσαν σε άνδρες και 126 (18,3%) σε γυναίκες (ΚΕ.ΕΛ.Π.ΝΟ., 2018).

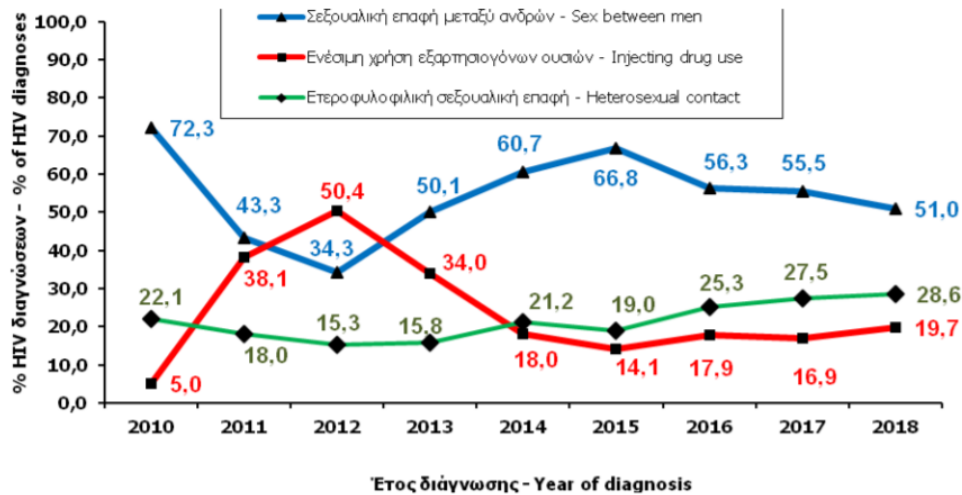


Εικόνα 26 Διαγνώσεις HIV λοίμωξης ανά 100.000 πληθυσμού στην Ελλάδα (2004-2018) (ΚΕ.ΕΛ.Π.ΝΟ., 2018).

Καθ' όλη τη διάρκεια της επιδημίας του HIV-1 στην Ελλάδα ο κυριότερος τρόπος μετάδοσης του ιού ήταν η σεξουαλική επαφή χωρίς προφύλαξη μεταξύ ανδρών (48,2%), ενώ ακολουθούσαν η ετεροφυλοφιλική επαφή χωρίς προφύλαξη (21,6%), η χρήση ενέσιμων εξαρτησιογόνων ουσιών (11,6%), η μόλυνση μέσω πολυμετάγγισης παράγωγων του αίματος (1,4%), η μετάγγιση αίματος (0,6%) και η κάθετη μετάδοση (0,4%). Επίσης, για ένα σημαντικό ποσοστό PLHIV στην Ελλάδα δεν υπάρχει πληροφορία αναφορικά με τον τρόπο με τον οποίο μολύνθηκαν από τον ιό (16,2%). Παρόλο που η σεξουαλική επαφή μεταξύ ανδρών αποτελεί μέχρι και σήμερα τον επικρατέστερο τρόπο μετάδοσης του ιού στην Ελλάδα, τα έτη 2011 και 2012 παρατηρήθηκε ραγδαία αύξηση του αριθμού των νέων HIV-1 διαγνώσεων σε άτομα που έκαναν χρήση ενέσιμων εξαρτησιογόνων ουσιών (Εικόνες 27 και 28). Η σημαντική αύξηση του συνολικού αριθμού των HIV-1 διαγνώσεων που καταγράφηκε για τα έτη 2011 και 2012 (Εικόνα 26) οφείλονταν στον υψηλό αριθμό μεταδόσεων που πραγματοποιήθηκαν κατά τα έτη αυτά μεταξύ των XEN (Paraskevis et al., 2013). Αν και από το 2014 και μετά ο αριθμός των νέων HIV-1 διαγνώσεων σε XEN έχει μειωθεί σημαντικά, συγκριτικά με την περίοδο μεταξύ 2011 και 2013 όπου είχε σημειωθεί επιδημία του HIV-1 στη συγκεκριμένη πληθυσμιακή ομάδα, μέχρι και σήμερα δεν έχει καταφέρει να προσεγγίσει τα προ της επιδημίας επίπεδα (Εικόνες 27 και 28) (ΚΕ.ΕΛ.Π.ΝΟ., 2018).



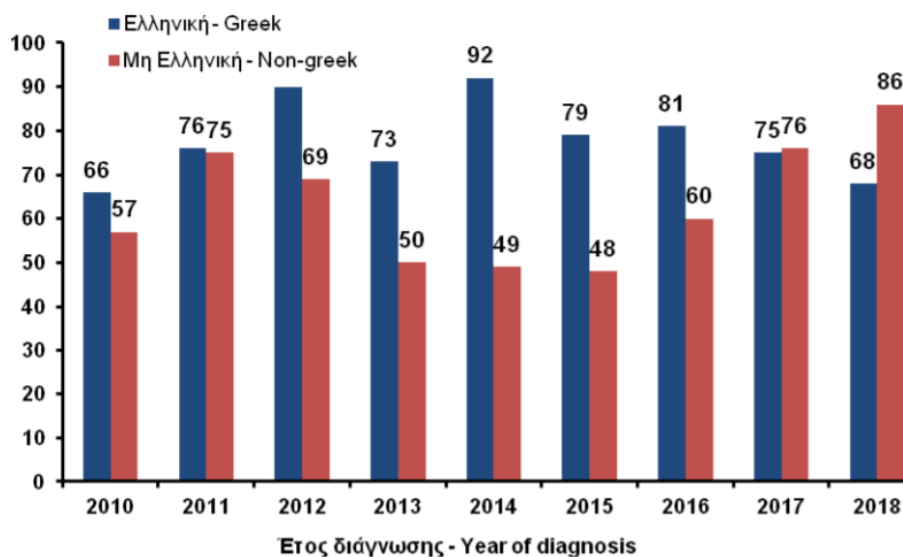
Εικόνα 27 Διαγνώσεις της HIV λοίμωξης στην Ελλάδα το χρονικό διάστημα 2010-2018 ανά κατηγορία μετάδοσης και έτος διάγνωσης (ΚΕ.ΕΛ.Π.ΝΟ., 2018).



Εικόνα 28 Ποσοστιαία αναλογία διαγνώσεων HIV με γνωστό τρόπο μετάδοσης στην Ελλάδα το χρονικό διάστημα 2010-2018 ανά κατηγορία μετάδοσης και έτος διάγνωσης (ΚΕ.ΕΛ.Π.ΝΟ., 2018).

Επιπρόσθετα, είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι από το 2015 και μετά παρατηρείται σταθερή αύξηση του ποσοστού των νέων HIV-1 διαγνώσεων σε άτομα με μη Ελληνική εθνικότητα: 2015: 19%, 2016: 25%, 2017: 31%, 2018: 37% (τα ποσοστά αυτά αφορούν άτομα για τα οποία έχει δηλωθεί η χώρα προέλευσης) (Εικόνα 29). Συγκεκριμένα, ο συνολικός αριθμός των HIV-1 διαγνώσεων σε άτομα μη Ελληνικής εθνικότητας (συμπεριλαμβανομένων και των περιπτώσεων AIDS) ανέρχεται σε 3.322. Από τα περιστατικά αυτά, 2.147 (64,6%) αφορούσαν σε άνδρες, 1.169 (35,2%) σε γυναίκες και 6 (0,2%) σε άτομα για τα οποία δεν είχε δηλωθεί το φύλο. Η πλειοψηφία των γυναικών προερχόταν από χώρες της Υποσαχάριας Αφρικής (48,5%), ενώ των ανδρών από χώρες της Κεντρικής Ευρώπης (27,6%). Συνολικά, το μεγαλύτερο ποσοστό των ατόμων με μη Ελληνική εθνικότητα που είχαν μολυνθεί με HIV-1 προερχόταν από χώρες της Υποσαχάριας Αφρικής (30,3%) και της Κεντρικής Ευρώπης (24,2%), ενώ ο κύριος τρόπος μετάδοσης του ιού στα άτομα αυτά ήταν η ετεροφυλοφιλική σεξουαλική επαφή χωρίς προφύλαξη (41,8%) (ΚΕ.ΕΛ.Π.ΝΟ., 2018).

A

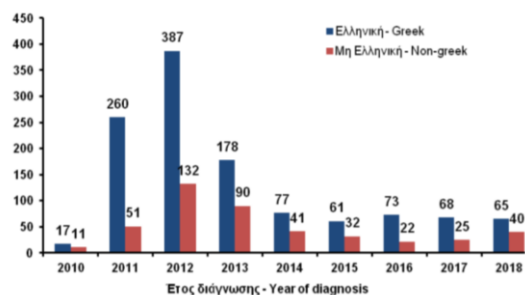


4

B



Γ

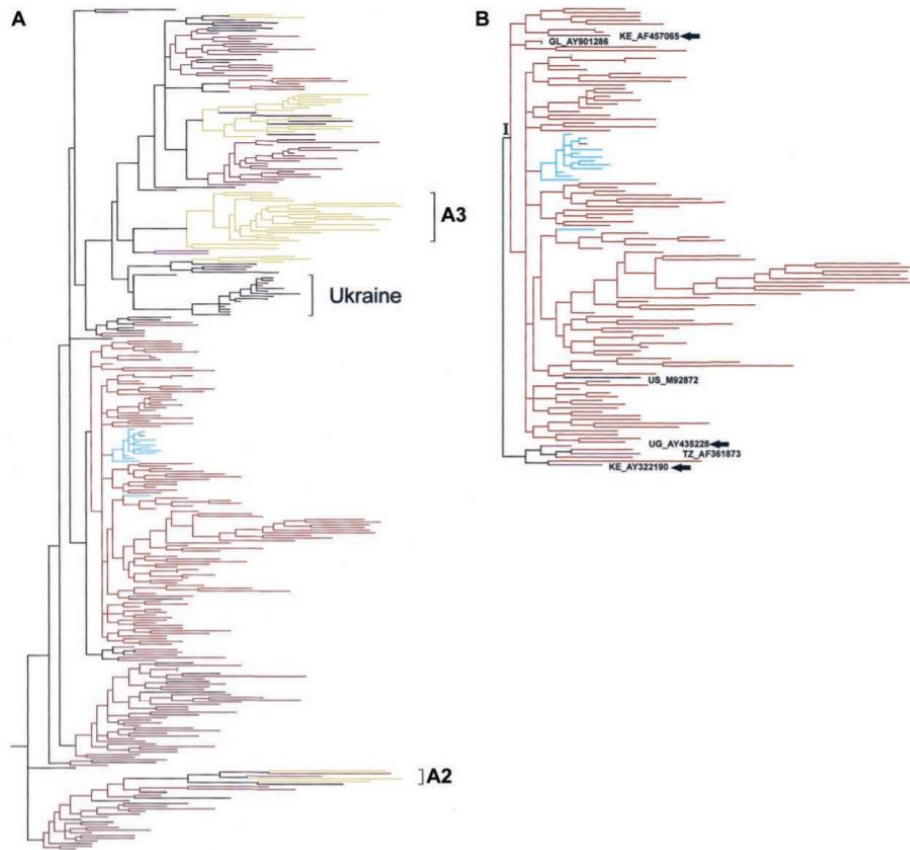


Εικόνα 29 Διαγνώσεις HIV λοίμωξης με βάση την εθνικότητα στην Ελλάδα το χρονικό διάστημα 2010-2018 ανά έτος διάγνωσης για: (Α) Ετεροφυλοφιλική σεξουαλική επαφή, (Β) Σεξουαλική επαφή μεταξύ ανδρών και (Γ) Ενέσιμη χρήση εξαρτησιογόνων ουσιών (ΚΕ.ΕΛ.Π.ΝΟ., 2018).

4.3.2 Μοριακή επιδημιολογία της HIV-1 λοίμωξης στην Ελλάδα

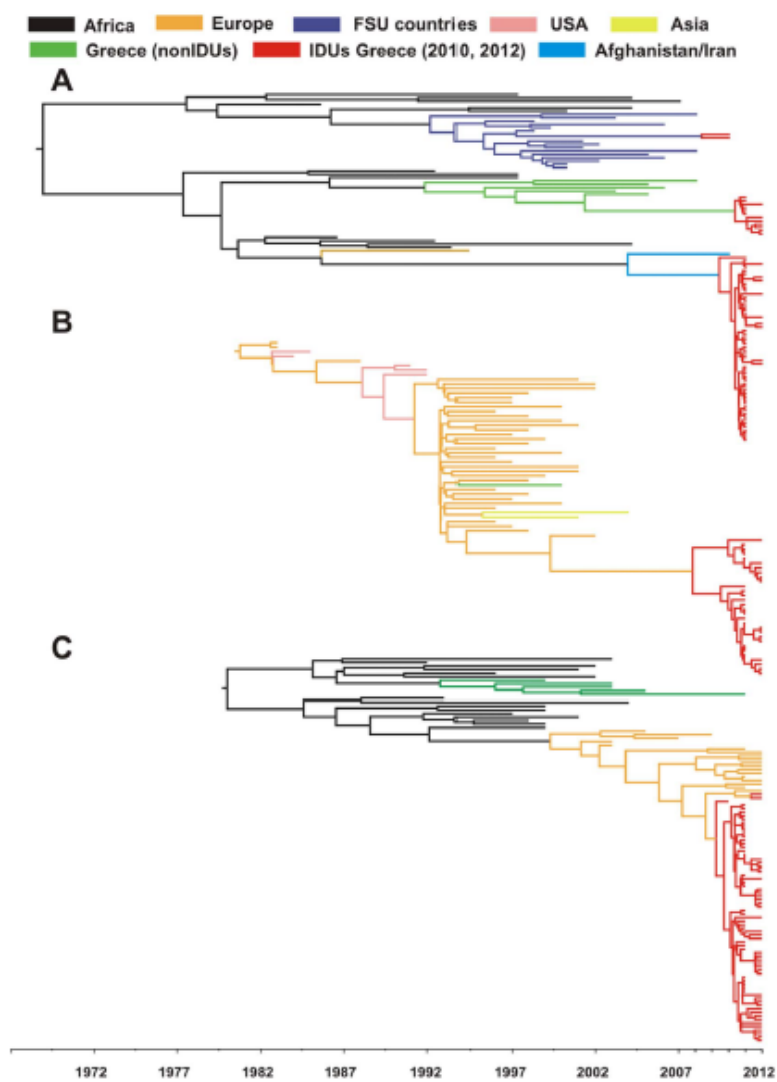
Μελέτες μοριακής επιδημιολογίας έχουν δείξει ότι τα στελέχη του HIV-1 που εντοπίζονται στην Ελλάδα χαρακτηρίζονται από υψηλή γενετική ετερογένεια. Το γεγονός αυτό πιθανότατα οφείλεται σε μεγάλο βαθμό στην υψηλή κινητικότητα πληθυσμιακών ομάδων και στη γεωγραφική θέση της χώρας, η οποία αποτελεί σταυροδρόμι μεταξύ Ευρώπης, Ασίας και Αφρικής (Nikolopoulos et al., 2008).

Όπως και στις υπόλοιπες χώρες της Δυτικής Ευρώπης, τα πρώτα HIV-1 στελέχη που εισήχθησαν στην Ελλάδα και οδήγησαν σε επιδημία ήταν στελέχη υπότυπου B. Για πολλά χρόνια ο συγκεκριμένος υπότυπος αποτέλεσε τον επικρατέστερο στη χώρα. Στην πορεία, όμως, του χρόνου η σταδιακή αύξηση του αριθμού των μεταδόσεων των στελεχών υπότυπου A1 οδήγησε το 2004 τον επιπολασμό του A1 να είναι υψηλότερος από εκείνον του B (42% και 33% αντίστοιχα). Ως εκ τούτου, τα τελευταία χρόνια στην Ελλάδα οι επικρατέστεροι HIV-1 υπότυποι είναι οι A1 και B, οι οποίοι όπως έχει δείξει χαρακτηρίζονται από υψηλά επίπεδα τοπικής διασποράς. Συγκεκριμένα, βρέθηκε ότι η επιδημία του υπότυπου A1 είναι μονοφυλετική και αποτελεί συνέπεια μεμονωμένης εισαγωγής στελέχους από την Υποσαχάρια Αφρική η οποία οδήγησε σε διασπορά του ιού μεταξύ του τοπικού πληθυσμού (φαινόμενο του ιδρυτή) (Εικόνα 30). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει, επίσης, το γεγονός ότι η Ελλάδα είναι μεταξύ ενός μικρού αριθμού Ευρωπαϊκών χωρών όπου ο υπότυπος A1 παρουσιάζει υψηλό επιπολασμό, ο οποίος, όμως, δεν οφείλεται σε στελέχη που κυριαρχούν σε XEN της Ανατολικής Ευρώπης (AFSU/A₆) ή σε μεταναστευτικά κύματα πληθυσμών από την Αφρική. Αναφορικά με την επιδημία του υπότυπου B, υπάρχουν σημαντικές ενδείξεις ότι έχει εισαχθεί στην Ελλάδα από πολλές διαφορετικές πηγές (Nikolopoulos et al., 2008; Paraskevis et al., 2007).



Εικόνα 30 Φυλογενετικά δένδρα αλληλουχιών HIV-1 υπότυπου A1 από διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές που αναδεικνύουν τον μονοφυλετικό χαρακτήρα της Ελληνικής επιδημίας (Paraskevis et al., 2007).

Εκτός από τους A1 και B, στην Ελλάδα εντοπίζονται σε μικρότερα ποσοστά και άλλοι HIV-1 υπότυποι, μεταξύ των οποίων οι C, G, F, D και H. Επίσης, έχουν παρατηρηθεί τοπικά δίκτυα διασποράς του ιού και στους ανασυνδυασμένους τύπους CRF14_BG και CRF35_AD. Τα δίκτυα αυτά εντοπίστηκαν στην Αθήνα το 2011 κατά τη διάρκεια της επιδημίας του HIV-1 στους XEN και βρέθηκαν να έχουν προέλευση από Ρουμανία (CRF14_BG) και Αφγανιστάν/Ιράν (CRF35_AD) (Εικόνα 31) (Paraskevis et al., 2011; Paraskevis et al., 2013; Sypsa et al., 2015; Niculescu et al., 2015). Επιπρόσθετα, στην Ελλάδα έχουν εντοπιστεί οι CRF04_cpx και CRF02/B που αποτελούν νέους ανασυνδυασμένους τύπους του ιού (Paraskevis et al., 2001).



Εικόνα 31 Ανάλυση μοριακού ρολογιού αλληλουχιών HIV-1 υπότυπων: (A) A και CRF35_AD, (B) B και (C) G και CRF14_BG από διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές που αναδεικνύουν την προέλευση των δικτύων των χρηστών ενδοφλέβιων ναρκωτικών της Αθήνας (Paraskevis et al., 2013).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

Εισαγωγή στις μεθόδους μοριακής επιδημιολογίας

Ο HIV-1 είναι υπεύθυνος για μία από τις μεγαλύτερες πανδημίες στα χρονικά της ανθρωπότητας. Παρά τις προσπάθειες που έχουν γίνει σε επίπεδο δημόσιας υγείας για την πρόληψή του, ο ιός συνεχίζει να εξαπλώνεται. Ως εκ τούτου, η εφαρμογή νέων παρεμβάσεων για τον περιορισμό των μεταδόσεων του ιού καθίσταται αναγκαία για την εξάλειψή του. Σύμφωνα με τον Π.Ο.Υ., το πιο σημαντικό βήμα για τον περιορισμό των μεταδόσεων του HIV-1 και την επίτευξη του παγκόσμιου στόχου 90-90-90 για την εξάλειψη του ιού είναι οι φορείς δημόσιας υγείας της κάθε χώρας να γνωρίζουν τα χαρακτηριστικά της HIV-1 επιδημίας τους (WHO, 2015). Η επιδημιολογική επιτήρηση του ιού μπορεί να συμβάλει σημαντικά στην κατανόηση της επιδημίας του HIV-1 και, ως εκ τούτου, στο σχεδιασμό, στην εφαρμογή και στην αξιολόγηση των μέτρων πρόληψης (WHO/UNAIDS, 2013). Για το σχεδιασμό αποτελεσματικών παρεμβάσεων είναι απαραίτητος τόσο ο χαρακτηρισμός των επιμέρους επιδημιών του ιού όσο και η γνώση επιδημιολογικών δεικτών, όπως ο επιπολασμός, η επίπτωση, η δυναμική της μετάδοσης, ο βασικός αριθμός αναπαραγωγής (basic reproductive number – R_0) και το χρονικό διάστημα μεταξύ μόλυνσης και διάγνωσης (Paraskevis et al., 2016). Η μοριακή επιδημιολογία περιλαμβάνει μεθόδους, όπως η φυλογενετική, η φυλοδυναμική και η φυλογεωγραφία, οι οποίες από μόνες τους ή και σε συνδυασμό με μαθηματικά μοντέλα συντελούν στην εκτίμηση των παραπάνω δεικτών, η γνώση των οποίων είναι καθοριστικής σημασίας για την κατανόηση και την επιτήρηση της επιδημιολογίας της νόσου (Rothman et al., 2008).

Η μοριακή εξέλιξη αποτελεί πεδίο της εξελικτικής βιολογίας, η οποία μελετά την προέλευση και τη διαδικασία μεταβολής όλων των ζωντανών οργανισμών στο πέρασμα του χρόνου, καθώς επίσης και τους μηχανισμούς που διέπουν τη μεταβολή αυτή. Η συγκεκριμένη επιστήμη αξιοποιεί όλη τη διαθέσιμη πληροφορία που βρίσκεται στο γενετικό υλικό των οργανισμών, το οποίο έχει την ιδιότητα να αποθηκεύεται με τη μορφή νουκλεοτιδίων (DNA ή RNA για ορισμένους ιούς), ώστε να επιτευχθεί η κατανόηση και αναπαράσταση της εξελικτικής ιστορίας οργανισμών ή παθογόνων, όπως ιών, μεταξύ των οποίων και ο HIV-1. Η μοριακή επιδημιολογία βασίζεται στην ανάλυση της γενετικής ετερογένειας παθογόνων (μοριακή εξέλιξη) για να μελετήσει επιδημίες. Συγκεκριμένα, η μοριακή επιδημιολογία αποτελεί έναν κλάδο της επιδημιολογίας, ο οποίος επικεντρώνεται στη μελέτη της συμβολής των γενετικών παραγόντων που ανιχνεύονται σε μοριακό επίπεδο στην αιτιολογία, στην κατανομή της

συχνότητάς και στην πρόληψη των νοσημάτων σε ανθρώπινους πληθυσμούς, καθώς και στο γενετικό χαρακτηρισμό των παραγόντων που μολύνουν ζώα ή φυτά (Peeters et al., 2013; Pybus et al., 2009; Rambaut et al., 2004). Τα τελευταία χρόνια η ανάπτυξη νέων τεχνικών μοριακής βιολογίας (Polymerase Chain Reaction – PCR, real-time PCR, αλληλούχιση DNA, γονιδιωματική κ.α.) και μεθόδων (βιοπληροφορική, μαθηματικά μοντέλα, φυλογενετική, φυλοδυναμική, φυλογεωγραφία κ.α.) έχει οδηγήσει στην εξέλιξη του πεδίου της μοριακής επιδημιολογίας των ιών (Paraskevis et al., 2016).

Οι πιο διαδεδομένες μοριακές μέθοδοι είναι η φυλογενετική, η φυλοδυναμική και η φυλογεωγραφία. Η φυλογενετική αποσκοπεί στη μοντελοποίηση της διαδικασίας της μοριακής εξέλιξης με χρήση στατιστικής μεθοδολογίας και χρησιμοποιείται για την εκτίμηση των προτύπων διασποράς του ιού, ενώ η φυλοδυναμική είναι ένας συνδυασμός φυλογενετικής και μαθηματικών μοντέλων που εκτιμούν το χρόνο προέλευσης μιας επιδημίας και τη δυναμική του πληθυσμού, και χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της δυναμικής της επιδημίας του παθογόνου στην πορεία του χρόνου (Drummond et al., 2002; Drummond et al., 2005; Grenfell et al., 2004; Pybus et al., 2000; Pybus et al., 2001; Stadler et al., 2012; Stadler et al., 2013a; Stadler et al., 2013b). Η φυλογεωγραφία χρησιμοποιείται, κυρίως, για τη μελέτη των γεωγραφικών προτύπων διασποράς του ιού και παρέχει πληροφορίες αναφορικά με τα πρότυπα ομαδοποίησης των στελεχών του σύμφωνα με τη γεωγραφική τους προέλευση (Holmes, 2004; Holmes, 2008; Lemey et al., 2009; Paraskevis et al., 2009; Slatkin and Maddison, 1989; Wallace et al., 2007). Αναλυτικότερα, οι μοριακές μέθοδοι (φυλογενετική, φυλοδυναμική, φυλογεωγραφία) εφαρμόζονται για: i) την ταξινόμηση του ιού, ii) τη χρονολόγηση της προέλευσης των επιμέρους επιδημιών του ιού και την εκτίμηση της δυναμικής της μετάδοσής τους, iii) τη διερεύνηση του τρόπου διασποράς του ιού σε τοπικό και παγκόσμιο επίπεδο, iv) την εκτίμηση της πηγής της μετάδοσης του ιού ανάλογα με το στάδιο της μόλυνσης, v) τη διερεύνηση των γεωγραφικών προτύπων διασποράς της επιδημίας, vi) την εκτίμηση επιδημιολογικών δεικτών [επιπολασμός, επίπτωση, ενεργός αριθμός αναπαραγωγής (effective reproductive number – R_e), χρόνος μεταξύ μόλυνσης και διάγνωσης κ.α.], vii) την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας των μεθόδων παρέμβασης και viii) τη διερεύνηση της επιδημίας. Οι μοριακές μέθοδοι έχουν επίσης εφαρμοστεί στη διερεύνηση των προτύπων μετάδοσης των ανθεκτικών στελεχών στην ART (Paraskevis et al., 2016).

Αν και η μοριακή επιδημιολογία αποτελεί μία πολλά υποσχόμενη προσέγγιση για την αντιμετώπιση των λοιμωδών νοσημάτων, οι μοριακές αναλύσεις έχουν περιορισμούς ως προς τη δειγματοληψία και τις μεθόδους που εφαρμόζουν. Αναφορικά με τη δειγματοληψία, οι περιορισμοί αφορούν συνήθως στην έλλειψη μοριακών ή δημογραφικών δεδομένων, στο γεγονός ότι τα μοριακά δεδομένα δεν είναι αντιπροσωπευτικά του υπό μελέτη πληθυσμού και στο συχνά ελλιπές φυλογενετικό σήμα των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών. Μεθοδολογικά, οι παραδοχές των μοντέλων που χρησιμοποιούνται στις μοριακές μεθόδους σε συνδυασμό με τον υπολογιστικό χρόνο που απαιτείται για την ανάλυση μεγάλου αριθμού αλληλουχιών, αποτελούν επιπρόσθετους περιορισμούς (Paraskevis et al., 2016). Επίσης, η ακρίβεια των εκτιμήσεων των μοριακών μεθόδων εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, μεταξύ των οποίων το ποσοστό των ατόμων από τα οποία υπάρχουν διαθέσιμα δείγματα σε σχέση με το συνολικό αριθμό των ατόμων που έχουν μολυνθεί, η στατιστική ισχύ των δεδομένων (φυλογενετικό σήμα) και οι βιολογικές διεργασίες που δεν στάθηκε δυνατό να ληφθούν υπόψη κατά την ανάλυση αλλά μπορούσαν να επιδράσουν στην ανακατασκευή της φυλογένειας (Abecasis et al., 2011; Leitner et al., 1999; Leitner et al., 1996; Paraskevis et al., 2004; Scaduto et al., 2010).

Ωστόσο, και οι μέθοδοι κλασσικής επιδημιολογίας έχουν αρκετούς περιορισμούς. Υπάρχουν περιπτώσεις όπου επιδημιολογικοί δείκτες, όπως η επίπτωση και ο R_0 , είναι δύσκολο να υπολογιστούν με τις κλασσικές μεθόδους. Για παράδειγμα, για τα άτομα που έχουν μολυνθεί με HIV-1 δεν είναι δυνατό να εκτιμηθεί το πότε έγινε η μετάδοση του ιού λόγω της μεγάλης διάρκειας της λανθάνουσας περιόδου. Επιπρόσθετα, δεδομένου ότι διάφοροι τύποι σφαλμάτων υπεισέρχονται συχνά στις επιδημιολογικές μελέτες, οι κλασσικές μέθοδοι πρέπει να λαμβάνουν υπόψη την πιθανή ύπαρξη σφαλμάτων και να διορθώνουν κατάλληλα τις εκτιμήσεις τους ώστε να μην οδηγούνται σε λανθασμένα συμπεράσματα (Paraskevis et al., 2016).

Συμπερασματικά, οι διαθέσιμες μέθοδοι μοριακής επιδημιολογίας αποτελούν ένα ισχυρό εργαλείο για τη δημόσια υγεία, με αρκετά πλεονεκτήματα έναντι των μεθόδων κλασσικής επιδημιολογίας. Σε ορισμένες περιπτώσεις τα μοριακά δεδομένα είναι πιο εύκολα διαθέσιμα από ότι τα δεδομένα επιδημιολογικής επιτήρησης, με

αποτέλεσμα οι μοριακές αναλύσεις να μπορούν να διεξαχθούν πιο γρήγορα και με μεγαλύτερη ευκολία. Παρόλο αυτά, οι κλασικές μέθοδοι παραμένουν σημαντικές και πρέπει να χρησιμοποιούνται συνδυαστικά με τις μοριακές.

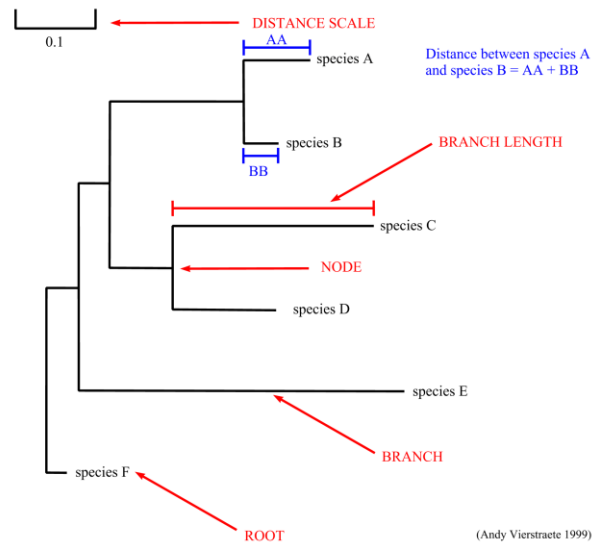
5.1 Φυλογενετική ανάλυση

Η φυλογενετική χρησιμοποιείται για την εκτίμηση και αναπαράσταση των εξελικτικών σχέσεων διαφορετικών οργανισμών ή διαφορετικών ατόμων του ίδιου οργανισμού. Η μέθοδος αυτή βασίζεται σε μοριακά δεδομένα [γενετικό υλικό (DNA, RNA) οργανισμών ή πρωτεϊνικές αλληλουχίες που κωδικοποιούνται από το γενετικό υλικό] και εφαρμόζεται σε πολλά πεδία της σύγχρονης βιολογίας και ιατρικής, δίνοντας απαντήσεις σε κρίσιμα επιστημονικά ερωτήματα όπως η προέλευση του ανθρώπου (Hall et al., 2006).

Απαραίτητη προϋπόθεση για την εκτίμηση των εξελικτικών σχέσεων διαφορετικών οργανισμών είναι ο υπολογισμός του βαθμού της μεταξύ τους ετερογένειας. Ο βαθμός ετερογένειας υπολογίζεται συγκρίνοντας περιοχές DNA που αντιστοιχούν σε ομόλογες περιοχές ή σε περιοχές που κωδικοποιούν για παρόμοιες λειτουργίες. Ο εντοπισμός των ομόλογων περιοχών για κάθε αλληλουχία επιτυγχάνεται μέσω μιας διαδικασίας η οποία χαρακτηρίζεται ως «στοίχιση-συστοιχία» (alignment) αλληλουχιών (Lam et al., 2010). Στοίχιση μπορεί να πραγματοποιηθεί τόσο σε ένα ζεύγος αλληλουχιών όσο και σε πολλαπλές αλληλουχίες χρησιμοποιώντας αλγορίθμους δυναμικού προγραμματισμού, αλγορίθμους κρυμμένων Μαρκοβιανών μοντέλων και γενετικούς ή προοδευτικούς αλγορίθμους (Rosenberg et al., 2009). Εφόσον ολοκληρωθεί η παραπάνω διαδικασία, ακολουθεί η εκτίμηση των γενετικών αποστάσεων των αλληλουχιών, η οποία βασίζεται στο ποσοστό ανομοιότητάς τους (αριθμός θέσεων που διαφέρουν οι αλληλουχίες). Η γενετική απόσταση ορίζεται ως ο αναμενόμενος αριθμός νουκλεοτιδικών αντικαταστάσεων που έχουν συμβεί στις αλληλουχίες DNA στη διάρκεια της εξέλιξης και αποτελεί μια ποσοτικοποίηση του μεγέθους της εξελικτικής αλλαγής που συνέβη στο γενετικό υλικό των οργανισμών. Λόγω του ότι, όπως έχει δειχθεί, ο παρατηρούμενος αριθμός μεταλλαγών υποεκτιμά τον αντίστοιχο αναμενόμενο, έχουν αναπτυχθεί εξελικτικά μοντέλα τα οποία «διορθώνουν» τις παρατηρούμενες γενετικές αποστάσεις ώστε να επιτυγχάνονται εκτιμήσεις του πραγματικού αριθμού εξελικτικών αλλαγών.

Τα πιο διαδεδομένα εξελικτικά μοντέλα είναι τα Jukes and Cantor (JC69) (Jukes and Cantor, 1969), Hasegawa-Kishino-Yano (HKY85) (Hasegawa et al., 1985), Tamura-Nei (TN93) (Tamura and Nei et al., 1993) και General Time Reversible (GTR) (Gatto et al., 2006). Το JC69 αποτελεί το απλούστερο εξελικτικό μοντέλο, ενώ το GTR το πιο σύνθετο, αλλά παράλληλα, και το πιο διαδεδομένο στην ανάλυση μοριακών δεδομένων. Συγκεκριμένα, στις παραδοχές του μοντέλου GTR περιλαμβάνονται ότι τα νουκλεοτίδια έχουν διαφορετική συχνότητα, ότι η κάθε νουκλεοτιδική αντικατάσταση συμβαίνει με διαφορετικό ρυθμό και ότι οι αντικαταστάσεις είναι συμμετρικές («αντιστροφής του χρόνου»).

Η φυλογενετική ανάλυση θα καταλήξει στην εκτίμηση μίας φυλογενετικής τοπολογίας στην οποία θα αναπαρίστανται οι εξελικτικές σχέσεις των υπό μελέτη οργανισμών. Συνοπτικά, όπως παρουσιάζεται και στην *Εικόνα 32*, η φυλογενετική τοπολογία έχει το σχήμα ενός δένδρου, το οποίο αποτελείται από κλάδους (branches) και κόμβους (nodes) που κατηγοριοποιούνται σε εξωτερικούς και εσωτερικούς. Οι εξωτερικοί κόμβοι αντιστοιχούν στις υπό μελέτη αλληλουχίες, ενώ οι εσωτερικοί αναπαριστούν τους υποθετικούς προγόνους των αλληλουχιών. Ένα δένδρο μπορεί να έχει ρίζα (root), η οποία θα αναπαριστά τον κοινό πρόγονο όλων των αλληλουχιών, ή να μην έχει (unrooted). Ειδική κατηγορία των δένδρων με ρίζα αποτελούν τα δένδρα με ρίζα μέσης θέσης (midpoint rooted), όπου η ρίζα υπολογίζεται στο μέσο της απόστασης των δυο αλληλουχιών με το μεγαλύτερο μήκος κλαδιών. Εφόσον υπάρχει ρίζα στο δένδρο, η απόσταση του κάθε κόμβου (εσωτερικού ή εξωτερικού) από αυτή αντιπροσωπεύει την εξελικτική απόσταση των υπό μελέτη αλληλουχιών από τον κοινό τους πρόγονο. Η φυλογενετική τοπολογία μπορεί να κατασκευαστεί με διάφορες μεθόδους φυλογενετικής ανάλυσης. Οι μέθοδοι αυτοί υπολογίζουν το μήκος των κλάδων (branch length) του δένδρου, το οποίο και αναλογεί στον αριθμό των εξελικτικών αλλαγών που έχουν συμβεί κατά το χρονικό διάστημα που έχουν εξελιχθεί οι αλληλουχίες. Οι πιο διαδεδομένες μέθοδοι φυλογενετικής ανάλυσης είναι οι μέθοδοι αποστάσεων και οι μέθοδοι χαρακτήρων.



Εικόνα 32 Φυλογενετική τοπολογία (<https://users.ugent.be/~avierstr/principles/phylogeny.html>).

Οι μέθοδοι αποστάσεων βασίζονται αρχικά στην εκτίμηση των γενετικών αποστάσεων για όλα τα ζεύγη των υπό μελέτη αλληλουχιών, και στη συνέχεια εκτιμούν τη φυλογενετική τοπολογία χρησιμοποιώντας έναν αλγόριθμο που στηρίζεται σε μια ακολουθία υπολογισμών. Είναι πολύ γρήγορες και βασίζονται σε εξελικτικά μοντέλα που περιέχουν διορθώσεις για πολλαπλές αντικαταστάσεις. Παρόλο αυτά, υπολογίζουν μία μόνο τοπολογία, εξαρτώνται από το εξελικτικό μοντέλο που επιλέχθηκε και ελαχιστοποιούν την πληροφορία σε έναν και μόνο αριθμό, τη γενετική απόσταση (Durbin et al., 1998). Οι κυριότερες μέθοδοι αποστάσεων είναι οι UPGMA (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic mean) και Neighbor-Joining (Mount, 2008).

- **UPGMA (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic mean)**

Η μέθοδος UPGMA αποτελεί την απλούστερη μέθοδο κατασκευής φυλογενετικών τοπολογιών. Η βασική παραδοχή της μεθόδου είναι ότι ο ρυθμός εξέλιξης των αλληλουχιών είναι σταθερός. Αρχικά υπολογίζεται η γενετική απόσταση των αλληλουχιών, αφού πρώτα έχει εκτιμηθεί ο βαθμός ανομοιότητας τους ανά ζεύγη, και στη συνέχεια η διαδικασία επαναλαμβάνεται μέχρι να προστεθούν όλες οι υπό μελέτη αλληλουχίες και να κατασκευαστεί η τελική φυλογενετική τοπολογία (Sokal et al., 1958).

- **Neighbor-Joining**

Η μέθοδος Neighbor-Joining μοιάζει αρκετά με τη μέθοδο UPGMA, χωρίς, όμως, να υιοθετεί την παραδοχή του σταθερού ρυθμού εξέλιξης. Η συγκεκριμένη μέθοδος αποτελεί την πιο διαδεδομένη μέθοδο αποστάσεων και πλεονεκτεί σημαντικά έναντι της μεθόδου UPGMA λόγω του ότι η παραδοχή του ίσου ρυθμού εξέλιξης για όλες τις αλληλουχίες ισχύει σπάνια (Saitou et al., 1987; Pearson et al., 2012).

Οι μέθοδοι χαρακτήρων βασίζονται στην εκτίμηση της τελικής φυλογενετικής τοπολογίας συγκρίνοντας διαφορετικές τοπολογίες βάσει ενός κριτηρίου βελτιστοποίησης, το οποίο μπορεί να είναι η πιθανοφάνεια ή η φειδωλότητα. Οι μέθοδοι χαρακτήρων είναι ιδιαίτερα διαδεδομένες διότι δίνουν τη δυνατότητα εκτίμησης όλων των πιθανών φυλογενετικών τοπολογιών καταλήγοντας σε εκείνη που μεγιστοποιεί το εκάστοτε κριτήριο. Αυτό έχει ως συνέπεια να θεωρούνται πιο αξιόπιστες από τις μεθόδους αποστάσεων, οι οποίες υπολογίζουν μία και μόνο τοπολογία. Οι συγκεκριμένες μέθοδοι είναι υπολογιστικά απαιτητικές και γι' αυτόν το λόγο χρησιμοποιούνται ευρετικές μέθοδοι που μειώνουν τον αριθμό των υπό εξέταση τοπολογιών σε κάθε βήμα των αλγορίθμων (Durbin et al., 1998). Οι πιο διαδεδομένες μέθοδοι χαρακτήρων είναι η μέθοδος της μέγιστης φειδωλότητας (maximum parsimony), η μέθοδος της μέγιστης πιθανοφάνειας (maximum likelihood) και η μέθοδος Μπεϋζιανής συμπερασματολογίας (Bayesian inference).

- **Μέθοδος της μέγιστης φειδωλότητας (maximum parsimony)**

Η μέθοδος της μέγιστης φειδωλότητας έχει ως στόχο να εκτιμήσει τη φυλογενετική τοπολογία που απαιτεί το μικρότερο αριθμό εξελικτικών αλλαγών, προσδιορίζοντας τις παρατηρούμενες διαφορές μεταξύ των υπό μελέτη αλληλουχιών. Συγκεκριμένα, η μέθοδος αρχικά κατηγοριοποιεί τις θέσεις της συστοιχίας σε πληροφοριακές και μη πληροφοριακές. Μια θέση θεωρείται πληροφοριακή αν ευνοεί μια τοπολογία σε σχέση με τις υπόλοιπες.

Στη συνέχεια, για κάθε τοπολογία υπολογίζεται ο ελάχιστος απαιτούμενος αριθμός αντικαταστάσεων και επιλέγεται εκείνη με το μικρότερο αριθμό. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται για όλες τις πληροφοριακές θέσεις και τελικά η τοπολογία μέγιστης φειδωλότητας είναι εκείνη για την οποία απαιτούνται συνολικά οι λιγότερες αντικαταστάσεις λαμβάνοντας υπόψη όλες τις θέσεις πληροφορίας. Όμως, με τη μέθοδο αυτή υπολογίζεται μόνο η φυλογενετική τοπολογία και όχι τα μήκη των κλάδων, δηλαδή το μέτρο των εξελικτικών αποστάσεων. Επίσης, παρόλο που σαν μέθοδος παρέχει τη δυνατότητα να μελετηθούν όλες οι διαφορετικές τοπολογίες προκειμένου να βρεθεί η τοπολογία μέγιστης φειδωλότητας, είναι εξαιρετικά αργή όταν ο αριθμός των υπό μελέτη αλληλουχιών είναι μεγάλος, όταν ο αλγόριθμος δεν περιλαμβάνει διορθώσεις για τις πολλαπλές αντικαταστάσεις και όταν ο ρυθμός εξέλιξης διαφέρει μεταξύ των αλληλουχιών, και μειονεκτεί έναντι των υπολοίπων μεθόδων (Lam et al., 2010; Eck et al., 1966).

- **Μέθοδος της μέγιστης πιθανοφάνειας (maximum likelihood)**

Η φυλογενετική ανάλυση με τη μέθοδο της μέγιστης πιθανοφάνειας έχει ως βασικό στόχο να υπολογίσει ανάμεσα σε όλες τις πιθανές φυλογενετικές τοπολογίες την τοπολογία, το μήκος των κλάδων και τις παραμέτρους του εξελικτικού μοντέλου (συχνότητα εμφάνισης νουκλεοτιδίων, ρυθμοί αντικατάστασης κ.λπ.) που μεγιστοποιούν την πιθανότητα να παρατηρηθούν τα υπό μελέτη δεδομένα (αλληλουχίες DNA ή πρωτεϊνών). Η βασική παραδοχή της μεθόδου είναι ότι η κάθε θέση στη συστοιχία εξελίσσεται ανεξάρτητα από τις υπόλοιπες. Η παραδοχή αυτή επιτρέπει τον υπολογισμό της πιθανοφάνειας της κάθε θέσης ξεχωριστά λαμβάνοντας υπόψη όλα τα πιθανά σενάρια (νουκλεοτιδικές αντικαταστάσεις) σύμφωνα με τα οποία μπορεί να έχουν εξελιχθεί οι αλληλουχίες, και στη συνέχεια το συνδυασμό όλων των θέσεων για την εκτίμηση της συνολικής πιθανοφάνειας (Lam et al., 2010; Felsenstein et al., 1985). Η πιθανοφάνεια ορίζεται ως η δεσμευμένη πιθανότητα να παρατηρηθούν τα υπό μελέτη δεδομένα δεδομένης της φυλογενετικής τοπολογίας και του εξελικτικού μοντέλου.

$$L(\text{τοπολογία, εξελικτικό μοντέλο}) \\ = \text{Prob}(\text{συστοιχία αλληλουχιών} \mid \text{τοπολογία, εξελικτικό μοντέλο})$$

Όμως, το κριτήριο βελτιστοποίησης της συγκεκριμένης μεθόδου, δηλαδή η πιθανοφάνεια, δεν παρέχει καμία πληροφορία σχετικά με το αν οι παραδοχές του μοντέλου που επιλέχθηκε είναι σωστές ή όχι. Δηλαδή, αν θεωρηθεί ότι τα υπό μελέτη δεδομένα έχουν εξελιχθεί σύμφωνα με ένα συγκεκριμένο εξελικτικό μοντέλο, ακόμα και αν το μοντέλο αυτό απέχει πολύ από την πραγματικότητα, το τελικό αποτέλεσμα της μεθόδου (φυλογενετική τοπολογία) θα αντιστοιχεί στη λύση με τη τιμή μέγιστης πιθανοφάνειας να παρατηρηθούν τα δεδομένα βάσει του χρησιμοποιούμενου μοντέλου (Biology et al., 2009).

- **Μέθοδος Μπεϋζιανής συμπερασματολογίας (Bayesian inference)**

Η μέθοδος αυτή αποτελεί μία επέκταση της μεθόδου της μέγιστης πιθανοφάνειας στα πλαίσια της Μπεϋζιανής συμπερασματολογίας. Η Μπεϋζιανή συμπερασματολογία είναι μία μέθοδος στατιστικής συμπερασματολογίας η οποία δίνει τη δυνατότητα να ληφθούν υπόψη στην ανάλυση των δεδομένων τυχόν εκ των προτέρων πεποιθήσεις που μπορεί να υπάρχουν σχετικά με αυτά. Στη συγκεκριμένη μέθοδο χρησιμοποιείται το θεώρημα του Bayes, το οποίο ενσωματώνει στην ανάλυση με τρόπο συστηματικό τη διαθέσιμη πληροφορία. Τα τελευταία χρόνια η ευρεία διάθεση ισχυρών υπολογιστικών συστημάτων και η ανάπτυξη εύκολα παραμετροποιήσιμου λογισμικού οδήγησε στην επέκταση της Μπεϋζιανής συμπερασματολογίας και στην φυλογενετική ανάλυση, η οποία βασίζεται σε μια ποσότητα που ονομάζεται ύστερη πιθανότητα μιας τοπολογίας (Boys et al., 2004). Το θεώρημα του Bayes για τη φυλογενετική συμπερασματολογία πήρε την ακόλουθη μορφή:

$$P(\text{Tree} \mid \text{Data}) = \frac{P(\text{Data} \mid \text{Tree})P(\text{Tree})}{P(\text{Data})}$$

Το θεώρημα αυτό συνδυάζει την εκ των προτέρων πιθανότητα μιας φυλογένειας $P(\text{Tree})$ με τη συνάρτηση πιθανοφάνειας $P(\text{Data} | \text{Tree})$ με σκοπό να παράγει μια ύστερη πιθανότητα στις τοπολογίες (δένδρα) $P(\text{Tree} | \text{Data})$. Αυτή η ύστερη πιθανότητα μεταφράζεται ως η πιθανότητα το δένδρο να είναι σωστό. Στη συνέχεια, επιλέγεται το δένδρο με τη μεγαλύτερη ύστερη πιθανότητα ως ο καλύτερος εκτιμητής της πραγματικής εξελικτικής ιστορίας. Επειδή στην πράξη είναι αδύνατο να υπολογιστεί αναλυτικά το άθροισμα όλων των πιθανών τοπολογιών [σταθερά κανονικοποίησης, $P(\text{Data})$] που χρειάζονται για την εκτίμηση της ύστερης πιθανότητας, έχουν αναπτυχθεί ευρετικοί αλγόριθμοι που λύνουν το πρόβλημα προσεγγιστικά. Μία τέτοια ευρεία κατηγορία υπολογιστικών αλγορίθμων είναι οι προσομοιώσεις Μαρκοβιανών αλυσίδων (Markov Chains Monte Carlo – MCMC), οι οποίες βασίζονται σε επαναλαμβανόμενες τυχαίες δειγματοληψίες για την επίτευξη αριθμητικών αποτελεσμάτων και χρησιμοποιούνται για την προσομοίωση μαθηματικών συστημάτων που είναι περίπλοκα να επιλυθούν (Gilks et al., 1996; Kass et al., 1997). Η ολοκλήρωση κατά Monte Carlo εφαρμόζεται για τη δειγματοληψία από κάποια περίπλοκη κατανομή πιθανοτήτων χρησιμοποιώντας τον αλγόριθμο Metropolis-Hastings (Metropolis et al., 1949; Metropolis et al., 1953; Hastings et al., 1970).

Τέλος, αφού ολοκληρωθεί η κατασκευή της φυλογενετικής τοπολογίας (δένδρου) ακολουθεί η αξιολόγηση της αξιοπιστίας του. Η αξιολόγηση αυτή πραγματοποιείται μέσω στατιστικού ελέγχου, ο οποίος εξαρτάται από τη μέθοδο φυλογενετικής ανάλυσης που εφαρμόστηκε. Ο πιο διαδεδομένος είναι ο μη παραμετρικός έλεγχος bootstrapping (μέθοδος bootstrap), ο οποίος βασίζεται σε μια τεχνική επαναλαμβανόμενης δειγματοληψίας. Αναλυτικότερα, στη μέθοδο bootstrap αρχικά ανακατατάσσονται τυχαία οι θέσεις στη συστοιχία, και στη συνέχεια για κάθε ανακαταταγμένη στοίχιση δημιουργείται ένα δένδρο με την ίδια μεθοδολογία που ακολουθήθηκε για την κατασκευή του αρχικού δένδρου. Στο δένδρο που προκύπτει από κάθε ανακατάταξη καταμετρώνται οι κόμβοι που εντοπίζονται στην ίδια θέση με το αρχικό δένδρο. Αν ένας κόμβος ενώνει δύο άκρα με ίδια δεδομένα (taxa), η τιμή bootstrap του κόμβου αυτού αυξάνεται κατά 1 μονάδα. Η διαδικασία αυτή

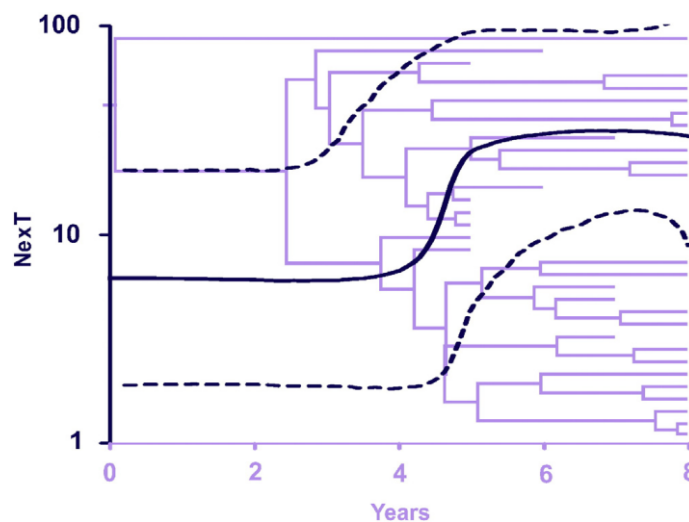
επαναλαμβάνεται αρκετές φορές (συνήθως περισσότερες από 100), και στο τέλος των επαναλήψεων αποδίδεται σε κάθε κόμβο η τιμή bootstrap η οποία έχει υπολογιστεί ως ποσοστό με βάση τον αριθμό των επαναλήψεων. Όσο μεγαλύτερες είναι οι τιμές bootstrap των κόμβων ενός δένδρου τόσο πιο σημαντικοί θεωρούνται οι κόμβοι αυτοί. Επίσης, υψηλές τιμές bootstrap για όλους τους κόμβους ενισχύουν σημαντικά την αξιοπιστία ενός δένδρου (Felsenstein, 1981).

5.2 Φυλοδυναμική ανάλυση

Η φυλοδυναμική είναι μια μέθοδος η οποία εστιάζει στη μελέτη της αλληλεπίδρασης επιδημιολογικών και εξελικτικών διεργασιών των παθογόνων εντός και μεταξύ των πληθυσμών (Rife et al., 2017). Η συγκεκριμένη μέθοδος καθιερώθηκε στη μελέτη ταχέως εξελισσόμενων ιών, όπως ο HIV-1, και χρησιμοποιήθηκε για την εκτίμηση της χρονικής προέλευσης και το χαρακτηρισμό της δυναμικής της μετάδοσης επιμέρους επιδημιών των ιών (Grenfell et al., 2004; Rife et al., 2017). Η φυλοδυναμική επιτρέπει την εκτίμηση επιδημιολογικών δεικτών μέσω των οποίων επιτυγχάνεται η ποσοτικοποίηση της δυναμικής της μετάδοσης μιας επιδημίας. Ένας τέτοιος επιδημιολογικός δείκτης είναι ο R_0 , ο οποίος αποτελεί το πιο διαδεδομένο μέτρο μεταδοτικότητας μιας νόσου. Ο R_0 αντιπροσωπεύει το μέσο αριθμό των δευτερογενών μεταδόσεων που προκαλούνται από ένα μόνο άτομο κατά τη διάρκεια της μολυσματικής περιόδου όταν όλος ο πληθυσμός είναι επίνοσος (Fraser et al., 2009). Στην ουσία αποτελεί ένα δείκτη που υπολογίζει την πιθανότητα που έχει ένα λοιμώδες νόσημα να προκαλέσει επιδημία. Ειδικότερα, αν $R_0 > 1$ τότε κατά πάσα πιθανότητα η εισαγωγή του λοιμογόνου παράγοντα στον πληθυσμό θα οδηγήσει σε επιδημία. Αντίθετα, αν $R_0 < 1$ τότε πιθανότατα δε θα υπάρξει επιδημία. Όσο μεγαλύτερος εκτιμάται ο R_0 τόσο μεγαλύτερη θα είναι και η δυναμική της μετάδοσης της επιδημίας (Stadler et al., 2012; Diekmann et al., 1990). Στα επόμενα στάδια της επιδημίας, όπου ο επίνοσος πληθυσμός έχει πλέον μειωθεί, στη θέση του R_0 εκτιμάται ένας άλλος δείκτης, ο R_e , που αντιπροσωπεύει το μέσο αριθμό των δευτερογενών μεταδόσεων που προκαλούνται από ένα μόνο άτομο σε έναν πληθυσμό που δεν είναι εξολοκλήρου επίνοσος (Biggerstaff et al., 2014).

Η συγκεκριμένη μέθοδος βασίζεται στις εκτιμήσεις της φυλογενετικής (φυλογένεια του ιού) και σε εξελιγμένα μαθηματικά μοντέλα για να προβεί σε περαιτέρω εκτιμήσεις αναφορικά με τα κύρια χαρακτηριστικά μιας επιδημίας, όπως η χρονική της προέλευση και η δυναμική της μετάδοσής της (Εικόνα 33). Η ανάλυση πραγματοποιείται σε μοριακά δεδομένα (αλληλουχίες νουκλεοτιδίων για αλληλουχίες DNA ή αμινοξέων για πρωτεΐνες), τα οποία, συνήθως, έχουν συλλεγεί σε διαφορετικές χρονικές στιγμές, χρησιμοποιώντας μοντέλα μοριακού ρολογιού. Τα μοντέλα αυτά

χρησιμοποιούνται για την εκτίμηση του ρυθμού εξέλιξης (ρυθμός με τον οποίο συμβαίνουν οι αντικαταστάσεις) κάνοντας την παραδοχή ότι ο ρυθμός αυτός είναι περίπου σταθερός μεταξύ των υπό μελέτη αλληλουχιών για όσο χρονικό διάστημα αυτές διατηρούν την αρχική τους λειτουργία (αρχή του μοριακού ρολογιού). Η παραδοχή αυτή χρησιμεύει στην εκτίμηση των ημερομηνιών απόκλισης μεταξύ των αλληλουχιών. Ο ρυθμός εξέλιξης εκφράζεται ως ο αριθμός των αντικαταστάσεων ανά νουκλεοτιδική θέση στη μονάδα του χρόνου που έχει οριστεί (π.χ. ανά έτος ή ανά εκατομμύρια έτη). Έχουν προταθεί διάφορα μαθηματικά μοντέλα, τα οποία κυρίως βασίζονται σε Μπεϋζιανή συμπερασματολογία, για την εκτίμηση του ρυθμού εξέλιξης, μεταξύ των οποίων τα αυστηρά μοντέλα μοριακού ρολογιού (strict clock models), τα χαλαρά μοντέλα μοριακού ρολογιού (relaxed clock models) και τα μοντέλα πολλαπλής συχνότητας (multi-rate clocks) (Kimura, 1980; Ho, 2013; Ho, 2014). Τα χαλαρά μοντέλα αποτελούν μια ενδιάμεση κατηγορία μεταξύ των αυστηρών μοντέλων και των μοντέλων πολλαπλής συχνότητας, επιτρέπουν ένα διακριτό ρυθμό αντικατάστασης σε κάθε κλάδο του δένδρου, είναι πιο περίπλοκα και δύσκολα να υπολογιστούν αλλά πιο ρεαλιστικά και με πιο ακριβείς εκτιμήσεις (Drummond et al., 2006; Drummond et al., 2010; Ho, 2013).



Εικόνα 33 Χρονολογημένη τοπολογία και δυναμική της μετάδοσης της επιδημίας που εκτιμήθηκαν μέσω φυλοδυναμικής ανάλυσης (Paraskevis et al., 2016).

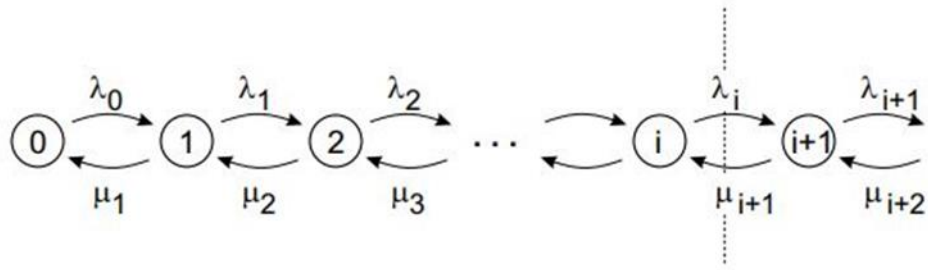
Αναφορικά με την εκτίμηση της δυναμικής της μετάδοσης μιας επιδημίας, οι διαδικασίες/μοντέλα που χρησιμοποιούνται πιο συχνά είναι η σύγκλιση (Coalescent) και τα μοντέλα γέννησης-θανάτου (Birth-Death models – BDM).

- **Σύγκλιση (Coalescent)**

Η Coalescent αποτελεί μια στοχαστική διαδικασία η ανάπτυξη της οποίας συνέβαλε σημαντικά στην εξέλιξη της φυλοδυναμικής (Kingman, 1982a; Kingman, 1982b). Η n-Coalescent αποτελεί μια Μαρκοβιανή αλυσίδα συνεχούς χρόνου με ένα πεπερασμένο σύνολο καταστάσεων, η οποία περιγράφει τις σχέσεις μεταξύ των ατόμων ενός δείγματος (n) από έναν πολυπληθή πληθυσμό. Συγκεκριμένα, η θεωρία αυτή υποθέτει ότι το υπό μελέτη δείγμα έχει προέλθει από έναν Wright-Fisher πληθυσμό. Ένας τέτοιος πληθυσμός είναι σταθερός (δηλαδή έχει μη μεταβαλλόμενο μέγεθος) και χαρακτηρίζεται από διακριτές μη επικαλυπτόμενες γενεές. Η βασική ιδέα της Coalescent είναι η παρατήρηση πληθυσμών πίσω στο χρόνο χρησιμοποιώντας τους παρατηρούμενους χρόνους απόκλισης μεταξύ των ατόμων ενός δείγματος για τον υπολογισμό του χρόνου ως τον πιο κοινό πρόγονο όλων των ατόμων (time to the most recent common ancestor – t_{MRCA}). Μέσω φυλοδυναμικής ανάλυσης, η οποία βασίζεται στην θεωρία της Coalescent, εκτιμώνται ο χρόνος ως τον πιο κοινό πρόγονο (αριθμός των γενεών που έχουν περάσει από τη στιγμή που τα άτομα μοιράζονταν ένα κοινό πρόγονο) και μια παράμετρος θ (theta) που αναπαριστά το πώς κλιμακώνεται το μέγεθος (effective size) του πληθυσμού στην πορεία του χρόνου. Η Coalescent παρουσιάζει σημαντικούς περιορισμούς όταν πρόκειται να εφαρμοστεί σε λοιμώδη νοσήματα. Ο βασικότερος εξ αυτών είναι ότι μπορεί να εφαρμοστεί και να οδηγήσει σε αξιόπιστες εκτιμήσεις μόνο αν το δείγμα που μελετάται αποτελεί ένα πολύ μικρό ποσοστό του πραγματικού πληθυσμού των ατόμων που έχουν μολυνθεί με το παθογόνο. Ως εκ τούτου, η Coalescent δε μπορεί εύκολα να εφαρμοστεί σε ιούς όπως ο HIV-1, όπου συνήθως υπάρχει υψηλή δειγματοληπτική κάλυψη (dense sampling) του υπό μελέτη πληθυσμού. Επίσης, η διαδικασία αυτή δε μπορεί να δώσει εκτιμήσεις για τους ρυθμούς μετάδοσης, ανάρρωσης/θανάτου και δειγματοληψίας (Drummond et al., 2005; Pybus et al., 2000).

- **Μοντέλα γέννησης-θανάτου (Birth-Death models – BDM)**

Τα μοντέλα γέννησης-θανάτου αποτελούν μια ειδική περίπτωση της στοχαστικής Μαρκοβιανής διαδικασίας συνεχούς χρόνου, όπου υπάρχουν μόνο δυο τύποι μεταβάσεων στην επόμενη κατάσταση: 1) Γεννήσεις (λ), οι οποίες αυξάνουν την κατάσταση κατά μία μονάδα. Δηλαδή, όταν συμβαίνει μία γέννηση η διαδικασία πηγαίνει από την κατάσταση n στην $n + 1$. 2) Θανάτους (μ), οι οποίοι μειώνουν την κατάσταση κατά μία μονάδα. Επομένως, όταν συμβαίνει ένας θάνατος η διαδικασία μεταβαίνει από την κατάσταση n στην $n - 1$. Η όλη διαδικασία καθορίζεται από τα ποσοστά γεννήσεων $\{\lambda_i\}_{i=0 \dots \infty}$ και θανάτων $\{\mu_i\}_{i=1 \dots \infty}$ (Εικόνα 34) (Virtamo, 2005). Τα μοντέλα αυτά έχουν πολλές εφαρμογές στη θεωρία ουρών αναμονής, στην επιδημιολογία και στη βιολογία. Στις αναλύσεις μοριακής επιδημιολογίας χρησιμοποιούνται συχνά, ως εναλλακτική διαδικασία έναντι εκείνης της Coalescent, όταν ο πληθυσμός από τον οποίο προέρχεται το δείγμα δεν ικανοποιεί τις προϋποθέσεις ενός Wright-Fisher πληθυσμού ή όταν το δείγμα δεν αποτελεί μικρό ποσοστό του πραγματικού πληθυσμού των ατόμων που έχουν μολυνθεί με το παθογόνο. Συγκεκριμένα, τα μοντέλα αυτά υποθέτουν ότι το δείγμα προέρχεται από έναν πληθυσμό όπου κάθε άτομο μπορεί να γεννηθεί ή να πεθάνει οποιαδήποτε χρονική στιγμή. Ένα γεγονός γέννησης αντιστοιχεί σε μία νέα μόλυνση, ενώ ένα γεγονός θανάτου στη μείωση του πληθυσμού των ατόμων που έχουν μολυνθεί κατά ένα άτομο (λόγω θανάτου ή θεραπείας). Στο μοντέλο παραμετροποιούνται ξεχωριστά οι ρυθμοί μετάδοσης, ανάρρωσης/θανάτου και δειγματοληψίας. Λόγω του ότι ο ρυθμός δειγματοληψίας αποτελεί μία ξεχωριστή παράμετρο στο μοντέλο, τα μοντέλα γέννησης-θανάτου μπορούν να εφαρμοστούν και σε περιπτώσεις ιών όπου η δειγματοληπτική κάλυψη είναι υψηλή (HIV-1). Εκτός από την εκτίμηση της χρονολογημένης τοπολογίας, η μέθοδος προχωρά και στη διαχρονική εκτίμηση του αριθμού των μεταδόσεων του παθογόνου. Μέσω γραφικής αναπαράστασης του αριθμού των μεταδόσεων στην πορεία του χρόνου (lineages through time) μπορεί να ελεγχθεί αν η αύξηση των μεταδόσεων πραγματοποιήθηκε εκθετικά ή με σταθερό ρυθμό (Stadler, 2009; Kuhnert et al., 2014; Stadler et al., 2013b; Stadler et al., 2012; Stadler, 2010).



Εικόνα 34 Διαδοχικά στάδια της διαδικασίας που περιγράφουν τα μοντέλα γέννησης-θανάτου (birth-death models – BDM) (Virtamo, 2005)

5.3 Φυλογεωγραφική ανάλυση

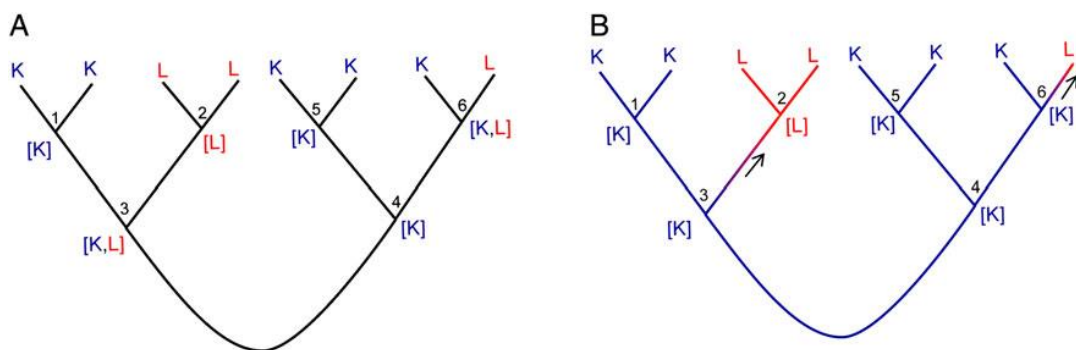
Η φυλογεωγραφία αποτελεί ένα επιστημονικό πεδίο το οποίο μελετά τις ιστορικές και εξελικτικές διεργασίες που είναι υπεύθυνες για την παλαιότερη και σύγχρονη γεωγραφική κατανομή των οργανισμών, συνδυάζοντας στοιχεία γενετικής, γενετικής πληθυσμών, εξέλιξης, φυλογενετικής, παλαιοντολογίας και γεωλογίας (Avise, 2000). Η φυλογεωγραφία είναι ένα χρήσιμο εργαλείο στην προσπάθεια διερεύνησης της καταγωγής και της κατανομής των οργανισμών, και μπορεί να εφαρμοστεί και σε μελέτες μοριακής επιδημιολογίας. Συγκεκριμένα, ως μέθοδος μοριακής επιδημιολογίας παρέχει σημαντικές πληροφορίες για την πληρέστερη κατανόηση του τρόπου διασποράς και της εξελικτικής ιστορίας ενός παθογόνου μικροοργανισμού, ανασυνθέτοντας τα γεωγραφικά πρότυπα διασποράς του παθογόνου και τις διαδρομές εξάπλωσής του μεταξύ διαφορετικών γεωγραφικών μονάδων (Paraskevis et al., 2009; Lemey et al., 2009; Holmes, 2008). Αυτή η μεθοδολογία έχει εφαρμοστεί σε μελέτες του ιού της γρίπης Α (H5N1) (Wallace et al., 2007), της ηπατίτιδας C (Nakano et al., 2004), του HIV-1 (Paraskevis et al., 2009; Angelis et al., 2015; Magiorkinis et al., 2016) κ.α.

Η μέθοδος της φυλογεωγραφίας συνδυάζεται με τη μέθοδο της φυλογενετικής ώστε να κατασκευαστεί, εν τέλει, ένα φυλογεωγραφικό δένδρο το οποίο θα παρέχει συνδυαστικές πληροφορίες τόσο ως προς την τοπολογία των αλληλουχιών όσο και ως προς τη γεωγραφική προέλευση των προγόνων που ανακατασκευάστηκαν από τη μέθοδο. Αναλυτικότερα, αρχικά εκτιμώνται τα γεγονότα διασποράς του ιού (migration events) στο φυλογενετικό δένδρο που εκτιμήθηκε κατά τη φυλογενετική ανάλυση και αναπαριστά την εξελικτική ιστορία των υπό μελέτη αλληλουχιών. Εναλλακτικά, τα γεγονότα διασποράς μπορούν να εκτιμηθούν στο σύνολο των bootstrap φυλογενετικών δένδρων. Όταν η φυλογεωγραφία πραγματοποιείται σε ένα μεγάλο αριθμό φυλογενετικών δένδρων λαμβάνει υπόψη τη φυλογενετική αβεβαιότητα, διότι τα γεγονότα διασποράς υπολογίζονται σε ένα σύνολο δένδρων και όχι σε ένα μόνο δένδρο. Το φυλογενετικό δένδρο ή τα bootstrap φυλογενετικά δένδρα χρησιμοποιούνται από τη μέθοδο ώστε να επιτευχθεί η ανασύνθεση της διασποράς του ιού στο παρελθόν από τη μία γεωγραφική μονάδα στην άλλη. Η ανασύνθεση γίνεται με μη παραμετρικά

μοντέλα χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της μέγιστης φειδωλότητας. Η μέθοδος της μέγιστης φειδωλότητας στα πλαίσια της συγκεκριμένης ανάλυσης εφαρμόζεται ως εξής: i) Αρχικά σε όλους τους κλάδους του/των φυλογενετικού/ών δένδρου/ων δίνεται ένας χαρακτήρας ανάλογα με τη γεωγραφική τους προέλευση (π.χ. 0 για την Ελλάδα). ii) Στη συνέχεια χρησιμοποιείται ένας αλγόριθμος ο οποίος αναδομεί τους προγονικούς χαρακτήρες, οι οποίοι αντιστοιχούν σε γεωγραφικές μονάδες, στους εσωτερικούς κόμβους του δένδρου με βάση το κριτήριο της μέγιστης φειδωλότητας και, επίσης, ελαχιστοποιεί τον αριθμό των γεγονότων διασποράς του κάθε ιικού στελέχους από τη μία γεωγραφική μονάδα στην άλλη. Μέσω αυτής της διαδικασίας, εν τέλει, εκτιμάται το πιο «φειδωλό» φυλογεωγραφικό δένδρο (Paraskevis et al., 2009).

Η αναδόμηση του προγονικού χαρακτήρα για κάθε εσωτερικό κόμβο ενός φυλογενετικού δένδρου αποτελεί μια αρκετά πολύπλοκη διαδικασία. Για παράδειγμα, όταν δυο κλάδοι από την ίδια χώρα τοποθετούνται μαζί στο δένδρο, τότε ο προγονικός χαρακτήρας που ανασκευάζεται είναι ο ίδιος, κι επομένως δεν υπάρχει γεγονός διασποράς. Στην περίπτωση, όμως, που δυο κλάδοι από διαφορετικές χώρες τοποθετούνται μαζί, ο προγονικός χαρακτήρας που ανασκευάζεται δεν είναι ο ίδιος. Αυτό έχει ως συνέπεια ο κόμβος να διχοτομείται και να χαρακτηρίζεται από την ένωση των δύο χαρακτήρων που αντιπροσωπεύουν τις δυο χώρες, και αυτό να θεωρείται ένα γεγονός διασποράς. Ειδικότερα, τα γεγονότα διασποράς στις περιπτώσεις όπου οι κλάδοι είναι από διαφορετικές χώρες εκτιμώνται ως εξής: i) Στην περίπτωση όπου ένας κόμβος έχει δυο, αλλά ισάξιους ως προς τα κριτήρια φειδωλότητας, χαρακτήρες, γίνεται επανέλεγχος ως προς την ανακατασκευή του, και για κάθε αλλαγή χαρακτήρα το πρόγραμμα δίνει το μέσο αριθμό των εκτιμώμενων αλλαγών από όλες τις πιθανές ανακατασκευές. ii) Όταν ένας κόμβος μπορεί να ανακατασκευασθεί με περισσότερους από δυο χαρακτήρες, η μέθοδος δεν προχωρά στην αναδόμηση του προγονικού χαρακτήρα για το συγκεκριμένο κόμβο διότι δε μπορεί να προβεί σε ασφαλή συμπεράσματα (Paraskevis et al., 2009).

Η παραπάνω διαδικασία μπορεί να γίνει ευκολότερα αντιληπτή μέσα από το παράδειγμα της *Εικόνας 35*. Στο παράδειγμα αυτό γίνεται η υπόθεση ότι υπάρχουν 8 κλάδοι (αλληλουχίες) από δυο διαφορετικές χώρες, οι οποίες εκπροσωπούνται από τους χαρακτήρες K και L. Στη φυλογενετική τοπολογία της *Εικόνας 35A* για όσους κλάδους ήταν από την ίδια χώρα και τοποθετήθηκαν μαζί, ο προγονικός χαρακτήρας ανασκευάστηκε άμεσα στους αντίστοιχους κόμβους (κόμβοι 1, 2 και 5) και δεν εκτιμήθηκε κάποιο γεγονός διασποράς. Αντίθετα, στους κλάδους που προέρχονταν από διαφορετικές χώρες και τοποθετήθηκαν μαζί, η ανακατασκευή του προγονικού χαρακτήρα στους αντίστοιχους κόμβους (κόμβοι 3 και 6) δε μπόρεσε να πραγματοποιηθεί και, ως εκ τούτου, δεν κατέστη δυνατό να προσδιοριστεί η κατεύθυνση της διασποράς του ιού (δηλαδή από ποια χώρα μεταδόθηκε ο ιός στην άλλη). Όπως μπορούμε να δούμε στη φυλογενετική τοπολογία της *Εικόνας 35B*, ο προσδιορισμός του προγονικού χαρακτήρα σε αυτούς τους κόμβους (κόμβοι 3 και 6) πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας την πληροφορία των προγονικών χαρακτήρων των γειτονικών τους κόμβων και εφαρμόζοντας τη μέθοδο της μέγιστης φειδωλότητας. Συγκεκριμένα, στους κόμβους 3 και 6 έγινε ανακατασκευή του προγονικού τους χαρακτήρα με βάση τον προγονικό χαρακτήρα του κόμβου 4 εκτιμώντας το πιο φειδωλό σενάριο που μπορούσε να έχει συμβεί. Μέσω αυτής της διαδικασίας προσδιορίστηκε η κατεύθυνση της διασποράς του ιού ($K \rightarrow L$). Ωστόσο, δεν είναι όλες οι καταστάσεις τόσο απλές και ξεκάθαρες όσο αυτή που περιγράφηκε στο παραπάνω παράδειγμα, με αποτέλεσμα να μη μπορούν όλες οι ασαφείς περιπτώσεις να επιλυθούν, και ιδιαίτερα εκείνες όπου οι κλάδοι προέρχονται από πολλές διαφορετικές γεωγραφικές μονάδες (Angelis et al., 2015).



Εικόνα 35 Αναπαράσταση διαδικασίας αναδόμησης προγονικών χαρακτήρων στους εσωτερικούς κόμβους μιας τοπολογίας και υπολογισμού των γεγονότων διασποράς του ιού (Angelis et al., 2015).

Αφού υπολογιστεί το σύνολο των γεγονότων διασποράς, και εφόσον αυτά έχουν εκτιμηθεί από περισσότερα από ένα φυλογενετικά δένδρα, στη συνέχεια κατανέμονται σε έναν πίνακα όπου οι σειρές και οι στήλες του αντιπροσωπεύουν τη γεωγραφική προέλευση και το γεωγραφικό προορισμό αντίστοιχα. Σε κάθε κελί του πίνακα δίνεται η μέση ή η διάμεση τιμή της κατανομής των γεγονότων διασποράς που εκτιμήθηκαν από όλα τα φυλογενετικά δένδρα που αναλύθηκαν. Τέλος, εφαρμόζεται στατιστική φυλογεωγραφία για να ελεγχθεί αν ο αριθμός των γεγονότων διασποράς που εκτιμήθηκαν διαφέρει σημαντικά από τον αριθμό των γεγονότων διασποράς που αναμένονταν υπό τη μηδενική υπόθεση της πλήρους γεωγραφικής ανάμειξης. Συγκεκριμένα, σε αυτό το στατιστικό έλεγχο (μονόπλευρος μη παραμετρικός έλεγχος Mann-Whitney U test με διόρθωση Bonferroni για πολλαπλούς ελέγχους) συγκρίνεται η κατανομή των γεγονότων διασποράς από τα φυλογενετικά δένδρα με την αντίστοιχη κατανομή από τα ίδια δένδρα στα οποία, όμως, έχουν ανακαταταναμηθεί τυχαία τα δεδομένα στα άκρα τους. Η υπόθεση της πλήρους γεωγραφικής ανάμειξης κάνει την παραδοχή ενός πληθυσμού όπου το κάθε άτομο έχει περίπου την ίδια πιθανότητα να μεταδώσει τον ιό σε οποιοδήποτε άλλο άτομο του πληθυσμού (πανμικτική υπόθεση μετάδοσης – panmixis hypothesis). Έτσι, μια τυχαία ανακατανομή των δεδομένων στα άκρα ενός δένδρου (γεωγραφικές μονάδες) θα προσομοίωνε ένα δένδρο το οποίο θα είχε συναχθεί από έναν τέτοιο πληθυσμό. Σημαντικά θεωρούνται τα μονοπάτια διασποράς του ιού για τα οποία εκτιμήθηκε σημαντικά μεγαλύτερος αριθμός παρατηρούμενων έναντι αναμενόμενων γεγονότων διασποράς. Σε αρκετές περιπτώσεις εκτιμάται, επιπρόσθετα, μια αναλογία μεταξύ της παρατηρούμενης και της αναμενόμενης μέσης τιμής των γεγονότων διασποράς η οποία παρέχει μια ποσοτικοποίηση της σχετικής κινητικότητας του ιού μεταξύ των διαφορετικών γεωγραφικών μονάδων. Υψηλότερες αναλογίες υποδεικνύουν υψηλότερα επίπεδα εξάπλωσης του ιού μεταξύ των γεωγραφικών μονάδων. Η αναλογία αυτή δε μπορεί να αποδοθεί στην τύχη και είναι διορθωμένη από πιθανή ύπαρξη σφάλματος δειγματοληψίας λόγω του άνισου αριθμού στελεχών ανά γεωγραφική μονάδα. Η παραπάνω στρατηγική επιτρέπει την εκτίμηση αξιόπιστων στατιστικά σημαντικών διαφορών ακόμα και όταν ο αριθμός των στελεχών ανά γεωγραφική μονάδα είναι άνισος (Paraskevis et al., 2009; Wallace et al., 2007).

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

**Διαχρονική εκτίμηση του επιπολασμού των
HIV-1 υπότυπων και ανασυνδυασμένων τύπων
στην Ελληνική επικράτεια μεταξύ 1999 και 2015**

6.1 Εισαγωγή-Σκοπός

Σύμφωνα με δεδομένα του εθνικού συστήματος επιδημιολογικής επιτήρησης της HIV/AIDS λοίμωξης (ΚΕ.ΕΛ.Π.ΝΟ., 2018), το μεγαλύτερο ποσοστό των PLHIV στην Ελλάδα είναι MSM, ενώ ακολουθούν με μικρότερα ποσοστά οι ετεροφυλόφιλοι και οι XEN. Μελέτες μοριακής επιδημιολογίας έχουν δείξει ότι τα στελέχη του HIV-1 που εντοπίζονται στην Ελλάδα χαρακτηρίζονται από υψηλή γενετική ετερογένεια. Συγκεκριμένα, η επιδημία του HIV-1 στην Ελλάδα ξεκίνησε από μεταδόσεις στελεχών υπότυπου B, όπως και στις περισσότερες χώρες της Δυτικής Ευρώπης. Ο συγκεκριμένος υπότυπος αποτέλεσε από την αρχή της επιδημίας τον επικρατέστερο στη χώρα. Η εικόνα αυτή άρχισε να διαφοροποιείται στην πορεία του χρόνου λόγω της αύξησης του αριθμού των μεταδόσεων στελεχών υπότυπου A1, με αποτέλεσμα το 2004 ο επιπολασμός του A1 να είναι υψηλότερος από εκείνον του B (42% και 33% αντίστοιχα). Επίσης, ο A1 βρέθηκε να σχετίζεται σημαντικά με μεταδόσεις σε άτομα με πρόσφατη HIV-1 λοίμωξη (Nikolopoulos et al., 2008; Paraskevis et al., 2007). Τα τελευταία χρόνια οι A1 και B είναι οι επικρατέστεροι HIV-1 τύποι στην Ελλάδα. Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω, στο παρόν κεφάλαιο, ο σκοπός ήταν να εκτιμηθεί ο επιπολασμός των HIV-1 υπότυπων και ανασυνδυασμένων τύπων στην Ελλάδα στο σύνολο του πληθυσμού των PLHIV με διαθέσιμο δείγμα το χρονικό διάστημα 1999-2015.

Για το σκοπό αυτό, η ανάλυση πραγματοποιήθηκε σταδιακά ως εξής: i) Δημιουργία βάσης δεδομένων με το σύνολο των διαθέσιμων νουκλεοτιδικών αλληλουχιών ανά άτομο με HIV-1 λοίμωξη με δειγματοληψία το χρονικό διάστημα μεταξύ 1999 και 06/2015 σε διάφορες περιοχές της Ελλάδας. ii) Διατήρηση μόνο της αλληλουχίας με την προγενέστερη χρονολογικά ημερομηνία δειγματοληψίας για τις περιπτώσεις των PLHIV με πολλαπλά δείγματα. iii) Στοίχιση και διόρθωση των αλληλουχιών, απομάκρυνση των αλληλουχιών με μη ικανοποιητικό αριθμό νουκλεοτιδικών βάσεων (<631) και αντικατάστασή τους από την επόμενη χρονολογικά αλληλουχία, εφόσον αυτή υπήρχε διαθέσιμη. iv) Εκτίμηση του υπότυπου για το σύνολο των διαθέσιμων μοναδικών αλληλουχιών ανά άτομο με HIV-1 λοίμωξη.

6.2 Υλικό-Μέθοδοι

6.2.1 Βάση δεδομένων HIV-1 αλληλουχιών

Συγκεντρώθηκαν σε βάση δεδομένων 7.052 HIV-1 νουκλεοτιδικές αλληλουχίες, οι οποίες ήταν διαθέσιμες στο γονίδιο *pol* και συγκεκριμένα στην πρωτεάση (PR) και σε τμήμα της αντίστροφης μεταγραφάσης (RT). Οι υπό μελέτη αλληλουχίες αποτελούσαν το σύνολο των διαθέσιμων αλληλουχιών με δειγματοληψία το χρονικό διάστημα 1999-06/2015 σε διάφορες περιοχές της Ελλάδας. Ειδικότερα, οι αλληλουχίες απομονώθηκαν από PLHIV οι οποίοι παρακολουθούνταν σε Μονάδες Ειδικών Λοιμώξεων (Μ.Ε.Λ.) της Αττικής και της Αλεξανδρούπολης. Στις Μ.Ε.Λ. της Αττικής παρακολουθούνται άτομα με HIV-1 λοίμωξη από το μεγαλύτερο τμήμα της Ελληνικής επικράτειας, εκτός από εκείνο της Βόρειας και Δυτικής Ελλάδας, της Ρόδου και της Κρήτης. Δεδομένων των παραπάνω, και όσον αφορά στη γεωγραφική κάλυψη του υπό μελέτη πληθυσμού, στα πλαίσια της παρούσας διατριβής ο όρος «Ελληνική επικράτεια» χρησιμοποιείται για να περιγράψει όλη τη χώρα, πλην των τμημάτων της Βόρειας και Δυτικής Ελλάδας, της Ρόδου και της Κρήτης.

Το σύνολο των αλληλουχιών που συγκεντρώθηκαν ($N = 7.052$) αφορούσε ήδη διαθέσιμο αρχειακό υλικό 4.919 PLHIV. Για το 21,5% ($N = 1.060$) των PLHIV βρέθηκαν πολλαπλά δείγματα ($N = 3.193$), τα οποία είχαν συλλεγεί σε διαφορετικές χρονικές στιγμές, και διατηρήθηκε μόνο το δείγμα με την προγενέστερη χρονολογικά ημερομηνία δειγματοληψίας. Ως εκ τούτου, συγκεντρώθηκαν 4.919 (69,8%) μοναδικές HIV-1 αλληλουχίες. Έπειτα από στοίχιση και διόρθωση των 4.919 αλληλουχιών, εντοπίστηκαν 108 (2,2%) αλληλουχίες με μη ικανοποιητικό μήκος νουκλεοτιδικών βάσεων. Οι αλληλουχίες αυτές ($N = 108$) είτε αντικαταστάθηκαν με την επόμενη χρονολογικά διαθέσιμη αλληλουχία ($N = 45$, 41,7%) είτε απομακρύνθηκαν λόγω έλλειψης άλλου διαθέσιμου δείγματος για το συγκεκριμένο άτομο ($N = 63$, 58,3%). Εν τέλει, το υλικό της διατριβής απαρτίζονταν από 4.856 μοναδικές αλληλουχίες, με μήκος 897 νουκλεοτιδικές βάσεις. Το μεγαλύτερο ποσοστό των αλληλουχιών αυτών είχε συλλεγεί το χρονικό διάστημα μεταξύ 2011 και 06/2015 ($N = 2.446$, 50,4%), ενώ

τα διαστήματα 1999-2004 και 2005-2010 είχαν συλλεγεί 1.167 (24,0%) και 1.243 (25,6%) αλληλουχίες αντίστοιχα. Για το σύνολο των αλληλουχιών (N = 4.856) εκτιμήθηκε ο HIV-1 υπότυπος και, επίσης, ήταν διαθέσιμα και τα δημογραφικά χαρακτηριστικά (φύλο, κατηγορία μετάδοσης, εθνικότητα, ηλικία) των PLHIV από τους οποίους είχαν απομονωθεί.

6.2.2 Στοιχίση και διόρθωση HIV-1 αλληλουχιών

Η στοιχίση των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών πραγματοποιήθηκε στο πρόγραμμα MEGA v7 χρησιμοποιώντας τον αλγόριθμο MUSCLE. Η επεξεργασία και η διόρθωση τους έγινε μη αυτόματα σύμφωνα με το κωδικοποιούμενο πλαίσιο ανάγνωσης (Kumar et al., 2016).

6.2.3 Υποτύπωση HIV-1 αλληλουχιών

Για όσες αλληλουχίες υπήρχε καταχωρημένη πληροφορία αναφορικά με τον HIV-1 υπότυπο χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος υποτύπωσης COMET v0.2 (Stuck et al., 2014) προς επιβεβαίωσή του. Για τις αλληλουχίες με μη διαθέσιμο υπότυπο, καθώς και για όσες αλληλουχίες υπήρξε ασυμφωνία μεταξύ του καταχωρημένου υπότυπου και εκείνου που υπέδειξε η μέθοδος COMET, εφαρμόστηκε φυλογενετική ανάλυση. Στην ανάλυση αυτή χρησιμοποιήθηκαν 216 αλληλουχίες αντιπροσωπευτικές όλων των γνωστών HIV-1 υπότυπων και CRFs ως αλληλουχίες αναφοράς. Οι αλληλουχίες αναφοράς βρέθηκαν διαθέσιμες στη βάση δεδομένων του HIV (Los Alamos HIV Sequences Database). Αναλυτικότερα, οι αλληλουχίες αναφοράς αφορούσαν: i) 55 αλληλουχίες 9 υπότυπων (A-D, F-H, J, K) και 7 υπο-υπότυπων (A1-A4, A6, F1, F2) και ii) 161 αλληλουχίες από τους περισσότερους CRFs. Η φυλογενετική ανάλυση πραγματοποιήθηκε στο πρόγραμμα FastTree v2.1 (Price et al., 2010) χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της μέγιστης πιθανοφάνειας, το GTR+cat ως μοντέλο νουκλεοτιδικής αντικατάστασης καθώς και την κατανομή Γάμμα για τη διόρθωση του ρυθμού ανομοιογένειας μεταξύ των θέσεων του DNA. Τα φυλογενετικά δένδρα

αναπαραστάθηκαν με το πρόγραμμα FigTree v1.4.0 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

Σε όσες αλληλουχίες δεν κατηγοριοποιήθηκαν σε κάποιον γνωστό HIV-1 υπότυπο ή CRF με τις παραπάνω μεθόδους πραγματοποιήθηκε περαιτέρω έλεγχος για την εύρεση των ανασυνδυασμένων τύπων του ιού με τα προγράμματα RDP4 (Martin et al., 2005) και Simplot (Lole et al., 1999). Στα πλαίσια της ανάλυσης που πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα Simplot, οι ανασυνδυασμένοι τύποι εντοπίστηκαν μέσω φυλογενετικής ανάλυσης με bootstrapping. Τα φυλογενετικά δένδρα εκτιμήθηκαν με τη μέθοδο Neighbor-Joining χρησιμοποιώντας το F84 μοντέλο αποστάσεων ως μοντέλο νουκλεοτιδικής αντικατάστασης και 100 αντίγραφα bootstrap.

6.3 Αποτελέσματα

6.3.1 Δημογραφικά χαρακτηριστικά του πληθυσμού

Η πλειοψηφία των 4.856 PLHIV ήταν άνδρες (N = 4.096, 84,4%), Ελληνικής εθνικότητας (N = 2.898, 59,7%) με μέση ηλικία τα 44 έτη (ενδοτεταρτημοριακό εύρος: 37-53). Αναφορικά με την κατηγορία μετάδοσης, το 49,7% (N=2.412) ήταν MSM, το 21,1% (N=1.023) XEN και το 18,6% (N=902) ετεροφυλόφιλοι (*Πίνακας 1, σελ. 140*).

6.3.2 Αποτελέσματα HIV-1 υποτύπησης

Η υποτύπηση του συνόλου των αλληλουχιών (N = 4.856) έδειξε ότι οι πιο συχνοί HIV-1 τύποι στην Ελληνική επικράτεια το χρονικό διάστημα 1999-06/2015 ήταν οι υπότυποι B (N = 2.144, 44,2%), A1 (N = 1.226, 25,3%) και C (N = 147, 3,0%), καθώς και οι ανασυνδυασμένοι τύποι CRF14_BG (N = 494, 10,1%), CRF35_AD (N = 160, 3,3%), CRF56_cpx (N = 150, 3,1%) και CRF02_AG (N = 146, 3,0%) (*Πίνακας 2,*

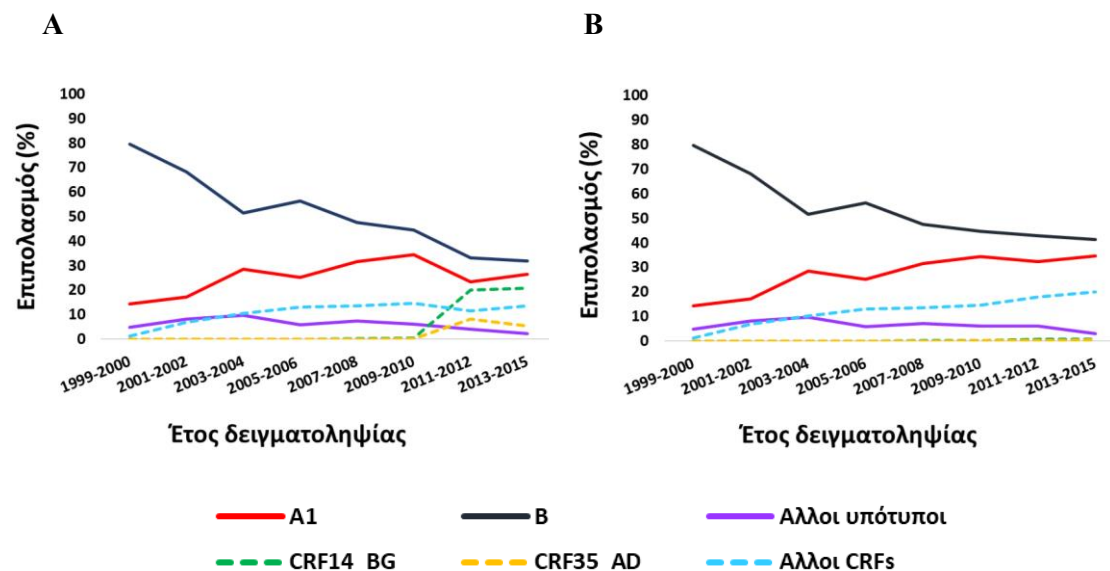
σελ. 141). Επιμερίζοντας το χρονικό διάστημα 1999-06/2015 σε μικρότερες περιόδους (1999-2004, 2005-2010, 2011-06/2015), βρέθηκε ότι: i) Την περίοδο 1999-2004, οι υπότυποι B (N = 752, 64,4%), A1 (N = 242, 20,7%) και C (N = 60, 5,2%) αφορούσαν σχεδόν το 90% των μεταδόσεων, ενώ οι ανασυνδυασμένοι τύποι εντοπίζονταν σε ιδιαίτερα χαμηλά ποσοστά (~6%). ii) Την περίοδο 2005-2010, οι πιο συχνοί τύποι ήταν οι υπότυποι B (N = 607, 48,8%), A1 (N = 379, 30,5%) και C (N = 47, 3,8%), καθώς και οι ανασυνδυασμένοι τύποι CRF56_cpx (N = 56, 4,5%) και CRF02_AG (N = 48, 3,9%). iii) Την περίοδο 2011-06/2015, οι υπότυποι B (N = 785, 32,1%) και A1 (N = 605, 24,7%), καθώς και οι ανασυνδυασμένοι τύποι CRF14_BG (N = 491, 20,1%), CRF35_AD (N = 159, 6,5%), CRF56_cpx (N = 78, 3,2%) και CRF02_AG (N = 80, 3,3%) βρέθηκαν να έχουν τον υψηλότερο επιπολασμό (Πίνακας 3, σελ. 142).

6.3.3 Διαχρονική εκτίμηση του επιπολασμού των HIV-1 υπότυπων

Η διαχρονική εκτίμηση του επιπολασμού των HIV-1 υπότυπων και ανασυνδυασμένων τύπων έδειξε ότι ο επιπολασμός όλων των μη A1 υπότυπων, μεταξύ των οποίων και οι B [1999-2004: 64,4%, 2005-2010: 48,8%, 2011-06/2015: 32,1%] και C [1999-2004: 5,2%, 2005-2010: 3,8%, 2011-06/2015: 1,6%], μειώνονταν σταδιακά καθ' όλη τη διάρκεια του διαστήματος μεταξύ 1999 και 06/2015 ($p = 0,010$). Σε αντίθεση με τους άλλους υπότυπους, ο επιπολασμός του A1 [1999-2004: 20,7%, 2005-2010: 30,5%, 2011-06/2015: 24,7%] παρουσίασε αυξητικές τάσεις την περίοδο 1999-2010. Αυξητική τάση στο χρόνο παρουσίασε και ο επιπολασμός των ανασυνδυασμένων τύπων του ιού ($p = 0,010$). Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτέλεσε η ραγδαία αύξηση των CRF14_BG [1999-2004: 0,0%, 2005-2010: 0,2%, 2011-06/2015: 20,1%] και CRF35_AD [1999-2004: 0,0%, 2005-2010: 0,1%, 2011-06/2015: 6,5%] (Πίνακας 3, Εικόνα 36A).

Η μεγάλη επιμέρους επιδημία στους XEN στην Αθήνα συνέβαλε στο να διαφοροποιηθεί η εικόνα της HIV-1 επιδημίας στην Ελλάδα αναφορικά με τον επιπολασμό των διαφορετικών υπότυπων και ανασυνδυασμένων τύπων του ιού. Προκειμένου να μελετηθεί η επιδημία του HIV-1 ανεξάρτητα από την επίδραση της

επιδημικής έκρηξης στους ΧΕΝ, επανεκτιμήθηκε διαχρονικά ο επιπολασμός των υπότυπων και ανασυνδυασμένων τύπων έχοντας εξαιρεθεί από τον υπό μελέτη πληθυσμό οι αλληλουχίες που απομονώθηκαν από ΧΕΝ οι οποίοι μολύνθηκαν μετά το 2010 στην Αθήνα. Η επανεκτίμηση επιβεβαίωσε τη διαχρονική πτωτική τάση του επιπολασμού όλων των μη Α1 υπότυπων ($p = 0,010$), την αυξητική τάση όλων των ανασυνδυασμένων τύπων ($p = 0,008$), και, επιπρόσθετα, ανέδειξε ότι ο επιπολασμός του υπότυπου Α1 [1999-2004: 20,7%, 2005-2010: 30,5%, 2011-06/2015: 32,9%] αυξάνονταν σημαντικά καθ' όλη τη διάρκεια του διαστήματος 1999-06/2015 ($p = 0,012$) (Πίνακας 4 σελ. 143, Εικόνα 36B).



Εικόνα 36 Εκτιμώμενος επιπολασμός των HIV-1 υπότυπων και ανασυνδυασμένων τύπων ανά διαίτα για το διάστημα μεταξύ 1999 και 06/2015 στην Ελληνική επικράτεια: (Α) στο σύνολο των αλληλουχιών της διατριβής ($N = 4.856$) και (Β) σε ένα υποσύνολο των αλληλουχιών της διατριβής από το οποίο έχουν εξαιρεθεί όσες αλληλουχίες απομονώθηκαν από ΧΕΝ που μολύνθηκαν στην Αθήνα μετά το 2010 (δηλαδή κατά τη διάρκεια της επιμέρους επιδημίας των ΧΕΝ) ($N = 4.033$). Στο γράφημα αναπαρίστανται με διαφορετικά χρώματα οι τύποι του ιού. Για λόγους ευκρίνειας αναπαρίστανται στην πορεία του χρόνου ο επιπολασμός των επικρατέστερων HIV-1 υπότυπων (Α1, Β) και CRFs (CRF14_BG, CRF35_AD), ενώ οι υπόλοιποι τύποι έχουν ομαδοποιηθεί σε ευρύτερες κατηγορίες («Αλλοι υπότυποι» και «Αλλοι CRFs»).

6.3.4 Χαρακτηριστικά των PLHIV που είχαν μολυνθεί με διαφορετικά HIV-1 στελέχη

Αν και η πλειονότητα των PLHIV βρέθηκε να είναι άνδρες, ανεξάρτητα από τον υπότυπο ή τον ανασυνδυασμένο τύπο με τον οποίο είχαν μολυνθεί, στους μη A1 μη B υπότυπους εντοπίστηκαν ιδιαίτερα υψηλά ποσοστά γυναικών (εύρος: 43,0-48,3%) (Πίνακας 5, σελ. 144).

Αναφορικά με την κατηγορία μετάδοσης των PLHIV, στους υπότυπους A1 και B, στον CRF56_cpx και στους απροσδιόριστους τύπους το μεγαλύτερο ποσοστό αφορούσε MSM (εύρος: 40,9-71,3%). Αντίθετα, στον υπότυπο C και στους μη A1 μη B μη C υπότυπους η πλειονότητα αφορούσε ετεροφυλόφιλους (68,0% και 61,3% αντίστοιχα). Οι CRF01_AE και CRF02_AG εντοπίζονταν σε υψηλά ποσοστά τόσο σε MSM (48,3% και 48,0% αντίστοιχα) όσο και ετεροφυλόφιλους (29,3% και 34,2% αντίστοιχα). Τέλος, στους CRF14_BG (95,4%) και CRF35_AD (92,5%), καθώς και στους URFs (57,0%) η συντριπτική πλειοψηφία αφορούσε XEN (Πίνακας 6, σελ. 145).

Ως προς την εθνικότητα, στους υπότυπους A1 και B, καθώς και σε όλους τους ανασυνδυασμένους τύπους (εκτός από τον CRF02_AG) η πλειοψηφία αφορούσε Έλληνες (εύρος: 39,6-76,9%). Αντίθετα, στον υπότυπο C (40,8%), στους μη A1 μη B μη C υπότυπους (46,2%) και στον CRF02_AG (31,5%) το μεγαλύτερο ποσοστό αφορούσε άτομα μη Ελληνικής εθνικότητας (Πίνακας 7, σελ. 146).

6.4 Συμπεράσματα

Στην παρούσα διατριβή αναλύθηκαν 4.856 μοναδικές HIV-1 νουκλεοτιδικές αλληλουχίες, οι οποίες είχαν απομονωθεί από PLHIV σε όλη σχεδόν την Ελληνική επικράτεια για μια περίοδο περίπου 17 ετών (1999-06/2015). Τα δεδομένα αυτά αποτελούν το μεγαλύτερο δείγμα που ήταν διαθέσιμο την περίοδο που

πραγματοποιήθηκε η ανάλυση. Το μεγαλύτερο ποσοστό αλληλουχιών με δειγματοληψία μετά το 2005 είχε απομονωθεί από μη θεραπευμένους PLHIV. Η πλειοψηφία των μη θεραπευμένων στον πληθυσμό το χρονικό διάστημα 2005-2015 οφείλεται, κατά κύριο λόγο, στην αλλαγή των κατευθυντήριων οδηγιών ως προς τη σύσταση πραγματοποίησης ελέγχου ανοτοχής πριν τη χορήγηση θεραπείας, και στο ιδιαίτερα μικρό ποσοστό ιολογικής αποτυχίας των νέων θεραπευτικών σχημάτων. Ως εκ τούτου, για το χρονικό διάστημα 2005-2015, η εκτίμηση του ποσοστού των HIV-1 υπότυπων και ανασυνδυασμένων τύπων αναφορικά με τη χρονική περίοδο προσεγγίζει τη χρονική περίοδο της διάγνωσης της HIV-1 λοίμωξης.

Όπως στις περισσότερες Ευρωπαϊκές χώρες, έτσι και στην Ελλάδα, το μεγαλύτερο ποσοστό των PLHIV αφορά MSM (ΚΕ.ΕΛ.Π.ΝΟ., 2018). Το υψηλό ποσοστό των XEN (21,1%) μεταξύ των PLHIV στην Ελλάδα οφείλεται στην εκθετική αύξηση του αριθμού των νέων HIV-1 διαγνώσεων σε αυτήν την πληθυσμιακή ομάδα μετά το τέλος του 2010, λόγω της επιδημικής έκρηξης του ιού στους XEN της Αθήνας το χρονικό διάστημα 2011-2012. Μέχρι και το 2010, μόλις το 4% των ετήσιων HIV-1 διαγνώσεων στην Ελλάδα αφορούσε XEN (ΚΕ.ΕΛ.Π.ΝΟ., 2018).

Η υποτύπηση του συνόλου των αλληλουχιών ($N = 4.856$) έδειξε ότι επικρατέστεροι HIV-1 τύποι στην Ελληνική επικράτεια παραμένουν μέχρι και το 2015 οι υπότυποι B (44,2%) και A1 (25,3%). Παρόλο αυτά, η επιδημία του HIV-1 δείχνει να διαφοροποιείται σημαντικά με το πέρασμα του χρόνου. Συγκεκριμένα, σε αντίθεση με τον επιπολασμό του υπότυπου A1 και των ανασυνδυασμένων τύπων του ιού, οι οποίοι έχουν αυξητικές τάσεις, ο επιπολασμός του υπότυπου B παρουσιάζει σταδιακή μείωση.

Αναλυτικότερα, η ανάλυση έδειξε την ύπαρξη τεσσάρων επιμέρους επιδημιών του ιού με διαφορετικά χαρακτηριστικά. Οι επιδημίες αυτές αφορούσαν: i) Τους υπότυπους A1 και B, οι οποίοι εντοπίζονται κυρίως σε Έλληνες MSM. ii) Τους μη A1 μη B υπότυπους, οι οποίοι εντοπίζονται, ως επί των πλείστων, σε ετεροφυλόφιλους με μη Ελληνική εθνικότητα. iii) Τους ανασυνδυασμένους τύπους CRF01_AE και

CRF02_AG, που εντοπίζονται τόσο σε MSM όσο και σε ετεροφυλόφιλους με Ελληνική (CRF01_AE) και μη Ελληνική εθνικότητα (CRF02_AG). iv) Τους ανασυνδυασμένους τύπους CRF14_BG και CRF35_AD, οι οποίοι εντοπίζονται, σχεδόν αποκλειστικά, σε Έλληνες XEN.

Όσον αφορά στην πρώτη επιμέρους επιδημία των υπότυπων A1 και B, παρατηρήθηκε ότι ενώ και οι δυο εντοπίζονται σε PLHIV με κοινά δημογραφικά χαρακτηριστικά (Έλληνες, MSM), εμφανίζουν σημαντικές διαφορές στις διαχρονικές τάσεις του επιπολασμού τους. Συγκεκριμένα, παρόλο που ο B αποτελεί από τα πρώιμα στάδια της επιδημίας μέχρι και σήμερα τον κυρίαρχο HIV-1 τύπο στην Ελληνική επικράτεια, ο επιπολασμός του ακολουθεί μια σταθερή πτωτική πορεία, με αποκορύφωμα την τελευταία χρονική περίοδο (2011-06/2015) όπου το ποσοστό του ήταν συγκρίσιμο με εκείνο του A1 (B: 41,2%, A1: 32,9%). Σε αντίθεση με τον B, ο επιπολασμός του υπότυπου A1 παρουσιάζει μια σταθερή ανοδική πορεία.

Οι διαφορές αυτές πιθανότατα οφείλονται σε παράγοντες οι οποίοι σχετίζονται είτε με το παθογόνο είτε με τον ξενιστή. Σε επίπεδο παθογόνου, οι αυξητικές τάσεις του υπότυπου A1 θα μπορούσαν να οφείλονται σε ενδεχόμενη υψηλότερη μολυσματικότητα του συγκεκριμένου τύπου. Σε επίπεδο ξενιστή, ο δείκτης R_0 έχει δείξει ότι εξαρτάται από την πιθανότητα μετάδοσης του ιού ανά επαφή, από τον αριθμό των επαφών στη μονάδα του χρόνου και από την περίοδο μολυσματικότητας. Δεδομένου ότι τόσο ο υπότυπος A1 όσο και ο υπότυπος B εντοπίζονται κυρίως σε Έλληνες MSM, η πιθανότητα μετάδοσης ανά επαφή δε θα μπορούσε να διαφέρει σημαντικά μεταξύ τους. Επομένως, μια πιθανή εξήγηση για τις διαφορές στις διαχρονικές τάσεις των A1 και B θα ήταν ότι οι PLHIV και έχουν μολυνθεί με στελέχη υπότυπου A1 έχουν υψηλότερη συμπεριφορά κινδύνου (μεγαλύτερο αριθμό επαφών) από εκείνους που έχουν μολυνθεί με στελέχη υπότυπου B.

Τα διαφορετικά πρότυπα διασποράς των υπότυπων A1 και B θα μπορούσαν, επίσης, να αποτελούν μια πιθανή εξήγηση των διαφορετικών τάσεών τους στο χρόνο. Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι όλες σχεδόν οι μεταδόσεις του υπότυπου A1

στην Ελλάδα πραγματοποιούνται εντός μίας μεγάλης φυλογενετικής ομάδας, η οποία δημιουργήθηκε μέσω μεμονωμένης εισαγωγής του ιού και διασποράς μεταξύ του τοπικού πληθυσμού (Nikolopoulos et al., 2008; Paraskevis et al., 2007). Όσον αφορά στα πρότυπα διασποράς του υπότυπου B, αν και δεν έχουν μελετηθεί εκτενώς, υπάρχουν σημαντικές ενδείξεις ότι ο συγκεκριμένος υπότυπος έχει εισαχθεί στη Ελλάδα από πολλές διαφορετικές πηγές (Nikolopoulos et al., 2008; Paraskevis et al., 2007). Όλες οι παραπάνω εκδοχές χρήζουν περαιτέρω διερεύνησης.

Ο επιπολασμός των μη A1 μη B υπότυπων (δεύτερη επιμέρους επιδημία) παρουσιάζει μια σταδιακή μείωση στην πορεία του χρόνου. Η πτωτική αυτή τάση θα μπορούσε να οφείλεται στο γεγονός ότι οι συγκεκριμένοι υπότυποι εντοπίζονται, κυρίως, σε ετεροφυλόφιλους μη Ελληνικής εθνικότητας, και, πιθανόν, αντικατοπτρίζει τη μειωμένη διασπορά σε τοπικά δίκτυα.

Οι ανασυνδυασμένοι τύποι CRF01_AE και CRF02_AG (τρίτη επιμέρους επιδημία) αντιστοιχούσαν σε ένα μικρό ποσοστό των μεταδόσεων του ιού στα πρώιμα στάδια της επιδημίας του HIV-1. Διαχρονικά άρχισαν να γίνονται συχνότεροι, με αποτέλεσμα ο επιπολασμός τους να παρουσιάσει μια σταδιακή αύξηση. Οι συγκεκριμένοι τύποι, σε αντίθεση με όλους τους παραπάνω, εντοπίζονται τόσο σε MSM όσο και σε ετεροφυλόφιλους. Αυτό έχει ως συνέπεια οι CRF01_AE και CRF02_AG να αποτελούν μία κατηγορία με ενδιάμεσα χαρακτηριστικά σε σχέση με τις επιμέρους επιδημίες των υπότυπων A1 και B και των μη A1 μη B υπότυπων. Τα ποσοστά τους που αφορούν μεταδόσεις μεταξύ MSM (τα οποία είναι και τα υψηλότερα) πιθανότατα σχετίζονται με τοπική διασπορά του ιού, η οποία και εξηγεί την αυξητική τους τάση. Αξίζει, επίσης, να σημειωθεί ότι το ποσοστό των MSM στους CRF01_AE και CRF02_AG είναι μεγαλύτερο σε σχέση με τους μη A1 μη B υπότυπους (οι οποίοι παρουσιάζουν πτωτική τάση).

Τέλος, σχετικά με την τέταρτη επιμέρους επιδημία των ανασυνδυασμένων τύπων CRF14_BG και CRF35_AD, βρέθηκε ότι ενώ μέχρι και το 2010 οι συγκεκριμένοι τύποι εντοπίζονταν σε ιδιαίτερα χαμηλά ποσοστά, την περίοδο 2011-

2015 ο επιπολασμός τους παρουσίασε ραγδαία αύξηση. Δεδομένου ότι τόσο ο CRF14_BG όσο και ο CRF35_AD εντοπίζονται σχεδόν αποκλειστικά σε Έλληνες XEN, η αύξηση αυτή οφείλεται στην επιδημική έκρηξη του HIV-1 στους XEN της Αθήνας το χρονικό διάστημα μεταξύ 2011 και 2012.

Πίνακας 1 Δημογραφικά χαρακτηριστικά PLHIV με διαθέσιμη αλληλουχία το χρονικό διάστημα 1999-06/2015 στην Ελληνική επικράτεια (υπό μελέτη πληθυσμός διατριβής).

	Αριθμός	Ποσοστό (%)
Φύλο		
Άνδρας	4.096	84,4
Γυναίκα	745	15,3
Άγνωστο	15	0,3
Κατηγορία μετάδοσης		
MSM ¹	2.412	49,7
XEN ²	1.023	21,1
Ετεροφυλόφιλοι	902	18,6
Άλλη	110	2,3
Άγνωστη	409	8,3
Εθνικότητα		
Ελληνική	2.898	59,7
Μη Ελληνική	598	12,3
Άγνωστη	1.360	28,0
	Διάμεση τιμή	IQR³
Ηλικία (έτη)*	44	(37-53)
Σύνολο	4.856	100

¹ MSM, Men who have Sex with Men

² XEN, Χρήστες Ενδοφλέβιων Ναρκωτικών

³ IQR, Interquartile Range (ενδοτεταρτημοριακό εύρος)

* Διαθέσιμη πληροφορία για 4.826 PLHIV

Πίνακας 2 Κατανομή HIV-1 υπότυπων και ανασυνδυασμένων τύπων στο σύνολο των αλληλουχιών με δειγματοληψία το χρονικό διάστημα 1999-06/2015 στην Ελληνική επικράτεια.

HIV-1 Υποτύπηση	Αριθμός	Ποσοστό (%)
A. Υπότυποι		
A1	1.226	25,3
B	2.144	44,2
C	147	3,0
Άλλοι υπότυποι	93	1,9
B. Ανασυνδυασμένοι τύποι		
CRF01_AE	58	1,2
CRF02_AG	146	3,0
CRF14_BG	494	10,1
CRF35_AD	160	3,3
CRF56_cpx	150	3,1
Άλλοι CRFs ¹	87	1,8
URFs ²	107	2,2
Γ. Απροσδιόριστοι τύποι	44	0,9
Σύνολο	4.856	100

¹CRFs, *Circulating Recombinant Forms*

²URFs, *Unique Recombinant Forms*

Πίνακας 3 Κατανομή HIV-1 υπότυπων και ανασυνδυασμένων τύπων μεταξύ διαφορετικών χρονικών περιόδων στο σύνολο των αλληλουχιών με δειγματοληψία το διάστημα 1999-06/2015 στην Ελληνική επικράτεια.

HIV-1 Υποτύπηση	Περίοδος δειγματοληψίας			Σύνολο (N, %)
	1999-2004 (N, %)	2005-2010 (N, %)	2011-06/2015 (N, %)	
A. Υπότυποι				
A1	242 (20,7)	379 (30,5)	605 (24,7)	1.226 (25,3)
B	752 (64,4)	607 (48,8)	785 (32,1)	2.144 (44,2)
C	60 (5,2)	47 (3,8)	40 (1,6)	147 (3,0)
Άλλοι υπότυποι	29 (2,5)	32 (2,6)	32 (1,3)	93 (1,9)
B. Ανασυνδυασμένοι τύποι				
CRF01_AE	4 (0,3)	15 (1,2)	39 (1,6)	58 (1,2)
CRF02_AG	18 (1,5)	48 (3,9)	80 (3,3)	146 (3,0)
CRF14_BG	0 (0,0)	3 (0,2)	491 (20,1)	494 (10,1)
CRF35_AD	0 (0,0)	1 (0,1)	159 (6,5)	160 (3,3)
CRF56_cpx	16 (1,4)	56 (4,5)	78 (3,2)	150 (3,1)
Άλλοι CRFs ¹	15 (1,3)	25 (2,0)	47 (1,9)	87 (1,8)
URFs ²	21 (1,8)	26 (2,1)	60 (2,5)	107 (2,2)
Γ. Απροσδιόριστοι τύποι				
	10 (0,9)	4 (0,3)	30 (1,2)	44 (0,9)
Σύνολο	1.167 (100)	1.243 (100)	2.446 (100)	4.856 (100)

¹CRFs, Circulating Recombinant Forms

²URFs, Unique Recombinant Forms

Πίνακας 4 Κατανομή HIV-1 υπότυπων και ανασυνδυασμένων τύπων μεταξύ διαφορετικών χρονικών περιόδων σε ένα υποσύνολο των αλληλουχιών με δειγματοληψία το διάστημα 1999-06/2015 στην Ελληνική επικράτεια, από το οποίο έχουν εξαιρεθεί όσες αλληλουχίες απομονώθηκαν από XEN που μολύνθηκαν στην Αθήνα κατά τη διάρκεια της επιμέρους επιδημίας του HIV-1.

HIV-1 Υποτύπηση	Περίοδος δειγματοληψίας			Σύνολο (N, %)
	1999-2004 (N, %)	2005-2010 (N, %)	2011-06/2015 (N, %)	
A. Υπότυποι				
A1	242 (20,7)	379 (30,5)	535 (32,9)	1.156 (28,7)
B	752 (64,4)	607 (48,8)	669 (41,2)	2.028 (50,3)
C	60 (5,2)	47 (3,8)	40 (2,5)	147 (3,6)
Άλλοι υπότυποι	29 (2,5)	32 (2,6)	32 (2,0)	93 (2,3)
B. Ανασυνδυασμένοι τύποι				
CRF01_AE	4 (0,3)	15 (1,2)	39 (2,4)	58 (1,4)
CRF02_AG	18 (1,5)	48 (3,9)	80 (4,9)	146 (3,6)
CRF14_BG	0 (0,0)	3 (0,2)	10 (0,6)	12 (0,3)
CRF35_AD	0 (0,0)	1 (0,1)	4 (0,2)	5 (0,1)
CRF56_cpx	16 (1,4)	56 (4,5)	78 (4,8)	150 (3,7)
Άλλοι CRFs ¹	15 (1,3)	25 (2,0)	47 (2,9)	87 (2,2)
URFs ²	21 (1,8)	26 (2,1)	60 (3,7)	107 (2,7)
Γ. Απροσδιόριστοι τύποι				
	10 (0,9)	4 (0,3)	30 (1,9)	44 (1,1)
Σύνολο	1.167 (100)	1.243 (100)	1.624 (100)	4.033 (100)

¹CRFs, *Circulating Recombinant Forms*

²URFs, *Unique Recombinant Forms*

Πίνακας 5 Κατανομή HIV-1 υπότυπων και ανασυνδυασμένων τύπων σε PLHIV με διαθέσιμη αλληλουχία το χρονικό διάστημα 1999-06/2015 στην Ελληνική επικράτεια, ως προς το φύλο.

HIV-1 Υποτύπηση	Φύλο			Σύνολο (%)
	Ανδρας (%)	Γυναίκα (%)	Άγνωστο (%)	
A. Υπότυποι				
A1	1.037 (84,6)	186 (15,2)	3 (0,2)	1.226 (100)
B	1.902 (88,7)	238 (11,1)	4 (0,2)	2.144 (100)
C	76 (51,7)	71 (48,3)	0 (0,0)	147 (100)
Άλλοι υπότυποι	53 (57,0)	40 (43,0)	0 (0,0)	93 (100)
B. Ανασυνδυασμένοι τύποι				
CRF01_AE	48 (82,8)	8 (13,8)	2 (3,4)	58 (100)
CRF02_AG	114 (78,1)	32 (21,9)	0 (0,0)	146 (100)
CRF14_BG	412 (83,4)	82 (16,6)	0 (0,0)	494 (100)
CRF35_AD	136 (85,0)	24 (15,0)	0 (0,0)	160 (100)
CRF56_cpx	141 (94,0)	8 (5,3)	1 (0,7)	150 (100)
Άλλοι CRFs ¹	55 (63,2)	31 (35,6)	1 (1,2)	87 (100)
URFs ²	84 (78,5)	19 (17,8)	4 (3,7)	107 (100)
Γ. Απροσδιόριστοι τύποι				
	38 (86,4)	6 (13,6)	0 (0,0)	44 (100)
Σύνολο	745 (15,3)	4.096 (84,4)	15 (0,3)	4.856 (100)

¹CRFs, *Circulating Recombinant Forms*

²URFs, *Unique Recombinant Forms*

Πίνακας 6 Κατανομή HIV-1 υπότυπων και ανασυνδυασμένων τύπων σε PLHIV με διαθέσιμη αλληλουχία το χρονικό διάστημα 1999-06/2015 στην Ελληνική επικράτεια, ως προς την κατηγορία μετάδοσης.

HIV-1 Υπότυψη	Κατηγορία μετάδοσης					Σύνολο (%)
	MSM ¹	XEN ²	Ετεροφυλόφιλοι	Άλλη	Άγνωστη	
A. Υπότυποι						
A1	704 (57,4)	120 (9,8)	262 (21,4)	15 (1,2)	125 (10,2)	1.226 (100)
B	1.408 (65,7)	191 (8,9)	318 (14,8)	75 (3,5)	152 (7,1)	2.144 (100)
C	13 (8,9)	3 (2,0)	100 (68,0)	5 (3,4)	26 (17,7)	147 (100)
Άλλοι υπότυποι	16 (17,2)	3 (3,2)	57 (61,3)	6 (6,5)	11 (11,8)	93 (100)
B. Ανασυνδυασμένοι τύποι						
CRF01_AE	28 (48,3)	3 (5,2)	17 (29,3)	0 (0,0)	10 (17,2)	58 (100)
CRF02_AG	70 (48,0)	6 (4,1)	50 (34,2)	1 (0,7)	19 (13,0)	146 (100)
CRF14_BG	4 (0,8)	471 (95,4)	9 (1,8)	0 (0,0)	10 (2,0)	494 (100)
CRF35_AD	4 (2,5)	148 (92,5)	4 (2,4)	2 (1,3)	2 (1,3)	160 (100)
CRF56_cpx	107 (71,3)	5 (3,3)	16 (10,8)	2 (1,3)	20 (13,3)	150 (100)
Άλλοι CRFs ³	19 (21,8)	4 (4,6)	49 (56,3)	1 (1,2)	14 (16,1)	87 (100)
URFs ⁴	21 (19,6)	61 (57,0)	16 (15,0)	1 (0,9)	8 (7,5)	107 (100)
Γ. Απροσδιόριστοι τύποι						
	18 (40,9)	8 (18,2)	4 (9,1)	2 (4,5)	12 (27,3)	44 (100)
Σύνολο	2.412 (49,7)	1.023 (21,1)	902 (18,6)	110 (2,3)	409 (8,3)	4.856 (100)

¹MSM, Men who have Sex with Men

²XEN, Χρήστες Ενδοφλέβιων Ναρκωτικών

³CRFs, Circulating Recombinant Forms

⁴URFs, Unique Recombinant Forms

Πίνακας 7 Κατανομή HIV-1 υπότυπων και ανασυνδυασμένων τύπων σε PLHIV με διαθέσιμη αλληλουχία το χρονικό διάστημα 1999-06/2015 στην Ελληνική επικράτεια, ως προς την εθνικότητα.

HIV-1 Υποτύπωση	Εθνικότητα			Σύνολο (%)
	Ελληνική	Μη Ελληνική	Άγνωστη	
A. Υπότυποι				
A1	677 (55,2)	123 (10,0)	426 (34,8)	1.226 (100)
B	1.411 (65,8)	125 (5,8)	608 (28,4)	2.144 (100)
C	50 (34,0)	60 (40,8)	37 (25,2)	147 (100)
Άλλοι υπότυποι	25 (26,9)	43 (46,2)	25 (26,9)	93 (100)
B. Ανασυνδυασμένοι τύποι				
CRF01_AE	23 (39,6)	7 (12,1)	28 (48,3)	58 (100)
CRF02_AG	44 (30,1)	46 (31,5)	56 (38,4)	146 (100)
CRF14_BG	345 (69,8)	110 (22,3)	39 (7,9)	494 (100)
CRF35_AD	123 (76,9)	23 (14,4)	14 (8,7)	160 (100)
CRF56_cpx	78 (52,0)	12 (8,0)	60 (40,0)	150 (100)
Άλλοι CRFs ¹	37 (42,5)	15 (17,3)	35 (40,2)	87 (100)
URFs ²	72 (67,3)	29 (27,1)	6 (5,6)	107 (100)
Γ. Απροσδιόριστοι τύποι				
	13 (29,6)	5 (11,3)	26 (59,1)	44 (100)
Σύνολο	2.898 (59,7)	598 (12,3)	1.360 (28,0)	4.856 (100)

¹CRFs, *Circulating Recombinant Forms*

²URFs, *Unique Recombinant Forms*

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7

**Μελέτη διασποράς των HIV-1 υπότυπων A1 και B στην
Ελληνική επικράτεια: Εκτίμηση σημαντικών τοπικών
δικτύων μετάδοσης και χαρακτηρισμός τους**

7.1 Εισαγωγή-Σκοπός

Η υποτύπηση 4.856 αλληλουχιών HIV-1 έδειξε ότι οι υπότυποι A1 και B είναι οι επικρατέστεροι τύποι στην Ελληνική επικράτεια μέχρι και το 2015. Συγκεκριμένα, βρέθηκε ότι το 25,3% (N = 1.226) αφορούσε αλληλουχίες υπότυπου A1 και το 44,2% (N = 2.144) αλληλουχίες υπότυπου B. Επιπρόσθετα, παρατηρήθηκε ότι, παρόλο που και οι δυο υπότυποι εντοπίζονται σε PLHIV με κοινά δημογραφικά χαρακτηριστικά (Ελληνες, MSM), εμφανίζουν σημαντικές διαφορές στις διαχρονικές τους τάσεις, με τον B να μειώνεται και τον A1 να αυξάνεται στην πορεία του χρόνου. Όπως αναφέρθηκε και στο προηγούμενο κεφάλαιο, ένας από τους παράγοντες στον οποίο μπορεί να οφείλονται οι διαφορές αυτές είναι τα διαφορετικά πρότυπα διασποράς.

Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι η επιδημία του υπότυπου A1 στην Ελλάδα είναι μονοφυλετική, δηλαδή, αποτελεί συνέπεια μεμονωμένης εισαγωγής του ιού και διασποράς μεταξύ του τοπικού πληθυσμού (φαινόμενο του ιδρυτή) (Nikolopoulos et al., 2008; Paraskevis et al., 2007). Αναφορικά με την επιδημία του υπότυπου B, αν και υπάρχουν σημαντικές ενδείξεις ότι ο συγκεκριμένος υπότυπος έχει εισαχθεί στην Ελλάδα από πολλές διαφορετικές πηγές, ο τρόπος διασποράς του δεν είχε μελετηθεί με μεγάλη λεπτομέρεια μέχρι σήμερα. Δεδομένων όλων αυτών, ο σκοπός της ανάλυσης, στο παρόν κεφάλαιο, ήταν να μελετηθούν τα πρότυπα διασποράς των υπότυπων A1 και B στην Ελληνική επικράτεια χρησιμοποιώντας μεθόδους μοριακής επιδημιολογίας, να εντοπιστούν και να καταγραφούν με τη μέγιστη δυνατή λεπτομέρεια όλα τα σημαντικά τοπικά δίκτυα μετάδοσής τους και, επιπρόσθετα, να εκτιμηθούν οι παράγοντες που πιθανόν σχετίζονται με τοπική διασπορά του ιού.

7.2 Υλικό-Μέθοδοι

Η διερεύνηση του τρόπου διασποράς των υπότυπων A1 και B πραγματοποιήθηκε σε νουκλεοτιδικές αλληλουχίες HIV-1 οι οποίες είχαν συλλεγεί σε όλη σχεδόν την Ελληνική επικράτεια. Συγκεκριμένα, οι αλληλουχίες απομονώθηκαν από PLHIV οι οποίοι παρακολουθούνταν σε Μ.Ε.Λ. της Αττικής, της Αλεξανδρούπολης, της Βόρειας Ελλάδας και της Κρήτης, το χρονικό διάστημα 1999-06/2015. Συνολικά μελετήθηκαν 1.777 αλληλουχίες υπότυπου A1 και 2.589 υπότυπου B, οι οποίες ήταν διαθέσιμες στο γονίδιο *pol* (PR/RT). Η πλειοψηφία των PLHIV οι οποίοι είχαν μολυνθεί με στελέχη υπότυπου A1 και B ήταν άνδρες (A1: 66,3%, B: 76,9%), MSM (A1: 49,2%, B: 59,6%), Ελληνικής εθνικότητας (A1: 38,1%, B: 54,5%), με μέση ηλικία, περίπου, τα 38 έτη (A1: 38,6, B: 37,8) (Πίνακας 8, σελ. 159).

7.2.1 Διερεύνηση τρόπου διασποράς υπότυπων A1 και B

Τα πρότυπα διασποράς των υπότυπων A1 και B μελετήθηκαν μέσω φυλογενετικής ανάλυσης, η οποία πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της μέγιστης πιθανοφάνειας και ανάλυση bootstrap στο πρόγραμμα RAxML v8.2.10 (Stamatakis, 2014). Στην ανάλυση ορίστηκαν το GTR ως μοντέλο νουκλεοτιδικής αντικατάστασης και η κατανομή Γάμμα για τη διόρθωση του ρυθμού ανομοιογένειας μεταξύ των θέσεων του DNA. Οι αλληλουχίες των υπότυπων A1 (N = 1.777) και B (N = 2.589) από την Ελληνική επικράτεια αναλύθηκαν μαζί με αλληλουχίες αναφοράς με παγκόσμια δειγματοληψία, οι οποίες βρέθηκαν διαθέσιμες στη βάση δεδομένων του HIV (Los Alamos HIV Sequences Database). Οι αλληλουχίες αναφοράς επιλεχτήκαν με τυχαίο τρόπο, και συγκεκριμένα, με γεννήτρια τυχαίων αριθμών χωρίς επανάθεση, η οποία βασίστηκε στην ομοιόμορφη κατανομή. Με σκοπό να διασφαλιστεί ότι η τυχαία επιλογή των αλληλουχιών αναφοράς δεν οδήγησε σε υπερεκπροσώπηση συγκεκριμένων χωρών ή γεωγραφικών περιοχών όπου ο έλεγχος αντοχής πραγματοποιείται με μεγαλύτερη συχνότητα (και ως εκ τούτου υπάρχει μεγαλύτερος αριθμός διαθέσιμων αλληλουχιών), η ανάλυση επαναλήφθηκε πέντε φορές για κάθε υπότυπο χρησιμοποιώντας κάθε φορά ένα διαφορετικό τυχαία επιλεγμένο δείγμα

αλληλουχιών μεγέθους 1.500 αλληλουχιών για τον A1 και 2.000 για τον B αντίστοιχα. Η αναπαράσταση των φυλογενετικών δένδρων πραγματοποιήθηκε με τα προγράμματα Dendroscope v3.5.7. (<http://dendroscope.org>) και FigTree v1.4.0.

7.2.2 Εκτίμηση σημαντικών τοπικών δικτύων μετάδοσης υπότυπων A1 και B

Η τοπική διασπορά του ιού, δηλαδή το ποσοστό μονοφυλετικότητας, εκτιμήθηκε ανά υπότυπο υπολογίζοντας το πηλίκο του αριθμού των αλληλουχιών σε μονοφυλετικές ομάδες (τοπικά δίκτυα μετάδοσης) και του συνολικού αριθμού των διαθέσιμων αλληλουχιών με δειγματοληψία από την Ελληνική επικράτεια.

% Μονοφυλετικότητας

$$= \frac{\text{Αριθμός αλληλουχιών σε μονοφυλετικές ομάδες}}{\text{Συνολικός αριθμός αλληλουχιών από την Ελληνική επικράτεια}}$$

Ως μονοφυλετική ομάδα ορίστηκε κάθε φυλογενετική ομάδα η οποία απαρτιζόταν από τουλάχιστον 2 αλληλουχίες με δειγματοληψία >70% από την Ελληνική επικράτεια, και, επίσης, είχε επιβεβαιωθεί από όλες τις αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν. Απαραίτητη προϋπόθεση για να επιβεβαιωθεί μια φυλογενετική ομάδα ήταν και στις πέντε αναλύσεις η σύνθεση της να παρέμενε η ίδια (δηλαδή σε όλες τις αναλύσεις η ομάδα να απαρτιζόταν από τις ίδιες ακριβώς αλληλουχίες). Στη διαδικασία της επιβεβαίωσης ιδιαίτερη δυσκολία παρουσίασαν οι μεγαλύτερες φυλογενετικές ομάδες, οι οποίες στις περισσότερες περιπτώσεις ήταν δύσκολο να διατηρήσουν ακριβώς την ίδια σύνθεση και στις πέντε αναλύσεις, με αποτέλεσμα να χρειάζεται να επιμεριστούν εκ νέου σε μικρότερες ομάδες και να επαναληφθεί η όλη διαδικασία.

7.2.3 Εκτίμηση παραγόντων που σχετίζονται με τοπική διασπορά υπότυπων A1 και B

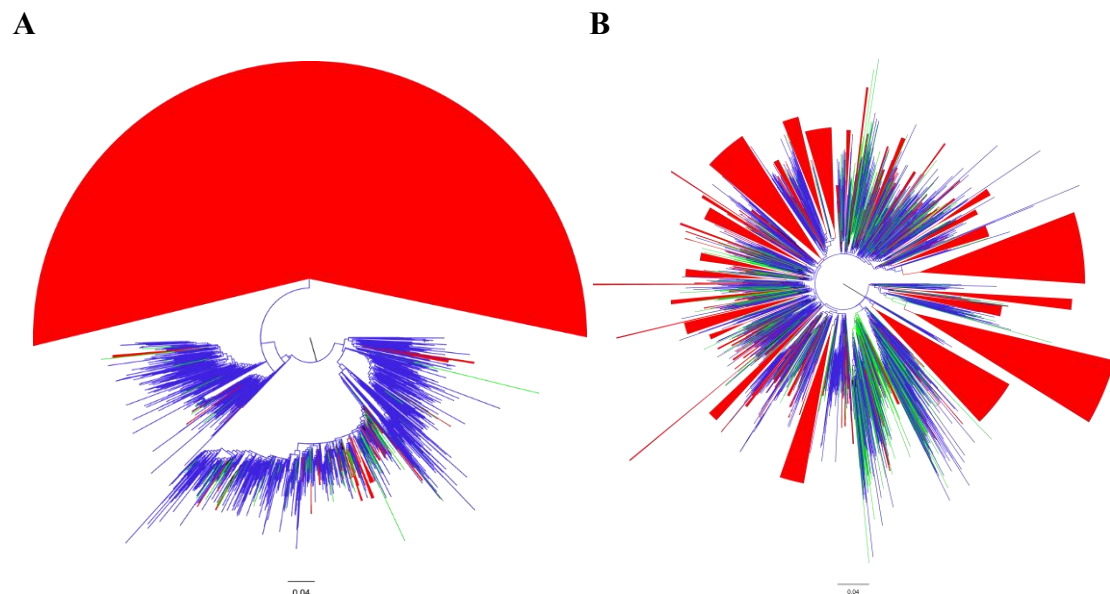
Η στατιστική ανάλυση για την εκτίμηση των παραγόντων, δηλαδή των χαρακτηριστικών του πληθυσμού που, πιθανόν, σχετίζονταν με τοπική διασπορά των υπότυπων A1 και B, πραγματοποιήθηκε με πολυπαραγοντικά μοντέλα λογιστικής παλινδρόμησης στο πρόγραμμα STATA 12-StataCorp LP. Ως εξαρτημένη μεταβλητή ορίστηκε το αν ένα άτομο είχε μολυνθεί ή όχι σε τοπικό δίκτυο μετάδοσης, ενώ μεταβλητές που αφορούσαν στο φύλο, στην ηλικία, στην κατηγορία μετάδοσης, στην εθνικότητα και στην περίοδο δειγματοληψίας επιλέχθηκαν ως ανεξάρτητες.

7.3 Αποτελέσματα

7.3.1 Πρότυπα διασποράς και τοπικά δίκτυα μετάδοσης υπότυπων A1 και B

Για τον υπότυπο A1 βρέθηκαν 38 τοπικά δίκτυα μετάδοσης με εύρος από 2 έως 1.543 αλληλουχίες (*Εικόνα 37A*). Για τον υπότυπο B βρέθηκαν 166 τοπικά δίκτυα μετάδοσης με εύρος από 2 έως 218 αλληλουχίες (*Εικόνα 37B*). Τα ποσοστά μονοφυλετικότητας των υπότυπων A1 και B ήταν 93,8% ($N = 1.667/1.777$) και 77,1% ($N = 1.996/2.589$) αντίστοιχα. Δηλαδή, το 93,8% των μεταδόσεων υπότυπου A1 πραγματοποιούνταν ενός 38 τοπικών δικτύων μετάδοσης και το 77,1% των μεταδόσεων υπότυπου B ενός 166 δικτύων αντίστοιχα. Επιπρόσθετα, η φυλογενετική ανάλυση έδειξε ότι το 86,8% ($N = 1.543$) των αλληλουχιών υπότυπου A1 σχημάτισε μία μονοφυλετική ομάδα (ένα τοπικό δίκτυο μετάδοσης) (*Εικόνα 37A*). Το εύρημα αυτό υποδεικνύει ότι σχεδόν το 87% των μεταδόσεων στελεχών υπότυπου A1 αφορούσε μεμονωμένη εισαγωγή του ιού και διασπορά μεταξύ του τοπικού πληθυσμού. Σε αντίθεση με τον υπότυπο A1, όπου η πλειοψηφία των μεταδόσεων πραγματοποιούνταν εντός ενός τοπικού δικτύου, στον υπότυπο B εντοπίστηκαν πολλαπλές εισαγωγές του ιού, οι οποίες οδήγησαν στη δημιουργία ενός μεγάλου αριθμού επιμέρους επιδημιών (τοπικά δίκτυα μετάδοσης) (*Εικόνα 37B*).

Οι αλληλουχίες των υπότυπων A1 και B που εντοπίστηκαν εκτός τοπικών δικτύων μετάδοσης υποδεικνύουν μεμονωμένες εισαγωγές χωρίς περαιτέρω τοπική διασπορά. Οι PLHIV οι οποίοι είχαν μολυνθεί με A1 στελέχη εκτός δικτύων (N = 110, 6,2%) ήταν, κυρίως, ετεροφυλόφιλοι (N = 42, 38,2%), μη Ελληνικής εθνικότητας (N = 33, 30,0%), ενώ εκείνοι που είχαν μολυνθεί σε δίκτυα (N = 1.667, 93,8%) ήταν κατά κύριο λόγο MSM (N = 862, 51,7%), Ελληνικής εθνικότητας (N = 661, 39,7%) (Πίνακας 9, σελ. 160). Σε αντίθεση με τον υπότυπο A1, στον B δεν βρέθηκαν διαφορές ως προς την κατηγορία μετάδοσης και την εθνικότητα μεταξύ των PLHIV που είχαν μολυνθεί εντός και εκτός των δικτύων. Τόσο τα άτομα που είχαν μολυνθεί σε δίκτυα υπότυπου B όσο και εκείνα που είχαν μολυνθεί εκτός ήταν, κυρίως, MSM, Ελληνικής εθνικότητας. Ωστόσο βρέθηκε ότι οι PLHIV που είχαν μολυνθεί σε δίκτυα υπότυπου B είχαν μικρότερη ηλικία (36,6 έτη) και πιο πρόσφατη διάγνωση ([2011-06/2015]: 42,5%) συγκριτικά με εκείνους που μολύνθηκαν εκτός των δικτύων (ηλικία: 41,7 έτη, περίοδος δειγματοληψίας: [1999-2005]: 60,1%) (Πίνακας 10, σελ. 161).



Εικόνα 37 Φυλογενετικά δένδρα αλληλουχιών HIV-1 υπότυπου (A) A1 και (B) B με δειγματοληψία από την Ελληνική επικράτεια και αλληλουχιών αναφοράς με παγκόσμια δειγματοληψία, τα οποία εκτιμήθηκαν με τη μέθοδο της μέγιστης πιθανοφάνειας στο πρόγραμμα RAxML v8.2.10. Οι αλληλουχίες από Ελλάδα έχουν επισημανθεί με πράσινο (αλληλουχίες εκτός τοπικών δικτύων μετάδοσης) και κόκκινο (αλληλουχίες εντός τοπικών δικτύων μετάδοσης) χρώμα, σε αντίθεση με τις αλληλουχίες από άλλες χώρες και γεωγραφικές περιοχές (αλληλουχίες αναφοράς) που έχουν επισημανθεί με μπλε χρώμα. Τα τοπικά δίκτυα μετάδοσης του ιού αναπαρίστανται στα δένδρα με τρίγωνα.

7.3.2 Χαρακτηριστικά πληθυσμού που σχετίζονται με τοπική διασπορά των υπότυπων A1 και B

Η πολυπαραγοντική ανάλυση λογιστικής παλινδρόμησης έδειξε ότι η κατηγορία μετάδοσης [MSM έναντι ετεροφυλόφιλων, odds ratio (OR) = 6,2, $p < 0,001$] και η εθνικότητα (Ελληνική έναντι μη Ελληνική, OR = 7,2, $p < 0,001$) σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο για τοπικές μεταδόσεις υπότυπου A1. Για τον υπότυπο B, η ανάλυση έδειξε ότι οι PLHIV με πρόσφατη διάγνωση ([2011-06/2015] έναντι [1999-2005]), OR = 5,3, $p < 0,001$) έχουν αυξημένο κίνδυνο για τοπικές μεταδόσεις. Επιπρόσθετα, υπάρχουν ενδείξεις ότι οι PLHIV με μη Ελληνική εθνικότητα οι οποίοι έχουν μολυνθεί με υπότυπο B έχουν μικρότερο κίνδυνο για μεταδόσεις σε τοπικό επίπεδο (OR = 0,64, $p = 0,048$) (Πίνακας 11, σελ. 162).

7.4 Συμπεράσματα

Μελετήθηκαν, σε μεγάλη λεπτομέρεια, τα πρότυπα διασποράς και τα τοπικά δίκτυα μετάδοσης των υπότυπων A1 και B, στο μεγαλύτερο δυνατό δείγμα διαθέσιμων HIV-1 αλληλουχιών από όλη σχεδόν την Ελληνική επικράτεια. Η ανάλυση των υπό μελέτη αλληλουχιών πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας πέντε διαφορετικούς συνδυασμούς τυχαία επιλεγμένων αλληλουχιών αναφοράς, διασφαλίζοντας με αυτόν τον τρόπο ότι η σύνθεση των δικτύων μετάδοσης που εντοπίστηκαν δεν επηρεάστηκε από τις αλληλουχίες αναφοράς που επιλέχθηκαν. Χρησιμοποιώντας κατάλληλη μεθοδολογία στην ανάλυση ενός μεγάλου αριθμού αλληλουχιών επιτεύχθηκε σημαντική βελτίωση της αξιοπιστίας των ευρημάτων και μείωση του σφάλματος δειγματοληψίας (selection bias).

Η παρούσα ανάλυση ανέδειξε την ύπαρξη σημαντικών διαφορών μεταξύ των υπότυπων A1 και B ως προς τα πρότυπα διασποράς τους. Συγκεκριμένα, η επιδημία του υπότυπου A1 βρέθηκε να παρουσιάζει υψηλότερο ποσοστό τοπικής διασποράς (A1: 93,8%, B: 77,1%), το οποίο αφορούσε σε πολύ μικρότερο αριθμό τοπικών

δικτύων μετάδοσης (A1: 38, B: 166). Το εύρημα αυτό υποδεικνύει την ύπαρξη περιορισμένου αριθμού εισαγωγών υπότυπου A1 στην Ελλάδα. Σε αντίθεση με τον A1, ο μεγάλος αριθμός δικτύων του υπότυπου B υποδεικνύει ότι η εισαγωγή του συγκεκριμένου τύπου στην Ελλάδα έγινε μέσω πολλαπλών πηγών. Το γεγονός αυτό πιθανόν να οφείλεται στο ότι ο συγκεκριμένος υπότυπος έχει ιδιαίτερα υψηλό επιπολασμό στο Δυτικό κόσμο, όπου οι ανθρώπινες δραστηριότητες που σχετίζονται με τη μετάδοση του HIV-1 (σεξουαλικές επαφές χωρίς προφύλαξη, ανθρώπινες μετακινήσεις) είναι συχνές. Αυτό δεν ισχύει για τον υπότυπο A1, ο οποίος εντοπίζεται συχνότερα στην Αφρική και στην Ανατολική Ευρώπη.

Η τοπική διασπορά του υπότυπου A1 βρέθηκε να σχετίζεται, κυρίως, με MSM Ελληνικής εθνικότητας. Αντίθετα, οι PLHIV οι οποίοι έχουν μολυνθεί εκτός των τοπικών δικτύων μετάδοσης του υπότυπου A1 βρέθηκε ότι είναι, κυρίως, ετεροφυλόφιλοι μη Ελληνικής εθνικότητας. Το εύρημα αυτό υποδεικνύει ότι τα άτομα που έχουν μολυνθεί με στελέχη υπότυπου A1 με γεωγραφική προέλευση εκτός Ελλάδας δεν σχετίζονται με περαιτέρω διασπορά του ιού, και, συνεπώς, με δημιουργία επιμέρους τοπικών επιδημιών. Σε αντίθεση με τον A1, η τοπική διασπορά του υπότυπου B βρέθηκε ότι δεν σχετίζεται με την κατηγορία μετάδοσης και την εθνικότητα, αλλά με την πρόσφατη διάγνωση. Η συσχέτιση αυτή υποδεικνύει ότι με την πάροδο του χρόνου τα άτομα τα οποία μολύνονται με στελέχη υπότυπου B τείνουν να μολύνονται σε τοπικά δίκτυα. Η παρατηρούμενη αυτή διαχρονική τάση του υπότυπου B μπορεί να οφείλεται και στο γεγονός ότι η πιθανή πηγή της μετάδοσης για τις αλληλουχίες με προγενέστερη δειγματοληψία είναι δύσκολο να εντοπιστεί, λόγω του ότι σε μεγάλο βαθμό απουσιάζει από το δείγμα.

Η ταυτοποίηση των τοπικών δικτύων μετάδοσης και η εκτίμηση του ποσοστού των μεταδόσεων σε τοπικό επίπεδο είναι σημαντική για τη διερεύνηση της επιδημίας του HIV-1 και την πληρέστερη κατανόηση των χαρακτηριστικών της, τα οποία έχουν ιδιαίτερη σημασία για την αποτελεσματική αντιμετώπιση και την πρόληψη της HIV-1 μετάδοσης. Σε πολλές Ευρωπαϊκές χώρες, μεταξύ των οποίων και η Ελλάδα, παρατηρείται υψηλό ποσοστό καθυστερημένης διάγνωσης HIV-1 (επίπεδα CD4 κυττάρων <350 CD4/μL) ή διάγνωση σε προχωρημένα στάδια της νόσου (επίπεδα CD4

κυττάρων <200 CD4/ μ L). Η καθυστερημένη διάγνωση έχει σημαντικές επιπτώσεις τόσο σε ατομικό όσο και πληθυσμιακό επίπεδο. Συγκεκριμένα, επηρεάζει σημαντικά τη δυνατότητα αποτελεσματικής θεραπείας του ατόμου με HIV-1 λοίμωξη, αλλά και τη δυνατότητα πρόληψης των νέων μεταδόσεων του ιού. Αναφορικά με το θέμα της πρόληψης της HIV-1 μετάδοσης, προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι ένα άτομο που ζει με την HIV-1 λοίμωξη και δεν έχει διαγνωσθεί μπορεί να επιδεικνύει υψηλότερη συμπεριφορά κινδύνου μέχρι τη διάγνωση, συγκριτικά με κάποιο άλλο άτομο που γνωρίζει ότι έχει μολυνθεί με τον ιό. Επιπρόσθετα, το χρονικό διάστημα που μεσολαβεί από τη μόλυνση ενός ατόμου με HIV-1 μέχρι τη διάγνωσή του είναι πιθανό να συμβούν νέες μεταδόσεις του ιού σε άλλα άτομα, λόγω του ότι το άτομο που ζει με τον ιό δεν λαμβάνει αντιρετροϊκή θεραπεία και το ιικό φορτίο (HIV-RNA) παραμένει ανιχνεύσιμο στα βιολογικά του υγρά. Δεδομένων όλων αυτών, η καθυστερημένη διάγνωση αποτελεί μέχρι σήμερα καίριο πρόβλημα για την αντιμετώπιση και την πρόληψη της HIV-1 λοίμωξης σε παγκόσμια κλίμακα. Η γνώση επιμέρους χαρακτηριστικών της επιδημίας του HIV-1, όπως τα τοπικά δίκτυα μετάδοσης, μπορεί να παρέχει σημαντικές πληροφορίες για τα χαρακτηριστικά του πληθυσμού που σχετίζονται με μεταδόσεις σε δίκτυα, και, ως εκ τούτου, αποτελεί σημαντική παράμετρο για την αντιμετώπιση της καθυστερημένης διάγνωσης. Αν η παραπάνω πληροφορία συνδυαστεί και με την εκτίμηση της ημερομηνίας μετάδοσης, τότε ο συνδυασμός αυτός αναδεικνύεται ιδιαίτερα σημαντικός για την πρόληψη του HIV-1 σε άτομα που ανήκουν σε ενεργά δίκτυα.

Πίνακας 8 Δημογραφικά χαρακτηριστικά PLHIV με διαθέσιμη αλληλουχία το χρονικό διάστημα 1999-06/2015 στην Ελληνική επικράτεια που είχαν μολυνθεί με στελέχη υπότυπων A1 και B.

	Υπότυπος A1 (N = 1.777)		Υπότυπος B (N = 2.589)	
	Αριθμός	Ποσοστό (%)	Αριθμός	Ποσοστό (%)
Φύλο				
Άνδρας	1.178	66,3	1.991	76,9
Γυναίκα	188	10,6	238	9,2
Άγνωστο	411	23,1	360	13,9
Κατηγορία μετάδοσης				
MSM ¹	874	49,2	1.544	59,6
XEN ²	140	7,9	203	7,8
Ετεροφυλόφιλοι	311	17,5	388	15,0
Άλλη	39	2,2	97	3,8
Άγνωστη	413	23,2	357	13,8
Εθνικότητα				
Ελληνική	677	38,1	1.411	54,5
Μη Ελληνική	123	6,9	125	4,8
Άγνωστη	977	55,0	1.053	40,7
Περίοδος δειγματοληψίας				
[1999-2005)	242	19,7	752	35,1
[2005-2011)	379	30,9	607	28,3
[2011-06/2015]	605	49,4	785	36,6
	Μέση τιμή	SD³	Μέση τιμή	SD³
Ηλικία (έτη)	38,6*	12,6	37,8**	10,5

¹ MSM, Men who have Sex with Men

² XEN, Χρήστες Ενδοφλέβιων Ναρκωτικών

³ SD, Standard Deviation (τυπική απόκλιση)

* Διαθέσιμη πληροφορία για 1.223 PLHIV

** Διαθέσιμη πληροφορία για 2.144 PLHIV

Πίνακας 9 Δημογραφικά χαρακτηριστικά PLHIV με διαθέσιμη αλληλουχία το χρονικό διάστημα 1999-06/2015 στην Ελληνική επικράτεια που είχαν μολυνθεί με στελέχη υπότυπου A1 εντός και εκτός τοπικών δικτύων μετάδοσης.

	Αλληλουχίες A1 σε δίκτυα (N = 1.667)		Αλληλουχίες A1 εκτός δικτύων (N = 110)	
	Αριθμός	Ποσοστό (%)	Αριθμός	Ποσοστό (%)
Φύλο				
Άνδρας	1.134	68,0	44	44,0
Γυναίκα	154	9,3	34	30,9
Άγνωστο	379	22,7	32	29,1
Κατηγορία μετάδοσης				
MSM ¹	862	51,7	12	10,9
XEN ²	123	7,4	17	15,5
Ετεροφυλόφιλοι	269	16,1	42	38,2
Άλλη	36	2,2	3	2,7
Άγνωστη	377	22,6	36	32,7
Εθνικότητα				
Ελληνική	661	39,7	16	14,6
Μη Ελληνική	90	5,4	33	30,0
Άγνωστη	916	54,9	61	55,4
Περίοδος δειγματοληψίας				
[1999-2005)	231	20,1	11	14,3
[2005-2011)	347	30,2	32	41,6
[2011-06/2015]	571	49,7	34	44,1
	Μέση τιμή	SD³	Μέση τιμή	SD³
Ηλικία (έτη)*	38,5	12,6	39,2	12,5

¹ MSM, Men who have Sex with Men

² XEN, Χρήστες Ενδοφλέβιων Ναρκωτικών

³ SD, Standard Deviation (τυπική απόκλιση)

* Διαθέσιμη πληροφορία για 1.223 PLHIV

Πίνακας 10 Δημογραφικά χαρακτηριστικά PLHIV με διαθέσιμη αλληλουχία το χρονικό διάστημα 1999-06/2015 στην Ελληνική επικράτεια που είχαν μολυνθεί με στελέχη υπότυπου B εντός και εκτός τοπικών δικτύων μετάδοσης.

	Αλληλουχίες B σε δίκτυα (N = 1.996)		Αλληλουχίες B εκτός δικτύων (N = 593)	
	Αριθμός	Ποσοστό (%)	Αριθμός	Ποσοστό (%)
Φύλο				
Άνδρας	1.541	77,2	450	75,9
Γυναίκα	166	8,3	72	12,1
Άγνωστο	289	14,5	71	12,0
Κατηγορία μετάδοσης				
MSM ¹	1.228	61,5	316	53,3
XEN ²	169	8,5	34	5,7
Ετεροφυλόφιλοι	269	13,5	119	20,1
Άλλη	38	1,9	59	9,9
Άγνωστη	292	14,6	65	11,0
Εθνικότητα				
Ελληνική	1.042	52,2	369	62,2
Μη Ελληνική	90	4,5	35	5,9
Άγνωστη	864	43,3	189	31,9
Περίοδος δειγματοληψίας				
[1999-2005)	448	27,3	304	60,1
[2005-2011)	494	30,2	113	22,3
[2011-06/2015]	696	42,5	89	17,6
	Μέση τιμή	SD³	Μέση τιμή	SD³
Ηλικία (έτη)*	36,6	9,6	41,7	11,1

¹ MSM, Men who have Sex with Men

² XEN, Χρήστες Ενδοφλέβιων Ναρκωτικών

³ SD, Standard Deviation (τυπική απόκλιση)

* Διαθέσιμη πληροφορία για 2.144 PLHIV

Πίνακας 11 Αποτελέσματα πολυπαραγοντικής λογιστικής παλινδρόμησης για την εκτίμηση των παραγόντων που σχετίζονται με τοπική διασπορά των HIV-1 υπότυπων A1 και B στην Ελληνική επικράτεια, το χρονικό διάστημα 1999-06/2015.

	Υπότυπος A1			Υπότυπος B		
	Odds Ratio	95% CI [†]	p-value	Odds Ratio	95% CI [†]	p-value
Φύλο (*Γυναίκα)						
Άνδρας	1,43	0,78-2,61	0,246	1,01	0,67-1,53	0,957
Άγνωστο	-	-	-	0,39	0,03-5,16	0,477
Κατηγορία μετάδοσης (*Ετεροφυλόφιλοι)						
MSM ²	6,20	2,71-14,04	<0,001	1,41	0,98-2,04	0,064
XEN ³	0,90	0,39-2,05	0,797	1,16	0,69-1,94	0,581
Άλλη	1,16	0,31-4,28	0,827	0,23	0,13-0,41	<0,001
Άγνωστη	0,78	0,33-1,88	0,587	1,60	0,70-3,68	0,269
Εθνικότητα (*Ελληνική)						
Μη Ελληνική	0,14	0,07-0,27	<0,001	0,64	0,41-0,99	0,048
Άγνωστη	0,30	0,14-0,61	0,001	0,81	0,60-1,09	0,162
Περίοδος δειγματοληψίας (*[1999-2005])						
[2005-2011)	0,86	0,39-1,89	0,706	2,77	2,12-3,63	<0,001
[2011-06/2015]	1,18	0,52-2,68	0,687	5,31	3,87-7,29	<0,001
Ηλικία						
	0,99	0,98-1,02	0,906	0,96	0,94-0,97	<0,001

[†] Κατηγορία αναφοράς

¹ 95% CI, 95% Confidence Interval (διάστημα εμπιστοσύνης)

² MSM, Men who have Sex with Men

³ XEN, Χρήστες Ενδοφλέβιων Ναρκωτικών

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8

Μοριακή επιτήρηση της επιδημίας του HIV-1 στους χρήστες ενδοφλεβίων ναρκωτικών στην Αθήνα το χρονικό διάστημα 2011-2014

Δημοσίευση:

Kostaki E, Magiorkinis G, Psychogiou M, Flampouris A, Iliopoulos P, Papachristou E, Daikos GL, Bonovas S, Otelea D, Friedman SR, Hatzakis A, Paraskevis D. Detailed molecular surveillance of the HIV-1 outbreak among people who inject drugs (PWID) in Athens during a period of four years. Curr HIV Res. 2017;15(6):396-404. doi: 10.2174/1570162X15666171120104048

8.1 Εισαγωγή-Σκοπός

Οι ΧΕΝ διατρέχουν μεγαλύτερο κίνδυνο μόλυνσης από τον HIV-1 συγκριτικά με το γενικό πληθυσμό, ειδικά απουσίας μέτρων μείωσης βλάβης. Έχει εκτιμηθεί ότι ο αριθμός των ΧΕΝ σε παγκόσμια κλίμακα είναι περίπου 16 (11-21) εκατομμύρια, εκ των οποίων περίπου το 20% [3 (0,8-6,6) εκατομμύρια] ζει με την HIV-1 λοίμωξη (Mathers et al., 2008). Επίσης, το ποσοστό των διαγνώσεων του ιού στους ΧΕΝ βρέθηκε να διαφέρει σημαντικά μεταξύ των Ευρωπαϊκών χωρών (Δυτική Ευρώπη: 3,1%, Κεντρική Ευρώπη: 5,4%, Ανατολική Ευρώπη: 27,8%) (ECDC, 2015b). Συγκεκριμένα, ο αριθμός των HIV-1 διαγνώσεων στην Ευρωπαϊκή Ένωση/Ευρωπαϊκή Οικονομική Κοινότητα αυξήθηκε σημαντικά το 2011 και το 2012. Η αύξηση αυτή οφειλόταν σε μεγάλο ποσοστό στις επιδημίες που εκδηλώθηκαν σε Αθήνα (Paraskevis et al., 2011), Βουκουρέστι (Niculescu et al., 2015), Βουλγαρία (Alexiev et al., 2016), Γλασκόβη (EMCDDA, 2016), Δουβλίνο (Giese et al., 2015) και Λουξεμβούργο (ECDC, 2015b).

Αναφορικά με την Ελλάδα, το χρονικό διάστημα από τα τέλη του 2010 μέχρι και το 2012 παρατηρήθηκε μια μεγάλη αύξηση του αριθμού των νέων HIV-1 διαγνώσεων σε ΧΕΝ (Paraskevis et al., 2011). Η επιδημία είχε τα χαρακτηριστικά επιδημικής έκρηξης (outbreak) και εντοπίστηκε στην ευρύτερη περιοχή της Αθήνας. Μελέτες μοριακής επιδημιολογίας έδειξαν ότι ο τρόπος διασποράς του ιού στους ΧΕΝ άλλαξε δραματικά μετά το 2010 (Paraskevis et al., 2013). Συγκεκριμένα, μέχρι το 2010 το ποσοστό των νέων HIV-1 διαγνώσεων σε ΧΕΝ ήταν ιδιαίτερα μικρό (<20) και οι μεταδόσεις του ιού σε αυτήν την πληθυσμιακή ομάδα δεν πραγματοποιούνταν σε δίκτυα (Paraskevis et al., 2013). Μετά το 2010 η κατάσταση αυτή διαφοροποιήθηκε σημαντικά και οι περισσότερες μεταδόσεις του ιού μεταξύ των ΧΕΝ εντοπίζονταν πλέον εντός τεσσάρων τοπικών δικτύων διασποράς του ιού (φυλογενετικών ομάδων) στους υπότυπους A1, B, καθώς και στους ανασυνδυασμένους τύπους CRF14_BG και CRF35_AD (Paraskevis et al., 2013). Με σκοπό τον περιορισμό των HIV-1 μεταδόσεων μεταξύ των ΧΕΝ στην Αθήνα, διευρύνθηκε η πρόσβαση σε θεραπευτικά προγράμματα υποκατάστασης (Opioid Substitution Therapy – OST) και εφαρμόστηκαν προγράμματα τα οποία αφορούσαν διαδικασίες εύρεσης-ελέγχου-

διασύνδεσης και διατήρησης στη θεραπεία (seek-test-treat and retain), όπως το πρόγραμμα «ΑΡΙΣΤΟΤΕΛΗΣ» (Hatzakis et al., 2015). Τα μέτρα αυτά οδήγησαν σε σημαντική μείωση της επίπτωσης του HIV-1 το χρονικό διάστημα μεταξύ 2012 και 2013 (Sypsa et al., 2017). Δεδομένων όλων αυτών, ο σκοπός της παρούσας ανάλυσης ήταν, αφενός, να διερευνηθεί ο τρόπος διασποράς του HIV-1 στους XEN και η πιθανή ύπαρξη μεταδόσεων από τους XEN σε άλλες ομάδες κινδύνου, και, αφετέρου, να εκτιμηθούν επιδημιολογικά χαρακτηριστικά της επιδημίας, όπως ο χρόνος προέλευσης (t_{MRCA}) και ο R_e , για τα σημαντικότερα δίκτυα του ιού. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν καινοτόμες μέθοδοι μοριακής επιδημιολογίας και τα πιο πρόσφατα διαθέσιμα δεδομένα.

8.2 Υλικό-Μέθοδοι

Η διερεύνηση του τρόπου διασποράς του HIV-1 στους XEN πραγματοποιήθηκε με μεθόδους φυλογενετικής ανάλυσης σε 2.274 αλληλουχίες, διαθέσιμες στο γονίδιο *pol* (PR/RT), οι οποίες αποτελούσαν το σύνολο των αλληλουχιών που συλλέχθηκαν στη Νότια/Κεντρική Ελλάδα το χρονικό διάστημα 01/01/2011-31/10/2014. Εξ αυτών το 38,4% ($N = 874$) αφορούσε αλληλουχίες που είχαν απομονωθεί από XEN (2011: 144, 2012: 312, 2013: 314, 2014: 104). Οι αλληλουχίες των XEN του υπό μελέτη πληθυσμού ($N = 874$) αποτελούσαν το 74,1% των XEN με HIV-1 λοίμωξη που είχαν δηλωθεί στο εθνικό σύστημα επιδημιολογικής επιτήρησης της HIV/AIDS λοίμωξης (Ε.Ο.Δ.Υ.) το χρονικό διάστημα 01/01/2011-31/10/2014 ($N = 1.179$). Το ποσοστό αυτό εκτιμήθηκε διαιρώντας τον αριθμό των XEN με διαθέσιμη αλληλουχία το διάστημα 2011-10/2014 με το συνολικό αριθμό των XEN που έχουν αναφερθεί με διάγνωση HIV-1 στον Ε.Ο.Δ.Υ. το αντίστοιχο χρονικό διάστημα.

8.2.1 Ταυτοποίηση σημαντικότερων δικτύων διασποράς XEN

Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε ξεχωριστά για κάθε υπότυπο/CRF, χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της μέγιστης πιθανοφάνειας με Shimodaira-Hasegawa

(SH) test για την εκτίμηση της αξιοπιστίας στο πρόγραμμα FastTree v2.1 (Price et al., 2010). Στην ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν ως αλληλουχίες αναφοράς: 2.125 αλληλουχίες με δειγματοληψία από τη Νότια/Κεντρική Ελλάδα (υπότυπος B: 1.424, υπότυπος A1: 667, CRF14_BG: 29, CRF35_AD: 5), 5.728 τυχαία επιλεγμένες αλληλουχίες με παγκόσμια δειγματοληψία από τη βάση δεδομένων του HIV (Los Alamos HIV Sequences Database) (υπότυπος B: 3.920, υπότυπος A1: 1.442, CRF35_AD: 297, CRF14_BG: 69) και 876 αλληλουχίες για τις οποίες εκτιμήθηκε μέσω του προγράμματος HIV BLAST tool (https://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/BASIC_BLAST/basic_blast.html) ότι παρουσίαζαν την υψηλότερη γενετική ομοιότητα με τις αλληλουχίες του εκάστοτε επιμέρους υπό μελέτη πληθυσμού (υπότυπος B: 675, υπότυπος A1: 131, CRF35_AD: 37, CRF14_BG: 33). Ως αλληλουχίες XEN που ομαδοποιήθηκαν (τοπικά δίκτυα διασποράς XEN) ορίστηκαν εκείνες που βρέθηκαν σε φυλογενετικές ομάδες που απαρτίζονταν τουλάχιστον κατά 75% από αλληλουχίες XEN, και, επιπρόσθετα, είχαν SH τιμή αξιοπιστίας $>0,95$. Οι φυλογενετικές τοπολογίες (δένδρα) που εκτιμήθηκαν χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό των μεταδόσεων μεταξύ διαφορετικών ομάδων (cross-group) ή εντός της ίδιας ομάδας (within group). Συγκεκριμένα, μία μετάδοση από XEN σε μη XEN οριζόταν όταν μία αλληλουχία που είχε απομονωθεί από μη XEN εντοπιζόταν σε ένα τοπικό δίκτυο διασποράς XEN.

8.2.2 Φυλοδυναμική ανάλυση και εκτίμηση επιδημιολογικών χαρακτηριστικών

Τα επιδημιολογικά χαρακτηριστικά τα οποία εκτιμήθηκαν ήταν: i) ο χρόνος προέλευσης (t_{MRCA}), ο οποίος αποτελεί μια προσέγγιση του χρόνου κατά τον οποίο πραγματοποιήθηκε η αρχική μετάδοση που οδήγησε στη δημιουργία μιας επιδημίας, και η εκτίμησή του βασίζεται στα εκάστοτε διαθέσιμα δεδομένα, ii) η δυναμική της μετάδοσης, η οποία αποτελεί μια προσέγγιση της αθροιστικής επίπτωσης, iii) ο R_e , ο οποίος αποτελεί μια διαφορετική προσέγγιση του R_0 . Τα χαρακτηριστικά αυτά εκτιμήθηκαν ξεχωριστά για κάθε επιμέρους επιδημία (τοπικό δίκτυο διασποράς XEN) μέσω ανάλυσης μοριακού ρολογιού και φυλοδυναμικής ανάλυσης, χρησιμοποιώντας μεθόδους Μπεϋζιανής συμπερασματολογίας και BDM μοντέλα. Τα BDM μοντέλα επιτρέπουν την εκτίμηση σημαντικών επιδημιολογικών δεικτών, όπως οι R_0 και R_e .

Συνοπτικά, ως R_0 ορίζεται ο μέσος αριθμός δευτερογενών μεταδόσεων που μπορούν να προκληθούν από ένα μολυσμένο άτομο σε έναν πλήρως ευάλωτο πληθυσμό στην αρχή της επιδημίας. Αντίστοιχα, ως R_e ορίζεται ο μέσος αριθμός δευτερογενών μεταδόσεων που μπορούν να προκληθούν από ένα μολυσμένο άτομο σε οποιαδήποτε φάση της επιδημίας.

Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε σε δυο βήματα χρησιμοποιώντας διαφορετικές παραμέτρους σε κάθε ένα από αυτά. Αρχικά, το κάθε τοπικό δίκτυο διασποράς XEN αναλύθηκε υπό την παραδοχή ότι ο R_0 είναι σταθερός. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε στο πρόγραμμα BEAST v1.7.4 (Drummond et al., 2012), ορίζοντας το GTR ως μοντέλο νουκλεοτιδικής αντικατάστασης, την κατανομή Γάμμα για τη διόρθωση του ρυθμού ανομοιογένειας μεταξύ των θέσεων του DNA, ένα μη συσχετισμένο χαλαρό μοντέλο μοριακού ρολογιού και τα BDM μοντέλα για την εκτίμηση του R_0 . Δεν χρησιμοποιήθηκαν πληροφοριακές εκ των προτέρων (prior) κατανομές για την MCMC ανάλυση, η οποία έτρεξε για 30×10^6 επαναλήψεις, με βήμα δειγματοληψίας 3.000 και burn-in 30×10^5 .

Στη συνέχεια, για το κάθε τοπικό δίκτυο διασποράς XEN εκτιμήθηκε ο R_e στην πορεία του χρόνου χρησιμοποιώντας σειριακά BDM μοντέλα στο πρόγραμμα BEAST v2.1.3 (Bouckaert et al., 2014). Στην ανάλυση αυτή χρησιμοποιήθηκαν οι ρυθμοί νουκλεοτιδικής αντικατάστασης του GTR μοντέλου, οι οποίοι εκτιμήθηκαν στην προηγούμενη ανάλυση, ως πληροφοριακές priors. Λόγω της υψηλής πολυπλοκότητας των BDM μοντέλων είναι δύσκολο να επιτευχθεί σύγκλιση των MCMC αλυσίδων. Για τον λόγο αυτόν χρησιμοποιήθηκαν πληροφοριακές priors σε κάποιες παραμέτρους του μοντέλου. Αναλυτικότερα, ορίστηκε ότι ο εκτιμώμενος ρυθμός μοριακού ρολογιού ακολουθεί την κανονική κατανομή, ο R_0 και ο ρυθμός μετατροπής ενός ατόμου σε μη μολυσματικό ακολουθούν μια LogNormal (0, 10,0) κατανομή, η πιθανότητα δειγματοληψίας μια Beta (0, 1,0) κατανομή και ο t_{MRC} την ομοιόμορφη κατανομή για τα τελευταία 18 έτη (με βάση τη συγκεκριμένη παραμετροποίηση στην εκτίμηση του t_{MRC} , θεωρείται ότι η επιδημία είχε την ίδια πιθανότητα να ξεκινήσει οποιαδήποτε στιγμή το χρονικό διάστημα μεταξύ 1996 και 2014). Όλες οι υπόλοιπες παράμετροι ορίστηκαν όπως και στην αρχική ανάλυση. Η MCMC ανάλυση έτρεξε δυο φορές για

50×10^6 επαναλήψεις, με βήμα δειγματοληψίας 5.000 και burn-in 50×10^5 . Για το μεγαλύτερο τοπικό δίκτυο διασποράς XEN του CRF14_BG, η MCMC ανάλυση έτρεξε για 10×10^7 επαναλήψεις, με βήμα δειγματοληψίας 10.000 και burn-in 10×10^6 .

Προκειμένου να επιβεβαιωθούν οι διαχρονικές εκτιμήσεις για τον R_e , και δεδομένου ότι το ποσοστό δειγματοληψίας του συνολικού αριθμού των XEN με HIV-1 λοίμωξη στην Αθήνα είχε εκτιμηθεί περίπου ίσο με 64% (E.O.Δ.Υ.), το δεύτερο βήμα της ανάλυσης επαναλήφθηκε θέτοντας το ποσοστό δειγματοληψίας ίσο με 64% για όλα τα τοπικά δίκτυα διασποράς XEN (όλες οι άλλες παράμετροι ορίστηκαν όπως και πριν). Τέλος, για τον έλεγχο της σύγκλισης των MCMC αλυσίδων, του t_{MRCA} και των effective samples sizes (ESS) (για τα οποία ορίστηκε ως κάτω όριο το 100) χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα Tracer v1.5 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/tracer/>). Τα δένδρα μέγιστης αξιοπιστίας εκτιμήθηκαν χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα TreeAnnotator v2.1.3, και τα διαγράμματα που αναπαριστούν τις εκτιμώμενες τιμές του R_e στην πορεία του χρόνου σχεδιάστηκαν μέσω της γλώσσας προγραμματισμού R. Τέλος, η στατιστική ανάλυση για τις κατηγορικές μεταβλητές βασίστηκε στο Pearson's chi-square test και για τις συνεχείς μεταβλητές σε παραμετρικά tests (two sample t-test), τα οποία πραγματοποιήθηκαν στο πρόγραμμα STATA 12-StataCorp LP.

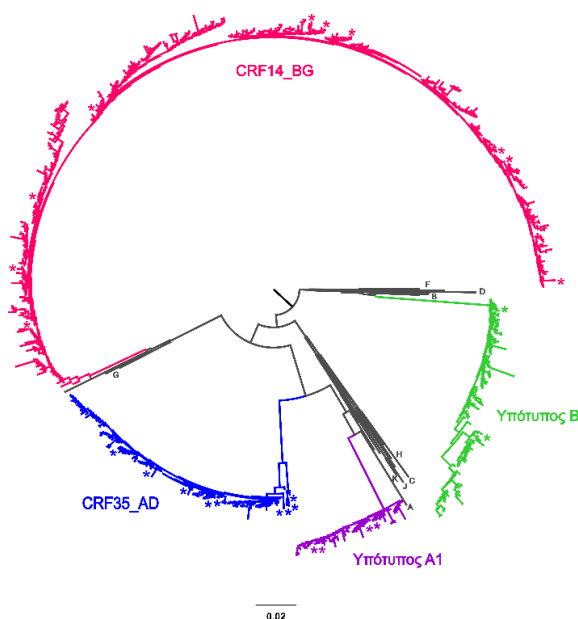
8.3 Αποτελέσματα

8.3.1 Τρόπος διασποράς στους XEN και μεταδόσεις σε άλλες ομάδες κινδύνου

Η φυλογενετική ανάλυση έδειξε την ύπαρξη τεσσάρων κύριων τοπικών δικτύων διασποράς του ιού σε XEN (μονοφυλετικές ομάδες) με εύρος από 59 έως 456 αλληλουχίες: CRF14_BG (N = 456, 58,3%), CRF35_AD (N = 149, 19,1%), B (N = 118, 15,1%) και A (N = 59, 7,5%) (Εικόνα 38). Συνολικά και στα τέσσερα δίκτυα εντοπίστηκαν 782 αλληλουχίες, οι οποίες είχαν απομονωθεί στο μεγαλύτερο ποσοστό τους από άνδρες (N = 667, 85,3%), Ελληνικής εθνικότητας (N = 605, 77,4%) με μέση

ηλικία τα 37,3 έτη (τυπική απόκλιση: 8,8 έτη) (Πίνακας 12, σελ. 178). Στο τοπικό δίκτυο διασποράς του CRF14_BG βρέθηκε το μεγαλύτερο ποσοστό μεταναστών με HIV-1 λοίμωξη (N = 104/456, 22,8%) (Πίνακας 12). Εντός των τοπικών δικτύων το 95,4% (N = 746) των μολύνσεων αφορούσε XEN, με το 8,2% (N = 61) εξ αυτών να έχει αναφέρει ότι έξανε σεξ με άτομα του ίδιου φύλου: CRF14_BG (N = 36, 59%), CRF35_AD (N = 13, 21,3%), B (N = 9, 14,8%), A (N = 3, 4,9%). Στα δίκτυα βρέθηκαν, επίσης, 25 (3,2%) αλληλουχίες από μη XEN, που υποδηλώνουν την ύπαρξη μεταδόσεων από τους XEN σε άλλες ομάδες κινδύνου: CRF14_BG (N = 10, 40%), CRF35_AD (N = 9, 36%), B (N = 2, 8%), A (N = 4, 16%) (Πίνακας 13 σελ. 179, Εικόνα 38). Τα στελέχη αυτά είχαν απομονωθεί από ετεροφυλόφιλους (N = 13, 52%), MSM (N = 7, 28%) και άτομα τα οποία μολύνθηκαν μέσω κάθετης μετάδοσης (N = 5, 20%) (Πίνακας 13). Η κατανομή των ομάδων κινδύνου για τους μη XEN στα δίκτυα διέφερε σημαντικά ($p = 0,002$). Συγκεκριμένα, οι ετεροφυλόφιλοι εντοπίστηκαν σε υψηλότερο ποσοστό στο δίκτυο του CRF14_BG (N = 9, 90%), ενώ οι MSM και τα άτομα που μολύνθηκαν μέσω κάθετης μετάδοσης στα δίκτυα των υπότυπων B (N = 2, 100%) και A1 (N = 3, 75%). Οι μη XEN στα δίκτυα είχαν μέση ηλικία 38,2 έτη (τυπική απόκλιση: 23,3 έτη) και ήταν στην πλειοψηφία τους άνδρες (N = 19, 76%). Αναφορικά με την εθνικότητα, 84% (N = 21) ήταν Έλληνες, 12% (N = 3) από Κεντρική ή Ανατολική Ευρώπη και 4% (N = 1) από Νότια/Νοτιοανατολική Ασία. Επιπρόσθετα, η κατανομή του φύλου, της ηλικίας και της εθνικότητας δεν βρέθηκε να διαφέρει σημαντικά μεταξύ XEN και μη XEN στα δίκτυα. Τέλος, στα δίκτυα βρέθηκαν 11 (1,4%) ακόμα αλληλουχίες από PLHIV με άγνωστη κατηγορία μετάδοσης (Πίνακας 13).

Εικόνα 38

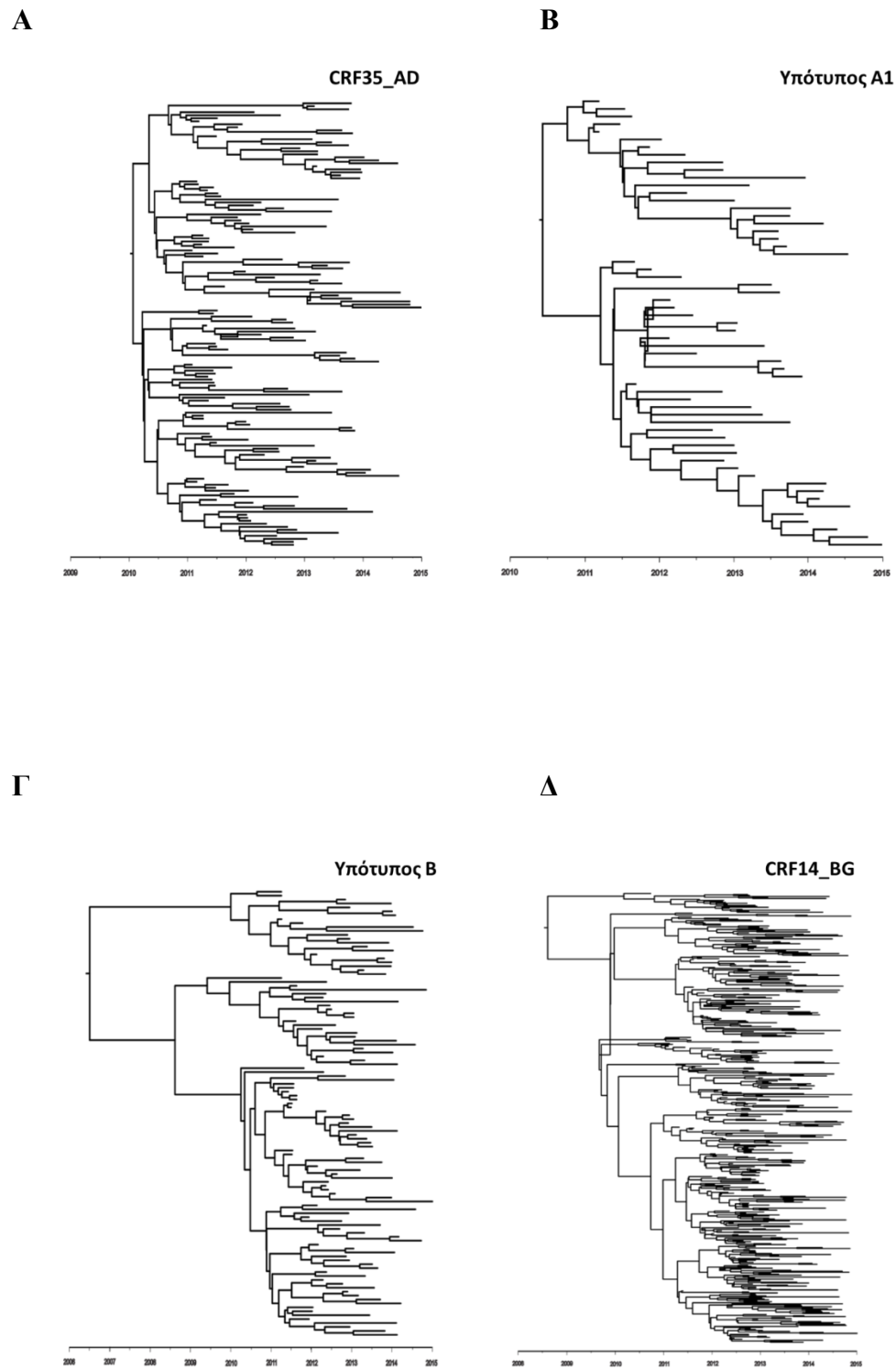


Φυλογενετική τοπολογία αλληλουχιών HIV-1 που εκτιμήθηκε με τη μέθοδο της μέγιστης πιθανοφάνειας (πρόγραμμα FastTree v2.1) και αναπαριστά τα τέσσερα κύρια τοπικά δίκτυα διασποράς του ιού (φυλογενετικές ομάδες) σε XEN στην Αθήνα. Με πράσινο χρώμα αναπαριστάται ο υπότυπος B, με μωβ ο υπότυπος A1, με μπλε ο ανασυνδιασμένος τύπος CRF35_AD και με σκούρο ροζ ο ανασυνδιασμένος τύπος CRF14_BG. Οι φυλογενετικές ομάδες υποστηρίζονται από υψηλές τιμές Shimodaira-Hasegawa ($>0,95$). Οι αστερίσκοι υποδηλώνουν τις αλληλουχίες που βρέθηκαν εντός των δικτύων των XEN και είχαν απομονωθεί από μη XEN. Οι αλληλουχίες που έχουν επισημανθεί με γκρι χρώμα αποτελούν αλληλουχίες αναφοράς γνωστού υπότυπου.

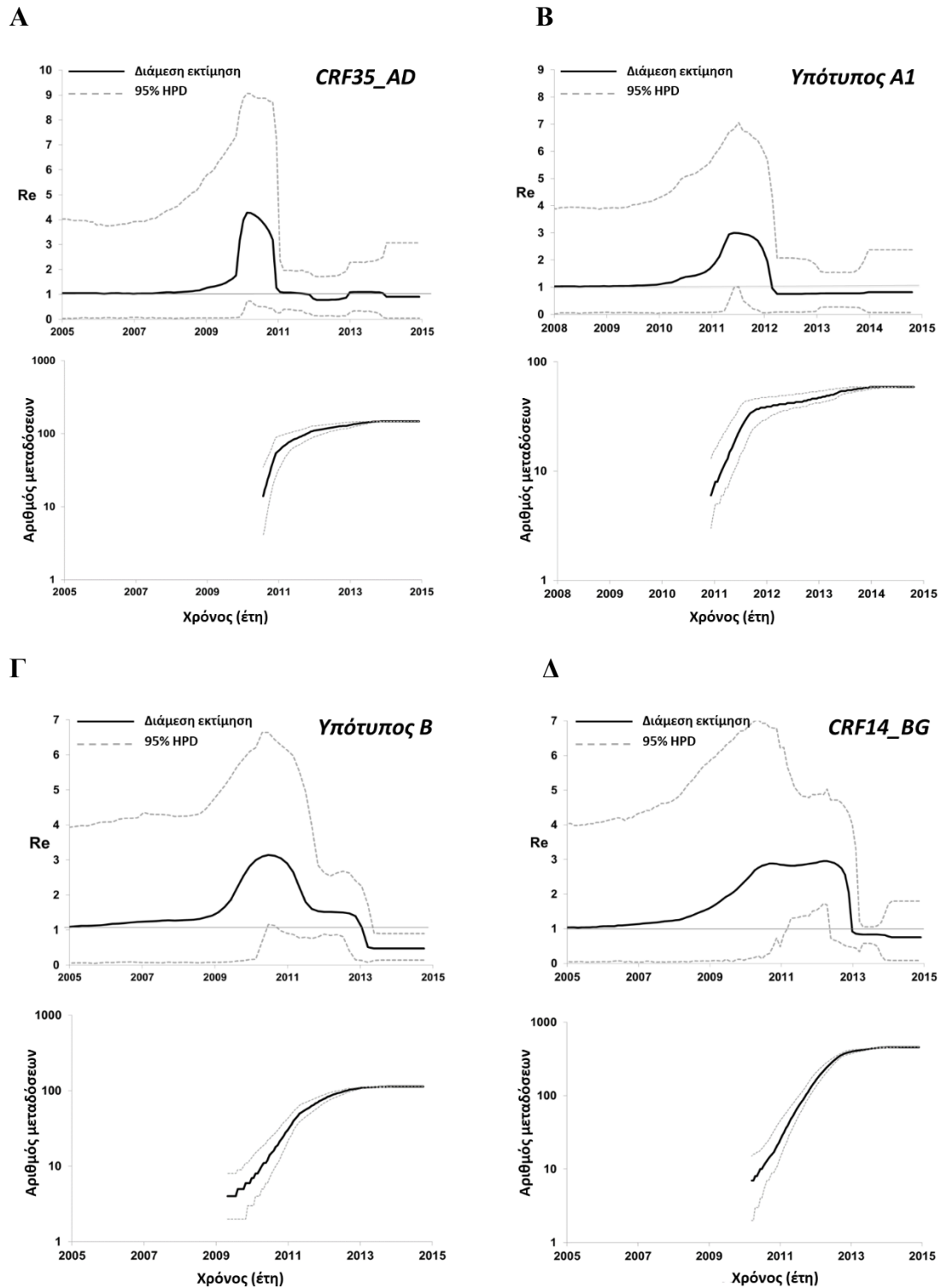
8.3.2 Επιδημιολογικά χαρακτηριστικά των επιμέρους επιδημιών

Για τις επιμέρους επιδημίες (τοπικά δίκτυα διασποράς XEN) του υπότυπου A1 και του ανασυνδυασμένου τύπου CRF35_AD εκτιμήθηκε, μέσω ανάλυσης μοριακού ρολογιού, ότι ξεκίνησαν την ίδια περίπου χρονική περίοδο (Δεκέμβριος 2009 - Μάιος 2010) (Πίνακας 14, σελ. 180). Ο t_{MRCA} της επιμέρους επιδημίας του CRF35_AD εκτιμήθηκε ίσος με 4,9 έτη [διάμεση τιμή, 95% διάστημα μέγιστης πυκνότητας ύστερης πιθανότητας-higher posterior density (HPD): 4,4-7,2] και του υπότυπου A1 4,4 έτη (διάμεση τιμή, 95% HPD διάστημα: 3,9-5,8). Οι εκτιμήσεις αυτές αντιστοιχούν στο 2010,4 (2009,0-2010,9) και 2009,9 (2007,7-2010,5) αντίστοιχα (Πίνακας 14, Εικόνες 39A και B). Για τις επιμέρους επιδημίες του υπότυπου B και του CRF14_BG εκτιμήθηκε ότι η προέλευση τους ήταν προγενέστερη (Μάρτιος 2006 για τον υπότυπο B και Ιούλιος 2008 για τον CRF14_BG) (Πίνακας 14, Εικόνες 39Γ και Δ).

Η φυλοδυναμική ανάλυση ανέδειξε την ύπαρξη σημαντικών διαφορών μεταξύ των δικτύων ως προς τον εκτιμώμενο αριθμό νέων μεταδόσεων και τον R_e στην πορεία του χρόνου. Η μικρότερη τιμή για τον R_e εκτιμήθηκε για την επιμέρους επιδημία του CRF14_BG ($R_e \sim 3,0$), ενώ η μεγαλύτερη για εκείνη του CRF35_AD ($R_e \sim 4,6$) (Πίνακας 14). Για όλες τις επιμέρους επιδημίες ο R_e εκτιμήθηκε ίσος ή μεγαλύτερος του 3 (διάμεση τιμή) κατά τη διάρκεια της επιδημίας. Οι επιμέρους επιδημίες των A1 και CRF35_AD παρουσίασαν αρχικά μια οξεία αύξηση του αριθμού των νέων μεταδόσεων και του R_e , την οποία ακολούθησε μια απότομη πτώση, η οποία ξεκίνησε τον Ιανουάριο του 2011 για τον CRF35_AD και τον Φεβρουάριο του 2012 για τον υπότυπο A1 (Εικόνες 40A και B). Οι επιμέρους επιδημίες των B και CRF14_BG παρουσίασαν αύξηση των νέων μεταδόσεων και του R_e μέχρι και το τέλος του 2012 (Εικόνες 40Γ και Δ). Για όλες τις επιμέρους επιδημίες παρατηρήθηκε μια αρχική αύξηση των νέων μεταδόσεων και του R_e , την οποία ακολούθησε μια σημαντική μείωση.



Εικόνα 39 Χρονολογημένες φυλογενετικές τοπολογίες (δένδρα) αλληλουχιών HIV-1 από τα τέσσερα κύρια τοπικά δίκτυα διασποράς του ιού (επιμέρους επιδημίες) σε XEN στην Αθήνα: **(Α)** CRF35_AD, **(Β)** υπότυπος A1, **(Γ)** υπότυπος B και **(Δ)** CRF14_BG, οι οποίες εκτιμήθηκαν μέσω ανάλυσης μοριακού ρολογιού που πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα BEAST v2.1.3 χρησιμοποιώντας μοντέλα γέννησης-θανάτου (birth-death models - BDM).



Εικόνα 40 Γραφήματα που αναπαριστούν τον ενεργό αριθμό αναπαραγωγής (R_e) και τον αριθμό των μεταδόσεων σε λογαριθμική κλίμακα στην πορεία του χρόνου για τις επιμέρους επιδημίες XEN των: (Α) CRF35_AD, (Β) υπότυπο A1, (Γ) υπότυπο B και (Δ) CRF14_BG. Οι εκτιμήσεις προέκυψαν από τη φυλοδυναμική ανάλυση που πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα BEAST v2.1.3 χρησιμοποιώντας μοντέλα γέννησης-θανάτου (birth-death models - BDM). Η συνεχόμενη γραμμή αναπαριστά τη διάμεση τιμή ενώ οι διακεκομμένες το 95% higher posterior density - HPD interval (διάστημα μέγιστης πυκνότητας ύστερης πιθανότητας).

8.4 Συμπεράσματα

Στην παρούσα ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν δεδομένα που αντιστοιχούσαν στο 74,1% του συνόλου των XEN με HIV-1 λοίμωξη που είχαν δηλωθεί στο εθνικό σύστημα επιδημιολογικής επιτήρησης της HIV/AIDS λοίμωξης (E.O.Δ.Υ.) σε ένα χρονικό διάστημα, περίπου, τεσσάρων ετών. Το ποσοστό αυτό είναι ένα από τα υψηλότερα που έχει χρησιμοποιηθεί μέχρι τώρα για τη μελέτη επιδημιών HIV-1 σε παγκόσμια κλίμακα. Η ανάλυση έδειξε ότι οι περισσότερες μεταδόσεις του ιού μεταξύ των XEN πραγματοποιούνταν εντός τεσσάρων κύριων τοπικών δικτύων. Το εύρημα αυτό είναι σε συμφωνία με ευρήματα άλλων μελετών από Ευρώπη (Niculescu et al., 2015; Paraskevis et al., 2015; Kivelä et al., 2007; Skar et al., 2011; Ciccozzi et al., 2007) και Αμερική (Peters et al., 2016), και υποδεικνύει ότι κατά τη διάρκεια της HIV-1 επιδημίας στην Αθήνα οι περισσότερες μεταδόσεις μεταξύ των XEN πιθανότατα πραγματοποιούνταν λόγω εφαρμογής μη ασφαλών πρακτικών. Επιπρόσθετα, εντοπίστηκε ένα μικρός, αλλά σημαντικός, αριθμός μεταδόσεων από XEN σε μη XEN εντός των τεσσάρων δικτύων. Οι μεταδόσεις αυτές πιθανότατα πραγματοποιήθηκαν μέσω σεξουαλικών επαφών χωρίς προφύλαξη μεταξύ XEN και μη XEN, και χρήζει παρακολούθησης το αν οδήγησαν σε περαιτέρω εξάπλωση του ιού μεταξύ των μη XEN. Τα παραπάνω ευρήματα αναδεικνύουν την πρόσθετη συνεισφορά της μοριακής επιδημιολογίας η οποία, εκτός του ότι παρέχει πληροφορίες αναφορικά με την πιθανή πηγή των HIV-1 μεταδόσεων, στα πλαίσια αυτής της ανάλυσης χρησιμοποιήθηκε και για τον εντοπισμό μεταδόσεων μεταξύ πληθυσμών διαφορετικών ομάδων κινδύνου.

Αναφορικά με τη δυναμική των μεταδόσεων, εντοπίστηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των τεσσάρων επιμέρους HIV-1 επιδημιών στους XEN (τοπικά δίκτυα διασποράς XEN). Συγκεκριμένα, για τους CRF35_AD και A1 παρατηρήθηκε μια ραγδαία αύξηση του R_e στην αρχή της επιδημίας, ενώ ακολούθησε μια απότομη πτώση του αργότερα. Επιπρόσθετα, και στις δυο επιμέρους επιδημίες ο αριθμός των νέων μεταδόσεων μετά το 2012 ήταν ιδιαίτερα μικρός. Αντίθετα, η εκθετική φάση της επιδημίας ($R_e > 1$) διήρκησε περισσότερο για τους CRF14_BG και B, και συγκεκριμένα περίπου μέχρι τα τέλη του 2012. Επίσης, οι νέες μεταδόσεις του ιού στις επιμέρους

επιδημίες των CRF35_AD και A1 μειώθηκαν νωρίτερα συγκριτικά με εκείνες των CRF14_BG και B, πιθανότατα λόγω της δομής των συγκεκριμένων δικτύων («firewall effect») ή και της φυσικής ιστορίας της νόσου (Dombrowski et al., 2017). Η μείωση του αριθμού των νέων μεταδόσεων για τις επιμέρους επιδημίες των CRF14_BG και B βρέθηκε να συμπίπτει με την περίοδο που πραγματοποιήθηκε το πρόγραμμα «ΑΡΙΣΤΟΤΕΛΗΣ» (Hatzakis et al., 2015). Στα πλαίσια του προγράμματος «ΑΡΙΣΤΟΤΕΛΗΣ» έχει εκτιμηθεί με μεθόδους κλασσικής επιδημιολογίας ότι η επίπτωση του HIV-1 μειώθηκε το χρονικό διάστημα μεταξύ Σεπτεμβρίου 2012 και Νοεμβρίου 2013 (Sypsa et al., 2017). Στην παρούσα ανάλυση, χρησιμοποιώντας μεθόδους μοριακής επιδημιολογίας, βρέθηκε μια σημαντική μείωση του R_e στις επιμέρους επιδημίες των CRF14_BG και B το ίδιο χρονικό διάστημα. Επιπρόσθετα, τα ευρήματα της παρούσας ανάλυσης ταυτίζονται και με ευρήματα προγενέστερων μοριακών μελετών ως προς την ύφεση της επιδημίας των XEN στην Αθήνα (Paraskevis et al., 2015), και, ως εκ τούτου, ενισχύεται σημαντικά η εγκυρότητά τους.

Συμπερασματικά, η μελέτη των προτύπων διασποράς του HIV-1 στους XEN στην Αθήνα τεκμηριώνει την ύπαρξη μετάδοσης του ιού από XEN και σε άλλες ομάδες κινδύνου, υποδεικνύοντας την ανάγκη παρεμβάσεων σε αυτούς τους πληθυσμούς. Επίσης, εντοπίστηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των επιμέρους επιδημιών του ιού στους XEN κατά το χρονικό διάστημα 2011-2014. Οι επιμέρους επιδημίες του υπότυπου A1 και του ανασυνδυασμένου τύπου CRF35_AD αυξήθηκαν έντονα κατά την αρχική περίοδο εξάπλωσής τους, σε αντίθεση με εκείνες του υπότυπου B και του ανασυνδυασμένου τύπου CRF14_BG όπου οι μεταδόσεις διήρκησαν για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα. Κοινό χαρακτηριστικό αποτελεί ότι μετά το 2012 όλες οι επιμέρους επιδημίες του HIV-1 που αφορούν XEN παρουσίασαν σημαντική μείωση του αριθμού των νέων μεταδόσεων. Μια πιθανή εξήγηση θα μπορούσε να είναι η εφαρμογή προληπτικών μέτρων, όπως του προγράμματος «ΑΡΙΣΤΟΤΕΛΗΣ» (Hatzakis et al., 2015).

Πίνακας 12 Κατανομή PLHIV οι αλληλουχίες των οποίων εντοπίστηκαν εντός των τεσσάρων κύριων τοπικών δικτύων διασποράς του ιού σε χρήστες ενδοφλεβίων ναρκωτικών στην Αθήνα, ως προς την εθνικότητα.

Τοπικά δίκτυα διασποράς XEN¹					
Εθνικότητα	Υπότυπος A1 (N, %)	Υπότυπος B (N, %)	CRF14_BG (N, %)	CRF35_AD (N, %)	Σύνολο (N, %)
Αφρική	0 (0,0)	0 (0,0)	3 (0,7)	0 (0,0)	3 (0,4)
Κεντρική Ευρώπη	2 (3,4)	1 (0,9)	15 (3,3)	5 (3,4)	23 (2,9)
Ανατολική Ευρώπη	0 (0,0)	3 (2,5)	28 (6,1)	2 (1,3)	33 (4,2)
Ελλάδα	51 (86,4)	98 (83,1)	336 (73,7)	120 (80,5)	605 (77,4)
Βόρεια Αφρική/Μέση Ανατολή	2 (3,4)	12 (10,2)	21 (4,5)	5 (3,4)	40 (5,1)
Βόρεια Αμερική	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (0,7)	1 (0,1)
Νότια Ασία	1 (1,7)	0 (0,0)	10 (2,2)	2 (1,3)	13 (1,7)
Νοτιοανατολική Ασία	1 (1,7)	1 (0,9)	5 (1,1)	1 (0,7)	8 (1,0)
Νότια & Νοτιοανατολική Ασία	0 (0,0)	1 (0,9)	12 (2,5)	3 (2,0)	16 (2,0)
Δυτική Ασία	0 (0,0)	0 (0,0)	8 (1,8)	2 (1,3)	10 (1,3)
Δυτική Ευρώπη	0 (0,0)	0 (0,0)	2 (0,4)	0 (0,0)	2 (0,3)
Άγνωστη	2 (3,4)	2 (1,7)	16 (3,5)	8 (5,4)	28 (3,6)
Σύνολο	59 (100)	118 (100)	456 (100)	149 (100)	782 (100)

¹ XEN, Χρήστες Ενδοφλεβίων Ναρκωτικών

Πίνακας 13 Κατανομή PLHIV οι αλληλουχίες των οποίων εντοπίστηκαν εντός των τεσσάρων κύριων τοπικών δικτύων διασποράς του ιού σε χρήστες ενδοφλεβίων ναρκωτικών στην Αθήνα, ως προς την κατηγορία μετάδοσης.

Κατηγορία μετάδοσης	Τοπικά δίκτυα διασποράς XEN ¹			
	Υπότυπος A (N, %)	Υπότυπος B (N, %)	CRF14_BG (N, %)	CRF35_AD (N, %)
Ετεροφυλόφιλοι	1 (1,7)	0 (0,0)	9 (2,0)	3 (2,0)
MSM ²	0 (0,0)	2 (1,7)	1 (0,2)	4 (2,7)
XEN ¹	54 (91,5)	116 (98,3)	437 (95,8)	139 (93,3)
Κάθετη μετάδοση	3 (5,1)	0 (0,0)	0 (0,0)	2 (1,3)
Άγνωστη	1 (1,7)	0 (0,0)	9 (2,0)	1 (0,7)
Σύνολο	59 (100)	118 (100)	456 (100)	149 (100)

¹ XEN, Χρήστες Ενδοφλέβιων Ναρκωτικών

² MSM, Men who have Sex with Men

Πίνακας 14 Επιδημιολογικά χαρακτηριστικά των τεσσάρων κύριων τοπικών δικτύων διασποράς του HIV-1 σε χρήστες ενδοφλεβίων ναρκωτικών στην Αθήνα.

	Επιδημιολογικοί δείκτες			
	Χρόνος προέλευσης (t_{MRCA}) ¹	R_e ²		
		Διάμεση τιμή (95% HPD ³)	Ελάχιστη τιμή (95% HPD ³)	Μέγιστη τιμή (95% HPD ³)
Δίκτυα διασποράς				
CRF14_BG	07/2008	6,4 (4,8-8,9)	0,8 (0,6-1,1)	3,0 (0,3-7,5)
CRF35_AD	12/2009	4,9 (4,4-7,2)	0,8 (0,1-1,7)	4,6 (1,6-9,2)
Υπότυπος B	03/2006	8,5 (5,5-12,5)	0,5 (0,1-0,9)	3,2 (1,3-6,4)
Υπότυπος A	05/2010	4,4 (3,9-5,8)	0,8 (0,3-1,5)	3,0 (1,1-6,7)

¹ t_{MRCA} , time to the most recent common ancestor (χρόνος ως τον πιο κοινό πρόγονο, δηλαδή, ο χρόνος που εκτιμήθηκε από την ανάλυση μοριακού ρολογιού ότι ξεκίνησαν οι μεταδόσεις του ιού)

² R_e , effective reproductive number (ενεργός αριθμός αναπαραγωγής)

³ HPD, Highest Posterior Density interval (διάστημα μέγιστης πυκνότητας ύστερης πιθανότητας)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9

Μοριακή εκτίμηση της γεωγραφικής προέλευσης της HIV-1 λοίμωξης και των προτύπων διασποράς του ιού στους χρήστες ενδοφλέβιων ναρκωτικών με μη Ελληνική εθνικότητα στην Αθήνα

Δημοσίευση:

Paraskevis D, Kostaki E*, Nikolopoulos GK, Sypsa V, Psychogiou M, Del Amo J, Hodges-Mameletzis I, Paraskeva D, Skoutelis A, Malliori M, Williams L, Friedman SR, Daikos GL, Hatzakis A. Molecular tracing of the geographical origin of Human Immunodeficiency Virus Type 1 infection and patterns of epidemic spread among migrants who inject drugs in Athens. Clin Infect Dis. 2017 Nov 29;65(12):2078-2084. doi: 10.1093/cid/cix717*

**contributed equally to this work*

9.1 Εισαγωγή-Σκοπός

Τα τελευταία χρόνια έχει παρατηρηθεί ότι ένα σημαντικό ποσοστό των νεοδιαγνωσθέντων με HIV-1 λοίμωξη στις χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης και της Ευρωπαϊκής Οικονομικής Κοινότητας είναι μετανάστες (ECDC, 2018). Συγκεκριμένα, το 2017 οι μετανάστες αντιστοιχούσαν στο 41% του συνόλου των νέων HIV-1 διαγνώσεων στις χώρες αυτές (ECDC, 2018). Η ετεροφυλοφιλική επαφή χωρίς προφύλαξη αποτελεί τον πιο συχνό τρόπο μετάδοσης του HIV-1 στους μετανάστες, με εξαίρεση τους μετανάστες με προέλευση την Ανατολική Ευρώπη όπου οι μεταδόσεις του ιού πραγματοποιούνται, κυρίως, μέσω ενδοφλέβιας χρήσης ναρκωτικών (Hernando et al., 2015; Paraskevis et al., 2013). Επιπρόσθετα, το μεγαλύτερο ποσοστό των μεταναστών διαγιγνώσκεται καθυστερημένα (ECDC, 2018). Τα προγράμματα διάγνωσης και πρόληψης, καθώς και οι υπάρχουσες δομές παροχής ιατρικής φροντίδας, έχουν χαρακτηριστεί ως ανεπαρκή γι' αυτόν τον πληθυσμό (Deblonde et al., 2015). Οι μετανάστες, ανεξάρτητα με το τι ορίζει το νομοθετικό πλαίσιο, αντιμετωπίζουν πολλαπλά εμπόδια στην πρόσβαση στις παραπάνω υπηρεσίες. Το 2014, 20 από τις 30 χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης/Ευρωπαϊκής Οικονομικής Κοινότητας και οι μισές χώρες εκτός αυτής ανακοίνωσαν ότι οι μετανάστες αποτελούν πληθυσμό σε προτεραιότητα ως προς την πρόσβαση στις HIV-1 υπηρεσίες, και, επίσης, ότι η γνώση του τρόπου μετάδοσης του ιού στο συγκεκριμένο πληθυσμό αποτελεί ζήτημα πρωταρχικής σημασίας (ECDC, 2015a). Οι Álvarez del Arco και συνεργάτες, βασισμένοι σε δεδομένα της μελέτης aMASE, δημοσίευσαν ότι το 50-67% των μεταναστών με HIV-1 λοίμωξη που διέμεναν σε 9 Ευρωπαϊκές χώρες, ανεξάρτητα από την καταγωγή και την κατηγορία μετάδοσής τους, μολύνθηκε με τον ιό μετά την άφιξή του στην χώρα διαμονής (Álvarez-Del Arco et al., 2017).

Αναφορικά με την Ελλάδα και την επιδημία του HIV-1 στους XEN της Αθήνας, όπως αναφέρθηκε και στο προηγούμενο κεφάλαιο, οι μεταδόσεις του ιού πραγματοποιούνταν εντός τεσσάρων κύριων τοπικών δικτύων διασποράς στους υπότυπους A1 και B, καθώς και στους ανασυνδυασμένους τύπους CRF14_BG και CRF35_AD. Προηγούμενες μοριακές μελέτες εκτίμησαν ότι η προέλευση των αρχικών

στελεχών (founder strains) που προκάλεσαν τις επιμέρους τοπικές επιδημίες του CRF14_GR και του CRF35_AD, ήταν η Ρουμανία και το Αφγανιστάν/Ιράν αντίστοιχα (Paraskevis et al., 2013; Paraskevis et al., 2011). Επίσης, εκτίμησαν ότι ο επιπολασμός της HIV-1 λοίμωξης ήταν υψηλότερος μεταξύ των ανδρών XEN από Αφγανιστάν/Ιράν και Βαλκάνια/Ανατολική Ευρώπη (Hatzakis et al., 2015; Sypsa et al., 2015). Τα ευρήματα αυτά αποτέλεσαν το έναυσμα για τη διερεύνηση του τρόπου διασποράς του HIV-1 στους μετανάστες XEN στο παρόν κεφάλαιο. Συγκεκριμένα, σκοπός της παρούσας ανάλυσης ήταν η εκτίμηση της πιθανής γεωγραφικής προέλευσης της HIV-1 λοίμωξης στους μετανάστες XEN, και η διερεύνηση της υπόθεσης ότι η συχνότητα των μεταδόσεων του ιού είναι μεγαλύτερη μεταξύ των μεταναστών XEN.

9.2 Υλικό-Μέθοδοι

Στο προηγούμενο κεφάλαιο, για τη διερεύνηση του τρόπου διασποράς του ιού στους XEN αναλύθηκαν 2.274 αλληλουχίες, οι οποίες αποτελούσαν το σύνολο των αλληλουχιών που συλλέχθηκαν στη Νότια/Κεντρική Ελλάδα το χρονικό διάστημα 01/01/2011-31/10/2014 (Εικόνα 41). Βρέθηκε ότι 874 (38,4%) αλληλουχίες είχαν απομονωθεί από XEN (Εικόνα 41) και αντιστοιχούσαν στο 74,1% των XEN με HIV-1 λοίμωξη που είχαν δηλωθεί στο εθνικό σύστημα επιδημιολογικής επιτήρησης της HIV/AIDS λοίμωξης (Ε.Ο.Δ.Υ.) την ίδια χρονική περίοδο.

Στην παρούσα ανάλυση ο υπό μελέτη πληθυσμός αφορούσε μετανάστες XEN. Ως «μετανάστης» ορίστηκε κάθε άτομο με HIV-1 λοίμωξη και μη Ελληνική εθνικότητα. Εκ των 874 αλληλουχιών XEN βρέθηκε ότι οι 184 (21,1%) είχαν απομονωθεί από μετανάστες (Εικόνα 41).

9.2.1 Εκτίμηση πιθανής προέλευσης HIV-1 λοίμωξης σε μετανάστες XEN

Η πιθανή γεωγραφική προέλευση της HIV-1 λοίμωξης για όλους τους μετανάστες XEN εκτιμήθηκε μέσω φυλογενετικής ανάλυσης. Τα τέσσερα κύρια

τοπικά δίκτυα διασποράς σε XEN στην Αθήνα (A1, B, CRF14_BG, CRF35_AD) υποδηλώνουν ότι οι μεταδόσεις του ιού πραγματοποιούνται μεταξύ του τοπικού πληθυσμού. Ως εκ τούτου, τα στελέχη των μεταναστών XEN που εντοπίζονται εντός αυτών των δικτύων ή απαρτίζονται σε τμήμα του γονιδιώματός τους από στελέχη του ιού από τα δίκτυα, υποδεικνύουν ότι η μετάδοση του ιού πραγματοποιήθηκε τοπικά και μεταγενέστερα της άφιξής τους στην Ελλάδα. Για τα στελέχη των μεταναστών XEN που εντοπίζονται εκτός των δικτύων, εκτιμήθηκε η πιθανή γεωγραφική προέλευση της HIV-1 λοίμωξης μέσω φυλογενετικής ανάλυσης, η οποία πραγματοποιήθηκε στο πρόγραμμα FastTree v2.1 παρουσία αλληλουχιών αναφοράς με παγκόσμια δειγματοληψία. Οι αλληλουχίες αναφοράς επιλέχθηκαν με διαφορετικά κριτήρια ανά περίπτωση, τα οποία αφορούσαν κατά κύριο λόγο τον HIV-1 υπότυπο/CRF και τη διαθεσιμότητα των αλληλουχιών στη βάση δεδομένων του HIV (Los Alamos HIV Sequences Database). Τα κριτήρια επιλογής των αλληλουχιών αναφοράς αναπαρίστανται αναλυτικά στον Πίνακα 15 (σελ. 196). Όταν ένα στέλεχος εντοπίζονταν σε τοπικό δίκτυο το οποίο αποτελούνταν σε ποσοστό μεγαλύτερο του 75% από αλληλουχίες με κοινή γεωγραφική προέλευση, θεωρούνταν ότι αυτή η περιοχή αποτελούσε και την προέλευση της HIV-1 λοίμωξης.

9.2.2 Διερεύνηση τρόπου διασποράς σε τοπικά δίκτυα διασποράς XEN (φυλοεθνική ανάλυση)

Για τη διερεύνηση της υπόθεσης ομαδοποίησης των αλληλουχιών ως προς την εθνικότητα, η ανάλυση πραγματοποιήθηκε ως εξής: Αρχικά, αναλύθηκαν φυλογενετικά οι HIV-1 αλληλουχίες ανά δίκτυο διασποράς μεταξύ XEN. Η φυλογενετική ανάλυση του κάθε δικτύου βασίστηκε στη μέθοδο της μέγιστης πιθανοφάνειας (maximum likelihood – ML) με bootstrap εκτιμήσεις αξιοπιστίας και πραγματοποιήθηκε στο πρόγραμμα RAxML v8.1.15 (Stamatakis, 2014), ενώ επιβεβαιώθηκε με περαιτέρω ανάλυση στο πρόγραμμα FastTree v2.1 (Price et al., 2010). Στη συνέχεια, εκτιμήθηκαν τα γεγονότα διασποράς του ιού μεταξύ των διαφορετικών εθνικοτήτων από τις bootstrap φυλογενετικές τοπολογίες (A1: 408, B: 708, CRF14_BG: 300, CRF35_AD: 408) (RAxML) και τις ML τοπολογίες (FastTree) με τη μέθοδο της μέγιστης φειδωλότητας στο πρόγραμμα PAUP*4.0 (Wilgenbusch et

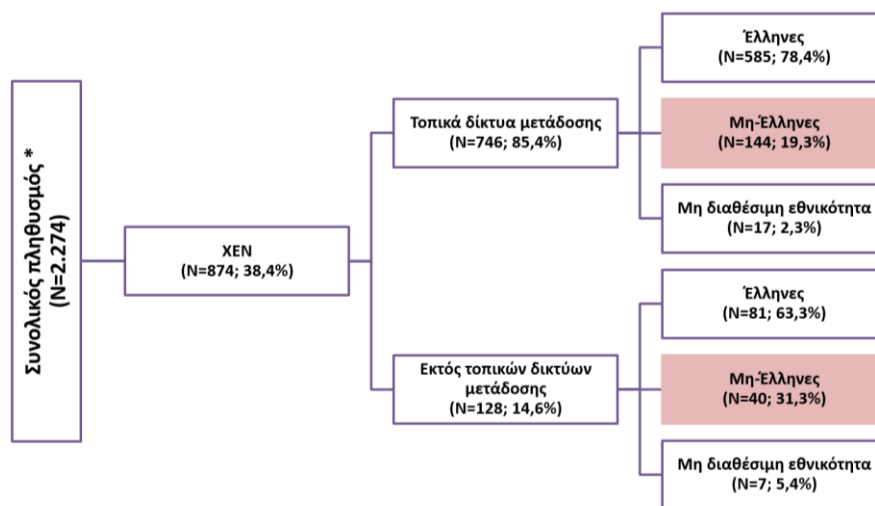
al., 2003). Για την εκτίμηση των γεγονότων διασποράς μεταξύ των εθνικοτήτων, τα άκρα των κλαδιών των bootstrap και ML δένδρων επισημάνθηκαν με χαρακτήρες, όπου ο κάθε χαρακτήρας αντιστοιχούσε στην εθνικότητα του ατόμου με HIV-1 λοίμωξη από τον οποίο είχε απομονωθεί η αλληλουχία. Τέλος, εφαρμόστηκε στατιστική φυλοεθνική ανάλυση, η οποία αφορούσε τον έλεγχο της υπόθεσης του αν η κατανομή των εκτιμώμενων γεγονότων διασποράς μεταξύ των διαφορετικών εθνικοτήτων, που προέκυψε από τα bootstrap και ML δένδρα, διέφερε στατιστικά σημαντικά από την αντίστοιχη κατανομή των αναμενόμενων γεγονότων διασποράς, που προέκυψε από τα προσομοιωμένα δένδρα, υπό την μηδενική υπόθεση της πλήρους ανάμειξης (panmixis hypothesis). Σε έναν πληθυσμό όπου ισχύει η υπόθεση της πλήρους ανάμειξης, το κάθε άτομο με HIV-1 λοίμωξη έχει περίπου την ίδια πιθανότητα να μεταδώσει τον ιό σε οποιοδήποτε άλλο άτομο του πληθυσμού, ανεξαρτήτως εθνικότητας. Τα δένδρα που προσομοίωναν έναν τέτοιο πληθυσμό κατασκευάστηκαν με τυχαία ανάμειξη των δεδομένων στα άκρα των κλαδιών των bootstrap και ML δένδρων στο πρόγραμμα Mesquite v3.0.1 (Maddison et al., 2018). Όταν ο αριθμός των εκτιμώμενων γεγονότων διασποράς βρίσκονταν σημαντικά μικρότερος από τον αριθμό των αντίστοιχων αναμενόμενων, υποδείκνυε ότι οι μεταδόσεις του ιού μεταξύ των μεταναστών XEN πραγματοποιούνταν με σημαντικά μεγαλύτερη συχνότητα. Η στατιστική ανάλυση βασίστηκε στο μη παραμετρικό μονόπλευρο έλεγχο Mann-Whitney U test και πραγματοποιήθηκε στο πρόγραμμα STATA 12-StataCorp LP.

Η υπόθεση της ομαδοποίησης ως προς την εθνικότητα ελέγχθηκε με περαιτέρω ανάλυση, κατά την οποία εκτιμήθηκαν οι γενετικές αποστάσεις ανά τοπικό δίκτυο διασποράς XEN. Οι γενετικές αποστάσεις εκτιμήθηκαν μέσω φυλογενετικής ανάλυσης, η οποία βασίστηκε στη μέθοδο Neighbor-Joining με αποστάσεις μέγιστης πιθανοφάνειας και πραγματοποιήθηκε στο πρόγραμμα PAUP*4.0 (Wilgenbusch et al., 2003).

9.3 Αποτελέσματα

9.3.1 Τοπικά δίκτυα διασποράς XEN

Στην ανάλυση συμπεριλήφθηκαν αλληλουχίες 874 XEN, εκ των οποίων το 21,1% (N = 184) ήταν μετανάστες (Εικόνα 41). Η κατανομή των XEN με HIV-1 λοίμωξη ως προς την εθνικότητα παρουσιάζεται αναλυτικά στον Πίνακα 16 (σελ. 197). Από προηγούμενη ανάλυση (Κεφάλαιο 8) βρέθηκε ότι το 85,4% (N = 746) των αλληλουχιών XEN εντοπίστηκε σε τέσσερα τοπικά δίκτυα διασποράς (Εικόνα 41). Συγκεκριμένα, η κατανομή των XEN με HIV-1 λοίμωξη σε δίκτυα ήταν ως εξής: CRF14_BG (N = 437, 58,6%), CRF35_AD (N = 139, 18,6%), B (N = 116, 15,6%), A (N = 54, 7,2%). Το μεγαλύτερο ποσοστό των XEN που βρέθηκαν σε δίκτυα ήταν Έλληνες (N = 585, 78,4%) (Εικόνα 41). Η κατανομή των HIV-1 υπότυπων και ανασυνδισμένων τύπων στους XEN του υπό μελέτη πληθυσμού παρουσιάζεται αναλυτικά στον Πίνακα 17 (σελ. 198). Ο CRF14_BG αποτελεί το πιο συχνό στέλεχος τόσο στους Έλληνες (N = 328, 49,3%) όσο και στους μη Έλληνες (N = 101, 54,9%) XEN (Πίνακας 17).



* Σύνολο HIV-1(+) με διαθέσιμη αλληλουχία το χρονικό διάστημα μεταξύ Ιανουαρίου 2011 και Οκτωβρίου 2014

Εικόνα 41 Διάγραμμα συνολικού πληθυσμού. Με ροζ χρώμα έχει επισημανθεί ο υπό μελέτη πληθυσμός (μετανάστες XEN που αναφέρονται στο διάγραμμα ως «Μη Έλληνες»).

9.3.2 Πιθανή προέλευση HIV-1 λοίμωξης σε μετανάστες XEN

Ο υπό μελέτη πληθυσμός αποτελούνταν συνολικά από 184 μετανάστες XEN με HIV-1 λοίμωξη, εκ των οποίων: i) 144 (78,3%) βρέθηκαν εντός των τοπικών δικτύων διασποράς XEN και, συνεπώς, μολύνθηκαν στην Ελλάδα και ii) 24 (13,0%) βρέθηκαν με ανασυνδυασμένους ιούς από τα δίκτυα διασποράς των XEN (A1, B, CRF14_BG, CRF35_AD) και, ως εκ τούτου, επίσης, μολύνθηκαν στην Ελλάδα (*Πίνακας 17*). Η προέλευση της HIV-1 λοίμωξης για τους 16 (8,7%) μετανάστες XEN που βρέθηκαν εκτός των τοπικών δικτύων διασποράς XEN παρουσιάζεται αναλυτικά στον *Πίνακα 18* (*σελ. 199*). Συγκεκριμένα, εκτιμήθηκε ως πιθανή χώρα προέλευσης των HIV-1 στελεχών εκτός δικτύων XEN (N = 16): i) υπότυπου A1, B και CRF01_AE, η Ελλάδα (N = 7, 43,8%), ii) υπότυπου F και CRF14_BG, η Ρουμανία (N = 2, 12,5%), iii) URF (A/U), η Τουρκία και η Βουλγαρία (N = 1, 6,3%) και iv) CRF03_AB, η Ελλάδα ή το Ισραήλ (N = 1, 6,3%). Αναφορικά με τα στελέχη με απροσδιόριστο τύπο (N = 5, 3,1%), για 4 (80%) από αυτά εκτιμήθηκε ως πιθανή χώρα προέλευσης η Τουρκία και για ένα (20%) στέλεχος, αν και δεν κατέστη δυνατό να εκτιμηθεί η ακριβής χώρα προέλευσής του, εκτιμήθηκε ότι η προέλευσή του ήταν εκτός Ελλάδας. Συνολικά, βρέθηκε ότι το 94,3% (N = 173) των μεταδόσεων του HIV-1 σε μετανάστες XEN συνέβησαν στην Ελλάδα.

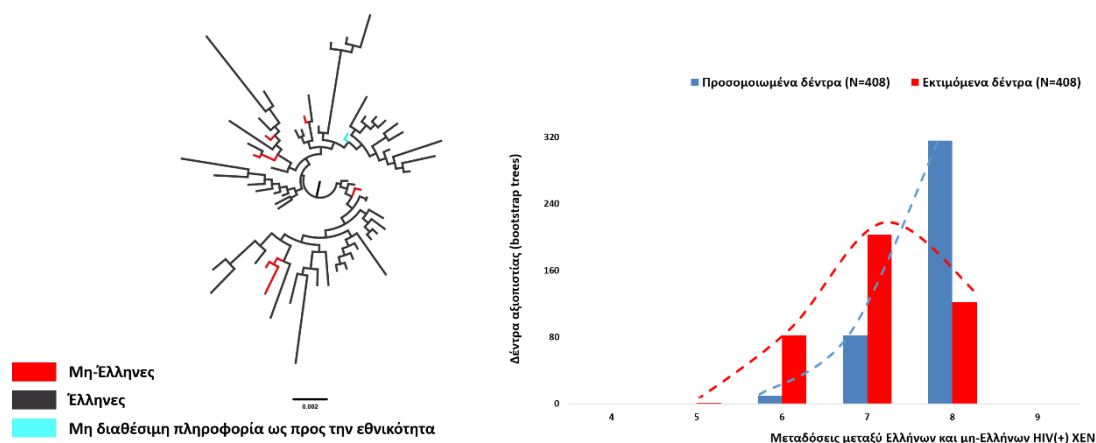
9.3.3 Τρόπος μετάδοσης μεταξύ XEN διαφορετικών εθνικοτήτων

9.3.3.1 Αποτελέσματα φυλοεθνικής ανάλυσης

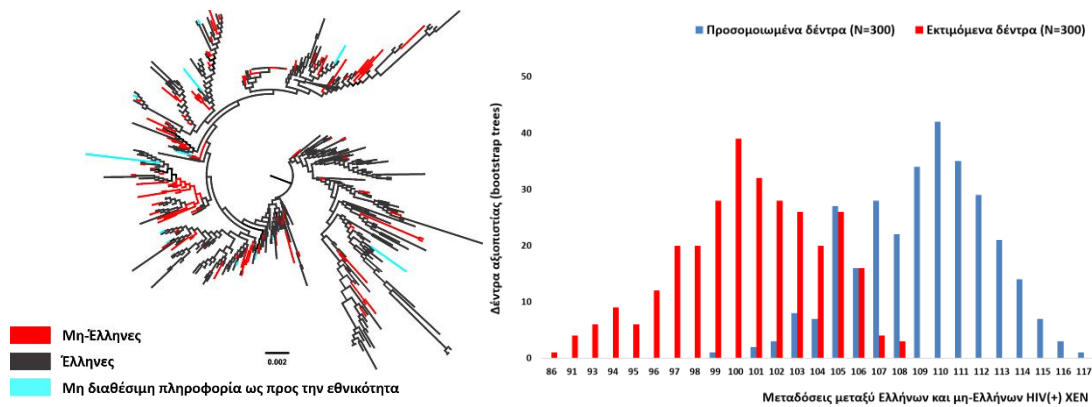
Εφαρμόστηκε στατιστική φυλοεθνική ανάλυση στα τέσσερα κύρια τοπικά δίκτυα διασποράς XEN, ώστε να διερευνηθούν τα πρότυπα διασποράς του HIV-1 μεταξύ των διαφορετικών εθνικοτήτων ανά δίκτυο. Η ανάλυση έδειξε της ύπαρξη σημαντικής ομαδοποίησης των στελεχών του ιού εντός των δικτύων του υπότυπου A1 και του CRF14_BG ως προς την εθνικότητα (*Εικόνα 42A και B*). Σε αντίθεση με τους A1 και CRF14_BG, για τους υπότυπους B και CRF35_AD δε βρέθηκε σημαντική

ομαδοποίηση των στελεχών του ιού ως προς την εθνικότητα (Εικόνα 42Γ και Δ). Συγκεκριμένα, για τον CRF35_AD βρέθηκε σημαντική διαφορά μεταξύ των εκτιμώμενων και των αναμενόμενων γεγονότων διασποράς του ιού μεταξύ Ελλήνων και μη Ελλήνων XEN με HIV-1 λοίμωξη χρησιμοποιώντας το σύνολο των bootstrap δένδρων (Εικόνα 42Δ). Το εύρημα αυτό, όμως, δεν επιβεβαιώθηκε από την περαιτέρω ανάλυση που πραγματοποιήθηκε στο ML δένδρο, και, ως εκ τούτου, δε μπορεί να γίνει αποδεκτή η ύπαρξη σημαντικής ομαδοποίησης των στελεχών του ιού ως προς την εθνικότητα σε αυτό το δίκτυο. Αναλυτικότερα, τα ευρήματα της ανάλυσης υποδεικνύουν ότι οι μεταδόσεις του ιού πραγματοποιούνται σε υψηλότερα ποσοστά μεταξύ των μεταναστών XEN που έχουν μολυνθεί με στελέχη υπότυπων A1 και CRF14_BG, σε σύγκριση με τα ποσοστά των μεταδόσεων μεταξύ των XEN με διαφορετική εθνικότητα (Ελλήνων και μη Ελλήνων). Ο CRF14_BG αποτελεί τον πιο συχνό υπότυπο τόσο στους Έλληνες όσο και στους μετανάστες XEN (Πίνακας 18), γεγονός το οποίο υποδηλώνει ότι αυτό το πρότυπο μετάδοσης του ιού επικρατεί στο σύνολο του πληθυσμού των XEN.

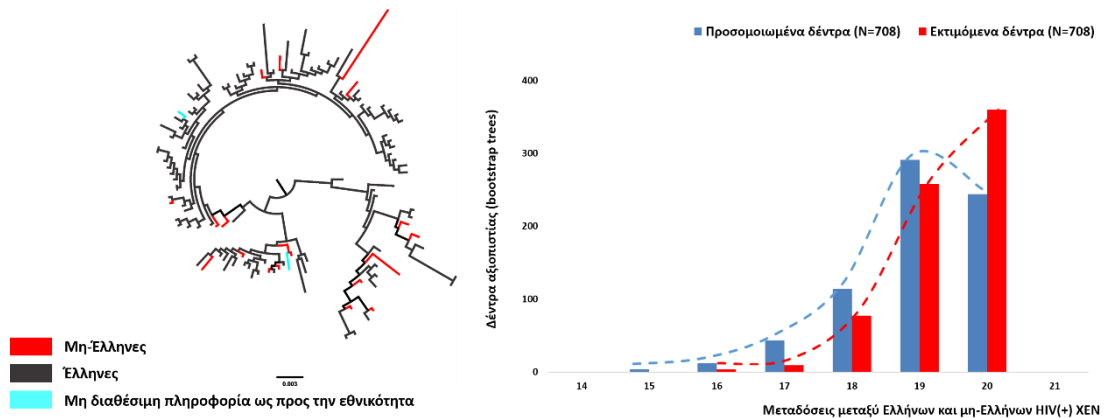
A



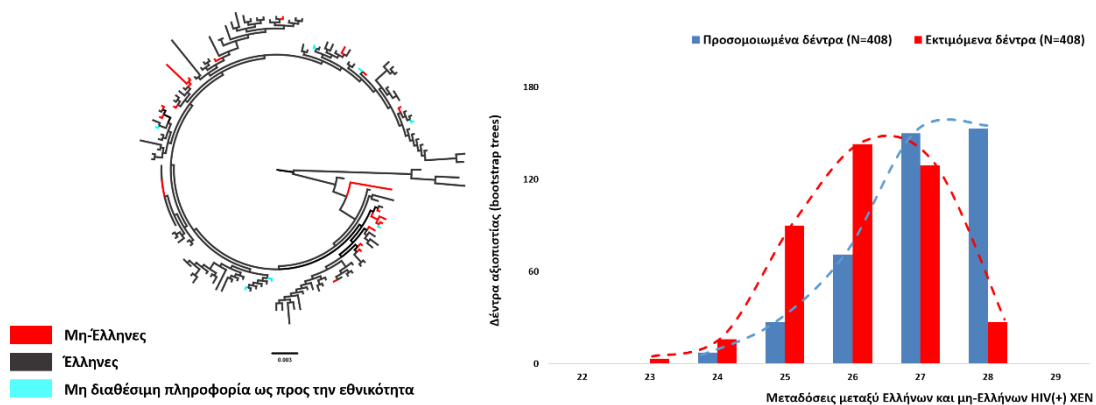
B



Γ



Δ



Εικόνα 42 Δένδρο μέγιστης πιθανοφάνειας αλληλουχιών HIV-1 που έχουν επισημανθεί με διαφορετικά χρώματα σύμφωνα με την εθνικότητα των PLHIV από τους οποίους απομονώθηκαν (αριστερά), και κατανομή των γεγονότων διασποράς του ιού τα οποία αντιστοιχούν στις μεταδόσεις μεταξύ των XEN με διαφορετική εθνικότητα (Έλληνες και μη Έλληνες), όπως προέκυψαν από τα εκτιμώμενα (κόκκινο χρώμα) και τα προσομοιωμένα (μπλε χρώμα) δένδρα (δεξιά), για τα τέσσερα κύρια τοπικά δίκτυα διασποράς του ιού σε XEN στην Αθήνα: (A) υπότυπου A1, (B) CRF14_BG, (Γ) υπότυπου B και (Δ) CRF35_AD.

9.3.3.2 Εκτίμηση πιθανής προέλευσης HIV-1 λοίμωξης μέσω γενετικών αποστάσεων

Για να επιβεβαιωθούν τα ευρήματα της φυλοεθνικής ανάλυσης, αναφορικά με την ομαδοποίηση των στελεχών των μεταναστών XEN, πραγματοποιήθηκε περαιτέρω ανάλυση. Στην επιβεβαιωτική ανάλυση εκτιμήθηκαν ζεύγη ατόμων από τους οποίους ο HIV-1 παρουσίαζε τη μικρότερη γενετική απόσταση, και, συνεπώς, τα άτομα αυτά είχαν μεγάλη πιθανότητα να έχει μεταδώσει τη λοίμωξη ο ένας στον άλλον. Στη συνέχεια, ελέγχθηκε η υπόθεση της ύπαρξης κοινής εθνικότητας. Η επιβεβαιωτική ανάλυση πραγματοποιήθηκε μόνο στα δίκτυα XEN για τα οποία βρέθηκε σημαντική ομαδοποίηση ως προς την εθνικότητα από την φυλοεθνική ανάλυση, δηλαδή, στα δίκτυα των υπότυπων A1 και CRF14_BG.

Η επιβεβαιωτική ανάλυση έδειξε ότι για 4 από τους 6 (66,6%) μετανάστες XEN του δικτύου του υπότυπου A1 ο πιο πιθανός κοντινός τους σύντροφος ήταν επίσης μετανάστης. Αντίστοιχα, για το δίκτυο του CRF14_BG βρέθηκε ότι το 75,2% (76 εκ των 101) των μεταναστών XEN είχε κοινή εθνικότητα με το άτομο του αντίστοιχου ζεύγους. Τα ευρήματα αυτά επιβεβαιώνουν τις εκτιμήσεις της φυλοεθνικής ανάλυσης ως προς την ομαδοποίηση των στελεχών των μεταναστών XEN σε υψηλότερα ποσοστά.

9.4 Συμπεράσματα

Τα ευρήματα της παρούσας ανάλυσης υποδεικνύουν ότι το μεγαλύτερο ποσοστό των μεταναστών XEN (94,3%) μολύνθηκε με HIV-1 μετά την άφιξή του στην Ελλάδα. Οι μεταδόσεις του ιού πραγματοποιήθηκαν στο μεγαλύτερο ποσοστό τους εντός των τεσσάρων κύριων τοπικών δικτύων διασποράς των XEN στην Αθήνα (CRF14_BG, CRF35_AD, B, A1), τα οποία δημιουργήθηκαν κατά την διάρκεια της επιδημικής έκρηξης του ιού το χρονικό διάστημα 2011-2012. Το γεγονός ότι τα

στελέχη αυτά βρέθηκαν εντός των δικτύων υποδεικνύει ότι εκτός των αρχικών στελεχών οι υπόλοιπες μεταδόσεις του ιού συνέβησαν σε τοπικό επίπεδο. Τα αρχικά στελέχη των δικτύων έχει βρεθεί από προηγούμενες μελέτες ότι προήλθαν από Ρουμανία (CRF14_BG), Αφγανιστάν/Ιράν (CRF35_AD) και Ελλάδα (υπότυποι A1 και B) (Paraskevis et al., 2013; Paraskevis et al., 2015).

Τα παραπάνω ευρήματα συμφωνούν με πρόσφατες εκτιμήσεις οι οποίες δείχνουν ότι οι PLHIV με διαφορετική εθνικότητα μολύνονται σε μεγάλο ποσοστό μετά την άφιξή τους στην Ευρώπη (Chaix et al., 2013; Abecasis et al., 2013). Οι εκτιμήσεις αυτές έρχονται σε αντίθεση με ευρήματα προηγούμενων μελετών, από διάφορες Ευρωπαϊκές χώρες, τα οποία έδειχναν ότι τα επίπεδα μόλυνσης των μεταναστών μετά την άφιξή τους στη χώρα υποδοχής ήταν μικρότερα (Fakoya et al., 2015), όμως οι μελέτες αυτές δεν αφορούσαν XEN με HIV-1 λοίμωξη. Επιπρόσθετα, μελέτες βασιζόμενες σε μοριακές μεθόδους έδειξαν ότι τα χαρακτηριστικά της επιδημίας (HIV-1 στέλεχος, φύλο, κατηγορία μετάδοσης) διέφεραν σημαντικά μεταξύ τοπικών και μη τοπικών πληθυσμών (Abecasis et al., 2013), υποδεικνύοντας ότι οι μεταδόσεις πραγματοποιήθηκαν στη χώρα υποδοχής των μεταναστών, αλλά αυτός ο τρόπος μετάδοσης του ιού δεν ήταν ο κυρίαρχος. Η εικόνα αυτή χαρακτηρίζει, κυρίως, τη Δυτική Ευρώπη, όπου τα μη B στελέχη έχουν εισαχθεί στο μεγαλύτερο ποσοστό τους από περιοχές με γενικευμένες HIV-1 επιδημίες (περιοχές με υψηλό επιπολασμό). Εξαιρέση αποτελούν η Ελλάδα και η Πορτογαλία, όπου τα στελέχη των υπότυπων A1 και G έχουν μεταδοθεί μέσω τοπικών δικτύων (Thomson et al., 2007).

Η εύρεση της πιθανής χώρας προέλευσης της HIV-1 λοίμωξης για κάθε άτομο που ζει με τον ιό αποτελεί ένα ιδιαίτερα πολύπλοκο ζήτημα, το οποίο, εκτός από τις παραδοσιακές επιδημιολογικές μεθόδους και τα συστήματα επιδημιολογικής επιτήρησης, χρειάζεται επιπλέον μεθόδους για να επιλυθεί. Με βάση τις οδηγίες του Ευρωπαϊκού Κέντρου Πρόληψης και Ελέγχου Νοσημάτων (ECDC), η εκτίμηση της προέλευσης της HIV-1 λοίμωξης στηρίζεται σε μοντέλα που βασίζονται στο ρυθμό πτώσης των CD4 κυττάρων (ECDC, 2015a). Στην παρούσα ανάλυση δείχθηκε ότι οι μοριακές αναλύσεις αποτελούν μια επιπλέον μέθοδο για την αξιόπιστη εκτίμηση της

προέλευσης της HIV-1 λοίμωξης και, επιπρόσθετα, παρέχουν πληροφορίες αναφορικά με τα χαρακτηριστικά της επιδημίας.

Χρησιμοποιώντας καινοτόμες μεθόδους βρέθηκε, επίσης, ότι η πρόσφατη επιδημία στους XEN στην Αθήνα αποτελεί μια ξεχωριστή περίπτωση, όπου οι μεταδόσεις του HIV-1 πραγματοποιούνται με μεγαλύτερη συχνότητα μεταξύ XEN διαφορετικών εθνικοτήτων (μεταναστών) σε τουλάχιστον δυο από τα τέσσερα δίκτυα, παρόλο που ο πληθυσμός αυτός αποτελεί μειονότητα. Το εύρημα αυτό υποδεικνύει, αφενός, το ενδεχόμενο εφαρμογής πρακτικών υψηλού κινδύνου μεταξύ των ατόμων αυτού του πληθυσμού, και, αφετέρου, ότι τα δίκτυα κινδύνου των μεταναστών XEN απαρτίζονται κατά κύριο λόγο από μετανάστες XEN. Βάσει των παραπάνω αναδεικνύεται η διαφορετικότητα των χαρακτηριστικών των επιδημιών που οφείλονται σε σεξουαλικές μεταδόσεις και των επιδημιών που προέκυψαν από πρακτικές ενδοφλέβιας χρήσης.

Συμπερασματικά, η παρούσα ανάλυση αναδεικνύει τη χρήση των μοριακών μεθόδων για την ανίχνευση της πιθανής γεωγραφικής προέλευσης της HIV-1 λοίμωξης, αλλά και την καλύτερη περιγραφή μιας επιδημίας μέσω εκτίμησης των επιμέρους χαρακτηριστικών της. Τα ευρήματα αυτά θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν προς όφελος της δημόσιας υγείας, και ειδικά στις επιδημίες που σχετίζονται με XEN, μέσω στοχευμένων προγραμμάτων πρόληψης σε ειδικούς πληθυσμούς όπως οι XEN και οι μετανάστες.

Πίνακας 15 Κριτήρια επιλογής των αλληλουχιών αναφοράς που χρησιμοποιήθηκαν για την εκτίμηση της πιθανής γεωγραφικής προέλευσης της HIV-1 λοίμωξης σε χρήστες ενδοφλέβιων ναρκωτικών με μη Ελληνική εθνικότητα οι αλληλουχίες των οποίων δεν εντοπίστηκαν εντός των τεσσάρων κύριων τοπικών δικτύων διασποράς του ιού σε χρήστες ενδοφλέβιων ναρκωτικών στην Αθήνα.

HIV-1 Υπότυπος /CRF	Αλληλουχίες αναφοράς				
	Όλες οι διαθέσιμες αλληλουχίες με παγκόσμια δειγματοληψία ¹	Τυχαία επιλεγμένες αλληλουχίες με παγκόσμια δειγματοληψία ¹	Όλες οι διαθέσιμες αλληλουχίες με δειγματοληψία από Νότια/Κεντρική Ελλάδα	Οι 100 ή 200 αλληλουχίες με την υψηλότερη γενετική ομοιότητα (HIV BLAST tool ²)	216 αλληλουχίες με παγκόσμια δειγματοληψία αντιπροσωπευτικές όλων των HIV-1 υπότυπων/CRFs
Υπότυπος					
A1	√		√		
B		√	√	√	
F	√		√		
CRFs					
CRF01_AE			√	√	
CRF03_AB			√	√	
CRF14_BG			√	√ ³	
URFs			√	√	√
Απροσδιόριστοι τύποι				√	√

¹ Los Alamos HIV-1 Sequences Database

² https://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/BASIC_BLAST/basic_blast.html

³ Βρέθηκαν διαθέσιμες 55 αλληλουχίες με παγκόσμια δειγματοληψία

Πίνακας 16 Κατανομή χρηστών ενδοφλέβιων ναρκωτικών με HIV-1 λοίμωξη και διαθέσιμη αλληλουχία το χρονικό διάστημα 2011-10/2014 στη Νότια/Κεντρική Ελλάδα, ως προς την εθνικότητα.

Χώρα/Γεωγραφική περιοχή προέλευσης	XEN ¹	
	Αριθμός	Ποσοστό (%)
Αμερική	2	0,2
Κεντρική Ασία	11	1,3
Κεντρική Ευρώπη	29	3,3
Ανατολική Ευρώπη	41	4,7
Ελλάδα	666	76,2
Βόρεια Αφρική/Μέση Ανατολή	46	5,3
Νότια Ασία	16	1,8
Νοτιοανατολική Ασία	15	1,7
Νότια & Νοτιοανατολική Ασία	14	1,6
Υποσαχάρια Αφρική	6	0,7
Δυτική Ευρώπη	4	0,5
Άγνωστη	24	2,7
Σύνολο	874	100

¹ XEN, Χρήστες Ενδοφλέβιων Ναρκωτικών

Πίνακας 17 Κατανομή HIV-1 υπότυπων και ανασυνδιασμένων τύπων σε χρήστες ενδοφλέβιων ναρκωτικών με διαθέσιμη αλληλουχία το χρονικό διάστημα 2011-10/2014 στη Νότια/Κεντρική Ελλάδα, ως προς την εθνικότητα.

HIV-1 Υπότυπος/CRF ¹	Εθνικότητα		Σύνολο
	Ελληνική (N, %)	Μη Ελληνική (N, %)	
XEN			
A1 (LTN ²)	47 (7,1)	6 (3,3)	53 (6,2)
B (LTN)	96 (14,3)	18 (9,8)	114 (13,4)
CRF14_BG (LTN)	328 (49,3)	101 (54,9)	429 (50,5)
CRF35_AD (LTN)	114 (17,1)	19 (10,3)	133 (15,7)
URFs ³ με στελέχη από LTNs	38 (5,7)	24 (13,0)	62 (7,3)
A1	11 (1,6)	5 (2,8)	16 (1,9)
B	13 (2,0)	1 (0,5)	14 (1,7)
F	0 (0,0)	1 (0,5)	1 (0,1)
CRF14_BG	1 (0,2)	1 (0,5)	2 (0,2)
CRF35_AD	1 (0,2)	0 (0,0)	1 (0,1)
CRFs & Ανασυνδυασμένοι τύποι	4 (0,5)	2 (1,1)	6 (0,7)
URFs	0 (0,0)	1 (0,5)	1 (0,1)
Απροσδιόριστοι τύποι	13 (2,0)	5 (2,8)	18 (2,1)
Σύνολο	666 (100)	184 (100)	850 (100)

¹ CRF, *Circulating Recombinant Form*

² LTN, *Local Transmission Network*

³ URFs, *Unique Recombinant Forms*

Πίνακας 18 Κατανομή πιθανής γεωγραφικής προέλευσης της HIV-1 λοίμωξης σε χρήστες ενδοφλέβιων ναρκωτικών με μη Ελληνική εθνικότητα και διαθέσιμη αλληλουχία το χρονικό διάστημα 2011-10/2014 στη Νότια/Κεντρική Ελλάδα.

Γεωγραφική προέλευση	HIV-1 Υπότυπος/CRF ¹	Αριθμός (%)	
Ελλάδα			
	A1 (LTN ²)	6 (3,3)	
	B (LTN)	18 (9,8)	
	CRF14_BG (LTN)	100 (54,4)	
	CRF35_AD (LTN)	18 (9,9)	
	URFs ³ με στελέχη από LTNs	24 (13,1)	
	A1 (non-LTN)	5 (2,7)	
	B (non-LTN)	1 (0,5)	
	CRF01_AE	1 (0,5)	
	Υποσύνολο	173 (94,3)	
Εκτός Ελλάδας			
	Πιθανή προέλευση		
	Ελλάδα/Ισραήλ	CRF03_AB	1 (0,5)
	Ρουμανία	CRF14_BG (non-LTN)	1 (0,5)
	Ρουμανία	F	1 (0,5)
	Τουρκία/Βουλγαρία	URF	1 (0,5)
	Τουρκία	Απροσδιόριστοι τύποι	4 (2,4)
	Απροσδιόριστη	CRF14_BG (LTN)	1 (0,5)
	Απροσδιόριστη	CRF35_AD (LTN)	1 (0,5)
	Απροσδιόριστη	Απροσδιόριστοι τύποι	1 (0,5)
	Υποσύνολο	11 (5,7)	
Σύνολο		184 (100)	

¹ CRF, *Circulating Recombinant Form*

² LTN, *Local Transmission Network*

³ URFs, *Unique Recombinant Forms*

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 10

**Μοριακή ανάλυση HIV-1 σε χρήστες ενδοφλέβιων
ναρκωτικών στα πλαίσια προγράμματος
παρέμβασης σε κοινωνικά δίκτυα στην Αθήνα
(Transmission Reduction Intervention Project – TRIP)**

Δημοσίευση:

Kostaki EG, Nikolopoulos GK, Pavlitina E, Williams L, Magiorkinis G, Schneider J, Skaathun B, Morgan E, Psychogiou M, Daikos GL, Sypsa V, Smyrnov P, Korobchuk A, Malliori M, Hatzakis A, Friedman SR, Paraskevis D. Molecular analysis of HIV-1 infected individuals in a network-based intervention (TRIP): Phylogenetics identify HIV-1 infected individuals with social links. J Infect Dis. 2018 Apr 24. doi: 10.1093/infdis/jiy239

10.1 Εισαγωγή-Σκοπός

Στη μείωση του αριθμού των νέων HIV-1 διαγνώσεων στους XEN στην Αθήνα συνέβαλλαν σημαντικά δυο προγράμματα παρέμβασης που εφαρμόστηκαν το διάστημα μεταξύ 2012 και 2015, και συγκεκριμένα, το πρόγραμμα «ΑΡΙΣΤΟΤΕΛΗΣ» (Hatzakis et al., 2015; Sypsa et al., 2017) και το πρόγραμμα «TRIP» (Transmission Reduction Intervention Project – TRIP).

Το πρόγραμμα «TRIP» χρηματοδοτήθηκε από τα Εθνικά Ινστιτούτα Υγείας (National Institutes of Health – NIH) των Η.Π.Α., πραγματοποιήθηκε το χρονικό διάστημα 06/2013-07/2015 και ήταν μία παρέμβαση που είχε ως στόχο την αναζήτηση, την ανεύρεση και τη σύνδεση με τις θεραπευτικές δομές ατόμων που είχαν πρόσφατα μολυνθεί από τον HIV-1 και, επομένως, ήταν, μάλλον, πιο μολυσματικά (Nikolopoulos et al., 2016b; Friedman et al., 2014). Για την επίτευξη του σκοπού του συγκεκριμένου προγράμματος αξιοποιήθηκαν τα κοινωνικά δίκτυα των συμμετεχόντων XEN, δηλαδή, οι ερωτώμενοι ανέφεραν άτομα με τα οποία είχαν σεξουαλικές επαφές ή/και επαφές ενέσιμης χρήσης, ώστε να συμμετάσχουν και τα άτομα αυτά στο πρόγραμμα, να εξεταστούν και να συνδεθούν με θεραπευτικές δομές, εάν χρειαζόταν. Για τη διάγνωση των πρόσφατων λοιμώξεων μελετήθηκε το ιστορικό προηγούμενων εργαστηριακών ελέγχων και χρησιμοποιήθηκε ένα ειδικό εργαστηριακό τεστ (Limiting Antigen Avidity assay) (Nikolopoulos et al., 2016b). Τόσο στην Αθήνα όσο και στις άλλες δύο πόλεις όπου υλοποιήθηκε το «TRIP» (Σικάγο, Η.Π.Α., Οδησός, Ουκρανία) φάνηκε ότι η συγκεκριμένη παρέμβαση ήταν εξαιρετικά αποτελεσματική και ασφαλής στην ανεύρεση πρόσφατων λοιμώξεων ή αδιάγνωστων λοιμώξεων από τον HIV-1 (Nikolopoulos et al., 2016b; Morgan et al., 2018; Smyrnov et al., 2018).

Τα δεδομένα κοινωνικής δικτύωσης συλλέγονται, κυρίως, μέσω συνεντεύξεων με ερωτηματολόγιο και παρατήρησης των χώρων συνάθροισης των συμμετεχόντων από το προσωπικό των προγραμμάτων. Στις συνεντεύξεις οι συμμετέχοντες καλούνται να δηλώσουν τα άτομα του κοινωνικού τους δικτύου, και τα δεδομένα αυτά

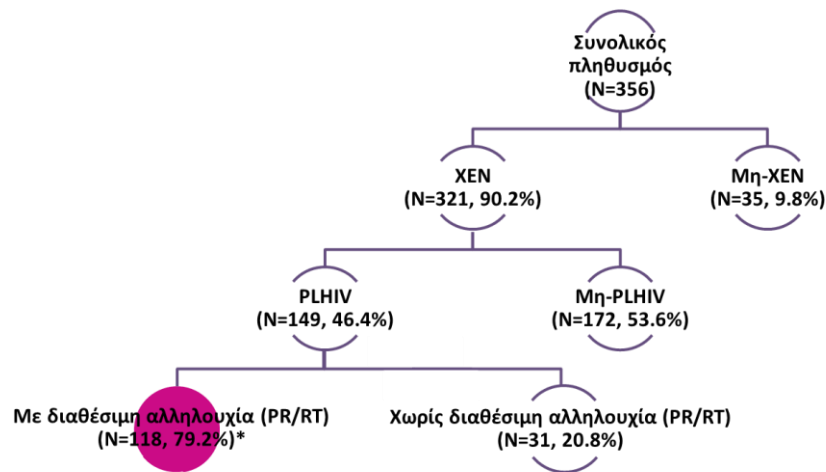
χρησιμοποιούνται για να διεξαχθούν συμπεράσματα για τα μονοπάτια διασποράς του HIV-1. Για τη μελέτη του τρόπου μετάδοσης του ιού έχουν χρησιμοποιηθεί και μέθοδοι μοριακής επιδημιολογίας (Friedman et al., 2003; Paraskevis et al. 2016; Grabowski et al. 2014; Brenner et al., 2013; Wertheim et al., 2017; Friedman et al., 1999). Τόσο οι μέθοδοι οι οποίες βασίζονται στη μελέτη των κοινωνικών δικτύων όσο και οι μοριακές παρουσιάζουν μειονεκτήματα. Για παράδειγμα, οι μελέτες οι οποίες εστιάζουν στην περιγραφή του κοινωνικού δικτύου των συμμετεχόντων αποτυγχάνουν στο να περιγράψουν ολόκληρο το κοινωνικό τους δίκτυο, λόγω του ότι είναι σχεδόν αδύνατο να εντοπιστούν όλα τα μέλη που το απαρτίζουν. Επιπρόσθετα, παρόλο που μέσω αυτών των μελετών συλλέγονται δεδομένα που αφορούν τις συμπεριφορές κινδύνου των συμμετεχόντων, στις περισσότερες περιπτώσεις δεν είναι ξεκάθαρο το πώς πραγματοποιήθηκε η μετάδοση του ιού μεταξύ τους (Vasylyeva et al., 2016). Αντίθετα, οι μοριακές μέθοδοι εκτιμούν μια προσέγγιση των μονοπατιών μετάδοσης του ιού μεταξύ των PLHIV (Delva et al., 2016), όμως, δεν μπορούν να δώσουν πληροφορίες για τα άτομα που ανήκουν στο κοινωνικό δίκτυο των PLHIV αλλά δεν έχουν μολυνθεί με τον ιό, ή την κατεύθυνση της μετάδοσης (δηλαδή ποιος μετέδωσε τον ιό σε ποιον) (Vasylyeva et al., 2016). Δεδομένων όλων αυτών, ο σκοπός της παρούσας ανάλυσης ήταν, συνδυάζοντας μεθόδους μοριακής επιδημιολογίας με μεθόδους που βασίζονται στη μελέτη των κοινωνικών δικτύων, να μελετηθούν τα κοινωνικά δίκτυα και ο τρόπος διασποράς του HIV-1 στους XEN που συμμετείχαν στο πρόγραμμα «TRIP», και, επίσης, να διερευνηθεί πιθανή συσχέτιση τρόπου μετάδοσης και κοινωνικής δικτύωσης.

10.2 Υλικό-Μέθοδοι

Το «TRIP» συνέλεξε δεδομένα από 356 άτομα, τα οποία ήταν άνω των 17 ετών, μπορούσαν να απαντήσουν στα ερωτηματολόγια και ανήκαν σε μία από τις παρακάτω τέσσερις κατηγορίες: i) άτομα με πρόσφατη HIV-1 λοίμωξη (εντός των τελευταίων έξι μηνών), ii) άτομα με χρόνια HIV-1 λοίμωξη, iii) άτομα που δεν είχαν μολυνθεί από τον HIV-1 και iv) άτομα του κοινωνικού δικτύου των ατόμων με HIV-1 λοίμωξη. Στο «TRIP», λόγω του σχεδιασμού του, ο επιπολασμός της HIV-1 λοίμωξης ανήλθε

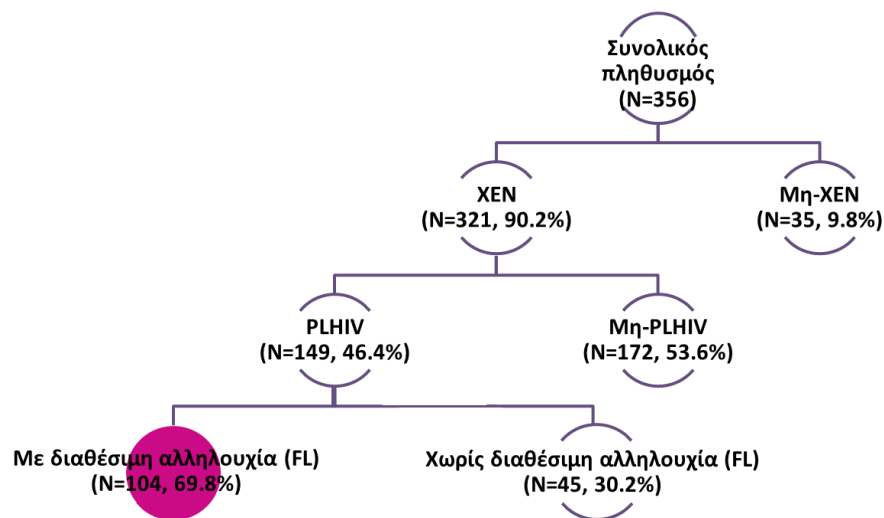
περίπου στο 40%. Συγκεκριμένα, εκ των 356 συμμετεχόντων του προγράμματος το 90,2% ήταν XEN. Το 46,4% (N = 149) των XEN συμμετεχόντων ήταν PLHIV.

Η μελέτη των κοινωνικών δικτύων και η διερεύνηση πιθανής συσχέτισης μεταξύ τρόπου μετάδοσης και κοινωνικής δικτύωσης πραγματοποιήθηκε σε όλες τις νουκλεοτιδικές αλληλουχίες HIV-1 των XEN συμμετεχόντων του προγράμματος «TRIP», οι οποίες ήταν διαθέσιμες στο γονίδιο *pol* (PR/RT) και είχαν δημιουργηθεί με τη μέθοδο αλληλούχισης Sanger (N = 119) (Εικόνα 43). Συγκεκριμένα, οι 119 αλληλουχίες που αναλύθηκαν είχαν απομονωθεί από 118 XEN, εκ των οποίων για 117 XEN χρησιμοποιήθηκε το προγενέστερο χρονικά δείγμα και για έναν XEN χρησιμοποιήθηκαν, κατ' εξαίρεση, 2 δείγματα, τα οποία είχαν συλλεγεί σε διαφορετικές χρονικές στιγμές και εντοπίστηκαν σε διαφορετικά δίκτυα μετάδοσης (A1 και CRF14_BG), υποδεικνύοντας την ύπαρξη επιλοίμωξης (superinfection).



Εικόνα 43 Ο συνολικός πληθυσμός του προγράμματος «TRIP» αντιστοιχούσε σε 356 άτομα εκ των οποίων το 90,2% ήταν XEN, και εκ των XEN το 46,4% ήταν PLHIV. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε σε όλες τις διαθέσιμες νουκλεοτιδικές αλληλουχίες HIV-1 των XEN συμμετεχόντων του προγράμματος (N = 119), οι οποίες είχαν απομονωθεί από 118 XEN και ήταν διαθέσιμες στο γονίδιο *pol* (PR/RT). Ο υπό μελέτη πληθυσμός έχει επισημανθεί με σκούρο ροζ χρώμα.

Αυξάνοντας το μήκος της αλληλουχίας του γενετικού υλικού αυξάνεται και η διαθέσιμη πληροφορία (γενετική ετερογένεια), και, ως εκ τούτου, δίνεται η δυνατότητα να εντοπιστούν τα δίκτυα μετάδοσης του ιού με μεγαλύτερη διακριτική ικανότητα. Για τον λόγο αυτό, η προηγούμενη ανάλυση επαναλήφθηκε σε όλες τις διαθέσιμες νουκλεοτιδικές αλληλουχίες HIV-1 πλήρους γονιδιώματος (full-length) των XEN συμμετεχόντων του προγράμματος «TRIP», αναμένοντας ότι το ποσοστό των ατόμων που μολύνθηκε σε κοινά δίκτυα μετάδοσης και είχε διαπιστωμένη κοινή κοινωνική δικτύωση θα αυξανόταν σημαντικά. Εκ των 149 XEN συμμετεχόντων του προγράμματος «TRIP» με HIV-1 λοίμωξη δημιουργήθηκαν 104 αλληλουχίες πλήρους γονιδιώματος, χρησιμοποιώντας μεθόδους αλληλούχισης νέας γενεάς (Next-Generation Sequencing – NGS) που αναπτύχθηκαν στα πλαίσια του προγράμματος «ICONIC» (InfeCtion respONse through vIrus genomiCs – ICONIC) (Yebara et al., 2016; Yebara et al., 2018) (Εικόνα 44).



Εικόνα 44 Ο συνολικός πληθυσμός του προγράμματος «TRIP» αντιστοιχούσε σε 356 άτομα εκ των οποίων το 90,2% ήταν XEN, και εκ των XEN το 46,4% ήταν PLHIV. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε σε όλες τις διαθέσιμες νουκλεοτιδικές αλληλουχίες HIV-1 πλήρους γονιδιώματος (full-length – FL) των XEN συμμετεχόντων του προγράμματος (N = 104). Ο υπό μελέτη πληθυσμός έχει επισημανθεί με σκούρο ροζ χρώμα.

10.2.1 Μελέτη κοινωνικών δικτύων συμμετεχόντων του «TRIP»

Τα δεδομένα κοινωνικής δικτύωσης προσδιορίστηκαν μέσω συνεντεύξεων με ερωτηματολόγιο και παρατήρησης των χώρων συνάθροισης των συμμετεχόντων από το προσωπικό του προγράμματος. Στις συνεντεύξεις οι συμμετέχοντες καλούνταν να δηλώσουν τα άτομα του κοινωνικού τους δικτύου (άμεσες ή έμμεσες κοινωνικές επαφές). Μια κοινωνική σύνδεση πρώτου βαθμού αφορούσε ένα άτομο το οποίο είχε σεξουαλικές επαφές ή/και επαφές ενέσιμης χρήσης με κάποιον συμμετέχοντα του προγράμματος ή ένα άτομο το οποίο είχε σεξουαλικές επαφές ή/και επαφές ενέσιμης χρήσης παρουσία κάποιου συμμετέχοντα του προγράμματος. Αντίστοιχα, μια κοινωνική σύνδεση δευτέρου βαθμού αφορούσε άτομα που συνδέονταν κοινωνικά με άτομα με κοινωνική σύνδεση πρώτου βαθμού. Στην παρούσα ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν μόνο οι άμεσες κοινωνικές επαφές (πρώτου και δευτέρου βαθμού). Η αναπαράσταση των κοινωνικών δικτύων και ο υπολογισμός του δείκτη «Degree Centrality» πραγματοποιήθηκε στο πρόγραμμα SocNetV v1.9 (<http://socnetv.org>). Ο συγκεκριμένος δείκτης ποσοτικοποιεί τον αριθμό των συνδέσεων του κάθε κόμβου με τους άλλους κόμβους του δικτύου, όπου ο κάθε κόμβος αντιπροσωπεύει και ένα συμμετέχοντα του προγράμματος.

10.2.2 Εκτίμηση δικτύων μετάδοσης XEN συμμετεχόντων του «TRIP»

Αναλύθηκαν φυλογενετικά οι 119 αλληλουχίες των XEN συμμετεχόντων του προγράμματος μαζί με αλληλουχίες XEN που είχαν συλλεγεί στην Αθήνα κατά τη διάρκεια της επιδημίας το χρονικό διάστημα μεταξύ 2011 και 2015 (αλληλουχίες αναφοράς). Οι φυλογενετικές τοπολογίες (δένδρα) εκτιμήθηκαν με τρεις διαφορετικές μεθόδους [μέθοδος της μέγιστης πιθανοφάνειας (ML) με τα προγράμματα FastTree v2.1 (Price et al., 2010) και RAxML v8.2.10 (Stamatakis, 2014), μέθοδος αποστάσεων (Neighbor-Joining – NJ) με το πρόγραμμα PAUP*4.0 (Wilgenbusch et al., 2003) και μέθοδος Μπεϋζιανής συμπερασματολογίας με το πρόγραμμα MrBayes v3.2.2 (Ronquist et al., 2012)]. Ως δίκτυα μετάδοσης ορίστηκαν οι μονοφυλετικές ομάδες οι οποίες απαρτιζόνταν τουλάχιστον από 2 αλληλουχίες, είχαν SH (ML μέθοδος) και

bootstrap τιμή αξιοπιστίας (NJ μέθοδος) μεγαλύτερη από 0,90 και 70% αντίστοιχα, και εκ των υστέρων πιθανότητα μεγαλύτερη από 0,80 (Μπεϋζιανή μέθοδος).

10.2.3 Εκτίμηση ποσοστού XEN σε δίκτυα μετάδοσης με κοινή κοινωνική δικτύωση

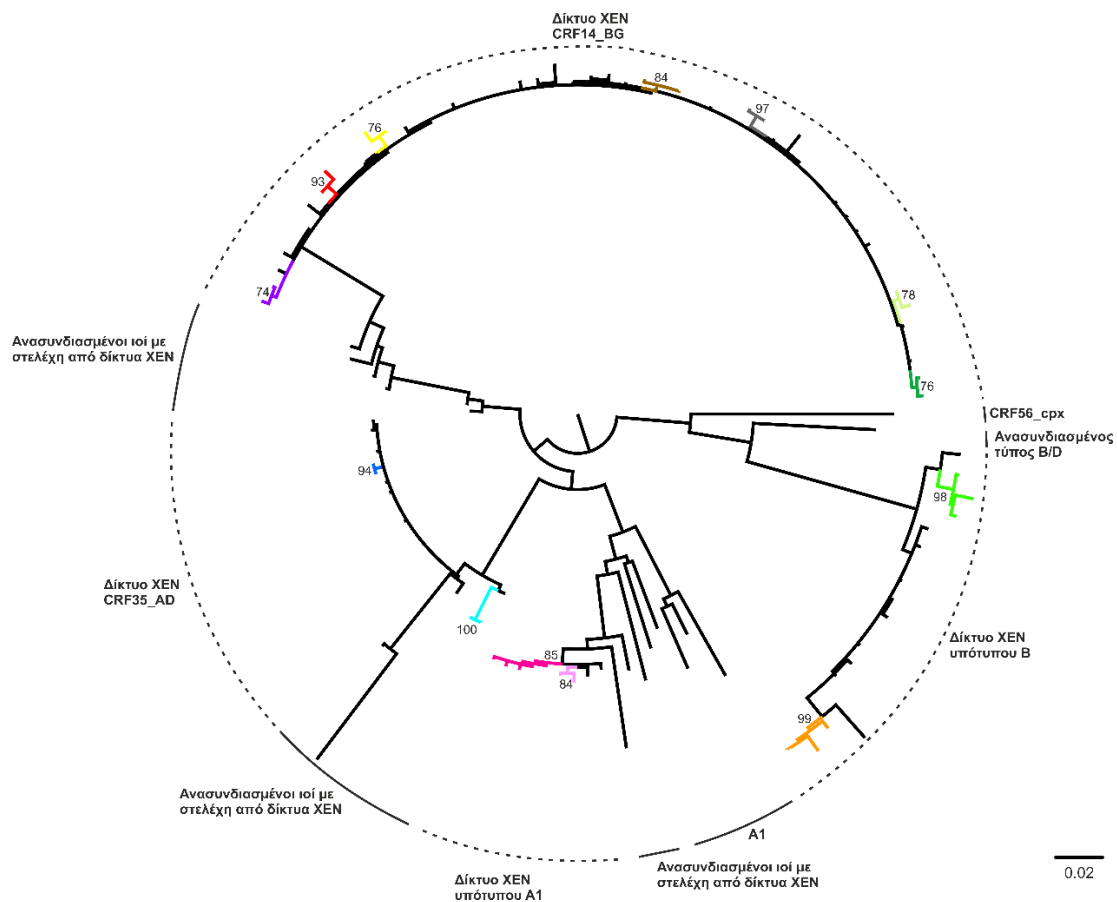
Χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα Mesquite v3.01 (Maddison et al., 2018) εφαρμόστηκε τυχαία ανακατανομή των δεδομένων στα άκρα του ML δένδρου, το οποίο εκτιμήθηκε από το πρόγραμμα RAxML, και κατασκευάστηκαν 100 προσομοιωμένα φυλογενετικά δένδρα ώστε να αναπαρασταθεί ένας πληθυσμός όπου το κάθε άτομο θα είχε περίπου την ίδια πιθανότητα να μεταδώσει τον ιό σε οποιαδήποτε άλλο άτομο του πληθυσμού (panmixis hypothesis). Για κάθε προσομοιωμένο φυλογενετικό δένδρο εκτιμήθηκε το ποσοστό των PLHIV που βρέθηκε σε δίκτυα μετάδοσης και είχε διαπιστωμένη κοινή κοινωνική δικτύωση πρώτου ή δεύτερου βαθμού με τουλάχιστον άλλο ένα μέλος του δικτύου του, και ελέγχθηκε αν το εκτιμώμενο ποσοστό ήταν σημαντικά μεγαλύτερο από την κατανομή των ποσοστών που αναμένονταν να ισχύει κατά τύχη.

10.3 Αποτελέσματα

10.3.1 Δίκτυα μετάδοσης XEN (μέθοδος αλληλούχισης Sanger)

Βρέθηκαν τρεις κατηγορίες δικτύων μετάδοσης με: i) στελέχη που είχαν εντοπιστεί σε τοπικά δίκτυα XEN και αφορούσαν την HIV-1 επιδημία στην Αθήνα (CRF14_BG, CRF35_AD, A1, B) (N = 97, 81,5%), ii) ανασυνδυασμένους ιούς από τα δίκτυα των XEN (N = 13, 11,0%) και iii) στελέχη που δε σχετίζονταν με μεταδόσεις σε δίκτυα XEN (A1, CRF56_cpx, ανασυνδυασμένος τύπος B/D) (N = 9, 7,5%) (Πίνακας 19, σελ. 218). Το μεγαλύτερο ποσοστό των αλληλουχιών αφορούσε την πρώτη κατηγορία,

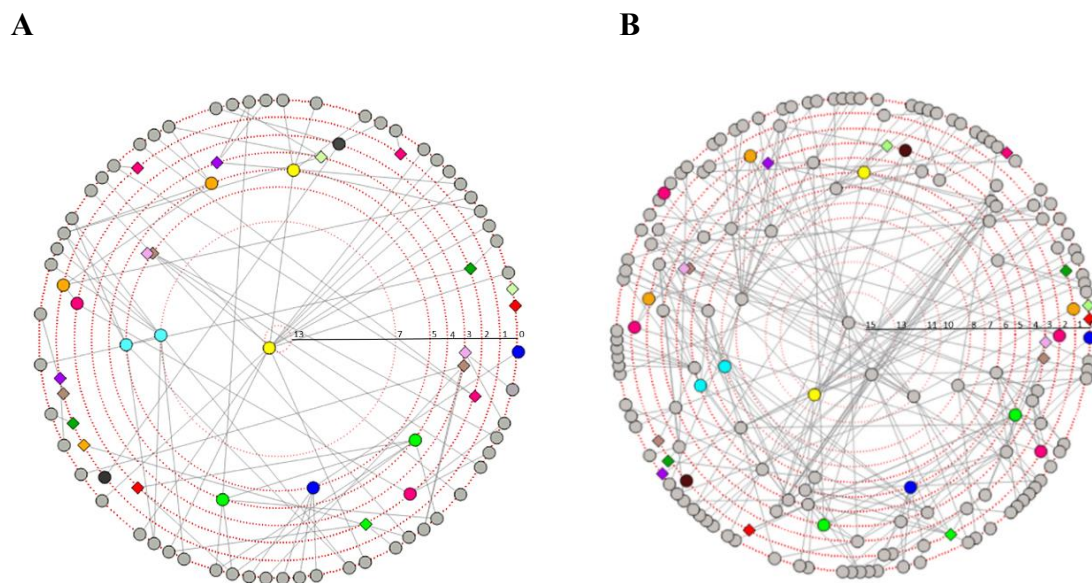
δηλαδή, στελέχη που εντοπίστηκαν σε τοπικά δίκτυα XEN στην Αθήνα. Η φυλογενετική ανάλυση που πραγματοποιήθηκε στο σύνολο των 119 αλληλουχιών έδειξε την ύπαρξη 13 μονοφυλετικών ομάδων (δίκτυα μετάδοσης) (Εικόνα 45, Πίνακας 19). Τα δίκτυα μετάδοσης είχαν εύρος από 2 έως 5 αλληλουχίες και στο σύνολό τους αποτελούνταν από 32 αλληλουχίες, οι οποίες αντιστοιχούσαν στο 27% του συνόλου των αλληλουχιών που αναλύθηκαν (Εικόνα 45, Πίνακας 19).



Εικόνα 45 Φυλογενετική τοπολογία (φυλογενετικό δένδρο) 119 νουκλεοτιδικών αλληλουχιών HIV-1 που απομονώθηκαν από XEN συμμετέχοντες του προγράμματος «TRIP». Το φυλογενετικό δένδρο εκτιμήθηκε με τη μέθοδο της μέγιστης πιθανοφάνειας στο πρόγραμμα RAxML v8.0.20. Τα ονόματα των υπότυπων και των ανασυνδυασμένων τύπων (Circulating Recombinant Forms – CRFs) έχουν επισημανθεί με συνεχείς και διακεκομμένες γραμμές περιμετρικά του δένδρου. Στην τοπολογία έχουν επισημανθεί με διαφορετικά χρώματα οι φυλογενετικές ομάδες (δίκτυα μετάδοσης) για τις οποίες βρέθηκαν υψηλά ποσοστά αξιοπιστίας από όλες τις μεθόδους. Οι αριθμοί στους κόμβους υποδηλώνουν τις bootstrap τιμές αξιοπιστίας.

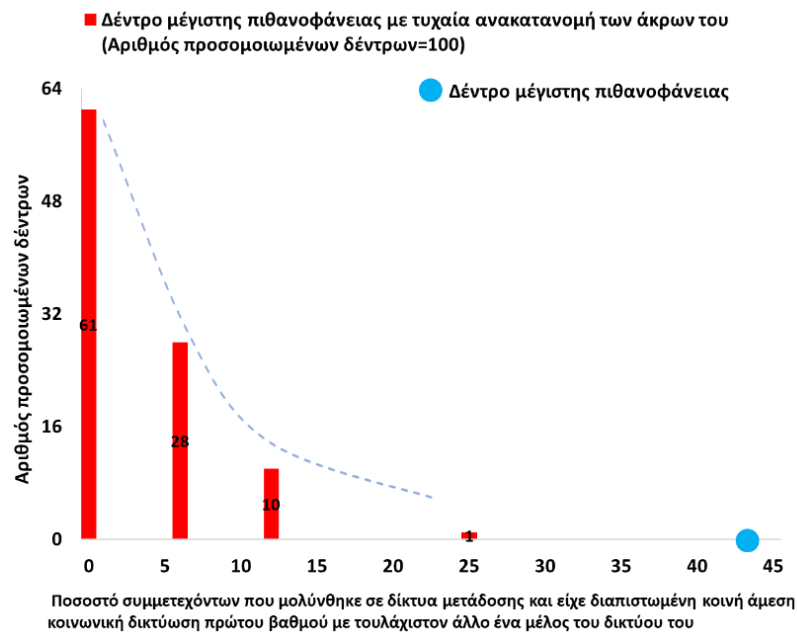
10.3.2 Συσχέτιση τρόπου μετάδοσης και κοινωνικής δικτύωσης XEN (μέθοδος αλληλούχισης Sanger)

Η διερεύνηση πιθανής συσχέτισης μεταξύ τρόπου μετάδοσης και κοινωνικής δικτύωσης έδειξε ότι, μελετώντας την άμεση κοινωνική δικτύωση πρώτου βαθμού, τα 7 (7/13, 53,9%) δίκτυα μετάδοσης αποτελούνταν συνολικά από 14 (14/32, 43,8%) PLHIV που συνδέονταν κοινωνικά με τουλάχιστον άλλο ένα άτομο με HIV-1 λοίμωξη του δικτύου τους (Εικόνα 46A). Το ποσοστό αυτό (43,8%) αναδείχτηκε σημαντικά μεγαλύτερο από εκείνο που αναμενόταν να ισχύει κατά τύχη ($p < 0,001$) (Εικόνα 47). Επίσης, μελετώντας την άμεση κοινωνική δικτύωση δευτέρου βαθμού, βρέθηκε ότι το ποσοστό των αλληλουχιών που εντοπίστηκε σε δίκτυα μετάδοσης με διαπιστωμένη κοινή κοινωνική δικτύωση αυξήθηκε σε 53,1% (17/32) (Εικόνα 46B).



Εικόνα 46 Κοινωνικά δίκτυα 32 XEN συμμετεχόντων του προγράμματος «TRIP» με HIV-1 λοίμωξη, οι οποίοι βρέθηκαν σε δίκτυα μετάδοσης (φυλογενετικές ομάδες): (A) άμεσης κοινωνικής δικτύωσης πρώτου βαθμού και (B) άμεσης κοινωνικής δικτύωσης πρώτου και δευτέρου βαθμού. Η αναπαράσταση των κοινωνικών δικτύων πραγματοποιήθηκε στο πρόγραμμα Social Network Visualizer v1.9 χρησιμοποιώντας τη μέθοδο «Degree Centrality», η οποία τοποθετεί τους κόμβους (συμμετέχοντες) από το κέντρο προς την περιφέρεια του κύκλου ανάλογα με τον αριθμό των κοινωνικών επαφών (συνδέσεων) των συμμετεχόντων.

Οι διακεκομμένοι κόκκινοι κύκλοι υποδεικνύουν τον αριθμό των συνδέσεων του κάθε κόμβου με τους υπόλοιπους κόμβους του δικτύου. Όσο μεγαλύτερος ο αριθμός των κοινωνικών επαφών ενός συμμετέχοντα τόσο πλησιέστερα τοποθετείται ο κόμβος που τον αναπαριστά στο κέντρο του κύκλου. Οι κόμβοι έχουν επισημανθεί με διαφορετικά χρώματα με βάση το δίκτυο μετάδοσης στο οποίο μολύνθηκε ο συμμετέχοντας τον οποίο αναπαριστούν. Οι κόμβοι σε σχήμα ρόμβου αναπαριστούν συμμετέχοντες οι οποίοι δεν έχουν διαπιστωμένη κοινή κοινωνική δικτύωση με κανένα άλλο μέλος του δικτύου τους.

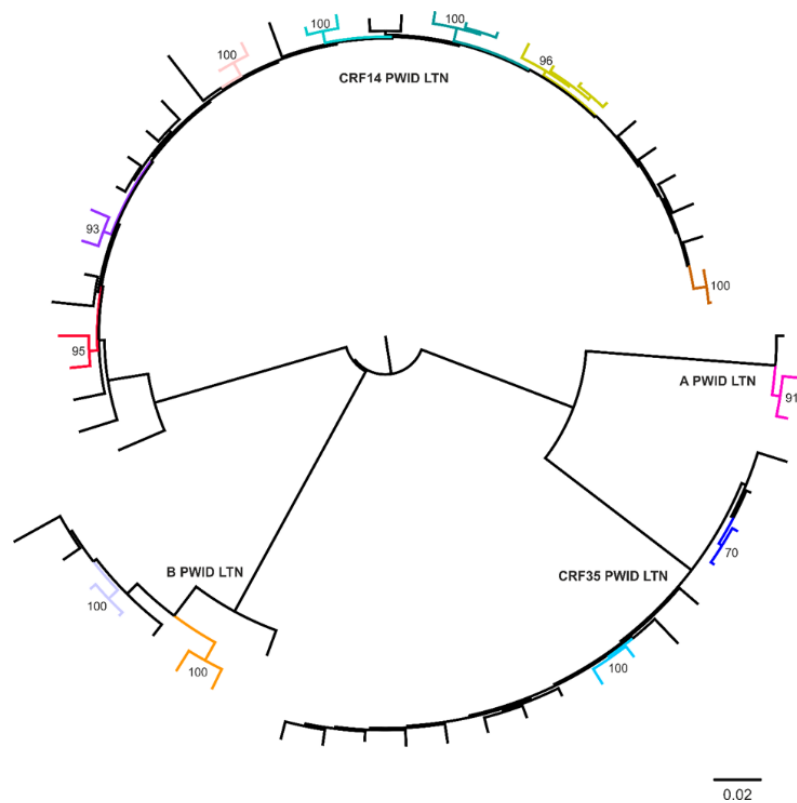


Εικόνα 47 Κατανομή του ποσοστού των ΧΕΝ συμμετεχόντων του προγράμματος «TRIP» με HIV-1 λοίμωξη που μολύνθηκε σε δίκτυα μετάδοσης και είχε διαπιστωμένη κοινή άμεση κοινωνική δικτύωση πρώτου βαθμού με τουλάχιστον άλλο ένα μέλος του δικτύου του. Η κατανομή εκτιμήθηκε με τυχαία ανακατανομή των δεδομένων στα άκρα του δένδρου μέγιστης πιθανοφάνειας ($N = 100$ προσομοιωμένα φυλογενετικά δένδρα) (πανμικτική υπόθεση μετάδοσης – *panmixis hypothesis*). Ο μπλε κύκλος υποδηλώνει το ποσοστό των συμμετεχόντων που μολύνθηκε σε δίκτυα μετάδοσης με διαπιστωμένη κοινή άμεση κοινωνική δικτύωση πρώτου βαθμού με τουλάχιστον άλλο ένα μέλος του δικτύου τους, το οποίο εκτιμήθηκε από τα πρωτογενή δεδομένα (43,8%).

10.3.3 Δίκτυα μετάδοσης XEN (μέθοδος αλληλούχισης NGS)

Όλες οι αλληλουχίες (N = 104) βρέθηκε ότι ανήκουν σε τρεις κατηγορίες δικτύων μετάδοσης με: i) στελέχη που είχαν εντοπιστεί σε τοπικά δίκτυα XEN (CRF14_BG/B/CRF14_BG, CRF35_AD/A/CRF35_AD, A1, B) και αφορούσαν την επιδημία του HIV-1 στην Αθήνα (N = 63, 60,6%), ii) ανασυνδυασμένους ιούς από τα δίκτυα των XEN (N = 36, 34,6%) και iii) στελέχη που δε σχετίζονταν με μεταδόσεις σε δίκτυα XEN (N = 5, 4,8%) (Πίνακας 20, σελ. 219). Το μεγαλύτερο ποσοστό των αλληλουχιών της μελέτης αφορούσε την πρώτη κατηγορία, δηλαδή στελέχη που εντοπίστηκαν σε τοπικά δίκτυα XEN στην Αθήνα. Οι HIV-1 αλληλουχίες που εντοπίστηκαν σε τοπικά δίκτυα XEN στην Αθήνα και είχαν χαρακτηριστεί, αρχικά, ως ανασυνδυασμένοι τύποι CRF35_AD και CRF14_BG στο γονίδιο *pol*, βρέθηκε ότι αποτελούν μοναδικές ανασυνδυασμένες μορφές με ταυτόσημο πρότυπο (CRF35_AD/A/CRF35_AD και CRF14_BG/B/CRF14_BG) στο πλήρες γονιδίωμα.

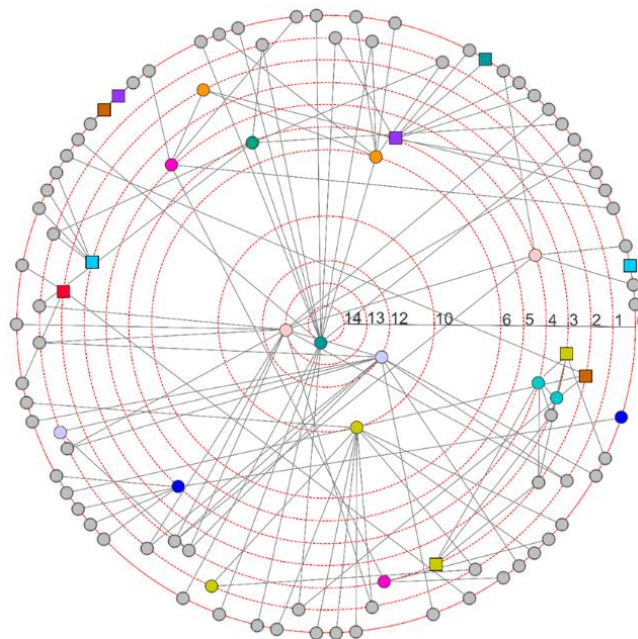
Οι ανασυνδυασμένοι ιοί από τα δίκτυα των XEN, τα στελέχη που δε σχετίζονταν με μεταδόσεις σε δίκτυα XEN και μία αλληλουχία που είχε εντοπιστεί σε τοπικό δίκτυο XEN αλλά είχε περιορισμένο μήκος (<4.000 νουκλεοτιδικές βάσεις), εξαιρέθηκαν από την ανάλυση. Η φυλογενετική ανάλυση των 62 αλληλουχιών που εντοπίστηκαν σε τοπικά δίκτυα XEN (CRF14_BG/B/CRF14_BG, CRF35_AD/A/CRF35_AD, A1, B) έδειξε την ύπαρξη 12 μονοφυλετικών ομάδων (δίκτυα μετάδοσης) με εύρος από 2 έως 4 αλληλουχίες, αποτελούμενων συνολικά από 27 αλληλουχίες (Εικόνα 48, Πίνακας 20). Τα δίκτυα μετάδοσης που βρέθηκαν αναλύοντας αλληλουχίες που δημιουργήθηκαν με τη μέθοδο αλληλούχισης Sanger επιβεβαιώθηκαν από την ανάλυση των αλληλουχιών πλήρους γονιδιώματος.



Εικόνα 48 Φυλογενετική τοπολογία (φυλογενετικό δένδρο) 62 νουκλεοτιδικών αλληλουχιών HIV-1 πλήρους γονιδιώματος που απομονώθηκαν από XEN συμμετέχοντες του προγράμματος «TRIP». Το φυλογενετικό δένδρο εκτιμήθηκε με τη μέθοδο της μέγιστης πιθανοφάνειας στο πρόγραμμα RAxML v8.0.20. Στην τοπολογία έχουν επισημανθεί με διαφορετικά χρώματα οι φυλογενετικές ομάδες (δίκτυα μετάδοσης) για τις οποίες βρέθηκαν υψηλά ποσοστά αξιοπιστίας από όλες τις μεθόδους. Οι αριθμοί στους κόμβους υποδηλώνουν τις bootstrap τιμές αξιοπιστίας.

10.3.4 Συσχέτιση τρόπου μετάδοσης και κοινωνικής δικτύωσης XEN (μέθοδος αλληλούχησης NGS)

Η διερεύνηση πιθανής συσχέτισης μεταξύ τρόπου μετάδοσης και κοινωνικής δικτύωσης έδειξε ότι, μελετώντας την άμεση κοινωνική δικτύωση πρώτου βαθμού, τα 8 (8/12, 66,7%) δίκτυα μετάδοσης αποτελούνταν συνολικά από 16 (16/27, 59,3%) PLHIV που συνδέονταν κοινωνικά με τουλάχιστον άλλο ένα άτομο με HIV-1 λοίμωξη του δικτύου τους (Εικόνα 49).



Εικόνα 49 Κοινωνικά δίκτυο το οποίο αναπαριστά τις συνδέσεις άμεσης κοινωνικής δικτύωσης πρώτου βαθμού των 27 XEN συμμετεχόντων του προγράμματος «TRIP» με HIV-1 λοίμωξη οι οποίοι βρέθηκαν σε δίκτυα μετάδοσης (φυλογενετικές ομάδες). Η αναπαράσταση του κοινωνικού δικτύου πραγματοποιήθηκε στο πρόγραμμα *Social Network Visualizer v1.9* χρησιμοποιώντας τη μέθοδο «Degree Centrality», η οποία τοποθετεί τους κόμβους (συμμετέχοντες) από το κέντρο προς την περιφέρεια του κύκλου ανάλογα με τον αριθμό των κοινωνικών επαφών (συνδέσεων) των συμμετεχόντων. Οι διακεκομμένοι κόκκινοι κύκλοι υποδεικνύουν τον αριθμό των συνδέσεων του κάθε κόμβου με τους υπόλοιπους κόμβους του δικτύου. Όσο μεγαλύτερος ο αριθμός των κοινωνικών επαφών ενός συμμετέχοντα τόσο πλησιέστερα τοποθετείται ο κόμβος που τον αναπαριστά στο κέντρο του κύκλου. Οι κόμβοι έχουν επισημανθεί με διαφορετικά χρώματα με βάση το δίκτυο μετάδοσης στο οποίο μολύνθηκε ο συμμετέχοντας τον οποίο αναπαριστούν. Οι κόμβοι σε σχήμα τετραγώνου αναπαριστούν συμμετέχοντες οι οποίοι δεν έχουν διαπιστωμένη κοινή κοινωνική δικτύωση με κανένα άλλο μέλος του δικτύου τους.

10.4 Συμπεράσματα

Το πρόγραμμα «TRIP» εφαρμόστηκε με σκοπό να μειώσει τις μεταδόσεις του HIV-1, εντοπίζοντας άτομα με πρόσφατη HIV-1 λοίμωξη και καταγράφοντας το κοινωνικό τους δίκτυο, δηλαδή, τα άτομα εκείνα τα οποία διέτρεχαν υψηλό κίνδυνο να μολυνθούν από τον ιό (Friedman et al., 2014). Η μελέτη κοινωνικών δικτύων για τον εντοπισμό ατόμων που έχουν μολυνθεί με HIV-1 αποτελεί μια πολλά υποσχόμενη προληπτική παρέμβαση για τον περιορισμό των HIV-1 μεταδόσεων (Nikolopoulos et al., 2016b; Green et al., 2017). Επιπρόσθετα, υπάρχει μια πληθώρα μελετών οι οποίες χρησιμοποιούν μοριακές μεθόδους για να εκτιμήσουν τα χαρακτηριστικά των δικτύων μετάδοσης του HIV-1 (Paraskevis et al., 2016; Grabowski et al., 2014; Chan et al., 2015; Poon et al., 2015; Kharsany et al., 2014; Avila et al., 2014; Middelkoop et al., 2014; Roberson et al., 2014; Volz et al., 2013a; Volz et al., 2013b; Lin et al., 2013; Levy et al., 2011; Lewis et al., 2008; Brenner et al., 2008; Vasylyeva et al., 2018; Paraskevis et al., 2017). Είναι καίριας σημασίας η κατανόηση του ρόλου που διαδραματίζουν τα κοινωνικά δίκτυα στη μετάδοση του HIV-1 και η εκτίμηση κρίσιμων επιδημιολογικών δεικτών της επιδημίας, όπως είναι οι πληθυσμοί που βρίσκονται σε υψηλό κίνδυνο. Ο συνδυασμός των πληροφοριών που παρέχουν οι μέθοδοι μοριακής επιδημιολογίας και οι μέθοδοι που βασίζονται στη μελέτη κοινωνικών δικτύων μπορεί να επηρεάσει σημαντικά την αποτελεσματικότητα και την αξία της μελέτης των κοινωνικών δικτύων ως προληπτική παρέμβαση για τη μείωση της επίπτωσης του HIV-1.

Χρησιμοποιώντας ένα συνδυασμό μοριακών μεθόδων και μεθόδων μελέτης κοινωνικών δικτύων στους XEN συμμετέχοντες του προγράμματος «TRIP» με HIV-1 λοίμωξη βρέθηκε, αναλύοντας αλληλουχίες διαθέσιμες στο γονίδιο *pol*, ότι το 43,7% των ατόμων τα οποία μολύνθηκαν σε κοινά δίκτυα μετάδοσης είχε διαπιστωμένη άμεση κοινωνική δικτύωση πρώτου βαθμού. Το ποσοστό αυτό αυξήθηκε σημαντικά (59,3%) όταν η ανάλυση επαναλήφθηκε χρησιμοποιώντας αλληλουχίες πλήρους γονιδιώματος, υποδεικνύοντας ότι αυξάνοντας το μήκος της αλληλουχίας του γενετικού υλικού μπορούν να προσδιοριστούν τα δίκτυα μετάδοσης του ιού με μεγαλύτερη λεπτομέρεια. Το υψηλό αυτό ποσοστό υποδηλώνει ότι κατά την επιδημία

του HIV-1 στους XEN στην Αθήνα περισσότερες από τις μισές μεταδόσεις πραγματοποιήθηκαν μεταξύ ατόμων με κοινή κοινωνική δικτύωση. Τα ευρήματα αυτά αναδεικνύουν την πρόσθετη συνεισφορά της μοριακής επιδημιολογίας στον εντοπισμό δικτύων μετάδοσης PLHIV οι οποίοι συνδέονται κοινωνικά, και θα μπορούσε να συμβάλει στο σχεδιασμό στοχευμένων παρεμβάσεων σε ευάλωτους και περιθωριοποιημένους πληθυσμούς (XEN, άστεγοι, μετανάστες κ.α.) προς όφελος της δημόσιας υγείας.

Ο συνδυασμός των δυο αυτών μεθόδων έχει εφαρμοστεί και από τους Wertheim και συνεργάτες, οι οποίοι εκτίμησαν ότι το ποσοστό των ατόμων που είχε μολυνθεί με γενετικά όμοιους ιούς και είχε διαπιστωμένη κοινωνική δικτύωση στη Νέα Υόρκη ήταν 53% (Wertheim et al., 2017). Σε μία άλλη μελέτη, από τους Campbell και συνεργάτες στην Ιντιάνα, βρέθηκε ότι το 34% των XEN που δήλωναν συμπεριφορές υψηλού κινδύνου είχε πιθανότητα μολυνθεί από κοινή πηγή (Campbell et al., 2017). Τα ποσοστά που εκτιμήθηκαν σε αυτές τις μελέτες είναι κοντά με τα αντίστοιχα ποσοστά που εκτιμήθηκαν από την παρούσα ανάλυση (43,8% από την ανάλυση των αλληλουχιών που ήταν διαθέσιμες στο γονίδιο *pol* και 59,3% από την ανάλυση των αλληλουχιών πλήρους γονιδιώματος). Τα παραπάνω ευρήματα υποδεικνύουν ότι η κοινωνική δικτύωση κάθε ατόμου επηρεάζει την πιθανότητά του να μολυνθεί ή να μεταδώσει τον HIV-1, και, επιπρόσθετα, αναδεικνύουν τη συμβολή της μελέτης των κοινωνικών δικτύων στη πρόληψη του HIV-1.

Αξίζει, επίσης, να σημειωθεί ότι στις παραπάνω μελέτες η περιγραφή των κοινωνικών δικτύων των εκάστοτε υπό μελέτη πληθυσμών βασίστηκε σε ένα τύπο αλυσιδωτής δειγματοληψίας (Respondent-driven sampling – RDS, δειγματοληψία καθοδηγούμενη από τον αποκρινόμενο), στην οποία ο κάθε συμμετέχων προσέλκυε στο πρόγραμμα άλλα άτομα με τη χρήση κουπονιών. Η μέθοδος αυτή, λόγω του μικρού αριθμού κουπονιών ανά συμμετέχοντα, περιορίζει σημαντικά τον αριθμό των ατόμων που μπορεί να προσελκύσει στο πρόγραμμα ο κάθε συμμετέχοντας και, ως εκ τούτου, έχει σημαντικά μειονεκτήματα στην περιγραφή του κοινωνικού του δικτύου. Αντίθετα, οι μέθοδοι που βασίζονται στην περιγραφή των κοινωνικών δικτύων επιτρέπουν στον κάθε συμμετέχοντα να προσελκύσει στο πρόγραμμα απεριόριστο αριθμό ατόμων του

κοινωνικού του δικτύου, χωρίς περιορισμούς αναφορικά με το σε ποιον έδωσε ή από ποιον δέχτηκε κουπόνι. Σε μελέτες που χρησιμοποιήθηκαν μοριακές μέθοδοι σε συνδυασμό με RDS δειγματοληψία βρέθηκε από τους Lerej και συνεργάτες ότι το 42% των MSM που εντοπίστηκε μέσω του RDS ανήκαν στο ίδιο δίκτυο μετάδοσης (Lerej et al., 2009), και από τους Dennis και συνεργάτες ότι το 24% των MSM που εντοπίστηκε σε δίκτυα μετάδοσης ανήκε στην ίδια RDS αλυσίδα (Dennis et al., 2013). Επίσης, οι Fujimoto και συνεργάτες έδειξαν ότι οι μεταδόσεις του HIV-1 δεν πραγματοποιούνται μεταξύ των νέων έγχρωμων MSM με κοινή κοινωνική δικτύωση (Fujimoto et al., 2017).

Το πρόγραμμα «TRIP» πραγματοποιήθηκε το χρονικό διάστημα 2013-2015 και το 30% (45/150) των συμμετεχόντων του ήταν άτομα με πρόσφατη HIV-1 λοίμωξη. Το γεγονός ότι η επιδημία του HIV-1 στους XEN στην Αθήνα ήταν πρόσφατη όταν πραγματοποιήθηκε το συγκεκριμένο πρόγραμμα (εκτιμάται ότι η επιδημία ξεκίνησε το χρονικό διάστημα μεταξύ τέλους του 2010 και αρχές του 2011, Paraskevis et al., 2015), υποδεικνύει ότι το υψηλό ποσοστό (59,3%) των ατόμων που μολύνθηκε σε κοινά δίκτυα μετάδοσης και είχε διαπιστωμένη κοινωνική δικτύωση ήταν πιθανότατα λόγω του μικρού χρονικού διαστήματος που μεσολάβησε μεταξύ των HIV-1 μεταδόσεων και των συνεντεύξεων. Τα κοινωνικά δίκτυα είναι από τη φύση τους πολύπλοκα λόγω του ότι εξελίσσονται δυναμικά στο χρόνο καθώς οι σχέσεις των ανθρώπων μεταβάλλονται και τα άτομα ενίοτε υιοθετούν ή αποβάλλουν συμπεριφορές κινδύνου (Delva et al., 2016). Στην παρούσα ανάλυση βρέθηκε ότι τα μονοπάτια διασποράς του HIV-1, που εκτιμώνται κατά προσέγγιση από τις μοριακές μεθόδους, σχετίζονται σημαντικά με την κοινωνική δικτύωση, όταν, όμως, αυτή μελετάται κοντά στο χρονικό διάστημα που πραγματοποιούνται οι μεταδόσεις.

Πίνακας 19 Κατανομή και πρότυπα δικτύωσης αλληλουχιών HIV-1 διαθέσιμων στο γονίδιο *pol* (PR/RT) οι οποίες απομονώθηκαν από χρήστες ενδοφλέβιων ναρκωτικών συμμετέχοντες του προγράμματος «TRIP», ανά υπότυπο/ανασυνδιασμένο τύπο.

Δίκτυο μετάδοσης	HIV-1 Υπότυπος/CRF ¹	Αριθμός αλληλουχιών (%)	Αριθμός αλληλουχιών σε δίκτυα (%)	Αριθμός δικτύων	Εύρος δικτύων	Άτομα σε δίκτυα με κοινωνική δικτύωση
Δίκτυα XEN²						
	A1	9 (7,6)	7 (21,9)	2	2-5	2
	B	17 (14,3)	6 (18,8)	2	3	4
	CRF14_BG	53 (44,5)	15 (46,9)	7	2-3	4
	CRF35_AD	18 (15,1)	2 (6,2)	1	2	2
	Υποσύνολο	97 (81,5)	30 (93,8)	12	2-5	12
Δίκτυα μη XEN²						
	A1	7 (5,9)	-	-	-	-
	Ανασυνδυασμένος τύπος B/D	1 (0,8)	-	-	-	-
	CRF56_cpx	1 (0,8)	-	-	-	-
	Υποσύνολο	9 (7,5)	-	-	-	-
Ανασυνδυασμένοι ιοί με στελέχη από δίκτυα XEN²						
	Υποσύνολο	13 (11,0)	2 (6,2)	1	2	2
	Σύνολο	119 (100)	32 (100)	13	2-5	14

¹ CRF, *Circulating Recombinant Form*

² XEN, *Χρήστες Ενδοφλέβιων Ναρκωτικών*

Πίνακας 20 Κατανομή και πρότυπα δικτύωσης αλληλουχιών HIV-1 πλήρους γονιδιώματος οι οποίες απομονώθηκαν από χρήστες ενδοφλέβιων ναρκωτικών συμμετέχοντες του προγράμματος «TRIP», ανά υπότυπο/ανασυνδιασμένο τύπο.

Δίκτυο μετάδοσης	HIV-1 Υπότυπος /CRF ¹	Αριθμός αλληλουχιών (%)	Αριθμός αλληλουχιών σε δίκτυα (%)	Αριθμός δικτύων	Εύρος δικτύων	Άτομα σε δίκτυα με κοινωνική δικτύωση
Δίκτυα XEN²						
	A1	3 (2,9)	2 (7,4)	1	2	2
	B	8 (7,7)	4 (14,8)	2	2	4
	CRF14_BG/B/CRF14_BG	35 (33,7)	17 (63,0)	7	2-4	8
	CRF35_AD/A/CRF35_AD	17 (16,3)	4 (14,8)	2	2	2
	Υποσύνολο	63 (60,6)	27 (100)	12	2-4	16
Δίκτυα μη XEN²						
	A1	4 (3,8)	-	-	-	-
	B	1 (1,0)	-	-	-	-
	Υποσύνολο	5 (4,8)	-	-	-	-
Ανασυνδιασμένοι ιοί με στελέχη από δίκτυα XEN²						
	Υποσύνολο	36 (34,6)	-	-	-	-
	Σύνολο	104 (100)				

¹ CRF, *Circulating Recombinant Form*

² XEN, *Χρήστες Ενδοφλέβιων Ναρκωτικών*

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 11

**Διερεύνηση με μοριακές μεθόδους αν οι μεταδόσεις HIV-1
συμβαίνουν πιο συχνά σε χρήστες ενδοφλέβιων ναρκωτικών
με υψηλό ιικό φορτίο στην Αθήνα
(Transmission Reduction Intervention Project – TRIP)**

Δημοσίευση:

Kostaki EG, Frampton D, Paraskevis D, Pantavou K, Ferns B, Raffle J, Grant P, Kozlakidis Z, Hadjickou A, Pavlitina E, Williams LD, Hatzakis A, Friedman SR, Nastouli E, Nikolopoulos GK. Near full-length genomic sequencing and molecular analysis of HIV-infected individuals in a network-based intervention (TRIP) in Athens, Greece: Evidence that transmissions occur more frequently from those with high HIV-RNA. Curr HIV Res. 2019 Jan 30. doi: 10.2174/1570162X17666190130120757

11.1 Εισαγωγή-Σκοπός

Η έγκαιρη διάγνωση των PLHIV με πρόσφατη λοίμωξη είναι καίριας σημασίας για τη μείωση της επίπτωσης του HIV-1. Το υψηλό ιικό φορτίο (HIV-RNA) αποτελεί ένα από τα κύρια χαρακτηριστικά της οξείας φάσης της HIV-1 λοίμωξης. Επιδημιολογικές μελέτες έχουν δείξει ότι η μολυσματικότητα σχετίζεται θετικά με το ιικό φορτίο (Hull et al., 2011; Hull et al., 2013; Tymejczyk et al., 2018; Quinn et al., 2000; Tovanabutra et al., 2002; Hughes et al., 2012; Zheng et al., 2018). Συνέπεια αυτού αποτελεί η υψηλή πιθανότητα μετάδοσης του ιού κατά τη διάρκεια της πρόσφατης λοίμωξης, όταν το ιικό φορτίο είναι ιδιαίτερα υψηλό (Wawer et al., 2005; Anglemyer et al., 2013; Solomon et al., 2016; Cohen et al., 2010; Bellan et al., 2015; Safren et al., 2015). Επίσης, έχει παρατηρηθεί ότι η μείωση του ιικού φορτίου σε ατομικό ή πληθυσμιακό επίπεδο οδηγεί σε σημαντική μείωση του αριθμού των HIV-1 μεταδόσεων (Hull et al., 2013; Lingappa et al., 2010; Del Romero et al., 2015; Murnane et al., 2012; Kerr et al., 2012). Επιπρόσθετα, μελέτες μοριακής επιδημιολογίας έχουν δείξει ότι οι μισές περίπου μεταδόσεις που προκαλεί το κάθε άτομο με HIV-1 λοίμωξη πραγματοποιούνται κατά τα αρχικά στάδια της λοίμωξης (Ambrosioni et al., 2012; Brenner et al., 2007; Escudero et al., 2017; Paraskevis et al., 2017). Δεδομένων των παραπάνω επιδημιολογικών ευρημάτων, ο σκοπός της παρούσας ανάλυσης ήταν να διερευνηθεί η υπόθεση ότι η μετάδοση του HIV-1 συμβαίνει συχνότερα μεταξύ PLHIV με υψηλό ιικό φορτίο, μελετώντας αλληλουχίες πλήρους γονιώματος με μοριακές μεθόδους.

11.2 Υλικό-Μέθοδοι

Για το σκοπό αυτό αναλύθηκαν όλες οι διαθέσιμες αλληλουχίες HIV-1 πλήρους γονιδιώματος των XEN συμμετεχόντων του προγράμματος «TRIP», οι οποίες είχαν εντοπιστεί σε τοπικά δίκτυα μετάδοσης XEN (CRF14_BG/B/CRF14_BG, CRF35_AD/A/CRF35_AD, A1, B) και αφορούσαν την επιδημία του HIV-1 στην Αθήνα (N = 63, 60,6%) (Πίνακας 21, σελ. 231). Μία αλληλουχία που είχε εντοπιστεί

σε τοπικό δίκτυο XEN εξαιρέθηκε από την ανάλυση λόγω του περιορισμένου μήκους της (<4.000 νουκλεοτιδικές βάσεις).

11.2.1 Διερεύνηση μόλυνσης XEN με υψηλό ιικό φορτίο σε δίκτυα μετάδοσης

Μέσω φυλογενετικής ανάλυσης διερευνήθηκε αν οι XEN με υψηλό ιικό φορτίο ($>10^6$ IU/mL) (Chu et al., 2010) μολύνονταν σε επιμέρους τοπικά δίκτυα μετάδοσης. Η φυλογενετική τοπολογία (δένδρο) εκτιμήθηκε με τη μέθοδο της μέγιστης πιθανοφάνειας, χρησιμοποιώντας τα προγράμματα RAxML v8.0 (Stamatakis, 2014) και FastTree v2.1 (Price et al., 2010). Ως επιμέρους τοπικά δίκτυα μετάδοσης ορίστηκαν όλες οι φυλογενετικές ομάδες οι οποίες αποτελούνταν από τουλάχιστον 2 αλληλουχίες και είχαν εκτίμηση SH $> 0,90$ ή τιμή αξιοπιστίας bootstrap $>75\%$.

11.2.2 Διερεύνηση υπόθεσης συχνότερης HIV-μετάδοσης μεταξύ XEN με υψηλό ιικό φορτίο

Η υπόθεση της ομαδοποίησης ως προς το ιικό φορτίο ελέγχθηκε εκτιμώντας τα γεγονότα διασποράς (μεταδόσεις) μεταξύ των XEN με υψηλό ($>10^5$ ή 10^6 IU/mL) και χαμηλό ($\leq 10^5$ ή 10^6 IU/mL) ιικό φορτίο από τα bootstrap φυλογενετικά δένδρα ($N = 300$) (τα οποία εκτιμήθηκαν με το πρόγραμμα RAxML v8.0). Συγκεκριμένα, η εκτίμησή των γεγονότων διασποράς βασίστηκε στη μέθοδο της μέγιστης φειδωλότητας και πραγματοποιήθηκε στο πρόγραμμα Mesquite v3.5 (Maddison et al., 2018). Το αν οι μεταδόσεις μεταξύ των XEN με υψηλό ιικό φορτίο ήταν πιο συχνές από ότι αναμενόταν κατά τύχη διερευνήθηκε μέσω στατιστικής φυλογεωγραφίας, κατά την οποία ελέγχθηκε αν η κατανομή των εκτιμώμενων γεγονότων διασποράς (μεταδόσεις) μεταξύ των διαφορετικών επιπέδων ιικού φορτίου, όπως προέκυψε από τα bootstrap φυλογενετικά δένδρα, διέφερε σημαντικά από την αντίστοιχη κατανομή των αναμενόμενων γεγονότων διασποράς (μεταδόσεις), που προέκυψε από τα προσομοιωμένα φυλογενετικά δένδρα υπό τη μηδενική υπόθεση της πλήρους γεωγραφικής ανάμειξης. Σε έναν τυχαίο πληθυσμό το κάθε άτομο με HIV-1 λοίμωξη

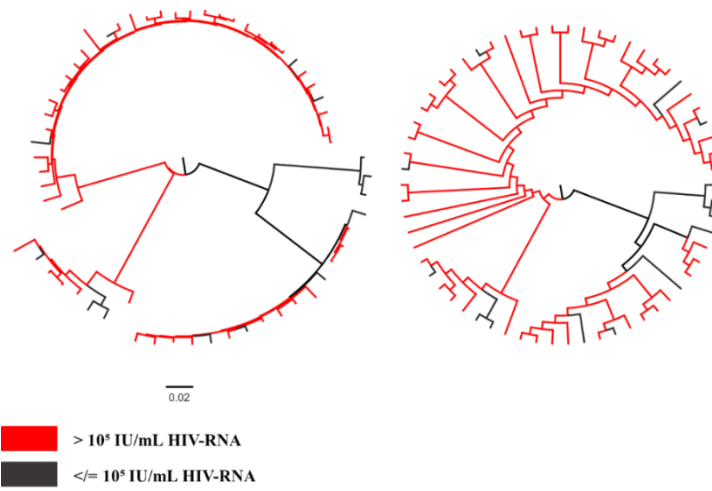
έχει περίπου την ίδια πιθανότητα να μεταδώσει τον ιό σε οποιοδήποτε άλλο άτομο, ανεξαρτήτως ικού φορτίου (panmixis hypothesis). Ως εκ τούτου, μια τυχαία ανακατανομή των δεδομένων στα άκρα των bootstrap φυλογενετικών δένδρων μπορεί να προσομοιώσει έναν τέτοιο πληθυσμό. Η στατιστική ανάλυση για τη σύγκριση των κατανομών των εκτιμώμενων και αναμενόμενων γεγονότων διασποράς (μεταδόσεων) πραγματοποιήθηκε με τον μη παραμετρικό μονόπλευρο έλεγχο Mann-Whitney U test στο πρόγραμμα STATA 14-StataCorp LP.

11.3 Αποτελέσματα

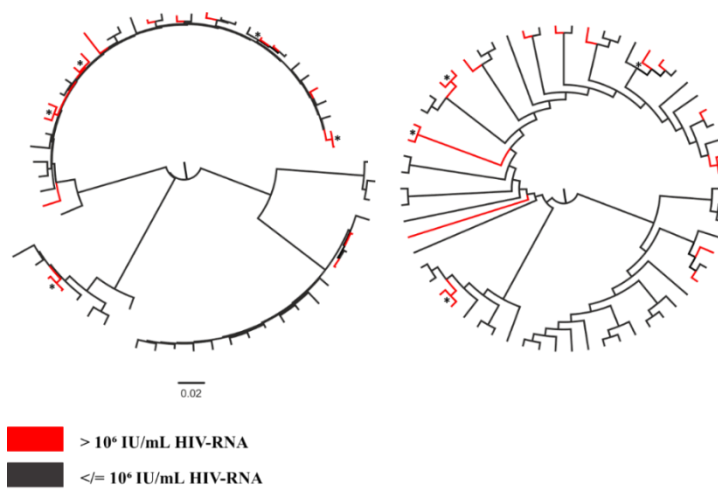
11.3.1 Δίκτυα μετάδοσης XEN με υψηλό ικό φορτίο

Η φυλογενετική ανάλυση των 62 αλληλουχιών πλήρους γονιδιώματος που εντοπίστηκαν σε τοπικά δίκτυα XEN στην Αθήνα (CRF14_BG/B/CRF14_BG, CRF35_AD/A/CRF35_AD, A1, B) πραγματοποιήθηκε ορίζοντας ως όριο διαχωρισμού των επιπέδων του HIV-RNA τις 10^5 και 10^6 IU/mL (Εικόνες 50A και B). Για 14 εκ των 18 XEN με ικό φορτίο μεγαλύτερο του 10^6 IU/mL βρέθηκε ότι οι αλληλουχίες τους ομαδοποιήθηκαν φυλογενετικά με τουλάχιστον άλλη μία αλληλουχία. Επίσης, το 71,4% (10/14) εξ αυτών εντοπίστηκε σε 5 επιμέρους τοπικά δίκτυα μετάδοσης (Εικόνα 50B). Στο ερώτημα αν εντός των επιμέρους τοπικών δικτύων μετάδοσης των XEN με υψηλό ικό φορτίο ($>10^6$ IU/mL) εντοπίστηκαν αλληλουχίες από XEN με πρόσφατη λοίμωξη, βρέθηκε ότι σε κάθε ένα από τα 4 (4/5, 80%) δίκτυα (τα οποία απαρτίζονταν συνολικά από 10 αλληλουχίες) εντοπίστηκε τουλάχιστον μία αλληλουχία XEN με πρόσφατη λοίμωξη (Εικόνα 50Γ). Συγκεκριμένα, 6 από τις 10 (60%) αλληλουχίες που εντοπίστηκαν σε επιμέρους τοπικά δίκτυα XEN με υψηλό ικό φορτίο ($>10^6$ IU/mL) είχαν απομονωθεί από XEN με πρόσφατη λοίμωξη. Επίσης, σε ένα από τα δίκτυα και οι δυο αλληλουχίες από τις οποίες απαρτίζονταν είχαν απομονωθεί από XEN με πρόσφατη λοίμωξη (Εικόνα 50Γ).

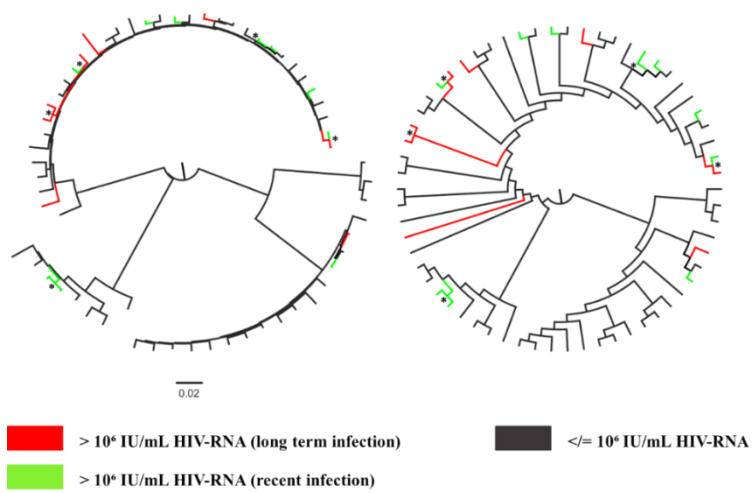
A



B



Γ

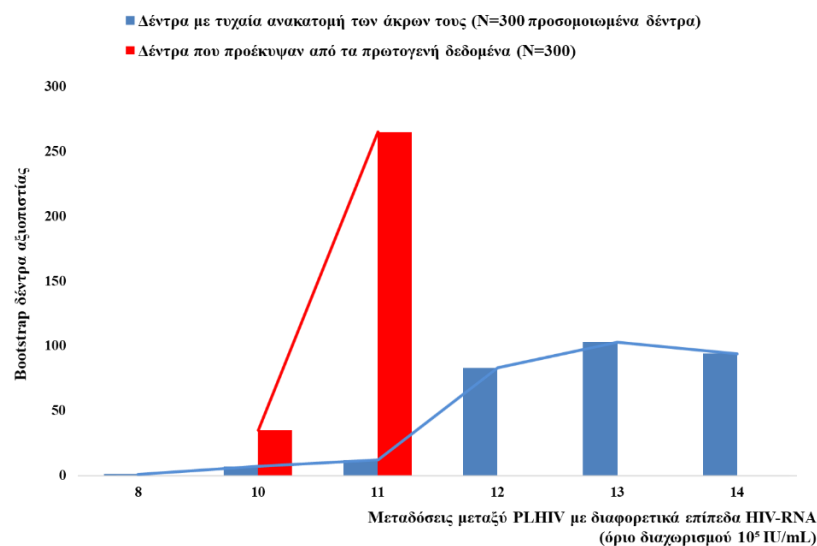


Εικόνα 50 Φυλογενετικές τοπολογίες (δένδρα) μέγιστης πιθανοφάνειας (τα οποία αναπαρίσταται με και χωρίς γενετικές αποστάσεις) 62 αλληλουχιών HIV-1 πλήρους γονιδιώματος, οι οποίες εντοπίστηκαν σε τοπικά δίκτυα XEN στην Αθήνα (CRF14_BG/B/CRF14_BG, CRF35_AD/A/CRF35_AD, A1, B) στα οποία: **(Α)** Οι αλληλουχίες των XEN με ικό φορτίο $>10^5$ IU/mL έχουν επισημανθεί με κόκκινο χρώμα. **(Β)** Οι αλληλουχίες των XEN με ικό φορτίο $>10^6$ IU/mL έχουν επισημανθεί με κόκκινο χρώμα. **(Γ)** Οι αλληλουχίες των XEN με χρόνια λοίμωξη και ικό φορτίο $>10^6$ IU/mL έχουν επισημανθεί με κόκκινο χρώμα, ενώ οι αλληλουχίες των XEN με πρόσφατη λοίμωξη και ικό φορτίο $>10^6$ IU/mL με πράσινο χρώμα αντίστοιχα. Τα επιμέρους τοπικά δίκτυα μετάδοσης των XEN συμμετεχόντων του προγράμματος «TRIP» με ικό φορτίο $>10^6$ IU/mL έχουν επισημανθεί με αστερίσκο.

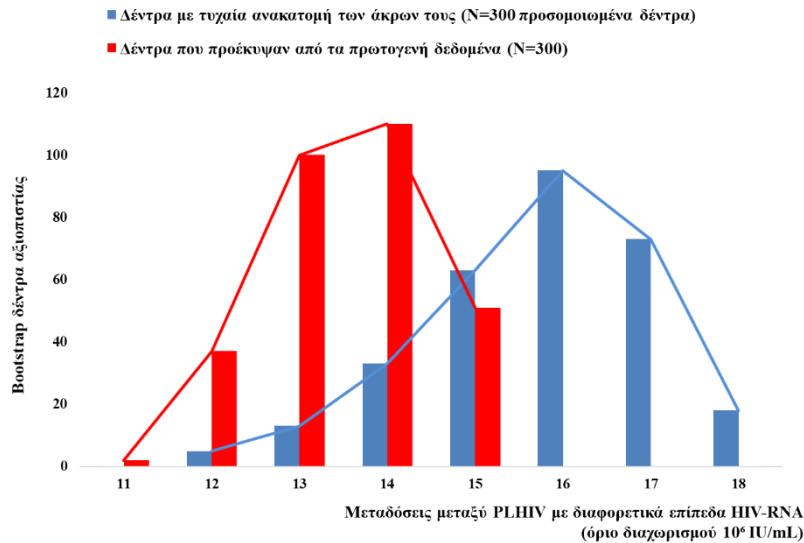
11.3.2 Υπόθεση συχνότερης HIV-μετάδοσης μεταξύ XEN με υψηλό ικό φορτίο

Ο εκτιμώμενος αριθμός των μεταδόσεων του HIV-1 μεταξύ των XEN με διαφορετικά επίπεδα ικού φορτίου βρέθηκε να είναι σημαντικά μικρότερος από τον αριθμό των μεταδόσεων που αναμένονταν να ισχύει κατά τύχη, και για τα δύο όρια διαχωρισμού του ικού φορτίου ($>10^5$ ή 10^6 IU/mL) ($p < 0,001$). Το εύρημα αυτό είναι ενδεικτικό ότι οι μεταδόσεις του HIV-1 συμβαίνουν με σημαντικά μεγαλύτερη συχνότητα μεταξύ XEN με υψηλό ικό φορτίο ($>10^5$ ή 10^6 IU/mL) (Εικόνες 51Α και Β).

A



B



Εικόνα 51 Στα γραφήματα αναπαρίστανται οι κατανομές του αριθμού των μεταδόσεων του HIV-1, όπως εκτιμήθηκαν από τα bootstrap φυλογενετικά δένδρα που προέκυψαν από τα πρωτογενή δεδομένα (κόκκινες μπάρες) και τα προσομοιωμένα δένδρα (μπλε μπάρες), μεταξύ των XEN συμμετεχόντων του προγράμματος «TRIP» με διαφορετικά επίπεδα ιικού φορτίου, με όριο διαχωρισμού τα: (A) 10^5 IU/mL και (B) 10^6 IU/mL.

11.4 Συμπεράσματα

Στην παρούσα ανάλυση διερευνήθηκε με μοριακές μεθόδους αν οι μεταδόσεις του HIV-1 συμβαίνουν πιο συχνά μεταξύ XEN με υψηλά επίπεδα ιικού φορτίου, και βρέθηκε ότι η μετάδοση του ιού είναι πιο πιθανό να συμβεί μεταξύ XEN με υψηλή ιαμία. Δεδομένου ότι το υψηλό ικό φορτίο αποτελεί ισχυρή ένδειξη πρόσφατης HIV-1 λοίμωξης, τα ευρήματα υποδεικνύουν ότι οι μεταδόσεις μεταξύ ατόμων με πρόσφατη HIV-1 λοίμωξη είναι πιο συχνές. Επίσης, η παρούσα ανάλυση, η οποία πραγματοποιήθηκε σε αλληλουχίες πλήρους γονιδιώματος, παρέχει επιπλέον ενδείξεις για το σημαντικό ρόλο των ατόμων με πρόσφατη λοίμωξη στην εξάπλωση του HIV, δεδομένου ότι στο 80% των δικτύων των XEN με υψηλή ιαμία που εντοπίστηκε υπήρχε τουλάχιστον ένας XEN με διαπιστωμένη πρόσφατη HIV-1 λοίμωξη.

Δεδομένων των παραπάνω ευρημάτων, τα άτομα με πρόσφατη HIV-1 λοίμωξη είναι πολύ πιθανό να αποτελούν πηγές μετάδοσης του ιού. Ως εκ τούτου, η έγκαιρη διάγνωση και η άμεση έναρξη της θεραπείας, με στόχο τη μείωση του ιικού φορτίου, πρέπει να αποτελούν την κύρια στρατηγική πρόληψης για τον HIV-1.

Τα ευρήματα της ανάλυσης είναι σε συμφωνία με εκτιμήσεις αναλύσεων που πραγματοποιήθηκαν προγενέστερα σε δεδομένα του προγράμματος «TRIP», καθώς και άλλων μελετών. Στο πρόγραμμα «TRIP» έχει δειχθεί ότι το ποσοστό των ατόμων με πρόσφατη λοίμωξη μεταξύ των PLHIV στα δίκτυα των «seeds» με πρόσφατη λοίμωξη ήταν περίπου 3 φορές μεγαλύτερο από το ποσοστό των ατόμων με πρόσφατη λοίμωξη στα δίκτυα των «seeds» με χρόνια λοίμωξη (Nikolopoulos et al., 2016b). Με τον όρο «seeds» ορίζονταν οι συμμετέχοντες οι οποίοι προσεγγίστηκαν στην αρχικά στάδια του προγράμματος «TRIP», ώστε να συμμετάσχουν και να ξεκινήσει η παρέμβαση στα κοινωνικά τους δίκτυα.

Αναφορικά με παρόμοια αποτελέσματα που έχουν αναφερθεί από άλλες μελέτες στο παρελθόν, οι Brenner και συνεργάτες έδειξαν ότι σχεδόν το 50% των στελεχών των ατόμων με πρόσφατη HIV-1 λοίμωξη στον Καναδά ομαδοποιήθηκε σε δίκτυα με εύρος από 2 έως 17 στελέχη (Brenner et al., 2007). Ο Pinkerton έδειξε με μαθηματικά μοντέλα ότι η πιθανότητα μετάδοσης του HIV-1 κατά τη διάρκεια της οξείας λοίμωξης ήταν περίπου 42 φορές μεγαλύτερη από ότι κατά τη διάρκεια της χρόνιας λοίμωξης (Pinkerton, 2008). Η ίδια ανάλυση έδειξε, επίσης, ότι η οξεία φάση της λοίμωξης ευθύνονταν για το 89% του συνολικού αριθμού των μεταδόσεων στους πρώτους 20 μήνες της παρακολούθησης (Pinkerton, 2008). Οι Miller και συνεργάτες, επίσης, ανέδειξαν το σημαντικό ρόλο της οξείας και πρόσφατης HIV-1 λοίμωξης (λόγω των υψηλών επιπέδων ιικού φορτίου σε αυτά τα στάδια) στη μετάδοση του ιού μέσω σεξουαλικής επαφής (Miller et al., 2010). Πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι κατά τη διάρκεια επιδημικών εκρήξεων του HIV-1 μεταξύ XEN ένας σημαντικός αριθμός ατόμων μολύνθηκε με ιούς με πολύ χαμηλή γενετική ετερογένεια (Kostaki et al., 2017; Paraskevis et al., 2013; Campbell et al., 2017; Niculescu et al., 2015; Paraskevis et al., 2011; Kostaki et al., 2018a; Kostaki et al., 2018b; Paraschiv et al., 2017; Peters et al., 2016) – εύρημα το οποίο ενισχύει την υπόθεση ότι τα άτομα με πρόσφατη HIV-1

λοίμωξη συμβάλουν σημαντικά στη μετάδοση του ιού. Τέλος, έχει βρεθεί από μελέτες προσομοίωσης ότι η φυσική ιστορία του HIV-1 (υψηλό ιικό φορτίο) διαδραματίζει σημαντικό ρόλο (μαζί με τα δίκτυα συμπεριφοράς κινδύνου που σχετίζονται με τη χρήση) όταν ο επιπολασμός του HIV-1 στους XEN είναι υψηλός (Dombrowski et al., 2017).

Πίνακας 21 Δημογραφικά, επιδημιολογικά και κλινικά χαρακτηριστικά των συμμετεχόντων του προγράμματος «TRIP» με HIV-1 λοίμωξη (N = 149) και ενός υποσυνόλου αυτών (63 εκ των 149), οι αλληλουχίες των οποίων εντοπίστηκαν σε επιμέρους τοπικά δίκτυα μετάδοσης χρηστών ενδοφλέβιων ναρκωτικών στην Αθήνα.

Χαρακτηριστικά		PLHIV ¹	PLHIV σε δίκτυα XEN ²
Σύνολο [N (%)]		149 (100)	63 (100)
Φύλο [N (%)]	Άνδρες	113 (75,8)	49 (77,8)
	Γυναίκες	36 (24,2)	14 (22,2)
Ηλικία [διάμεση εκτίμηση σε έτη (IQR ³)]		34 (30-40)	34 (30-39)
Επίπεδο εκπαίδευσης [N (%)]	Δευτεροβάθμια	131 (87,9)	59 (93,7)
	Τριτοβάθμια	18 (12,1)	4 (6,3)
Διαμονή τους τελευταίους 6 μήνες [N (%)]	Μη άστεγοι	97 (65,1)	42 (66,7)
	Άστεγοι	52 (34,9)	21 (33,3)
Χρήση ενδοφλέβιων ναρκωτικών τους τελευταίους 6 μήνες (N (%)) ^{a, b}	Μη XEN	5 (3,4)	2 (3,2)
	XEN	141 (96,6)	60 (96,8)
Διάρκεια χρήσης [σε έτη (IQR)]		13 (7-17) ^c	12,5 (7-17) ^d
Ιικό φορτίο (HIV-RNA) [log IU/ml ⁴ (IQR)]		5,4 (4,5-6,1) ^e	5,5 (5,0-6,1)

¹ PLHIV, People Living with HIV

² XEN, Χρήστες Ενδοφλέβιων Ναρκωτικών

³ IQR, Interquartile Range (ενδοτεταρτημοριακό εύρος)

⁴ log IU/ml, διεθνείς μονάδες/χιλιοστόλιτρο σε λογαριθμική κλίμακα

^a Διαθέσιμη πληροφορία για 146 εκ των 149 PLHIV

^b Διαθέσιμη πληροφορία για 62 εκ των 63 PLHIV σε δίκτυα XEN

^c Διαθέσιμη πληροφορία για 140 εκ των 149 PLHIV

^d Διαθέσιμη πληροφορία για 60 εκ των 63 PLHIV σε δίκτυα XEN

^e Διαθέσιμη πληροφορία για 126 εκ των 149 PLHIV

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 12

Εκτίμηση επιπολασμού, τρόπου διασποράς και δυναμικής των HIV-1 στελεχών με αντοχή σε αντιρετροϊκά φάρμακα σε μη θεραπευμένα άτομα που ζουν με HIV-1 στη Νότια/Κεντρική Ελλάδα το χρονικό διάστημα 2003-2015

Δημοσιεύσεις:

1. Paraskevis D, Kostaki E, Magiorkinis G, Gargalianos P, Xylomenos G, Magiorkinis E, Lazanas M, Chini M, Nikolopoulos G, Skoutelis A, Papastamopoulos V, Antoniadou A, Papadopoulos A, Psychogiou M, Daikos GL, Oikonomopoulou M, Zavitsanou A, Chrysos G, Paparizos V, Kourkounti S, Sambatakou H, Sipsas NV, Lada M, Panagopoulos P, Maltezos E, Drimis S, Hatzakis A. Prevalence of drug resistance among HIV-1 treatment-naïve patients in Greece during 2003-2015: Transmitted drug resistance is due to onward transmissions. *Infect Genet Evol.* 2017 Oct;54:183-191. doi: 10.1016/j.meegid.2017.07.003
2. Paraskevis D*, Kostaki E*, Gargalianos P, Xylomenos G, Lazanas M, Chini M, Skoutelis A, Papastamopoulos V, Paraskeva D, Antoniadou A, Papadopoulos A, Psychogiou M, Daikos GL, Chrysos G, Paparizos V, Kourkounti S, Sambatakou H, Sipsas NV, Lada M, Panagopoulos P, Maltezos E, Drimis S, Hatzakis A. Transmission dynamics of HIV-1 drug resistance among treatment-naïve individuals in Greece: The added value of molecular epidemiology to public health. *Genes (Basel).* 2017 Nov 13;8(11). pii: E322. doi: 10.3390/genes8110322

*contributed equally to this work

12.1 Εισαγωγή-Σκοπός

Η HIV-1 λοίμωξη αντιμετωπίζεται μέσω της δια βίου χορήγησης αντιρετροϊκής θεραπείας, η οποία επιβραδύνει την εξέλιξη του νοσήματος και επιμηκύνει σημαντικά το προσδόκιμο επιβίωσης. Ένα από τα μειονεκτήματα της ART είναι η πιθανότητα ανάπτυξης αντοχής του ιού, που μειώνει την ανασταλτική δράση της θεραπείας. Συγκεκριμένα, ως αντοχή στην αντιρετροϊκή θεραπεία ορίζεται η μείωση στην ανασταλτική επίδραση της θεραπείας στον ιικό πολλαπλασιασμό. Η αντοχή μπορεί και να προϋπάρχει της θεραπείας (μεταδιδόμενη αντοχή) ή μπορεί να είναι συνέπεια της μη ιολογικής ανταπόκρισης στη θεραπεία. Συνεπώς, στην πρώτη περίπτωση η αντοχή μπορεί να είναι η αιτία αποτυχίας στη θεραπεία, ενώ στη δεύτερη αποτελεί συνέπεια της μη ιολογικής ανταπόκρισης.

Η επιδημιολογική επιτήρηση της μεταδιδόμενης αντοχής έχει ιδιαίτερη σημασία, ειδικά στους μη θεραπευμένους PLHIV, προκειμένου να βελτιστοποιηθεί η αποτελεσματικότητα του πρώτου θεραπευτικού σχήματος (Wittkop et al., 2011). Από προηγούμενες μελέτες έχει εκτιμηθεί ότι ο επιπολασμός των μεταλλαγών αντοχής σε αντιρετροϊκά φάρμακα σε μη θεραπευμένους PLHIV κυμαίνεται μεταξύ 8,3% και 15% στην Ευρώπη και τη Βόρεια Αμερική αντίστοιχα (Rhee et al., 2015b). Οι παραπάνω εκτιμήσεις επιβεβαιώθηκαν από μία πολυκεντρική Ευρωπαϊκή μελέτη, στην οποία χρησιμοποιήθηκαν δεδομένα από πρόσφατα διαγνωσμένους PLHIV σε 26 χώρες, όπου εκτιμήθηκε ότι ο επιπολασμός των μεταλλαγών αντοχής σε αντιρετροϊκά φάρμακα ήταν 8,3% το χρονικό διάστημα 2008-2010 (Hofstra et al., 2016). Τα υψηλότερα επίπεδα αντοχής αφορούσαν τα μη νουκλεοσιδικά ανάλογα (NNRTIs) (7,4%), ενώ τα ποσοστά αντοχής για τα νουκλεοσιδικά ανάλογα (NRTIs) και τους αναστολείς πρωτεάσης (PIs) ήταν 3,4% και 2,9% αντίστοιχα. Η εκτίμηση της αντοχής στις παραπάνω μελέτες (Rhee et al., 2015b; Hofstra et al., 2016) πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο «SDRM» (Surveillance Drug Resistance Mutations – SDRM), η οποία συνίσταται από τον Π.Ο.Υ. (Bennett et al., 2009). Στην Ελλάδα εκτιμήθηκε ότι ο επιπολασμός αντοχής του HIV-1 σε αντιρετροϊκά φάρμακα, σε μη θεραπευμένους PLHIV το χρονικό διάστημα 2003-2013, ήταν περίπου 19,6%. Τα επίπεδα αντοχής σε

NNRTIs (15,9%) ήταν τα υψηλότερα στον υπό μελέτη πληθυσμό [PIs (4,6%), NRTIs (3,2%)] (Paraskevis et al., 2014; Wensing et al., 2017).

Τα τελευταία χρόνια, έχειδειχθεί ότι σε ορισμένες περιπτώσεις η παρουσία ανθεκτικών στελεχών σε μη θεραπευμένους PLHIV ήταν αποτέλεσμα μεταδόσεων μεταξύ τους (Antoniadou et al., 2014; Brenner et al., 2008; Panichsillapakit et al., 2016; Rhee et al., 2015b; Zeh et al., 2016). Το συμπέρασμα αυτό βασίστηκε σε εκτιμήσεις φυλογενετικών αναλύσεων, όπου οι αλληλουχίες με μεταλλαγές αντοχής ομαδοποιούνταν σε μονοφυλετικές ομάδες. Τα παραπάνω ευρήματα υποδεικνύουν ότι οι μη θεραπευμένοι PLHIV αποτελούν την κύρια πηγή μεταδιδόμενης αντοχής σε αυτόν τον πληθυσμό.

Δεδομένων των παραπάνω, στην παρούσα ανάλυση ο σκοπός ήταν να εκτιμηθεί ο επιπολασμός της πρωτογενούς αντοχής σε μη θεραπευμένους PLHIV το χρονικό διάστημα από 01/01/2003 έως 30/06/2015 στη Νότια/Κεντρική Ελλάδα, να διερευνηθεί ο τρόπος διασποράς των ανθεκτικών στελεχών των επικρατέστερων HIV-1 υπότυπων, να εκτιμηθούν οι παράγοντες που σχετίζονται με πρωτογενή αντοχή σε διαφορετικές κατηγορίες φαρμάκων, και να εκτιμηθούν επιδημιολογικοί δείκτες, όπως ο χρόνος προέλευσης (t_{MRCA}), η δυναμική της μετάδοσης και ο R_e , των επιμέρους επιδημιών των ανθεκτικών στελεχών.

12.2 Υλικό-Μέθοδοι

Για την εκτίμηση του επιπολασμού της πρωτογενούς αντοχής αναλύθηκαν 3.428 αλληλουχίες από μη θεραπευμένους PLHIV. Συγκεκριμένα, οι αλληλουχίες αυτές ήταν διαθέσιμες στο γονίδιο *pol* (PR/RT) και είχαν συλλεγεί το χρονικό διάστημα από 01/01/2003 έως 30/06/2015 στη Νότια/Κεντρική Ελλάδα. Ο υπό μελέτη πληθυσμός ($N = 3.428$) αποτελεί το 39,4% του συνόλου των PLHIV που έχουν δηλωθεί στο εθνικό σύστημα επιδημιολογικής επιτήρησης της HIV/AIDS λοίμωξης (Ε.Ο.Δ.Υ.)

το ίδιο χρονικό διάστημα ($N = 8.694$). Στον υπό μελέτη πληθυσμό οι XEN υπερεκπροσωπούνται έναντι του συνολικού πληθυσμού των PLHIV στην Ελλάδα (26,1% έναντι 16,0%), λόγω του μεγάλου αριθμού δειγμάτων που συλλέχτηκαν από XEN το διάστημα 2012-2013 στην Αθήνα στα πλαίσια του προγράμματος «ΑΡΙΣΤΟΤΕΛΗΣ» (Hatzakis et al., 2015). Αντίθετα, στον υπό μελέτη πληθυσμό οι ετεροφυλόφιλοι υποεκπροσωπούνται έναντι του συνολικού πληθυσμού των PLHIV στην Ελλάδα (14,9% έναντι 20,4%), πιθανότατα, λόγω της περιορισμένης διασύνδεσής τους στη φροντίδα (Nikolopoulos et al., 2008). Τέλος, οι MSM (44,6% έναντι 46,0%) και τα άτομα με άγνωστη κατηγορία μετάδοσης (14,1 έναντι 17,6%) εντοπίζονται περίπου στα ίδια ποσοστά στον υπο μελέτη πληθυσμό και στο συνολικό πληθυσμό των PLHIV στην Ελλάδα (Πίνακας 22, σελ. 256).

12.2.1 Εκτίμηση επιπολασμού πρωτογενούς αντοχής σε μη θεραπευμένους PLHIV

Η εκτίμηση της πρωτογενούς αντοχής πραγματοποιήθηκε με δυο μεθόδους, και συγκεκριμένα: i) με τη μέθοδο «SDRM» (Bennett et al., 2009) και ii) μέσω αλγόριθμων στη βάση δεδομένων του Stanford (HIVdb) (<http://hivdb.stanford.edu>). Ως αντοχή στην αντιρετροϊκή θεραπεία ορίστηκε η παρουσία μεταλλαγών αντοχής που οδηγούν στη μείωση της ανασταλτικής δράσης της θεραπείας στον ικό πολλαπλασιασμό (χαμηλά επίπεδα αντοχής, ενδιάμεση αντοχή, υψηλά επίπεδα αντοχής).

12.2.2 Διερεύνηση τρόπου διασποράς ανθεκτικών στελεχών στους επικρατέστερους HIV-1 υπότυπους

Τα HIV-1 στελέχη με το μεγαλύτερο επιπολασμό στον υπό μελέτη πληθυσμό ήταν οι υπότυποι B ($N = 1.215$, 35,5%) και A1 ($N = 965$, 28,2%). Ο τρόπος διασποράς των στελεχών με αντοχή εκτιμήθηκε με φυλογενετική ανάλυση, η οποία βασίστηκε στη μέθοδο της μέγιστης πιθανοφάνειας και πραγματοποιήθηκε στα προγράμματα RAxML v8.2.10 (Stamatakis, 2014) και FastTree 2 (Price et al., 2010). Συγκεκριμένα, η

φυλογενετική ανάλυση πραγματοποιήθηκε σε αλληλουχίες υπότυπου A1 (N = 235) και B (N = 86) με αναπτυγμένη αντοχή σε NNRTIs (K103N, E138A), σε αλληλουχίες PLHIV χωρίς αναπτυγμένη αντοχή που συλλέχτηκαν στη Νότια/Κεντρική Ελλάδα το χρονικό διάστημα 1998-2015 (υπότυπου A1: N = 904, υπότυπου B: N = 1.615), και σε ένα τυχαία επιλεγμένο δείγμα αλληλουχιών με παγκόσμια δειγματοληψία (υπότυπου A1: N = 5.907, υπότυπου B: N = 3.984). Ως τοπικά δίκτυα μετάδοσης ορίστηκαν οι μονοφυλετικές ομάδες οι οποίες απαρτίζονταν από τουλάχιστον 2 αλληλουχίες με ποσοστό μεγαλύτερο από 75% εξ αυτών να έχει συλλεγεί στην Ελλάδα, και SH τιμή αξιοπιστίας μεγαλύτερη από 0,90.

12.2.3 Εκτίμηση παραγόντων που σχετίζονται με πρωτογενή αντοχή σε διαφορετικές κατηγορίες φαρμάκων

Η εκτίμηση των παραγόντων που σχετίζονται με πρωτογενή αντοχή σε διαφορετικές κατηγορίες φαρμάκων πραγματοποιήθηκε με στατιστικά μοντέλα πολυπαραγοντικής λογιστικής παλινδρόμησης στο πρόγραμμα STATA 12-StataCorp LP. Συγκεκριμένα, στα μοντέλα ορίστηκε ως εξαρτημένη μεταβλητή η παρουσία ή όχι μίας συγκεκριμένης μεταλλαγής ανά άτομο με HIV-1 λοίμωξη, ενώ μεταβλητές που αφορούσαν στο φύλο, στην κατηγορία μετάδοσης, στην εθνικότητα, στον HIV-1 υπότυπο και στο χρονικό διάστημα δειγματοληψίας επιλέχθηκαν ως ανεξάρτητες.

12.2.4 Εκτίμηση επιδημιολογικών δεικτών επιμέρους επιδημιών ανθεκτικών στελεχών

Η εκτίμηση των επιδημιολογικών δεικτών [χρόνος προέλευσης (t_{MRCA}), δυναμική της μετάδοσης, R_e] πραγματοποιήθηκε στα στελέχη του υπότυπου A1 με τις κυρίαρχες μεταλλαγές αντοχής σε NNRTIs (E138A, K103N) τα οποία εντοπίστηκαν σε τοπικά δίκτυα μετάδοσης (N = 196). Συγκεκριμένα, οι δείκτες αυτοί εκτιμήθηκαν μέσω ανάλυσης μοριακού ρολογιού και φυλοδυναμικής ανάλυσης για κάθε ένα από τα πέντε τοπικά δίκτυα μετάδοσης του υπότυπου A1 τα οποία απαρτίζονταν από

περισσότερες από έξι αλληλουχίες (τέσσερα δίκτυα αλληλουχιών με E138A και ένα δίκτυο αλληλουχιών με K103N). Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε με μεθόδους Μπεϋζιανής συμπερασματολογίας σε δυο βήματα (εφαρμόζοντας διαφορετική παραμετροποίηση στα μοντέλα).

Αρχικά, το κάθε δίκτυο αναλύθηκε υπό την παραδοχή ότι ο R_0 είναι σταθερός. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε στο πρόγραμμα BEAST v1.8.0 (Drummond et al., 2012) ορίζοντας το HKY ως μοντέλο νουκλεοτιδικής αντικατάστασης, την κατανομή Γάμμα για τη διόρθωση του ρυθμού ανομοιογένειας μεταξύ των θέσεων του DNA, ένα μη συσχετισμένο χαλαρό μοντέλο μοριακού ρολογιού, και τα BDM μοντέλα για την εκτίμηση του R_0 . Δεν χρησιμοποιήθηκαν πληροφοριακές priors κατανομές για την MCMC ανάλυση, η οποία έτρεξε για 30×10^6 επαναλήψεις, με βήμα δειγματοληψίας 3.000 και burn-in 30×10^5 .

Στη συνέχεια, το κάθε δίκτυο αναλύθηκε εκ νέου χρησιμοποιώντας ως πληροφοριακές priors τις εκτιμώμενες από την προηγούμενη ανάλυση τιμές του ρυθμού μεταβάσεων/μεταστροφών του HKY μοντέλου και του χρόνου μόλυνσης του πρώτου ατόμου στο δίκτυο (origin). Σε αυτήν την ανάλυση πραγματοποιήθηκε διαχρονική εκτίμηση του R_e χρησιμοποιώντας σειριακά BDM μοντέλα στο πρόγραμμα BEAST v2.1.3 (Bouckaert et al., 2014; Stadler et al., 2013). Αναλυτικότερα, ορίστηκε ότι ο εκτιμώμενος ρυθμός μοριακού ρολογιού ακολουθεί την κανονική κατανομή, ο R_0 και ο ρυθμός μετατροπής ενός ατόμου σε μη μολυσματικό ακολουθούν μια LogNormal (0, 10,0) κατανομή, και η πιθανότητα δειγματοληψίας ακολουθεί μια Beta (0, 1,0) κατανομή. Όλες οι υπόλοιπες παράμετροι ορίστηκαν όπως και στην αρχική ανάλυση. Τέλος, η σύγκλιση των MCMC αλυσίδων και των ESS (για τα οποία ορίστηκε ως κάτω όριο το 100) ελέγχθηκε μέσω του προγράμματος Tracer v1.5. Τα δένδρα μέγιστης αξιοπιστίας εκτιμήθηκαν χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα TreeAnnotator v2.1.3, ενώ τα διαγράμματα που αναπαριστούν τις εκτιμώμενες τιμές του R_e στην πορεία του χρόνου σχεδιάστηκαν μέσω της γλώσσας προγραμματισμού R. Τέλος, η στατιστική ανάλυση για τις κατηγορικές μεταβλητές βασίστηκε στο Pearson's chi-square test και πραγματοποιήθηκε στο πρόγραμμα STATA 12-StataCorp LP, ενώ η συσχέτιση μεταξύ root-to-tip γενετικής απόστασης και χρόνου δειγματοληψίας ελέγχθηκε μέσω

εκτίμησης του συντελεστή συσχέτισης Spearman στο πρόγραμμα TempEst v1.5.1 (Rambaut et al., 2016).

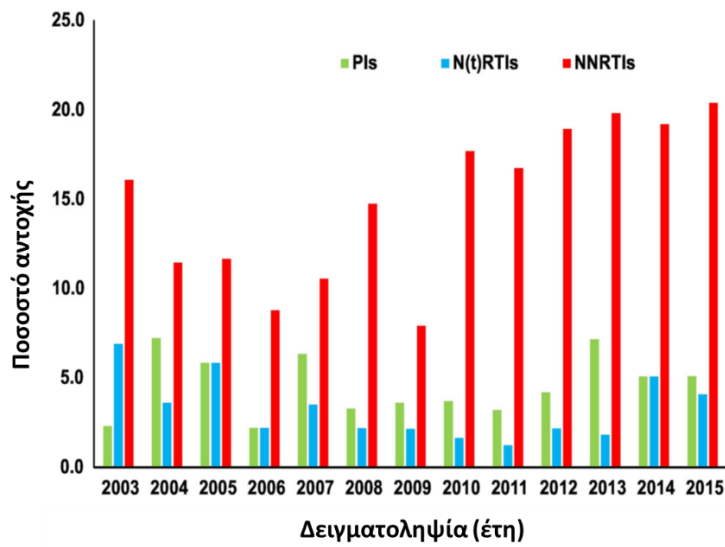
12.3 Αποτελέσματα

12.3.1 Επιπολασμός πρωτογενούς ανοχής σε μη θεραπευμένους PLHIV

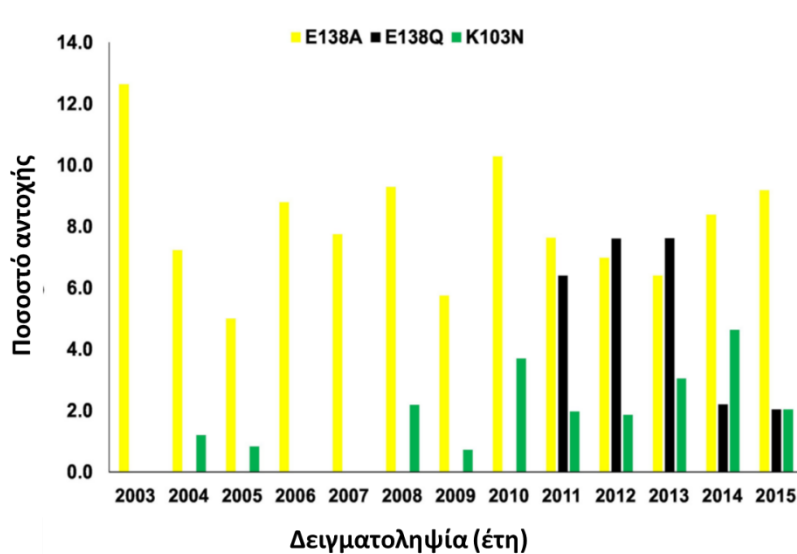
Με τη μέθοδο «SDRM», ο επιπολασμός ανοχής σε οποιαδήποτε κατηγορία φαρμάκων εκτιμήθηκε 5,98% (N = 205), με την ανοχή σε NNRTIs να παρουσιάζει τα υψηλότερα ποσοστά (N = 129, 3,76%). Η ανοχή σε NRTIs εκτιμήθηκε 2,28% (N = 78) και σε PIs 1,02% (N = 35). Μέσω αλγόριθμων στη βάση δεδομένων HIVdb, ο επιπολασμός ανοχής σε οποιαδήποτε κατηγορία εκτιμήθηκε 22,2% (N = 762/3.428). Η ανοχή σε NNRTIs παρουσίασε τα υψηλότερα ποσοστά (N = 578, 16,9%) ακολουθούμενη από την ανοχή σε PIs (N = 167, 4,9%) και NRTIs (N = 95, 2,8%). Η ανοχή σε NRTIs/NNRTIs εκτιμήθηκε 1,0% (N = 35), σε NNRTIs/PIs 1,0% (N = 35) και σε NRTIs/PIs 0,6% (N = 19).

Οι συχνότερα παρατηρούμενες μεταλλαγές ανοχής σε NNRTIs ήταν οι: E138 (N = 400, 11,7%) [E138A (N = 263, 7,7%), E138Q (N = 137, 4,0%)], K103N (N = 80, 2,3%) και V179D (N = 46, 1,3%) (Πίνακας 23, σελ. 257). Οι διαχρονικές τάσεις της εκτιμώμενης ανοχής για τις συχνότερα παρατηρούμενες μεταλλαγές σε NNRTIs αναπαρίστανται στις *Εικόνες 52A* και *B*. Ο επιπολασμός της ανοχής σε NNRTIs βρέθηκε να αυξάνεται στην πορεία του χρόνου (*Εικόνα 52A*). Αναφορικά με τις συχνότερα παρατηρούμενες μεταλλαγές ανοχής σε NNRTIs, μια αυξητική τάση παρατηρήθηκε για τις K103N και E138Q (*Εικόνα 52B*).

A



B



Εικόνα 52 Επιπολασμός αντοχής: (A) σε NNRTIs, NRTIs, PIs και (B) στις συχνότερα παρατηρούμενες μεταλλαγές σε NNRTIs στην πορεία του χρόνου. Ο πληθυσμός της μελέτης αφορούσε μη θεραπευμένους PLHIV στη Νότια/Κεντρική Ελλάδα με διαθέσιμη αλληλουχία το χρονικό διάστημα 01/01/2003-30/06/2015. Οι τιμές του άξονα Y αντιπροσωπεύουν τα έτη δειγματοληψίας των αλληλουχιών. Οι κατηγορίες φαρμάκων και οι μεταλλαγές αντοχής έχουν επισημανθεί με διαφορετικά χρώματα.

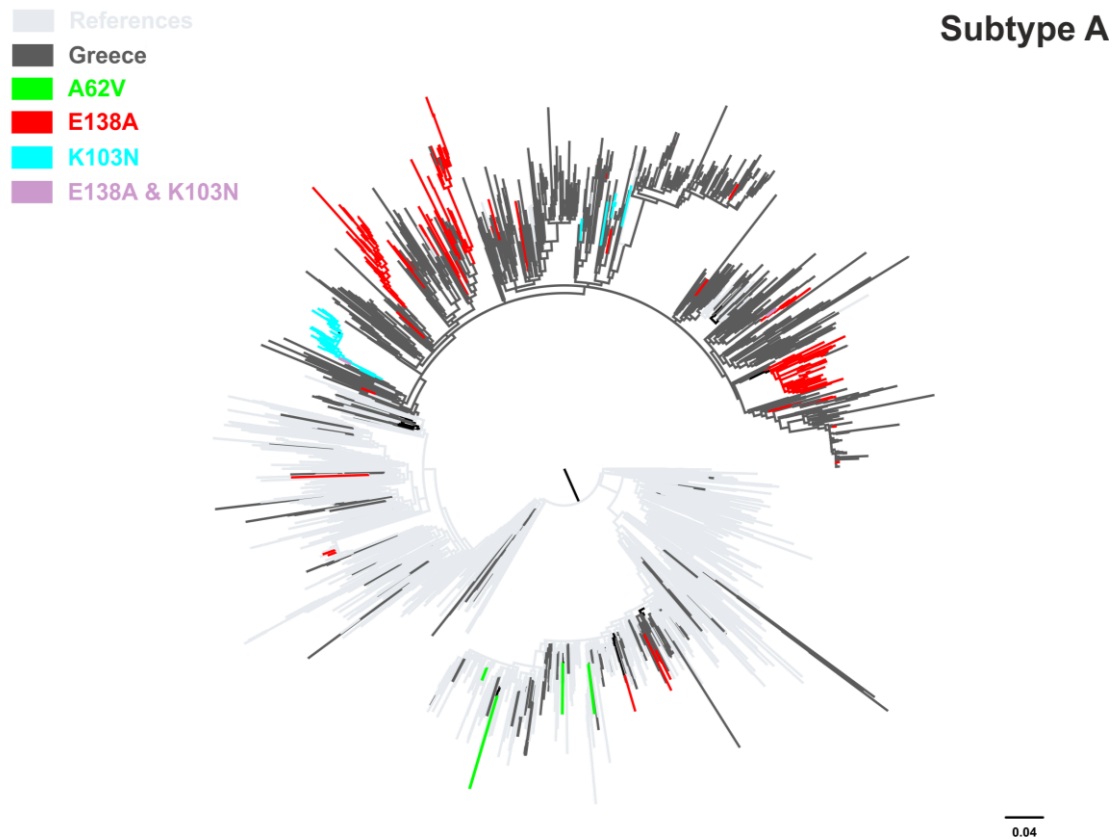
12.3.2 Τοπικά δίκτυα μετάδοσης ανθεκτικών στελεχών υπότυπων A1 και B

Η φυλογενετική ανάλυση ανέδειξε την ύπαρξη σημαντικών διαφορών μεταξύ των υπότυπων A1 και B ως προς το ποσοστό των ανθεκτικών στελεχών που εντοπίστηκαν σε τοπικά δίκτυα μετάδοσης. Συγκεκριμένα, το 89,7% (245/273) των αλληλουχιών υπότυπου A1 με κυρίαρχες μεταλλάξεις αντοχής σε NNRTIs (E138A, K103N, E138Q, V179D) βρέθηκε να ανήκει σε μονοφυλετικές ομάδες (τοπικά δίκτυα μετάδοσης που υποδηλώνουν την ύπαρξη τοπικής διασποράς) (Πίνακας 24, σελ. 258). Αναλυτικότερα, εντοπίστηκαν τρία δίκτυα με αλληλουχίες με K103N (εύρος: 2-48 αλληλουχίες) και 7 δίκτυα με αλληλουχίες με E138A (εύρος: 3-50 αλληλουχίες). Το 85,7% (48/56) των αλληλουχιών με K103N και το 82,7% (148/179) με E138A βρέθηκε σε ένα και τέσσερα δίκτυα με περισσότερες από 6 αλληλουχίες ανά δίκτυο αντίστοιχα (Εικόνα 53). Για τον υπότυπο B βρέθηκαν μικρές μονοφυλετικές ομάδες με εύρος από 2 έως 6 αλληλουχίες, καθώς και μεμονωμένες αλληλουχίες εκτός των δικτύων (Πίνακας 24, Εικόνες 54A και B). Το 68,1% (139/204) των ανθεκτικών στελεχών του υπότυπου B (E138A, K103N, E138Q, V179D) εντοπίστηκε σε μονοφυλετικές ομάδες (Πίνακας 24).

Για την αντοχή σε NRTIs βρέθηκε ότι τοπική διασπορά έχει συμβεί για το 27,3% (3/11) και το 21,6% (8/37) των αλληλουχιών υπότυπου A1 και B αντίστοιχα (Πίνακας 24). Συγκεκριμένα, όλες οι αλληλουχίες υπότυπου A1 με A62V (N = 4) εντοπίστηκαν εντός της επιμέρους επιδημίας του HIV-1 στους XEN της Ρωσίας και των χωρών της πρώην Ε.Σ.Σ.Δ. (Εικόνα 53). Αναφορικά με τις μεταλλάξεις M41L και T215rev, δεν εντοπίστηκαν σημαντικές διαφορές ως προς το ποσοστό των ανθεκτικών στελεχών σε τοπικά δίκτυα μετάδοσης (Πίνακας 24, Εικόνα 54B).

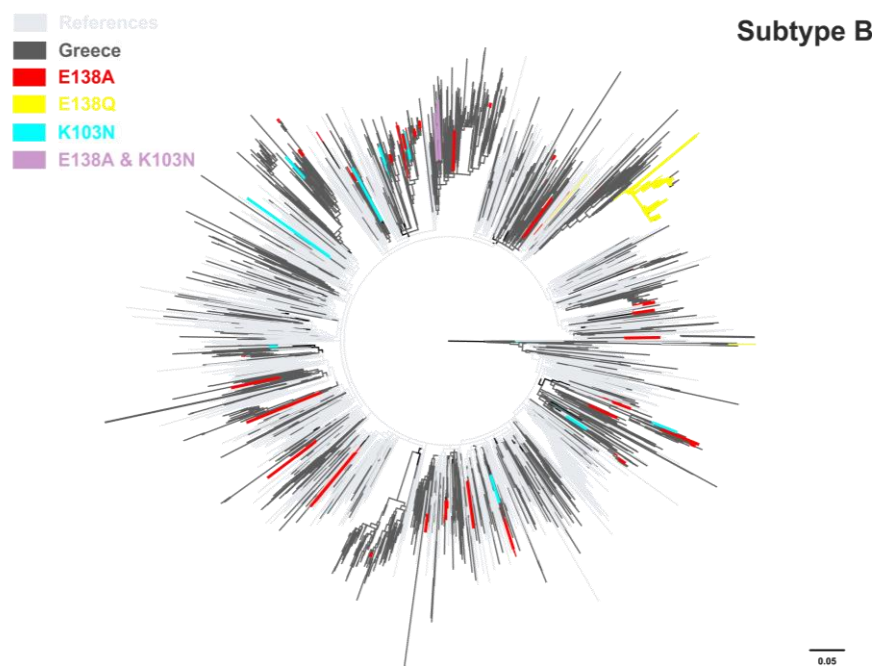
Συμπερασματικά, εντοπίστηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των NRTIs και NNRTIs ως προς τα πρότυπα μετάδοσης των ανθεκτικών στελεχών στη Νότια/Κεντρική Ελλάδα (Πίνακας 24). Με μόνη εξαίρεση τη μεταλλαγή E138Q, η οποία μεταδιδόταν μεταξύ των XEN στην Αθήνα κατά τη διάρκεια της επιμέρους επιδημίας του HIV-1, οι αλληλουχίες υπότυπου A1 με μεταλλάξεις αντοχής σε NNRTIs,

σε αντίθεση με εκείνες του υπότυπου B, ανήκουν σε μεγάλα τοπικά δίκτυα μετάδοσης (Πίνακας 24).

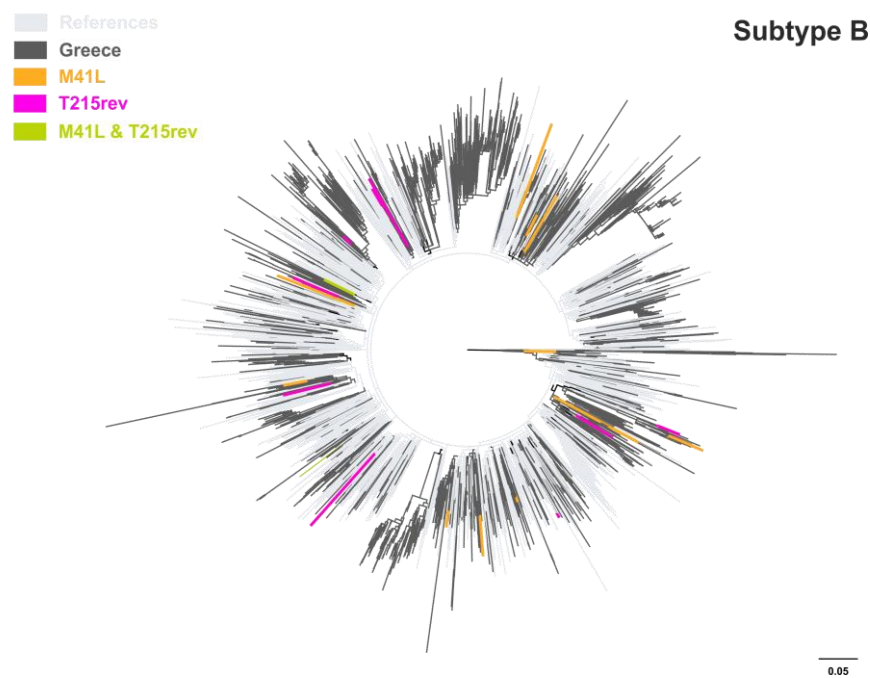


Εικόνα 53 Φυλογενετικό δένδρο αλληλουχιών HIV-1 υπότυπου A1 από Ελλάδα και με παγκόσμια δειγματοληψία, το οποίο εκτιμήθηκε με τη μέθοδο της μέγιστης πιθανοφάνειας στο πρόγραμμα RAxML v8.0.20. Οι αλληλουχίες από Ελλάδα έχουν επισημανθεί με σκούρο γκρι χρώμα, ενώ οι αλληλουχίες από άλλες χώρες/γεωγραφικές περιοχές με ανοιχτό γκρι χρώμα. Οι αλληλουχίες από Ελλάδα με μεταλλαγές αντοχής [NNRTI: K103N, E138A, E138A & K103N και NRTI: A62V] έχουν επισημανθεί με διαφορετικά χρώματα.

A



B



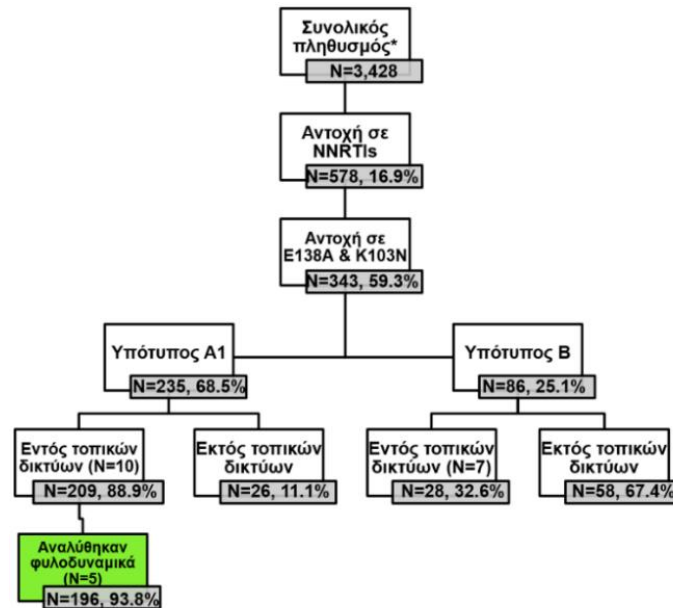
Εικόνα 54 Φυλογενετικό δένδρο αλληλουχιών HIV-1 υπότυπου B από Ελλάδα και με παγκόσμια δειγματοληψία, το οποίο εκτιμήθηκε με τη μέθοδο της μέγιστης πιθανοφάνειας στο πρόγραμμα RAxML v8.0.20. Οι αλληλουχίες από Ελλάδα έχουν επισημανθεί με σκούρο γκρι χρώμα, ενώ οι αλληλουχίες από άλλες χώρες/γεωγραφικές περιοχές με ανοιχτό γκρι χρώμα. Οι αλληλουχίες από Ελλάδα με μεταλλαγές αντοχής [(A) NNRTI: K103N, E138A, E138Q, E138A & K103N, (B) NRTI: M41L, T215rev, M41L & T215rev] έχουν επισημανθεί με διαφορετικά χρώματα.

12.3.3 Παράγοντες που σχετίζονται με πρωτογενή αντοχή σε διαφορετικές κατηγορίες φαρμάκων

Η πολυπαραγοντική ανάλυση λογιστικής παλινδρόμησης στις πιο συχνές θέσεις αντοχής έδειξε ότι οι μεταλλαγές σε NNRTIs, E138A και K103N, σχετίζονταν με MSM και υπότυπο A1. Η E138A παρατηρήθηκε συχνότερα σε PLHIV Ελληνικής εθνικότητας, ενώ η K103N σχετιζόταν με πιο πρόσφατη δειγματοληψία. Τα στελέχη με E138Q ήταν υπότυπου B και αφορούσαν σχεδόν αποκλειστικά XEN. Συγκεκριμένα, τα στελέχη αυτά αποτελούσαν το ένα εκ των τεσσάρων κύριων τοπικών δικτύων διασποράς που εντοπίστηκαν στους XEN στην Αθήνα κατά τη διάρκεια της επιμέρους επιδημίας του HIV-1. Τα στελέχη με V179D ήταν πιο συχνά στον υπότυπο A1. Συνοψίζοντας, οι πιο συχνές μεταλλαγές αντοχής σε NNRTIs (με εξαίρεση την E138Q) εντοπίζονταν συχνότερα σε άτομα που είχαν μολυνθεί με στελέχη υπότυπου A1 (Πίνακας 25, σελ. 259). Για τις μεταλλαγές σε NRTIs, η M41L βρέθηκε πιο συχνά σε γυναίκες και στον υπότυπο B, ενώ οι μεταλλαγές T215rev βρέθηκαν να σχετίζονται με ετεροφυλόφιλους και υπότυπο B (Πίνακας 26, 260).

12.3.4 Επιδημιολογικά χαρακτηριστικά επιμέρους επιδημιών A1 στελεχών με μεταλλαγές αντοχής σε NNRTIs (E138A και K103N)

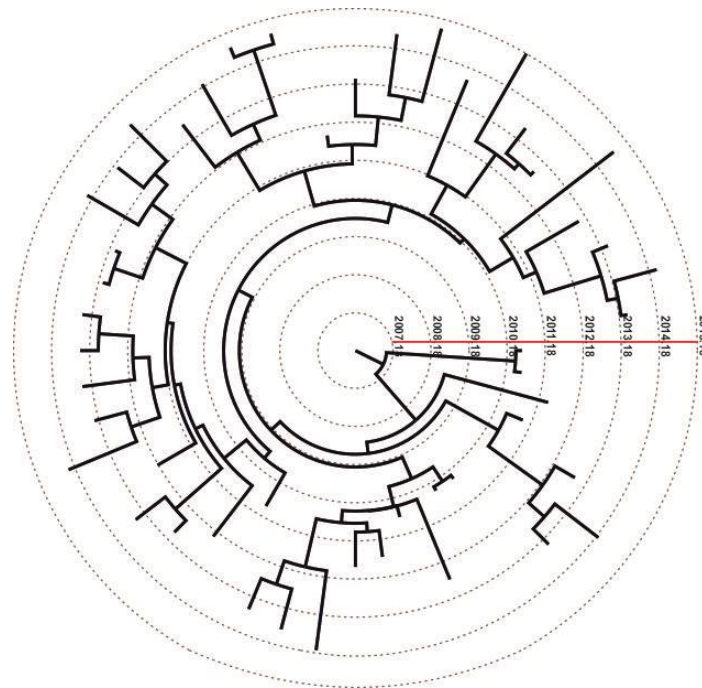
Αναλύσεις μοριακού ρολογιού και φυλοδυναμικής ανάλυσης πραγματοποιήθηκαν σε 196 στελέχη υπότυπου A1 με τις κυρίαρχες μεταλλαγές αντοχής σε NNRTIs (E138A, K103N), τα οποία σχημάτισαν πέντε τοπικά δίκτυα μετάδοσης (τέσσερα δίκτυα στελεχών με E138A και ένα δίκτυο στελεχών με K103N) (Εικόνα 55). Τα χαρακτηριστικά των μη θεραπευμένων PLHIV οι αλληλουχίες των οποίων εντοπίστηκαν εντός των παραπάνω δικτύων παρουσιάζονται αναλυτικά στον Πίνακα 27 (σελ. 261). Η πλειοψηφία των ατόμων αυτών βρέθηκε να αφορά MSM, Ελληνικής εθνικότητας (Πίνακας 27).



Εικόνα 55 Ο συνολικός πληθυσμός αντιστοιχεί σε 3.428 αλληλουχίες, οι οποίες απομονώθηκαν από μη θεραπευμένους PLHIV στη Νότια/Κεντρική Ελλάδα το χρονικό διάστημα 01/2003-06/2015. Οι κύριοι επιδημιολογικοί δείκτες [χρόνος προέλευσης (t_{MRCA}), δυναμική της μετάδοσης, ενεργός αριθμός αναπαραγωγής (R_e)] εκτιμήθηκαν μέσω αναλύσεων μοριακού ρολογιού και φυλοδυναμικής ανάλυσης για τα πέντε κύρια τοπικά δίκτυα μετάδοσης NNRTI-ανθεκτικών στελεχών (E138A, K103N) υπότυπου A1 (πράσινη επισήμανση).

Βρέθηκε σημαντική συσχέτιση μεταξύ της root-to-tip γενετικής απόστασης και του χρόνου δειγματοληψίας, η οποία υποδεικνύει την ύπαρξη σήματος μοριακού ρολογιού, στα δίκτυα: E138A_2 ($R = 0,39$, $p = 0,008$), E138A_4 ($R = 0,43$, $p = 0,008$) και K103N ($R = 0,38$, $p = 0,009$). Για τα υπόλοιπα δίκτυα (E138A_1, E138A_3) χρειάστηκε να επαναληφθεί η ανάλυση χρησιμοποιώντας αλληλουχίες αναφοράς υπότυπου A1 με δειγματοληψία στη Νότια/Κεντρική Ελλάδα το χρονικό διάστημα 2002-2003, ώστε να επιτευχθεί η ύπαρξη σήματος μοριακού ρολογιού (E138A_1: $R = 0,48$, $p = 0,014$, E138A_3: $R = 0,28$, $p = 0,037$).

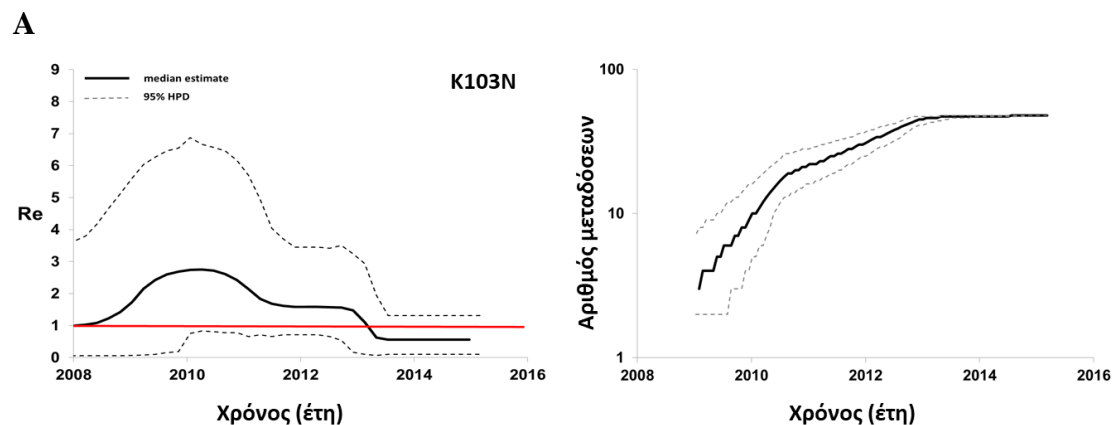
Η ανάλυση μοριακού ρολογιού έδειξε ότι ο εκτιμώμενος χρόνος προέλευσης (t_{MRC}) ήταν το 2007 (95% HPD διάστημα: 2004-2009) για το δίκτυο της K103N (Εικόνα 56) και το 1995 (95% HPD διάστημα: 1991-1999), το 1996 (95% HPD διάστημα: 1989-2000), το 1997 (95% HPD διάστημα: 1991-2001) και το 2004 (95% HPD διάστημα: 2000-2007) για τα τέσσερα δίκτυα της E138A (Πίνακας 28, σελ. 262). Τα ευρήματα αυτά υποδεικνύουν ότι τρεις από τις τέσσερις επιμέρους επιδημίες (τοπικά δίκτυα μετάδοσης) της E138A ξεκίνησαν το ίδιο περίπου χρονικό διάστημα (μεταξύ 1995 και 1997), αρκετά χρόνια πριν από σήμερα (Πίνακας 28). Αντίθετα, η προέλευση της επιμέρους επιδημίας της K103N και μιας εκ των τεσσάρων της E138A (E138A_4) εκτιμήθηκε αρκετά πιο πρόσφατα (2007 και 2004 αντίστοιχα) (Πίνακας 28).

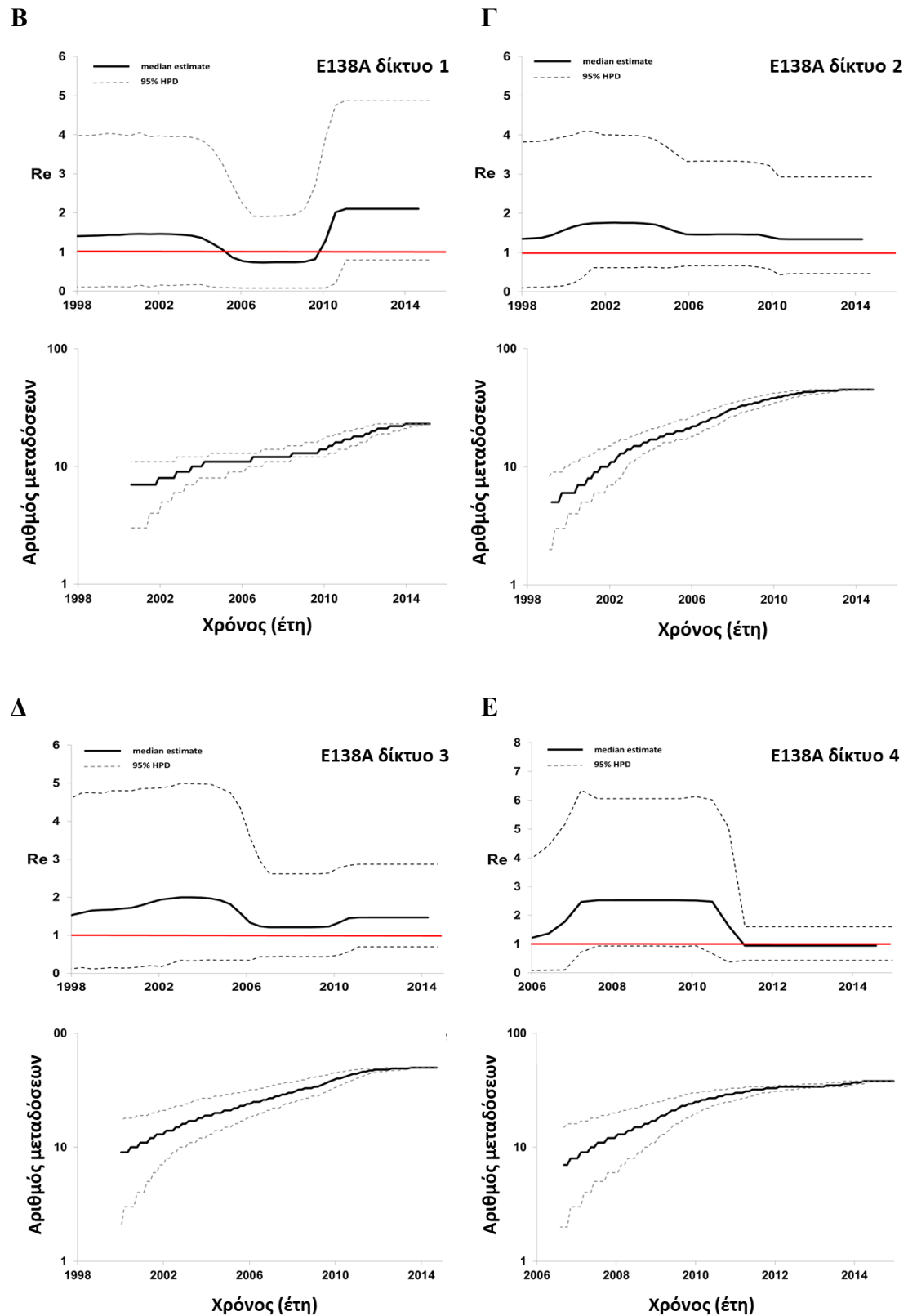


Εικόνα 56 Χρονολογημένη φυλογενετική τοπολογία (δένδρο) ενός εκ των πέντε κύριων τοπικών δικτύων μετάδοσης στελεχών υπότυπου A1 με μεταλλαγές αντοχής σε NNRTIs (K103N). Η κόκκινη γραμμή αναπαριστά τα εκτιμώμενα έτη μόλυνσης, ενώ η ρίζα του δένδρου αντιπροσωπεύει την προέλευση της επιμέρους επιδημίας της K103N. Οι διακεκομμένες γραμμές κατά μήκος του δένδρου υποδηλώνουν τις ενδιάμεσες χρονικές στιγμές μόλυνσης.

Η φυλοδυναμική ανάλυση ανέδειξε την ύπαρξη σημαντικών διαφορών μεταξύ των επιμέρους επιδημιών (τοπικών δικτύων) ως προς τη δυναμική της μετάδοσης (Πίνακας 28, Εικόνες 57A - E). Συγκεκριμένα, η κλίση της καμπύλης, που αναπαριστά τον αριθμό των μεταδόσεων στην πορεία του χρόνου, κατά την εκθετική φάση όλων των επιμέρους επιδημιών της E138A (E138A_1: 0,9, E138A_2: 3,3, E138A_3: 3,1, E138A_4: 5,5) βρέθηκε χαμηλότερη από εκείνη της επιμέρους επιδημίας της K103N (10,5). Αντίστοιχα, η υψηλότερη τιμή για τον R_e εκτιμήθηκε για την επιμέρους επιδημία της K103N (μέγιστη τιμή της διάμεσης τιμής του $R_e = 2,8$) και την πιο πρόσφατη από εκείνες της E138A (E138A_4: μέγιστη τιμή της διάμεσης τιμής του $R_e = 2,5$) (Πίνακας 28). Για τις υπόλοιπες τρεις επιμέρους επιδημίες της E138A, η μέγιστη τιμή της διάμεσης τιμής του R_e εκτιμήθηκε 1,8 (E138A_1), 2,0 (E138A_2) και 2,1 (E138A_3) (Πίνακας 28).

Επιπρόσθετα, για την επιμέρους επιδημία της K103N εκτιμήθηκε ότι ο R_e (διάμεση τιμή) ήταν μεγαλύτερος από 1 το χρονικό διάστημα 2008-06/2013, δηλαδή, για μια περίοδο σχεδόν έξι ετών (Εικόνα 57A). Το εύρημα αυτό υποδεικνύει ότι η συγκεκριμένη επιμέρους επιδημία παρέμενε ενεργή για όλο αυτό το χρονικό διάστημα. Για όλες τις επιμέρους επιδημίες της E138A, ο R_e (διάμεση τιμή) εκτιμήθηκε μεγαλύτερος από 1 για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα (1998-2015), με εξαίρεση την πιο πρόσφατη εξ αυτών (E138A_4), για την οποία εκτιμήθηκε μεγαλύτερος από 1 το χρονικό διάστημα 2006-2011 και σχεδόν ίσος με 1 μετά το 2011 (μη αυξανόμενη επιδημία), και την E138A_1, όπου εκτιμήθηκε μικρότερος από 1 το χρονικό διάστημα 2005-2010 (Εικόνες 57B - E).





Εικόνα 57 Γραφήματα που αναπαριστούν τον ενεργό αριθμό αναπαραγωγής (R_e) και τον αριθμό των μεταδόσεων σε λογαριθμική κλίμακα στην πορεία του χρόνου για τα πέντε κύρια τοπικά δίκτυα μετάδοσης NNRTI-ανθεκτικών στελεχών (E138A, K103N) του υπότυπου A1: (Α) K103N, (Β) E138A δίκτυο 1, (Γ) E138A δίκτυο 2, (Δ) E138A δίκτυο 3 και (Ε) E138A δίκτυο 4. Οι εκτιμήσεις προέκυψαν από φυλοδυναμική

ανάλυση, η οποία πραγματοποιήθηκε στα δίκτυα με το πρόγραμμα BEAST v2.1.3 χρησιμοποιώντας μοντέλα γέννησης-θανάτου (BDM). Η συνεχόμενη γραμμή αναπαριστά τη διάμεση τιμή, ενώ οι διακεκομμένες το 95% higher posterior density - HPD interval (διάστημα μέγιστης πυκνότητας ύστερης πιθανότητας).

Συνοψίζοντας, βρέθηκε ότι παρόλο που η προέλευση όλων των επιμέρους επιδημιών της E138A εκτιμήθηκε αρκετά χρόνια πριν από σήμερα, ο αριθμός των μεταδόσεων τους αυξήθηκε τα τελευταία χρόνια, και συγκεκριμένα το χρονικό διάστημα μεταξύ 2011 και 2015 (Εικόνες 57B - Δ), με εξαίρεση την πιο πρόσφατη επιμέρους επιδημία (E138A_4), η οποία το διάστημα αυτό παρέμεινε σε ενδημική κατάσταση ($R_e \sim 1$) (Εικόνα 57E). Επιπρόσθετα, η επιμέρους επιδημία της K103N και η πιο πρόσφατη της E138A (E138A_4) παρουσιάζουν κοινά χαρακτηριστικά, τα οποία αφορούν πρόσφατο χρόνο προέλευσης, υψηλότερη κλίση της καμπύλης του αριθμού των μεταδόσεων κατά την εκθετική φάση, υψηλότερο R_e και πτωτική τάση του αριθμού των μεταδόσεων το χρονικό διάστημα 2014-2015. Οι υπόλοιπες τρεις επιμέρους επιδημίες της E138A δείχνουν μια σχετικά σταθερή αύξηση του αριθμού των μεταδόσεων τους που διήρκησε μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα.

Για να διερευνηθεί η πιθανότητα ύπαρξης διαφορών μεταξύ των πληθυσμών των πέντε κύριων τοπικών δικτύων μετάδοσης (επιμέρους επιδημιών) ως προς τα χαρακτηριστικά τους, πραγματοποιήθηκαν δυο συγκρίσεις μεταξύ: (i) των πληθυσμών των πέντε δικτύων (Πίνακας 27) και (ii) των πληθυσμών των δικτύων K103N και E138A_4 και των δικτύων E138A_1, E138A_2 και E138A_3 (Πίνακας 29, σελ. 263). Η ομαδοποίηση των πληθυσμών των δικτύων K103N και E138A_4 πραγματοποιήθηκε λόγω των κοινών χαρακτηριστικών τους έναντι των υπολοίπων. Διαπιστώθηκε ότι η κατανομή της κατηγορίας μετάδοσης και της εθνικότητας μεταξύ των πληθυσμών ήταν διαφορετική και στις δύο συγκρίσεις (Πίνακες 27 και 29). Ωστόσο, δεδομένου του υψηλού ποσοστού ελλειπουσών τιμών ως προς την εθνικότητα, δε μπορούν να διεξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα σχετικά με το χαρακτηριστικό αυτό. Αναφορικά με την κατηγορία μετάδοσης, βρέθηκε ότι το ποσοστό των MSM στα δίκτυα K103N και E138A_4 (77,9%) ήταν υψηλότερο συγκριτικά με τα υπόλοιπα (69,1%) ($p < 0,05$) (Πίνακας 29). Επίσης, στα δίκτυα E138A_1, E138A_2 και E138A_3 βρέθηκε υψηλότερο ποσοστό ετεροφυλόφιλων (11,8%) (Πίνακας 29).

12.4 Συμπεράσματα

Η λίστα της μεθόδου «SDRM» δεν έχει ενημερωθεί από το 2009, και, ως εκ τούτου, δεν είναι δυνατό να εντοπιστεί η αντοχή στα νεότερα φάρμακα σε μη θεραπευμένους PLHIV. Για τον λόγο αυτό, η παρούσα ανάλυση εστίασε σε όλες τις μεταλλαγές που σχετίζονται με αντοχή στην PR και την RT. Συγκεκριμένα, εκτιμήθηκε ο επιπολασμός της πρωτογενούς αντοχής σε PIs, NRTIs και NNRTIs.

Ο επιπολασμός της πρωτογενούς αντοχής με τη μέθοδο «SDRM» στη Νότια/Κεντρική Ελλάδα (5,9%) βρέθηκε μικρότερος από εκείνον της μεταδιδόμενης αντοχής (8,3%) που είχε εκτιμηθεί σε άτομα με πρόσφατη διάγνωση HIV-1 από 26 Ευρωπαϊκές χώρες το χρονικό διάστημα 2008-2010 (Hofstra et al., 2016). Επίσης, βρέθηκε μικρότερος και από εκτιμήσεις προηγούμενων μελετών, οι οποίες πραγματοποιήθηκαν στο σύνολο των αλληλουχιών (RT με ή χωρίς PR) που ήταν διαθέσιμες σε βάσεις δεδομένων το χρονικό διάστημα 2000-2013, που έδειξαν ότι στην Ευρώπη είναι 9,4% (Rhee et al., 2015a; Rhee et al., 2015b). Αναφορικά με την Ελλάδα, ο επιπολασμός της πρωτογενούς αντοχής με τη μέθοδο «SDRM» είχε εκτιμηθεί 12,5% το διάστημα 2000-2007 και 21,8% το διάστημα 2009-2011 στη Βόρεια Ελλάδα (Antoniadou et al., 2014; Skoura et al., 2013), ποσοστά πολύ υψηλότερα από τις εκτιμήσεις της παρούσας ανάλυσης για τη Νότια/Κεντρική Ελλάδα (6,9% το διάστημα 2003-2007 και 4,7% το διάστημα 2009-2011). Οι παρατηρούμενες διαφορές στην Ελλάδα πιθανότατα οφείλονται στην ύπαρξη ανθεκτικών στελεχών (T215C, Y181C) που σχετίζονται με τοπική διασπορά στη Βόρεια Ελλάδα (Antoniadou et al., 2014; Skoura et al., 2013) και έχουν ιδιαίτερα μικρό επιπολασμό στην υπόλοιπη χώρα.

Εστιάζοντας σε όλες τις μεταλλαγές που σχετίζονται με αντοχή στην PR και την RT, ο επιπολασμός της πρωτογενούς αντοχής εκτιμήθηκε σημαντικά μεγαλύτερος. Συγκεκριμένα, εκτιμήθηκαν υψηλότερα ποσοστά αντοχής σε NNRTIs λόγω του υψηλού επιπολασμού τριών μεταλλαγών που σχετίζονται με μεταδόσεις μεταξύ MSM, υπότυπο A1 και πιο πρόσφατη διάγνωση. Τα ευρήματα αυτά υποδηλώνουν ότι τα

«efavirenz» και «rilpivirine», πιθανότατα, δε μπορούν να συνιστώνται ως αρχικά θεραπευτικά σχήματα για ένα μεγάλο ποσοστό νεοδιαγνωσθέντων PLHIV στην Ελλάδα. Δεδομένου ότι μέχρι σήμερα δεν υπάρχουν ευρήματα που να υποδεικνύουν την ύπαρξη αντοχής σε InSTIs (Integrase Strand Transfer Inhibitors), και ότι από την παρούσα ανάλυση δεν ανιχνεύθηκαν υψηλά επίπεδα αντοχής σε PIs και NRTIs, τα σχήματα με PIs και InSTIs προτιμώνται ως αρχικά θεραπευτικά σχήματα στην Ελλάδα.

Αναφορικά με τα πρότυπα διασποράς, η φυλογενετική ανάλυση των αλληλουχιών με τις κυρίαρχες μεταλλάξεις αντοχής έδειξε ότι η πρωτογενής αντοχή σε NNRTIs είναι υψηλή στη Νότια/Κεντρική Ελλάδα, κυρίως, λόγω των μεταδόσεων μεταξύ των μη θεραπευμένων PLHIV που πραγματοποιούνται σε τοπικό επίπεδο. Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι τα παραπάνω ισχύουν σε παγκόσμια κλίμακα (Brenner et al., 2008; Drescher et al., 2014; Mbisa et al., 2015; Mourad et al., 2015). Επιπρόσθετα, βρέθηκε ότι οι κυρίαρχες μεταλλάξεις στα NNRTIs (E138A, K103N) σχετίζονταν με μεταδόσεις μεταξύ MSM και υπότυπο A1, ενώ η E138Q εντοπιζόταν σε XEN. Τα στελέχη που μόλυναν τους XEN κατά τη διάρκεια της επιμέρους επιδημίας στην Αθήνα έχει δείχθει ότι προέρχονταν από το Αφγανιστάν/Ιράν (CRF35_AD), τη Ρουμανία (CRF14_BG) και την Ελλάδα (υπότυποι A1 και B) (Paraskevis et al., 2013, Paraskevis et al., 2015). Ο αριθμός των στελεχών με K103N και E138Q, σε αντίθεση με εκείνων με E138A, παρουσιάζει σημαντική αύξηση τα τελευταία χρόνια, γεγονός που υποδηλώνει, αφενός, την πρόσφατη μετάδοση της K103N σε τοπικά δίκτυα MSM και, αφετέρου, ότι η E138A είχε υψηλό επιπολασμό για μεγάλο χρονικό διάστημα. Όσον αφορά στον επιπολασμό των μεταλλαγών αντοχής E138, συστηματική ανασκόπηση, που πραγματοποιήθηκε σε μη θεραπευμένους PLHIV με υψηλό επιπολασμό σε υπότυπο C (6,1%), έδειξε ότι η E138A/G/K/Q/R εντοπίστηκε σε ποσοστό 2,9% (95% διάστημα εμπιστοσύνης: 1,8%-4,4%) (Calvez et al., 2016). Σε αντίθεση με τα NNRTIs, η αντοχή σε NRTIs διατηρείται σε χαμηλά επίπεδα λόγω του περιορισμένου αριθμού μεταδόσεων μεταξύ των μη θεραπευμένων PLHIV σε τοπικό επίπεδο. Συγκεκριμένα, τα ανθεκτικά στελέχη με A62V βρέθηκε ότι εισήχθησαν από πολλαπλές πηγές με προέλευση τη Ρωσία και τις χώρες της πρώην Ε.Σ.Σ.Δ., αλλά δεν προκάλεσαν περαιτέρω μεταδόσεις στην Ελλάδα.

Συνοψίζοντας, η φυλογενετική ανάλυση έδειξε ότι οι μεταλλαγές σε NNRTIs μεταδίδονται σε τοπικά δίκτυα. Επίσης, η στατιστική ανάλυση με μοντέλα λογιστικής παλινδρόμησης ανέδειξε την ύπαρξη σημαντικών διαφορών στους παράγοντες που σχετίζονται με τη διασπορά των στελεχών με μεταλλαγές σε NRTIs και NNRTIs. Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω ευρήματα, οι μεταλλαγές αντοχής σε NRTIs αποτελούν μεμονωμένες μεταδόσεις στελεχών υπότυπου B, πιθανόν, από άτομα που είχαν αποτύχει σε θεραπεία. Αντίθετα, ο υψηλότερος επιπολασμός της αντοχής σε NNRTIs οφείλεται σε μεταδόσεις που πραγματοποιούνταν εντός δικτύων μετάδοσης MSM στον υπότυπο A1. Το φαινόμενο αυτό είναι πιο συχνό στον υπότυπο A1 απ' ό τι στον υπότυπο B, γεγονός που οφείλεται, πιθανόν, στην υψηλότερη συμπεριφορά κινδύνου των ατόμων που έχουν μολυνθεί με στελέχη υπότυπου A1. Το παραπάνω συμπέρασμα δε μπορεί να τεκμηριωθεί λόγω έλλειψης δεδομένων που αφορούν τη συμπεριφορά κινδύνου του υπό μελέτη πληθυσμού, και, κατά συνέπεια, χρήζει περαιτέρω διερεύνησης.

Τα νεότερα φάρμακα έχουν βελτιωμένα χαρακτηριστικά και, ως εκ τούτου, σημαντικά υψηλότερα ποσοστά ανταπόκρισης και χαμηλότερα επίπεδα επίκτητης αντοχής μεταξύ των θεραπευμένων PLHIV με ανιχνεύσιμο ιικό φορτίο. Αυτό αφορά κατά κύριο λόγο στις χώρες υψηλού κοινωνικοοικονομικού προφίλ, όπου τα νεότερα φάρμακα χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία του HIV-1. Αντίθετα, στις χώρες όπου χρησιμοποιούνται διαφορετικοί συνδυασμοί ART, ο επιπολασμός της επίκτητης αντοχής παραμένει υψηλός (TenoRes, 2016). Το παράδοξο αυτό μπορεί να εξηγηθεί από το γεγονός ότι οι μεταδόσεις πραγματοποιούνται μεταξύ των μη θεραπευμένων PLHIV, με αποτέλεσμα τα επίπεδα αντοχής σε αυτόν τον πληθυσμό να παραμένουν υψηλά. Τα υψηλά επίπεδα τοπικής διασποράς μεταξύ των μη θεραπευμένων PLHIV εξηγούν τον υψηλό επιπολασμό πρωτογενούς αντοχής παρά τα χαμηλά ποσοστά αποτυχίας στην ART και, συνεπώς, και τα χαμηλά ποσοστά ανάπτυξης αντοχής σε θεραπευμένους PLHIV. Αυτό αφορά κυρίως στις μεταλλαγές στα NNRTIs, οι οποίες μπορούν να παραμείνουν για μεγαλύτερες χρονικές περιόδους απουσία επιλεκτικής πίεσης των αντιρετροϊκών φαρμάκων (Yang et al., 2015a; Yang et al., 2015b). Προηγούμενες μελέτες, σε Ευρώπη, Αμερική και άλλες περιοχές, ανέφεραν ότι οι περισσότερες αλληλουχίες με μεταλλαγές αντοχής από μη θεραπευμένους PLHIV βρέθηκαν σε μονοφυλετικές ομάδες, γεγονός που υποδηλώνει την ύπαρξη τοπικών

δικτύων μεταδιδόμενης αντοχής (Antoniadou et al. 2014; Castor et al., 2012; Mourad et al., 2015; Pineda-Pena et al., 2013; Rhee et al., 2015b; Zhao et al., 2015).

Στην παρούσα ανάλυση εκτιμήθηκαν, επιπρόσθετα, τα επιδημιολογικά χαρακτηριστικά των δικτύων της μεταδιδόμενης αντοχής με μεθόδους φυλοδυναμικής ανάλυσης, η οποία χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της δυναμικής της μετάδοσης, που αποτελεί μια προσέγγιση της αθροιστικής επίπτωσης. Συγκεκριμένα, αναλύοντας στελέχη μη θεραπευμένων PLHIV με τις κυρίαρχες μεταλλαγές αντοχής σε NNRTIs που εντοπίστηκαν σε τοπικά δίκτυα μετάδοσης υπότυπου A1, εκτιμήθηκε η χρονική προέλευση και η δυναμική της μετάδοσης, παρέχοντας μια πληρέστερη εικόνα για τις επιμέρους επιδημίες της μεταδιδόμενης αντοχής. Η ανάλυση επικεντρώθηκε μόνο στα δίκτυα του υπότυπου A1, διότι τα στελέχη με τις κυρίαρχες μεταλλαγές αντοχής εντοπίστηκαν σε δίκτυα μετάδοσης με περισσότερες από έξι αλληλουχίες που ανήκαν μόνο σε αυτόν τον υπότυπο [με μοναδική εξαίρεση το δίκτυο των στελεχών με E138Q του υπότυπου B, το οποίο αφορούσε XEN και είχε ήδη μελετηθεί (Paraskevis et al., 2015)].

Για τον υπότυπο A1 βρέθηκε ότι εκτός από ένα δίκτυο (E138A_4), όλα τα υπόλοιπα δίκτυα της E138A δημιουργήθηκαν πριν από περίπου 15 χρόνια. Για το δίκτυο της K103N εκτιμήθηκε ότι είναι αρκετά πιο πρόσφατο. Τα ευρήματα αυτά υποδηλώνουν, αφενός, ότι τα δίκτυα της E138A δημιουργήθηκαν πολλά χρόνια πριν από τη χρήση του «rilpivirine» στην κλινική πράξη (Wensing et al., 2017), και, αφετέρου, ότι μεταλλαγές αντοχής όπως η E138A μπορούν να πολλαπλασιαστούν απουσία επιλεκτικής πίεσης των αντιρετροϊκών φαρμάκων ως αποτέλεσμα μεταδόσεων μεταξύ μη θεραπευμένων PLHIV (Yang et al., 2015a). Η δυναμική της μετάδοσης έδειξε ότι ενώ αρχικά οι πιο πρόσφατες επιμέρους επιδημίες (K103N, E138A_4) επεκτάθηκαν με υψηλότερους ρυθμούς (υψηλότερη κλίση της καμπύλης μεταδόσεων και R_e) συγκριτικά με τις προγενέστερες (E138A_1, E138A_2, E138A_3), τα τελευταία χρόνια ήταν ανενεργές ή παρέμειναν σε ενδημική φάση ($R_e < 1$ ή $R_e = 1$), σε αντίθεση με τις προγενέστερες οι οποίες παρέμειναν ενεργές ($R_e > 1$). Τα ευρήματα αυτά υποδεικνύουν ότι οι πιο πρόσφατες επιμέρους επιδημίες δεν είναι δεδομένο ότι θα συνεχίσουν να επεκτείνονται έναντι των προγενέστερων, οι οποίες έδειξαν

υψηλότερες δυνατότητες και συνέχισαν να εξαπλώνονται παρόλο που δημιουργήθηκαν πριν από περίπου 15 χρόνια. Συνεπώς, η γνώση μόνο του χρόνου προέλευσης μιας επιδημίας δεν είναι αρκετή. Η εκτίμηση της δυναμικής της μετάδοσής είναι απαραίτητη και μπορεί να λειτουργήσει συμπληρωματικά ώστε να παρέχει μια πληρέστερη εικόνα για την επιδημία.

Ένα πιθανό μειονέκτημα της ανάλυσης είναι ότι οι XEN υπερεκπροσωπούνται στον υπό μελέτη πληθυσμό. Δεδομένου, όμως, ότι ο επιπολασμός της E138Q στους XEN ήταν 14,7%, και ότι τα στελέχη των XEN με E138Q εντοπίστηκαν σε ένα τοπικό δίκτυο μετάδοσης στο οποίο δεν υπήρχαν στελέχη με άλλες μεταλλάξεις, προκύπτει το συμπέρασμα ότι η υπερεκπροσώπηση των XEN δεν εισάγει κάποιο σφάλμα στα αποτελέσματα.

Η επιτήρηση της αντοχής είναι καίριας σημασίας για την επιλογή του αρχικού θεραπευτικού σχήματος και συνίσταται από τις τρέχουσες οδηγίες (DHHS Panel on Antiretroviral Guidelines for Adults and Adolescents, 2016; Ryom et al., 2016; Vandamme et al., 2011). Η μοριακή επιτήρηση της αντοχής είναι επίσης σημαντική από σκοπιά δημόσιας υγείας, διότι μέσω της διερεύνησης του τρόπου διασποράς και της εκτίμησης επιδημιολογικών δεικτών των ανθεκτικών στελεχών (όπως ο R_e) μπορούν να εντοπιστούν οι πληθυσμοί στους οποίους πρέπει να γίνει παρέμβαση κατά προτεραιότητα, και με αυτόν τον τρόπο να περιοριστεί σημαντικά η περαιτέρω μετάδοση των ανθεκτικών στελεχών. Για παράδειγμα, αν και η άμεση έναρξη θεραπείας συνιστάται για όλους τους PLHIV (European AIDS Clinical Society Guidelines, 2017), η γνώση των ενεργών επιδημιών του ιού μπορεί να ενισχύσει την αποτελεσματικότητα των παρεμβάσεων (εκτός από την πρώιμη έναρξη ART) στοχεύοντας σε άτομα με HIV-1 λοίμωξη και τους συντρόφους τους. Ο R_e και η δυναμική της μετάδοσης μπορούν να υποδείξουν ποιες επιδημίες είναι ενεργές ($R_e > 1$) και ποιες όχι ($R_e < 1$) (Antoniadou et al., 2014).

Πίνακας 22 Δημογραφικά χαρακτηριστικά μη θεραπευμένων PLHIV με διαθέσιμη αλληλουχία το χρονικό διάστημα 01/01/2003-30/06/2015 στη Νότια/Κεντρική Ελλάδα.

	Αριθμός	Ποσοστό (%)
Φύλο		
Άνδρας	2.927	85,4
Γυναίκα	498	14,5
Άγνωστο	3	0,1
Κατηγορία μετάδοσης		
MSM ¹	1.530	44,6
XEN ²	896	26,1
Ετεροφυλόφιλοι	511	14,9
Άλλη	10	0,3
Άγνωστη	481	14,1
Εθνικότητα		
Ελληνική	1.913	55,8
Μη Ελληνική	496	13,9
Άγνωστη	1.039	30,3
Σύνολο	3.428	100

¹ MSM, Men who have Sex with Men

² XEN, Χρήστες Ενδοφλέβιων Ναρκωτικών

Πίνακας 23 Επιπολασμός πρωτογενούς αντοχής σε μη θεραπευμένους PLHIV με διαθέσιμη αλληλουχία το χρονικό διάστημα 01/01/2003-30/06/2015 στη Νότια/Κεντρική Ελλάδα.

Συνολικός πληθυσμός (N = 3.428)		
Μεταλλαγές αντοχής	Αριθμός αλληλουχιών	Ποσοστό (%)
NNRTIs¹		
E138others	29	0,9
E138A	263	7,7
E138Q	137	4,0
Υποσύνολο E138	416	12,1
K103N	80	2,3
V179D	46	1,3
NRTIs²		
T215rev	21	0,6
M41L	26	0,8
M184V	17	0,5
PIs³		
V82A	10	0,3
L90M	8	0,2

¹ NNRTIs, Non-Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors

² NRTIs, Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors

³ PIs, Protease Inhibitors

Πίνακας 24 Κατανομή αλληλουχιών με μεταλλαγές αντοχής σε NNRTIs και NRTIs και δειγματοληψία το χρονικό διάστημα 01/01/2003-30/06/2015 στη Νότια/Κεντρική Ελλάδα στους HIV-1 υπότυπους A1 και B, συνολικά και ως προς τον εντοπισμό τους σε τοπικά δίκτυα μετάδοσης.

Υπότυπος A1			Υπότυπος B		
	Αριθμός αλληλουχιών	Αλληλουχίες σε δίκτυα (N, %)		Αριθμός αλληλουχιών	Αλληλουχίες σε δίκτυα (N, %)
NNRTIs¹			NNRTIs¹		
E138A	179	156 (87,2)	E138A	68	24 (36,8)
K103N	56	53 (94,6)	K103N	18	4 (22,2)
E138Q	0	0 (0,0)	E138Q	113	111 (98,2)
V179D	38	36 (94,7)	V179D	5	0 (0,0)
Σύνολο	273	245 (89,7)	Σύνολο	204	139 (68,1)
NRTIs²			NRTIs²		
A26V	4	0 (0,0)	A26V	2	0 (0,0)
M41L	3	0 (0,0)	M41L	21	6 (28,6)
T215rev	4	3 (75,0)	T215rev	14	2 (14,3)
Σύνολο	11	3 (27,3)	Σύνολο	37	8 (21,6)

¹ NNRTIs, Non-Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors

² NRTIs, Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors

Πίνακας 25 Παράγοντες που σχετίζονται με πρωτογενή αντοχή σε NNRTIs σε μη θεραπευμένους PLHIV με διαθέσιμη αλληλουχία το χρονικό διάστημα 01/01/2003-30/06/2015 στη Νότια/Κεντρική Ελλάδα.

NNRTIs ¹	E138A		E138Q		K103N		V179D	
	OR ²	p-value	OR	p-value	OR	p-value	OR	p-value
Φύλο (†Άνδρας)								
Γυναίκα	0,81	0,448	0,72	0,420	0,64	0,384	3,18	0,052
Άγνωστο	-	-	-	-	-	-	-	-
Κατηγορία μετάδοσης (†MSM³)								
Ετεροφυλόφιλοι	0,91	0,685	-	-	0,55	0,212	0,37	0,114
XEN ⁴	0,25	<0,001	594,0	<0,001	0,18	0,004	0,39	0,103
Άλλη	-	-	-	-	7,12	0,078	-	-
Άγνωστη	0,84	0,400	3,89	0,146	1,13	0,687	0,60	0,235
Εθνικότητα (†Ελληνική)								
Μη Ελληνική	0,56	0,047	1,72	0,132	2,0	0,112	0,29	0,235
Άγνωστη	0,63	0,008	0,2	0,002	1,03	0,920	0,60	0,179
HIV-1 Υπότυπος (†B)								
A1	3,94	<0,001	-	-	4,66	<0,001	10,06	<0,001
Ανασυνδυασμένος τύπος	0,28	0,001	0,006	<0,001	0,63	0,397	0,31	0,299
Άλλος	0,51	0,105	0,03	<0,001	0,36	0,193	2,21	0,350
Δειγματοληψία (†[2003-2012])								
[2012-06/2015]	1,48	0,112	3,04	0,004	2,75	<0,001	1,91	<0,001

[†] Κατηγορία αναφοράς

² OR, Odds Ratio (λόγος συμπληρωματικών πιθανοτήτων)

⁴ XEN, Χρήστες Ενδοφλέβιων Ναρκωτικών

¹ NNRTIs, Non-Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors

³ MSM, Men who have Sex with Men

Πίνακας 26 Παράγοντες που σχετίζονται με πρωτογενή αντοχή σε NRTIs σε μη θεραπευμένους PLHIV με διαθέσιμη αλληλουχία το χρονικό διάστημα 01/01/2003-30/06/2015 στη Νότια/Κεντρική Ελλάδα.

NRTIs ¹	M41L		M184V		T215rev	
	OR ²	p-value	OR	p-value	OR	p-value
Φύλο (†Ανδρας)						
Γυναίκα	7,39	0,018	2,25	0,248	0,69	0,609
Άγνωστο	-	-	-	-	-	-
Κατηγορία μετάδοσης (†MSM³)						
Ετεροφυλόφιλοι	0,43	0,344	0,66	0,661	3,86	0,020
XEN ⁴	0,13	0,090	0,17	0,130	-	-
Άλλη	-	-	19,4	0,014	-	-
Άγνωστη	0,27	0,150	1,36	0,624	1,68	0,451
Εθνικότητα (†Ελληνική)						
Μη Ελληνική	2,24	0,157	0,64	0,711	0,26	0,200
Άγνωστη	1,16	0,789	4,15	0,041	0,17	0,011
HIV-1 Υπότυπος (†B)						
A1	0,15	0,002	0,62	0,504	0,31	0,043
Ανασυνδυασμένος τύπος	0,08	0,019	2,98	0,067	0,53	0,340
Άλλος	0,11	0,041	0,56	0,605	-	-
Δειγματοληψία (†[2003-2012])						
[2012-06/2015]	0,65	0,400	1,02	0,973	1,93	0,175

[†] Κατηγορία αναφοράς

² OR, Odds Ratio (λόγος συμπληρωματικών πιθανοτήτων)

⁴ XEN, Χρήστες Ενδοφλέβιων Ναρκωτικών

¹ NRTIs, Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors

³ MSM, Men who have Sex with Men

Πίνακας 27 Δημογραφικά χαρακτηριστικά μη θεραπευμένων PLHIV με διαθέσιμη αλληλουχία το χρονικό διάστημα 01/01/2003-30/06/2015 στη Νότια/Κεντρική Ελλάδα οι οποίοι είχαν μολυνθεί σε τοπικά δίκτυα μετάδοσης NNRTI-ανθεκτικών στελεχών HIV-1 υπότυπου A1.

Τοπικά δίκτυα μετάδοσης NNRTIs ¹	K103N (N, %)	E138A 1 (N, %)	E138A 2 (N, %)	E138A 3 (N, %)	E138A 4 (N, %)	p-value
Αριθμός αλληλουχιών						
	48 (24,5)	22 (11,2)	38 (19,4)	50 (25,5)	38 (19,4)	
Φύλο						
						0,159
Ανδρας	48 (100)	21 (95,5)	36 (94,7)	50 (100)	37 (97,4)	
Γυναίκα	0 (0,0)	1 (4,5)	2 (5,3)	0 (0,0)	1 (2,6)	
Κατηγορία μετάδοσης						
						0,046
MSM ²	35 (72,9)	13 (59,1)	24 (63,2)	39 (78,0)	32 (84,2)	
Ετεροφυλόφιλοι	1 (2,1)	5 (22,7)	5 (13,2)	3 (6,0)	0 (0,0)	
XEN ³	1 (2,1)	0 (0,0)	1 (2,6)	3 (6,0)	1 (2,6)	
Άλλη/Άγνωστη	11 (22,9)	4 (18,2)	8 (21,0)	5 (10,0)	5 (13,2)	
Εθνικότητα						
						0,020
Ελληνική	21 (43,8)	12 (54,6)	27 (71,1)	37 (74)	21 (55,3)	
Μη Ελληνική	2 (4,2)	0 (0,0)	3 (7,9)	1 (2,0)	1 (2,6)	
Άγνωστη	25 (52,0)	10 (45,4)	8 (21,0)	12 (24,0)	16 (42,1)	

¹ NNRTIs, *Non-Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors*

² MSM, *Men who have Sex with Men*

³ XEN, *Χρήστες Ενδοφλέβιων Ναρκωτικών*

Πίνακας 28 Επιδημιολογικοί δείκτες τοπικών δικτύων μετάδοσης NNRTI-ανθεκτικών στελεχών HIV-1 υπότυπου A1 με δειγματοληψία το χρονικό διάστημα 01/01/2003-30/06/2015 στη Νότια/Κεντρική Ελλάδα.

	Χρόνος προέλευσης (t_{MRC}) ¹		R_e ²	CV ³
	Αριθμός αλληλουχιών	Διάμεση τιμή (95% HPD ⁴)	Μέγιστη διάμεση τιμή	Διάμεση τιμή (95% HPD ⁴)
Δίκτυο μετάδοσης NNRTIs⁵				
K103N	48	2007 (2004-2009)	2,8	0,25 (0,00002-0,68)
E138A 1	22	1995 (1991-1999)	2,1	1,10 (0,57-1,72)
E138A 2	38	1996 (1989-2000)	1,8	0,73 (0,47-1,04)
E138A 3	50	1997 (1991-2001)	2,0	0,84 (0,48-1,24)
E138A 4	38	2004 (2000-2007)	2,5	0,58 (0,20-0,95)

¹ t_{MRC} , time to the most recent common ancestor (χρόνος ως τον πιο κοινό πρόγονο, δηλαδή, ο χρόνος που εκτιμήθηκε από την ανάλυση μοριακού ρολογιού ότι ξεκίνησαν οι μεταδόσεις του ιού)

² R_e , effective reproductive number (ενεργός αριθμός αναπαραγωγής)

³ CV , Coefficient of Variation (συντελεστής μεταβλητότητας)

⁴ HPD, Highest Posterior Density interval (διάστημα μέγιστης πυκνότητας ύστερης πιθανότητας)

⁵ NNRTIs, Non-Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors

Πίνακας 29 Δημογραφικά χαρακτηριστικά μη θεραπευμένων PLHIV με διαθέσιμη αλληλουχία το χρονικό διάστημα 01/01/2003-30/06/2015 στη Νότια/Κεντρική Ελλάδα οι οποίοι είχαν μολυνθεί σε τοπικά δίκτυα μετάδοσης NNRTI-ανθεκτικών στελεχών HIV-1 υπότυπου A1. Τα δίκτυα έχουν ομαδοποιηθεί σύμφωνα με τα επιδημιολογικά χαρακτηριστικά τους, τα οποία εκτιμήθηκαν από αναλύσεις μοριακού ρολογιού και φυλοδυναμικής ανάλυσης.

Τοπικά δίκτυα μετάδοσης NNRTIs ¹	K103N & E138A 4 (N, %)	E138A 1, E138A 2 & E138A 3 (N, %)	p-value
Αριθμός αλληλουχιών			
	86 (43,9)	110 (56,1)	
Φύλο			
			0,633
Άνδρας	85 (98,8)	107 (97,3)	
Γυναίκα	1 (1,2)	3 (2,7)	
Κατηγορία μετάδοσης			
			0,020
MSM ²	67 (77,9)	76 (69,1)	
Ετεροφυλόφιλοι	1 (1,2)	13 (11,8)	
XEN ³	2 (2,3)	4 (3,6)	
Άλλη/Άγνωστη	16 (18,6)	17 (15,5)	
Εθνικότητα			
			0,011
Ελληνική	42 (48,8)	76 (69,1)	
Μη Ελληνική	3 (3,5)	4 (3,6)	
Άγνωστη	41 (47,7)	30 (27,3)	

¹ NNRTIs, *Non-Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors*

² MSM, *Men who have Sex with Men*

³ XEN, *Χρήστες Ενδοφλέβιων Ναρκωτικών*

Επίλογος - Συμπεράσματα Διδακτορικής Διατριβής

Οι κατευθυντήριες οδηγίες των Κέντρων Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων των Η.Π.Α. (CDC) σχετικά με την αντιμετώπιση και πρόληψη επιδημιών από λοιμογόνους παράγοντες αναφέρουν ότι η διερεύνηση και αποτύπωση των χαρακτηριστικών μιας επιδημίας είναι καίριας σημασίας για την κατανόηση των χαρακτηριστικών της (όπως ο τρόπος διασποράς, ο βασικός/ενεργός αριθμός αναπαραγωγής, η δυναμική) ή και των χαρακτηριστικών του πληθυσμού υψηλού κινδύνου προκειμένου να επιτευχθεί ο έλεγχος της επιδημίας.

Προς αυτήν την κατεύθυνση, τα τελευταία χρόνια, η μοριακή επιδημιολογία μας παρέχει καινοτόμες μεθόδους για τη μελέτη επιδημιών με έμφαση σε παθογόνα όπως ο HIV-1, για τον οποίον υπάρχει διαθέσιμη πληθώρα μοριακών δεδομένων, διαχρονικά. Η διαθεσιμότητα υψηλής κάλυψης (high coverage) δεδομένων σε συνδυασμό με τα χαρακτηριστικά ενός μετρήσιμα εξελισσόμενου πληθυσμού/παθογόνου (measurably evolving population) καθιστούν τον HIV-1 «ιδανικό» μικροοργανισμό για την ανάπτυξη καινοτόμων μεθόδων μοριακής επιδημιολογίας με εφαρμογή στην πρόληψη.

Η παρούσα διατριβή είχε σκοπό τη διερεύνηση και την αποτύπωση της επιδημίας του HIV-1 στην Ελλάδα με μοριακές μεθόδους και καινοτόμες εφαρμογές. Τα δεδομένα που προέκυψαν αφορούν το σύνολο των ανθρώπων που ζουν με HIV (PLHIV) ή ειδικούς πληθυσμούς, όπως οι XEN και οι μετανάστες, ή χαρακτηριστικά, όπως τα στελέχη του ιού με αντοχή στα αντιρετροϊκά φάρμακα, και μπορούν να συμβάλουν στην προσπάθεια ελέγχου της επιδημίας του HIV-1 στην Ελλάδα.

Συγκεκριμένα, μελετήθηκαν ο τρόπος διασποράς και τα χαρακτηριστικά της επιδημίας του HIV-1 στην Ελλάδα, η επιδημική έκρηξη του ιού στους XEN κατά το χρονικό διάστημα 2011-2015 στην Αθήνα, η γεωγραφική προέλευση της HIV-λοίμωξης και ο τρόπος διασποράς σε μετανάστες XEN, η πιθανή συσχέτιση των

μεταδόσεων του HIV-1 με την κοινωνική δικτύωση σε XEN, ο επιπολασμός, καθώς και ο τρόπος διασποράς και η δυναμική των ανθεκτικών στελεχών σε PLHIV που δεν έχουν λάβει θεραπεία. Η διατριβή πραγματοποιήθηκε στο σύνολο των μοριακών δεδομένων που ήταν διαθέσιμα το χρονικό διάστημα 1999-2015 και αφορούσε ένα μεγάλο ποσοστό των PLHIV στην Ελλάδα. Είχε τα χαρακτηριστικά της υψηλής κάλυψης με διαχρονική δειγματοληψία.

Από τη μελέτη του τρόπου διασποράς προέκυψαν δεδομένα αναφορικά με τον επιπολασμό των διαφορετικών HIV-1 υπότυπων και ανασυνδυασμένων τύπων, καθώς και τα δίκτυα τοπικής διασποράς για τους επικρατέστερους υπότυπους. Η ταυτοποίηση των τοπικών δικτύων είναι κεφαλαιώδους σημασίας για την εύρεση των χαρακτηριστικών του πληθυσμού που σχετίζονται με τοπικές μεταδόσεις (MSM, Ελληνική εθνικότητα, πρόσφατη δειγματοληψία κ.λπ.). Επιπρόσθετα, τα δίκτυα αυτά αποτέλεσαν πρωταρχικά δεδομένα για περαιτέρω μελέτες αναφορικά με τη χρονολόγηση των μεταδόσεων του HIV-1 και την εκτίμηση της δυναμικής της επιδημίας. Συγκεκριμένα, επιπλέον ανάλυση αποκάλυψε και τα δίκτυα με τον υψηλότερο ρυθμό μεταδόσεων, τα οποία αποτελούν πρωταρχικό στόχο πρόληψης. Η ταυτοποίηση των τοπικών δικτύων αποτελεί πρωταρχική πληροφορία για τη μελέτη και την εφαρμογή μοριακών μεθόδων για την πρόληψη του HIV-1. Ειδικότερα, στην αναφορά του Φεβρουαρίου του 2019 από τον Διευθυντή του Εθνικού Ινστιτούτου Αλλεργίας και Λοιμωδών Νοσημάτων (National Institute of Allergy and Infectious Diseases – NIAID) των Εθνικών Ινστιτούτων Υγείας (NIH) των Η.Π.Α. αναφέρεται ότι ένας από τους τέσσερις πρωταρχικούς άξονες του Εθνικού Σχεδίου Δράσης της χώρας είναι η άμεση ανίχνευση και παρέμβαση στα δίκτυα του HIV-1 για τη μείωση του αριθμού των νέων μεταδόσεων («*Rapidly detect and respond to emerging clusters of HIV infection to further reduce new transmissions*») (Fauci et al., 2019). Τα ευρήματα της διατριβής είχαν ακριβώς αυτόν το σκοπό, δηλαδή, να αποτυπώσουν τα τοπικά δίκτυα διασποράς του ιού και να είναι δυνατή η περαιτέρω μελέτη τους στο μέλλον. Η γνώση των τοπικών δικτύων μπορεί να συμβάλει στην παρακολούθηση της επιδημίας και την ανίχνευση των πρόσφατων δικτύων μετάδοσης με σκοπό τη στοχευμένη πρόληψη.

Τα ευρήματα των μοριακών αναλύσεων αναφορικά με τη διερεύνηση της επιδημικής έκρηξης στους XEN μετά το 2010 αποτέλεσαν μία από τις λίγες πιλοτικές μελέτες, διεθνώς, σχετικά με την εφαρμογή μεθόδων μοριακής επιδημιολογίας στη διερεύνηση, στο σχεδιασμό και την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων παρεμβάσεων δημόσιας υγείας. Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε χρονολόγηση των μεταδόσεων του HIV-1 και εκτιμήθηκαν η δυναμική της επιδημίας, επιδημιολογικοί δείκτες [όπως ο ενεργός αριθμός αναπαραγωγής (R_e)] και ο αριθμός των μεταδόσεων από XEN σε άλλες ομάδες κινδύνου (π.χ. MSM ή ετεροφυλόφιλους). Η εκτίμηση της ημερομηνίας μετάδοσης και της δυναμικής της επιδημίας αποτέλεσε μία ανεξάρτητη πηγή αξιολόγησης της αποτελεσματικότητας του προγράμματος «ΑΡΙΣΤΟΤΕΛΗΣ», όπως, επίσης, συνέβαλε και στη γνώση της δυναμικής της επιδημίας πριν την εφαρμογή του προγράμματος το 2012. Παράλληλα, αποτέλεσε πεδίο καινοτόμου μελέτης, όπως η εκτίμηση του τρόπου διασποράς του ιού μεταξύ των μεταναστών XEN, για τους οποίους βρέθηκε ότι στη συντριπτική πλειοψηφία τους είχαν μολυνθεί στην Ελλάδα. Η μελέτη αυτή πραγματοποιήθηκε με εφαρμογή τροποποιημένων μεθόδων στατιστικής φυλογεωγραφίας και αποτελεί μία από τις ελάχιστες μελέτες που εκτίμησαν τη γεωγραφική προέλευση της HIV-1 λοίμωξης, αλλά και τον τρόπο διασποράς του ιού σε συγκεκριμένες ομάδες του πληθυσμού. Τα αποτελέσματα των παραπάνω μοριακών μελετών στους XEN έχουν παρουσιασθεί σε επιστημονικές εκδηλώσεις του Ευρωπαϊκού Κέντρου Πρόληψης και Ελέγχου Νοσημάτων (ECDC) ως παραδείγματα μελετών αναφορικά με τη σημασία των μοριακών μεθόδων στη διερεύνηση και την πρόληψη επιδημικών εκρήξεων.

Οι μελέτες διερεύνησης της αντοχής του ιού σε PLHIV που δεν έχουν λάβει θεραπεία αποκάλυψαν τον υψηλό επιπολασμό αντοχής σε NNRTIs, καθώς και τον τρόπο διασποράς των ανθεκτικών στελεχών, μέσω φυλογενετικής ανάλυσης. Η ανάλυση αυτή έδειξε ότι τα ανθεκτικά στελέχη μεταδίδονται σε υψηλά ποσοστά μεταξύ των PLHIV που δεν έχουν λάβει θεραπεία, και, επίσης, ότι τα ποσοστά αυτά είναι υψηλότερα για τον υπότυπο A1. Επιπρόσθετα, εκτιμήθηκε η δυναμική της επιδημίας και το χρονικό διάστημα κατά το οποίο οι μεταδόσεις ανθεκτικών στελεχών σε NNRTIs μεγιστοποιήθηκαν. Τα ευρήματα αυτά έχουν μεγάλη σημασία τόσο για τον έλεγχο των μεταδόσεων των ανθεκτικών στελεχών όσο και για την επιλογή του πρώτου

θεραπευτικού σχήματος, ειδικά τη χρονική περίοδο μετά το 2015 όπου ο εργαστηριακός έλεγχος αντοχής ήταν περιορισμένος.

Συνοψίζοντας, οι μοριακές μέθοδοι και οι εφαρμογές τους στον έλεγχο της πανδημίας του HIV έχουν εξελιχθεί παράλληλα με τον ιό. Ακολουθούν έναν ταχύ βηματισμό από τα πρώτα στάδια, που η εφαρμογή τους περιοριζόταν στην ταξινομική και στην εκτίμηση του επιπολασμού των HIV-1 υπότυπων, μέχρι τις μέρες μας, που, πλέον, αποτελούν έναν από τους βασικούς πυλώνες για τον έλεγχο της επιδημίας. Ο σκοπός της παρούσας διατριβής ήταν η εφαρμογή αυτών των μεθόδων στο «tempo» των καιρών, δηλαδή, στην παραγωγή τεκμηριωμένης γνώσης που θα μπορούσε να συμβάλει στην αποτελεσματική αντιμετώπιση της επιδημίας του HIV-1 στην Ελλάδα. Ο σκοπός ήταν φιλόδοξος, αλλά αν επιτευχθεί, έστω και εν μέρει, το αποτέλεσμα θα είναι εντέλει θετικό!

Περίληψη

Ο ιός της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας (Human Immunodeficiency Virus – HIV) έχει προκαλέσει μία από τις μεγαλύτερες πανδημίες στα χρονικά της ανθρωπότητας. Στην Ελλάδα, σύμφωνα με στοιχεία του εθνικού συστήματος επιδημιολογικής επιτήρησης της HIV/AIDS λοίμωξης (Εθνικός Οργανισμός Δημόσιας Υγείας – Ε.Ο.Δ.Υ), ο συνολικός αριθμός των ατόμων που έχουν προσβληθεί από τον ιό μέχρι τα τέλη του 2018 ανέρχεται σε 17.389. Επίσης, στην Ελλάδα, με απαρχή το 2011, συνέβη μία από τις μεγαλύτερες επιδημικές εκρήξεις στην Ευρώπη σε χρήστες ενδοφλέβιων ναρκωτικών (XEN).

Η παρούσα διατριβή είχε σκοπό τη διερεύνηση και την αποτύπωση της επιδημίας του HIV-1 στην Ελλάδα με μοριακές μεθόδους και καινοτόμες εφαρμογές. Συγκεκριμένα, αναλύθηκαν 4.856 μοναδικές HIV-1 νουκλεοτιδικές αλληλουχίες, οι οποίες αποτελούσαν το μεγαλύτερο δυνατό δείγμα διαθέσιμων δεδομένων με δειγματοληψία το χρονικό διάστημα 1999-2015 από το μεγαλύτερο τμήμα της Ελληνικής επικράτειας. Η ανάλυση των αλληλουχιών βασίστηκε σε καινοτόμες εφαρμογές μοριακών μεθόδων, και συγκεκριμένα σε εφαρμογές φυλογενετικής, φυλοδυναμικής και φυλογεωγραφικής ανάλυσης.

Η υποτύπηση των υπό μελέτη αλληλουχιών έδειξε ότι επικρατέστεροι HIV-1 τύποι στην Ελλάδα παραμένουν οι υπότυποι B (44,2%) και A1 (25,3%). Παρόλο αυτά, η διαχρονική εκτίμηση του επιπολασμού των HIV-1 υπότυπων το χρονικό διάστημα 1999-2015 έδειξε ότι η επιδημία του HIV-1 στην Ελλάδα διαφοροποιείται σημαντικά με το πέρασμα του χρόνου. Συγκεκριμένα, ο επιπολασμός του υπότυπου B και όλων των μη B μη A1 υπότυπων βρέθηκε να μειώνεται σταδιακά στην πορεία του χρόνου, σε αντίθεση με τον επιπολασμό του υπότυπου A1 και των ανασυνδυασμένων τύπων του ιού ο οποίος βρέθηκε να παρουσιάζει αυξητική τάση.

Η μελέτη των προτύπων διασποράς των επικρατέστερων HIV-1 υπότυπων στην Ελλάδα έδειξε ότι η επιμέρους επιδημία του υπότυπου A1 (93,8%) παρουσιάζει υψηλότερα επίπεδα τοπικής διασποράς συγκριτικά με του B (77,1%). Η τοπική

διασπορά του υπότυπου A1 βρέθηκε να σχετίζεται σημαντικά με τον τρόπο μετάδοσης (άνδρες που κάνουν σεξ με άνδρες, Men who have Sex with Men – MSM) και την εθνικότητα (Ελληνική), ενώ του B με την περίοδο δειγματοληψίας (2011-2015).

Η μοριακή επιτήρηση της επιδημίας του HIV-1 στους XEN της Αθήνας το χρονικό διάστημα 2011-2014 ανέδειξε την ύπαρξη τεσσάρων κύριων τοπικών δικτύων διασποράς του ιού (επιμέρους επιδημίες) σε XEN (CRF14_BG, CRF35_AD, B, A). Στα δίκτυα αυτά βρέθηκαν, επίσης, αλληλουχίες από μη XEN, που υποδηλώνουν την ύπαρξη μετάδοσης του ιού από XEN και σε άλλες ομάδες κινδύνου. Επιπρόσθετα, βρέθηκε ότι οι επιμέρους επιδημίες του υπότυπου A1 και του CRF35_AD ξεκίνησαν την ίδια περίπου χρονική περίοδο (Δεκέμβριος 2009 - Μάιος 2010) και παρουσίασαν έντονη αύξηση κατά τα αρχικά στάδια της επιδημίας, σε αντίθεση με εκείνες του υπότυπου B και του CRF14_BG για τις οποίες εκτιμήθηκε ότι η προέλευση τους ήταν προγενέστερη (B: Μάρτιος 2006, CRF14_BG: Ιούλιος 2008) και ότι οι μεταδόσεις διήρκησαν για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα.

Εστιάζοντας στους XEN με μη Ελληνική εθνικότητα στην Αθήνα βρέθηκε ότι το μεγαλύτερο ποσοστό (94,3%) μολύνθηκε με HIV-1 μετά την άφιξή του στην Ελλάδα. Οι μεταδόσεις σε αυτόν τον ειδικό πληθυσμό πραγματοποιήθηκαν, κυρίως, εντός των τοπικών δικτύων διασποράς των XEN (CRF14_BG, CRF35_AD, B, A1). Επίσης, βρέθηκε ότι κατά την επιδημική έκρηξη του HIV-1 στους XEN στην Αθήνα οι μεταδόσεις του ιού συνέβησαν με μεγαλύτερη συχνότητα μεταξύ των XEN διαφορετικών εθνικοτήτων (με μη Ελληνική εθνικότητα).

Η μελέτη των κοινωνικών δικτύων και του τρόπου διασποράς του HIV-1 στους XEN που συμμετείχαν στο πρόγραμμα «TRIP» (Transmission Reduction Intervention Project – TRIP) στην Αθήνα έδειξε ότι το 59,3% των ατόμων είχε μολυνθεί σε κοινά δίκτυα μετάδοσης και είχε κοινωνική δικτύωση πρώτου βαθμού. Το υψηλό αυτό ποσοστό υποδηλώνει ότι κατά την επιδημία του HIV-1 στους XEN στην Αθήνα περισσότερες από τις μισές μεταδόσεις πραγματοποιήθηκαν μεταξύ ατόμων με κοινωνική δικτύωση. Επιπρόσθετα, στον ίδιο πληθυσμό δείχθηκε ότι οι μεταδόσεις μεταξύ ατόμων με πρόσφατη HIV-1 λοίμωξη είναι πιο συχνές και, συνεπώς, τα άτομα με πρόσφατη HIV-1 λοίμωξη πιθανόν αποτελούν πηγές μετάδοσης του ιού.

Αναφορικά με τον επιπολασμό αντοχής σε οποιαδήποτε κατηγορία φαρμάκων σε μη θεραπευμένα άτομα το διάστημα 2003-2015 εκτιμήθηκε 22,2%, με την αντοχή σε NNRTIs (Non-Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors) να παρουσιάζει τα υψηλότερα ποσοστά (16,9%) και να αυξάνεται στην πορεία του χρόνου. Επιπρόσθετα, εντοπίστηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των NRTIs (Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors) και NNRTIs ως προς τα πρότυπα μετάδοσης των ανθεκτικών στελεχών. Συγκεκριμένα, οι κυρίαρχες μεταλλαγές στα NNRTIs (E138A, K103N) βρέθηκαν να μεταδίδονται σε τοπικά δίκτυα (πέντε επιμέρους επιδημίες) και να σχετίζονται με μεταδόσεις μεταξύ MSM και υπότυπο A1. Τέλος, για τρεις επιμέρους επιδημίες της E138A εκτιμήθηκε ότι ξεκίνησαν το ίδιο περίπου χρονικό διάστημα (1995-1997) και παρέμεναν ενεργές μεταξύ 2011 και 2015. Σε αντίθεση με τις παραπάνω επιδημίες, για την επιδημία της K103N εκτιμήθηκε ότι ξεκίνησε αρκετά πιο πρόσφατα (2007) και παρέμενε ενεργή το διάστημα 2008-2013.

Εν κατακλείδι, σύμφωνα με τα Κέντρα Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων των Η.Π.Α. (Centers for Disease Control and Prevention – CDC), η διερεύνηση και αποτύπωση των χαρακτηριστικών μιας επιδημίας είναι καίριας σημασίας προκειμένου να επιτευχθεί ο έλεγχος της επιδημίας. Προς αυτήν την κατεύθυνση, τα ευρήματα της παρούσας διατριβής, τα οποία προέκυψαν από την εφαρμογή καινοτόμων μεθόδων μοριακής επιδημιολογίας, οδήγησαν στην παραγωγή τεκμηριωμένης γνώσης που μπορεί να συμβάλει σημαντικά στην προσπάθεια ελέγχου της επιδημίας του HIV-1 στην Ελλάδα.

Abstract

Human Immunodeficiency Virus (HIV) has caused one of the most devastating pandemics in human history. In Greece, according to the national HIV/AIDS surveillance system (National Public Health Organization – NOPH), the total number of HIV-infected individuals was 17,389 in 2018. In addition, Greece has experienced one of the largest HIV-1 outbreaks among people who inject drugs (PWID) in Europe.

The aim of the thesis was the investigation of the HIV-1 epidemic in Greece using molecular methods. In the context of the study, most of the available molecular data in Greece were analysed (high coverage). Specifically, the study population consisted of 4,856 unique HIV-1 nucleotide sequences sampled during 1999-2015 in Greece. The analysis was based on current state-of-the-art molecular epidemiology methods – phylogenetic, phylodynamic and phylogeographic analyses – which have proven to be powerful tools in public health.

Subtyping analysis revealed that although subtype B (44.2%) and A1 (25.3%) are the most prevalent HIV-1 clades, the HIV-1 epidemic in Greece has a significant trend over time. Specifically, the prevalence of subtype B and non-B non-A1 subtypes was found to decrease over time. On the contrary, the prevalence of subtype A1 and circulating recombinant forms shows an increasing trend.

The investigation of the dispersal patterns of the most prevalent HIV-1 subtypes in Greece revealed that 93.8% of subtype A1 sequences formed monophyletic clusters (regional dispersal). For subtype B, the corresponding proportion was lower and equal to 77.1%. In addition, analysis showed that risk group (Men who have Sex with Men – MSM) and nationality (Greek) were associated with the regional clustering of subtype A1, while period of sampling (2011-2015) was associated with the regional clustering of subtype B.

The molecular surveillance of the HIV-1 subepidemic among PWID in Athens (2011-2014) indicated that the majority of sequences from PWID fell within four local

transmission networks – LTNs (subepidemics) (CRF14_BG, CRF35_AD, B, A). In addition to sequences from PWID, a low number of sequences from non-PWID belonged to these networks, corresponding to cross-group transmissions. It was also found that subtype A1 and CRF35_AD subepidemics started around the same time period (December 2009 - May 2010), in contrast to subtype B and CRF14_BG subepidemics which started earlier (B: March 2006, CRF14_BG: July 2008). Furthermore, transmissions within subtype A1 and CRF35_AD LTNs increased sharply during the early stage of the outbreak, while transmissions within subtype B and CRF14_BG LTNs lasted for a longer time period.

Focusing on the non-Greek PWID in Athens, analysis revealed that for 94.3% the origin of their HIV-1 infection was assumed to be in Greece (post-migration). Most of the non-Greek PWID had been infected within the PWID-LTNs (CRF14_BG, CRF35_AD, B, A1). Moreover, the recent PWID subepidemic in Athens was found to be a unique case, since for PWID infected within networks, HIV-1 transmissions occurred more frequently among non-Greeks than would be expected by chance.

The exploration of associations between transmission links (as estimated by molecular analysis) and social network-based ties among PWID recruited into “TRIP” (Transmission Reduction Intervention Project – TRIP) showed that a high proportion of individuals (59.3%) in phylogenetic clusters had first-degree social ties with at least one member of their cluster. This means that more than half of the individuals with viral linkage were also socially linked, suggesting that during an HIV outbreak among PWID, transmissions occurred preferentially within socially linked individuals. Additionally, it was found that transmissions are more frequent among PWID with high viremia and that recently HIV-infected individuals are more likely to be the source of HIV-1 transmission within transmission pairs.

The prevalence of resistance among treatment-naïve individuals during 2003-2015 was estimated 22.2% (HIVdb resistance interpretation algorithm). Resistance to NNRTIs (Non-Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors) was the most common (16.9%) and was found to increase over time. Analysis revealed that the dispersal patterns of the NRTI (Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitor) and NNRTI resistant

strains differed significantly. Specifically, the most frequently observed NNRTI resistant mutations (E138A, K103N) were found to be transmitted within local networks (five subepidemics), suggesting regional dispersal, and, also, to be associated with MSM and subtype A1. Furthermore, it was found that three out of four E138A subepidemics started around the same time period (between 1995 and 1997) and that the number of transmissions within most of the E138A networks increased during 2011-2015. On the other hand, the origin of the K103N subepidemic was more recent (2007), and the number of transmissions within this network increased during 2008-2013.

In conclusion, according to the leading national public health institute of the USA (Centers for Disease Control and Prevention – CDC), the investigation and characterization of an epidemic is of crucial importance for the control of the epidemic. Under this perspective, the current findings, which were based on an analysis of almost 5,000 HIV-1 sequences using innovative molecular epidemiology methods, produced evidence-based knowledge that could provide added value on the control of the HIV-1 epidemic in Greece.

Βιβλιογραφία

Κέντρο Ελέγχου & Πρόληψης Νοσημάτων (ΚΕ.ΕΛ.Π.ΝΟ.), Επιδημιολογική Επιτήρηση της HIV/AIDS λοίμωξης στην Ελλάδα, Δηλωθέντα Στοιχεία έως 31.12.2018, Υπουργείο Υγείας.

Abecasis, A.B., Deforche, K., Bachelier, L.T., McKenna, P., Carvalho, A.P., Gomes, P., Vandamme, A.-M., Camacho, R.J., 2006. Investigation of baseline susceptibility to protease inhibitors in HIV-1 subtypes C, F, G and CRF02_AG. *Antivir. Ther.* 11, 581–589.

Abecasis, A.B., Geretti, A.M., Albert, J., Power, L., Weait, M., Vandamme, A.M., 2011. Science in court: the myth of HIV fingerprinting. *Lancet. Infect. Dis.* 11, 78–79.

Abecasis, A.B., Wensing, A.M., Paraskevis, D., Vercauteren, J., Theys, K., Van de Vijver, D.A., Albert, J., Asjö, B., Balotta, C., Beshkov, D., Camacho, R.J., Clotet, B., De Gascun, C., Griskevicius, A., Grossman, Z., Hamouda, O., Horban, A., Kolupajeva, T., Korn, K., Kostrikis, L.G., Kücherer, C., Liitsola, K., Linka, M., Nielsen, C., Otelea, D., Paredes, R., Poljak, M., Puchhammer-Stöckl, E., Schmit, J.C., Sönnernborg, A., Stanekova, D., Stanojevic, M., Struck, D., Boucher, C.A., Vandamme, A.M., 2013. HIV-1 subtype distribution and its demographic determinants in newly diagnosed patients in Europe suggest highly compartmentalized epidemics. *Retrovirology.* 10, 7.

Acheson, N.H., *Fundamentals of molecular virology.* 2nd ed., 2011. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons. xxv, 500 p.

Alexiev, I., Shankar, A., Dimitrova, R., Gancheva, A., Kostadinova, A., Teoharov, P., Golkocheva, E., Nikolova, M., Muhtarova, M., Elenkov, I., Stoycheva, M., Nikolova, D., Varleva, T., Switzer, W.M., 2016. Origin and spread of HIV-1 in persons who inject drugs in Bulgaria. *Infect. Genet. Evol.* 46, 269-78.

Álvarez-Del Arco, D., Monge, S., Rivero-Montesdeoca, Y., Burns, F., Noori, T., Del Amo, J., 2017. Implementing and expanding HIV testing in immigrant

populations in Europe: comparing guideline's recommendations and expert's opinions. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 35, 47–51.

Ambrosioni, J., Junier, T., Delhumeau, C., Calmy, A., Hirschel, B., Zdobnov, E., Kaiser, L., Yerly, S., Swiss HIV Cohort Study., 2012. Impact of highly active antiretroviral therapy on the molecular epidemiology of newly diagnosed HIV infections. *AIDS*. 26, 2079–2086.

Angelis, K., Albert, J., Mamais, I., Magiorkinis, G., Hatzakis, A., Hamouda, O., Struck, D., Vercauteren, J., Wensing, A.M.J., Alexiev, I., Åsjö, B., Balotta, C., Camacho, R.J., Coughlan, S., Griskevicius, A., Grossman, Z., Horban, A., Kostrikis, L.G., Lepej, S., Liitsola, K., Linka, M., Nielsen, C., Otelea, D., Paredes, R., Poljak, M., Puchhammer-Stöckl, E., Schmit, J.-C., Sönnnerborg, A., Staneková, D., Stanojevic, M., Boucher, C.A.B., Kaplan, L., Vandamme, A.-M., Paraskevis, D., 2015. Global dispersal pattern of HIV type 1 subtype CRF01_AE: a genetic trace of human mobility related to heterosexual sexual activities centralized in Southeast Asia. *J. Infect. Dis.* 211, 1735–1744.

Anglemyer, A., Horvath, T., Rutherford, G., 2013. Antiretroviral Therapy for Prevention of HIV Transmission in HIV-Discordant Couples. *JAMA*. 310, 1619.

Antoniadou, Z.A., Kousiappa, I., Skoura, L., Pilalas, D., Metallidis, S., Nicolaidis, P., Malisiovas, N., Kostrikis, L.G., 2014. Short communication: molecular epidemiology of HIV type 1 infection in northern Greece (2009-2010): evidence of a transmission cluster of HIV type 1 subtype A1 drug-resistant strains among men who have sex with men. *AIDS Res. Hum. Retrovir.* 30, 225–232.

Avila, D., Keiser, O., Egger, M., Kouyos, R., Böni, J., Yerly, S., Klimkait, T., Vernazza, P.L., Aubert, V., Rauch, A., Bonhoeffer, S., Günthard, H.F., Stadler, T., Spycher, B.D., Swiss HIV Cohort Study, 2014. Social meets molecular: combining phylogenetic and latent class analyses to understand HIV-1 transmission in Switzerland. *Am. J. Epidemiol.* 179, 1514–25.

Avice, J.C., *Phylogeography: the history and formation of species*. 2000, Cambridge, Mass.: Harvard University Press. viii, 447 p.

Ayinde, D., Maudet, C., Transy, C., Margottin-Goguet, F., 2010. Limelight on two HIV/SIV accessory proteins in macrophage infection: Is Vpx overshadowing Vpr? *Retrovirology*. 9, 7-35.

Baeten, J.M., Chohan, B., Lavreys, L., Chohan, V., McClelland, R.S., Certain, L., Mandaliya, K., Jaoko, W., Overbaugh, J., 2007. HIV-1 subtype D infection is associated with faster disease progression than subtype A in spite of similar plasma HIV-1 loads. *J. Infect. Dis.* 195, 1177–1180.

Baron, S., *Medical microbiology*. 4th ed. 1996, Galveston, Tex.: University of Texas Medical Branch at Galveston. xvii, 1273 p.

Barre-Sinoussi, F., Chermann, J., Rey, F., Nugeyre, M., Chamaret, S., Gruest, J., Dauguet, C., Axler-Blin, C., Vézinet-Brun, F., Rouzioux, C., Rozenbaum, W., Montagnier, L., 1983. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science*. 220(4599), 868–71.

Basavapathruni, A., Anderson, K.S., 2007. Reverse transcription of the HIV-1 pandemic. *FASEB J.* 21(14), 3795–808.

Beerenwinkel, N., Däumer, M., Sing, T., Rahnenfuhrer, J., Lengauer, T., Selbig, J., Hoffmann, D., Kaiser, R., 2005. Estimating HIV Evolutionary Pathways and the Genetic Barrier to Drug Resistance. *J. Infect. Dis.* 3840, 1953–60.

Bellan, S.E., Dushoff, J., Galvani, A.P., Meyers, L.A., 2015. Reassessment of HIV-1 Acute Phase Infectivity: Accounting for Heterogeneity and Study Design with Simulated Cohorts. *PLOS Med.* 12, e1001801.

Beloukas, A., Psarris, A., Giannelou, P., Kostaki, E., Hatzakis, A., Paraskevis, D., 2016. Molecular epidemiology of HIV-1 infection in Europe: An overview. *Infect. Genet. Evol.* 46, 180-189.

Ben Haij, N., Planès, R., Mzoughi, O., Bahraoui, E., 2011. HIV Tat Protein, a Key Factor in Pathogenesis and Immune System Dysregulation: Implication of IL-10. *HIV-Host Interactions*. ISBN: 978-953-307-442-9.

Bennett, D.E., Camacho, R.J., Otelea, D., Kuritzkes, D.R., Fleury, H., Kiuchi, M., Heneine, W., Kantor, R., Jordan, M.R., Schapiro, J.M., Vandamme, A.M., Sandstrom, P., Boucher, C.A., van de Vijver, D., Rhee, S.Y., Liu, T.F., Pillay, D.,

Shafer, R.W., 2009. Drug resistance mutations for surveillance of transmitted HIV-1 drug-resistance: 2009 update. *PLoS One*. 4, e4724.

Bennett, J.E., Dolin, R. and Blaser, M.J., Mandell, Douglas and Bennett's principles and practice of infectious diseases. Eighth edition. ed. 2015, Philadelphia, PA: Elsevier/Saunders. 2 volumes.

Beyrer, C., Sullivan, P., Sanchez, J., Baral, S.D., Collins, C., Wirtz, A.L., Altman, D., Trapence, G., Mayer, K., 2013. The increase in global HIV epidemics in MSM. *AIDS*. 27, 2665–2678.

Biggerstaff, M., Cauchemez, S., Reed, C., Gambhir, M., Finelli, L., 2014. Estimates of the reproduction number for seasonal, pandemic, and zoonotic influenza: a systematic review of the literature. *BMC Infect. Dis.* 4, 14:480.

Biology, E., Arbor, A., Arbor, A., 2009. Maximum Likelihood Estimates of Species Trees: How Accuracy of Phylogenetic Inference Depends upon the Divergence History and Sampling Design. 58(5), 501–8.

Bobkov, A., Cheingsong-Popov, R., Selimova, L., Ladnaya, N., Kazennova, E., Kravchenko, A., Pokrovsky, V., Weber, J., 1997. HIV type 1 subtype E in Russia. *AIDS Res. Hum. Retrovir.* 13, 725–727.

Bobkov, A.F., Kazennova, E.V., Selimova, L.M., Khanina, T.A., Ryabov, G.S., Bobkova, M.R., Sukhanova, A.L., Kravchenko, A.V., Ladnaya, N.N., Weber, J.N., Pokrovsky, V.V., 2004. Temporal trends in the HIV-1 epidemic in Russia: predominance of subtype A. *J. Med. Virol.* 74, 191–196.

Bobkova, M., 2013. Current status of HIV-1 diversity and drug resistance monitoring in the former USSR. *AIDS Rev.* 15, 204–212.

Bouckaert, R., Heled, J., Kuhnert, D., Vaughan, T., Wu, C.H., Xie, D., Suchard, M.A., Rambaut, A., Drummond, A.J., 2014. BEAST 2: A software platform for bayesian evolutionary analysis. *PLoS Comput. Biol.* 10, e1003537.

Boys, R.J., Henderson, D.A., 2004. A Bayesian Approach to DNA Sequence Segmentation. 573–88.

Brenner, B., Turner, D., Oliveira, M., Moisi, D., Detorio, M., Carobene, M., Marlink, R.G., Schapiro, J., Roger, M., Wainberg, M.A., 2003. A V106M mutation in

HIV-1 clade C viruses exposed to efavirenz confers cross-resistance to non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors. *AIDS*. 17, F1–F5.

Brenner, B.G., Roger, M., Routy, J.P., Moisi, D., Ntemgwa, M., Matte, C., Baril, J.G., Thomas, R., Rouleau, D., Bruneau, J., Leblanc, R., Legault, M., Tremblay, C., Charest, H., Wainberg, M.A., Quebec Primary HIV Infection Study Group., 2007. High Rates of Forward Transmission Events after Acute/Early HIV-1 Infection. *J. Infect. Dis.* 195, 951–959.

Brenner, B.G., Roger, M., Moisi, D.D., Oliveira, M., Hardy, I., Turgel, R., Charest, H., Routy, J.P., Wainberg, M.A., 2008. Transmission networks of drug resistance acquired in primary/early stage HIV infection. *AIDS*. 22, 2509–2515.

Brenner, B.G., Wainberg, M.A., 2013. Future of phylogeny in HIV prevention. *J. Acquir. Immune. Defic. Syndr.* 63(Suppl 2), S248–54.

Brunet, J.B., Bouvet, E., Massari, V., 1984. Epidemiological aspects of acquired immune deficiency syndrome in France. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 437, 334–339.

Buonaguro, L., Tornesello, M.L., Buonaguro, F.M., 2007. Human immunodeficiency virus type 1 subtype distribution in the worldwide epidemic: pathogenetic and therapeutic implications. *J. Virol.* 81, 10209–10219.

Calvez, V., Marcelin, A.G., Vingerhoets, J., Hill, A., Hadacek, B., Moecklinghoff, C., 2016. Systematic review to determine the prevalence of transmitted drug resistance mutations to rilpivirine in HIV-infected treatment-naive persons. *Antivir. Ther.* 21, 405–412.

Campbell, E.M., Jia, H., Shankar, A., Hanson, D., Luo, W., Masciotra, S., Owen, S.M., Oster, A.M., Galang, R.R., Spiller, M.W., Blosser, S.J., Chapman, E., Roseberry, J.C., Gentry, J., Pontones, P., Duwve, J., Peyrani, P., Kagan, R.M., Whitcomb, J.M., Peters, P.J., Heneine, W., Brooks, J.T., Switzer, W.M., 2017. Detailed Transmission Network Analysis of a Large Opiate-Driven Outbreak of HIV Infection in the United States. *J. Infect. Dis.* 216, 1053–62.

Campbell-Yesufu, O.T., Gandhi, R.T., 2011. Update on human immunodeficiency virus (HIV)-2 infection. *Clin. Infect. Dis.* 15;52(6), 780–7.

Carr, J., Salminen, M.O., Albert, J., Sanders-Buell, E., Gotte, D., Birx, D.L., Mccutchan, F.E., 1998. Full Genome Sequences of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Subtypes G and A / G Intersubtype Recombinants. *Virology*. 20;247(1), 22-31.

Castor, D., Low, A., Evering, T., Karmon, S., Davis, B., Figueroa, A., LaMar, M., Garmon, D., Mehandru, S., Markowitz, M., 2012. Transmitted drug resistance and phylogenetic relationships among acute and early HIV-1-infected individuals in New York City. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 61, 1–8.

Centers for Disease Control (CDC), 1981. Pneumocystis Pneumonia - Los Angeles. *Morbidity and Mortality Weekly Report*. 30(6), pp.250–252.

Centers for Disease Control (CDC), 1982. Update on acquired immune deficiency syndrome (AIDS) — United States. *MMWR Morb. Mortal. Wkly Rep.* 31 (37): 507–508, 513–514.

Chaix, M.L., Seng, R., Frange, P., Tran, L., Avettand-Fenoël, V., Ghosn, J., Reynes, J., Yazdanpanah, Y., Raffi, F., Goujard, C., Rouzioux, C., Meyer, L., ANRS PRIMO Cohort Study Group., 2013. Increasing HIV-1 non-B subtype primary infections in patients in France and effect of HIV subtypes on virological and immunological responses to combined antiretroviral therapy. *Clin. Infect. Dis.* 56, 880–7.

Chan, P.A., Hogan, J.W., Huang, A., DeLong, A., Salemi, M., Mayer, K.H., Kantor, R., 2015. Phylogenetic investigation of a state-wide HIV-1 epidemic reveals ongoing and active transmission networks among men who have sex with men. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 70, 428–35.

Chu, C., Selwyn, P., 2010. Diagnosis and initial management of acute HIV infection. *Am. Fam. Physician.* 81, 1239-44.

Ciccozzi, M., Montieri, S., Salemi, M., de Oliveira, T., Dorrucchi, M., Sinicco, A., De Luca, A., Giuliani, M., Balotta, C., Rezza, G., 2007. An outbreak of HIV-1 subtype G among Italian injecting drug users. *Aids.* 21, 1213-5.

Coffin, J.M., 1995. HIV population dynamics in vivo: implications for genetic variation, pathogenesis, and therapy. *Science.* 267, 483-9.

Coffin, J.M., Hughes, S.H., Varmus, H.E., 1997. *Retroviruses*. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Cohen, M.S., Gay, C.L., 2010. Treatment to Prevent Transmission of HIV-1. *Clin. Infect. Dis.* 50, S85-S95.

Cohen, M.S., Chen, Y.Q., McCauley, M., Gamble, T., Hosseinipour, M.C., Kumarasamy, N., Hakim, J.G., Kumwenda, J., Grinsztejn, B., Pilotto, J.H.S., Godbole, S.V., Mehendale, S., Chariyalertsak, S., Santos, B.R., Mayer, K.H., Hoffman, I.F., Eshleman, S.H., Piwowar-Manning, E., Wang, L., Makhema, J., Mills, L.A., de Bruyn, G., Sanne, I., Eron, J., Gallant, J., Havlir, D., Swindells, S., Ribaud, H., Elharrar, V., Burns, D., Taha, T.E., Nielsen-Saines, K., Celentano, D., Essex, M., Fleming, T.R., 2011a. Prevention of HIV-1 infection with early antiretroviral therapy. *N. Engl. J. Med.* 365, 493–505.

Cohen, M.S., Shaw, G.M., McMichael, A.J., Haynes, B.F., 2011b. Acute HIV-1 Infection. *N. Engl. J. Med.* 364, 1943–1954.

Collier, L.H. and Oxford J.S., *Human virology: a text for students of medicine, dentistry, and microbiology*. 3rd ed. 2006. Oxford, New York: Oxford University Press. xviii, 303 p.

de Oliveira, T., Pillay, D., Gifford, R.J., Resistance, U.K.C.G.o.H.D., 2010. The HIV-1 subtype C epidemic in South America is linked to the United Kingdom. *PLoS One.* 5, e9311.

Del Romero, J., Río, I., Castilla, J., Baza, B., Paredes, V., Vera, M., Rodríguez, C., 2015. Absence of transmission from HIV-infected individuals with HAART to their heterosexual serodiscordant partners. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 33, 666-72.

Deblonde, J., Sasse, A., Del Amo, J., Burns, F., Delpech, V., Cowan, S., Levoy, M., Keith, L., Pharris, A., Amato-Gauci, A., Noori, T., 2015. Restricted access to antiretroviral treatment for undocumented migrants: a bottle neck to control the HIV epidemic in the EU/EEA. *BMC Public Health.* 15, 1228.

Delva, W., Leventhal, G.E., Helleringer, S., 2016. Connecting the dots: network data and models in HIV epidemiology. *AIDS.* 30, 2009–20.

Deng, H., Liu, R., Ellmeier, W., Choe, S., Unutmaz, D., Burkhart, M., Di Marzio, P., Marmon, S., Sutton, R.E., Hill, C.M., Davis, C.B., Peiper, S.C., Schall, T.J., Littman, D.R., Landau, N.R., 1996. Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature*. 381, 661-666.

Dennis, A.M., Murillo, W., de Maria Hernandez, F., Guardado, M.E., Nieto, A.I., Lorenzana de Rivera, I., Eron, J.J., Paz-Bailey, G., 2013. Social network-based recruitment successfully reveals HIV-1 transmission networks among high-risk individuals in El Salvador. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 63, 135–41.

DHHS Panel on Antiretroviral Guidelines for Adults and Adolescents, 2016. Guidelines for the Use of Antiretroviral Agents in HIV-1-infected Adults and Adolescents. Department of Health and Human Services.

Diekmann, O., Heesterbeek, J., Metz, J.A., 1990. On the definition and the computation of the basic reproduction ratio R_0 in models for infectious diseases in heterogeneous populations. *J. Math. Biol.* 28(4), 365-82.

Dimmock, N.J., Easton, A.J. and Leppard, K.N., 2016. Introduction to modern virology. Wiley Blackwell: Chichester, West Sussex; Hoboken, NJ,. p. xviii, 519 pages.

Dombrowski, K., Khan, B., Habecker, P., Hagan, H., Friedman, S.R., Saad, M., 2017. The interaction of risk network structures and virus natural history in the non-spreading of HIV among people who inject drugs in the early stages of the epidemic. *AIDS Behav.* 21, 1004-15.

Drescher, S.M., von Wyl, V., Yang, W.L., Boni, J., Yerly, S., Shah, C., Aubert, V., Klimkait, T., Taffe, P., Furrer, H., Battegay, M., Ambrosioni, J., Cavassini, M., Bernasconi, E., Vernazza, P.L., Ledergerber, B., Gunthard, H.F., Kouyos, R.D., 2014. Treatment-naive individuals are the major source of transmitted HIV-1 drug resistance in men who have sex with men in the Swiss HIV Cohort Study. *Clin. Infect. Dis.* 58, 285–294.

Drummond, A.J., Nicholls, G.K., Rodrigo, A.G., Solomon, W., 2002. Estimating mutation parameters, population history and genealogy simultaneously from temporally spaced sequence data. *Genetics*. 161, 1307–1320.

Drummond, A.J., Pybus, O.G., Rambaut, A., Forsberg, R., Rodrigo, A.G., 2003. Measurably evolving populations. *Trends Ecol. Evol.* 18, 8.

Drummond, A.J., Rambaut, A., Shapiro, B., Pybus, O.G., 2005. Bayesian coalescent inference of past population dynamics from molecular sequences. *Mol. Biol. Evol.* 22, 1185–1192.

Drummond, A.J., Ho, S.Y.W., Phillips, M.J., Rambaut, A., 2006. Relaxed phylogenetics and dating with confidence. *PLoS Biology*. 4, e88.

Drummond, A.J., Suchard, M.A., 2010. Bayesian random local clocks, or one rate to rule them all. *BMC Biology*. 8, 114.

Drummond, A.J., Suchard, M.A., Xie, D., Rambaut, A., 2012. Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Mol. Biol. Evol.* 29, 1969–1973.

Durbin, R., Eddy, S. R., Krogh, A., Mitchison, G. J., 1998. *Biological Sequence Analysis: Probabilistic Models of Proteins and Nucleic Acids*. Biology, Computer Science.

Eck, R.V., Dayhoff, M.O., 1966. Evolution of the Structure of Ferredoxin Based on Living Relics of Primitive Amino Acid Sequences. *Science*. 152, 363–6.

Escudero, D.J., Lurie, M.N., Mayer, K.H., King, M., Galea, S., Friedman, S.R., Marshall, B.D.L., 2017. The risk of HIV transmission at each step of the HIV care continuum among people who inject drugs: a modeling study. *BMC Public Health*. 17, 614.

European AIDS Clinical Society (EACS). Guidelines, version 8.2; European AIDS Clinical Society: Brussels, Belgium, 2017.

European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Thematic report: migrants. Monitoring implementation of the Dublin Declaration on Partnership to Fight HIV/AIDS in Europe and Central Asia: 2014 progress report. Stockholm: ECDC 2015a.

European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). WHO Regional Office for Europe. HIV/AIDS surveillance in Europe 2014. Stockholm: ECDC 2015b.

European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). WHO Regional Office for Europe. HIV/AIDS surveillance in Europe 2018 – 2017 data. Copenhagen: WHO Regional Office for Europe; ECDC 2018.

European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA). Drug related infectious diseases in Europe: update from the EMCDDA expert network. Luxembourg: Publications Office of the European Union; EMCDDA 2016.

Fabeni, L., Alteri, C., Orchi, N., Gori, C., Bertoli, A., Forbici, F., Montella, F., Pennica, A., De Carli, G., Giuliani, M., Continenza, F., Pinnetti, C., Nicastrì, E., Ceccherini-Silberstein, F., Mastroianni, C.M., Girardi, E., Andreoni, M., Antinori, A., Santoro, M.M., Perno, C.F., 2015. Recent transmission clustering of HIV-1C and CRF17_BF strains characterized by NNRTI-related mutations among newly diagnosed men in Central Italy. *PLoS One*. 10, e0135325.

Fakoya, I., Álvarez-del Arco, D., Woode-Owusu, M., Monge, S., Rivero-Montesdeoca, Y., Delpech, V., Rice, B., Noori, T., Pharris, A., Amato-Gauci, A.J., del Amo, J., Burns, F.M., 2015. A systematic review of post-migration acquisition of HIV among migrants from countries with generalised HIV epidemics living in Europe: implications for effectively managing HIV prevention programmes and policy. *BMC Public Health*. 15, 561.

Faria, N.R., Rambaut, A., Suchard, M.A., Baele, G., Bedford, T., Ward, M.J., Tatem, A.J., Sousa, J.D., Arinaminpathy, N., Pepin, J., Posada, D., Peeters, M., Pybus, O.G., Lemey, P., 2014. HIV epidemiology. The early spread and epidemic ignition of HIV-1 in human populations. *Science*. 346, 56–61.

Fauci, A.S., Redfield, R.R., Sigounas, G., Weahkee, M.D., Giroir, B.P., 2019. Ending the HIV Epidemic: A Plan for the United States. *JAMA*. 321(9), 844–845.

Felsenstein, J., 1981. Evolutionary Trees from DNA Sequences: A Maximum Likelihood Approach. 368–76.

Felsenstein, J., 1985. Confidence Limits on Phylogenies: An Approach Using the Bootstrap Author. *Evolution* (N Y). 39(4), 783–91.

Feng, Y., Broder, C.C., Kennedy, P.E., Berger, E.A., 1996. HIV-1 entry cofactor: Functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science*. 272, 872-877.

Foley, B.T., Leitner, T., Paraskevis, D., Peeters, M., 2016. Primate immunodeficiency virus classification and nomenclature: Review. *Infect. Genet. Evol.* 46, 150–158.

Fox, J., Castro, H., Kaye, S., McClure, M., Weber, J.N., Fidler, S., Resistance, U.K.C.G.o.H.D., 2010. Epidemiology of non-B clade forms of HIV-1 in men who have sex with men in the UK. *AIDS*. 24, 2397–2401.

Fraser, C., Donnelly, C.A., Cauchemez, S., Hanage, W.P., Van Kerkhove, M.D., Hollingsworth, T.D., Griffin, J., Baggaley, R.F., Jenkins, H.E., Lyons, E.J., Jombart, T., Hinsley, W.R., Grassly, N.C., Balloux, F., Ghani, A.C., Ferguson, N.M., Rambaut, A., Pybus, O.G., Lopez-Gatell, H., Alpuche-Aranda, C.M., Chapela, I.B., Zavala, E.P., Guevara, D.M., Checchi, F., Garcia, E., Hugonnet, S., Roth, C., WHO Rapid Pandemic Assessment Collaboration., 2009. Pandemic potential of a strain of influenza A (H1N1): early findings. *Science*. 19;324(5934), 1557-61.

Friedman, S.R., Curtis, R., Neaigus, A., Jose, B., Des Jarlais, D.C., 1999. Social networks, drug injectors' lives, and HIV/AIDS. New York: Kluwer/Plenum.

Friedman, S.R., Ompad, D.C., Maslow, C., Young, R., Case, P., Hudson, S.M., Diaz, T., Morse, E., Bailey, S., Des Jarlais, D.C., Perlis, T., Hollibaugh, A., Garfein, R.S., 2003. HIV prevalence, risk behaviors, and high-risk sexual and injection networks among young women injectors who have sex with women. *Am. J. Public Health*. 93, 902–6.

Friedman, S.R., Rossi, D., Braine, N., 2009. Theorizing “Big Events” as a potential risk environment for drug use, drug-related harm and HIV epidemic outbreaks. *Int. J. Drug Policy*. 20, 283–291.

Friedman, S.R., Downing, M.J., Smyrnov, P., Nikolopoulos, G., Schneider, J.A., Livak, B., Magiorkinis, G., Slobodanyk, L., Vasylyeva, T.I., Paraskevis, D., Psychogiou, M., Sypsa, V., Malliori, M.M., Hatzakis, A., 2014. Socially integrated transdisciplinary HIV prevention. *AIDS Behav.* 18, 1821–34.

Friedman-Kien, A.E., 1981. Disseminated Kaposi's sarcoma syndrome in young homosexual men. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 5(4), pp.468–471.

Fujimoto, K., Coghill, L.M., Weier, C.A., Hwang, L.Y., Kim, J.Y., Schneider, J.A., Metzker, M.L., Brown, J.M., 2017. Short communication: Lack of support for socially connected HIV-1 transmission among young adult black men who have sex with men. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 33, 935–40.

Gallo, R.C., Sarin, P.S., Gelmann, E.P., Robert-Guroff, M., Richardson, E., Kalyanaraman, V.S., Mann, D., Sidhu, G.D., Stahl, R.E., Zolla-Pazner, S., Leibowitch, J., Popovic, M., 1983. Isolation of Human T-Cell Leukemia Virus in Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS). *Science*. 220, 865–7.

Gao, F., Bailes, E., Robertson, D.L., Chen, Y., Rodenburg, C.M., Michael, S.F., Cummins, L.B., Arthur, L.O., Peeters, M., Shaw, G.M., Sharp, P.M., Hahn, B.H., 1999. Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes troglodytes*. *Nature*. 397(6718), 436-41.

Gatto, L., Catanzaro, D., Milinkovitch, M.C., 2006. Assessing the Applicability of the GTR Nucleotide Substitution Model Through Simulations. *Evol. Bioinform. Online*. 2, 145-55.

Giese, C., Igoe, D., Gibbons, Z., Hurley, C., Stokes, S., McNamara, S., Ennis, O., O'Donnell, K., Keenan, E., De Gascun, C., Lyons, F., Ward, M., Danis, K., Glynn, R., Waters, A., Fitzgerald, M., outbreak control team., 2015. Injection of new psychoactive substance snow blow associated with recently acquired HIV infections among homeless people who inject drugs in Dublin, Ireland. *Eurosurveillance*. 20(40), 1-6.

Gilbert, M.T.P., Rambaut, A., Wlasiuk, G., Spira, T.J., Pitchenik, A.E., Worobey, M., 2007. The emergence of HIV/AIDS in the Americas and beyond. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 104, 18566–18570.

Gilks, W.R., Richardson, S., Spiegelhalter, D., 1996. *Markov Chain Monte Carlo in Practice* Chapman & Hall/CRC.

Glauser, M.P., Francioli, P., 1984. Clinical and epidemiological survey of acquired immune deficiency syndrome in Europe. *Eur. J. Clin. Microbiol.* 3, 55–58.

Gottlieb, M.S., 2006. *Pneumocystis Pneumonia* - Los Angeles. 1981. *Am. J. Public Health.* 96(6), 980-1.

Gottlinger, H.G., Sodroski, J.G., Haseltine, W.A., 1989. Role of capsid precursor processing and myristoylation in morphogenesis and infectivity of human immunodeficiency virus type 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86, 5781-5785.

Grabowski, M.K., Redd, A.D., 2014. Molecular tools for studying HIV transmission in sexual networks. *Curr. Opin. HIV AIDS.* 9, 126–33.

Grant, R.M., Lama, J.R., Anderson, P.L., McMahan, V., Liu, A.Y., Vargas, L., Goicochea, P., Casapía, M., Guanira-Carranza, J.V., Ramirez-Cardich, M.E., Montoya-Herrera, O., Fernández, T., Veloso, V.G., Buchbinder, S.P., Chariyalertsak, S., Schechter, M., Bekker, L.-G., Mayer, K.H., Kallás, E.G., Amico, K.R., Mulligan, K., Bushman, L.R., Hance, R.J., Ganoza, C., Defechereux, P., Postle, B., Wang, F., McConnell, J.J., Zheng, J.-H., Lee, J., Rooney, J.F., Jaffe, H.S., Martinez, A.I., Burns, D.N., Glidden, D.V., 2010. Preexposure chemoprophylaxis for HIV prevention in men who have sex with men. *N. Engl. J. Med.* 363, 2587–2599.

Green, N., Hoenigl, M., Chaillon, A., Anderson, C.M., Kosakovsky Pond, S.L., Smith, D.M., Little, S.J., 2017. Partner services in adults with acute and early HIV infection. *AIDS.* 31, 287–93.

Grenfell, B.T., Pybus, O.G., Gog, J.R., Wood, J.L., Daly, J.M., Mumford, J.A., Holmes, E.C., 2004. Unifying the epidemiological and evolutionary dynamics of pathogens. *Science.* 303, 327–332.

Hall, B.G. & Barlow, M., 2006. Phylogenetic analysis as a tool in molecular epidemiology of infectious diseases. *Annals of epidemiology.* 16(3), pp.157–69.

Hallenberger, S., Bosch, V., Anglikar, H., Shaw, E., Klenk, H.D., Garten, W.S., 1992. Inhibition of furin-mediated cleavage activation of HIV-1 glycoprotein gp160. *Nature.* 360(6402), p.358-61.

Hasegawa, M., Kishino, H., Yano, T., 1985. Dating of the Human-Ape Splitting by a Molecular Clock of Mitochondrial DNA. *J. Mol. Evol.* 22, 160–74.

Hastings, W.K., 1970. Monte Carlo sampling methods using Markov chains and their applications. *Biometrika*. 57(1), 97.

Hatzakis, A., Sypsa, V., Paraskevis, D., Nikolopoulos, G., Tsiara, C., Micha, K., Panopoulos, A., Malliori, M., Psychogiou, M., Pharris, A., Wiessing, L., van de Laar, M., Donoghoe, M., Heckathorn, D.D., Friedman, S.R., Des Jarlais, D.C., 2015. Design and baseline findings of a large-scale rapid response to an HIV outbreak in people who inject drugs in Athens, Greece: The ARISTOTLE programme. *Addiction*. 110, 1453-67.

Hemelaar, J., Gouws, E., Ghys, P.D., Osmanov, S., Isolation, WHO-UNAIDS Network for HIV Characterisation, 2011. Global trends in molecular epidemiology of HIV-1 during 2000-2007. *AIDS*. 25, 679–689.

Hemelaar, J., 2012. The origin and diversity of the HIV-1 pandemic. *Trends Mol. Med*. 18, 182–192.

Hemelaar, J., Elangovan, R., Yun, J., Dickson-Tetteh, L., Fleminger, I., Kirtley, S., Williams, B., Gouws-Williams, E., Ghys, P.D., WHO–UNAIDS Network for HIV Isolation Characterisation, 2018. Global and regional molecular epidemiology of HIV-1, 1990-2015: a systematic review, global survey, and trend analysis. *Lancet Infect. Dis*. 19(2), 143-155.

Hernando, V., Alvarez-del Arco, D., Alejos, B., Monge, S., Amato-Gauci, A.J., Noori, T., Pharris, A., del Amo, J., 2015. HIV infection in migrant populations in the European Union and European Economic Area in 2007–2012: an epidemic on the move. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr*. 70, 204–11.

Ho, S.Y.W., 2013. Molecular clocks, relaxed variant. In: *Encyclopedia of Scientific Dating Methods*. Springer Science Business Media, pp.1–5.

Ho, S.Y.W., Duchêne, S., 2014. Molecular clock methods for estimating evolutionary rates and timescales. *Mol Ecol*. (24), 5947.

Hoenigl, M., Chaillon, A., Kessler, H.H., Haas, B., Stelzl, E., Weninger, K., Little, S.J., Mehta, S.R., 2016. Characterization of HIV transmission in south-East Austria. *PLoS One*. 11, e0151478.

Hofstra, L.M., Sauvageot, N., Albert, J., Alexiev, I., Garcia, F., Struck, D., Van de Vijver, D.A.M.C., Åsjö, B., Beshkov, D., Coughlan, S., Descamps, D., Griskevicius, A., Hamouda, O., Horban, A., Van Kasteren, M., Kolupajeva, T., Kostrikis, L.G., Liitsola, K., Linka, M., Mor, O., Nielsen, C., Otelea, D., Paraskevis, D., Paredes, R., Poljak, M., Puchhammer-Stöckl, E., Sönnernborg, A., Staneková, D., Stanojevic, M., Van Laethem, K., Zazzi, M., Zidovec Lepej, S., Boucher, C.A.B., Schmit, J.C., Wensing, A.M.J., SPREAD Program, Puchhammer-Stockl, E., Sarcletti, M., Schmied, B., Geit, M., Balluch, G., Vandamme, A.M., Vercauteren, J., Derdelinckx, I., Sasse, A., Bogaert, M., Ceunen, H., De Roo, A., De Wit, S., Echahidi, F., Fransen, K., Goffard, J.C., Goubau, P., Goudeseune, E., Yombi, J.C., Lacor, P., Liesnard, C., Moutschen, M., Pierard, D., Rens, R., Schrooten, Y., Vaira, D., Vandekerckhove, L.P.R., Van den Heuvel, A., Van Der Gucht, B., Van Ranst, M., Van Wijngaerden, E., Vandercam, B., Vekemans, M., Verhofstede, C., Clumeck, N., Van Laethem, K., Beshkov, D., Alexiev, I., Lepej, S.Z., Begovac, J., Kostrikis, L., Demetriades, I., Kousiappa, I., Demetriou, V., Hezka, J., Linka, M., Maly, M., Machala, L., Nielsen, C., Jørgensen, L.B., Gerstoft, J., Mathiesen, L., Pedersen, C., Nielsen, H., Laursen, A., Kvinesdal, B., Liitsola, K., Ristola, M., Suni, J., Sutinen, J., Descamps, D., Assoumou, L., Castor, G., Grude, M., Flandre, P., Storto, A., Hamouda, O., Kücherer, C., Berg, T., Braun, P., Poggensee, G., Däumer, M., Eberle, J., Heiken, H., Kaiser, R., Knechten, H., Korn, K., Müller, H., Neifer, S., Schmidt, B., Walter, H., Gunsenheimer-Bartmeyer, B., Harrer, T., Paraskevis, D., Hatzakis, A., Zavitsanou, A., Vassilakis, A., Lazanas, M., Chini, M., Lioni, A., Sakka, V., Kourkounti, S., Pappas, V., Antoniadou, A., Papadopoulos, A., Poulakou, G., Katsarolis, I., Protopapas, K., Chryssos, G., Drimis, S., Gargalianos, P., Xylomenos, G., Lourida, G., Psychogiou, M., Daikos, G.L., Sipsas, N.V., Kontos, A., Gamaletsou, M.N., Koratzanis, G., Sambatakou, H., Mariolis, H., Skoutelis, A., Papastamopoulos, V., Georgiou, O., Panagopoulos, P., Maltezos, E., Coughlan, S., De Gascun, C., Byrne, C., Duffy, M., Bergin, C., Reidy, D., Farrell, G., Lambert, J., O'Connor, E., Rochford, A., Low, J., Coakely, P., O'Dea, S., Hall, W., Mor, O., Levi, I., Chemtob, D., Grossman, Z., Zazzi, M., de Luca, A., Balotta, C., Riva, C., Mussini, C., Caramma, I., Capetti, A., Colombo, M.C., Rossi, C., Prati, F., Tramuto, F., Vitale, F., Ciccozzi, M., Angarano, G., Rezza, G., Kolupajeva, T., Vasins, O., Griskevicius, A., Lipnickiene, V., Schmit, J.C., Struck, D., Sauvageot, N., Hemmer, R., Arendt, V., Michaux, C., Staub, T., Sequin-Devaux, C., Wensing, A.M.J., Boucher, C.A.B., van de Vijver, D.A.M.C., van Kessel, A., van Bentum, P.H.M., Brinkman, K., Connell, B.J.,

van der Ende, M.E., Hoepelman, I.M., van Kasteren, M., Kuipers, M., Langebeek, N., Richter, C., Santegoets, R.M.W.J., Schrijnders-Gudde, L., Schuurman, R., van de Ven, B.J.M., Åsjö, B., Kran, A.B., Ormaasen, V., Aavitsland, P., Horban, A., Stanczak, J.J., Stanczak, G.P., Firlag-Burkacka, E., Wiercinska-Drapalo, A., Jablonowska, E., Maolepsza, E., Leszczyszyn-Pynka, M., Szata, W., Camacho, R., Palma, C., Borges, F., Paixão, T., Duque, V., Araújo, F., Otelea, D., Paraschiv, S., Tudor, A.M., Cernat, R., Chiriac, C., Dumitrescu, F., Prisecariu, L.J., Stanojevic, M., Jevtovic, D., Salemovic, D., Stanekova, D., Habekova, M., Chabadová, Z., Drobkova, T., Bukovinova, P., Shunnar, A., Truska, P., Poljak, M., Lunar, M., Babic, D., Tomazic, J., Vidmar, L., Vovko, T., Karner, P., Garcia, F., Paredes, R., Monge, S., Moreno, S., Del Amo, J., Asensi, V., Sirvent, J.L., de Mendoza, C., Delgado, R., Gutiérrez, F., Berenguer, J., Garcia-Bujalance, S., Stella, N., de Los Santos, I., Blanco, J.R., Dalmau, D., Rivero, M., Segura, F., Elías, M.J.P., Alvarez, M., Chueca, N., Rodríguez-Martín, C., Vidal, C., Palomares, J.C., Viciano, I., Viciano, P., Cordoba, J., Aguilera, A., Domingo, P., Galindo, M.J., Miralles, C., Del Pozo, M.A., Ribera, E., Iribarren, J.A., Ruiz, L., de la Torre, J., Vidal, F., Clotet, B., Albert, J., Heidarian, A., Aperia-Peipke, K., Axelsson, M., Mild, M., Karlsson, A., Sönnnerborg, A., Thalme, A., Navér, L., Bratt, G., Karlsson, A., Blaxhult, A., Gisslén, M., Svennerholm, B., Bergbrant, I., Björkman, P., Säll, C., Mellgren, Å., Lindholm, A., Kuylensstierna, N., Montelius, R., Azimi, F., Johansson, B., Carlsson, M., Johansson, E., Ljungberg, B., Ekvall, H., Strand, A., Mäkitalo, S., Öberg, S., Holmblad, P., Höfer, M., Holmberg, H., Josefson, P., Ryding, U., 2016. Transmission of HIV Drug Resistance and the Predicted Effect on Current First-line Regimens in Europe. *Clin. Infect. Dis.* 1;62(5), 655-663.

Holmes, E.C., 2004. The phylogeography of human viruses. *Mol. Ecol.* 13, 745–756.

Holmes, E.C., 2008. Evolutionary history and phylogeography of human viruses. *Annu. Rev. Microbiol.* 62, 307–328.

Hughes, J.P., Baeten, J.M., Lingappa, J.R., Magaret, A.S., Wald, A., de Bruyn, G., Kiarie, J., Inambao, M., Kilembe, W., Farquhar, C., Celum, C., Partners in Prevention HSV/HIV Transmission Study Team. 2012. Determinants of Per-Coital-Act HIV-1 Infectivity Among African HIV-1–Serodiscordant Couples. *J. Infect. Dis.* 205, 358-65.

Hull, M.W., Montaner, J., 2011. Antiretroviral Therapy: A Key Component of a Comprehensive HIV Prevention Strategy. *Curr. HIV/AIDS Rep.* 8, 85-93.

Hull, M.W., Montaner, J.S.G., 2013. HIV treatment as prevention: The key to an AIDS-free generation. *J. Food Drug Anal.* 21, S95-S101.

Institute of Health Metrics and Evaluation (IHME), Global Burden of Disease, Max Roser and Hannah Ritchie (2019) - "HIV / AIDS" (<https://ourworldindata.org/hiv-aids>)

International Committee on Taxonomy of Virus (ICTV). ICTV Taxonomy 2017 (<https://talk.ictvonline.org/taxonomy/w/ictv-taxonomy>).

International Committee on Taxonomy of Virus (ICTV). ICTV Taxonomy Release History 2017 (https://talk.ictvonline.org/taxonomy/p/taxonomy_releases).

Jukes, T.H., Cantor, C., 1969. Evolution of protein molecules. In: *Mammalian Protein Metabolism*. New York Acad. Press. 21–132.

Junqueira, D.M., Matos Almeida, S.E. de, 2016. HIV-1 subtype b: Traces of a pandemic. *Virology.* 495, 173–184.

Kamarulzaman, A., Altice, F.L., 2015. Challenges in managing HIV in people who use drugs. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 28, 10–16.

Kass, M.R.E., Carlin, P.B.P., Gelman, A., Neal, R.M., 1997. Markov Chain Monte Carlo in Practice: A Roundtable Discussion. 1–26.

Kayser, F.H., Bienz, K.A., Eckert, J., Zinkernagel, P.M., 2005. *Medical Microbiology*. Thieme.

Keele, B.F., Van Heuverswyn, F., Li, Y., Bailes, E., Takehisa, J., Santiago, M.L., Bibollet-Ruche, F., Chen, Y., Wain, L.V., Liegeois, F., Loul, S., Ngole, E.M., Bienvenue, Y., Delaporte, E., Brookfield, J.F., Sharp, P.M., Shaw, G.M., Peeters, M., Hahn, B.H., 2006. Chimpanzee reservoirs of pandemic and nonpandemic HIV-1. *Science.* 313(5786), pp.523–526.

Keele, B.F., Giorgi, E.E., Salazar-gonzalez, J.F., Decker, J.M., Pham, K.T., Salazar, M.G., Sun, C., Grayson, T., Wang, S., Li, H., Wei, X., Jiang, C., Kirchherr, J.L., Gao, F., Anderson, J.A., Ping, L.H., Swanstrom, R., Tomaras, G.D., Blattner,

W.A., Goepfert, P.A., Kilby, J.M., Saag, M.S., Delwart, E.L., Busch, M.P., Cohen, M.S., Montefiori, D.C., Haynes, B.F., Gaschen, B., Athreya, G.S., Lee, H.Y., Wood, N., Seoighe, C., Perelson, A.S., Bhattacharya, T., Korber, B.T., Hahn, B.H., Shaw, G.M., 2008. Identification and characterization of transmitted and early founder virus envelopes in primary HIV-1 infection. *105*(21).

Kentikelenis, A., Karanikolos, M., Williams, G., Mladovsky, P., King, L., Pharris, A., Suk, J.E., Hatzakis, A., McKee, M., Noori, T., Stuckler, D., 2015. How do economic crises affect migrants' risk of infectious disease? A systematic-narrative review. *Eur. J. Pub. Health.* *25*, 937–944.

Kerr, T., Marshall, B.D.L., Milloy, M.-J., Zhang, R., Guillemi, S., Montaner, J.S., Wood, E., 2012. Patterns of heroin and cocaine injection and plasma HIV-1 RNA suppression among a long-term cohort of injection drug users. *Drug Alcohol Depend.* *124*, 108-112.

Kharsany, A.B., Buthelezi, T.J., Frohlich, J.A., Yende-Zuma, N., Samsunder, N., Mahlase, G., Williamson, C., Travers, S.A., Marais, J.C., Dellar, R., Karim, S.S., Karim, Q.A., 2014. HIV infection in high school students in rural South Africa: role of transmissions among students. *AIDS Res. Hum. Retroviruses.* *30*, 956–65.

Kimura, M., 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* *16*(2), 111-20.

King, S.R., 1994. HIV: Virology and mechanisms of disease. *Ann. Emerg. Med.* *24*(3), 443–9.

Kingman, J., 1982a. The coalescent. *Stochastic Processes and their Applications.* *13*, 235–248.

Kingman, J., 1982b. On the genealogy of large populations. *Journal of Applied Probability.* *19*, 27.

Kivelä, P., Krol, A., Simola, S., Vaattovaara, M., Tuomola, P., Brummer-Korvenkontio, H., Ristola, M., 2007. HIV outbreak among injecting drug users in the Helsinki region: Social and geographical pockets. *Eur. J. Public Health.* *17*, 381-6.

Kiwanuka, N., Laeyendecker, O., Quinn, T.C., Wawer, M.J., Shepherd, J., Robb, M., Kigozi, G., Kagaayi, J., Serwadda, D., Makumbi, F.E., Reynolds, S.J., Gray, R.H., 2009. HIV-1 subtypes and differences in heterosexual HIV transmission among HIV-discordant couples in Rakai, Uganda. *AIDS*. 23, 2479–84.

Knipe, D.M. and P.M. Howley, *Fields virology*. 2013, Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins Health: Philadelphia, PA. p. 2 volumes.

Kostaki, E., Magiorkinis, G., Psychogiou, M., Flampouris, A., Iliopoulos, P., Papachristou, E., Daikos, G.L., Bonovas, S., Otelea, D., Friedman, S.R., Hatzakis, A., Paraskevis, D., 2017. Detailed molecular surveillance of the HIV-1 outbreak among people who inject drugs (PWID) in Athens during a period of four years. *Curr. HIV Res.* 15(6), 396-404.

Kostaki, E.G., Karamitros, T., Bobkova, M., Oikonomopoulou, M., Magiorkinis, G., Garcia, F., Hatzakis, A., Paraskevis, D., 2018a. Spatiotemporal Characteristics of the HIV-1 CRF02_AG/CRF63_02A1 Epidemic in Russia and Central Asia. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. 34, 415-20.

Kostaki, E.G., Nikolopoulos, G.K., Pavlitina, E., Williams, L., Magiorkinis, G., Schneider, J., Skaathun, B., Morgan, E., Psychogiou, M., Daikos, G.L., Sypsa, V., Smyrnov, P., Korobchuk, A., Malliori, M., Hatzakis, A., Friedman, S.R., Paraskevis, D., 2018b. Molecular Analysis of Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1)-Infected Individuals in a Network-Based Intervention (Transmission Reduction Intervention Project): Phylogenetics Identify HIV-1-Infected Individuals with Social Links. *J. Infect. Dis.* 218, 707-715.

Kuhnert, D., Stadler, T., Vaughan, T.G., Drummond, A.J., 2014. Simultaneous reconstruction of evolutionary history and epidemiological dynamics from viral sequences with the birth-death SIR model. *J. R. Soc. Interface*. 11, 20131106.

Kumar, S., Stecher, G., Tamura, K., 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular biology and evolution*. 33, 1870-4.

Lam, T.T.Y., Hon, C.C., Tang, J.W., 2010. Use of phylogenetics in the molecular epidemiology and evolutionary studies of viral infections. Vol. 47, *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*. 5-49 p.

Lanier, E.R., Ait-Khaled, M., Scott, J., Stone, C., Melby, T., Sturge, G., St Clair, M., Steel, H., Hetherington, S., Pearce, G., Spreen, W., Lafon, S., 2004. Antiviral efficacy of abacavir in antiretroviral therapy-experienced adults harbouring HIV-1 with specific patterns of resistance to nucleoside reverse transcriptase inhibitors. *Antivir. Ther.* 9(1), 37-45.

Larsen, M.V., Omland, L.H., Gerstoft, J., Røge, B.T., Larsen, C.S., Pedersen, G., Obel, N., Kronborg, G., 2010. Impact of injecting drug use on response to highly active antiretroviral treatment in HIV-1-infected patients: a nationwide population-based cohort study. *Scand. J. Infect. Dis.* 42, 917–923.

Lau, K.A., Wong, J.J.L., 2013. Current trends of HIV recombination worldwide. *Infect. Dis. Rep.* 5, e4.

Leitner, T., Escanilla, D., Franzen, C., Uhlen, M., Albert, J., 1996. Accurate reconstruction of a known HIV-1 transmission history by phylogenetic tree analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 10864–10869.

Leitner, T., Albert, J., 1999. The molecular clock of HIV-1 unveiled through analysis of a known transmission history. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 10752–10757.

Lemey, P., Rambaut, A., Drummond, A.J., Suchard, M.A., 2009. Bayesian phylogeography finds its roots. *PLoS Comput. Biol.* 5, e1000520

Lepej, S.Z., Vrakela, I.B., Poljak, M., Bozicevic, I., Begovac, J., 2009. Phylogenetic analysis of HIV sequences obtained in a respondent-driven sampling study of men who have sex with men. *AIDS Res. Hum. Retroviruses.* 25, 1335–8.

Levy, I., Mor, Z., Anis, E., Maayan, S., Leshem, E., Pollack, S., Chowers, M., Mor, O., Riesenber, K., Stoecker, Z., Ram, D., Grossman, Z., 2011. Men who have sex with men, risk behavior, and HIV infection: integrative analysis of clinical, epidemiological, and laboratory databases. *Clin. Infect. Dis.* 52, 1363–70.

Levy, J.A., Hoffman, A.D., Kramer, S.M., Landis, J.A., Shimabukuro, J.M., Oshiro, L.S., 1984. Isolation of Lymphocytopathic Retroviruses from San Francisco Patients with AIDS. *Science.* 225(4664), 840-2.

Lewis, F., Hughes, G.J., Rambaut, A., Pozniak, A., Leigh Brown, A.J., 2008. Episodic sexual transmission of HIV revealed by molecular phylodynamics. *PLoS Med.* 5, e50.

Lin, H., He, N., Zhou, S., Ding, Y., Qiu, D., Zhang, T., Wong, F.Y., 2013. Behavioral and molecular tracing of risky sexual contacts in a sample of Chinese HIV infected men who have sex with men. *Am. J. Epidemiol.* 177, 343–50.

Lingappa, J.R., Hughes, J.P., Wang, R.S., Baeten, J.M., Celum, C., Gray, G.E., Stevens, W.S., Donnell, D., Campbell, M.S., Farquhar, C., Essex, M., Mullins, J.I., Coombs, R.W., Rees, H., Corey, L., Wald, A., Partners in Prevention HSV/HIV Transmission Study Team, 2010. Estimating the Impact of Plasma HIV-1 RNA Reductions on Heterosexual HIV-1 Transmission Risk. *PLoS One.* 5, e12598.

Lole, K.S., Bollinger, R.C., Paranjape, R.S., Gadkari, D., Kulkarni, S.S., Novak, N.G., Ingersoll, R., Sheppard, H.W., Ray, S.C., 1999. Full-Length Human Immunodeficiency Virus Type 1 Genomes from Subtype C-Infected Seroconverters in India, with Evidence of Intersubtype Recombination. *J. Virol.* 73(1), 152-160.

Maddison, W.P., Maddison, D.R., 2018. Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Version 3.10. (<http://mesquiteproject.org>).

Magiorkinis, G., Angelis, K., Mamais, I., Katzourakis, A., Hatzakis, A., Albert, J., Lawyer, G., Hamouda, O., Struck, D., Vercauteren, J., Wensing, A., Alexiev, I., Åsjö, B., Balotta, C., Camacho, R.J., Coughlan, S., Griskevicius, A., Grossman, Z., Horban, A., Kostrikis, L.G., Lepej, S.J., Liitsola, K., Linka, M., Nielsen, C., Otelea, D., Paredes, R., Poljak, M., Puchhammer-Stöckl, E., Schmit, J.C., Sönnernborg, A., Staneková, D., Stanojevic, M., Boucher, C.A.B., Nikolopoulos, G., Vasylyeva, T., Friedman, S.R., van de Vijver, D.A.M.C., Angarano, G., Chaix, M.-L., de Luca, A., Korn, K., Loveday, C., Soriano, V., Yerly, S., Zazzi, M., Vandamme, A.M., Paraskevis, D., 2016. The global spread of HIV-1 subtype B epidemic. *Infect. Genet. Evol.* 46, 169–79.

Martin, D.P., Williamson, C., Posada, D., 2005. RDP2: recombination detection and analysis from sequence alignments. *Bioinformatics.* 21(2), 260-262.

Masur, H., Michelis, M.A., Greene, J.B., Onorato, I., Stouwe, R.A., Holzman, R.S., Wormser, G., Brettman, L., Lange, M., Murray, H.W., Cunningham-Rundles, S.,

1981. An outbreak of community- acquired *Pneumocystis carinii* pneumonia. *New Engl. J. Med.* 305(24), 1431–7.

Mathers, B.M., Degenhardt, L., Phillips, B., Wiessing, L., Hickman, M., Strathdee, S.A., Wodak, A., Panda, S., Tyndall, M., Toufik, A., Mattick, R.P., 2008. Global epidemiology of injecting drug use and HIV among people who inject drugs: a systematic review. *Lancet.* 372, 1733–1745.

Mathers, B.M., Degenhardt, L., Bucello, C., Lemon, J., Wiessing, L., Hickman, M., 2013. Mortality among people who inject drugs: a systematic review and meta-analysis. *Bull. World Health Organ.* 91, 102–123.

Mbisa, J.L., Fearnhill, E., Dunn, D.T., Pillay, D., Asboe, D., Cane, P.A., 2015. Evidence of self-sustaining drug resistant HIV-1 lineages among untreated patients in the United Kingdom. *Clin. Infect. Dis.* 61, 829–836.

McCormack, S., Dunn, D.T., Desai, M., Dolling, D.I., Gafos, M., Gilson, R., Sullivan, A.K., Clarke, A., Reeves, I., Schembri, G., Mackie, N., Bowman, C., Lacey, C.J., Apea, V., Brady, M., Fox, J., Taylor, S., Antonucci, S., Khoo, S.H., Rooney, J., Nardone, A., Fisher, M., McOwan, A., Phillips, A.N., Johnson, A.M., Gazzard, B., Gill, O.N., 2015. Preexposure prophylaxis to prevent the acquisition of HIV-1 infection (PROUD): effectiveness results from the pilot phase of a pragmatic open-label randomised trial. *Lancet.* 387(10013), 53–60.

Melbye, M., Biggar, R.J., Ebbesen, P., Sarngadharan, M.G., Weiss, S.H., Gallo, R.C., Blattner, W.A., 1984. Seroepidemiology of HTLV-III antibody in Danish homosexual men: prevalence, transmission, and disease outcome. *Br. Med. J. (Clin. Res. Ed.)*. 289, 573–575.

Metropolis, N., Ulam, S., 1949. The Monte Carlo Method. *J. Am. Stat. Assoc.* 44(247), 335–41

Metropolis, N., Rosenbluth, A.W., Rosenbluth, M.N., Teller, A.H., Teller, E., 1953. Equation of State Calculations by Fast Computing Machines. *J. Chem. Phys.* 21(6), 1087–92.

Middelkoop, K., Rademeyer, C., Brown, B.B., Cashmore, T.J., Marais, J.C., Scheibe, A.P., Bandawe, G.P., Myer, L., Fuchs, J.D., Williamson, C., Bekker, L.G.,

2014. Epidemiology of HIV-1 subtypes among men who have sex with men in Cape Town, South Africa. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 65, 473–80.

Miller W.C., Rosenberg N.E., Rutstein S.E., Powers K.A., 2010. Role of acute and early HIV infection in the sexual transmission of HIV. *Curr. Opin. HIV AIDS.* 5, 277-82.

Modrow, S., *Molecular virology.* 2013, New York: Springer. pages cm.

Molina, J.-M., Capitant, C., Spire, B., Pialoux, G., Cotte, L., Charreau, I., Tremblay, C., Le Gall, J.-M., Cua, E., Pasquet, A., Raffi, F., Pintado, C., Chidiac, C., Chas, J., Charbonneau, P., Delaugerre, C., Suzan-Monti, M., Loze, B., Fonsart, J., Peytavin, G., Cheret, A., Timsit, J., Girard, G., Lorente, N., Préau, M., Rooney, J.F., Wainberg, M.A., Thompson, D., Rozenbaum, W., Doré, V., Marchand, L., Simon, M.-C., Etien, N., Aboulker, J.-P., Meyer, L., Delfraissy, J.-F., 2015. On-demand preexposure prophylaxis in men at high risk for HIV-1 infection. *N. Engl. J. Med.* 373, 2237–2246.

Morgan, E., Skaathun, B., Duvoisin, R., Michaels, S., Schneider, J.A., 2018. Are HIV Seroconversions Among Young Men Who Have Sex With Men Associated With Social Network Proximity to Recently or Long-Term HIV-Infected Individuals? *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 1, 77(2), 128-134.

Mount, D.W., 2008. Distance Methods for Phylogenetic Prediction Distance Methods for Phylogenetic Prediction. *CSH Protoc.* 1, pdb.top33.

Mourad, R., Chevennet, F., Dunn, D.T., Fearnhill, E., Delpech, V., Asboe, D., Gascuel, O., Hue, S., 2015. A phylotype-based analysis highlights the role of drug-naïve HIV-positive individuals in the transmission of antiretroviral resistance in the UK. *AIDS.* 29, 1917–1925.

Murnane, P.M., Hughes, J.P., Celum, C., Lingappa, J.R., Mugo, N., Farquhar, C., Kiarie, J., Wald, A., Baeten, J.M., Partners in Prevention HSV/HIV Transmission Study Team, 2012. Using Plasma Viral Load to Guide Antiretroviral Therapy Initiation to Prevent HIV-1 Transmission. *PLoS One.* 7, e51192.

Murray, M., Hogg, R.S., Lima, V.D., May, M.T., Moore, D.M., Abgrall, S., Bruyand, M., D'Arminio Monforte, A., Tural, C., Gill, M.J., Harris, R.J., Reiss, P.,

Justice, A., Kirk, O., Saag, M., Smith, C.J., Weber, R., Rockstroh, J., Khaykin, P., Sterne, J.A.C., 2012. The effect of injecting drug use history on disease progression and death among HIV-positive individuals initiating combination antiretroviral therapy: collaborative cohort analysis. *HIV Med.* 13, 89–97.

Mushahwar, I.K., 2006. Human Immunodeficiency Viruses: Molecular Virology, Pathogenesis, Diagnosis and Treatment. *Perspect. Med. Virol.* 13(6), 75–87.

Musumeci, D., Riccardi, C., Montesarchio, D., 2015. G-Quadruplex Forming Oligonucleotides as Anti-HIV Agents. *Molecules.* 20, 17511–17532.

Nakano, T., Lu, L., Liu, P., Pybus, O.G., 2004. Viral gene sequences reveal the variable history of hepatitis C virus infection among countries. *The Journal of infectious diseases.* 190(6), pp.1098–108.

Niculescu, I., Paraschiv, S., Paraskevis, D., Abagiu, A., Batan, I., Banica, L., Otelea, D., 2015. Recent HIV-1 outbreak among intravenous drug users in Romania: evidence for cocirculation of CRF14_BG and subtype F1 strains. *AIDS Res. Hum. Retrovir.* 31, 488–495.

Nikolopoulos, G., Paraskevis, D., Hatzakis, A., 2008. HIV epidemiology in Greece. *Future Microbiol.* 3(5), 507-16.

Nikolopoulos, G.K., Sypsa, V., Bonovas, S., Paraskevis, D., Malliori-Minerva, M., Hatzakis, A., Friedman, S.R., 2015. Big events in Greece and HIV infection among people who inject drugs. *Subst. Use Misuse.* 50, 825–38.

Nikolopoulos, G.K., Kostaki, E.G., Paraskevis, D., 2016a. Overview of HIV molecular epidemiology among people who inject drugs in Europe and Asia. *Infect. Genet. Evol.* 46, 256-268.

Nikolopoulos, G.K., Pavlitina, E., Muth, S.Q., Schneider, J., Psychogiou, M., Williams, L.D., Paraskevis, D., Sypsa, V., Magiorkinis, G., Smyrnov, P., Korobchuk, A., Vasylyeva, T.I., Skaathun, B., Malliori, M., Kafetzopoulos, E., Hatzakis, A., Friedman, S.R., 2016b. A network intervention that locates and intervenes with recently HIV-infected persons: The Transmission Reduction Intervention Project (TRIP). *Sci. Rep.* 6, 38100.

Onafuwa-Nuga, A., Telesnitsky, A., 2009. The remarkable frequency of human immunodeficiency virus type 1 genetic recombination. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 73(3), 451-80.

Panichsillapakit, T., Smith, D.M., Wertheim, J.O., Richman, D.D., Little, S.J., Mehta, S.R., 2016. Prevalence of transmitted HIV drug resistance among recently infected persons in San Diego, CA 1996-2013. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 71, 228–236.

Paraschiv, S., Banica, L., Nicolae, I., Niculescu, I., Abagiu, A., Jipa, R., Pineda-Peña, A.C., Pingarilho, M., Neaga, E., Theys, K., Libin, P., Otelea, D., Abecasis, A., 2017. Epidemic dispersion of HIV and HCV in a population of co-infected Romanian injecting drug users. *PLoS One.* 12, e0185866.

Paraskevis, D., Hatzakis, A., 1999. Molecular Epidemiology of HIV-1 Infection. *AIDS reviews.* 238–49.

Paraskevis, D., Magiorkinis, E., Magiorkinis, G., Anastassopoulou, C., Lazanas, M., Chrysos, G., Vandamme, A.M., Hatzakis, A., 2001. Molecular characterization of a complex, recombinant human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) isolate (A/G/J/K/?): evidence to support the existence of a novel HIV-1 subtype. *J. Gen. Virol.* 82(Pt 10), 2509-14.

Paraskevis, D., Magiorkinis, E., Magiorkinis, G., Kiosses, V.G., Lemey, P., Vandamme, A.M., Rambaut, A., Hatzakis, A., 2004. Phylogenetic reconstruction of a known HIV-1 CRF04_cpx transmission network using maximum likelihood and Bayesian methods. *J. Mol. Evol.* 59, 709–717.

Paraskevis, D., Magiorkinis, E., Magiorkinis, G., Sypsa, V., Paparizos, V., Lazanas, M., Gargalianos, P., Antoniadou, A., Panos, G., Chrysos, G., Sambatakou, H., Karafoulidou, A., Skoutelis, A., Kordossis, T., Koratzanis, G., Theodoridou, M., Daikos, G.L., Nikolopoulos, G., Pybus, O.G., Hatzakis, A., Multicentre Study on HIV Heterogeneity, 2007. Increasing prevalence of HIV-1 subtype A in Greece: estimating epidemic history and origin. *J. Infect. Dis.* 196(8), 1167-76.

Paraskevis, D., Pybus, O., Magiorkinis, G., Hatzakis, A., Wensing, A.M., Vijver, D.A. van de, Albert, J., Angarano, G., Asjo, B., Balotta, C., Boeri, E., Camacho, R., Chaix, M.-L., Coughlan, S., Costagliola, D., Luca, A.D., Mendoza, C. de,

Derdelinckx, I., Grossman, Z., Hamouda, O., Hoepelman, I.M., Horban, A., Korn, K., Kuecherer, C., Leitner, T., Loveday, C., Macrae, E., Maljkovic, I., Meyer, L., Nielsen, C., Coul, E.L.O. de, Ormaasen, V., Perrin, L., Puchhammer-Stockl, E., Ruiz, L., Salminen, M., Schmit, J.-C., Schuurman, R., Soriano, V., Stanczak, J., Stanojevic, M., Struck, D., Laethem, K.V., Violin, M., Yerly, S., Zazzi, M., Boucher, C.A., Vandamme, A.-M., Programme, S., 2009. Tracing the HIV-1 subtype b mobility in Europe: A phylogeographic approach. *Retrovirology*. 6, 49.

Paraskevis, D., Nikolopoulos, G., Tsiara, C., Paraskeva, D., Antoniadou, A., Lazanas, M., Gargalianos, P., Psychogiou, M., Malliori, M., Kremastinou, J., Hatzakis, A., 2011. HIV-1 outbreak among injecting drug users in Greece, 2011: a preliminary report. *Euro Surveill*. 8, 16(36).

Paraskevis, D., Nikolopoulos, G., Fotiou, A., Tsiara, C., Paraskeva, D., Sypsa, V., Lazanas, M., Gargalianos, P., Psychogiou, M., Skoutelis, A., Wiessing, L., Friedman, S. R., Jarlais, D. C., Terzidou, M., Kremastinou, J., Malliori, M., Hatzakis, A., 2013. Economic recession and emergence of an HIV-1 outbreak among drug injectors in Athens metropolitan area: a longitudinal study. *PLoS One*. 8(11), e78941.

Paraskevis, D., Zavitsanou, A., Magiorkinis, E., Gargalianos, P., Xylomenos, G., Lazanas, M., Chini, M., Skoutelis, A., Papastamopoulos, V., Antoniadou, A., Papadopoulos, A., Psychogiou, M., Daikos, G., Vassilakis, A., Chrysos, G., Papanizos, V., Kourkounti, S., Sambatakou, H., Kordossis, T., Koratzanis, G., Panagopoulos, P., Maltezos, E., Drimis, S., Hatzakis, A., 2014. Patterns of drug resistance among newly diagnosed HIV-1 infected patients in Greece during the last decade: the crucial role of transmission networks. *J. Int. AIDS Soc.* 17(4 Suppl 3), 19742.

Paraskevis, D., Paraschiv, S., Sypsa, V., Nikolopoulos, G., Tsiara, C., Magiorkinis, G., Psychogiou, M., Flampouris, A., Mardarescu, M., Niculescu, I., Batan, I., Malliori, M., Otelea, D., Hatzakis, A., 2015. Enhanced HIV-1 surveillance using molecular epidemiology to study and monitor HIV-1 outbreaks among intravenous drug users (IDUs) in Athens and Bucharest. *Infect. Genet. Evol.* 35, 109–121.

Paraskevis, D., Nikolopoulos, G.K., Magiorkinis, G., Hodges-Mameletzis, I., Hatzakis, A., 2016. The application of HIV molecular epidemiology to public health. *Infect. Genet. Evol.* 46, 159–68.

Paraskevis, D., Kostaki, E., Nikolopoulos, G.K., Sypsa, V., Psychogiou, M., Del Amo, J., Hodges-Mameletzis, I., Paraskeva, D., Skoutelis, A., Malliori, M., Williams, L., Friedman, S.R., Daikos, G.L., Hatzakis, A., 2017. Molecular tracing of the geographical origin of human immunodeficiency virus type 1 infection and patterns of epidemic spread among migrants who inject drugs in Athens. *Clin. Infect. Dis.* 65, 2078–84.

Paraskevis, D., Hatzakis, A., 2019. Global molecular epidemiology of HIV-1: the chameleon challenge. *Lancet Infect. Dis.* 19(2), 114–115.

Patel, P., Borkowf, C.B., Brooks, J.T., Lasry, A., Lansky, A., Mermin, J., 2014. Estimating per act HIV transmission risk: a systematic review. *AIDS.* 28, 1509–1519.

Pearson, W.R., Robins, G., Zhang, T., 2012. More Reliable Phylogenetic Tree Reconstruction. Kannan L, Wheeler WC. Maximum Parsimony on Phylogenetic networks. 1–10.

Peeters, M., Honore, C., Huet, T., Bedjabaga, L., Ossari, S., Bussi, P., Cooper, R.W., Delaporte, E., 1989. Isolation and partial characterization of an HIV-related virus occurring naturally in chimpanzees in Gabon. *AIDS.* 3, 625–630.

Peeters, M., Sharp, P.M., 2000. Genetic diversity of HIV-1: the moving target. *AIDS.* 14 Suppl. 3, S129–40.

Peeters, M., Jung, M., Ayouba, A., 2013. The origin and molecular epidemiology of HIV. *Expert Rev. Anti-Infect. Ther.* 11, 885–896.

Peters, P.J., Pontones, P., Hoover, K.W., Patel, M.R., Galang, R.R., Shields, J., Blosser, S.J., Spiller, M.W., Combs, B., Switzer, W.M., Conrad, C., Gentry, J., Khudyakov, Y., Waterhouse, D., Owen, S.M., Chapman, E., Roseberry, J.C., McCants, V., Weidle, P.J., Broz, D., Samandari, T., Mermin, J., Walthall, J., Brooks, J.T., Duwve, J.M., Indiana HIV Outbreak Investigation Team, 2016. HIV infection linked to injection use of oxycodone in Indiana, 2014–2015. *N. Engl. J. Med.* 375, 229–39.

Pharris, A., Wiessing, L., Sfetcu, O., Hedrich, D., Botescu, A., Fotiou, A., Nikolopoulos, G.K., Malliori, M., Salminen, M., Suk, J.E., Griffiths, P., van de Laar, M.J., 2011. Human immunodeficiency virus in injecting drug users in Europe following a reported increase of cases in Greece and Romania, 2011. *Euro Surveill.* 16, pii:20032.

Pineda-Pena, A.C., Faria, N.R., Imbrechts, S., Libin, P., Abecasis, A.B., Deforche, K., Gomez-Lopez, A., Camacho, R.J., de Oliveira, T., Vandamme, A.M., 2013. Automated subtyping of HIV-1 genetic sequences for clinical and surveillance purposes: performance evaluation of the new REGA version 3 and seven other tools. *Infect. Genet. Evol.* 19, 337–348.

Pingen, M., Nijhuis, M., Bruijn, J.A. De., Boucher, C.A.B., Wensing, A.M.J., 2011. Evolutionary pathways of transmitted drug-resistant HIV-1. *J. Antimicrob. Chemother.* 66(7), 1467-80.

Pinkerton, S.D., 2008. Probability of HIV Transmission During Acute Infection in Rakai, Uganda. *AIDS Behav.* 12, 677-684.

Plantier, J.C., Leoz, M., Dickerson, J.E., De Oliveira, F., Cordonnier, F., Lemee, V., Damond, F., Robertson, D.L., Simon, F., 2009. A new human immunodeficiency virus derived from gorillas. *Nat. Med.* 15, 871–872.

Poon, A.F., Joy, J.B., Woods, C.K., Shurgold, S., Colley, G., Brumme, C.J., Hogg, R.S., Montaner, J.S., Harrigan, P.R., 2015. The impact of clinical, demographic and risk factors on rates of HIV transmission: a population-based phylogenetic analysis in British Columbia, Canada. *J. Infect. Dis.* 211, 926–35.

Preston, B.D., Poiesz, B.J., Loeb, L.A., 1988. Fidelity of HIV-1 reverse transcriptase. *Science.* 242, 1168-71.

Price, M.N., Dehal, P.S., Arkin, A.P., 2010. FastTree 2--approximately maximum-likelihood trees for large alignments. *PLoS One.* 5(3), e9490.

Pybus, O.G., Rambaut, A., Harvey, P.H., 2000. An integrated framework for the inference of viral population history from reconstructed genealogies. *Genetics.* 155, 1429–1437.

Pybus, O.G., Charleston, M.A., Gupta, S., Rambaut, A., Holmes, E.C., Harvey, P.H., 2001. The epidemic behavior of the hepatitis C virus. *Science.* 292, 2323–2325.

Pybus, O.G., Rambaut, A., 2009. Evolutionary analysis of the dynamics of viral infectious disease. *Nat. Rev. Genet.* 10, 540–550.

Quinn, T.C., Wawer, M.J., Sewankambo, N., Serwadda, D., Li, C., Wabwire-Mangen, F., Meehan, M.O., Lutalo, T., Gray, R.H., 2000. Viral Load and Heterosexual

Transmission of Human Immunodeficiency Virus Type 1. *N. Engl. J. Med.* 342, 921-29.

Rambaut, A., Posada, D., Crandall, K.A., Holmes, E.C., 2004. The causes and consequences of HIV evolution. *Nat. Rev. Genet.* 5, 52–61.

Rambaut, A., Lam, T.T., Max Carvalho, L., Pybus, O.G., 2016. Exploring the temporal structure of heterochronous sequences using TempEst. *Virus Evol.* 2(1), vew007.

Reeves, J.D. and Doms R.W., 2002. Human immunodeficiency virus type 2. *J. Gen. Virol.* 83(Pt 6), p.1253-65.

Reis, M., Bello, G., Guimaraes, M.L., Stefani, M.M.A., 2017. Characterization of HIV-1 CRF90_BF1 and putative novel CRFs_BF1 in Central West, North and Northeast Brazilian regions. *PLoS One.* 12(6), e0178578.

Renjifo, B., Gilbert, P., Chaplin, B., Msamanga, G., Mwakagile, D., Fawzi, W., Essex, M., 2004. Preferential in-utero transmission of HIV-1 subtype C as compared to HIV-1 subtype A or D. *AIDS.* 18, 1629–1636.

Rhee, S.Y., Blanco, J.L., Jordan, M.R., Taylor, J., Lemey, P., Varghese, V., Hamers, R.L., Bertagnolio, S., de Wit, T.F., Aghokeng, A.F., Albert, J., Avi, R., Avila-Rios, S., Bessong, P.O., Brooks, J.I., Boucher, C.A., Brumme, Z.L., Busch, M.P., Bussmann, H., Chaix, M.L., Chin, B.S., D'Aquin, T.T., De Gascun, C.F., Derache, A., Descamps, D., Deshpande, A.K., Djoko, C.F., Eshleman, S.H., Fleury, H., Frange, P., Fujisaki, S., Harrigan, P.R., Hattori, J., Holguin, A., Hunt, G.M., Ichimura, H., Kaleebu, P., Katzenstein, D., Kiertiburanakul, S., Kim, J.H., Kim, S.S., Li, Y., Lutsar, I., Morris, L., Ndemi, N., Kee, P.N., Paranjape, R.S., Peeters, M., Poljak, M., Price, M.A., Ragonnet-Cronin, M.L., Reyes-Teran, G., Rolland, M., Sirivichayakul, S., Smith, D.M., Soares, M.A., Soriano, V.V., Ssemwanga, D., Stanojevic, M., Stefani, M.A., Sugiura, W., Sungkanuparph, S., Tanuri, A., Tee, K.K., Truong, H.M., van de Vijver, D.A., Vidal, N., Yang, C., Yang, R., Yebra, G., Ioannidis, J.P., Vandamme, A.M., Shafer, R.W., 2015a. Correction: geographic and temporal trends in the molecular epidemiology and genetic mechanisms of transmitted HIV-1 drug resistance: an individual-patient- and sequence-level meta-analysis. *PLoS Med.* 12, e1001845.

Rhee, S.Y., Blanco, J.L., Jordan, M.R., Taylor, J., Lemey, P., Varghese, V., Hamers, R.L., Bertagnolio, S., Rinke de Wit, T.F., Aghokeng, A.F., Albert, J., Avi, R., Avila-Rios, S., Bessong, P.O., Brooks, J.I., Boucher, C.A., Brumme, Z.L., Busch, M.P., Bussmann, H., Chaix, M.L., Chin, B.S., D'Aquin, T.T., De Gascun, C.F., Derache, A., Descamps, D., Deshpande, A.K., Djoko, C.F., Eshleman, S.H., Fleury, H., Frange, P., Fujisaki, S., Harrigan, P.R., Hattori, J., Holguin, A., Hunt, G.M., Ichimura, H., Kaleebu, P., Katzenstein, D., Kiertiburanakul, S., Kim, J.H., Kim, S.S., Li, Y., Lutsar, I., Morris, L., Ndembu, N., Ng, K.P., Paranjape, R.S., Peeters, M., Poljak, M., Price, M.A., Ragonnet-Cronin, M.L., Reyes-Teran, G., Rolland, M., Sirivichayakul, S., Smith, D.M., Soares, M.A., Soriano, V.V., Ssemwanga, D., Stanojevic, M., Stefani, M.A., Sugiura, W., Sungkanuparph, S., Tanuri, A., Tee, K.K., Truong, H.M., van de Vijver, D.A., Vidal, N., Yang, C., Yang, R., Yebra, G., Ioannidis, J.P., Vandamme, A.M., Shafer, R.W., 2015b. Geographic and temporal trends in the molecular epidemiology and genetic mechanisms of transmitted HIV-1 drug resistance: an individual-patient- and sequence-level meta-analysis. *PLoS Med.* 12, e1001810.

Rife, B.D., Mavian, C., Chen, X., Ciccozzi, M., Salemi, M., Min, J., Prospero, M.C., 2017. Phylodynamic applications in 21st century global infectious disease research. *Glob. Health Res. Policy.* 8, 2:13.

Robbins, K.E., Lemey, P., Pybus, O.G., Jaffe, H.W., Youngpairoj, A.S., Brown, T.M., Salemi, M., Vandamme, A.M., Kalish, M.L., 2003. U.S. human immunodeficiency virus type 1 epidemic: date of origin, population history, and characterization of early strains. *J. Virol.* 77, 6359–6366.

Robertson, A.M., Garfein, R.S., Wagner, K.D., Mehta, S.R., Magis-Rodriguez, C., Cuevas-Mota, J., Moreno-Zuniga, P.G., Strathdee, S.A., Proyecto El Cuete IV and STAHR II, 2014. Evaluating the impact of Mexico's drug policy reforms on people who inject drugs in Tijuana, B.C., Mexico, and San Diego, CA, United States: a binational mixed methods research agenda. *Harm. Reduct J.* 11:4.

Robertson, D.L., Anderson, J.P., Bradac, J.A., Carr, J.K., Foley, B., Funkhouser, R.K., Gao, F., Hahn, B.H., Kalish, M.L., Kuiken, C., Learn, G.H., Leitner, T., McCutchan, F., Osmanov, S., Peeters, M., Pieniazek, D., Salminen, M., Sharp, P.M., Wolinsky, S., Korber, B., 2000. HIV-1 nomenclature proposal. *Science.* 288, 55–55

Ronquist, F., Teslenko, M., van der Mark, P., Ayres, D.L., Darling, A., Höhna, S., Larget, B., Liu, L., Suchard, M.A., Huelsenbeck, J.P., 2012. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Syst. Biol.* 61, 539–42.

Rosenberg, M.S., 2009. *Sequence alignment: methods, models, concepts, and strategies*. Berkeley: University of California Press.

Rothman, K.J., Lash, T.L., 2008. *Modern Epidemiology*. third ed. Wolters Kluwer Lippincott Williams & Wilkins.

Ryom, L., Boesecke, C., Gisler, V., Manzardo, C., Rockstroh, J.K., Puoti, M., Furrer, H., Miro, J.M., Gatell, J.M., Pozniak, A., Behrens, G., Battegay, M., Lundgren, J.D., 2016. Essentials from the 2015 European AIDS clinical society (EACS) guidelines for the treatment of adult HIV-positive persons. *HIV Med.* 17, 83–88.

Ryu, W.-S., *Molecular virology of human pathogenic viruses*. 2017. Amsterdam: Academic Press. xv, 423 pages.

Safren, S.A., Mayer, K.H., Ou, S.S., McCauley, M., Grinsztejn, B., Hosseinipour, M.C., Kumarasamy, N., Gamble, T., Hoffman, I., Celentano, D., Chen, Y.Q., Cohen, M.S., HPTN 052 Study Team, 2015. Adherence to Early Antiretroviral Therapy: Results From HPTN 052, a Phase III, Multinational Randomized Trial of ART to Prevent HIV-1 Sexual Transmission in Serodiscordant Couples. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 69, 234–40.

Saitou, N., Nei, M., 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 406–25.

Scaduto, D.I., Brown, J.M., Haaland, W.C., Zwickl, D.J., Hillis, D.M., Metzker, M.L., 2010. Source identification in two criminal cases using phylogenetic analysis of HIV-1 DNA sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 21242–21247.

Seitz, R., 2016. Human Immunodeficiency Virus (HIV). *Transfus. Med. Hemotherapy.* 43(3), 203–22.

Sepkowitz Kent A., 2001. AIDS — The First 20 Years. *N. Engl. J. Med.* 344(23).

Sharp, P. M., Bailes, E., Chaudhuri, R. R., Rodenburg, C. M., Santiago, M. O., Hahn, B. H., 2001. «The origins of acquired immune deficiency syndrome viruses: where and when?». *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 356(1410), 867-76.

Sharp, P. M., Hahn, B.H., 2011. Origins of HIV and the AIDS pandemic. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 1(1), a006841.

Simonetti, F.R., Lai, A., Monno, L., Binda, F., Brindicci, G., Punzi, G., Bozzi, G., Violin, M., Galli, M., Zazzi, M., Angarano, G., Balotta, C., 2014. Identification of a new HIV-1BC circulating recombinant form (CRF60_BC) in Italian young men having sex with men. *Infect. Genet. Evol.* 23, 176–181.

Skar, H., Axelsson, M., Berggren, I., Thalme, A., Gyllensten, K., Liitsola, K., Brummer-Korvenkontio, H., Kivelä, P., Spångberg, E., Leitner, T., Albert, J., 2011. Dynamics of two separate but linked HIV-1 CRF01_AE outbreaks among injection drug users in Stockholm, Sweden, and Helsinki, Finland. *J. Virol.* 85, 510-8.

Skoura, L., Metallidis, S., Pilalas, D., Kourelis, A., Margariti, A., Papadimitriou, E., Antoniadou, Z.A., Chrysanthidis, T., Tsachouridou, O., Kollaras, P., Nikolaidis, P., Malisiovas, N., 2013. High rates of transmitted drug resistance among newlydiagnosed antiretroviral naive HIV patients in Northern Greece, data from 2009–2011. *Clin. Microbiol. Infect.* 19, E169–E172.

Slatkin, M., Maddison, W.P., 1989. A cladistic measure of gene flow inferred from the phylogenies of alleles. *Genetics.* 123, 603–613.

Smyrnov, P., Williams, L.D., Korobchuk, A., Sazonova, Y., Nikolopoulos, G.K., Skaathun, B., Morgan, E., Schneider, J., Vasylyeva, T.I., Friedman, S.R., 2018. Risk network approaches to locating undiagnosed HIV cases in Odessa, Ukraine. *J. Int. AIDS Soc.* 21(1).

Sokal, R. R., and Michener, C.D., 1958. A Statistical Method for Evaluating Systematic Relationships. *Univ. Kansas Sci. Bull.* 38, 1409–38.

Solomon, S.S., Mehta, S.H., McFall, A.M., Srikrishnan, A.K., Saravanan, S., Laeyendecker, O., Balakrishnan, P., Celentano, D.D., Solomon, S., Lucas, G.M., 2016. Community viral load, antiretroviral therapy coverage, and HIV incidence in India: a cross-sectional, comparative study. *Lancet HIV.* 3, e183-e190.

Soriano, V., Gomes, P., Heneine, W., Holguín, A., Doruana, M., Antunes, R., Mansinho, K., Switzer, W.M., Araujo, C., Shanmugam, V., Lourenço, H., González-Lahoz, J., Antunes, F., 2000. Human immunodeficiency virus type 2 (HIV-2) in Portugal: clinical spectrum, circulating subtypes, virus isolation, and plasma viral load. *J. Med. Virol.* 61(1), 111-6.

Stadler, T., 2009. On incomplete sampling under birth – death models and connections to the sampling-based coalescent. *J. Theor. Biol.* 261(1), 58–66.

Stadler, T., 2010. Sampling-through-time in birth-death trees. *J. Theor. Biol.* 267, 396–404.

Stadler, T., Kouyos, R., von Wyl, V., Yerly, S., Boni, J., Burgisser, P., Klimkait, T., Joos, B., Rieder, P., Xie, D., Gunthard, H.F., Drummond, A.J., Bonhoeffer, S., 2012. Estimating the basic reproductive number from viral sequence data. *Mol. Biol. Evol.* 29, 347–357.

Stadler, T., Bonhoeffer, S., 2013a. Uncovering epidemiological dynamics in heterogeneous host populations using phylogenetic methods. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. Ser. B Biol. Sci.* 368, 20120198.

Stadler, T., Kuhnert, D., Bonhoeffer, S., Drummond, A.J., 2013b. Birth-death skyline plot reveals temporal changes of epidemic spread in HIV and hepatitis C virus (HCV). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 228–233.

Stamatakis, A., 2014. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics.* 30, 1312–3.

Stephenson, K.E., Barouch, D.H., 2013. A global approach to HIV-1 vaccine development. *Immunol. Rev.* 254, 295–304.

Stolk, L.M., Luers, J.F., 2004. Increasing number of anti-HIV drugs but no definite cure. Review of anti-HIV drugs. *Pharm. World Sci.* 26, 133-136.

Strathdee, S.A., Stachowiak, J.A., Todd, C.S., Al-Delaimy, W.K., Wiebel, W., Hankins, C., Patterson, T.L., 2006. Complex emergencies, HIV, and substance use: no “big easy” solution. *Subst. Use Misuse.* 41, 1637–1651.

Strathdee, S.A., Stockman, J.K., 2010. Epidemiology of HIV among injecting and noninjecting drug users: current trends and implications for interventions. *Curr. HIV/AIDS Rep.* 7, 99–106.

Struck, D., Lawyer, G., Ternes, A.M., Schmit, J.C., Bercoff, D.P., 2014. COMET: adaptive context-based modeling for ultrafast HIV-1 subtype identification. *Nucleic acids research.* 42, e144.

Sypsa, V., Paraskevis, D., Malliori, M., Nikolopoulos, G. K., Panopoulos, A., Kantzanou, M., Katsoulidou, A., Psychogiou, M., Fotiou, A., Pharris, A., Van De Laar, M., Wiessing, L., Jarlais, D. D., Friedman, S. R., Hatzakis A., 2015. Homelessness and Other Risk Factors for HIV Infection in the Current Outbreak Among Injection Drug Users in Athens, Greece. *Am. J. Public Health.* 105(1), 196-204.

Sypsa, V., Psychogiou, M., Paraskevis, D., Nikolopoulos, G., Tsiara, C., Paraskeva, D., Micha, K., Malliori, M., Pharris, A., Wiessing, L., Donoghoe, M., Friedman, S., Jarlais, D.D., Daikos, G., Hatzakis, A., 2017. Rapid decline in HIV incidence among persons who inject drugs during a fast-track combination prevention program after an HIV outbreak in Athens. *J. Infect. Dis.* 215, 1496–505.

Takebe, Y., Uenishi, R., Li, X., 2008. Global molecular epidemiology of HIV: understanding the genesis of AIDS pandemic. *Adv. Pharmacol.* 56, 1-25.

Tamalet, C., Ravaux, I., Moreau, J., Bregigeon, S., Tourres, C., Richet, H., Abat, C., Colson, P., 2015. Emergence of clusters of CRF02_AG and B human immunodeficiency viral strains among men having sex with men exhibiting HIV primary infection in southeastern France. *J. Med. Virol.* 87, 1327–1333.

Tamura, K., Nei, M., 1993. Estimation of the Number of Nucleotide Substitutions in the Control Region of Mitochondrial DNA in Humans and Chimpanzees. *Mol. Biol. Evol.* 10(3), 512–25.

Taylor, B. S., Sobieszczyk, M. E., McCutchan, F. E., Hammer, S. M., 2008. The challenge of HIV-1 subtype diversity. *N. Engl. J. Med.* 358, 1590–1602.

Tebit, D.M. and Arts E.J., 2011. Tracking a century of global expansion and evolution of HIV to drive understanding and to combat disease. *Lancet Infect. Dis.* 11(1), p.45-56.

TenoRes Study Group, 2016. Global epidemiology of drug resistance after failure of WHO recommended first-line regimens for adult HIV-1 infection: a multicentre retrospective cohort study. *Lancet Infect. Dis.* 16, 565–575.

Thomson, M.M., Najera, R., 2007. Increasing HIV-1 genetic diversity in Europe. *J. Infect. Dis.* 196, 1120–4.

Tienen, Cv., van der Loeff, M.S., Zaman, S.M., Vincent, T., Sarge-Njie, R., Peterson, I., Leligdowicz, A., Jaye, A., Rowland-Jones, S., Aaby, P., Whittle, H., 2010. Two distinct epidemics: the rise of HIV-1 and decline of HIV-2 infection between 1990 and 2007 in rural Guinea-Bissau. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 53(5), 640-7.

Tovanabutra, S., Robison, V., Wongtrakul, J., Sennum, S., Suriyanon, V., Kingkeow, D., Kawichai, S., Tanan, P., Duerr, A., Nelson, K.E., 2002. Male viral load and heterosexual transmission of HIV-1 subtype E in northern Thailand. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 29, 275-83.

Turner, B.G., Summers, M.F., 1999. Structural biology of HIV. *J. Mol. Biol.* 285(1), 1–32.

Tymeczyk, O., Jamison, K., Pathela, P., Braunstein, S., Schillinger, J.A., Nash, D., 2018. HIV Care and Viral Load Suppression After Sexual Health Clinic Visits by Out-of-Care HIV-Positive Persons. *AIDS Patient Care STDS.* 32, 390-98.

United Nations Office on Drugs and Crime (UNODC), 2014. World Drug Report (Vienna, Austria).

Van der Kuyl, A. C., Cornelissen, M., 2007. Identifying HIV-1 dual infections. *Retrovirology.* 4, 67.

Van Heuverswyn, F., Li, Y., Neel, C., Bailes, E., Keele, B.F., Liu, W., Loul, S., Butel, C., Liegeois, F., Bienvenue, Y., Ngolle, E.M., Sharp, P.M., Shaw, G.M., Delaporte, E., Hahn, B.H., Peeters, M., 2006. Human immunodeficiency viruses: SIV infection in wild gorillas. *Nature.* 444(7116), p.164.

Vandamme, A.M., Camacho, R.J., Ceccherini-Silberstein, F., de Luca, A., Palmisano, L., Paraskevis, D., Paredes, R., Poljak, M., Schmit, J.C., Soriano, V., Walter, H., Sonnerborg, A., 2011. European recommendations for the clinical use of HIV drug resistance testing: 2011 update. *AIDS Rev.* 13, 77–108.

Vasylyeva, T.I., Friedman, S.R., Paraskevis, D., Magiorkinis, G., 2016. Integrating molecular epidemiology and social network analysis to study infectious diseases: towards a socio-molecular era for public health. *Infect. Genet. Evol.* 46, 248–55.

Vasylyeva, T.I., Liulchuk, M., Friedman, S.R., Sazonova, I., Faria, N.R., Katzourakis, A., Babii, N., Scherbinska, A., Thézé, J., Pybus, O.G., Smyrnov, P., Mbisa, J.L., Paraskevis, D., Hatzakis, A., Magiorkinis, G., 2018. Molecular epidemiology reveals the role of war in the spread of HIV in Ukraine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 115, 1051–6.

Virtamo, J., 2005. "Birth death processes", *Queueing Theory.* 38.3143.

Volz, E.M., Frost, S.D., 2013a. Inferring the source of transmission with phylogenetic data. *PLoS Comput. Biol.* 9, e1003397.

Volz, E.M., Ionides, E., Romero-Severson, E.O., Brandt, M.G., Mokotoff, E., Koopman, J.S., 2013b. HIV-1 transmission during early infection in men who have sex with men: a phylodynamic analysis. *PLoS Med.* 10, e1001568.

Wallace, R.G., Hodac, H., Lathrop, R.H., Fitch, W.M., 2007. A statistical phylogeography of influenza A H5N1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 4473–4478.

Wawer, M.J., Gray, R.H., Sewankambo, N.K., Serwadda, D., Li, X., Laeyendecker, O., Kiwanuka, N., Kigozi, G., Kiddugavu, M., Lutalo, T., Nalugoda, F., Wabwire-Mangen, F., Meehan, M.P., Quinn, T.C., 2005. Rates of HIV-1 Transmission per Coital Act, by Stage of HIV-1 Infection, in Rakai, Uganda. *J. Infect. Dis.* 191, 1403-9.

Weber, R., Huber, M., Battegay, M., Stähelin, C., Castro Batanjer, E., Calmy, A., Bregenzer, A., Bernasconi, E., Schoeni-Affolter, F., Ledergerber, B., 2015. Influence of noninjecting and injecting drug use on mortality, retention in the cohort, and antiretroviral therapy, in participants in the Swiss HIV Cohort Study. *HIV Med.* 16, 137–151.

Wensing, A.M., Calvez, V., Gunthard, H.F., Johnson, V.A., Paredes, R., Pillay, D., Shafer, R.W., Richman, D.D., 2017. 2017 Update of the drug resistance mutations in HIV-1. *Top. Antivir. Med.* 24, 132–133.

Wertheim, J.O., Kosakovsky Pond, S.L., Forgione, L.A., Mehta, S.R., Murrell, B., Shah, S., Smith, D.M., Scheffler, K., Torian, L.V., 2017. Social and genetic networks of HIV-1 transmission in New York City. *PLoS Pathog.* 13, e1006000.

World Health Organisation (WHO), 2015. Consolidated Strategic Information Guidelines for HIV in the Health Sector. Geneva, Switzerland (<https://www.who.int/>).

WHO/UNAIDS, 2013. Guidelines for Second Generation HIV Surveillance: An Update: Know Your Epidemic. Geneva, Switzerland (<http://www.unaids.org/en/>).

WHO/UNAIDS, 2018. Global AIDS update 2018. Geneva, Switzerland (<http://www.unaids.org/en/>).

WHO/UNAIDS, 2019. Global AIDS update 2019. Geneva, Switzerland (<http://www.unaids.org/en/>).

Wilgenbusch, J.C., Swofford, D., 2003. Inferring evolutionary trees with PAUP. *Curr. Protoc. Bioinformatics*. Chapter 6, Unit 6.4.

Wittkop, L., Gunthard, H.F., deWolf, F., Dunn, D., Cozzi-Lepri, A., de Luca, A., Kucherer, C., Obel, N., vonWyl, V., Masquelier, B., Stephan, C., Torti, C., Antinori, A., Garcia, F., Judd, A., Porter, K., Thiebaut, R., Castro, H., van Sighem, A.I., Colin, C., Kjaer, J., Lundgren, J.D., Paredes, R., Pozniak, A., Clotet, B., Phillips, A., Pillay, D., Chene, G., 2011. Effect of transmitted drug resistance on virological and immunological response to initial combination antiretroviral therapy for HIV (EuroCoord-CHAIN joint project): a European multicohort study. *Lancet Infect. Dis.* 11, 363–371.

Yang, W.L., Kouyos, R.D., Boni, J., Yerly, S., Klimkait, T., Aubert, V., Scherrer, A.U., Shilaih, M., Hinkley, T., Petropoulos, C., Bonhoeffer, S., Gunthard, H.F., 2015a. Persistence of transmitted HIV-1 drug resistance mutations associated with fitness costs and viral genetic backgrounds. *PLoS Pathog.* 11, e1004722.

Yang, W.L., Kouyos, R., Scherrer, A.U., Boni, J., Shah, C., Yerly, S., Klimkait, T., Aubert, V., Furrer, H., Battegay, M., Cavassini, M., Bernasconi, E., Vernazza, P., Held, L., Ledergerber, B., Gunthard, H.F., 2015b. Assessing the paradox between transmitted and acquired HIV type 1 drug resistance mutations in the Swiss HIV cohort study from 1998 to 2012. *J. Infect. Dis.* 212, 28–38.

Yebra, G., Hodcroft, E.B., Ragonnet-Cronin, M.L., Pillay, D., Brown, A.J., PANGEA_HIV Consortium, ICONIC Project, 2016. Using nearly full-genome HIV sequence data improves phylogeny reconstruction in a simulated epidemic. *Sci. Rep.* 6, 39489.

Yebra, G., Frampton, D., Gallo Cassarino, T., Raffle, J., Hubb, J., Ferns, R.B., Waters, L., Tong, C.Y.W., Kozlakidis, Z., Hayward, A., Kellam, P., Pillay, D., Clark, D., Nastouli, E., Leigh Brown, A.J., ICONIC Consortium, 2018. A high HIV-1 strain variability in London, UK, revealed by full-genome analysis: Results from the ICONIC project. *PLoS One.* 13, e0192081.

Zeh, C., Inzaule, S.C., Ondo, P., Nafisa, L.G., Kasembeli, A., Otieno, F., Vandenhoudt, H., Amornkul, P.N., Mills, L.A., Nkengasong, J.N., 2016. Molecular epidemiology and transmission dynamics of recent and long-term HIV-1 infections in rural Western Kenya. *PLoS One.* 11, e0147436.

Zhao, B., Han, X., Xu, J., Hu, Q., Chu, Z., Zhang, J., Lu, L., Wang, Z., Fu, J., Chen, X., Yan, H., Zhuang, M., Wang, L., Sun, A., Zhang, C.M., Shang, H., 2015. Increase of RT-related transmitted drug resistance in non-CRF01_AE among HIV type 1-infected men who have sex with men in the 7 cities of China. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 68, 250–255.

Zheng, Z., Li, Y., Jiang, Y., Liang, X., Qin, S., Nehl, E.J., 2018. Population HIV transmission risk for serodiscordant couples in Guangxi, Southern China: A cohort study. *Medicine (Baltimore).* 97(36), e12077.