Molekularna heterogenost virusa humane imunodeficijencije tipa 1 i uloga transmisijskih lanaca u lokalnom širenju infekcije u Hrvatskoj

Oroz, Maja

Doctoral thesis / Disertacija

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:291812

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-20**

Repository / Repozitorij:

Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Maja Oroz

Molekularna heterogenost virusa humane imunodeficijencije tipa 1 i uloga transmisijskih lanaca u lokalnom širenju infekcije u Hrvatskoj

DISERTACIJA

Zagreb, 2020.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Maja Oroz

Molekularna heterogenost virusa humane imunodeficijencije tipa 1 i uloga transmisijskih lanaca u lokalnom širenju infekcije u Hrvatskoj

DISERTACIJA

Zagreb, 2020.

Doktorska disertacija je izrađena u Klinici za infektivne bolesti "Dr. Fran Mihaljević", Zagreb.

Voditelji rada: prof.dr.sc. Josip Begovac i doc.dr.sc. Snježana Židovec Lepej

Zahvale

Zahvaljujem svojim mentorima prof.dr.sc. Josipu Begovcu i doc.dr.sc. Snježani Židovec Lepej na brojnim savjetima u svakodnevnom radu koji su mi pomogli da se profesionalno usmjerim, osmislim temu rada te da izradim ovu doktorsku disertaciju.

Zahvaljujem kolegici dr.sc. Ani Planinić na pomoći oko uhodavanja molekularnih metoda i na pomoći oko rukovanja sa svojeglavim kapilarnim sekvencerom.

Zahvaljujem svim kolegama iz Laboratorija za imunološku i molekularnu dijagnostiku na svakodnevnoj pomoći s reagensima, aparatima i općenitoj podršci tijekom izrade doktorske disertacije.

Zahvaljujem kolegama s Instituta Ruđer Bošković, doc.dr.sc. Oliveru Vugreku, dr.sc. Robertu Belužiću i Filipu Rokiću na pomoći oko uhodavanja metode sekvenciranja nove generacije te analize i interpretacije dobivenih podataka.

Hvala kolegama Maji Lunar i Tomažu Marku Zorecu za obradu filogenetičkih i filodinamičkih podataka.

Na kraju veliko hvala mojoj obitelji, posebice mami i tati za veliku podršku i oslonac koji su mi pružili tijekom brojnih godina školovanja i suprugu koji je bio uz mene i pomagao mi da uskladim obiteljski život s obavezama na fakultetu te mi pomogao s brojnim savjetima.

SADRŽAJ

1. UVOD I SVRHA RADA 1
1.1. Rekonstrukcija otkrića virusa HIV-1 2
1.2. Epidemiologija HIV-1 infekcije 3
1.2.1. Epidemiologija HIV-1 infekcije u svijetu 4
1.2.2. Epidemiologija HIV-1 infekcije u Hrvatskoj 4
1.3. Klasifikacija virusa HIV-1 5
1.4. Globalna i regionalna distribucija podtipova i rekombinanti HIV-1 6
1.5. Biološke karakteristike virusa HIV-1 8
1.5.1. Organizacija genoma i strukture virusne čestice HIV-1 8
1.5.2. HIV-1 stanični ciklus 10
1.5.3. Genetička varijabilnost virusa HIV-1 13
1.6. Patogeneza HIV-1 infekcije 14
1.6.1. Akutna faza HIV-1 infekcije 14
1.6.2. Kronična faza infekcije 15
1.7. Antiretrovirusno liječenje HIV-1 infekcije 17
1.7.1. Klasifikacija antiretrovirusnih lijekova 18
1.8. Rezistencija na antiretrovirusne lijekove 18
1.8.1. Antiretrovirusno liječenje i prevalencija primarne rezistencije u Hrvatskoj 20
1.8.2. Nukleotidni/nukleozidni inhibitori reverzne transkriptaze 21
1.8.3. Ne-nukleozidni inhibitori reverzne transkriptaze 22
1.8.4. Inhibitori virusne proteaze 23
1.8.5. Inhibitori virusne integraze 24
1.9. Laboratorijske metode analize kliničke rezistencije HIV-1 na antiretrovirusne lijekove 26
1.9.1. Genotipizacija HIV-1 tehnologijom sekvenciranja po Sangeru 26
1.9.2. Genotipizacija HIV-1 tehnologijom sekvenciranja nove generacije 27
1.10. Molekularna analiza transmisijskih mreža 30
1.10.1. Filogenetska analiza 30
1.10.2. Filodinamička analiza 31
1.10.3. Rekonstrukcija epidemiološke povezanosti HIV-om zaraženih osoba u Hrvatskoj 32
2. HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA 34
3. CILJEVI RADA 35
4. MATERIJALI I METODE 36

4.1. Ispitanici ... 36
4.2. Biološki uzorci ... 36
4.3. Popis kemikalija ... 37
4.4. Oprema i potrošni materijal ... 40
4.5. Računalni programi i on-line alati ... 41
4.6. Metode ... 42
4.6.1. Određivanje broja CD4+ T-limfocita ... 42
4.6.2. Kvantifikacija HIV-1 RNA ... 42
4.6.3. Izolacija virusne HIV-1 RNA ... 42
4.6.4. Amplifikacija *pol* regije HIV-1 genoma ... 43
4.6.5. Sekvenciranje *pol* regije HIV-1 genoma ... 45
4.6.6. Pročišćavanje produkata reakcije sekvenciranja i postupak kapilarne elektroforeze ... 46
4.6.7. Bioinformatička analiza sekvenci i identifikacija mutacija povezanih s rezistencijom HIV-1 na antiretrovirusne lijekove ... 47
4.6.8. Sekvenciranje gena za virusnu HIV-RT, -PR i –IN tehnologijom NGS ... 48
4.6.9. Filogenetska i filodinamička analiza sekvenci dobivenih tehnologijom SS ... 55
4.6.10. Statistička analiza ... 57
5. REZULTATI ... 58
5.1. Ispitanici ... 58
5.2. Analiza mutacija povezanih s primarnom rezistencijom HIV-1 na antiretrovirusne lijekove ... 60
5.2.1. Mutacije povezane s rezistencijom na inhibitore virusne RT ... 60
5.2.2. Mutacije povezane s rezistencijom na inhibitore virusne proteaze ... 63
5.2.3. Mutacije povezane s rezistencijom na inhibitore virusne integraze ... 64
5.3. Klinička interpretacija detektiranih obrazaca mutacija povezanih s primarnom rezistencijom HIV-1 na antiretrovirusne lijekove ... 68
5.4. Analiza mutacija povezanih a primarnom rezistencijom HIV-1 na antiretrovirusne lijekove pomoću tehnologije NGS ... 72
5.5. Filogenetska analiza ... 75
5.5.1. Filogenetska analiza sekvenci podtipa A1 ... 75
5.5.2. Filogenetska analiza sekvenci podtipa C ... 77
5.5.3. Filogenetska analiza sekvenci podtipa B ... 78
5.5.4. Karakterizacija istaknutih transmisijskih klastera ... 81
5.5.5. Analiza geografske distribucije sekvenci podtipa B ... 87
5.6. Filodinamička analiza sekvenci podtipa B ... 89
5.7. Statistička analiza karakteristika ispitanika ... 91
6. RASPRAVA ... 93

7. ZAKLJUČCI 108
8. KRATKI SADRŽAJ NA HRVATSKOM JEZIKU 109
9. KRATKI SADRŽAJ NA ENGLESKOM JEZIKU 110
10. POPIS LITERATURE 111
11. ŽIVOTOPIS 130

POPIS KRATICA

3TC-lamivudin
ABC-abakavir
AIDS-engl. Acquired Immuno Deficiency Syndrome; sindrom stečene imunodeficijencije
AK-aminokiselina
ART-engl. Antiretroviral therapy; antiretrovirusna terapija
ATP-adenozin trifosfat
ATV-atazanavir
BIC-biktegravir
BLAST-engl. Basic Local Alignment Tool; tražilica za nukleotidne slijedove
cDNA-engl. complementary deoxiribonucleic acid; komplementarna deoksiribonukleinska kiselina
CMV-citomegalovirus
CNS-engl. Central nervous system; središnji živčani sustav
CRF-engl. Circulating Recombinant Form; cirkulirajuća rekombinantna forma
d4T-stavudin
ddc-zalcitabin
ddI-didanozin
ddNTP-dideoksinukleotid trifosfat
DLV-delavirdin
DNA- engl. Deoxiribonucleic acid; deoksiribonukleinska kiselina
dNTP-deoksinukleotid trifosfat
DRV-darunavir
DTG-dolutegravir
EFV-efavirenc
EMA- engl. European Medicines Agency; Europska agencija za lijekove
EMIS-engl. European MSM Internet study; europska studija MSM zajednice
ESAR-engl. European Society for Translational Antiviral Research; Europsko društvo za translacijsko antiretrovirusno istraživanje
ETV-etravirin
EVG-elvitegravir
FDA-engl. US Food and Drug Administration; Američka agencija za hranu i lijekove
FPV-fosamprenavir
FTC-emtricitabin
gp-glikoprotein
GTR model-engl. General time reversible model; model općeg reverzibilnog vremena
HAART-engl. Highly Active Antiretroviral Therapy; vrlo djelotvorno antiretrovirusno liječenje
HIV-1-engl. Human Imunodeficiency Virus type 1; virus ljudske imunodeficijencije tipa 1
HIV-2-engl. Human Imunodeficiency Virus type 2; virus ljudske imunodeficijencije tipa 2
HPD interval-engl. Highest posterior density interval; interval najveće posteriorne gustoće
HR-engl. High-level resistance; visoka razina rezistencije
HTLV-engl. human T-cell leukemia virus; ljudski virus leukemije T-limfocita

IAS-USA-engl. International AIDS Society-USA-američki ogranak međunarodnog društva za borbu protiv AIDS-a
IDU-engl. Injecting drug users; intravenski korisnici droga
IDV-indinavir
InSTI-engl. Integrase Strand Transfer Inhibitor; inhibitor integraze
IR-engl. Intermediate resistance; umjerena rezistencija
KZIB-Klinika za infektivne bolesti "Dr. Fran Mihaljević"
LAV-fr. Lymphadenopathie associe virus; virus udružen s limfadenopatijom
LGBT- zajednica lezbijki, homoseksualnih, biseksualnih i transrodnih/transseksualnih osoba
LPV-lopinavir
LR-engl. Low-level resistance; niska razina rezistencije
LTR-engl. Long Terminal Repeat; dugi ponavljajući krajevi
MCMC-engl. Markov chain Monte Carlo; Markovljev lanac Monte Carlo
MDR-engl. Multidrug Resistance; rezistencije na više lijekova
MGT-muški urogenitalni sustav
MSM-engl. Men who have sex with men; muškarci koji imaju spolne odnose s muškarcima
NFV-nelfinavir
NGS-engl. Next generation sequencing; sekvenciranje nove generacije
NNRTI-engl. Non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor; nenukleozidni inhibitor reverzne transkriptaze
NRTI/NtRTI-engl. Nucleoside/nucleotide reverse transcriptase inhibitor; nukleozidni/nukleotidni inhibitor reverzne transkriptaze
NVP-nevirapin
OR-engl. Odds ratio; omjer rizika
PBS-engl. Primer Binding Site; mjesto vezanja početnice
PCR-engl. Polymerase Chain Reaction; lančana reakcija polimeraze
PI-engl. Protease inhibitor, inhibitor proteaze
PIC-pre-integracijski kompleks
PR-proteaza
PRS-engl. Possible resistance; moguća razina rezistencije
RAL-raltegravir
RNA-engl. Ribonucleic acid; ribonukleinska kiselina
RPV-rilpivirin
RRE-Rev Responsive Element; regija u RNA transkriptu za koju se veže Rev protein
RT-reverzna transkriptaza/transkripcija
RT-PCR-engl. Reverse transcriptase polymerase chain reaction; lančana reakcija polimeraze s reverznom transkripcijom
RTV-ritonavir
S-engl. Susceptible; osjetljiv
SAD-Sjedinjene Američke Države
SDRM-engl. Surveillance drug resistance mutations HRVATSKI dodati
SIV-engl. Simian Immunodeficiency Virus, virus imunodeficijencije majmuna
SS-sekvenciranje po Sangeru
ss cDNA-engl. single stranded complementar DNA; jednolančana komplementarna DNA

SQV-sakvinavir
TAM-engl. Thymidine Analog resistance Mutation; mutacija povezana s rezistencijom na timidinske analoge
TAR-engl. Transcriptional Activation Region; regija koja regulira aktivaciju transkripcije
tMRCA-engl. Time of the most common recent ancestor; vrijeme postanka najrecentnijeg pretka
TDF-tenofovir
TPV-tipranavir
URF-engl. Unique recombinant form; jedinstvena rekombinantna forma
WT-divlji tip
ZDV-zidovudin

Aminokiseline:

A-alanin
C-cistein
D-asparaginska kiselina
E-glutaminska kiselina
F-fenilalanin
G-glicin
H-histidin
I-izoleucin
K-lizin
L-leucin
M-metionin
N-asparagin
P-prolin
Q-glutamin
R-arginin
S-serin
T-treonin
V-valin
W-triptofan
Y-tirozin

1. UVOD I SVRHA RADA

Virus ljudske imunodeficijencije tipa 1 (engl. *Human immunodeficiency virus type 1*, HIV-1) je RNA virus koji se ubraja u porodicu *Retroviridae*, rod *Lentivirus*. Infekcija s HIV-1 uzrokuje progresivnu depleciju CD4+ T-limfocita i trajnu hiperaktivaciju imunosnog sustava zaraženih osoba, a u slučaju neliječenja uzrokuje smrt [1].

HIV-1 infekcija se vrlo djelotvorno liječi antiretrovirusnom terapijom (engl. *antiretroviral therapy*, ART) koja djeluje na način da smanjuje viremiju u plazmi na nemjerljivu razinu (<50 kopija HIV-1 RNA po mL) te tako smanjuje morbiditet, mortalitet i transmisiju uzrokovanu HIV-om [2]. Postoji više skupina lijekova koji se primjenjuju u liječenju, no u Hrvatskoj su zastupljene sljedeće 4 klase antiretrovirusnih lijekova: nukleozidni (engl. *Nucleoside/nucleotide reverse transcriptase inhibitors*, NRTI/NtRTI) i nenukleozidni (engl. *Non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors*, NNRTI) inhibitori reverzne transkriptaze, inhibitori virusne proteaze (engl. *Protease inhibitors*, PI), inhibitori virusne integraze (engl. *Integrase strand-transfer inhibitors*, InSTI) i antagonisti CCR5 receptora (engl. *CCR5-receptor antagonists*). Iako je djelotvornost ART-a visoka, zbog pojave rezistencije virusa na lijekove, samo liječenje može biti ugroženo. Infekcija sojevima HIV-1 koji su rezistentni na antiretrovirusne lijekove tj. razvoj primarne rezistencije u novozaraženih, terapijski-naivnih osoba može povećati rizik od kasnijeg neuspjeha antiretrovirusnog liječenja. Stoga primarna rezistencija HIV-1 na antiretrovirusne lijekove ima veliko javnozdravstveno značenje te postoji potreba za njenim nadziranjem na nacionalnoj razini [3].

Razumijevanje dinamike HIV-1 transmisije, posebice u kontekstu analize puteva primarne rezistencije, od velike je važnosti za praćenje HIV-1 infekcije i razvoja intervencijskih strategija. U tu svrhu potrebno je provesti opsežne opservacijske studije o nastanku i kretanju transmisijskih klastera na lokalnoj i globalnoj razini [4, 5]. Transmisijski klaster se definira kao set HIV-1 sekvenci koje se grupiraju na osnovi genomske sličnosti te su epidemiološki povezane [6]. Zbog iznimno velike heterogenosti virusa te posljedično brze evolucije, transmisijski klasteri se uspješno identificiraju filogenetskom analizom. Filogenetska analiza, osim što se koristi u svrhu identifikacije i stratifikacije transmisijskih klastera HIV-1, vrlo je korisna za razjašnjavanje strukture lokalne HIV-1 epidemije i evaluaciju raznih socijalnih mreža i rizičnog seksualnog ponašanja povezanih s HIV-1 transmisijom. Kada se povežu filogenetski podatci s epidemiološkim i kliničkim podatcima

takvi rezultati predstavljaju iznimno vrijedan javnozdravstveni podatak [7]. U idućim poglavljima prikazan je pregled dosadašnje literature s posebnim osvrtom na biološke značajke virusa HIV-1, epidemiologiju infekcije i karakterizaciju transmisijskih mreža filogenetskom analizom te na analizu rezistencije virusa na antiretrovirusne lijekove i njezin javnozdravstveni značaj.

1.1. Rekonstrukcija otkrića virusa HIV-1

Evolucijski gledano, virus ljudske imunodeficijencije (engl. *Human immunodeficiency virus,* HIV) se relativno nedavno razvio, literaturni podatci predviđaju njegov inicijalni nastanak u prvoj polovici 20-tog stoljeća [8, 9].Virus HIV-a je uzročnik sindroma stečene imunodeficijencije (engl. *Acquired immunodeficiency syndrom,* AIDS), prvi puta opisanog u Sjedinjenim Američkim Državama (SAD) 1981. godine, u bolesnika s kroničnom multiplom limfadenopatijom, oportunističkim infekcijama (pneumocistis) te malignim bolestima (Kaposijev sarkom). Ubrzo nakon toga, 1983. godine istraživači iz Pasteurovog Instituta u Parizu su iz bioptata limfnog čvora bolesnika izolirali retrovirus te ga nazvali virus udružen s limfadenopatijom (fr. *Lymphadénopathie associé virus*, LAV), a 1984. godine u SAD-u je izoliran identičan virus te nazvan ljudskim virusom leukemije T-limfocita (engl. *Human T-cell leukemia virus,* HTLV). Od 1986. godine koristi se isključivo naziv virus ljudske imunodeficijencije [10].

Postoje dva tipa HIV-a: HIV-1 i HIV-2. HIV-2 se genetički razlikuje u >55% nukleotidnih slijedova od HIV-1, općenitno ima manji transmisijski kapacitet i uglavnom je lokaliziran na dijelove zapadne Afrike [11, 12]. HIV-1 je virulentniji i infektivniji od HIV-2 virusa te je vodeći uzrok globalne pandemije [13]. U vrijeme kada je HIV-1 po prvi puta opisan najsrodniji virus tada je bio Visna virus, lentivirus koji uzrokuje encefalitis i pneumoniju kod ovaca. Potom su izolirani i drugi lentivirusi koji inficiraju primate, a među njima je otkriven i HIV-2. Filogenetska istraživanja evolucijske srodnosti lentivirusa indiciraju da oba tipa virusa (HIV-1 i -2) potječu od virusa imunodeficijencije majmuna (engl. *Simian immunodeficiency virus,* SIV). Podrijetlo virusa HIV-2 je prvo razriješeno. HIV-2 je prvi puta opisan među zaraženim osobama iz zapadne Afrike. Evolucijski srodan virus SIV_{smm} je 1989. godine pronađen među inficiranim mangabejima *Cercocebus atys* čije je prirodno stanište u zapadnoj Africi [14]. Filogenetskom analizom uvrđeno je da je HIV-2 podijeljen u različite grupe koje su raspršene među virusnim linijama SIV_{smm}-a [15]. Vrlo vjerojatno su garavi mangabeji bili primarni izvor HIV-2, a međusobna evolucijska

raspršenost virusnih linija ukazuje da je uslijed niza neovisnih transmisijskih događaja došlo do prijenosa virusa sa majmuna na ljude [16]. Virus srodan virusu HIV-1 je prvi puta opisan 1989. godine. Radilo se o virusu SIV_{cpz} koji je izoliran iz dvije čimpanze *Pan troglodytes troglodytes* u zatočeništvu u Gabonu [17]. Filogenetskom analizom je utvrđeno da virus SIV_{cpz}-a izoliran iz *P. t. troglodytes* formira monofiletski klaster sa svim HIV-1 linijama, dok na istom stablu virus SIV-a izoliran iz *P. t. schweinfurthii* predstavlja vanjsku grupu [18].

Virusne sekvence izolirane 1959. i 1960. godine iz uzorka plazme i bioptata tkiva ZR59 i DC60 bolesnika iz grada Léopoldvillea u Demokratskoj Republici Kongo smatraju se najstarijim uzorcima HIV-1. Na osnovu bioinformatičkih i filogenetskih istraživanja sekvenci prikupljenih od 80-ih godina prošlog stoljeća do danas te uzoraka ZR59 i DC60 pretpostavlja se da je do prijenosa virusa s čimpanzi na ljude došlo u nekoliko neovisnih događaja u razdoblju prije 1908. godine, a vrlo vjerojatno je urbanizacija Afrike ranih 20-ih godina prošlog stoljeća utjecala na širenje infekcije na druge dijelove svijeta. Početkom 20. stoljeća pretpostavlja se da je nekolicina osoba bila zaražena virusom HIV-1 u centralnoj Africi, međutim taj broj je do 60-ih godina prošlog stoljeća narastao na nekoliko tisuća pojedinaca. Upravo zbog širokog spektra kliničkih simptoma AIDS-a epidemija nije bila prepoznata sve do 80-ih godina kada je uslijed globalizacije i urbanizacije došlo do razvoja pandemije [19].

1.2. Epidemiologija HIV-1 infekcije

Virulencija je definirana stopom mortaliteta kao posljedicom infekcije uzrokovane određenim patogenom, međutim najčešće se povezuje sa stopom reprodukcije i patogenošću određenog mikroorganizma. U slučaju da su veličina, gustoća i reprodukcijska stopa određenog domaćina limitirajući faktor, bolju replikativnu prilagodbu (engl. *fitness*) imaju mikrorganizmi niže virulencije jer na taj način osiguravaju dugotrajno preživljavanje domaćina i mikrooganizma. Primjer mikroorganizma niže virulencije je svakako HIV-1 (stopa zaraze 0,1-10% po pojedinom izlaganju), virus koji uzrokuje dugotrajnu kroničnu imunodeficijenciju, koja u slučaju neliječenja vodi do AIDS-a i posljedično smrti. Dug životni ciklus domaćina u kombinaciji s efikasnom transmisijom te relativno dugim razdobljem neizraženosti simptoma bolesti doveo je do nastanka jedne od najvećih epidemija zaraznih bolesti u svijetu [20].

1.2.1. Epidemiologija HIV-1 infekcije u svijetu

Procjenjuje se da je od početka epidemije oko 75 milijuna ljudi bilo zaraženo sa HIV-om, od toga je 32 milijuna zaraženih osoba umrlo od posljedica AIDS-a. Najnoviji svjetski epidemiološki podatci navode da je 2018. godine 38 milijuna ljudi živjelo s HIV-1 infekcijom, od čega je 770,000 zaraženih osoba umrlo od posljedica AIDS-a [21]. Ukupan broj novih zaraza u svijetu se uvelike smanjio (za 40%) od vrhunca infekcije 1997. godine, s 2.9 milijuna (1997.) na 1.7 milijuna (2018.), a isto tako se smanjio i broj novih zaraza među djecom, s 280,000 slučajeva (2010.) na 160,000 slučajeva (2018.). Trend mortaliteta uzrokovan AIDS-om također je smanjen (za 55%) u odnosu na 2004. godinu kada je 1.7 milijuna ljudi umrlo od posljedica AIDS-a, dok je 2018. godine oko 770,000 smrti bilo povezano s AIDS-om. Oko 20% HIV-om zaraženih osoba 2018. godine nisu znale svoj HIV status, a 38% osoba nisu bili dostupni antiretrovirusni lijekovi. Ipak, procjenjuje se da je 2018. godine 82% trudnica koje žive s HIV-om imalo pristup antiretrovirusnim lijekovima kako bi se spriječila daljnja transmisija, dok je najniži postotak nađen u populaciji mladih muškaraca >15 godina (55%) i djece starosne dobi između 0-14 godina (54%) [21].

Teret epidemije znatno varira između regija i država, a najveća stopa zaraze vezana je uz područje istočne i jugoistočne Afrike gdje otpada 54% (20.6 milijuna slučajeva zaraze) ukupnog broja infekcija 2018. godine. Distribucija prema ostalim regijama je sljedeća: Azija i Pacifik (15,6%, 5.9 milijuna), Zapadna i Središnja Afrika (13,2%, 5.0 milijuna), Latinska Amerika (5%, 1.9 milijuna), Karipsko otočje (0,9%, 340,000), Bliski Istok i Sjeverna Afrika (0,6%, 240,000), Istočna Europa i Središnja Azija, Zapadna i Središnja (4,5%, 1.7 milijuna) Europa, Sjeverna Amerika (5,8%, 2.2 milijuna) [21].

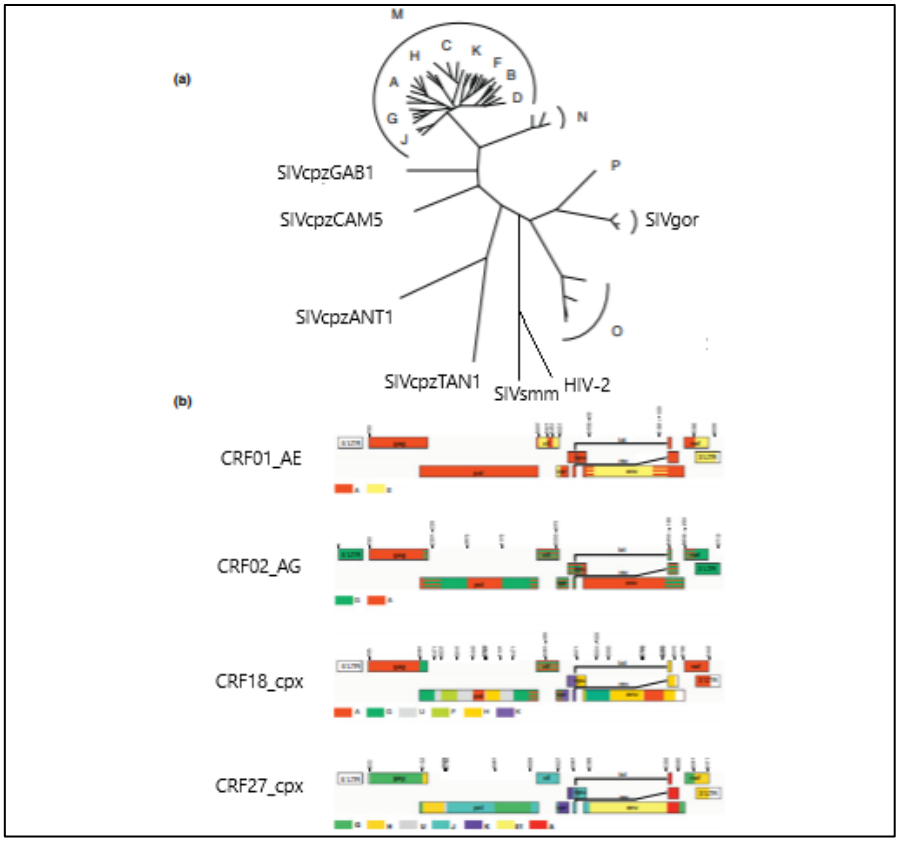
1.2.2. Epidemiologija HIV-1 infekcije u Hrvatskoj

Hrvatska je zemlja niske prevalencije HIV-1 infekcije, procjenjuje se da manje od 0.1% stanovnika ima protutijela na HIV-1. Prvi slučajevi zaraze zabilježeni su 1985. godine, a do kraja prosinca 2018. godine ukupno je 1640 osoba zaraženo sa virusom HIV-1, od čega ih je 532 oboljelo od AIDS-a. Incidencija novih slučajeva u 2018. godini bila je 2.3 na 100,000 stanovnika, a podatci za 2019. godinu nisu dostupni. Zaraza HIV-om u Hrvatskoj uglavnom je vezana uz muški spol, od ukupnog broja infekcija 89% (n=1,453) otpada na muškarce, a 11% (n=187) na žene. Prema podatcima za 2018. godinu čak 94% (88/94) novih slučajeva zaraze je zabilježeno kod muškaraca, a 6% (6/94) kod žena. Povećana stopa zaraze je uočena kod određenih rizičnih skupina. Najčešći prijavljeni put prijenosa je u skupini muškaraca koji

imaju spolne odnose s muškarcima (engl. *men who have sex with men*, MSM) ili biseksualni kontakt (87% svih slučajeva HIV-1/AIDS-a) dok je drugi najčešći put prijenosa spolni odnos između muškarca i žene (7% svih slučajeva HIV-1/AIDS-a). Povećan rizik za infekciju imaju i i.v. korisnici droga (engl. *injecting drug users*, IDU), međutim u Hrvatskoj je 5% osoba zaraženo HIV-om na ovaj način, dok je vertikalan prijenos sa zaražene majke na dijete pronađen u izoliranim slučajevima (1%) [22].

1.3. Klasifikacija virusa HIV-1

Uslijed nekoliko neovisnih transmisijskih događaja u kojima je došlo do prijenosa virusa HIV-a s majmuna na ljude, došlo je do razvoja više različitih virusnih linija: HIV-1, koji se dijeli u četiri grupe M (major), O (outlier), N (non-M, non-O ili new) i P i HIV -2, koji se dijeli u osam grupa A-H (slika 1). Veličina epidemije uzrokovana različitim grupama međusobno jako varira. Dok je grupa M odgovorna za globalnu epidemiju, grupe O i N su uglavnom ograničene na područje Afrike (zapadna i središnja Afrika), a grupa P je nedavno identificirana u dvije osobe iz Kameruna [23, 24]. Literatutni podatci navode da do sada nisu identificirane sve virusne linije te je u budućnosti moguće očekivati i daljnji prijenos novoformiranih virusnih linija između majmuna i čovjeka [25].



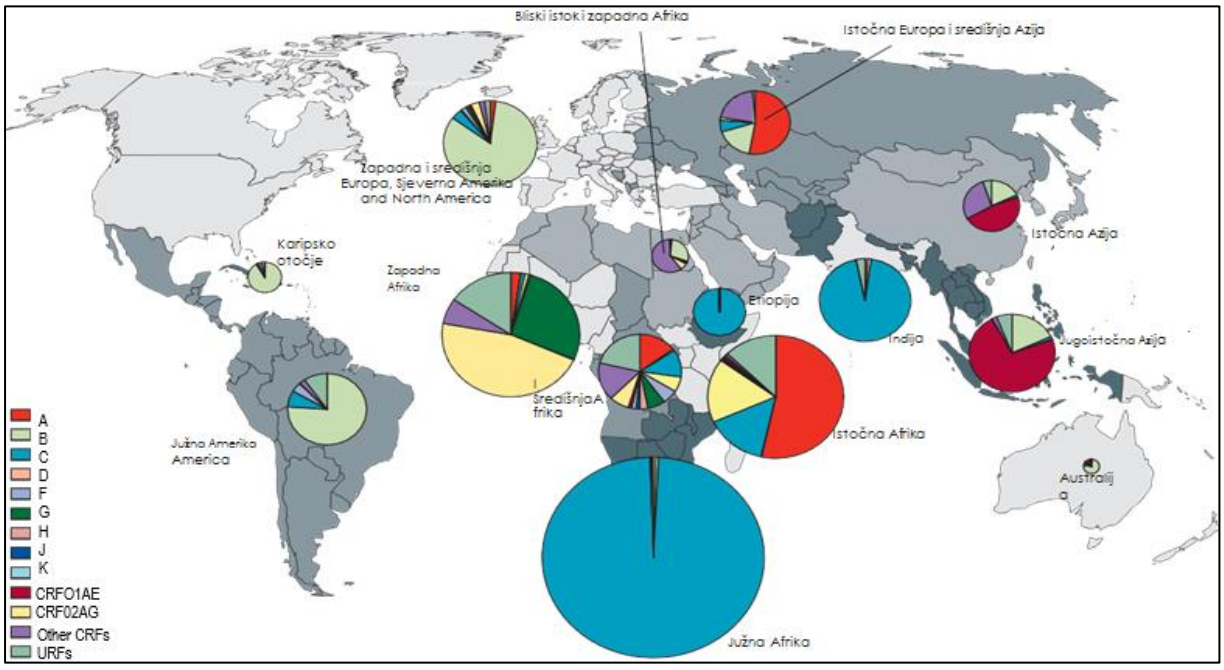
Slika 1. Filogenetsko stablo linija SIV, HIV-1 i HIV-2. (a) Grupe N, O, P i podtipovi grupe M (A-D, F-H, J i K) prikazani su na stablu. Virusne linije SIV_{cmpz} (SIV_{cmpz}GAB1, SIV_{cmpz}CAM5, SIV_{cmpz}ANT1, SIV_{cmpz}TAN19) izolirane su iz čimpanza *Pan troglodytes troglodytes*, SIV_{gor} izolirane su iz gorila *Gorilla gorilla gorilla*, dok su SIV_{smm} izolirane iz mangabeja *Cercocebus atys*. (b) Prikaz genomskih struktura kod 4 cirkulirajuće rekombinantne forme (CRF01_AE, CRF02_AG, CRF18_cpx, CRF27_cpx). Preuzeto i prilagođeno: Hemelaar J i sur., Trends Mol Med 2012;18:182-192.

Grupa M dijeli se u 9 podtipova (A, B, C, D, F, G, H, J, K), 4 pod-podtipa (A1, A2, F1, F2) i rekombinantne forme (slika 1). Varijabilnost aminokiselinskog slijeda unutar podtipa je u rasponu od 8 do 17% (najviše 30%), dok se između podtipova varijacije kreću od 17 do 35% (najviše 42%) [26]. Analizom različitih genomskih regija putem sekvenciranja cjelokupnog genoma HIV-1 otkrivena je visoka učestalost rekombinacija između podtipova. Rekombinante virusa se klasificiraju, ovisno o tome da li su dokazane kod tri ili više epidemiološki nepovezane osobe, u cirkulirajuće rekombinantne forme (engl. *Circulating recombinant form*, CRF) ili u jedinstvene rekombinantne forme (engl. *Unique recombinant form*, URF), u slučaju da nisu dokazane kod jedne ili više epidemiološki povezanih osoba (slika 1) [27]. Podatci o CRF se pohranjuju u bazi podataka Los Alamos Sequence, a trenutno se procjenjuje da postoji 98 opisanih CRF-ova [28]. Inače se CRF klasificiraju po redoslijedu kojim su opisane, a njihovo numeriranje nije odraz evolucijske starosti niti kronološkog redoslijeda kojim su se razvile.

1.4. Globalna i regionalna distribucija podtipova i rekombinanti HIV-1

Molekularna epidemiologija HIV-1 infekcije je kompleksna zbog različite geografske distribucije pojedinih podtipova i rekombinanti ovog virusa u svijetu, ali i unutar same Europe [23, 29, 30]. Posljednja analiza molekularne heterogenosti HIV-1 obuhvatila je 383,519 ispitanika iz 116 zemalja prikupljenih tijekom razdoblja od 1990. do 2015. godine [31]. Najprevalentniji podtipovi bili su C (46.6%), B (12.1%) i A (10.3%). Potom slijede CRF02_AG (7.7%), CRF01_AE (5.3%), podtip G (4.6%) i podtip D (2.7%). Procjenjuje se da je globalna zastupljenost podtipovima F, H, J i K oko 0.9%, dok su preostale CRF bile zastupljene sa 3.7%. Uzevši u obzir zastupljenost URF-ova sa 6.1%, udio rekombinantnih formi u globalnoj HIV-1 zarazi iznosio je 22.8%.

Distribucija HIV-1 podtipova, CRF-ova i URF-ova znatno varira između regija. Najveća raznolikost pronađena je u središnjoj Africi gdje su identificirani svi podtipovi, ali i velik broj CRF-ova i URF-ova (ukupno 46,8% globalne infekcije rekombinantama). U zapadnoj Africi najzastupljenije su infekcije sa podtipom G, CRF02_AG te URF-ovima, a u istočnoj Africi najprevalentniji je podtip A, C i D te URF-ovi. Podtip C je odgovoran za gotovo 50% infekcija u svijetu te je najčešći podtip HIV-1 u južnoj Africi i Etiopiji, upravo u područjima najviše prevalencije infekcije te u zemljama južne Azije, poput Indije, gdje prevladava brojno stanovništvo. Podtip A je najčešći u zemljama istočne Afrike, središnje Azije te bivšim zemljama Sovjetskog saveza, dok je podtip B najčešći u zapadnoj i centralnoj Europi, Srednjoj i Sjevernoj Americi te u nekim državama Južne i Srednje Amerike, Australije, zapadne Afrike i jugoistične Azije. U pojedinim dijelovima svijeta infekcije sa CRF-ovima postale su najčešćim oblikom zaraze HIV-om. Tako je primjerice na Bliskom istoku i zapadnoj Africi najzastupljeniji soj HIV-1 CRF35_AD, u jugoistočnoj i istočnoj Aziji CRF01_AE, a u Kini CRF07_BC i CRF08_BC (slika 2) [31].



Slika 2. Geografska distribucija podtipova, cirkulirajućih rekombinantnih formi (CRF) i jedinstvenih rekombinantnih formi (URF). Preuzeto i prilagođeno: Hemelaar J i sur., Lancet Infect Dis 2019;19:143-155.

U zapadnoj i središnjoj Europi zaraza virusom HIV-1 bilježi se od ranih 80-ih godina 20. stoljeća u formi podtipa B, koji i do današnjih dana ostaje dominantni podtip u ovoj regiji. Infekcija podtipom B, posebice u MSM skupini, jedan je od najvažnijih čimbenika koji

pridonose širenju HIV-1 infekcije u zapadnoj i središnjoj Europi, dok se širenje non-B podtipova uglavnom povezuje s imigracijom, heteroseksualnom transmisijom i iv. primjenom droga [30, 32-34]. Najnovije studije pokazuju da se non-B podtipovi počinju širiti i među populacijom u kojoj zaraza tim formama virusa nije prethodno viđena, MSM populacijom i populacijom nativnih Europljana. Primjerice, širenje podtipa G u Portugalu i podtipa A u Grčkoj, Albaniji i Cipru, no čini se da je ondje HIV-1 infekcija vezana uz specifičnu epidemiologiju tih pojedinih zemalja [35-37]. Tako se podtip A u Grčkoj i Cipru pojavio uslijed efekta osnivača podrijetlom iz sub-saharske Afrike (engl. *founder efect*) kasnih 70-ih godina prošlog stoljeća, a posljedično se zaraza tim podtipom proširila u susjednu Albaniju. Neuobičajena epidemiologija karakteristična je i za HIV-1 infekciju u Rumunjskoj. Od početka epidemije kasnih 80-ih godina prošlog stoljeća >90% infekcija bilo je uzrokovano podtipom F1, no čini se da unazad zadnjih 10 godina dolazi do povećanja prevalencije drugih podtipova poput A, B i C, a smanjenja novih infekcija sa podtipom F1 [38]. Analizom molekularne epidemiologije HIV-1 infekcije u Hrvatskoj iz 2009. godine utvrđena je najviša zastupljenost podtipa B (posebice u MSM skupini), no istraživanje je pokazalo da se i 26% infekcija povezuje s non-B podtipovima koji su bili ograničeni na ispitanike iz heteroseksualne skupine [39].

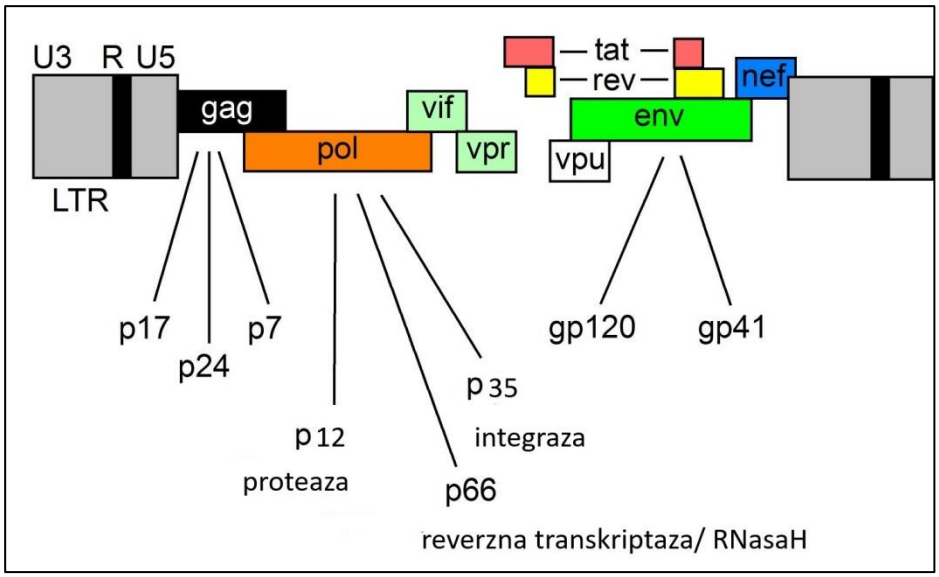
1.5. Biološke karakteristike virusa HIV-1

Virus HIV-1 je retrovirus koji pripada porodici *Retroviridae*, rod *Lentivirus*. Uslijed niza bioloških karakteristika, kao što su specifična organizacija genoma, izrazito velika genetička varijabilnost te tijek staničnog ciklusa koji dovodi do nemogućnosti eradikacije HIV-1 iz zaražene stanice, virus uzrokuje trajnu, neizlječivu infekciju kod domaćina i kroničnu hiperaktivaciju imunološkog sustava [1]. U idućem poglavlju biti će opisane glavne biološke značajke virusa koje pobliže objašnjavaju specifičnu patogenezu HIV-1 infekcije.

1.5.1. Struktura virusne čestice i organizacija genoma HIV-1

Genom virusa HIV-1 predstavlja jednolančana RNA molekula veličine 9,749 nukleotida koja na 5' kraju nosi Gppp kapu, a na 3' kraju poli(A) rep. Na krajevima virusnog genoma nalaze se ponavljajuće sekvence LTR (engl. *long terminal repeats*) koje služe za ugradnju virusa u genom stanice domaćina. Uz to, 5'LTR regija sadrži promotor koji potiče inicijaciju transkripcije virusnih gena [40].

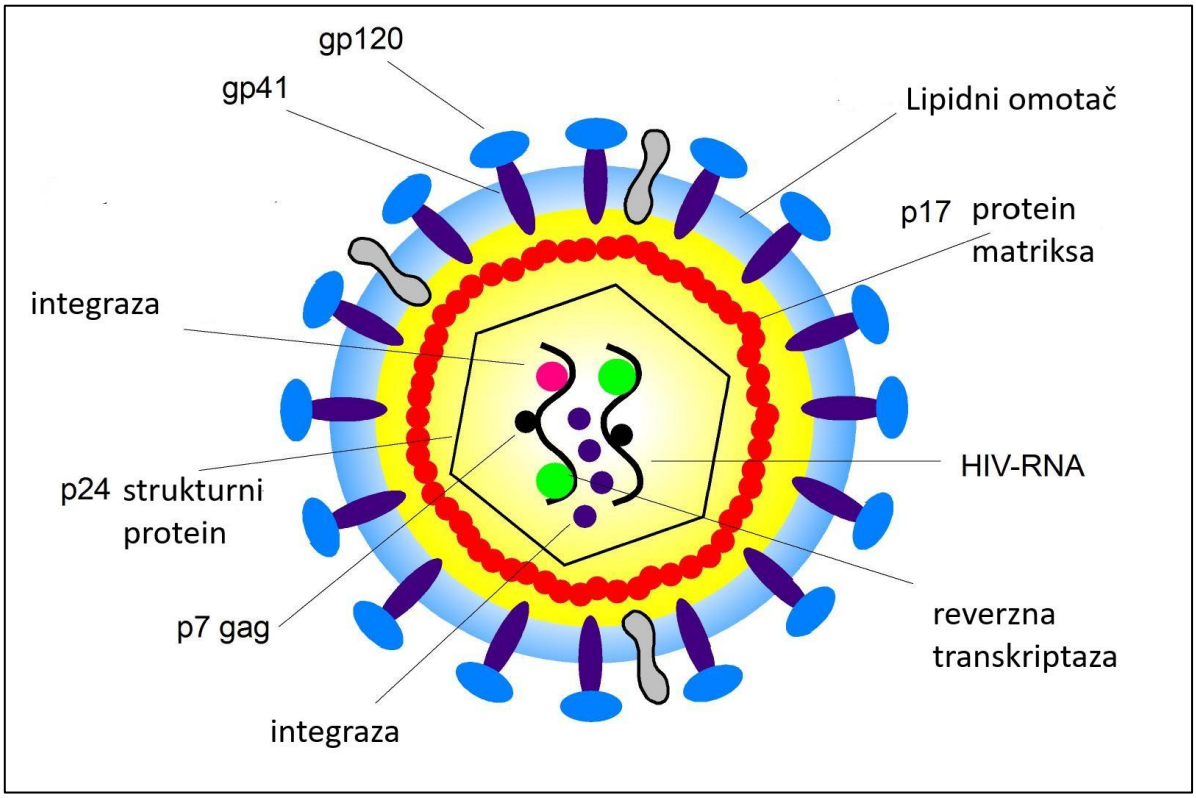
U genomu HIV-1 nalazi se 9 gena koji kodiraju 15 virusnih proteina. Gen *gag* (engl. *group antigen*) kodira proteine vanjskog omotača (engl. *matrix protein*, MA, p17), kapside (engl. *capside protein*, CA, p24) i nukleokaspide (engl. *nucleocapside protein*, NC, p7). Nakon gena *gag*, slijedi okvir čitanja *pol* gena (engl. *polymerase*) koji kodira virusne enzime proteazu (engl. *protease*, PR, p12), reverznu transkriptazu (engl. *reverse transcriptase*, RT, p51), RNasu H (engl. *ribonuclease H*, p15) i integrazu (engl. *integrase*, IN, p35). *Gag*- i *pol*-mRNA molekule prevode se u glikoproteinske polipetide koje virusne proteaze cijepaju u funkcionalne proteine. Gen *env* (engl. *envelope*) kodira glikoprotein čijim cijepanjem nastaju dvije podjedinice, gp120 i gp41 koje se spajaju u trimere te ugrađuju u virusnu ovojnicu. Preostalih šest gena imaju regulatornu ulogu te kodiraju sintezu proteina važnih za virusnu replikaciju i infektivnost virusne čestice: *tat* (engl. *transactivating protein*) i *rev* (engl. *RNA splicing regulator*) sudjeluju u inicijaciji virusne replikacije, a *nef* (engl. *negative regulating factor*), *vif* (engl. *viral infectivity factor*), *vpr* (engl. *virus protein r*) i *vpu* (engl. *virus protein unique*) imaju ulogu u virusnoj replikaciji, pupanju virusnih čestica te općenito u patogenezi HIV-1 infekcije (slika 3) [40].



Slika 3. Struktura i organizacija genoma HIV-1. Prikazani su okviri čitanja gena koji kodiraju za strukturne i regulatorne proteine.

Preuzeto i prilagođeno: https://www.hivbook.com/tag/structure-of-hiv-1/.

Virusna čestica HIV-1 ukupnog je promjera 100 nm, a sadrži dvije kopije nekovalentno vezanih jednolančanih ss(+) RNA unutar virusne kapside koja je obavijena lipoproteinskom membranom. Svaka virusna čestica posjeduje 72 glikoproteinska kompleksa sastavljena od trimera proteina gp120 i gp41 koja su integrirana u membranu. Glavna uloga glikoproteinskih kompleksa je u interakciji virusa sa staničnim receptorima i koreceptorima, kao i u fuziji virusa sa stanicom domaćina. S unutrašnje strane lipoproteinske membrane nalazi se virusni protein matriksa p17 koji je uključen u gotovo sve stadije životnog ciklusa virusa, a posebice u sastavljanje novih virusnih čestica i fuziju virusa sa stanicom domaćina. Unutar virusne kapside, formirane od glavnog strukturnog proteina p24, nalazi se virusni genom vezan za proteine nukleokapside p7 te enzimi potrebni za virusnu replikaciju: virusna PR (p12), IN (p35) i RT (p51) (slika 4) [40].



Slika 4. Struktura virusne čestice HIV-1. gp41 i gp120: glikoproteini; p7 protein nukleokapside. Preuzeto i prilagođeno: https://www.hivbook.com/tag/structure-of-hiv-1/.

1.5.2. HIV-1 stanični ciklus

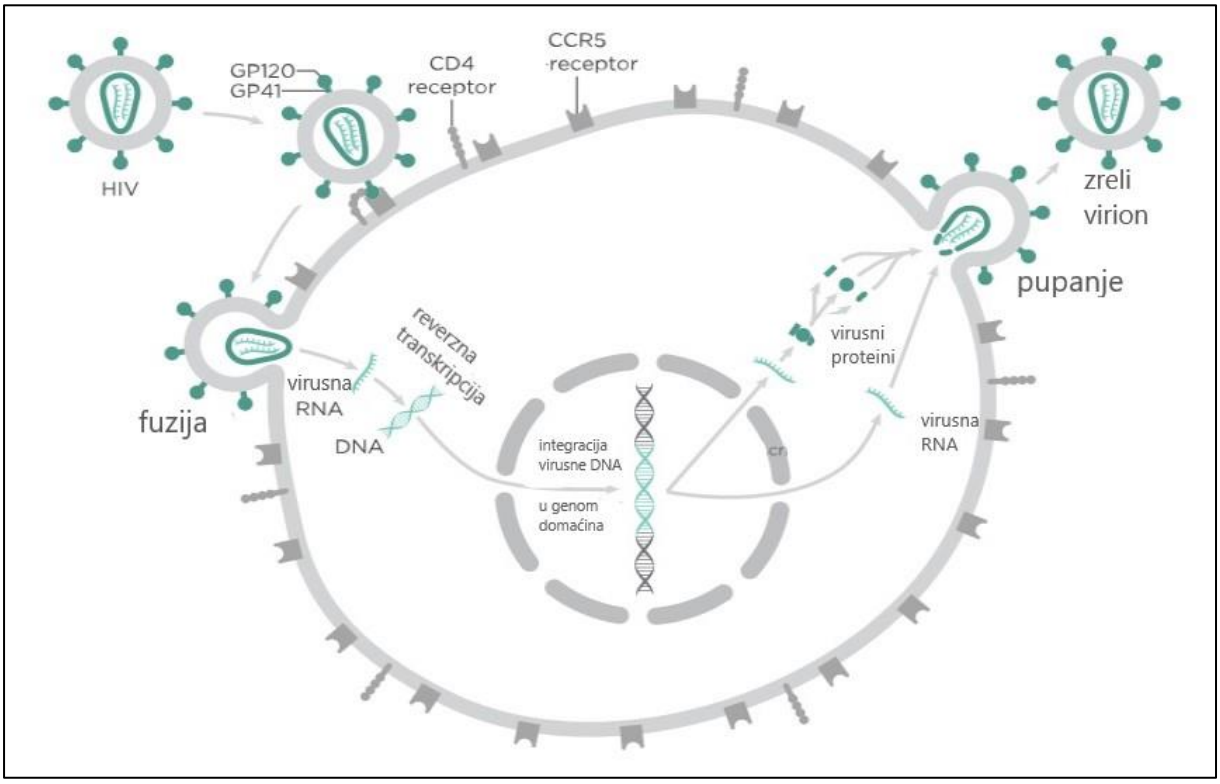
Virus HIV-1 primarno inficira stanice koje na svojim membranama imaju eksprimiranu CD4 molekulu, kao što su cirkulirajući T-limfociti, prekusori T-limfocita koji se nalaze u timusu ili koštanoj srži, monociti/makrofazi, eozinofili, dendritičke i mikroglija stanice [41]. Infekcija stanice domaćina započinje vezanjem virusnog glikoproteina gp120 za

CD4 molekulu i za jedan od kemokinskih receptora (CCR5 ili CXCR4) koji služi virusu kao koreceptor pri ulasku u stanicu (slika 5). CXCR4 molekula je eksprimirana na mnogim stanicama (uključujući T-limfocite), dok je CCR5 molekula prisutna na stanicama monocitno/makrofagne loze, denedritičkim stanicama i aktiviranim T-limfocitima. Ovisno o vrsti koreceptora koju virus koristi pri ulasku u stanicu postoje dva soja, CCR5-tropni virusi (R-5 virusi) koji su ujedno odgovori za HIV-1 pandemiju i CXCR4-tropni virusi (X4-virusi) [42]. Početna interakcija između tih proteina potiče strukturalne promjene repetativnih sekvenci virusnog glikoproteina gp41 uslijed kojih protein poprima strukturu ukosnice. Nastale promjene omogućuju približavanje i fuziju virusne membrane i membrane stanice domaćina te ulazak virusne kapside u citoplazmu stanice domaćina [41].

Prilikom ulaska virusne kapside u citoplazmu stanice domaćina dolazi do oslobađanja genetičkog materijala virusa i virusnih enzima RT, PR i IN. Uslijed oslobađanja virusnog genoma virusna RT započinje s prepisivanjem genetičkog materijala krećući od mjesta vezanja početnice (engl. *primer binding site*, PBS), pri čemu prvo dolazi do formiranja RNA/DNA dvolančanog hibrida. Potom RT putem svoje ribonukleazne aktivnosti katalizira hidrolizu RNA lanca, a pomoću polimerazne aktivnosti nastavlja sintezu drugog lanca DNA. Kao konačni produkt transkripcije nastaje provirusna dvolančana HIV-DNA čija je integracija u genom domaćina katalizirana putem enzima virusne IN (slika 5) [41]. Virusna IN, HIV-DNA, Vpr i p17 protein formiraju nukleoproteinski pre-integracijski kompleks (engl. *pre-integration complex*, PIC) koji pomoću enzima stanice domaćina (primjerice BANF1) prolazi kroz jezgrine pore, što omogućuje integraciju virusa čak i u stanicama koje nisu u diobi. Virus se ugrađuje u eukromatinske regije genoma gdje struktura nukleosoma nije tako čvrsto kondenzirana, a posebice u transkripcijski aktivne gene. Integracija DNA lanca prevođena virusnom IN odvija se u nekoliko faza: prvo dolazi do cijepanja GT dinukleotida na 3' krajevima virusne DNA, potom se slobodne hidroksilne skupine na 3' krajevima virusne DNA vežu na 5' fosfatne skupine stanične DNA te dolazi do ugradnje provirusa [43].

Nakon aktivacije ciljne stanice stanični transkripcijski faktor NF-κB se veže na promotore LTR-regija virusne DNA i pokreće transkripciju genoma HIV-1 pomoću stanične RNA-polimeraze. U ranoj fazi transkripcije sintetiziraju se regulatorni proteini HIV-1, poput Tat i Rev, koji stimuliraju transkripciju dužih RNA transkripta, ekspresiju strukturalnih i enzimatskih gena, a inhibiraju daljnju sintezu regulatornih proteina. U kasnijoj fazi, uslijed povećanja proteina Rev, dolazi do prijenosa virusne mRNA iz jezgre u citoplazmu te sinteze strukturalnih proteina nukleokapside i ovojnice te enzima RT, PR i IN [44]. Formiranje novih

virusnih čestica se odvija u nekoliko koraka. U prvom koraku povezuju se dvije molekule RNA s replikacijskim enzimima i proteinima nukleokapside te se pakiraju u kapsidu. Potom takve nezrele čestice putuju prema površini stanične membrane, prilikom čega putem cijepanja virusnom proteazom sazrijevaju u infektivne virione. Zreli virioni pupanjem izlaze iz inficirane stanice (slika 5). Tijekom procesa pupanja virusne čestice napuštaju stanicu omotane u staničnu lipidnu membranu koja može na sebi sadržavati razne stanične proteine i molekule poput kolesterola ili fosfolipida. Proces pupanja se razlikuje ovisno o staničnoj lozi u kojoj se virus nalazi. Primjerice, kod T-limfocita pupanje se odvija na staničnoj površini, a virioni se otpuštaju u međustanični prostor. Kod monocitno/makrofagne loze virioni se nakupljaju u unutarstaničnim vakuolama smještenim u citoplazmi koje se potom otpuštaju iz stanica [41].



Slika 5. Stanični ciklus virusa HIV-1. Virusne čestice pomoću glikoproteina gp41 i gp120 prepoznaju CD4 receptor i CCR5 koreceptor. Uslijed niza strukturalnih promjena dolazi do fuzije virusa u stanicu domaćina. Virusni genom se nakon reverzne transkripcije ugrađuje u genom stanice domaćina, a po aktivaciji stanice dolazi do sinteze virusnih proteina i formiranja novih virusnih čestica. Preuzeto i prilagođeno: https://teachmeobgyn.com/sexual-health/sexually-transmitted-infections/hiv/.

1.5.3. Genetička varijabilnost virusa HIV-1

Za virus HIV-1 karakteristična je iznimna genetička varijabilnost koja mu omogućuje niz prilagodbi na imunološki odgovor domaćina, održavanje perzistentne infekcije i povećanu otpornost na antiretrovirusne lijekove. Iznimna varijabilnost posljedica je intenzivne replikacije virusa, svojstava virusne RT i rekombinacijskih događaja do kojih može doći prilikom virusne replikacije [45-47].

Uslijed brze virusne replikacije dnevno u prosjeku nastane 10^9 novih viriona. Kratak poluživot virusnih čestica (približno 2 dana) uzrokuje potpunu zamjenu virusnih čestica u plazmi tijekom 2-4 tjedna [48]. Intenzivna virusna replikacija dovodi do razvoja virusne populacije koja se sastoji od velikog broja genetski srodnih varijanti koje nose slične mutacije, a ta populacija naziva se virusni kvazispecijes. Na razvoj kvazispecijesa utječe i izostanak svojstva provjere (engl. *profreeding activity*) enzima RT. Virusna RT ne posjeduje 3′→ 5′-endonukleaznu aktivnost, stoga se prilikom reverzne transkripcije komplementarnost ugrađenih nukleotida u rastući DNA lanac ne provjerava. Iz tog razloga virus HIV-1 ima izrazito visoku stopu mutacija (približno 10^{-4} do 10^{-5}), a novosintetizirani DNA lanci se međusobno uvelike razlikuju uslijed pogrešaka izazvanih ugradnjom pogrešnih nukleotida ili pak delecijom, duplikacijom i insercijom nukleotida [49]. Jedna od glavnih virusnih strategija za prilagodbu u okolišu je i genetička rekombinacija. Kako se virusni genom sastoji od dvije kopije RNA tijekom procesa reverzne transkripcije vrlo često dolazi do promjene kalupa što dovodi do inter- i intramolekularnih prespajanja [47, 50]. Genetska rekombinacija doprinosi heterogenosti kvazispecijesa, pri čemu se mogu razviti virioni smanjene ili pak povećane replikativne prilagodbe. Ta replikativna prilagodba virusa u okolišu opisana je pojmom "virusnog fitnesa". Primjerice, ako u rekombinaciji sudjeluju virus većeg fitnesa i virus manjeg fitnesa tada mogu nastati nove forme kod kojih je došlo do gubitka određenih mutacija, a koje su jamčile jači virusni fitnes [51].

Iz navedenog je moguće zaključiti da kvazispecijes sadržava vrlo dinamičnu populaciju virusnih čestica koja je podložna neprestanim promjenama i prilagodbama u određenom okolišu. Primjerice, prilikom uzimanja antiretrovirusnih lijekova sastav kvazispecijesa se uslijed promjene okoliša mijenja te može doći do razvoja rezistentnih varijanti virusa unutar zaražene osobe. Rezistentne varijante većeg virusnog fitnesa ubrzo prevladavaju u kvazispecijesu zbog najbolje prilagodbe na novonastale uvjete. Takva brza

evolucija mutiranih varijanti HIV-1 jedna je od glavnih prepreka za pronalazak učinkovite terapije koja bi mogla omogućiti potpunu eradikaciju virusa [52].

1.6. Patogeneza HIV-1 infekcije

Virus HIV-1 uzrokuje progresivno smanjenje broja CD4+ T-limfocita, kroničnu hiperaktivaciju imunološkog sustava te brojne kvalitativne i kvantitativne promjene efektorskih mehanizama urođene i specifične imunosti, što na kraju dovodi organizam u stanje imunodeficijencije [1, 53]. Tijek bolesti može se podijeliti u dva stadija: akutnu fazu infekcije i kroničnu fazu infekcije, a u slučaju neliječenja dolazi do razvoja AIDS-a.

1.6.1. Akutna faza HIV-1 infekcije

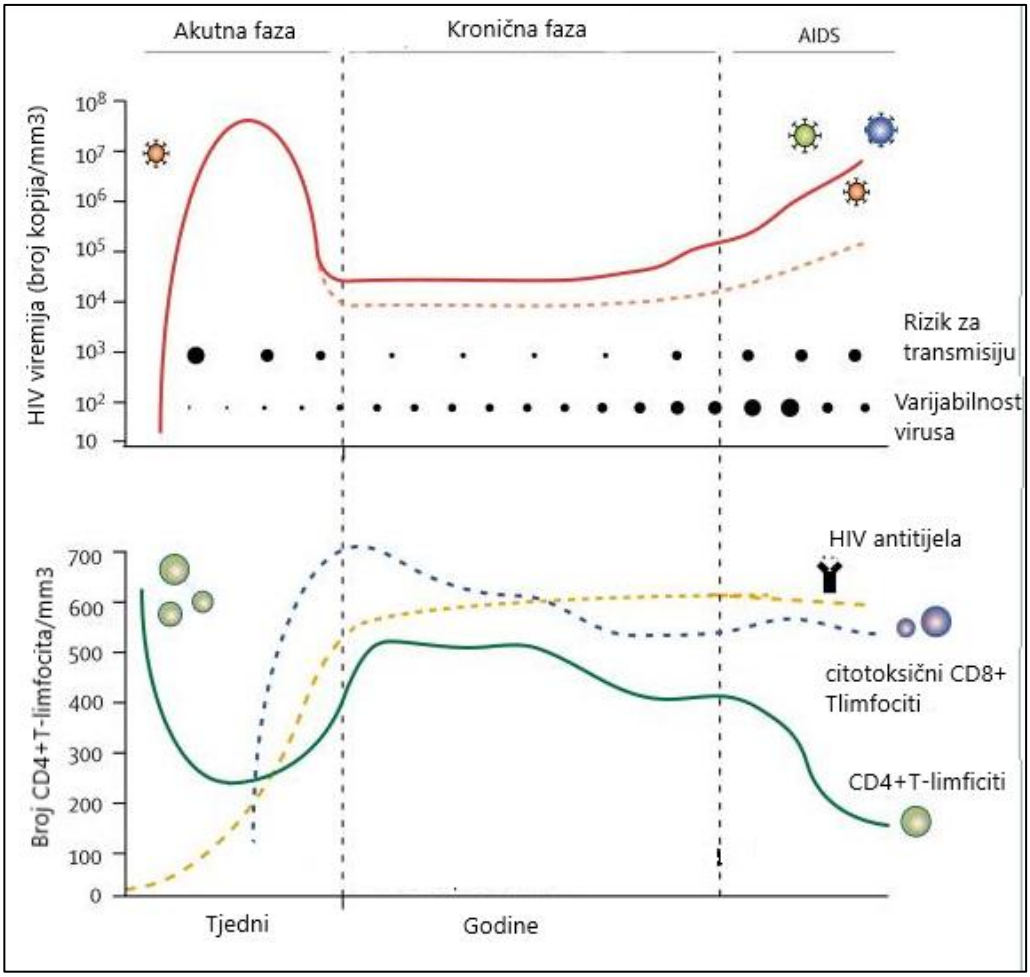
Otprilike 2-6 tjedana nakon zaraze nastupa akutna faza infekcije koju karakterizira pojava simptoma poput povišene temperature te povećanje limfnih čvorova uslijed sistematske diseminacije virusa u limfatična tkiva, urogenitalni sustav, središnji živčani sustav (SŽS) i druge organske sustave [54]. U prvoj fazi infekcije stopa replikacije virusa je visoka te se u bolesnika obično nalazi visoka koncentracija virusa u plazmi i limfatičnim tkivima. Aktivacija staničnog odgovora, u vidu pojave specifičnih CD8+ citotoksičnih T-limfocita, dovodi do stagnacije virusne replikacije. Nekoliko mjeseci nakon zaraze (kod neliječenih osoba) nastupa stadij "stabilne replikacije" HIV-1 [55]. Antitijela reaktivna na virusne antigene pojavljuju se u cirkulaciji vrlo brzo nakon zaraze, a postaju detektabilna otprilike istovremeno sa stabilizacijom virusne replikacije (4-12 tjedana nakon infekcije) (slika 6). Iako antitijela imaju snažan neutralizirajući učinak, virus posjeduje čitav niz prilagodbi kojima sprječava učinkovitu eradikaciju iz organizma. Primjerice, promjenom glikozilacijskih mjesta dolazi do strukturalnih promjena u virusnom omotaču čime se umanjuje učinkovitost prepoznavanja virusnih antigena [56]. Iako se virus replicira u aktiviranim CD4+-T limfocitima, čini se da zaražava i druge populacije stanica kako bi održao infekciju perzistentnom te stvorio "latentne rezervoare" virusa. Primjeri takvih rezervoara su mirujuće T-limfociti u kojima virus može obitavati godinama, a prilikom dostupnosti određenih signala iz okoliša (citokina) te stanice mogu ući u replikativnu fazu ciklusa u kojoj se posljedično pokreće i virusni replikacijski ciklus [57]. Uz T-stanice, stanice poput monocita i određenih tkivnih makrofaga predstavljaju vrlo važne rezervoare virusa koji se mogu naći u urogenitalnom sustavu ili SŽS-u, a koji zbog krvno-moždane barijere predstavlja jednu od najvećih zapreka u liječenju antiretrovirusnom terapijom [58-60].

1.6.2. Kronična faza HIV-1 infekcije

Tijekom rane kronične faze infekcije razina virusa ostaje stabilna nekoliko godina, a simptomi prvotne akutne infekcije nestaju bez liječenja. Broj limfocita se obično kreće od 350 do 750/mm^3, a ukoliko osoba uslijed izostanka izraženijih simptoma i znakova bolesti ne sumnja na zarazu, neće biti svjesna svog HIV statusa. Nakon asimptomatske faze bolesti, slijedi razdoblje u kojem broj CD4+ T-limfocita opada na 200-500/ mm^3 te se mogu pojaviti određene uobičajene infekcije, poput gljivičnih infekcija (kandidoza usne šupljine ili rodnice), dermatitisi, infekcije kože (herpes zoster) ili pak reaktivacija tuberkuloze te Kaposijev sarkom. Ova faza može trajati do 5 godina u neliječenih osoba. U srednjoj kroničnoj fazi broj CD4+ T-limfocita opada ispod 200/ mm^3, a ta faza se uglavnom javlja kod neliječenih osoba 10 godina od zaražavanja. Tada se razvijaju teže bolesti poput upale pluća uzrokovane gljivom *Pneumocystis jirovecii* ili dijareja uzrokovan parazitom *Cryptosporidium* te druge oportunističke bolesti (toksoplazmoza, kriptokokni meningitis). U kasnoj fazi kronične infekcije broj CD4+ T-limfocita opada ispod 50/ mm^3, a kod osoba se javljaju infekcije mrežnice uzrokovane CMV-om, limfom mozga ili pak progresija Kaposijevog sarkoma [1, 54].

Istovremeno u organizmu dolazi do progresivnog smanjenja CD4+ T-limfocita (slika 6). U ranoj kroničnoj fazi infekcije osobe imaju izražen sindrom generalizirane limfadenopatije koju karakterizira akumulacija limfocita u upaljenim limfnim čvorovima i povećana ekspresija adhezijskih molekula. Tijekom te faze dolazi do selektivne deplecije memorijskih CD4+ T-limfocita iz sistemske cirkulacije, a kako bolest napreduje, uz memorijske i broj naivnih limfocita se počinje smanjivati. Kod uznapredovale bolesti smanjen broj svih CD4+ staničnih populacija je evidentan [61]. Osim smanjenja broja CD4+ T-limfocita, dolazi do razvoja čitavog niza funkcionalnih abnormalnosti kod te stanične linije, primjerice izostanaka funkcionalne stanične diobe, smanjene sposobnosti imunološkog prepoznavanja antigena, aloantigena i mitogena te promijenjene ekspresije proupalnog citokina IL-2 [62, 63]. Budući da je jedna od glavnih značajki CD4+ T-limfocita pospješenje imunološke reakcije putem proizvodnje imunomodulatornih citokina, postepenim smanjenjem broja i funkcionalnosti tih stanica dolazi i do poremećene sposobnosti pravilnog funkcioniranja imunološkog sustava. S druge strane, dinamika opadanja broja citotoksičnih CD8+ T-limfocita je potpuno drugačija. U akutnoj fazi infekcije, dolazi do rapidnog povećanja ukupnog broja CD8+ T-limfocita uslijed ekspanzije memorijskih CD8+ T-limfocita (HIV-reaktivnih T-limfocita). Ta ekspanzija je prisutna sve do kasne kronične faze

infekcije, tijekom koje je ukupan broj svih T-limfocita u padu (slika 6). S druge strane udio naivnih CD8+ T-limfocita je u padu u ranoj fazi infekcije, no apsolutan broj CD8+ stanica ostaje nepromijenjen sve dok ne dođe do progresije bolesti tijekom kasnije faze [64, 65]. Važno je napomenuti da uz razvoj progresivne imunodeficijencije istovremeno imunološki sustav prolazi kroz stanje snažne imunološke hiperaktivacije. Taj proces odražava se u pojačanoj ekspresiji aktivacijskih markera na perifernim T- i B-limfocitima i povišenoj razini upalnih citokina u plazmi, snažnoj poliklonalnoj hiperglobulinemiji (samo djelomično usmjerenoj protiv antigena HIV-1), plazmocitozi koštane srži, povećanoj ekspresiji aktivacijskih molekula na cirkulirajućim B-limfocitima, prisutnosti autoreaktivnih antitijela u plazmi i simptomima autoimune bolesti [66-68].



Slika 6. Grafički prikaz tijeka HIV-1 infekcije u akutnoj i kroničnoj fazi bolesti. Akutna faza bolesti je karakterizirana prisutnošću visoke viremije, niskog broja CD4+ T-limfocita i odsutnošću HIV-1 specifičnih antitijela. Kako bolest ulazi u kroničnu fazu, viremija pada pojavom citotoksičnih CD8+ T-limfocita te se stabilizira tijekom nekoliko godina. Genetička varijabilnost virusa se povećava kako bolest napreduje, dok je rizik za transmisiju najveći

tijekom prvih nekoliko tjedana nakon infekcije. Preuzeto i prilagođeno: Simon V i sur., Lancet 2006;368:489-504.

1.7. Antiretrovirusno liječenje HIV-1 infekcije

HIV-1 infekcija uspješno se liječi primjenom antiretrovirusnih lijekova koji suprimiraju virusnu replikaciju do nedetektabilne razine, međutim ne mogu u potpunosti eradicirati virus. Otkriće virusa HIV-1 kao uzročnika AIDS-a te sve veće razumijevanje virusne strukture, replikacijskog ciklusa i općenito patogeneze infekcije je omogućilo razvoj efektivnih lijekova koji ciljano inhibiraju određene virusne strukture. Prije 1996. godine postojalo je nekoliko terapijskih opcija za liječenje HIV-1 infekcije koje se uglavnom svodilo na uzimanje profilaktične terapije usmjerene protiv određenih oportunističkih patogena te liječenje simptoma uznapredovalog AIDS-a. Veliki preokret u liječenju infekcije događa se sredinom 90-ih godina prošlog stoljeća kad dolazi do razvoja inhibitora virusne RT i PR, koji predstavljaju ključne enzime uključene u virusni replikacijski ciklus. Ranih 90-ih prvi specifični anti-HIV lijekovi su se primjenjivali kao monoterapija, međutim s razvojem lijekova nastaju i različiti agensi koji omogućuju kombiniranu antiretrovirusnu terapiju (engl. *Highly Active Antiretroviral Therapy*, HAART). HAART se sastoji od kombinacije najmanje tri različita lijeka koji vrlo uspješno suprimiraju virusnu replikaciju i viremiju ispod detektabilne razine (<50 RNA kopija/mm^3). Supresija virusne replikacije omogućuje postepenu rekonstituciju imunosnog sustava zaražene osobe te na taj način uvelike smanjuje morbiditet i mortalitet uzrokovan HIV-1 infekcijom [69].

Smjernice za početak antiretrovirusnog liječenja podložne su promjenama. Primjerice, 2010. godine europska i američka stručna društva za liječenje HIV-1 infekcije (European AIDS Clinical Society, International AIDS Society-USA) su preporučila inicijalno korištenje antiretrovirusne terapije kod HIV-om zaraženih osoba kod kojih je broj CD4+ T-limfocita manji od 350/mm^3 (stadij bolesti s prosječnim kretanjem viremije 10,000-100,000 kopija/mm^3). Prema današnjim smjernicama preporučuje se započeti terapiju odmah prilikom dijagnoze, neovisno o broju CD4+ T-limfocita [70, 71]. Uslijed niza bioloških značajki virusa te stvaranja virusnih rezervoara u raznim organskim sustavima, potpuno izliječenje infekcije za sada nije moguće. Ipak, uspjeh liječenja uvelike ovisi o adherenciji bolesnika. Ukoliko je adherencija dobra, tada lijekovi mogu značajno produžiti kvalitetu i životni vijek zaraženih osoba. Na učinak terapije osim loše adherencije mogu utjecati i drugi faktori poput smanjene tolerabilnosti lijeka ili pak interakcije antiretrovirusne terapije s drugim lijekovima koji

značajno mogu smanjiti njeno djelovanje uzrokujući promjene u famakodinamici ili farmakokinetici [69].

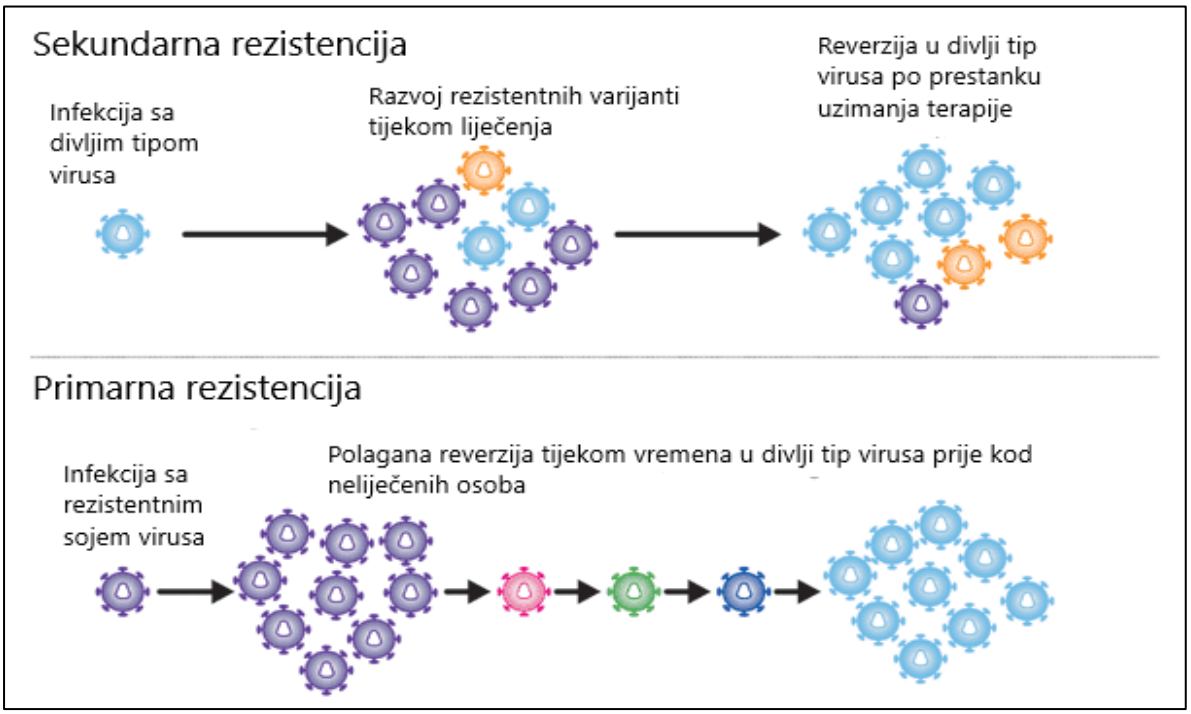
1.7.1. Klasifikacija antiretrovirusnih lijekova

Prema regulacijama Američke agencije za lijekove (engl. *Food and drugs administration*, FDA) i Europske agencije za lijekove (engl. *European medicines agency*, EMA) 2018. godine je 40 pojedinačnih lijekova i kombiniranih pripravaka bilo odobreno za liječenje HIV-1 infekcije [72, 73]. Postoji 5 klasa antiretrovirusnih lijekova koji se klasificiraju na temelju ciljnih struktura uključenih u životni ciklus virusa. Prva faza ciklusa podrazumijeva ulazak u ciljnu stanicu, a ona predstavlja metu inhibitora ulaska u stanicu (CCR5 inhibitori i inhibitori stanične fuzije). Inhibitori virusne RT (NRTI/NtRTI i NNRTI) sprječavaju reverznu transkripciju virusa, dok inhibitori virusne IN (InSTI) sprječavaju integraciju provirusne DNA u genom domaćina. Inhibitori virusne PR (PI) sprječavaju učinkovito procesuiranje virusnih polipeptidnih lanaca i sazrijevanje virusnih čestica [69]. U antivirusnom liječenju se sukladno odobrenjima EMA i FDA koriste: **NRTI** abakavir (ABC), didanozin (ddI), emtricitabin (FTC), lamivudin (3TC), tenofovir disoproksil fumarat (TDF), tenofovir alafemanid (TAF) i zidovudin (ZDV); **NNRTI** delavirdin (DLV), efavirenz (EFV), etravirin (ETR), nevirapin (NVP) i rilpivirin (RPV); **PI** atazanavir (ATV), darunavir (DRV), fosamprenavir (FPV), indinavir (IDV), nelfinavir (NFV), lopinavir (LPV), ritonavir (RTV, r), sakvinavir (SQV) i tipranavir (TPV); **InSTI** biktegravir (BIC), dolutegravir (DTG), elvitegravir (EVG) i raltegravir (RAL); **CCR5 inhibitor** maravirok i **inhibitor stanične fuzije** enfuvirtid.

1.8. Rezistencija na antiretrovirusne lijekove

Rezistencija na antiretrovirusne lijekove javlja se kao posljedica razvoja mutacija u genima koji su ciljne strukture lijekova, enzima (RT, PR, IN) i glikoproteina (gp41, gp120). Kod zaraze virusom HIV-1 razlikuju se dvije vrste rezistencije: primarna rezistencija virusa i sekundarna (stečena) rezistencija virusa. Primarna rezistencija uglavnom obuhvaća novozaražene, dotad neliječene osobe, a može se razviti i kod osoba koje dugo znaju da su zaražene HIV-om, ali iz nekih razloga nisu uzimali lijekove. Primarna rezistencija nastaje uslijed infekcije sojevima HIV-1 koji su rezistentni na antiretrovirusne lijekove, a može povećati rizik od kasnijeg neuspjeha liječenja. Sekundarna rezistencija javlja se uslijed nepotpune supresije virusne replikacije tijekom antiretrovirusnog liječenja (slika 7) [69, 2].

Genetička varijabilnost virusa te suboptimalne koncentracije antiretrovirusnih lijekova uzrokovane lošom adherencijom bolesnika ili pak promijenjenim metabolizmom lijeka mogu doprinijeti razvoju virusne rezistencije. Procjenjuje se da kod zaraženih osoba uslijed visoke replikacijske stope virusa (nastanak otprilike 10^{10} viriona dnevno u zaraženog domaćina), svojstava enzima RT i visoke stope rekombinacije (2-20 događaja po replikacijskom ciklusu) nastane jedna mutacija unutar virusnog genoma na svakih 1000-10000 sintetiziranih nukleotida. Uzimajući u obzir da je genom HIV-1 veličine 10,000 nukleotida, prilikom svakog replikacijskog ciklusa dolazi do razvoja 10 novih mutacija [74]. Kako liječenje monoterapijom dovodi do nepotpune supresije virusne replikacije, uslijed izrazito velike genetičke varijabilnosti virusa velika je vjerojatnost razvoja virusnih varijanti sa smanjenom osjetljivošću na antiretrovirusne lijekove, stoga se primjenom HAART-a nastoji u potpunosti suprimirati virusnu replikaciju i izbjeći razvoj rezistencije [69].



Slika 7. Slikovni prikaz razvoja primarne i sekundarne rezistencije virusa HIV-1. Virus plave boje predstavlja divlji tip, dok virusi ljubičaste, naračanste, zelene i roze boje predstavljaju rezistentne varijante virusa. Preuzeto i prilagođeno: https://prn.org/index.php/complications/article/hiv_drug_resistance_386.

Na razvoj mutirane virusne populacije uvelike utječe i okoliš u kojem dolazi do virusne replikacije. Virusne varijante koje su sposobne prilagoditi se sukladno zahtjevima okoliša te se efektivno replicirati u njemu imaju bolji virusni fitnes [75]. Primjerice, u neliječenih zaraženih osoba najjaču sposobnost izazivanja bolesti imaju varijante divljeg tipa

virusa [76]. Uslijed korištenja antiretrovirusnih lijekova, dolazi do znatnih promjena u okolišu unutar kojeg se virus replicira, što uglavnom dovodi do potpune supresije virusne replikacije. Neadekvatne koncentracije lijeka vrlo često uzrokuju nepotpunu supresiju virusne replikacije. Kontinuirana virusna replikacija u uvjetima suboptimalne koncentracije lijeka omogućuje razvoj mutirane virusne populacije (kvazispecijesa) visokog replikativnog potencijala i većeg virusnog fitnesa u odnosu na divlji tip virusa [77]. U slučaju promjene terapije virusna populacija koja nosi određenu mutaciju povezanu s razvojem rezistencije se vrlo vjerojatno više neće efektivno replicirati te će ponovno nastupiti potpuna supresija virusne replikacije. Ako pak dođe do potpunog prekida uzimanja lijekova, tada će ponovno doći do razvoja divljeg tipa virusa koji dominira u odsutstvu antiretrovirusnih lijekova. Međutim, rezistentne virusne varijante mogu ostati i dalje prisutne u populaciji kvazispecija u vidu manjinskih virusnih varijanti koje stvaraju virusne rezervorare u plazmi i tkivima te mogu ponovno postati dominantne pod selektivnim pritiskom lijekova [78, 79]. Primjer vrlo dugotrajnog rezervoara je muški urogenitalni sustav (MGS), u kojem dolazi do značajno sporije reverzije rezistentnih varijanti u divlji tip virusa. Na taj način MGS predstavlja važno utočište za rezistentne HIV-1 varijante koje se dalje mogu prenijeti putem spolnog odnosa te kod novozaraženih osoba uzrokovati primarnu rezistenciju prilikom uzimanja inicijalne antiretrovirusne terapije [80-82].

1.8.1. Antiretrovirusno liječenje i prevalencija primarne rezistencije u Hrvatskoj

Liječenje HIV-1 infekcije antiretrovirusnom terapijom u Hrvatskoj je dostupno od 1998. godine te je u potpunosti besplatno za sve bolesnike. Prvi registrirani lijek bio je ZDV koji pripada su skupini lijekova NRTI [22]. Trenutno je dostupno 22 različita lijeka i kombinacija lijekova, a uključuju: NRTI- ABC, 3TC, FTC, TAF, TDF i ZDV;NNRTI- EFV, NVP i RPV; PI- DRV/r i LPV/r; INSTI- BIC, DTG, EVG i RAL; CCR5 inhibitor maravirok. Od koformuliranih pripravaka, dostupne su kombinacije 2NRTI (ABC+3TC, ZDV+3TC, TDF/FTC, TAF/FTC); 2NRTI+NNRTI (TAF+FTC+RPV, TDF+FTC+RPV,) 2NRTI+INSTI (ABC+3TC+DTG, TAF/FTC/BIC); U liječenju se najčešće koristi kombinacija 2NRTI+InSTI , 2NRTI+NNRTI, ili 2NRTI+PI [22, 83, 84].

Primarna rezistencija virusa HIV-1 predstavlja značajan javnozdravstveni problem [3]. Zbog bioloških svojstava virusa osobe zaražene rezistentnim sojem HIV-1 imaju veći rizik od terapijskog neuspjeha, koji se može javiti odmah pri inicijalnom uzimanju antiretrovirusnih lijekova ili naknadno, uslijed razvoja niskofrekventnih latentnih HIV-1 rezervoara i njihove

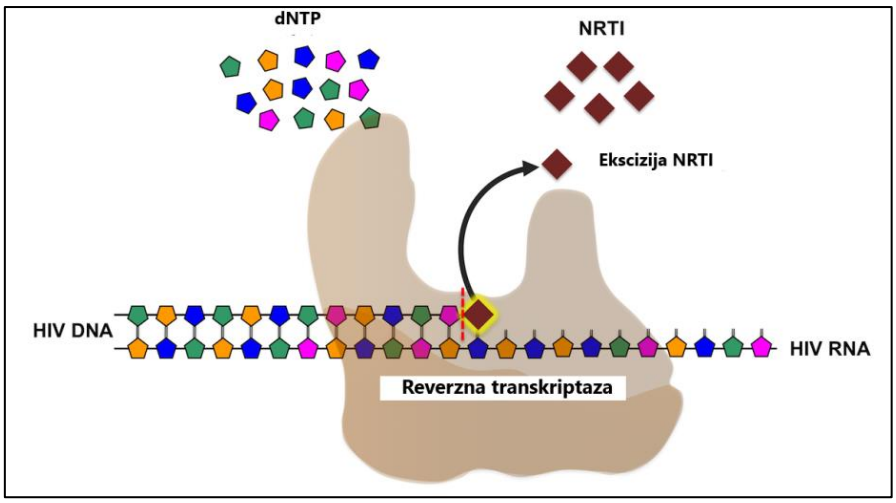
dominacije u virusnom kvazispecijesu [85-94]. Zadnja studija u kojoj je analizirana primarna rezistencija virusa HIV-1 u Hrvatskoj je objavljena 2009. godine. U periodu istraživanja (2006.-2008.) prevalencija primarne rezistencije iznosila je 22% te je bila jedna od najviših u svijetu [85]. Najveći broj detektiranih mutacija bio je povezan s rezistencijom na lijekove iz klase NRTI, dok primarna rezistencija na PI nije bila detektirana. Primarna rezistencija na InSTI nije bila analizirana budući da su lijekovi iz te skupine u široj upotrebi od 2015. godine. Obzirom da se liječenje antiretrovirusnom terapijom u Hrvatskoj bazira na korištenju pojedinih lijekova iz klasa NRTI/NNRTI, PI i InSTI, u iduća četiri poglavlja biti će pojašnjeni mehanizmi razvoja rezistencije virusa HIV-1 u tim skupinama lijekova.

1.8.2. Nukleotidni/nukleozidni inhibitori reverzne transkriptaze

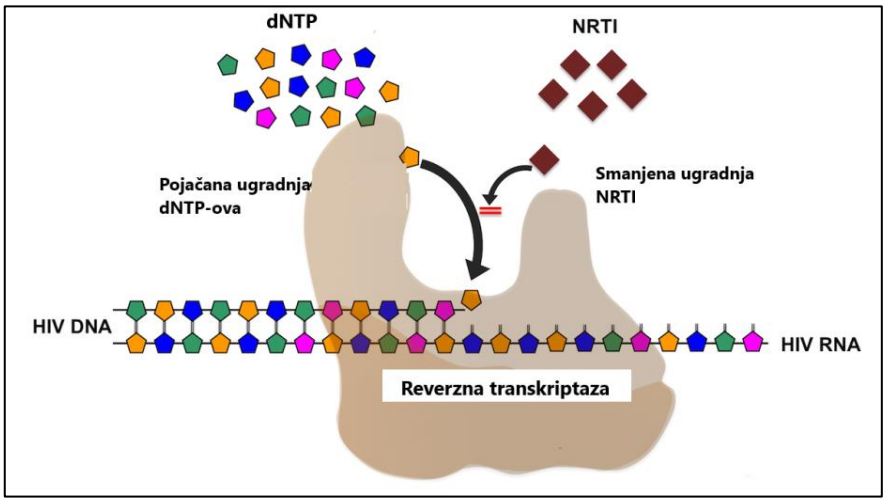
U ovu skupinu lijekova spada i prva specifična terapija za liječenje HIV-1 infekcije koja je bila odobrena 1988. godine, a riječ je o ZDV [95]. NRTI/NtRTI djeluju na način da interferiraju s aktivnošću virusnog enzima RT i tako onemogućuju proces reverzne transkripcije i sintezu provirusne DNA. NRTI se primjenjuju kao biološke neaktivne supstance (prolijek) koje za aktivaciju zahtjevaju fosforilaciju posredovanu staničnim kinazama. Nakon stvaranja aktivnog oblika, supstance predstavljaju alternativne supstrate nukleotida (dNTP) koje virusna RT prepoznaje te ugrađuje u rastući lanac. Za razliku od dNTP-ova ne posjeduju 3'OH skupinu pri čemu dolazi do sprječavanja formiranja 3'-5' fosfodiesterske veze sa sljedećim 5'-nukleozid trifosfatom, što uzrokuje preuranjenu terminaciju sinteze DNA lanca [69].

Rezistencija se javlja kao posljedica kompenzacije virusa putem dva mehanizma: ATP-ovisna pirofosforilacija te pojačana diskriminacija između dNTP-a i inhibitora. ATP-ovisna pirofosforilacija podrazumijeva uklanjanje NRTI s 3' kraja rastućeg lanca i nastavak daljnje sinteze lanca (slika 8). Rezistencija mehanizmom ATP-ovisne pirofosforilacije se javlja uslijed razvoja mutacija u RT koje se klasificiraju kao mutacije timidinskih analoga (engl. *thymidine analog mutations*, TAM) i nukleotidne/nukleozidne mutacije (engl. *nucleotide/nucloside associated mutations*, NAM). Najčešće TAM mutacije povezane s rezistencijom na NRTI nalaze se na kodonskim pozicijama 41, 67, 70 210, 215 i 219 u RT. Dijele se u dvije skupine: TAM-I (M41L, L210W, T215Y) i TAM-II (D67N, K70R, T215F, K219Q/E). Drugi mehanizam rezistencije podrazumijeva povećanu diskriminaciju NRTI u odnosu na prirodne dNTP-supstrate prilikom polimerizacije u aktivnom mjestu mutirane RT.

Najčešće mutacije koje uzrokuju rezistenciju ovim mehanizmom uključuju mutacije M184V/I i K65R (slika 9) [69].



Slika 8. Mehanizam razvoja HIV-1 rezistencije na NRTI putem ATP-ovisne fosforilacije. Preuzeto i prilagođeno: https://www.hiv.uw.edu/go/antiretroviral-therapy/evaluation-management-virologic-failure/core-concept/all



.

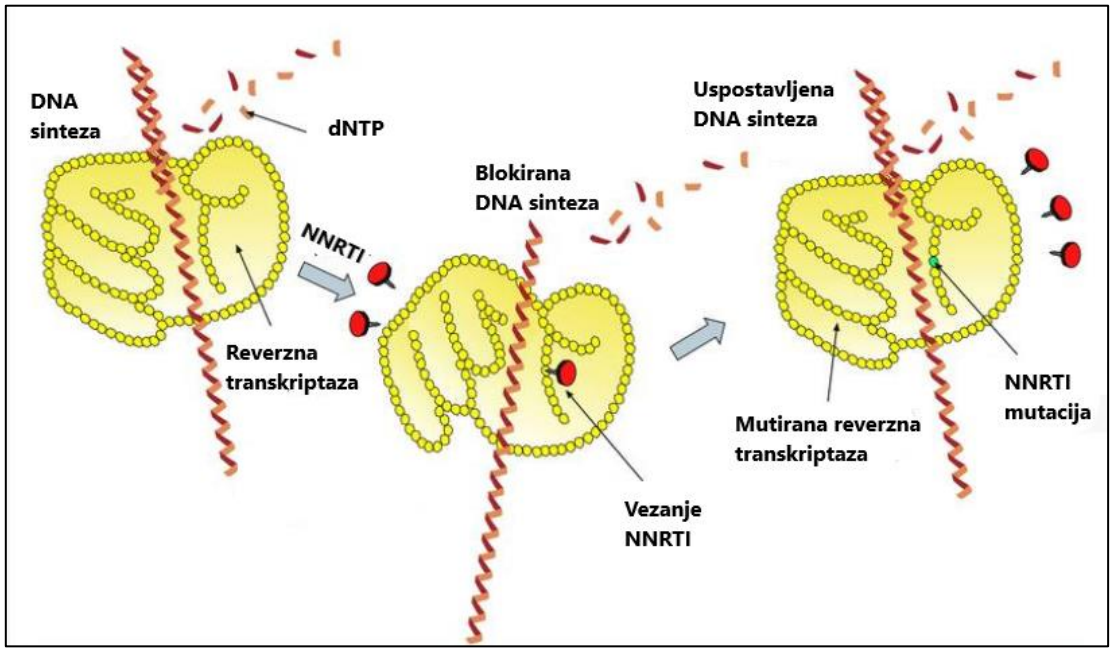
Slika 9. Mehanizam razvoja HIV-1 rezistencije na NRTI putem diskriminacije. Preuzeto i prilagođeno: https://www.hiv.uw.edu/go/antiretroviral-therapy/evaluation-management-virologic-failure/core-concept/all

1.8.3. Ne-nukleozidni inhibitori reverzne transkriptaze

NNRTI predstavljaju nekompetitivne inhibtore koji se vežu blizu aktivnog mjesta RT i induciraju stvaranje hidrofobnog džepa. Prilikom toga uzrokuju promjene u prostornoj konformaciji veznog mjesta za supstrat te uzrokuju smanjenu aktivnost RT, odnosno smanjenu polimerizaciju. Hidrofobni džep postoji samo u prisutnosti NNRTI, a sastoji se od

hidrofobnih ogranaka (Y181, Y188, F227, W229, Y232) i hidrofilnih ogranaka (K101, K103, S105, E139, D192, E224) [69].

Virusne mutante uglavnom iskazuju smanjenu osjetljivost na NNRTI uslijed mutacija u dijelu genoma koji kodira sintezu aminokiselina koje čine aktivno mjesto RT. Na taj način sprječava se stvaranje hidrofobnog džepa, a RT ponovno uspostavlja enzimatsku aktivnost (slika 10). Rezistencija na NNRTI se najčešće povezuje s mutacijama K103N i Y181C, međutim vrlo česte su i mutacije L100I, K101E, E138A, V179D, Y188L, G190A [96].

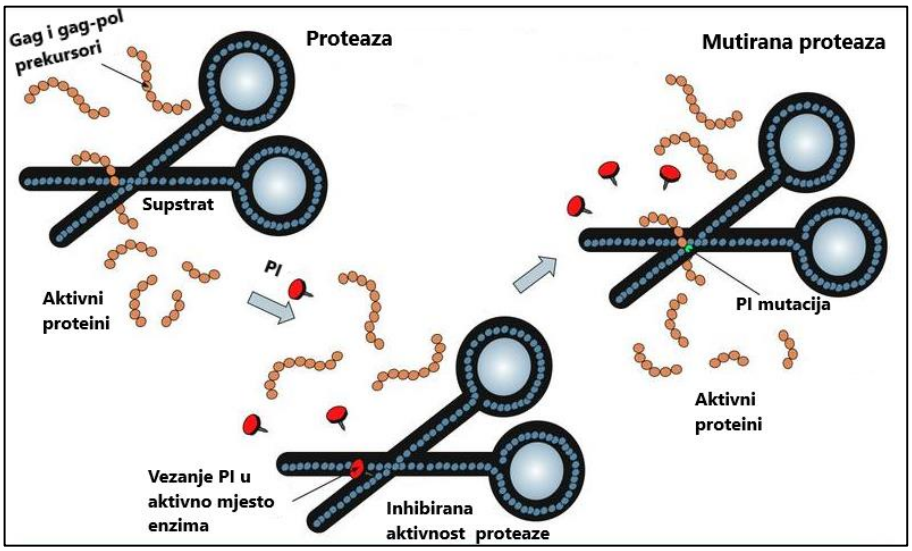


Slika 10. Mehanizam razvoja rezistencije HIV-1 na NNRTI putem mutacije amonokiselina koje čine glavnu strukturu hidrofobnog džepa. Preuzeto i prilagođeno: https://www.immunopaedia.org.za/treatment-diagnostics/hiv-infection-treatment/arv-mode-of-action/.

1.8.4. Inhibitori virusne proteaze

Jedan od ključnih enzima za završetak virusnog replikacijskog ciklusa je virusna PR, odgovorna za sazrijevanje virusnih čestica. HIV-1 PR je homodimerna aspartatska proteaza koja je sastoji od dva nekovalentno vezana monomera. Na dodirnoj površini podjedinica nalazi se aktivno mjesto enzima s katalitičkim aspartatom na poziciji 25. Enzim katalizira cijepanje poliproteina Gag i Gag-Pol na 9 procesuirajućih pozicija i tako omogućuje sazrijevanje virusnih proteina. Aktivno mjesto enzima djelomično je prekriveno s dvije fleksibilne β-ukosnice. Kako bi došlo do vezanja supstrata, ukosnice se moraju otvoriti.

Obzirom da PI oponašaju supstrate, njihovim vezanjem u aktivno mjesto inhibira se fleksibilnost ukosnica i daljnja aktivnost enzima (slika 11) [97].



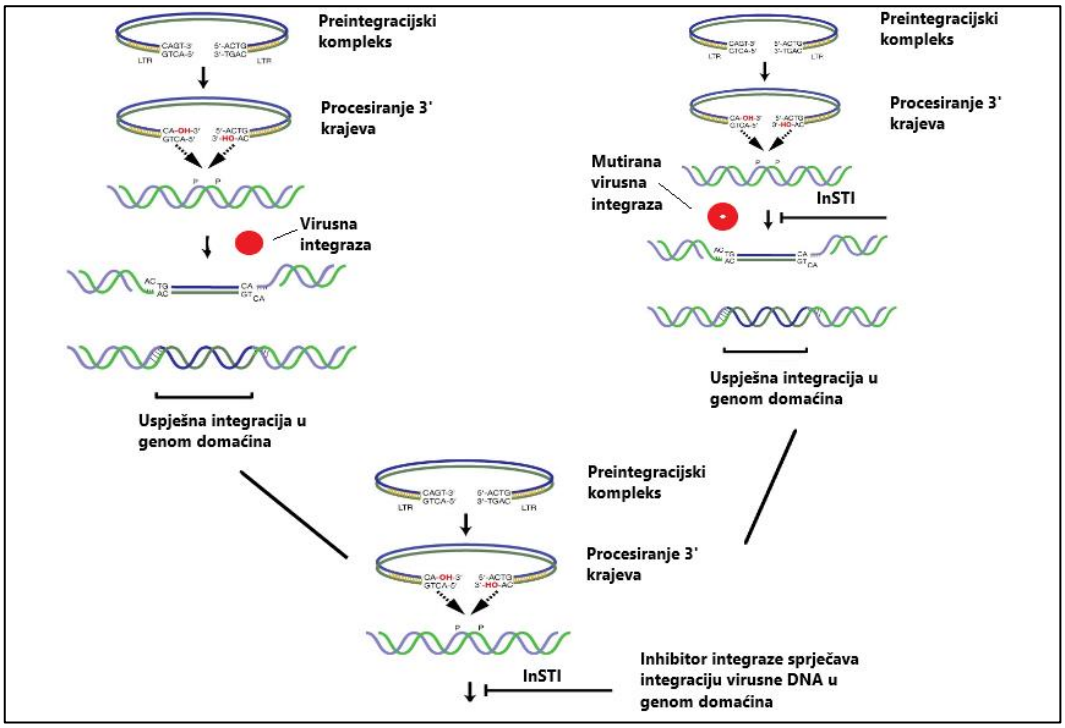
Slika 11. Mehanizam razvoja rezistencije na PI promjenom ključnih aminokiselina u aktivnom mjestu PR . Preuzeto i prilagođeno: https://www.immunopaedia.org.za/treatment-diagnostics/hiv-infection-treatment/arv-mode-of-action/.

Iako se u početku razvoja PI smatralo da će zbog plastičnosti gena za PR pojava rezistencije biti vrlo rijetka, postoji preko 20 supstitucija i polimorfizama povezanih s rezistencijom. Zbog međusobno slične strukture PI vrlo česta je pojava i križne rezistencije (rezistencija na više lijekova unutar iste skupine). Rezistencija se javlja uslijed promjena određenih aminokiselina na pozicijama važnim za vezanje inhibitora u aktivno mjesto enzima. Najčešće mutacije su D30N, G48V, I50V, V82A i I84V koje omogućuju povratak aktivnosti PR, ali i uzrokuju smanjenje replikativnog fitnesa. Osim mutacija vezanih za PR, pronađene su i mutacije na procesuirajućim pozicijama u prekursorskim poliproteinima. Poliproteini mutirani na tim pozicijama predstavljaju bolje supstrate mutiranoj virusnoj PR i djelomično kompenziraju učinak rezistencijom izazvanog gubitka replikativnog fitnesa [69].

1.8.5. Inhibitori virusne integraze

InSTI su posljednja skupina antiretrovirusnih lijekova odobrena za liječenje HIV-1 infekcije. Prvi InSTI bio je RAL, a odobren je za kliničku upotrebu 2007. godine [98]. Virusna IN je ključan enzim PIC-a koji omogućuje ugradnju virusne DNA u genom stanice domaćina (slika 12). Aktivno mjesto enzima čini konzervirana DDE katalitička trijada (aminokiseline Asp64, Asp116, Glu152) i esencijalni dvovalentni ion magnezija (Mg^{2+}) koji služi kao kofaktor u

katalitičkom procesu. InSTI su jedini antiretrovirusni lijekovi čiji mehanizam djelovanja uključuje interakciju s enzimom i supstratom (virusnom DNA). Vežu se na PIC pomoću hidrofobne skupine koja se veže na supstrat, dok kemijska grupa koja sadrži atom kisika ili dušika veže kofaktore magnezija [69, 98].



Slika 12. Mehanizam razvoja HIV-1 rezistencije na InSTI promjenom ključnih aminokiselina u aktivnom mjestu IN. Preuzeto i prilagođeno: https://www.intmedpress.com/journals/avcc/popup_fig.cfm?img=aaf7b7e8-dc7a-4b09-9599-eced05ba8298.

Rezistencija se javlja uslijed promjena aminokiselina na pozicijama važnim za koordinaciju Mg2+. Za sada su odobrena tri InSTI lijeka DTG, EVG i RAL, dok je BIC dio formulirane kombinacije BIC+FTC+TAF. Križna rezistencija je uočena kod RAL i ELV, a najčešće mutacije nalaze se na kodonskim IN pozicijama Y143, Q148 i N155. Mutacije na tim pozicijama uglavnom se pojavljaju s popratnim mutacijama pa su tako uz N155H česte mutacije E92Q, V151L, T97A, G163R i L74M, a uz Q148H/R/K česte su mutacije G140S/A i E138K [69, 98]. DTG predstavlja najnoviju generaciju InSTI, a za sada je poznat mali broj mutacija (poput R263K, T97A, Y143C) koje smanjuju osjetljjivost na tu vrstu lijeka [99].

1.9. Laboratorijske metode analize kliničke rezistencije HIV-1 na antiretrovirusne lijekove

Određivanje kliničke rezistencije kod osoba zaraženih HIV-1 podrazumijeva analizu virusnog genoma, odnosno gena za virusnu PR, RT i IN. Određene mutacije u genu za PR (kodoni 10-93) uzrokuju rezistenciju na PI, a mutacije u genu za RT (kodoni 40-240) uzrokuju rezistenciju na NRTI i NNRTI, dok su mutacije u genu za IN (kodoni 51-263) povezane s rezistencijom na InSTI [100]. Virusni genom može se analizirati primjenom raznih tehnologija, a u ovom poglavlju biti će opisan tehnički pristup i laboratorijska primjena tehnologije sekvenciranja po Sangeru (engl. *Sanger sequencing*, SS) i tehnologije sekvenciranja nove generacije (engl. *next generation sequencing*, NGS).

1.9.1. Genotipizacija HIV-1 tehnologijom sekvenciranja po Sangeru

Klasični pristup analize rezistencije HIV-1 podrazumijeva genotipizaciju virusa primjenom tehnologije SS. Na početku postupka potrebno je izuzeti plazmu ispitanika te iz nje izolirati virusnu RNA. RNA izolat se potom prevodi u komplementarnu DNA (engl. *complementary DNA*, cDNA) pomoću metode reverzne transkripcije, a nakon toga se genetički materijal (geni za HIV-1 PR, RT, IN) amplificira primjenom klasične lančane reakcije polimeraze (engl. *polymerase chain reaction*, PCR). DNA amplifikati služe kao kalupi u reakciji sekvenciranja, čiji se produkti potom analiziraju na kapilarnom sekvenceru. Reakcijska smjesa sadrži DNA kalup, specifičnu početnicu, polimerazu, dNTP-ove te fluorescentno obilježene dideoksinukleoide (ddNTP). Modificirani ddNTP-ovi u svojoj strukturi nemaju 3'OH skupinu važnu za proces polimerizacije, stoga prilikom njihove ugradnje u rastući lanac dolazi do zastoja daljnje sinteze DNA. Kao rezultat, u konačnoj reakciji sekvenciranja nalaze se brojni fragmenti DNA različitih duljina na čijim se krajevima nalaze fluorescentno obilježeni ddNTP-ovi. Obzirom na postojanje 4 različita deoksinukleotida, svaki ddNTP je obilježen različitom fluorescentnom bojom. Fluorescentno obilježeni fragmenti se elektroforetski razdvajaju na genetičkom analizatoru pod visokim naponom u procesu kapilarne gel elektroforeze. Manji fragmenti putuju brže, dok veći fragmenti putuju sporije. Prilikom prolaska fragmenata kroz detekcijski prozorčić laser ekscitira fluorescentne ddNTP-ove, a emisija se bilježi detektorom koji intenzitet u fluorescenciji prevodi u kromatogram te automatski očitava specifičan slijed nukleotida (slika 13) [101]. Dobivene sekvence uspoređuju se sa sekvencom referentnog soja virusa primjenom određenog bioinformatičkog programa. Međusobnom usporedbom sekvenci moguće je

detekirati mutacije povezane s rezistencijom. Zadnji korak je određivanje biološke značajnosti detektiranih mutacija primjenom bioinformatičkog algoritma poput Stanford University HIV Drug Resistance Database, Genotypic Resistance Interpretation Algorithm (Stanford HIV db) [102]. Algoritam klasificira mutacije na primarne (engl. *major)* i sekundarne (engl. *minor*), ovisno o jačini njihova učinka na osjetljivost virusa na antiretrovirusne lijekove. Primarne mutacije najčešće samostalno uzrokuju rezistenciju virusa na određene lijekove, dok sekundarne samostalno ne utječu na osjetljivost virusa, no u kombinaciji s primarnim mutacijama mogu značajno utjecati na razvoj rezistencije na određeni lijek. U konačnici na osnovu zbroja učinka jedne ili više primarnih i/ili sekundarnih mutacija algoritam daje procjenu (engl. *mutation scoring*) njihova sinergističkog učinka na kliničku rezistenciju. Uovom istraživanju analizirane su mutacije povezane sa primarnom rezistencijom virusa HIV-1 na antiretrovirusne lijekove iz skupine NRTI, NNRTI, PI i InSTI primjenom tehnologije SS prema gore opisanom protokolu.

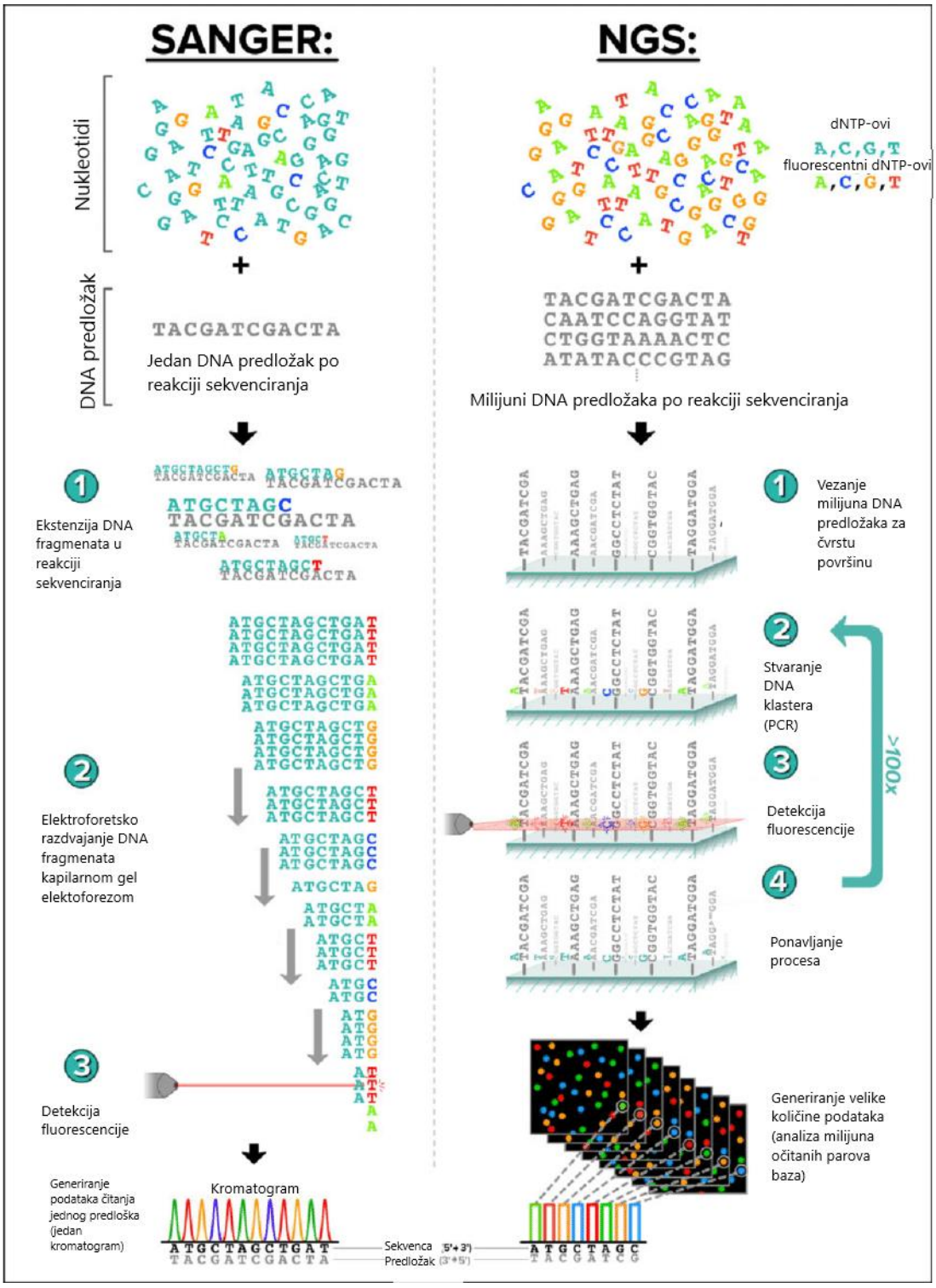
Iako je određivanje HIV-1 rezistencije tehnologijom SS još uvijek standardna metoda koja se koristi u većini dijagnostičkih i istraživačkih laboratorija, zbog određenih nedostataka počele su se razvijati i nove tehnologije koje polako ulaze u laboratorijsku primjenu. Primjerice za analizu virusnih gena (PR, RT, IN) s tehnologijom SS potrebno je prirediti barem 10 reakcijskih smjesa za sekvenciranje zbog male veličine DNA fragmenata koji služe kao predlošci za sekvenciranje. Osim dugotrajnosti postupka i visine troškova značajan nedostatak SS je i nizak prag detekcije rezistentnih HIV-1 varijanti. Tehnologijom SS se mogu detektirati samo rezistentne varijante HIV-1 prisutne u 15-20% ukupne virusne populacije, dok niskofrekventne virusne varijante neće biti identificirane ovom metodom [103, 104].

1.9.2. Genotipizacija HIV-1 tehnologijom sekvenciranja nove generacije

Sekvenciranje tehnologijom NGS podrazumijeva masivno istodobno analiziranje milijuna DNA fragmenata koji se nalaze u reakcijskoj smjesi (slika 13). Prvi korak u tehnologiji NGS podrazumijeva pripremu fragmenata koji će biti sekvencirani. Klasičnim PCR-om se umnaža regija od interesa (geni za HIV-1 PR, RT, IN) nakon čega se dodaju aditivni oligonukleotidi koji se vežu za krajeve DNA amplikona. Oligonukleotidi služe kao barkodovi te pomažu u slaganju konačne sekvence (engl. *contig*) sastavljene od velikog broja preklapajućih DNA fragmenata. Nakon pripreme, jednolančani fragmenti DNA se nanose na čvrstu površinu i umnažaju PCR-om. Na taj način se proizvode milijuni grupiranih DNA

fragmenata (klasteri) koji se paralelno sekvenciraju pomoću lasera koji prate ugradnju fluorescentnih nukleotida. Uređaj u konačnici stvara veliku količinu podataka (stotine gigabajta ili terabajta) koji se bioinformatičkim programima dalje analiziraju. Prvi korak bioinformatičke analize je mapiranje kratkih DNA fragmenata pomoću referentne sekvence. Nakon toga slijedi utvrđivanje pokrivenosti regije od interesa (engl. *coverage*), identifikacija varijanti i dubine (broja) njihova očitovanja. Dubina očitovanja tehnologije NGS se kreće između 1-100% te uređaj može očitati rezistentne varijante prisutne u najmanje 1% virusne populacije, no kod kliničke primjene preporuča se analizirati rezistentne virusne varijante prisutne u ≥5% ukupne virusne populacije. Što je pokrivenost regije od interesa veća (preporučeno je postići pokrivenost od barem 100x), time je i sigurnija zastupljenost i očitana frekvencija nađene varijante na određenoj poziciji [105, 106].

Zbog velike genetičke varijabilnosti HIV-1 uzrokovane visokom replikacijskom stopom, mutacijama i rekombinacijom, poznato je da kod HIV-om zaraženih osoba postoji populacija manjinskih rezistentnih varijanti virusa, čak i prije početka korištenja antiretrovirusne terapije [107]. Literaturni podatci navode da nakon zaraze s rezistentnim sojem virusa HIV-1 (primarna rezistencija), a uslijed nedostatka selektivnog pritiska antiretrovirusnih lijekova, vrlo često dolazi do djelomične reverzije kvazispecijesa u divlji tip virusa. Udio rezistentnih varijanti u virusnoj populaciji ovisi i o stadiju HIV-1 infekcije prilikom ulaska u kliničku skrb. Kod osoba koje vrlo brzo nakon zaraze uđu u kliničku skrb (u akutnoj fazi) veća je vjerojatnost detekcije rezistentnih virusnih varijanti primjenom tehnologije SS. Kod osoba uključenih u kasnoj kroničnoj fazi, uslijed reverzije mutiranog virusa u divlji tip, primarna rezistencija neće biti detektirana. Međutim, rezistentne varijante virusa ostaju dugo prisutne u cirkulaciji te prilikom inicijacije antiretrovirusne terapije može doći do njihove ponovne dominacije [77-79]. Izgledno je da su takvi bolesnici pod povećanim rizikom od razvoja virusološkog neuspjeha terapije, no rezultati takvih istraživanja još uvijek sadrže podijeljene zaključke [93, 94, 107-111]. U ovoj doktorskoj disertaciji istražena je prisutnost i klinička značajnost rijetkih rezistentnih varijanti pri frekvenciji ≥5% kod neliječenih HIV-om zaraženih osoba primjenom tehnologije NGS i uređaja MiniSeq Illumina za masivno usporedno sekvenciranje.



Slika 13. Proces sekvenciranja tehnologijom SS i tehnologijom NGS. Preuzeto i prilagođeno: https://www.researchgate.net/figure/Traditional-Sanger-sequencing-compared-with-next-generation-sequencing-technology-In_fig2_322475464).

1.10. Molekularna analiza transmisijskih mreža

Infektivne bolesti koje se prenose izravno (bez vektora i rezervoara) uglavnom se šire preko kontaktnih mreža. U tim mrežama svaki pojedinac predstavlja čvor povezan s krajnjim skupom kontakata putem kojih se patogen dalje širi. Struktura i sastav transmisijskih mreža čine glavne značajke načina prijenosa određenog patogena, a njihova identifikacija omogućava razvoj kontrolnih javnozdravstvenih strategija [112]. Literaturni podatci navode da su infektivne bolesti koje se šire putem spolnog kontakta (poput HIV-1 infekcije) karakterizirane kao "mreže bez skale" koje rezultiraju u razvoju beskonačne varijance distribucije mrežnih stupnjeva. Uslijed toga vrlo je teško pristupiti razvoju prevencijskih strategija kojima bi se moglo utjecati na smanjenje širenja epidemija toga tipa, međutim razvojem metoda molekularne epidemiologije omogućeno je rekonstruiranje transmisijskih događaja koji su prethodili stvaranju velikih kontaktnih mreža [113-115].

Tijekom razvoja epidemije patogen se od čvora dalje širi putem krajnjih kontakata, a rekonstrukcija transmisijskih događaja moguća je pod pretpostavkom da se svaki pojedinac zarazio samo jednom u kontaktu sa samo jednom osobom te posjedovanjem određenih epidemioloških podataka (način prijenosa virusa, zemlja zaraze, pretpostavljeno vrijeme infekcije). Budući da patogeni evoluiraju tijekom vremena, analiza njihovog genetičkog materijala (nukleotidnih slijedova) uzorkovanog iz različitih zaraženih pojedinaca predstavlja način kako ustanoviti tijek epidemije. U tu svrhu koristi se filogenetska analiza radi izrade transmisijskog (filogenetskog) stabla, dok se filodinamičkom analizom nastoji objasniti na koji način epidemiološki, imunološki i evolucijski procesi međusobno interreagiraju i utječu na virusnu filogeniju [116].

1.10.1. Filogenetska analiza

Filogenetska analiza omogućuje rekonstrukciju epidemioloških događaja putem analize evolucijske povezanosti između grupe jedinki (taksona) koje su genetički vrlo slične. Analiza virusne evolucije uglavnom se bazira na usporedbi varijabilnih regija genoma jedinki. Razlike u nukleotidnim slijedovima između virusnih genoma služe u razjašnjavanju epidemioloških veza između uzoraka budući da se mjera virusne evolucije odražava u stopi nukleotidne suptitucije na određenoj genomskoj poziciji. Krajnji cilj filogenetike je izrada filogenetskog stabla na kojem su prikazani međusobni odnosi između jedinki [117]. Filogenetske metode uglavnom su bazirane na vjerojatnosti nalaženja najbolje topologije stabla, a u tu svrhu se koriste dva pristupa: metoda najveće vjerojatnosti (engl. *Maximum*

Likelihood) i zaključivanje po Bayesu (engl. *Bayesian inference*). Metoda najveće vjerojatnosti maksimizira funkciju vjerojatnosti u odnosu na topologiju stabla i dužinu grana te na taj način daje prikaz najboljeg stabla dobivenog od izvornih podataka. Ta se metoda koristi uglavnom za analizu manjih skupova podataka. Bayesov pristup uspoređuje posteriorne vjerojatnosti za različite topologije stabala pomoću prethodnih vjerojatnosti te stablo s najvećom posteriornom vjerojatnosti predlaže kao najbolji odabir. Bayesova metoda, budući da ne traži optimalno stablo već uzorkuje stabla na osnovu njihove posteriorne vjerojatnosti, pronašla je namjenu u analizi velikih skupova podataka te u filodinamičkoj analizi [118, 119].

Kod svakog filogenetskog stabla potrebno je razlikovati vrhove grana, koji predstavljaju grupu epidemiološki povezanih jedinki (taksa) i čvorove grana, koji predstavljaju zajedničkog pretka te takse. Filogenetska stabla su vrlo često ukorijenjena s vanjskom grupom, odnosno taksonom koji nije predmetom analize. Sve jedinke koje se nalaze na stablu su međusobno genetički srodnije u odnosu na vanjsku grupu, s kojom dijele određenu srodnost, međutim ne u tolikoj mjeri. Korijen stabla predstavlja pretka svih drugih jedinki na stablu, ali ne proizlazi niti iz jednog čvora na stablu. Ukoliko stabla nisu ukorijenjena analizom će se moći utvrditi relativna međusobna povezanost grana, no time neće moći biti identificirano koje jedinke predstavljaju pretke, a koje potomke. Budući da je identifikacija pretka iznimno važna za determinaciju inicijalnog porijekla epidemije, stablo je potrebno ukorijeniti [117, 119]. Prilikom izrade filogenetskog stabla vrlo važno je paziti na mogućnost rekombinacijskih događaja u određenih jedinki te na odabir pravilnog modela nukleotidne suptitucije. Ukoliko se utvrdi da su uzroci dviju ili više jedinki međusobne rekombinante, potrebno ih je isključiti iz daljnje analize jer mogu negativno utjecati na izradu filogenetskog stabla. Model nukleotidne substitucije opisuje stopu kojom je određeni nukleotid zamijenjen s drugim nukleotidom te služi za procjenu evolucijske udaljenosti između sekvenci. Ukoliko nije drugačije naznačeno, za analizu je korišten GTR model (engl. *general time reversible*) budući da se radi o generaliziranom modelu koji ne obuhvaća pretpostavke o stopi i frekvenciji nukleotidne supstitucije [119].

1.10.2. Filodinamička analiza

Kako bi se odredio vremenski tijek razvoja epidemijskih i pandemijskih događaja potrebno je napraviti filodinamičku analizu. Dinamika virusne populacije te njihova prostorna i temporalna distribucija može se istražiti korištenjem filogenetske, koalescentne i drugih

statističkih metoda. Bayesova koalescentna metoda je ujedno i najčešći filodinamički pristup, a u podlozi koristi stohastički algoritam Markovljevog lanca Monte Carlo (engl. *Markov chain Monte Carlo,* MCMC). Taj algoritam omogućuje procjenu vjerojatnosti nekog događaja koristeći ciljanu proizvoljnu distribuciju. U slučaju filodinamičke analize ciljana distribucija je posteriorna vjerojatnost skupa evolucijskih parametara u odnosu na skup uzorkovanih sekvenci. Na taj način Bayesova MCMC metoda omogućuje uklapanje kompleksnih demografskih scenarija uz integriranje filogenetske nesigurnosti, odnosno pokušava objasniti sadašnjost neke populacije gledajući u njenu prošlost i tako rekonstruirati genealoške odnose između randomiziranog populacijskog uzorka. Zbog vrlo brze stope evolucije virusnih čestica analizom njihovih nukleotidnih slijedova moguće je ustanoviti godišnju stopu njihove evolucije, a mjerenjem tog parametra u stvarnom vremenu moguće je čak i precizno odrediti datum razvoja najrecentnijeg pretka (engl. *time of the most common recent ancestor,* tMRCA) određenog taksona. Važno je da je genetski materijal jedinki uključenih u filogenetsku analizu uzorkovan tijekom različitih vremenskih razdoblja jer se tako omogućuje određivanje stope supstitucije nukleotidnih slijedova i procjena vremenskog razdoblja razvoja tMRCA [120, 121].

1.10.3. Rekonstrukcija epidemiološke povezanosti HIV-om zaraženih osoba u Hrvatskoj

Virus HIV-1 predstavlja vrlo zanimljiv modelni organizam za proučavanje evolucijskih procesa zbog raznih karakteristika, a ponajprije iznimne genetičke varijabilnosti i razmjerno velikog broja zaraženih osoba u svijetu. Izvor genetičke varijabilnosti su biološke značajke virusa, kao što je visoka stopa rekombinacije i razvoja mutacija, relativno malena veličina genetičkog materijala (~9.8 kb) te posljedično vrlo kratko generacijsko vrijeme (1.2 dana) [122]. Stopa genetičke varijabilnosti opisana je s molekularnim satom. Evolucijski proces koji diktira razvoj virusa HIV-1 predstavlja vrlo kompleksnu interakciju između virusa i domaćina, ali i vanjskih čimbenika poput antiretrovirusne terapije. Ishod tih interakcija uvelike je ovisan o stadiju bolesti te je specifično vezan za određenog domaćina i kvazispecijes virusa [123].

Filogenetska i filodinamička analiza naišle su na čitav niz primjena u istraživanju HIV-1 infekcije. Primjerice, pomoću filogenetike i filodinamike je identificirano porijeklo i procijenjeno je vrijeme razvoja virusa HIV-1, genetička srodnost s drugim lentivirusima, a omogućena je i klasifikacija HIV-1 prema podtipovima i CRF-ovima [8, 9, 14, 18, 23-26]. Uz istraživanja vezana za fundamentalnu biologiju virusa, te metode su našle primjenu i u

istraživanjima molekularne epidemiologije zaraze HIV-om. Budući da HIV brže evoluira nego što se širi te posljedično akumulira mutacije tijekom tog procesa, filogenetskom analizom moguće je rekonstruirati evolucijske procese širenja infekcije [124-127]. Pomoću filogenetike moguće je razjasniti način širenja zaraze na određenom geografskom području te identificirati transmisijske klastere koji su vrlo često formirani od određenih rizičnih skupina (primjerice MSM, IDU), unutar kojih se infekcija gotovo ekskluzivno širi među pripadnicima te određene populacije. Osim toga, filogenetika i filodinamika služe i za identifikaciju puteva širenja rezistentnih varijanti HIV-1 i procjenu veličine takvih transmisijskih klastera i dinamike njihova rasta [87-92, 128-132]. Povezivanje rezultata bioinformatičkih analiza virusnog genetičkog materijala s epidemiološkim, demografskim i kliničkim podatcima zaraženih osoba predstavlja vrlo vrijedne podatke koji omogućuju planiranje i razvoj prevencijskih strategija daljnjeg širenja zaraze HIV-om. U sklopu ove doktorske disertacije primjenom filogenetske i filodinamičke analize istražena je epidemiološka povezanost HIV-om zaraženih osoba iz Hrvatske. Istraživanjem je napravljena sveobuhvatna karakterizacija transmisijskih klastera analizom njihove veličine, sastava, karakteristika ispitanika uključenih u pojedine klastere te identifikacijom širenja rezistentnih varijanti virusa HIV-1 i procjenom godine inicijalnog nastanka pojedinih transmisijskih klastera.

2. HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA

1) U razdoblju od 2014. do 2017. godine doći će do povećanja trenda novodijagnosticiranih HIV-1 zaraženih osoba koji se grupiraju u lokalne transmisijske lance.

2) U razdoblju od 2014. do 2017. godine neće biti značajnog povećanja postotka novodijagnosticiranih bolesnika s primarnom rezistencijom HIV-1 na antiretrovirusne lijekove.

3) Prevalencija primarne rezistencije virusa HIV-1 bit će viša na NRTI i NNRTI skupine lijekova koji inhibiraju virusnu reverznu transkriptazu u odnosu na PI skupinu lijekova koji inhibiraju virusnu proteazu.

4) Prevalencija primarne rezistencije će biti viša u skupini bolesnika dijagnosticiranih u ranoj fazi infekcije u odnosu na bolesnike dijagnosticirane u kroničnoj fazi infekcije.

5) Dubinsko sekvenciranje će otkriti višu stopu mutacija povezanih s rezistencijom virusa HIV-1 na antiretrovirusne lijekove u odnosu na sekvenciranje po Sangeru.

3. CILJEVI RADA

Opći je cilj istražiti lokalno širenje HIV-1 infekcije filogenetskom analizom transmisijskih lanaca B i non-B podtipova i u sklopu toga analizirati socio-demografske, kliničke, terapijske i laboratorijske podatke novozaraženih i neliječenih osoba uključenih u kliničku skrb u razdoblju od 2014. do 2017. godine.

SPECIFIČNI CILJEVI:

1. Karakterizacija molekularne epidemiologije HIV-1 u Hrvatskoj analizom učestalosti podtipova HIV-1.

2. Odrediti prevalenciju primarne rezistencije na NRTI/NNRTI i PI skupine lijekova (u razdoblju od 2014 do 2017. godine) te na InSTI skupinu lijekova (tijekom 2017. godine).

3. Metodama populacijskog sekvenciranja i sekvenciranja sljedeće generacije usporediti obrazac mutacija povezanih s rezistencijom na antiretrovirusne lijekove te odrediti kliničku značajnost detektiranih manjinskih virusnih varijanti.

4. MATERIJALI I METODE

Ova doktorska disertacija dio je znanstveno-istraživačkog projekta financiranog od strane Hrvatske zaklade za znanost naslovljenog "Molekularna, epidemiološka i klinička obilježja zaraze HIV-om u Hrvatskoj", čiji je nositelj Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, (šifra projekta: IP-2014-09-4461). Etičko povjerenstvno Klinike za infektivne bolesti "Dr. Fran Mihaljević" je 16. srpnja 2015. godine odobrilo provođenje navedenog znanstveno-istraživačkog projekta, dok je doktorska disertacija "Molekularna heterogenost virusa humane imunodeficijencije tipa 1 i uloga transmisijskih lanaca u lokalnom širenju infekcije u Hrvatskoj" dobila etičku dopusnicu na sjednici 13. rujna 2018. godine.

4.1. Ispitanici

U istraživanje sam uključila prethodno neliječene HIV-om zaražene osobe koje su ušle u skrb Klinike za infektivne bolesti "Dr. Fran Mihaljević" (KZIB) i Referentnog centra za dijagnostiku i liječenje HIV/AIDS-a Ministarstva zdravstva R. Hrvatske u razdoblju od siječnja 2014. do kraja prosinca 2017. godine. Kriteriji za uključenje bili su: **(1)** dob >18 godina **(2)** dostupnost uzorka plazme za genotipizacijski test rezistencije unutar 6 mjeseci od dijagnoze HIV-1 infekcije **(3)** viremija u plazmi >2000 kopija HIV-1 RNA po mL. Osobe mlađe od 18 godina te trudnice nisam uključila u istraživanje. Rana faza HIV-1 infekcije definirana je s jednim ili više sljedećih parametara: **(1)** prisutnost simptoma akutne HIV-1 infekcije; **(2)** negativan test na HIV unutar prethodnih 6 mjeseci ; **(3)** evolucija u serološkim testovima detekcije antigena p24 i anti-HIV antitijela (pozitivan test antigena p24 i negativan ili neodrediv Western blot s potvrdom dijagnoze detekcijom HIV-1 RNA i/ili pozitivnim Western blotom). Istraživanje je bilo retrospektivno te je provedeno u Odjelu za imunološku i molekularnu dijagnostiku KZIB "Dr. Fran Mihaljević", Ambulanti za HIV/AIDS KZIB-a i u Referentnom centru za dijagnostiku i liječenje HIV/AIDS-a Ministarstva zdravstva R. Hrvatske. Osnovni epidemiološki i klinički podaci su dobiveni iz elektronske baze podataka koja se koristi od 1997. godine.

4.2. Biološki uzorci

Uzorke za kvantifikaciju HIV-1 RNA, određivanja broja CD4+ T-limfocita, genotipizacijski test rezistencije HIV-1 na antiretrovirusne lijekove i molekularnu karakterizaciju virusa HIV-1 prikupila sam tijekom redovitih kontrola ispitanika u Ambulanti za HIV/AIDS ili na Zavodu za infekcije imunokompromitiranih bolesnika KZIB-a. Tijekom

ovog istraživanja nisam prikupljala dodatne uzorke već sam koristila ostatne dijelove uzoraka prikupljenih za potrebe dijagnostičke obrade bolesnika. Za potrebe kvantifikacije HIV-1 RNA, genotipizacijskog testa rezistencije HIV-1 na antiretrovirusne lijekove i molekularne analize virusa HIV-1 koristila sam plazmu izdvojenu centrifuriganjem periferne krvi uzete venepunkcijom u sterilnu epruvetu VACUTAINER (Becton Dickinskon) na 3500 x g 10 minuta pri sobnoj temperaturi. Alikvotiranu plazmu volumena 1.5 ml potom sam pohranila na -80ºC do testiranja. Dio uzoraka periferne krvi za određivanje broja CD4+ T-limfocita metodom protočne citometrije pohranila sam pri sobnoj temperaturi do analize (najduže 3 sata).

4.3. Popis kemikalija

4.3.1. Komplet reagencija za kvantifikaciju HIV-1-RNA

- *PCR COBAS TaqMan HIV-1 Test (Roche Diagnostics, Mannheim, Njemačka), version 2.0*.

4.3.2. Kompleti reagencija za protočnu citometriju

- *CYTO-STAT tetraCHROME CD45-FITC/CD4-RD-1/CD8-ECD/CD-3PC-5 Monoclonal Antibody Reagents for use with tetraONE SYSTEM software (Beckman Coulter, Inc., Brea, Kalifornija).*
- *CYTO-STAT tetraCHROME CD45-FITC/CD56-RD-1/CD19-ECD/CD3-PC-5 Monoclonal Antibody Reagents for use with tetraONE SYSTEM software (Beckman Coulter, Inc., Brea, Kalifornija).*
- *Monoklonsko protutijelo specifično za molekulu HLA-DR.HLA-DR-PC-7 (Beckman Coulter, Inc., Brea, Kalifornija).*
- *ImmnunoPrep Reagent System Whole blood lysing reagent (Beckman Coulter, Inc., Brea, Kalifornija).*
- *Flow-Count™ Flourospheres absolute count determination on CXP Flow Cytometry System (Beckman Coulter, Inc., Brea, Kalifornija).*
- *Flow-Check™ Flourospheres, Flow Cytometer Alignment Verification (Beckman Coulter, Inc., Brea, Kalifornija).*
- *IsoFlow™ Sheath Fluid Azide free balanced electrolyte solution (Beckman Coulter, Inc., Brea, Kalifornija).*

4.3.3. Komplet reagencija za izolaciju HIV-1-RNA

- *QIAmp Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Njemačka).*

4.3.4. Kompleti reagencija za reverznu transkripciju *pol* regije HIV-1 genoma

- *SuperScript III First-Strand Synthesis System (Invitrogen, Carlsbad, Kalifornija).*
- *Specifične početnice (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts).*

4.3.5. Kompleti reagencija za lančanu reakciju polimeraze s reverznom transkripcijom u postupku amplifikacije HIV-1-PR i -RT gena

- *SuperScript III One-Step RT-PCR System with Platinum Taq (Invitrogen, Carlsbad, Kalifornija).*
- *Specifične početnice (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts).*

4.3.6. Kompleti reagencija za ugniježđenu lančanu reakciju polimeraze u postupku amplifikacije HIV-1-PR i -RT gena

- *HotStarTaq DNA Polymerase (Qiagen, Hilden, Njemačka).*
- *2'-deoksinuklozid-5'-trifosfat (dNTP), svaki koncentracije 10 mM (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts).*
- *Voda bez RNaza, RNase-free Water (Invitrogen, Carlsbad, Kalifornija).*
- *Specifične početnice (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts).*

4.3.7. Kompleti reagencija za lančanu reakciju polimeraze s reverznom transkripcijom u postupku amplifikacije HIV-1-IN gena

- *SuperScript IV One-Step RT-PCR System with Platinum Taq (Invitrogen, Carlsbad, Kalifornija).*
- *Specifične početnice (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts).*

4.3.8. Komplet reagencija za određivanje koncentracije DNA amplikona

- *dsDNA HS (High Sensitivity) Assay Kit (Invitrogen, Carlsbad, Kalifornija).*

4.3.9. Kompleti reagencija za sekvenciranje po Sangeru amplikona HIV-1-RT, -PR i -IN gena

- *BigDye Terminator V3.1. Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, Kalifornija).*

- *DEPC-tretirana voda, DEPC-Treated Water (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts).*
- *Specifične početnice (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts).*

4.3.10. Kompleti reagencija za pročišćavanje i pripremanje produkata sekvencijskih reakcija

- *EDTA, 0.5 M, pH 8.0, Molecular Biology Grade, (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri).*
- *Natrijev acetat, Sodium Acetate, 3M, pH 5.2., Molecular Biology Grade (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri).*
- *Etanol (T.T.T.d.o.o., Sveta Nedjelja, Hrvatska)*
- *HiDi formamid (Applied Biosystems, Foster City, Kalifornija).*

4.3.11. Kompleti reagencija za višestruku lančanu reakciju polimeraze u postupku sekvenciranja amplikona HIV-1-PR, -RT i –IN gena metodom sekvenciranja nove generacije

- *ALLin Taq DNA Polymerase (highQu, Kraichtal, Njemačka).*
- *Specifične početnice (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts).*

4.3.12. Komplet reagencija za pročišćavanje produkata višestruke lančane reakcije polimeraze

- *Agencourt Ampure XP Beads (Beckman Coulter, Krefeld, Njemačka).*
- *Etanol (T.T.T.d.o.o., Sveta Nedjelja, Hrvatska)*
- *Elucijski pufer EB 10 mM Tris-Cl, pH 8,5 (Qiagen, Hilden, Njemačka)*

4.3.13. Kompleti reagencija za pripremu DNA knjižnice u postupku sekvenciranja amplikona HIV-1-PR, -RT i -IN gena metodom sekvenciranja nove generacije

- *NEBNext Ultra II DNA Library Prep Kit with Sample Purification Beads (New England BioLabs, Beverly, Massachusetts).*
- *Etanol (T.T.T.d.o.o., Sveta Nedjelja, Hrvatska)*
- *Elucijski pufer EB 10 mM Tris-Cl, pH 8,5 (Qiagen, Hilden, Njemačka).*

4.3.14. Komplet reagencija za određivanje koncentracije i čistoće DNA knjižnice u postupku elektroforeze na DNA čipu

- *Agilent High Sensitivity Kit (Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornija).*

4.3.15. Komplet reagencija za sintezu klastera i reakciju sekvenciranja pročišćenih amplikona HIV-1-PR, -RT i -IN gena metodom sekvenciranja nove generacije

- *MiniSeq MID Output 300-cycles Reagent Kit (Illumina, San Diego, Kalifornija).*

4.4. Oprema i potrošni materijal

- epruvete *(Vacutainer, Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey).*
- pipete *(Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts).*
- nastavci za pipete *(Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts)*
- epruvete od 1.5 i 2 mL *(Micro Tube 1.5 and 2 mL, Sarstedt, Numbrecht, Njemačka).*
- PCR epruvete od 0.2 mL *(PCR tubes, Eppendorf, Hamburg, Njemačka).*
- pločice od 96 jažica *(MicroAmp Optical 96-well Reaction Plate, Applied Biosystems, Foster City, Kalifornija).*
- PCR epruvete u nizu od 0.2 mL i pokrovi za nizove *(MicroAmp 8-Tube and –Cap Strip, Applied Biosystems, Foster City, Kalifornija).*
- septe od 96 jažica za sekvenciranje *(Plate Septa, 96-well, Applied Biosystems, Foster City, Kalifornija).*
- polimer za sekvenciranje *(POP-4 Polymer, Applied Biosystems, Foster City, Kalifornija).*
- kapilare za sekvenciranje *(310 Genetic Analyzer Capillary, 47 cm, Applied Biosystems, Foster City, Kalifornija).*
- tresilica *(MPS-1 High-Speed Multi Plate Shaker, Biosan Laboratories, Warren, Michigan).*
- termociklički amplifikator *(GeneAmp PCR System 9700, Applied Biosystems, Foster City, Kalifornija).*
- centrifuga *(Centrifuge 5430 Eppendorf, Hamburg, Njemačka).*
- instrument za kapilarno sekvenciranje *(ABI PRISM 310 Genetic Analyzer, Applied Biosystems, Foster City, Kalifornija).*
- instrument za određivanje koncentracije nukleinskih kiselina *(Qubit Fluorometer, Invitrogen, Carlsbad, Kalifornija).*
- uređaj za sekvenciranje nove generacije *(MiniSeq Illumina, San Diego, Kalifornija).*
- magnetni stalak *(Magnetic Stand-96, Invitrogen, Carlsbad, Kalifornija).*

- instrument za automatsku izolaciju nukleinskih kiselina *(COBAS AmpliPrep, Roche Diagnostics, Risch-Rotkreutz, Švicarska).*
- instrument za amplifikaciju HIV-1 RNA *(COBAS AMPLICOR Roche Diagnostics, Risch-Rotkreutz, Švicarska)*.
- instrument za detekciju PCR produkata *(COBAS TaqMan Roche Diagnostics, Risch-Rotkreutz, Švicarska).*
- instrument za DNA elektroforezu *(Bioanalyzer 2100, Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornija).*
- instrument za pipetiranje uzoraka za protočnu citometriju *(Coulter PrepPlus 2, Beckman Coulter, Brea, Kalifornija).*
- instrument za pripremu uzoraka za protočnu citometriju *(Coulter TQ-Prep, Beckman Coulter, Brea, Kalifornija).*
- protočni citometar *(CYTOMICS FC 500, Beckman Coulter, Brea, Kalifornija).*

4.5. Računalni programi i on-line alati

- Vector NTI Software (*Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts).*
- Stanford University HIV Drug Resistance Database, Genotypic Resistance Interpretation Algorithm version 8.8 [102]
- Rega HIV-1 Subtyping Tool, version 3.0 [134]
- jumping profile Hidden Markov Model (jpHMM) [135]
- COntext-based Modelling for Expeditious Typing (COMET) [136]
- HyDRA Web verzija 1.5.1. [140]
- Basic local alignment search tool (BLAST) [141]
- Bioedit verzija 7.2.5. [142]
- PhyML 3.0 program [143]
- Figtree verzija 1.4.3. [144]
- Recombination Detection Program 3 (RDP3) [145]
- Los Alamos HIV sequence database [146]
- Molecular Evolutionary Genetics Analyses (MEGA) verzija 6 [147]
- Bayesian Evolutionary Analysis Sampling Trees 2 (BEAST2) verzija 2.1.3. [148]
- Tracer verzija 1.7.1. [150]

4.6. Metode

4.6.1. Određivanje broja CD4+ T-limfocita

Tijekom istraživanja prospektivno sam određivala aspolutni broj CD4+ T-limfocita u uzorcima koji su prikupljeni istovremeno s uzorcima predviđenim za genotipizaciju virusa. Metodom protočne citometrije određen je imunološki status HIV-om zaraženih osoba koji uključuje analizu postotaka B-limfocita, T-limfocita, NK-stanica, CD4+ T-limfocita, CD8+ T-limfocita i aktiviranih CD4+ T-limfocita kao i određivanje apsolutnog broja CD4+ T-limfocita po mikrolitru periferne krvi (μl/mm^3). Limfocitne subpopulacije odredila sam metodom četverostrukog bojanja (kombinacije protutijela specifične za CD45-FITC/CD4-RD-1/CD8-ECD/CD-3PC-5) i peterostrukog bojanja (kombinacije protutijela specifične za CD45-FITC/CD56-RD-1/CD19-ECD/CD3-PC-5 i HLA-DR PC7), prema uputama proizvođača *(Beckman Coulter).* Uzorci su analizirani pomoću protočnog citometra *CYTOMICS FC 500 (Beckman Coulter).*

4.6.2. Kvantifikacija HIV-1 RNA

Tijekom istraživanja prospektivno sam određivala viremiju HIV-1 RNA u uzorcima koji su prikupljeni istovremeno s uzorcima predviđenim za genotipizaciju virusa. Broj kopija HIV-1-RNA u plazmi odredila sam kvantitativnom metodom lančane reakcije polimeraze u stvarnom vremenu (engl. *real-time PCR*) primjernom standardiziranog testa *COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HIV-1 assay, version 2.0 (Roche Diagnostics),* prema uputama proizvođača. *COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HIV-1 assay, version 2.0* je *in vitro* amplifikacijski test za kvantifikaciju HIV-1 RNA u plazmi, s rasponom detekcije 20-10,000,000 kopija/mL. Test koristi početnice za reverznu transkriptazu i PCR amplifikaciju koji definiraju sekvencu unutar visoko postojane regije *gag* gena HIV-1 i HIV-1 LTR regije. Aparat za automatiziranu izolaciju nukleinskih kiselina *COBAS Ampliprep (Roche Diagnostics)* koristila sam za izolaciju RNA, a termociklički amplifikator *COBAS AMPLICOR (Roche Diagnostics)* te analizator za detekciju PCR produkata *COBAS TaqMan (Roche Diagnostics)* koristila sam se za amplifikaciju HIV-1-RNA i detekciju produkata PCR reakcije.

4.6.3. Izolacija virusne HIV-1 RNA

Virusnu RNA izolirala sam iz 500 μl plazme ispitanika sa primjenom standardiziranog reagensa *QIAmp Viral RNA Mini Kit (Qiagen),* prema uputama proizvođača. Po završetku,

virusnu RNA eluirala sam u 30 μL elucijskog pufera te odmah koristila u daljnjem procesu amplifikacije *pol* regije HIV-1 genoma, odnosno gena za virusnu PR, RT i IN.

4.6.4. Amplifikacija *pol* regije HIV-1 genoma

U svrhu analize rezistencije virusa HIV-1 na antiretrovirusne lijekove iz skupina inhibitora virusne RT, PR i IN, određivanja genotipa virusa te filogenetske i filodinamičke analize nukleotidnih slijedova, amplificirana je *pol* regija HIV-1 genoma. Amplifikaciju *pol* regije provela sam u dvije zasebne reakcije: (1) amplifikacija *pol* regije koja obuhvaća gene za virusnu PR i RT (2) amplifikacija *pol* regije koja obuhvaća gen za virusnu IN. Odmah po završetku izolacije virusne HIV-1 RNA, započela sam s postupkom pripreme reakcijskih smjesa za amplifikaciju specifičnih gena HIV-1 RT, PR i IN, pazeći pritom da sve kemikalije i reakcijske smjese do stavljanja u termociklički amplifikator budu držane na ledu.

4.6.4.1. Amplifikacija gena za virusnu HIV-1-RT i -PR

Amplifikaciju dijela *pol* regije HIV-1 genoma koja obuhvaća gen za HIV-PR (kodoni 1–99) te dio gena za HIV-RT (kodoni 1–240) provela sam kod 403 ispitanika, kod kojih je ispitivana rezistencija HIV-1 na antiretrovirusne lijekove iz skupine NRTI/NNRTI i PI. Dio *pol* regije HIV-1 genoma koja obuhvaća gene za PR i RT amplificirala sam pomoću lančane reakcije polimeraze s reverznom transkripcijom (engl. *reverse transcriptase polymerase chain reaction*, RT-PCR) koristeći reagens *SuperScript III One-Step RT-PCR System with Platinum Taq (Invitrogen)* i specifični set početnica, JA269 (pozicija u referentnom *HIV-1 HXB2* genomu dostupnog u banci gena GeneBank pod pristupnim brojem K03455, 2042-2063; nukleotidni slijed, AGG AAG GAC ACC ARA TGA ARG A) i JA272 (pozicija u referentnom *HIV-1 HXB2* genomu KO3455, 3364-3342; nukleotidni slijed, GGA TAA ATC TGA CTT GCC CAR T) [133]. Reakcijska smjesa ukupnog volumena 25 μL sadržavala je: 12,5 μL reakcijskog mixa *2x Reaction Mix*, 0.5 μL početnice JA269, 0.5 μL početnice JA272, 1 μL enzima *SuperScript III RT/Platinum Taq Mix* te 10.5 μL HIV-1 RNA. Reakcijske smjese pripremala sam u PCR epruvetama zapremnine 0.2 mL *(PCR tubes, Eppendorf)* koje sam potom stavila u termociklički amplifikator *GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems)*, prema uvjetima navedenim u tablici 1. Očekivani produkt RT-PCR reakcije bila je HIV-1 DNA veličine 1322 parova baza.

Tablica 1. Uvjeti RT-PCR reakcije u postupku amplifikacije dijela *pol* regije genoma HIV-1 koja obuhvaća gene za virusnu PR i RT.

	40 ciklusa		
52°C / 30 min	94°C / 15 s	68°C / 5 min	4°C / ∞
94°C / 2 min	50°C / 30 s		
	68°C / 2 min		

Koncentracije virusne HIV-1 DNA nakon RT-PCR reakcije provjerila sam pomoću reagensa *Qubit dsDNA High Sensitivity Assay Kit (Invitrogen)* i instrumenta za određivanje koncentracije nukleinskih kiselina *Qubit Fluorometer (Invitrogen)*. Potom sam uzorke s DNA koncetracijom ≥15 ng/µl direktno koristila u pripremi reakcijske smjese za sekvenciranje nukleinskih kiselina, kao što je opisano u poglavlju 4.6.5.

Uzorke s DNA koncentracijom <15 ng/µl podvrgnula sam drugoj amplifikaciji koristeći metodu ugnježđene lančane reakcije polimeraze (engl. *nested PCR*). U tu svrhu koristila sam reagens *HotStarTaq DNA Polymerase* (*Qiagen),* vodu bez RNaza (*Invitrogen), dNTP mix 10mM (Thermo Fisher Scientific)* te specifični set početnica: JA270 (pozicija u referentnom *HIV-1 HXB2* genomu K03455, 2248-2267; nukleotidni slijed, GCT TCC CTC ARA TCA CTC TT) i JA 271 (pozicija u referentnom *HIV-1 HXB2* genomu K03455, 3309-3333; nukleotidni slijed, CCA CTA AYT TCT GTA TRT CAT TGA C) [133]. Reakcijska smjesa ukupnog volumena 25 µL sadržavala je: 2,5 µL reakcijskog mixa *10x PCR Buffer*, 0.5 µL $MgCl_2$, 0.5 µL mješavine nukleotida *dNTP mix*, 0.75 µL JA270, 0.75 µL JA 271, 0.125 µL enzima *HotStarTaq DNA Polymerase*, 18.8 µL vode te 1 µL HIV-1 DNA. Reakcijske smjese pripremala sam u PCR epruvetama zapremnine 0.2 mL *(PCR tubes, Eppendorf)* koje sam potom stavila u termociklički amplifikator *GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems)* prema uvjetima navedenim u tablici 2. Očekivani produkt PCR reakcije bila je HIV-1 DNA veličine 1086 parova baza.

Tablica 2. Uvjeti nested PCR reakcije u postupku amplifikacije dijela *pol* regije genoma HIV-1 koja obuhvaća gene za virusnu PR i RT.

	35 ciklusa		
95°C / 15 min	94°C / 30 s	72°C / 7 min	4°C / ∞
	59°C / 45 s		
	72°C / 2 min		

4.6.4.2. Amplifikacija gena za virusnu HIV-1-IN

Amplifikaciju dijela *pol* regije HIV-1 genoma koja obuhvaća gen za HIV-IN (kodoni 1-288) provela sam kod ispitanika uključenih u kliničku skrb tijekom 2017. godine kod kojih je ispitivana rezistencija HIV-1 na InSTI. Tijekom 2017. godine, ukupno je 110 HIV-om zaraženih osoba ušlo u skrb KZIB-a, dok je 100 osoba zadovoljilo kriterije uključenja iz poglavlja 4.1. Dio *pol* regije genoma HIV-1 koja obuhvaća gen IN amplificirala sam pomoću RT-PCR reakcije koristeći reagens *SuperScript IV One-Step RT-PCR System with Platinum Taq (Invitrogen)* i specifični set početnica IN1 (pozicija u referentnom *HIV-1 HXB2* genomu K03455, 3559-3583; nukleotidni slijed, GGA CAT ATC AAA TTT ATC AAG AGC C) i IN2 (pozicija u referentnom *HIV-1 HXB2* genomu K03455, 5162-5183; nukleotidni slijed, TGA GGG CTT TCA TAG TGA TGT C). Reakcijska smjesa ukupnog volumena 25 μL sadržavala je: 12,5 μL reakcijskog mixa *2x Platinum SuperFi RT-PCR Master Mix*, 1.25 μL početnice IN1, 1.25 μL početnice IN2, 0.25 μL enzima *SuperScript IV RT Mix* te 9.75 μL HIV-1 RNA. Reakcijske smjese pripremala sam u PCR epruvetama zapremnine 0.2 mL *(PCR tubes, Eppendorf*) koje sam potom stavila u termociklički amplifikator *GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems*) prema uvjetima navedenim u tablici 3. Očekivani produkt RT-PCR reakcije bila je HIV-1 DNA veličine 1624 parova baza.

Tablica 3. Uvjeti RT-PCR reakcije u postupku amplifikacije dijela *pol* regije genoma HIV-1 koja obuhvaća gen za virusnu IN.

<table>
<tr><td rowspan="2">60°C / 10 min</td><td>40 ciklusa</td><td rowspan="4">72°C / 5 min</td><td rowspan="4">4°C / ∞</td></tr>
<tr><td>98°C / 10 s</td></tr>
<tr><td rowspan="2">98°C / 2 min</td><td>61°C / 10 s</td></tr>
<tr><td>72°C / 1 min</td></tr>
</table>

4.6.5. Sekvenciranje *pol* regije HIV-1 genoma

Amplikonima koji obuhvaćaju gene HIV-PR i -RT te amplikona koji obuhvaćaju gen HIV-IN određen je nukleotidni slijed pomoću tehnologije SS. U tu svrhu koristila sam reagens *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems), DEPC-tretiranu vodu (Thermo Fisher Scientific)* te specifični set početnica koje formiraju dvosmjerne sekvence. Za sekvenciranje gena HIV-PR i -RT korištene su početnice JA273 (pozicija u referentnom *HIV-1 HXB2* genomu K03455, 2252-2271; nukleotidni slijed, CCC TCA AAT CAC TCT TTG GC), JA276 (pozicija u referentnom *HIV-1 HXB2* genomu K03455, 3303-3322; nukleotidni slijed, TGT ATA TCA TTG ACA GTC CA), JA280 (pozicija u

referentnom *HIV-1 HXB2* genomu K03455, 2366-2383; nukleotidni slijed, GGT TTC CAT CTT CCT GGC), JA305 (pozicija u referentnom *HIV-1 HXB2* genomu K03455, 2811-2830; nukleotidni slijed, ATT CCT AAT TGR ACY TCC CA) i JA311 (pozicija u referentnom *HIV-1 HXB2* genomu K03455, 2707-2726; nukleotidni slijed, AAA ATC CAT AYA AYA CTC CA) [133], dok su za sekvenciranje gena za HIV-IN korištene početnice IN3 (pozicija u referentnom *HIV-1 HXB2* genomu K03455, 3559-3583; nukleotidni slijed, GGA CAT ATC AAA TTT ATC AAG AGC C), IN4 (pozicija u referentnom *HIV-1 HXB2* genomu K03455, 4654-4674; nukleotidni slijed, CCT ACA ATC CCC AAA GTC AAG), IN5 (pozicija u referentnom *HIV-1 HXB2* genomu K03455, 4583-4602; nukleotidni slijed, CAG CAA TTT CAC CGG TGC TA) i IN6 (pozicija u referentnom *HIV-1 HXB2* genomu K03455, 5162-5183; nukleotidni slijed, TGA GGG CTT TCA TAG TGA TGT C). Reakcijska smjesa ukupnog volumena 5 μL sadržavala je: 1 μL mixa za sekvenciranje *BigDye Terminator V3.1. Reaction Mix*, 0.5 μL specifične početnice, 0.5 μL pufera za sekvenciranje *5x Sequencing Buffer*, 2 μL vode te 1 μL HIV-1 DNA. Reakcijske smjese pripremala sam u pločicama od 96 jažica *(MicroAmp Optical 96-well Reaction Plate, Applied Biosystems)* ili PCR epruvetama u nizu *(MicroAmp 8-tube strip, Applied Biosystems*) koje sam potom stavila u termociklički amplifikator *GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems)* prema uvjetima navedenim u tablici 4.

Tablica 4. Uvjeti za reakciju sekvenciranja.

	25 ciklusa			
96°C / 1 min	96°C / 10s	50°C / 5s	60°C / 4min	4°C / ∞

4.6.6. Pročišćavanje produkata reakcije sekvenciranja i postupak kapilarne elektroforeze

Prije analize kapilarnim sekvencerom reakciju sekvenciranja potrebno je pročistiti kako bi se uklonili neugrađeni ddNTP-ovi, neugrađene početnice, soli te druge molekule niske molekularne težine koje potječu iz same reakcije. Sekvencijske reakcije pročistila sam na način da sam na 5 μL reakcije dodala 0.5 μL otopine EDTA *(Sigma-Aldrich)*, 0.5 μL natrijevog acetata *(Sigma Aldrich*) te 15.5 μL apsolutnog etanola *(T.T.T.d.o.o.)*. Uzorke sam inkubirala 30 minuta na sobnoj temperaturi te potom centrifugirala na 2000 x g 30 minuta, pri sobnoj temperaturi. Nakon uklanjanja supernatanta, u idućem koraku dodala sam 20 μL 70% etanola te uzorke centrifugirala na 1650 x g 15 minuta, pri sobnoj temperaturi. Nakon uklanjanja supernatanata, uzorke sam otopila u 20 μL reagensa *HiDi formamid (Applied*

Biosystems). Uzorci pročišćeni na opisani način, te otopljeni u formamidu, spremni su za analizu kapilarnim sekvencerom. Takve uzorke nanijela sam na pločicu za automatsko uzorkovanje (engl. *autosampler*) te pokrenula proces kapilarne elektroforeze na instrumentu *ABI 310 (Applied Biosystems)*. Elektroforeza se odvijala pod sljedećim uvjetima: injekcijsko vrijeme (30s), trajanje kapilarne eletroforeze (50 min) i modul Seq POP4 Rapid (1 mL)E.md4, pri čemu je korišten polimer *POP-4 (Applied Biosystems)* i kapilara *310 Genetic Analyzer Capillary, 47 cm (Applied Biosystems)*. Nakon završenog sekvenciranja za početnu obradu prikupljenog signala koristila sam program *Sequencing analysis (Applied Biosystems)* te modul za analizu KB_310_POP4_BDTv1_36Rapid.mob. Analiza sekvenci podrazumijeva postupak "basecalling" koji uključuje automatsko sravnjivanje linija, identifikaciju signala, označavanje parova baza i normalizaciju osnovne linije (″baseline″). Nukleotidni slijedovi uređeni na opisani način spremni su za daljnju bioinformatičku obradu.

4.6.7. Bioinformatička analiza sekvenci i identifikacija mutacija povezanih s rezistencijom HIV-1 na antiretrovirusne lijekove

Nukleotidne slijedove ispitivanih sekvenci usporedila sam s nukleotidnim slijedom referentnog soja HIV-1, *HIV-1 HXB2* genom K03455. Za potrebe poravnavanja sekvenci i usporedbe s referentnim sojem HIV-1 koristila sam program Vector NTI software (*Thermo Fisher Scientific*). Uređene sekvence spremila sam u FASTA formatu te dalje koristila u svrhu analize mutacija povezanih s rezistencijom HIV-1 na antiretrovirusne lijekove, genotipizacije HIV-1 (određivanja podtipa) te filogenetske i filodinamičke analize. Dobivene sekvence pohranila sam u banci gena GeneBank, gdje su javno dostupne pod pristupnim brojevima MN163320 - MN163821 i MN187252.

Podtip sekvenci HIV-1 određen je pomoću nekoliko algoritama: Rega HIV-1 Subtyping Tool, verzija 3.0., jumping profile Hidden Markov Model i COntext-based Modelling for Expeditious Typing [134-136]. Ti algoritmi omogućavaju genotipizaciju HIV-1 bioinformatičkom analizom *pol* regije genoma virusa HIV-1 temeljenom na kombinaciji filogenetike i rekombinantnih metoda detekcije.

Primarnu rezistenciju na antiretrovirusne lijekove iz skupine NRTI/NNRTI i PI definirala sam kao prisutnost ‡ 1 mutacije iz skupine „surveillance drug resistance mutations“ (SDRM) [137]. Budući da na SDRM listi nisu klasificirane mutacije koje uzrokuju rezistenciju na InSTI, primarnu rezistenciju na InSTI definirala sam kao ‡ 1 mutacije prijavljenje u bazi mutacija algoritma Stanford HIVdb, verzija 8.8 [102]. U ovom

istraživanju analizirala sam primarnu rezistenciju virusa HIV-1 na sljedeće lijekove: NRTI (ABC, AZT, 3TC, FTC, TDF), NNRTI (DOR, EFV, ETR, NVP, RPV), PI (ATV/r, DRV/r, FPV/r, IDV/r, LPV/r, NFV, SQV/r, TPV/r) i InSTI (BIC, DTG, EVG, RAL). Kliničku značajnost identificiranih mutacija *pol* regije genoma HIV-1 interpretirala sam pomoću algoritma Stanford HIVdb, v.8.8 te prema smjernicama The International AIDS Society (IAS-USA) Drug Resistance Mutation Group [102, 138].

4.6.8. Sekvenciranje gena za virusnu HIV-RT, -PR i –IN tehnologijom NGS

U svrhu karakterizacije manjinskih virusnih varijanti prisutnih pri frekvencijama ispod razine detekcije tehnologije SS (<15%), nasumično sam odabrala 48 ispitanika za analizu *pol* regije genoma HIV-1 tehnologijom NGS. Dio *pol* regije genoma HIV-1 koja obuhvaća gen za virusnu PR i dio gena za virusnu RT (pozicija u referentnom *HIV-1 HXB2* genomu K03455, 2219-3753) te gen za virusnu IN (pozicija u referentnom *HIV-1 HXB2* genomu K03455, 4171-5183) sekvencirani su instrumentom *MiniSeq (Illumina)*. Sekvenciranje tehnologijom NGS i bioinformatička analiza podataka napravljena je u suradnji s Laboratorijem za naprednu genomiku, na Zavodu za molekularnu medicinu, Institut Ruđer Bošković. Postupak sekvenciranja tehnologijom NGS provela sam u nekoliko koraka opisanih u poglavljima 4.6.8.1. - 4.6.8.4.

4.6.8.1. Priprema HIV-1 jednolančane komplementarne DNA

HIV-1 RNA izolirala sam prema protokolu opisanom u poglavlju 4.6.3. Nakon izolacije, virusna RNA prepisana je u jednolančanu cDNA (engl. *single-stranded complementary DNA, ss cDNA*) postupkom reverzne transkripcije. Za postupak reverzne transkripcije koristila sam reagens *SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen)* i specifičnu početnicu UNINEF (pozicija u referentnom *HIV-1 HXB2* genomu K03455, 9605-9632; nukleotidni slijed, GCA CTC AAG GCA AGC TTT ATT GAG GCT T) [139]. U prvom koraku pomiješala sam 8 µL HIV-1 RNA sa 1 µL specifične početnice UNINEF i 1 µL mješavine nukleotida *dNTP mix*. Reakcijsku smjesu br. 1 inkubirala sam 5 minuta pri 65°C u termocikličkom amplifikatoru *GeneAmp PCR System 9600 (Applied Biosystems)* te potom ohladila na ledu 1 minutu. Tijekom inkubacije u termocikličkom amplifikatoru, priredila sam reakcijsku smjesu br. 2 ukupnog volumena 10 µL, koja je sadržavala 2 µL reakcijskog mixa *10x RT buffer*, 4 µL $MgCl_2$, 2 µL reagensa *DTT*, 1 µL enzima *RNaseOUT* i 1 µL enzima *SuperScript III RT*. Nakon završenog hlađenja reakcijske smjese br. 1, pomiješala sam 10 µL reakcijske smjese br. 1 i 2 te inkubirala uzorke ukupnog

volumena 20 μL u termocikličkom amplifikatoru *GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems)*. Reakcija se odvijala pri 50°C tijekom 50 minuta, nakon čega je slijedio postupak denaturacije pri 85°C tijekom 5 minuta. Posljednji korak reverzne transkripcije podrazumijeva uklanjanje neprepisane HIV-1 RNA, pri čemu sam koristila enzim *RNase H*, koji je dostupan unutar kompleta reagensa *SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen)*. U svaki uzorak dodala sam 1 μL enzima *RNase H*, a reakcija se odvijala pri 37°C tijekom 20 minuta u termocikličkom amplifikatoru *GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems)*. Konačni produkt je ss HIV-1 cDNA veličine 9632 parova baza.

4.6.8.2. Amplifikacija uzoraka višestrukim PCR-om

Prije samog postupka pripreme knjižnice za sekvenciranje, amplificirala sam ciljane regije od interesa, gene za HIV-PR, -RT i –IN, s višestrukim PCR-om (engl. *multiplex PCR*). U tu svrhu koristila sam reagens *ALLin Taq DNA Polymerase (highQu GmbH)*, vodu bez RNaza *(Invitrogen)* i 22 para specifičnih početnica, P1-P44 (tablica 5).

Tablica 5. Početnice za amplifikaciju gena za HIV-RT (kodoni 1-400), -PR (kodoni 1-99) i -IN (kodoni 1-288).

Početnice za umnažanje HIV-PR, -RT i -IN gena	Početnica, nukleotidni slijed (5'->3')	Pozicija u referentnom *HIV-1 HXB2* genomu K03455
Početnica 1	AGCCGATAGACAAGGAACTG	2219-2238
Početnica 2	GATAAAACCTCCAATTCCCCCTAT	2391-2414
Početnica 3	GCTCTATTAGATACAGGAGCAGAT	2316-2339
Početnica 4	CAATTATGTTGACAGGTGTAGGT	2486-2508
Početnica 5	GAAATCTGTGGACATAAAGCTATAGG	2445-2470
Početnica 6	GGCCATTGTTTAACTTTTGGG	2603-2623
Početnica 7	TAGCCCTATTGAGACTGTACCAG	2555-2577
Početnica 8	ACTGGAGTATTGTATGGATTTTCAG	2704-2728
Početnica 9	GTACAGAGATGGAAAAGGAAGG	2662-2683
Početnica 10	CGGGATGTGGTATTCCTAATTG	2820-2841

Početnica 11	GAGAACTCAAGACTTCTGGGAAG	2795-2817
Početnica 12	GTACTGATATCTAATCCCTGGTGTC	2963-2987
Početnica 13	ACAGTACTGGATGTGGGTGATG	2868-2889
Početnica 14	AGGCTCTAAGATTTTTGTCATGCTAC	3034-3059
Početnica 15	TGTGCTTCCACAGGGATG	2990-3007
Početnica 16	AGATGTTGTCTCAGCTCCTC	3156-3175
Početnica 17	GGATCTGACTTAGAAATAGGGC	3117-3138
Početnica 18	AGCACTATAGGCTGTACTGTC	3266-3286
Početnica 19	CATCAGAAAGAACCTCCATTCCTT	3210-3233
Početnica 20	CTTTAATCCCTGGGTAAATCTGACT	3351-3375
Početnica 21	CAATGACATACAGAAGTTAGTGG	3311-3333
Početnica 22	GGTCATAATACACTCCATGTACTG	3487-3510
Početnica 23	CACTAACAGAAGAAGCAGAGCTAG	3430-3453
Početnica 24	CCCTCATTCTTGCATATTTTCCTGT	3600-3624
Početnica 25	GGACATATCAAATTTATCAAGAGCC	3559-3583
Početnica 26	ACCATGTTTCCCATGTTTCC	3734-3753
Početnica 27	GAATTGGAGGAAATGAACAAGTAG	4171-4194
Početnica 28	GCTGACATTTATCACAGCTGG	4342-4362
Početnica 29	GGCTAGTGATTTTAACCTGCC	4295-4315
Početnica 30	CACTGGCTACATGAACTGCT	4454-4473
Početnica 31	GCATGGACAAGTAGACTGTAGT	4379-4400
Početnica 32	GTTTTTAGGCCATCTTCCTGC	4542-4555
Početnica 33	GAAACAGGGCAGGAAACAGC	4503-4522
Početnica 34	CTTGACTTTGGGGATTGTAGG	4654-4674
Početnica 35	CAGCAATTTCACCGGTGCT	4583-4601
Početnica 36	GATGAATACTGCCATTTGTACTGC	4752-4775

Početnica 37	GGTAAGAGATCAGGCTGAACAT	4721-4742
Početnica 38	GCTGTCCCTGTAATAAACCCG	4899-4919
Početnica 39	GGGGAAAGAATAGTAGACATAATAGCAAC	4818-4846
Početnica 40	GTCACTATTATCTTGTATTACTACTGCCC	4969-4997
Početnica 41	AAGCTCCTCTGGAAAGGTGAAG	4947-4968
Početnica 42	CCATGTTCTAATCCTCATCCTGT	5081-5103
Početnica 43	TGCCAAGAAGAAAAGCAAAGATC	5008-5030
Početnica 44	TGAGGGCTTTCATAGTGATGT	5163-5183

Svaki uzorak ss HIV-1 cDNA korišten je kao predložak za 4 multiplex PCR reakcije u kojima se umnaža dio *pol* regije HIV-1 genoma (pozicija u referentnom *HIV-1 HXB2* genomu K03455, 2219-3753 i 4171-5183). Budući da se radi o multiplex PCR reakciji, reakcijska smjesa sadržavala je 5 ili 6 parova specifičnih početnica koje su dizajnirane na način da imaju istu temperaturu taljenja (engl. *melting temperature*), što im omogućuje simultano vezanje na DNA kalup te se na taj način unutar jedne reakcije istovremeno događa amplifikacija više regija od interesa. Reakcijska smjesa ukupnog volumena 12.5 μL sadržavala je: 2.5 μL reakcijskog mixa *2x ALLin PCR Buffer*, 0.25 μL svake početnice P1-P12 (Reakcija 1); P13-P24 (Reakcija 2); P25-P34 (Reakcija 3); P35-P44 (Reakcija 4), 0.25 μL enzima *ALLin Taq DNA Polymerase*, 5 μL HIV-1 ss cDNA te 1.8 ili 2.2 μL vode (ovisno o broju početnica u reakcijskoj smjesi). Reakcijske smjese pripremala sam u PCR epruvetama zapremnine 0.2 mL *(PCR tubes, Eppendorf)* koje sam potom stavila u termociklički amplifikator *GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems)* prema uvjetima navedenim u tablici 6. Očekivana veličina produkata multiplex PCR reakcije bila je između 168 i 225 parova baza.

Tablica 6. Uvjeti multiplex PCR reakcije u postupku amplifikacije HIV-RT (kodoni 1-400), -PR (kodoni 1-99) i -IN (kodoni 1-288) gena.

<table>
<tr><td rowspan="4">95°C / 1 min</td><td>40 ciklusa</td><td rowspan="4">72°C / 7 min</td><td rowspan="4">4°C / ∞</td></tr>
<tr><td>95°C / 15 s</td></tr>
<tr><td>55°C / 15 s</td></tr>
<tr><td>72°C / 15 s</td></tr>
</table>

PCR produkte umnožene u 4 odvojene reakcije spojila sam u jedinstveni uzorak konačnog volumena 50 µL te potom sve uzorke prenijela u pločicu od 96 jažica *(MicroAmp Optical 96-well Reaction Plate, Applied Biosystems)*. Uzorci su pročišćeni pomoću magnetskih kuglica *Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter)* i 80%-tnog etanola. Na 50 µL PCR produkta dodala sam 90 µL magnetskih kuglica. Slijedila je inkubacija na tresilici *MPS-1 High-Speed Multi Plate Shaker (Biosan Laboratories)* na 2000 rpm tijekom 2 minute te potom 5 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon toga, pločicu s uzorcima stavila sam na magnetski stalak tijekom 2 minute, pričekala da se otopina razbistri te potom uklonila supernatant. Magnetske kuglice isprane su dva puta s 200 µL 80% etanola, te puštene da se osuše tijekom 4 minute na sobnoj temperaturi. Nakon što sam uzorke maknula s magnetskog stalka, na svaki od njih dodala sam 50 µL elucijskog pufera *EB 10 mM Tris-Cl (Qiagen)*. Slijedila je inkubacija na tresilici *MPS-1 High-Speed Multi Plate Shaker (Biosan Laboratories)* na 2000 rpm tijekom 2 minute. Pločicu sa uzorcima vratila sam na magnetski stalak, pričekala da se otopina razbistri te prenijela supernatane uzoraka u novu pločicu od 96 jažica *(MicroAmp Optical 96-well Reaction Plate, Applied Biosystems)*. Uzorci pročišćeni na opisani način spremni su za pripremu biblioteke za sekvenciranje.

4.6.8.3. Priprema biblioteke za sekvenciranje

Za pripremu knjižnice koristila sam reagens *NEBNext Ultra II DNA Library Prep Kit with Sample Purification Beads (New England BioLabs)*. Prvi korak u pripremi biblioteke je popravak DNA krajeva. Reakcijska smjesa ukupnog volumna 60 µL sadržavala je 7 µL reakcijskog mixa *NEBNext Ultra II End Prep Reaction Buffer*, 3 µL enzima *NEBNext Ultra II End Prep Enzyme Mix* i 50 µL pročišćenog PCR produkta. Uzorke sam inkubirala u termocikličkom amplifikatoru *GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems)* pri 20°C tijekom 30 minuta te potom pri 65°C tijekom 30 minuta.

U sljedećem koraku ligacije adaptora (kratki nukleotidni slijedovi sintetske DNA koji služe za vezanje indeksa), uzorcima ukupnog volumena 60 µL dodala sam 30 µL reakcijskog mixa *NEBNext Ultra II Ligation Master Mix*, 1 µL enzima *NEBNext Ligation Enhancer* i 2.5 µL adaptora *NEBNext Adaptor for Illumina*. Reakcijske smjese inkubirala sam u termocikličkom amplifikatoru *GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems)* pri 20°C tijekom 15 minuta, dodala 3 µL enzima *USER Enzyme* te ponovila inkubaciju u termocikličkom amplifikatoru pri 37°C tijekom 15 minuta.

Reakcijske smjese ukupnog volumena 96.5 µL pročišćene su s magnetskim kuglicama *NEBNext Sample Purification Beads* na način da sam svakom uzorku dodala 40 µl resuspendiranih magnetskih kuglica. Uzorci su inkubirani na tresilici *(MPS-1 High-Speed Multi Plate Shaker)* na 2000 rpm tijekom 2 minute te potom pri sobnoj temperaturi tijekom 5 minuta. Nakon toga, uzorke sam stavila na magnetski stalak tijekom 2 minute, pričekala da se otopina razbistri te potom prenijela supernatante u novu pločicu od 96 jažica *(MicroAmp Optical 96-well Reaction Plate, Applied Biosystems).* Na supernatante sam dodala 20 µl resuspendiranih magnetskih kuglica te ponovila postupak inkubacije, no u zadnjem koraku supernatane sam uklonila iz jažica, a magnetske kuglice koje su ostale u jažicama, pročistila sam dva puta s 200 µl 80% etanola na način opisan u poglavlju 4.6.8.2. U zadnjem koraku eluirala sam DNA s magnetskih kuglica koristeći 17 µl elucijskog pufera *EB 10 mM Tris-Cl (Qiagen)* te prenijela supernatante u novu pločicu s 96 jažica *(MicroAmp Optical 96-well Reaction Plate, Applied Biosystems).*

Supernatanti, koji sadrže pročišćene i adaptirane DNA fragmente od interesa, umnoženi su s konvencionalnim PCR-om. Reakcijska smjesa ukupnog volumena 50 µl sadržavala je 25 µl reakcijskog mixa *NEBNext Ultra II Q5 Master Mix*, 10 µl indeksa *Index/Universal Primer* i 15 µl supernatanta iz prethodnog koraka. Reakcijske smjese inkubirala sam u termocikličkom amplifikatoru *GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems)* prema uvjetima navedenim u tablici 7.

Tablica 7. PCR Amplifikacija pročišćenih i adaptiranih DNA fragmenata od interesa.

98°C / 30 s	**15 ciklusa**	65°C / 5 min	4°C / ∞
	98°C / 10 s		
	65°C / 75 s		

PCR produkte pročistila sam s magnetskim kuglicama *NEBNext Sample Purification Beads* na način da sam svakom uzorku dodala 45 µl resuspendiranih magnetskih kuglica. Uzorci su inkubirani na tresilici *MPS-1 High-Speed Multi Plate Shaker (Biosan Laboratories)* na 2000 rpm tijekom 2 minute te potom pri sobnoj temperaturi tijekom 5 minuta. Nakon toga uzorke sam stavila na magnetski stalak tijekom 2 minute, pričekala da se otopina razbistri te potom uklonila supernatante. Magnetske kuglice, koje su ostale u jažicama, pročišćene su dva puta sa 200 µl 80% etanola na način opisan u poglavlju 4.6.8.2. U zadnjem koraku eluirala sam DNA s magnetskih kuglica koristeći 33 µl elucijskog pufera *EB 10 mM Tris-Cl (Qiagen)*

te prenijela po 30 µl supernatanta u novu pločicu s 96 jažica *(MicroAmp Optical 96-well Reaction Plate, Applied Biosystems)*.

Distribuciju DNA fragmenata, te njihovu koncentraciju i čistoću, provjerila sam DNA elektroforezom na čipu pomoću reagensa *Agilent High Sensitivity Kit (Agilent Technologies).* DNA analiza na čipu omogućuje vrlo preciznu analizu NGS biblioteka i visoku rezoluciju produkata multiplex PCR reakcije. Na DNA čip sam aplicirala 9 µl obojenog matriks gela te potom nanijela 5 µl markera *High Sensitivity DNA marker*, 5 µl DNA ljestvi *High Sensitivity DNA ladder* te po 1 µl uzorka u predviđene pozicije na čipu. Elektroforeza se odvijala na instrumentu *Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies)*. Nakon završene provjere DNA fragmenata, slijedio je korak sekvenciranja.

4.6.8.4. Reakcija sekvenciranja i analiza podataka

Reakcija sekvenciranja odvijala se unutar instrumenta *MiniSeq (Illumina).* Za pripremu reakcijske smjese koristila sam kasetu s reagensima za sekvenciranje *MiniSeq MID output 300 cycles reagent kit (Illumina).* Uzorke pročišćene u prethodnom koraku prikupila sam u skupni uzorak biblioteke (engl. *pooled libraries*) finalnog volumena 240 µl koji je sadržavao 5 µl svakog pojedonačnog uzorka (n=48). Skupni uzorak sam denaturirala kako bih dobila jednolančane DNA fragmente i aplicirala na protočnu stanicu (engl. *flow cell*), u kojoj se automatski odvija proces formiranja klastera i sekvenciranja. Proces formiranja klastera podrazumijeva amplifikaciju DNA fragmenata kako bi signal, koji je potrebno očitati prilikom sekvenciranja, bio dovoljno snažan. Klaster predstavlja grupno mjesto specifičnog DNA fragmenta koji je uslijed amplifikacije formirao brojne kopije na određenom prostoru na protočnoj stanici. Za amplifikaciju klastera koristi se tehnologija „most“ (engl. *bridge*) PCR. Fragmenti DNA čiji krajevi sadrže specifične nukleotidne slijedove - adaptere se prilikom nanošenja na protočnu stanicu vežu na komplementarne nukleotidne slijedove prisutne na protočnoj stanici te stvaraju "mostove". Uslijed prisutnosti DNA polimeraze i ostalih komponenti potrebnih za amplifikaciju, dolazi do sinteze drugog lanca. Ubrzo na protočnoj stanici dolazi do procesa višestrukog umnažanja pojedinačnih DNA fragmenata, a nastale kopije identičnih DNA molekula prisutne su na istom prostoru i tvore klastere. Prilikom formiranja klastera kamera prikuplja rastući fluorescentni signal. Svaki od 4 nukleotida obilježen je sa različitim fluoroforom te na taj način dolazi do raspoznavanja ugradnje različitih nukleotida u rastući DNA lanac.

Nakon završetka sekvenciranja, dobivene podatke spremila sam u FASTQ format te analizirala u programu HyDRA Web [140]. Podatci su analizirani sa sljedećim postavkama: granica osjetljivosti (engl. *sensitivity threshold*) je postavljena na 5%, korištena je pokrivenost (engl. *target coverage*) od 10,000 čitanja, minimalna dubina čitanja (engl. *minimum read depth*) od 100 te minimalna kvaliteta varijanti (engl. *minimum variant quality*) Q30. Kliničku značajnost manjinskih virusnih varijanti definirala sam s razvojem virusološkog neuspjeha liječenja (porastom viremije u krvi) ispitanika unutar godinu dana od uzimanja inicijalne antiretrovirusne terapije.

4.6.9. Filogenetska i filodinamička analiza sekvenci dobivenih tehnologijom SS

Transmisijske klastere analizirala sam primjernom metode najveće vjerojatnosti. U tu svrhu korištene su sekvence *pol* regije genoma HIV-1 koja obuhvaća gene za virusnu PR i RT. U analizu sam uključila najučestalije podtipove identificirane u ovom istraživanju, odnosno analizirala sam 368 sekvenci podtipa B, 17 sekvenci podtipa A i 7 sekvenci podtipa C. Nukleotidne slijedove dobivene tehnologijom SS usporedila sam sa sekvencama objavljenim u bazi podataka BLAST (eng. *Basic Local Alignment Tool*) [141]. BLAST omogućuje pretragu i prikaz najsličnijih sekvenci u odnosu na sekvencu od interesa koju pretražitelj ubacuje u tražilicu. Nakon što sam unijela nukleotidne slijedove vlastitih sekvenci, odabrala sam 10 najsličnijih kontrolnih sekvenci po jednoj vlastitoj sekvenci te potom sve sekvence pohranila u FASTA formatu. Budući da je dio ispitanika uključenih u istraživanje epidemiološki povezan, kontrolne sekvence su se djelomično preklapale. U konačnici, umjesto 3680 kontrolnih sekvenci podtipa B, 170 kontrolnih sekvenci podtipa A i 70 kontrolnih sekvenci podtipa C, nakon uklanjanja duplikata, ukupno sam uključila 667 kontrolnih sekvenci podtipa B, 104 kontrolne sekvence podtipa A te 62 kontrolne sekvence podtipa C.

Za izradu filogenetskog stabla potrebno je bioinformatički urediti sekvence koje se analiziraju. Višestruka sravnjenja sekvenci napravila sam pomoću CLUSTAW algoritma, dostupnog u Bioedit programu, verzija 7.0.5.3 [142]. Potom sam sravnjene sekvence ručno uredila na način da sam uklonila loše očitane početke i krajeve, čija duljina je varirala između očitanih sekvenci. Nakon uređenja, sve sekvence bile su duljine 992 parova baza. Kako bi odredili točan smjer evolucije te bili sigurni da se protok genetičkih informacija u filogenetskom stablu kreće od korijena do svih završetaka, filogenetsko stablo je potrebno korjenovati. Filogenetska stabla ukorijenila sam na sljedeći način: tri referentne sekvence

podtipa A korištene su za ukorijenjivanje filogenetskih stabala podtipa B i C, dok su četiri referetne sekvence podtipa B korištene za ukorijenjivanje filogenetskog stabla podtipa A. Zbog mogućnosti utjecaja mutacija povezanih s rezistencijom na ishod filogenetske analize, uklonila sam ukupno 43 kodona iz nukleotidnih slijedova, od toga 18 kodona unutar gena za HIV-PR (kodoni 23, 24, 30, 32, 46, 47, 48, 50, 53, 54, 73, 76, 82, 83, 84, 85, 88, 90) te 25 kodona unutar gena za HIV-RT (kodoni, 41, 65, 67, 69, 70, 74, 75, 77, 100, 101, 103, 106, 115, 116, 151, 179, 181, 184, 188, 190, 210, 215, 219, 225, 230). Uklonjeni kodoni prijavljeni su u IAS-ovoj listi mutacija povezanih sa rezistencijom HIV-1 na antiretrovirusne lijekove [138]. Konačna veličina sekvenci skraćena je na 863 bp te dalje korištena pri filogenetskoj analizi. Filogenetsku analizu izradila sam u programu PhyML 3.0 koristeći pristup najveće vjerojatnosti s integriranim modelom AIC (engl. *Akaike Information Criterion*) te automatski postavljenim parametrima [143]. Transmisijski klaster definirala sam kao grupu od tri ili više sekvenci s aLRT (engl. *approximate likelihood ratio test value*) vrijednosti >0.90. U analizi sam razlikovala lokalne transmisijke klastere (s uključenih >75% lokalnih sekvenci) i miješane transmisijske klastere (sa uključenih <75% lokalnih sekvenci). Filogenetska stabla vizualizirala sam u programu Figtree, verzija 1.4.3 [144]. Taj program omogućuje pregled i uređenje stabala unosom različitih varijabli kao što su način transmisije HIV-1 (homoseksualni, heteroseksualni, nepoznat), prikaz SDRM mutacija uz pripadajuću sekvencu na stablu, prikaz geografskog podrijetla uzorkovanih sekvenci i sl.

Kako bih procijenila vrijeme najrecentnijeg pretka (tMRCA) transmisijskih klastera, provela sam filodinamičku MCMC analizu. U ovaj dio analize uključila sam 368 sekvenci podtipa B, budući da je taj podtip HIV-1 najzastupljeniji u ovom istraživanju (368/403, 91,3%). Obzirom da je filogenetska analiza pokazala visok postotak klasteriranja lokalnih sekvenci, odabrala sam 10 transmisijskih klastera s najvećim udjelom lokalnih sekvenci i provela pojedinačne MCMC analize. Prije filodinamičke analize, prisutnost rekombinacijskih događaja između sravnjenih sekvenci provjerila sam u RDP3 programu [145]. Kod četiri sekvence utvrđen je rekombinacijski događaj, a kod 8 sekvenci točan datum uzorkovanja nije bio poznat, stoga sam 12 sekvenci uklonila iz daljnje analize. Konačni uzorak sadržavao je 356 lokalnih sekvenci podtipa B i 571 kontrolnu sekvencu. Datum uzorkovanja svih lokalnih sekvenci definirala sam kao datum ulaska u kliničku skrb i prvog vađenja krvi ispitanika, dok točan datum uzorkovanja kontrolnih sekvenci nije bio poznat, stoga sam ga definirala kao sredinu godine uzorkovanja, prema podatcima dostupnim u bazi podataka Los Alamos HIV sequence database [146].

Optimalan model nukleotidne supstitucije odredila sam u MEGA 6 programu kao model HKY + I + G, no zbog nemogućnosti kalibracije tog modela, korišten je model HKY (Hasegawa-Kishino-Yano) [147]. Filodinamičku analizu izradila sam u programu BEAST2, verzija 2.1.3. [148]. Kao najvjerojatniji model evolucije odabran je koalescentni Bayesov horizontalni populacijski model (engl. *coalescent Bayesian skyline population model*) s relaksiranim log-normalnim molekularnim satom (engl. *relaxed log-normal clock model*) i HKY supstitucijskim modelom s 4 diskretne gamma stope i ne-varijantnim mjestima [149]. MCMC analiza postavljena je u duplikatnim MCMC lancima tijekom 500,000,000 generacija i stopom uzorkovanja od 0.001. Za ispitivanje konvergencije koristila sam parametar efektivne veličine uzorka (engl. *effective sample size, ESS*), koji je dostupan u programu Tracer, verzija v.1.7.1 [150]. Program automatski odbacuje prvih 10% rezultata (engl. *burn-in*), a vrijednosti ESS >200 uzela sam kao mjeru dobre konvergencije MCMC lanaca. U programu LogCombiner, dostupnom u paketu BEAST2, moguće je spojiti višestruke analize stabala u jedan konačni izlazni dokument. Program omogućuje i re-uzorkovanje (engl. *resample*) posteriorne distribucije na nižim frekvencijama u odnosu na originalnu BEAST analizu. Uz pomoć LogCombiner programa, spojila sam višestruke analize stabala i re-uzorkovala konačno stablo za 50,000 generacija. Potom sam stabla generirala u programu TreeAnnotator, dostupnom u paketu BEAST2, te vizualizirala u programu FigTree, verzija 1.4.3. [144]. Pouzdanost procjena tMRCA izrazila sam kao 95%-tni interval najveće posteriorne gustoće (engl, *highest posterior density, HPD*).

4.6.10. Statistička analiza

Podatke bolesnika statistički sam obradila koristeći distribuciju frekvencija za deskriptivnu analizu i medijane i interkvartilne vrijednosti (Q1, Q3) za varijable čija je distribucija odstupala od normale. Procjenu povezanosti između kategorijskih varijabli usporedila sam omjerom rizika (eng. *odds ratio, OR*) i 95%-tnim intervalom pouzdanosti (engl. *confidence interval, CI*) te sa Fisherovim egzaktnim testom ili hi-kvadrat testom. Za varijable sa ne-normalnom distribucijom koristila sam Mann–Whitney-Wilcoxon-ov test. Statistička analiza napravljena je uporabom SAS programa verzija 9.4 (SAS Institute, Cary, NC, USA). Značajnom razlikom definirala sam vrijednosti sa $p < 0.05$.

5. REZULTATI

5.1. Ispitanici

U razdoblju od siječnja 2014. do kraja prosinca 2017. godine ukupno je uključeno 436 prethodno neliječenih HIV-om zaraženih osoba u kliničku skrb Referentnog centra za HIV/AIDS pri Klinici za infektivne bolesti "Dr. Fran Mihaljević". Na osnovu kriterija opisanih u poglavlju 4.1., u ovo istraživanje uključene su 403 HIV-om zaražene osobe (403/436, 92,4%). Godina inicijalne dijagnoze bila je istovjetna s godinom ulaska u kliničku skrb kod 377 ispitanika (377/403, 93,5%). Među ispitanicima uključen je 381 muškarac (381/403, 94,5%), 21 žena (21/403, 5,2%) te jedna transseksualna osoba (1/403, 0,3%) (tablica 8). Većina ispitanika je ušla u kliničku skrb u kroničnoj fazi HIV-1 infekcije (322/403, 79,9%), no 81 ispitanik (81/403, 21,1%) je ušao u kliničku skrb u ranoj fazi HIV-1 infekcije. Medijan dobi ispitanika iznosio je 36.0 godina (29.0 - 43.0 godine). Medijan viremije (broj kopija HIV-1 RNA po mL plazme) iznosio je 4.9 $\log_{10}$ kopija/mL (4.4 - 5.5 $\log_{10}$ kopija/mL), a medijan apsolutnog broja CD4+ T-limfocita iznosio je 325.0 stanica/μL (142.0 - 515.5 stanica/μL) (tablica 8). Najčešći prijavljeni put prijenosa bio je spolni odnos između muškaraca (358/403, 88,8%), a drugi najčešći put prijenosa bio je spolni odnos između muškarca i žene (39/403, 9,7%). Kod 3 ispitanika utvrđen je prijenos putem i.v. primjene droge (3/403, 0,7%), a za ostale je rizični čimbenik nepoznat (tablica 8). Molekularna analiza distribucije HIV-1 podtipova pokazala je najvišu zastupljenost HIV-1 podtipa B u ispitivanoj kohorti, koji je identificiran kod 368 ispitanika (368/403, 91,3%). Preostalih 35 ispitanika bilo je zaraženo s non-B-podtipovima i CRF-ovima grupe M. Od toga, najčešći je bio podtip A1 (17/403, 4,2%), podtip C (7/403, 1,7%) i rekombinanta CRF02_AG (5/403, 1,2%). U tri ispitanika bioinformatički algoritmi korišteni u ovom istraživanju nisu mogli precizno utvrditi podtip te su ih definirali kao rekombinante podtipova A1-B (2/403, 0,5%) te A1-C (1/403, 0,2%) (tablica 8).

Tablica 8. Demografski, klinički i virusološki parametri prethodno neliječenih HIV-om zaraženih osoba uključenih u kliničku skrb tijekom razdoblja 2014. - 2017.

Ispitanici, n	403
Spol, n (%) Muškarci Žene Transseksualci	 381 (94,5) 21 (5,2) 1 (0,3)
Dob, n (%) 18-29 godina	 112 (27,8)

30-39 godina 40-49 godina ≥50 godina	156 (38,7) 86 (21,3) 49 (12,2)
Dob, medijan (Q1-Q3), godine	36 (29.0-43.0)
Rizični čimbenik za infekciju, n (%) Homoseksualni spolni odnos Heteroseksualni spolni odnos Injektiranje droga Nepoznato	 358 (88,8) 39 (9,7) 3 (0,7) 3 (0,7)
Mjesto stanovanja, n (%) Zagreb Izvan Zagreba	 200 (49,6) 203 (50,4)
Pretpostavljena zemlja zaraze, n (%) Hrvatska Izvan Hrvatske Nepoznatno	 348 (86,4) 52 (12,9) 3 (0,7)
Stadij infekcije pri ulasku u skrb, n (%) Recentna faza infekcije Kronična faza infekcije	 81 (20,1) 322 (79,9)
Utvrđen AIDS pri ulasku u skrb, n (%) Da Ne	 75 (18,6) 328 (81,4)
Godina HIV-1 dijagnoze, n (%) < 2014 2014 2015 2016 2017	 12 (3,0) 91 (22,6) 106 (26,3) 100 (24,8) 94 (23,3)
Godina ulaska u kliničku skrb, n (%) 2014 2015 2016 2017	 96 (23,8) 106 (26,3) 101 (25,1) 100 (24,8)
Ispitanici sa primarnom rezistencijom, n (%) Ukupan broj 2014 2015 2016 2017	 66 (16,4) 20 (20,8) 16 (15,1) 14 (13,9) 16 (16.0)
HIV podtip, n (%) A1 B C A1-B A1-C CRF02_AG CRF01_AE CRF06_cpx	 17 (4,2) 368 (91,3) 7 (1,7) 2 (0,5) 1 (0,3) 5 (1,2) 2 (0,5) 1 (0,3)
Broj CD4+ T-limfocita po µL, n (%)	

<100 101-250 251-400 401-600 >601	88 (21,8) 71 (17,6) 90 (22,3) 82 (20,3) 72 (17,9)
Broj CD4+ T-limfocita, medijan (Q1 i Q3), stanice po μL	325.0 (142.0-515.5)
Viremija u plazmi, medijan (Q1-Q3), log kopija HIV-1-RNA po mL	4.9 (4.4-5.5)

Q1, Q3: prva i treća kvartila; n: broj ispitanika.

5.2. Analiza mutacija povezanih s primarnom rezistencijom HIV-1 na antiretrovirusne lijekove

Analizom sekvenci *pol* regije genoma HIV-om zaraženih osoba utvrđena je prisutnost jedne ili više SDRM mutacija povezanih s primarnom rezistencijom HIV-1 na antiretrovirusne lijekove kod 66 ispitanika (66/403, 16,4%). Primarna rezistencija analizirana je kroz 4-godišnji period te je dokazana kod 20 ispitanika uključenih u kliničku skrb tijekom 2014. godine (20/96, 20,8%), 16 ispitanika uključenih u kliničku skrb tijekom 2015. godine (16/106, 15,1%), 14 ispitanika uključenih u kliničku skrb tijekom 2016. godine (14/101, 13,9%) te kod 16 ispitanika uključenih u kliničku skrb tijekom 2017. godine (16/100, 16,0%) (tablica 8).

5.2.1. Mutacije povezane s rezistencijom na inhibitore virusne RT

Mutacije povezane sa rezistencijom na inhibtore RT bile su najzastupljenije u ispitivanoj kohorti, ukupno su dokazane kod 64 ispitanika (64/66, 96,9%). Detektirani su različiti obrasci mutacija. Kod nekih ispitanika je primarna rezistencija na NRTI ili NNRTI bila uzrokovana jednom SDRM mutacijom, dok su kod drugih detektirane ≥2 SDRM mutacije uzrokujući na taj način rezistenciju na jednu (primarna rezistencija na NRTI ili NNRTI) ili tri klase antiretrovirusnih lijekova (primarna rezistencija na NRTI+NNRTI+PI).

U 46/66 ispitanika sa primarnom rezistencijom HIV-1 utvrđene su SDRM mutacije povezane s rezistencijom na NRTI (46/403, 11,4%). Mutacije, pronađene pojedinačno (21/46, 45,7%) ili u kombinaciji sa drugim mutacijama (25/46, 54,3%), su bile povezane s rezistencijom na NRTI (37/46, 80,4%) ili na NRTI+NNRTI+PI (9/46, 19,6%). Biološka značajnost pojedinačnih mutacija prikazana je u tablici 9, dok su detektirani obrasci mutacija i njihova klinička značajnost prikazani u tablici 12. Najčešća mutacija bila je T215S, povezana sa rezistencijom na TAM, a detektirana je kod 30 ispitanika (30/403, 7,4%). Mutacija T215D nađena je kod 7 ispitanika (7/403, 1,7%), a mutacije T215E i T215L u 3 ispitanika svaka

(3/403, 0,7%). Vrlo česta mutacija bila je i na poziciji 210 u genu za RT: leucin je zamijenjen sa triptofanom (L210W) u 11 ispitanika (11/403, 2,7%). Ta mutacija najčešće je detektirana kod ispitanika s mutacijom T215S (9/11, 81,8%), ali je detektirana i u jednog ispitanika s T215D mutacijom te u jednog ispitanika sa dokazanom rezistencijom na tri klase antiretrovirusnih lijekova (tablica 12). Mutacija na poziciji 41 u genu za RT nastaje zamjenom metionina s leucinom (M41L), a detektirana je kod 5 ispitanika (5/403, 1,2%). Mutacija M41L je kod svih 5 ispitanika nađena u kombinaciji sa drugim mutacijama, 3 ispitanika su ujedno nosili i T215D mutaciju, a 2 ispitanika su nosili T215L i K219R mutaciju svaki. Mutacije T69D i K219Q nađene su kod jednog ispitanika svaka (1/403, 0,3%), dok je mutacija M184MIV nađena kod ispitanika s dokazanom primarnom rezistencijom na tri klase antiretrovirusnih lijekova (tablica 12).

Tablica 9. Biološka značajnost mutacija povezanih sa rezistencijom na NRTI.

Pozicija kodona unutar RT gena	Divlji tip aminokiseline	Promijenjena aminokiselina u rezistentnom virusu	Biološka značajnost mutacije povezane s NRTI rezistencijom, prema algoritmu Stanford HIVdb	Broj ispitanika s detektiranom mutacijom
41	M	L	Mutacija iz skupine TAM-1. Najčešće se javlja u kombinaciji sa T215Y te uzrokuje visoku razinu rezistencije na AZT i d4T te nisku razinu rezistencije na ABC, ddI i TDF.	5/403
69	T	D	T69D je nepolimorfna mutacija koja smanjuje osjetljivost na ddI i d4T.	1/403
184	M	V/I	M184V/I mutacija uzrokuje visoku razinu rezistencije na 3TC i FTC i nisku razinu rezistencije na ABC i ddI, ali povećava osjetljivost na AZT, TDF i d4T.	1/403
210	L	W	Mutacija iz skupine TAM-1. Najčešće se javlja u kombinaciji sa M41L i T215Y te uzrokuje visoku razinu rezistencije na AZT i d4T te umjerenu do visoke razine rezistencije na ABC, ddI i TDF.	11/403
215	T	S	Mutacije iz skupine TAM-1. Predstavljaju revertante 215Y mutacije. Neliječeni bolesnici s ovim mutacijama imaju povećan rizik od virusološkog neuspjeha liječenja prilikom uzimanja AZT i d4T zbog mogućnosti reverzije mutacije u T215Y.	30/403
	T	D		7/403
	T	E		3/403
	T	L		3/403
219	K	Q	Mutacija iz skupine TAM-2. Najčešće se javlja u kombinaciji s	

			T215F/Y ili K70R te smanjuje osjetljivost na AZT i d4T	1/403
219	K	R	Mutacija iz skupine TAM-2 koja smanjuje osjetljivost na AZT.	1/403

RT: reverzna transkriptaza; NRTI: nukleozidni inhibitori reverzne transkriptaze; ABC: abakavir; AZT: zidovudin; ddI: didanozin; d4T: stavudin; FTC: emtricitabin; TDF: tenofovir; 3TC: lamivudin; TAM: timidin analogne mutacije.

Mutacije povezane s rezistencijom na NNRTI detektirane su kod 27 ispitanika (27/403, 6,7%). Pronađene su pojedinačno kod 18 ispitanika (18/27, 66,6%) ili u kombinaciji s drugim mutacijama, uzrokujući rezistenciju na NRTI+NNRTI+PI (9/46, 19,6%). Biološka značajnost pojedinačnih mutacija prikazana je u tablici 10, dok su detektirani obrasci mutacija i njihova klinička značajnost prikazani u tablici 12. Najčešća mutacija povezana s rezistencijom na NNRTI bila je na poziciji 101 gdje je lizin zamijenjen s glutaminskog kiselinom (K101E) te je utvrđena kod 15 ispitanika (15/403, 3,7%). Druga najčešća mutacija bila je K103N, a nastala je zamjenom lizina s asparaginom kod 9 ispitanika (9/403, 2,2%). Ta mutacija je nađena kod 8 ispitanika koji su ujedno nosili i L100I mutaciju (8/403, 1,9%) (tablica 12). Mutacija G190A nađena je kod dva ispitanika (2/403, 0,5%), dok su mutacije Y181C, G190E i P225PH detektirane kod jednog ispitanika svaka (1/403, 0,3%) (tablica 10).

Tablica 10. Biološka značajnost mutacija povezanih s rezistencijom na NNRTI.

Pozicija kodona unutar RT gena	Divlji tip aminokiseline	Promijenjena aminokiselina u rezistentnom virusu	Biološka značajnost mutacije povezane sa NNRTI rezistencijom, prema algoritmu Stanford HIVdb	Broj ispitanika s detektiranom mutacijom
100	L	I	L100I je nepolimorfna mutacija koja se najčešće javlja u kombinaciji s mutacijom K103N te uzrokuje umjerenu rezistenciju na DOR i ETR i visoku razinu rezistencije na EFV, RPV, NVP.	8/403
101	K	E	K101E je nepolimorfna mutacija koja uzrokuje nisku razinu rezistencije na DOR, EFV i ETR i umjerenu rezistenciju na NVP i RPV.	15/403
103	K	N	K103N je nepolimorfna mutacija koja uzrokuje visoku razinu rezistencije na EFV i NVP.	9/403
181	Y	C	Y181C je nepolimorfna mutacija koja uzrokuje umjerenu rezistenciju na EFV, ETR i RPV te visoku razinu rezistencije na NVP.	1/403
190	G	A	G190A je nepolimorfna mutacija koja uzrokuje umjerenu rezistenciju	2/403

			na EFV i visoku razinu rezistencije na NVP.	
190	G	E	G190E je nepolimorfna mutacija koja uzrokuje umjerenu rezistenciju na ETR te visoku razinu rezistencije na DOR, EFV, NVP i RPV.	1/403
225	P	PH	P225H je nepolimorfna mutacija koja se najčešće javlja u kombinaciji sa K103N mutacijom te sinergistički uzrokuju umjerenu rezistenciju na DOR, EFV i NVP.	1/403

RT: reverzna transkriptaza; NNRTI: ne-nukleozidni inhibitori reverzne transkriptaze; DOR: doravirin; ETR: etravirin; EFV: efavirenz; NVP: nevirapin; RPV: rilpivirin.

5.2.2. Mutacije povezane s rezistencijom na inhibitore virusne proteaze

Mutacije povezane s rezistencijom na PI detektirane su kod 10 ispitanika (10/403, 2,5%). Mutacije su uglavnom pronađene u kombinaciji s drugim mutacijama, uzrokujući rezistenciju na tri klase antretrovirusnih lijekova (NRTI+NNRTI+PI) kod 9 ispitanika (9/403, 2,2%). Biološka značajnost pojedinačnih mutacija prikazana je u tablici 11, dok su detektirani obrasci mutacija i njihova klinička značajnost prikazani u tablici 12. Mutacije I47V i V32I utvrđene su kod osam ispitanika (8/403, 1,9%), kod kojih je ujedno i dokazana rezistencija na tri klase antiretrovirusnih lijekova. Od osam ispitanika s primarnom rezistencijom na tri klase lijekova kod 4 je obrazac SDRM mutacija bio: (NRTI) L210W, T215D +(NNRTI) L100I, K103N + (PI) V32I, I47V; kod 3 ispitanika je obrazac SDRM mutacija bio: (NRTI) L210W, T215E + (NNRTI) L100I, K103N + (PI) V32I, I47V, a kod jednog ispitanika: (NRTI) T215D, M184MIV + (NNRTI) L100I, K103N + (PI) V32I, I47V (tablica 12). Uz to, kod jednog ispitanika s primarnom rezistencijom na tri klase antiretrovirusnih lijekova utvrđena je mutacija I84V koja je bila dio sljedećeg obrasca SDRM mutacija: (NRTI) M184MIV, L210W, T215S + (NNRTI) K101E, Y181C, G190A, P225PH + (PI) I84V. Mutacija na poziciji 46, uzrokovana zamjenom metionina s izoleucinom (M46I), utvrđena je kod samo jednog ispitanika kojemu je ujedno utvrđena rezistencija samo na PI (1/403, 0,3%) (tablica 11).

Tablica 11. Biološka značajnost mutacija povezanih s rezistencijom na PI.

Pozicija kodona unutar PR gena	Divlji tip aminokiseline	Promijenjena aminokiselina u rezistentnom virusu	Biološka značajnost mutacije povezane sa PI rezistencijom, prema algoritmu Stanford HIVdb	Broj ispitanika s detektiranom mutacijom
32	V	I	V32I je nepolimorfna mutacija koja smanjuje osjetljivost na sve PI osim SQV/r.	8/403

46	M	I	M46I je nepolimorfna mutacija koja u prisutnosti drugih mutacija smanjuje osjetljivost na sve IDV/r, NFV, FPV/r, LPV/r i ATV/r.	1/403
47	I	V	I47V je nepolimorfna mutacija koja smanjuje osjetljivost na FPV/r, ATV/r, IDV/r, LPV/r, TPV/r i DRV/r.	8/403
84	I	V	I84V je nepolimorfna mutacija koja uzrokuje nisku razinu rezistencije na DRV/r, umjerenu rezistenciju na LPV/r i TPV/r te visoku razinu rezistencije na ATV/r, FPV/r, IDr, NFV and SQV/r.	1/403

PR: proteaza; PI: inhibitori proteaze; ATV: atazanavir; DRV: darunavir; FPV: fosamprenavir; IDV: indinavir; LPV: lopinavir; NFV: nelfinavir; SQV: sakvinavir; TPV: tipranavir: /r: lijek kombiniran s ritonavirom.

5.2.3. Mutacije povezane s rezistencijom na inhibitore virusne integraze

Primarna mutacija povezana sa rezistencijom na InSTI detektirana je kod samo jednog ispitanika (1/100, 1%) (tablica 12). Mutacija se nalazi na poziciji 140, a uzrokovana je zamjenom gvanina s alaninom (G140A). Radi se o nepolimorfnoj mutaciji koja u kombinaciji s Q148H/K/N/R mutacijama uzrokuje visoku razinu rezistencije na RAL i EVG te umjerenu rezistenciju na DTG i BIC. Uz to, kod tri ispitanika detektirane su sekundarne mutacije povezane s rezistencijom na InSTI, T97A (1/100, 1%), Q146QH (1/100, 1%), D232N (1/100, 1%). Te polimorfne mutacije javljaju se u 1% - 5% virusa kod prethodno neliječenih osoba. Pojedinačno imaju minimalan efekt na smanjivanje osjetljivosti na InSTI, ali u kombinaciji s primarnim mutacijama djeluju sinergistički i smanjuju osjetljivost na InSTI.

Tablica 12. Obrazac mutacija povezanih s rezistencijom na antiretrovirusne lijekove kod 66 prethodno neliječenih, HIV-om zaraženih osoba (2014. - 2017.)

Rizični čimbenik	Dob	HIV-1 podtip	NRTI mutacije	NNRTI mutacije	PI mutacije	InSTI mutacije	Klinička značajnost mutiranog soja, prema IAS smjernicama	Klinička značajnost mutiranog soja, prema algoritmu Stanford HIVdb
MSM	26	B	T215D	K103N, L100I	V32I, I47V	N	Klinička rezistencija	Umjerena do visoka razina rezistencije
MSM	35	B	T215D	K103N, L100I	V32I, I47V	N	Klinička rezistencija	Umjerena do visoka razina rezistencije
MSM	23	B	T215D	K103N, L100I	V32I, I47V	N	Klinička rezistencija	Umjerena do visoka razina rezistencije
MSM	23	B	T215E	K103N, L100I	V32I, I47V	/	Klinička rezistencija	Umjerena do visoka razina rezistencije
MSM	29	B	T215D	K103N, L100I	V32I, I47V	N	Klinička rezistencija	Umjerena do visoka razina rezistencije
MSM	30	B	T215D	K103N, L100I	V32I, I47V	N	Klinička rezistencija	Umjerena do visoka razina rezistencije
MSM	37	B	T215E	K103N, L100I	V32I, I47V	N	Klinička rezistencija	Umjerena do visoka razina rezistencije
MSM	42	B	T215E	K103N, L100I	V32I, I47V	N	Klinička rezistencija	Umjerena do visoka razina rezistencije
MSM	36	B	M184MIV, L210W, T215S	K101E, Y181C, G190A, P225PH	I84V	N	Klinička rezistencija	Umjerena do visoka razina rezistencije
MSM	32	B	M41L, T215L	/	/	/	Klinička rezistencija	Niska do umjerena razina rezistencije
MSM	40	B	M41L, T215L	/	/	/	Klinička rezistencija	Niska do umjerena razina rezistencije
MSM	54	B	M41L, T215L	/	/	/	Klinička rezistencija	Niska do umjerena razina rezistencije
MSM	20	B	L210W, T215S	/	/	N	Klinička rezistencija	Niska do umjerena razina rezistencije
MSM	21	B	L210W, T215S	/	/	N	Klinička rezistencija	Niska do umjerena razina rezistencije
MSM	21	B	L210W, T215S	/	/	N	Klinička rezistencija	Niska do umjerena razina rezistencije
MSM	24	B	T215S, L210W	/	/	N	Klinička rezistencija	Niska do umjerena razina rezistencije
MSM	24	B	L210W, T215S	/	/	N	Klinička rezistencija	Niska do umjerena razina rezistencije
MSM	29	B	L210W,	/	/	/	Klinička rezistencija	Niska do umjerena razina

			T215S					rezistencije
MSM	39	B	L210W, T215S,	/	/	/	Klinička rezistencija	Niska do umjerena razina rezistencije
MSM	42	B	L210W, T215S	/	/	/	Klinička rezistencija	Niska do umjerena razina rezistencije
MSM	47	B	L210W, T215S	/	/	/	Klinička rezistencija	Niska do umjerena razina rezistencije
MSM	41	B	T215S	/	/	N	Osjetljiv	Niska razina rezistencije
MSM	33	B	T215S	/	/	N	Osjetljiv	Niska razina rezistencije
MSM	20	B	T215S	/	/	N	Osjetljiv	Niska razina rezistencije
MSM	38	B	T215S	/	/	N	Osjetljiv	Niska razina rezistencije
MSM	39	B	T215S	/	/	N	Osjetljiv	Niska razina rezistencije
MSM	22	B	T215S	/	/	N	Osjetljiv	Niska razina rezistencije
MSM	25	B	T215S	/	/	N	Osjetljiv	Niska razina rezistencije
MSM	26	B	T215S	/	/	N	Osjetljiv	Niska razina rezistencije
MSM	26	B	T215S	/	/	N	Osjetljiv	Niska razina rezistencije
MSM	32	B	T215S	/	/	N	Osjetljiv	Niska razina rezistencije
MSM	33	B	T215S	/	/	N	Osjetljiv	Niska razina rezistencije
MSM	35	B	T215S	/	/	N	Osjetljiv	Niska razina rezistencije
MSM	37	B	T215S	/	/	N	Osjetljiv	Niska razina rezistencije
MSM	37	B	T215S	/	/	N	Osjetljiv	Niska razina rezistencije
MSM	37	B	T215S	/	/	N	Osjetljiv	Niska razina rezistencije
MSM	43	B	T215S	/	/	N	Osjetljiv	Niska razina rezistencije
MSM	47	B	T215S	/	/	N	Osjetljiv	Niska razina rezistencije
MSM	53	B	T215S	/	/	N	Osjetljiv	Niska razina rezistencije
MSM	62	B	T215S	/	/	N	Osjetljiv	Niska razina rezistencije
MSM	56	B	T215S	/	/	N	Osjetljiv	Niska razina rezistencije
MSM	21	B	/	K101E	/	N	Klinička rezistencija	Niska do umjerena razina rezistencije
MSM	30	B	/	K101E	/	N	Klinička rezistencija	Niska do umjerena razina rezistencije
MSM	44	B	/	K101E	/	N	Klinička rezistencija	Niska do umjerena razina rezistencije
MSM	37	B	/	K101E	/	N	Klinička rezistencija	Niska do umjerena razina rezistencije

MSM	40	B	/	K101E	/	N	Klinička rezistencija	Niska do umjerena razina rezistencije
MSM	46	B	/	K101E	/	N	Klinička rezistencija	Niska do umjerena razina rezistencije
MSM	48	B	/	K101E	/	N	Klinička rezistencija	Niska do umjerena razina rezistencije
MSM	48	B	/	K101E	/	N	Klinička rezistencija	Niska do umjerena razina rezistencije
MSM	54	B	/	K101E	/	/	Klinička rezistencija	Niska do umjerena razina rezistencije
MSM	54	B	/	K101E	/	/	Klinička rezistencija	Niska do umjerena razina rezistencije
MSM	59	B	/	K101E	/	/	Klinička rezistencija	Niska do umjerena razina rezistencije
MSM	71	B	/	K101E	/	/	Klinička rezistencija	Niska do umjerena razina rezistencije
MSM	52	B	/	K101E	/	/	Klinička rezistencija	Niska do umjerena razina rezistencije
MSM	47	B	/	K101E	/	/	Klinička rezistencija	Niska do umjerena razina rezistencije
MSM	28	B	/	K103N	/	N	Klinička rezistencija	Visoka razina rezistencije
MSM	44	C	/	K103N	/	N	Klinička rezistencija	Visoka razina reizstencije
HETERO	28	B	L210W, T215D	/	/	N	Klinička rezistencija	Niska do umjerena razina rezistencije
MSM	45	B	K219R, M41L	/	/	N	Klinička rezistencija	Niska razina rezistencije
MSM	47	B	M41L, T215D	/	/	N	Klinička rezistencija	Niska do umjerena razina rezistencije
MSM	52	B	K219Q	/	/	N	Klinička rezistencija	Moguća niska razina rezistencije
MSM	29	B	/	G190A	/	N	Klinička rezistencija	Niska do umjerena razina rezistencije
MSM	25	B	/	G190E	/	/	Osjetljiv	Umjerena do visoka razina rezistencije
MSM	41	A1	/	/	M46I	/	Klinička rezistencija	Moguća niska razina rezistencije
MSM		B	T69D	/	/	/	Osjetljiv	Osjetljiv
MSM	26	B	/		/	G140A	Osjetljiv	Niska do umjerena razina rezistencije

MSM: spolni odnos između muškaraca; HETERO: spolni odnos između muškarca i žene; NRTI: nukleozidni inhibitori reverzne transkriptaze; NNRTI: nenukleozidni inhibitori reverzne transkriptaze; PI: inhibitori proteaze; InSTI: inhibitori integraze; N: rezistencija nije rađena.

5.3. Klinička interpretacija detektiranih obrazaca mutacija povezanih s primarnom rezistencijom HIV-1 na antiretrovirusne lijekove

Klinička interpretacija detektiranih obrazaca SDRM mutacija napravljena je analizom sekvenci *pol* regije HIV-1 genoma pomoću algoritma Stanford HIVdb verzija 8.8 te prema IAS-USA smjernica. Prema Stanford algoritmu, sve SDRM mutacije detektirane u ovom istraživanju bile su klinički značajne, osim mutacije T69D. Prema IAS smjernicama, većina detektiranih SDRM mutacija bila je klinički značajna, osim T69D, T215S, K219R, G190E i G140A mutacija. Obrasci detektiranih mutacija te njihova klinička značajnost kod 66 prethodno neliječenih HIV-om zaraženih osoba prikazani su u tablici 12.

IAS smjernice ne dodjeljuju jačinu kojom mutacije mogu utjecati na razvoj rezistencije, nego predlažu jedinstven popis mutacija povezanih s primarnom rezistencijom HIV-1 na antiretrovirusne lijekove. Algoritam Stanford HIVdb dodjeljuje pet razina rezistencije: osjetljiv (engl. *susceptible,* S), moguća razina rezistencije (engl. *possible resistance,* PR), niska razina rezistencije (engl. *low-level resistance,* LR), umjerena rezistencija (engl. *intermediate resistance,* IR), visoka razina rezistencije (engl. *high-level resistance,* HR). Program također dodjeljuje svakoj mutaciji i jačinu kojom može utjecati na smanjenu osjetljivost na lijek. Raspon se kreće: 0-5x (S), 5-10x (IR), 10-15x (LR), 15-45x (IR) i 45-60x (HR).

Prema algoritmu Stanford HIVdb, ispitanik s detektiranim obrascem SDRM mutacija: (NRTI) T215D + (NNRTI) L100I, K103N + (PI) V32I, I47V ima smanjenu osjetljivost mutiranog virusa na sve klase antiretrovirusnih lijekova. Mutacija I47V smanjuje osjetljivost na PI: ATV/r 10x, DRV/r 10x, FPV/r 35x, IDV/r 15x, LPV/r 15x, NFV 20x i TPV/r 30x, dok na SQV/r nema učinak. Mutacija V32I smanjuje osjetljivost na ATV/r 15x, DRV/r 15x, FPV/r 30x, IDV/r 15x, LPV/r 15x, NFV 15x i TPV/r 5x, dok na SQV/r nema učinak. Njihovo sinergističko djelovanje također ima utjecaj na smanjenje osjetljivosti na PI pa tako zajedno smanjuju osjetljivost za 5x kod svih klasa PI, osim kod SQV/r i TPV/r. U konačnici zbroj njihova djelovanja višestruko smanjuje osjetljivost na ATV/r 30x, DRV/r 30x, FPV/r 70x, IDV/r 35x, LPV/r 35x, NFV 40x i TPV/r 35x, dok na SQV/r nemaju zajednički učinak. Mutacija T215D smanjuje osjetljivost na NRTI: ABC 5x, AZT 20x i TDF 5x, a na FTC i 3TC nema učinak. Mutacija L100I smanjuje osjetljivost na NNRTI: DOR 15x, EFV 60x, ETR 30x, NVP 60x, RPV 60x. Mutacija K103N smanjuje osjetljivost NNRTI: EFV 60x, NVP 60x, dok na druge NNRTI nema učinak. Njihovo sinergističko djelovanje smanjuje osjetljivost na DOR 15x, dok na druge NNRTI nemaju zajednički učinak. Ukupan zbroj njihova učinka na smanjenje osjetljivosti na NNRTI iznosi: DOR 30x, EFV 120x, ETR 30x, NVP 120x, RPV 60x (slika 14).

Mutation Scoring: RT

NRTI	ABC	AZT	FTC	3TC	TDF
T215D	5	20	0	0	5
Total	5	20	0	0	5

NNRTI	DOR	EFV	ETR	NVP	RPV
L100I	15	60	30	60	60
L100I + K103N	15	0	0	0	0
K103N	0	60	0	60	0
Total	30	120	30	120	60

Mutation Scoring: PR

PI	ATV/r	DRV/r	FPV/r	IDV/r	LPV/r	NFV	SQV/r	TPV/r
V32I	15	15	30	15	15	15	0	5
V32I + I47V	5	5	5	5	5	5	0	0
I47V	10	10	35	15	15	20	0	30
Total	30	30	70	35	35	40	0	35

Slika 14. Primjer kliničke interpretacije obrasca SDRM mutacija: (NRTI) T215D + (NNRTI) L100I , K103N + (PI) V32I + I47V. Preuzeto i prilagođeno: https://hivdb.stanford.edu/hivdb/by-mutations/report/.

Ispitanik s detektiranim obrascem mutacija: (NRTI) M184IV, L210W, T215S + (NNRTI) L100I, K103N + (PI) I84V inficiran je sa mutiranim virusom koji ima smanjenu osjetljivost na sve klase antiretrovirusnih lijekova. Mutacija I84V smanjuje osjetljivost na PI: ATV/r 60x, DRV/r 15x, FPV/r 60x, IDV/r 60x, LPV/r 30x, NFV 60x, SQV/r 60X i TPV/r 30x. Mutacija M184V smanjuje osjetljivost na NRTI: ABC 15X, FTC 60X, 3TC 60X, dok na AZT i TDF povećava osjetljivost 10x. Mutacija L210W smanjuje osjetljivost na NRTI: ABC 5x, AZT 15x i TDF 5x, dok na FTC i 3TC nema učinak. Mutacija T215S smanjuje osjetljivost na NRTI: ABC 5x, AZT 20x i TDF 5x, a na FTC i 3TC nema učinak. Mutacije L210W i T215S djeluju sinergistički te zajedno smanjuju učinak na ABC, AZT i TDF 5x. Ukupan zbroj njihova učinka na smanjenje osjetljivosti na NRTI iznosi: ABC 30x, AZT 30x, FTC 60x, 3TC 60x i TDF 5x. Mutacija K101E smanjuje osjetljivost na NNRTI: DOR 15x, EFV 15x, ETR 15x, NVP 30x, RPV 45x. Mutacija Y181C smanjuje osjetljivost na NNRTI: DOR 10x, EFV 30x, ETR 30x, NVP 60x, RPV 45x. Mutacija G190A smanjuje osjetljivost na NNRTI: EFV 45x, ETR 10x, NVP 60x, RPV 15x, dok na DOR nema učinak. Mutacija P225H smanjuje osjetljivost na NNRTI: DOR 30x, EFV 45x i NVP 45x, a na ETR i RPV nema učinak. Mutacija K101E djeluje sinergistički sa Y181C mutacijom, smanjujući osjetljivost na EFV, ETR i NVP 5x, dok u kombinaciji s mutacijom G190A smanjuje osjetljivost na DOR i ETR 5x, a zajedno s mutacijom M184I smanjuje osjetljivost na RPV 15x. Mutacija Y181C u kombinaciji s mutacijom G190A smanjuje osjetljivost na DOR 20x te na ETR i RPV 10x. Ukupan zbroj njihova učinka na smanjenje osjetljivosti na NNRTI iznosi: DOR 80x, EFV 140x, ETR 75x, NVP 200x, RPV 130x (slika 15). Na opisani način ispitala sam učinak svih obrazaca mutacija utvrđenih u ovom istraživanju (tablica 13), no zbog međusobnog učinka pojedinačnih mutacija, prikazala sam konačan zbroj (engl. *mutation score*) njihova djelovanja.

Mutation Scoring: PR

PI	ATV/r	DRV/r	IDV/r	LPV/r	NFV	SQV/r	TPV/r
I84V	60	15	60	30	60	60	30
Total	60	15	60	30	60	60	30

Mutation Scoring: RT

NRTI	ABC	AZT	FTC	3TC	TDF
M184IV	15	-10	60	60	-10
L210W	5	15	0	0	5
L210W + T215S	5	5	0	0	5
T215S	5	20	0	0	5
Total	30	30	60	60	5

NNRTI	DOR	EFV	ETR	NVP	RPV
K101E	15	15	15	30	45
K101E + G190A	5	0	5	0	0
Y181C	10	30	30	60	45
Y181C + G190A	20	0	10	0	10
P225H	30	45	0	45	0
K101E + Y181C	0	5	5	5	0
G190A	0	45	10	60	15
K101E + M184I	0	0	0	0	15
Total	80	140	75	200	130

Slika 15. Primjer kliničke interpretacije obrasca SDRM mutacija: (NRTI) M184IV, L210W, T215S + (NNRTI) K101E, Y181C, G190A, P225PH + (PI) I84V. Preuzeto i prilagođeno: https://hivdb.stanford.edu/hivdb/by-mutations/report/.

Tablica 13. Interpretacija kliničke značajnosti obrazaca mutacija povezanih s primarnom rezistencijom HIV-1 primjenom algoritma Stanford HIVdb.

Obrasci mutacija	T215D/E, K103N, L100I, V32I, I47V	M184IV, T215D, K103N, L100I, V32I, I47V	M184IV, L210W, T215S, K101E, Y181C, P225PH, G190A, I84V	M41L, T215L	M41L, T215D	M41L, K219R	L210W, T215S	L210W, T215D	T215S	K101E	K103N	K219Q	G190A	G190E	M46I
NRTI, jačina učinka mutacija (razina rezistencije)															
ABC	5 (S)	20 (LR)	30 (IR)	15 (LR)	15 (LR)	10 (PR)	15 (LR)	15 (LR)	5 (S)	0 (S)	0 (S)	5 (S)	0 (S)	60 (HR)	0 (S)
AZT	20 (LR)	10 (PR)	30 (IR)	40 (IR)	40 (IR)	25 (LR)	40 (IR)	40 (IR)	20 (LR)	0 (S)	0 (S)	10 (PR)	45 (IR)	60 (HR)	0 (S)
FTC	0 (S)	60 (HR)	60 (HR)	0 (S)	0 (S)	0 (S)	0 (S)	0 (S)	0 (S)	0 (S)	0 (S)	0 (S)	10 (PR)	45 (IR)	0 (S)
3TC	0 (S)	60 (HR)	60 (HR)	0 (S)	0 (S)	0 (S)	0 (S)	0 (S)	0 (S)	0 (S)	0 (S)	0 (S)	60 (HR)	60 (HR)	0 (S)
TDF	5 (S)	-5 (S)	5 (S)	15 (LR)	15 (LR)	10 (PR)	15 (LR)	15 (LR)	5 (S)	0 (S)	0 (S)	5 (S)	15 (LR)	60 (HR)	0 (S)
NNRTI, jačina učinka mutacija (razina rezistencije)															
DOR	30 (IR)	30 (IR)	80 (HR)	0 (S)	0 (S)	0 (S)	0 (S)	0 (S)	0 (S)	15 (LR)	0 (S)	0 (S)	0 (S)	0 (S)	0 (S)
EFV	120 (HR)	120 (HR)	140 (HR)	0 (S)	0 (S)	0 (S)	0 (S)	0 (S)	0 (S)	15 (LR)	60 (HR)	0 (S)	0 (S)	0 (S)	0 (S)
ETR	30 (IR)	30 (IR)	75 (HR)	0 (S)	0 (S)	0 (S)	0 (S)	0 (S)	0 (S)	15 (LR)	0 (S)	0 (S)	0 (S)	0 (S)	0 (S)
NVP	120 (HR)	120 (HR)	200 (HR)	0 (S)	0 (S)	0 (S)	0 (S)	0 (S)	0 (S)	30 (IR)	60 (HR)	0 (S)	0 (S)	0 (S)	0 (S)
RPV	60 (HR)	60 (HR)	130 (HR)	0 (S)	0 (S)	0 (S)	0 (S)	0 (S)	0 (S)	45 (IR)	0 (S)	0 (S)	0 (S)	0 (S)	0 (S)
PI, jačina učinka mutacija (razina rezistencije)															
ATV/r	30 (IR)	30 (IR)	60 (HR)	0 (S)	0 (S)	0 (S)	0 (S)	0 (S)	0 (S)	0 (S)	0 (S)	0 (S)	0 (S)	0 (S)	10 (PR)
DRV/r	30 (IR)	30 (IR)	15 (LR)	0 (S)	0 (S)	0 (S)	0 (S)	0 (S)	0 (S)	0 (S)	0 (S)	0 (S)	0 (S)	0 (S)	0 (S)
FVP/r	70 (HR)	70 (HR)	60 (HR)	0 (S)	0 (S)	0 (S)	0 (S)	0 (S)	0 (S)	0 (S)	0 (S)	0 (S)	0 (S)	0 (S)	10 (PR)
IDV/r	35 (IR)	35 (IR)	60 (HR)	0 (S)	0 (S)	0 (S)	0 (S)	0 (S)	0 (S)	0 (S)	0 (S)	0 (S)	0 (S)	0 (S)	10 (PR)
LPV/r	35 (IR)	35 (IR)	30 (IR)	0 (S)	0 (S)	0 (S)	0 (S)	0 (S)	0 (S)	0 (S)	0 (S)	0 (S)	0 (S)	0 (S)	10 (PR)
NFV	40 (IR)	40 (IR)	60 (HR)	0 (S)	0 (S)	0 (S)	0 (S)	0 (S)	0 (S)	0 (S)	0 (S)	0 (S)	0 (S)	0 (S)	30 (IR)
SQV/r	0 (S)	0 (S)	60 (HR)	0 (S)	0 (S)	0 (S)	0 (S)	0 (S)	0 (S)	0 (S)	0 (S)	0 (S)	0 (S)	0 (S)	10 (PR)
TPV/r	35 (IR)	35 (IR)	30 (IR)	0 (S)	0 (S)	0 (S)	0 (S)	0 (S)	0 (S)	0 (S)	0 (S)	0 (S)	0 (S)	0 (S)	5 (S)

NRTI: nukleozidni inhibitori reverzni transkriptaze; ABC: abakavir; AZT: zidovudin; ddI: didanozin; d4T: stavudin; FTC: emtricitabin; TDF: tenofovir; 3TC: lamivudin; NNRTI: nenukleozidni inhibitori reverzne transkriptaze; DOR: doravirin; ETR: etravirin; EFV: efavirenz; NVP: nevirapin; RPV: rilpivirin; PI: inhibitori proteaze; ATV: atazanavir; DRV: darunavir; FPV: fosamprenavir; IDV: indinavir; LPV: lopinavir; NFV: nelfinavir; SQV: sakvinavir; TPV: tipranavir: /r: lijek kombiniran s ritonavirom; S: osjetljiv; PR: moguća rezistencija; LR: niska razina rezistencije; IR: umjerena rezistencija; HR: visoka razina rezistencije.

5.4. Analiza mutacija povezanih s primarnom rezistencijom HIV-1 na antiretrovirusne lijekove pomoću tehnologije NGS

Klinička rezistencija virusa HIV-1 na NRTI, NNRTI, PI i InSTI analizirana je primjenom tehnologije SS. Tehnologija SS ima prag detekcije virusnih varijanti >15%, odnosno manjinske virusne varijante prisutne <15% virusne populacije tehnologijom SS neće biti detektirane. S druge strane tehnologija NGS ima prag detekcije mutacijskih varijanti ≥1%, što znači da će većinu virusnih varijanti, uključujući i one zastupljene u 1% virusne populacije, moći detektirati. Manjinske HIV-1 varijante analizirane su NGS tehnologijom u 48 ispitanika, s time da sekvenciranje jednog uzorka nije uspjelo. Tehnologijom NGS sekvencirani su geni za HIV-PR, -RT i -IN, a budući da su ispitanicima sekvencirani isti geni i tehnologijom SS, cilj je bio usporediti rezultate sekvenciranja između te dvije platforme, njihovu međusobnu sukladnost te kliničku značajnost manjinskih virusnih varijanti. Primjenom tehnologije SS ukupno su detektirane 23 SDRM mutacije kod 12 ispitanika (12/47, 25,5%). Od 23 mutacije, 12 mutacija bilo je povezano s rezistencijom na NRTI, 6 mutacija sa rezistencijom na NNRTI, 4 mutacije s rezistencijom na PI te jedna mutacija s rezistencijom na InSTI. Primjenom tehnologije NGS ukupno su detektirane 34 SDRM mutacije kod 16 ispitanika (16/47, 34%). Od 34 mutacije, 19 mutacija bilo je povezano s rezistencijom na NRTI, 10 mutacija sa rezistencijom na NNRTI, a 5 mutacija s rezistencijom na PI.

Definicija potpune sukladnosti podrazumijevala je da obje platforme detektiraju isti obrazac SDRM mutacija. Potpuna sukladnost utvrđena je u 39 uzoraka, od toga u 31 uzorku (31/47, 65,9%) mutacije nisu bile detektirane niti s tehnologijom SS niti s tehnologijom NGS. U ostalih 8 uzoraka obrazac mutacija identificiran primjenom te dvije platforme međusobno se podudarao (tablica 14). Djelomična sukladnost nađena je u 2 uzorka, oba uzorka s obrascem mutacija povezanim sa rezistencijom na tri klase antiretrovirusnih lijekova detektiranim s tehnologijom SS: (NRTI) T215E + (NNRTI) L100I, K103N + (PI) V32I, I47V. Osim što su detektirani isti obrasci mutacija povezani s rezistencijom na tri klase antiretrovirusnih lijekova, NGS tehnologijom pronađene su još i dodatne mutacije povezane s rezistencijom na NRTI i NNRTI. U jednom uzorku nađena je dodatna NNRTI mutacija N348I, koja je bila prisutna pri frekvenciji od 28,9%. Ta mutacija nalazi se na poziciji kodona 348 i nije detektirana s tehnologijom SS budući da je prilikom genotipizacije HIV-a djelomično amplificiran gen za virusnu RT od kodona 1 - 240. Za analizu mutacija s tehnologijom NGS također je samo djelomičnio amplificiran gen za virusnu RT, ali kako je amplikon obuhvaćao kodone 1 - 400, tu je mutaciju bilo moguće detektirati. U drugom uzorku tehnologija NGS identificirala je, uz N348I mutaciju pri frekvenciji od 84,7%, i četiri dodatne mutacije. Radilo se o NRTI mutacijama T215S/D i NNRTI mutacijama Y181C/H, prisutnim pri frekvencijama ispod limita detekcije SS (tablica 14). Potpuna nesukladnost uočena je u 6 uzoraka, pri čemu je u 4 uzorka

nesukladnost pripisana manjinskoj virusnoj varijanti T215S koja je primjenom tehnologije NGS bila detektirana pri frekvencijama ispod limita detekcije tehnologije SS (tablica 14). U preostala dva uzorka nesukladnost je bila uočena zbog različitih obrazaca mutacija detektiranih sa tehnologijama NGS i SS. Primjenom tehnologije SS u jednom uzorku detektirana je G140A mutacija povezana s rezistencijom na InSTI. U istom uzorku tehnologijom NGS nije identificirana ista mutacija, već potpuno drugi obrazac mutacija. Detektirana je NRTI mutacija T215D, koja je bila prisutna pri frekvenciji iznad limita tehonologije SS te NRTI mutacija T215S i PI mutacija I47V, koje su bile prisutne pri frekvenciji ispod limita tehnologije SS. U drugom uzorku tehnologijom SS nađene su dvije mutacije povezane s rezistencijom na NRTI, M41L i K219R, dok je tehnologija NGS identificirala T215S mutaciju pri frekvenciji iznad limita tehnologije SS (tablica 14).

Ukupno je kod 8 ispitanika tehnologija NGS detektirala manjinske virusne varijante (tablica 14). Praćenjem viremija ispitanika sa detektiranim manjinskih virusnim varijantama uočeno je da nakon inicijalne visoke viremije prilikom prvog vađenja krvi, unatoč prisutnosti manjinskih virusnih varijanti, kod svih ispitanika je početna kombinacija antiretrovirusnih lijekova uspješno snizila viremiju u krvi te nije došlo do razvoja virusološkog neuspjeha liječenja (tablica 15).

Tablica 14. Usporedba obrazaca mutacija detektiranih sa tehnologijom SS i sa tehnologijom NGS.

Pristupni brojevi u banci gena NGS/SS	Sukladnost između platformi	Mutacije detektirane s tehnologijom SS	Mutacije detektirane s tehnologijom NGS	Frekvencija mutacija detektiranih s NGS, %	Pokrivenost čitanja baza tehnologijom NGS
E-MTAB 8153/MN163599	potpuna	T215S	T215S	63,1	20572
E-MTAB-8153/MN163471	potpuna	T215S	T215S	76,7	34493
E-MTAB-8153/MN163490	potpuna	T215S	T215S	16,7	2104
E-MTAB-8153/MN163505	potpuna	T215S	T215S	41,8	28781
E-MTAB-8153/MN163615	potpuna	T215S L210W	T215S L210W	21,6 36,6	1288 1288
E-MTAB-8153/MN163486	potpuna	T215S L210W	T215S L210W	21,4 15,8	3320 3320
E-MTAB-8153/MN163535	potpuna	K101E	K101E	18,5	36017
E-MTAB-8153/MN163622	potpuna	K101E	K101E	92,7	42749

E-MTAB-8153/MN163553	djelomična	V32I, I47V L100I K103N T215E	V32I I47V L100I K103N T215E N348I	17,9 43,1 32,1 32,6 38,3 28,9	1082 288 685 682 5147 236
E-MTAB-8153/MN163437	djelomična	V32I, I47V L100I K103N T215E	V32I, I47V L100I K103N T215E T215S T215D Y181C Y181H N348I	29,9 87,6 84,5 83,6 67,9 5,2 10,2 10,8 10,8 84,7	2385 1658 3673 3684 20732 20732 20732 59276 59276 2578
E-MTAB-8153/MN163561	nesukladnost	/	T215S	11,6	3637
E-MTAB-8153/MN163517	nesukladnost	/	T215S	10,1	3207
E-MTAB-8153/MN163504	nesukladnost	/	T215S	9,5	21941
E-MTAB-8153/MN163607	nesukladnost	/	T215S	9,4	7722
E-MTAB-8153/MN163766	nesukladnost	G140A	I47V T215D T215S	7,7 16,99 7,1	2162 9709 9709
E-MTAB-8153/MN163457	nesukladnost	K219R M41L	T215S	25,5	47783

SS: sekvenciranje po Sangeru; NGS: sekvenciranje nove generacije.

Tablica 15. Ispitivanje kliničke značajnosti manjinskih virusnih varijanti detektiranih tehnologijom NGS.

Manjiske virusne varijante	Viremija 1 (Prvo vađenje krvi)	Viremija 2 (Nakon incijalne terapije)	Viremija 3 (Nakon godinu dana od inicijalne terapije)	Inicijalna antiretrovirusna terapija	Klinička značajnost manjinskih virusnih varijanti
N348I	27,400	nedetektabilan	nedetektabilan	ABC+3TC+DTG	Nisu klinički značajne
T215S T215D Y181C Y181H N348I	154,200	nedetektabilan	nedetektabilan	ABC+3TC+DTG	Nisu klinički značajne
T215S	103,000	119	58	FTC+TDF+DTG	Nisu klinički značajne
T215S	250,891	158	320	FTC+TDF+DTG	Nisu klinički značajne
	194,345	208	<40	ABC+3TC+DTG	Nisu klinički

T215S					značajne
T215S	85,198	nedetektabilan	<40	ABC+3TC+DTG	Nisu klinički značajne
I47V T215D T215S	26,900	125	<40	FTC+TDF+EFV	Nisu klinički značajne
T215S	22,800	nedetektabilan	<40	TDF+FTC+RPV +DTG+DRV	Nisu klinički značajne

NGS: sekvenciranje nove generacije

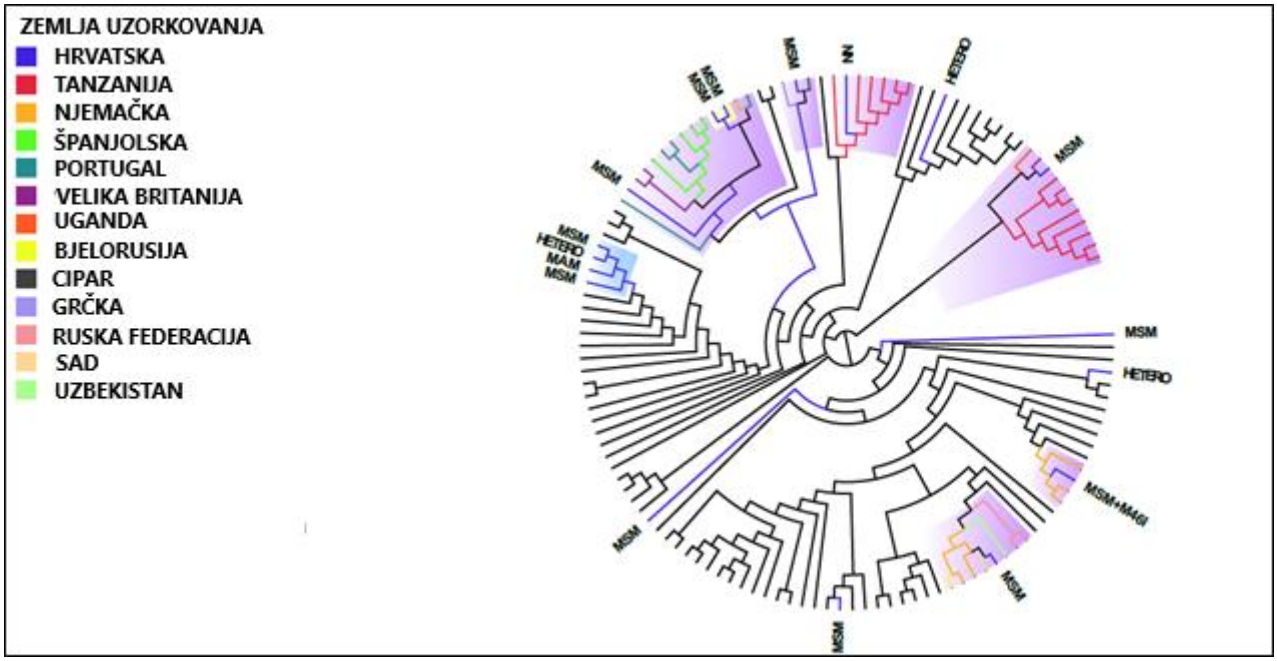
5.5. Filogenetska analiza

Filogenetska analiza je napravljena kako bi se ustvrdila epidemiološka povezanost HIV-om zaraženih osoba uključenih u skrb KZIB-a tijekom perioda 2014. - 2017. godine. U izradi filogenetskih stabala korišten je kladogramski tip taksonomskog dijagrama. U kladogramu nema informacija o evolucijskoj udaljenosti između predaka jer su vanjski čvorovi postavljeni na jednaku udaljenost, stoga takvo stablo predstavlja topologiju. Filogenetska stabla konstruirana su za 368 lokalnih sekvenci podtipa B, 17 lokalnih sekvenci podtipa A1 i 7 lokalnih sekvenci podtipa C. Filogenetska analiza identificirala je 54 transmisijska klastera, odnosno 45 transmisijskih klastera podtipa B, 7 transmisijskih klastera podtipa A1 i 2 transmisijska klastera podtipa C. Ukupno je 347 (347/403, 86,1%) ispitanika sudjelovalo u transmisijskim klasterima, pri čemu je velik broj ispitanika sudjelovao je u razvoju lokalnih transmisijskih klastera (246/347, 70,9%), od čega ih je 60 ušlo u kliničku skrb tijekom 2014. (60/246, 24,4%), 72 tijekom 2015. (72/246, 29,3%), 52 tijekom 2016. (52/246, 21,1%) i 62 tijekom 2017. (62/246, 25,2%) godine. Zbog malog broja uzoraka, sekvence koje su bioinformatičkim algoritmima Rega, COMET i jpHmm određene kao rekombinante (3/403, 0,7%) i CRF-ovi (8/403, 1,9%) nisu uključene u filogenetsku analizu.

5.5.1. Filogenetska analiza sekvenci podtipa A1

Filogenetskom analizom sekvenci podtipa A1 utvrđeno je da 7 ispitanika (7/17, 41.2%) pripada jednom lokalnom transmisijskom klasteru te jednom miješanom transmisijskom klasteru, koji je sadržavao sekvence uzorkovane u Hrvatskoj i izvan Hrvatske (slika 16). Transmisijski klasteri bili su određeni s aLRT vrijednosti >0.90. Unutar lokalnog transmisijskog klastera epidemiološki su bila povezana 4 ispitanika. Svi ispitanici bili su muškarci, najčešći put prijenosa bio je spolni odnos sa muškarcima (3/4, 75%), dok je jedan ispitanik prijavio spolni odnos između muškarca i žene (1/4, 25%). Ispitanici su ušli u kliničku skrb tijekom 2015. (3/4, 75%) i 2016. (1/4, 25%) godine. Unutar miješanog transmisijskog klastera, koji je sadržavao ukupno 14 sekvenci, nalazile su se 3 lokalne sekvence (3/14, 21,4%). Ispitanici su prijavili spolni odnos s muškarcima kao rizični čimbenik za infekciju, a ušli su u kliničku skrb tijekom 2015. (2/3, 66,6%) i 2017. (1/3, 33,3%) godine. Ostale sekvence uzorkovane su izvan Hrvatske (11/14, 79,6%), a podrijetlom su iz

zemalja: Španjolska (4/14, 28,6%), Portugal (4/14, 28,6%), Velika Britanija (2/14, 14,3%) i Njemačka (1/14, 7,1%).



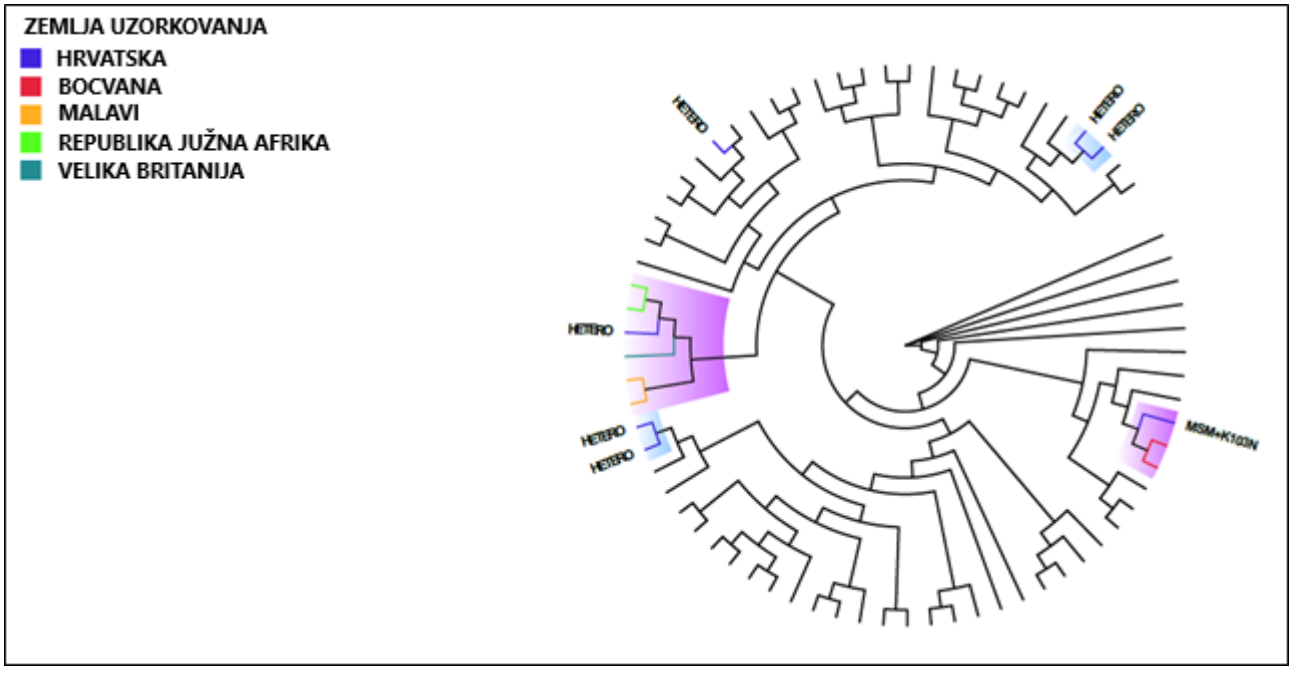
Slika 16. Prikaz filogenetskog stabla dobivenog pomoću Maximum Likelyhood pristupa koje sadržava lokalne sekvence podtipa A1 uzorkovane u Hrvatskoj, kontrolne sekvence uzorkovane izvan Hrvatske i njihovo geografsko podrijetlo. Grane koje prikazuju lokalne sekvence te kontrolne sekvence koje se nalaze unutar transmisijskih klastera obojene su prema njihovom geografskom podrijetlu, kao što je prikazano na legendi na slici 16. Grane kontrolnih sekvenci izvan transmisijskih klastera obojene su crno. Za sve lokalne sekvence vjerojatni put prijenosa prikazan je na stablu: MSM, spolni odnos između muškaraca; HETERO, spolni odnos između muškarca i žene; NN, nepoznat put prijenosa. Sekvenca koja nosi SDRM mutaciju M46I prikazana je na stablu uz rizični čimbenik. Lokalni transmisijski klasteri istaknuti su plavom bojom, dok su miješani transmisijski klasteri istaknuti ljubičastom bojom.

Na filogenetskom stablu identificirano je i dodatnih 5 miješanih transmisijskih klastera, od kojih je svaki sadržavao po jednu sekvencu uzorkovanu u Hrvatskoj (slika 16). Ti klasteri indiciraju da su se ispitanici vjerojatno zarazili izvan Hrvatske, ali nisu epidemiološki povezani niti s jednim drugim ispitanikom uključenim u ovo istraživanje. Od 5 ispitanika uključenih u miješane transmisijske klastere, 4 ih je prijavilo spolni odnos između muškaraca kao vjerojatni put prijenosa (4/5, 80%), dok za jednog ispitanika put prijenosa nije bio poznat (1/5, 20%). Ispitanici su ušli u kliničku skrb tijekom 2014. (3/5, 60%) i 2016. (2/5, 40%) godine. Najveći klaster sadržavao je 11 sekvenci, jednu uzorkovanu u Hrvatskoj (1/11, 9,1%), dok su druge bile uzorkovane u zemljama: Tanzanija (8/11, 72,7%), Uganda (1/11, 9,1%) i Velika Britanija (1/11, 9,1%). Epidemiološka povezanost jedne lokalne sekvence sa sekvencama uzorkovanim u Tanzaniji nađena je u još jednom transmisijskom klasteru koji je sadržavao ukupno 7 sekvenci. Treći miješani transmisijski klaster

sadržavao je 8 sekvenci koje su bile uzorkovane u zemljama: Ruska Federacija (2/8, 25%), Njemačka (2/8, 25%), Bjelorusija (1/8, 12,5%), SAD (1/8, 12,5%), Uzbekistan (1/8, 12,5%) i Hrvatska (1/8, 12,5%). Preostala dva miješana transmisijska klastera bila su manje veličine. Jedan je sadržavao 4 sekvence, od kojih su tri bile uzorkovane u Njemačkoj (3/4, 75%), dok je drugi sadržavao tri sekvence, od kojih je jedna bila uzorkovana u Grčkoj (1/3, 33,3%) te jedna u Cipru (1/3, 33,3%).

5.5.2. Filogenetska analiza sekvenci podtipa C

Analizom transmisijskih mreža lokalnih sekvenci podtipa C i pripadajućih kontrolnih sekvenci identificirana su 2 miješana transmisijska klastera i 2 lokalna transmisijska para (slika 17). Transmisijski klasteri i parovi bili su određeni sa aLRT vrijednosti >0.90. U oba transmisijska para ispitanici su bili muškarac i žena koji su prijavili spolni odnos između muškarca i žene kao vjerojatni rizični čimbenik za infekciju. Sekvence uzorkovane unutar jednog transmisijskog para potječu iz 2014. godine, dok su sekvence drugog transmisijskog para uzorkovane tijekom 2015. godine.



Slika 17. Prikaz filogenetskog stabla dobivenog pomoću Maximum Likelyhood pristupa koje sadržava lokalne sekvence podtipa C uzorkovane u Hrvatskoj, kontrolne sekvence uzorkovane izvan Hrvatske i njihovo geografsko podrijetlo. Grane koje prikazuju lokalne sekvence te kontrolne sekvence koje se nalaze unutar transmisijskih klastera obojene su prema njihovom geografskom podrijetlu, kao što je prikazano na legendi na slici 17. Grane kontrolnih sekvenci izvan transmisijskih klastera obojene su crno. Za sve lokalne sekvence vjerojatni put prijenosa prikazan je na stablu: MSM, spolni odnos između muškaraca; HETERO, spolni odnos između muškarca i žene. Sekvenca koja nosi SDRM mutaciju K103N prikazana je na stablu uz rizični čimbenik.

Transmisijski parovi lokalnih sekvenci istaknuti su plavom bojom, dok su miješani transmisijski klasteri istaknuti ljubičastom bojom.

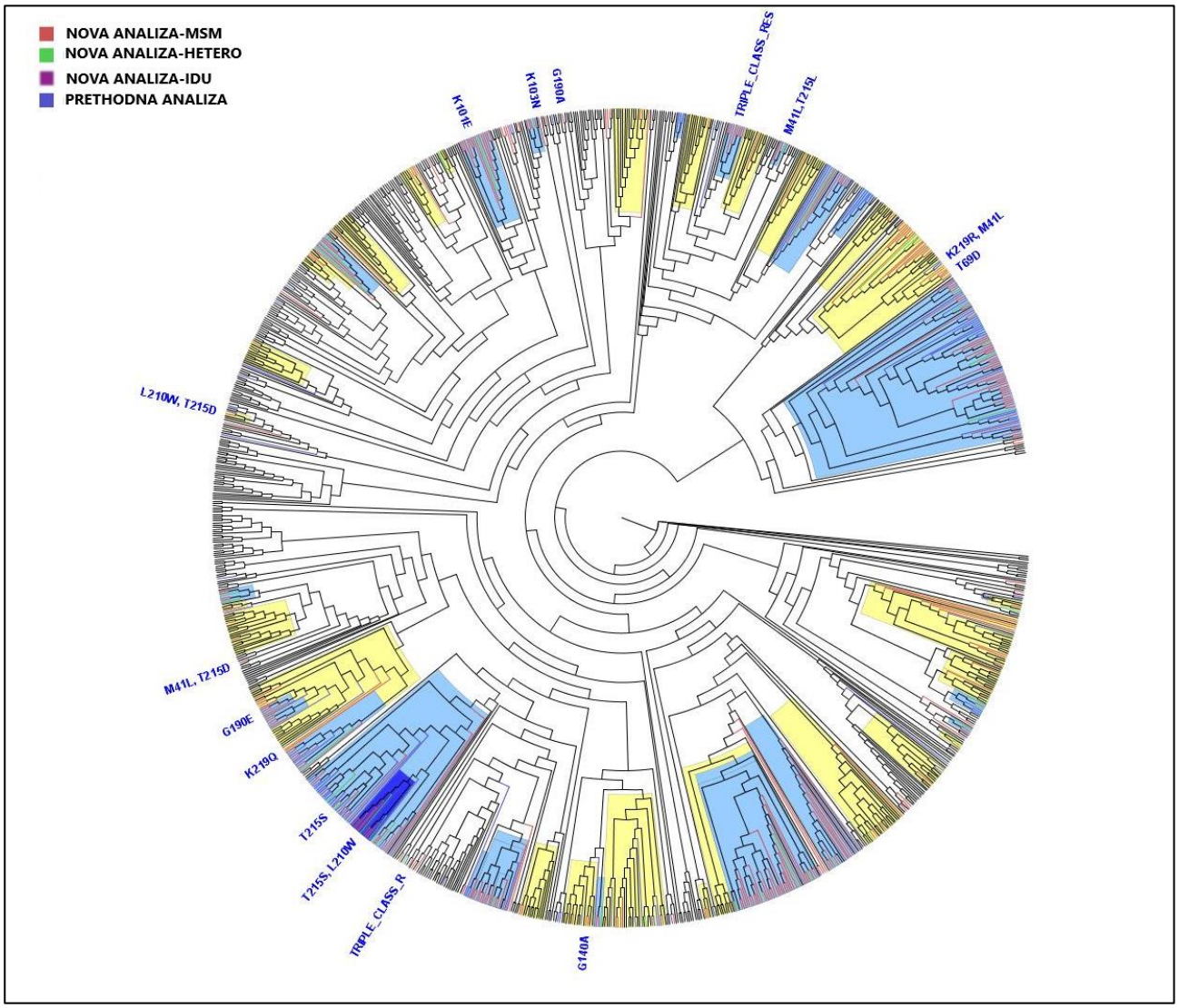
Miješani transmisijski klaster veličine 6 sekvenci sadržavao je jednu lokalnu sekvencu i 5 sekvenci uzorkovanih u zemljama: Republika Južna Afrika (2/6, 33,3%), Malavi (2/6, 33,3%) i Velika Britanija (1/6, 16,7%). Ispitanik čija sekvenca se nalazila unutar tog miješanog transmisijskog klastera prijavio spolni odnos između muškarca i žene kao vjerojatni čimbenik za infekciju, a ušao je u skrb tijekom 2017. godine. Drugi miješani transmisijski klaster sadržavao je jednu lokalnu sekvencu (1/3, 33,3%) koja je nosila K103N mutaciju te dvije sekvence uzorkovane u Bocvani (2/3, 66,7%). Ispitanik je prijavio spolni odnos s muškarcima kao vjerojatni rizični čimbenik za infekciju te je ušao u kliničku skrb tijekom 2017. godine.

5.5.3. Filogenetska analiza sekvenci podtipa B

U filogenetsku analizu sekvenci podtipa B bilo je uključeno >90% ispitanika iz analizirane kohorte te se ukupno sastojala od 368 lokalnih sekvenci uzorkovanih tijekom 2014. - 2017. godine (nova analiza), 107 lokalnih sekvenci uzorkovanih tijekom 2006. - 2008. godine (prethodna analiza) i 663 pripadajuće kontrolne sekvence. Sekvence iz prethodne analize uključene su radi determinacije idućih tipova transmisijskih klastera: (1) "ekspandirajućih" transmisijskih klastera, koji su sadržavali sekvence uzorkovane u novoj i prethodnoj analizi; (2) "novoformiranih" transmisijskih klastera, koji su sadržavali sekvence uzorkovane u novoj analizi; (3) "povijesnih" transmisijskih klastera, koji su sadržavali sekvence uzorkovane u prethodnoj analizi. Filogenetskom analizom utvrđena je pripadnost 329 ispitanika (329/368, 89%) u 23 lokalna i 23 miješana transmisijska klastera. Od 329 ispitanika, 78 ih je ušlo u kliničku skrb tijekom 2014. (78/329, 23,7%), 91 tijekom 2015. (91/329, 27,7%), 79 tijekom 2016. (79/329, 24,01%) i 81 tijekom 2017. (81/329, 24,6%) godine. Najčešći prijavljeni put prijenosa bio je spolni odnos između muškaraca (293/329, 89,1%), drugi najčešći prijavljeni put prijenosa bio je spolni odnos između muškarca i žene (30/329, 9,1%), kod 2 ispitanika utvrđen je prijenos putem i.v. primjene droge (2/329, 0,6%), dok je za 4 ispitanika put prijenosa bio nepoznat (4/329, 1,2%).

Transmisijski klasteri međusobno su se razlikovali po broju uključenih sekvenci, a raspon se kretao od 3 do 80 sekvenci po klasteru. Na filogenetskom stablu moguće je razlikovati 9 transmisijskih klastera s 3 sekvence (9/46, 19,6%), 3 transmisijska klastera s 4 sekvence (3/46, 6,5%), 23 transmisijska klastera s 5 do 15 sekvenci (23/46, 50%) i 11 transmisijskih klastera s ≥16 sekvenci (11/46, 23,9%) (slika 18). Ovisno o tipu transmisijskog klastera, detektirano je 28 novoformiranih, 16 ekspandirajućih te dva povijesna transmisijska klastera. Ispitanici uključeni u

28 novoformiranih transmisijskih klastera činili su transmisijsku mrežu od 10 lokalnih i 18 miješanih transmisijskih klastera.



Slika 18. Prikaz filogenetskog stabla dobivenog pomoću Maximum Likelyhood pristupa koje sadržava lokalne sekvence podtipa B uzorkovane u Hrvatskoj (prethodna i nova analiza) i pripadajuće kontrolne sekvence uzorkovane izvan Hrvatske. Grane koje prikazuju lokalne sekvence iz nove analize (2014. - 2017.) obojene su prema vjerojatnom putu prijenosa: crveno, spolni odnos između muškaraca (MSM); zeleno, spolni odnos između muškarca i žene (HETERO); ljubičasto, prijenos putem injektiranja droge (IDU). Grane koje prikazuju lokalne sekvence iz prethodne analize (2006. - 2008.) obojene su plavo, a grane koje prikazuju kontrolne sekvence obojene su crno. Sve detektirane mutacije prikazane su na filogenetskom stablu uz pripadajuće sekvence. Iznad transmisijskih klastera koji sadrže sekvence sa mutacijama: T215S; T215S+L210W; K101E; M41L+T215L zbog bolje preglednosti nije prikazan točan broj nađenih mutacija unutar klastera, već je iznad svakog klastera prikazana pripadajuća mutacija. Iznad transmisijskog klastera koji sadrži sekvence sa mutacijama T215D/E+L100I+K103N+V32I+I47V stoji naziv

TRIPLE_CLASS_RES. Lokalni transmisijski klasteri istaknuti su plavom bojom, dok su miješani transmisijski klasteri istaknuti žutom bojom.

U filogenetsku analizu podtipa B bile su uključene sve sekvence koje su nosile SDRM mutacije povezane sa primarnom rezistencijom HIV-1 (n=64). Aktivni prijenos određenih SDRM mutacija kroz promatrani period (2014. - 2017.) bio je utvrđen kod nekoliko transmisijskih klastera: (1) T215S (n=20) i pod-klaster T215S+L210W (n=9), (2) K101E (n=14), (3) V32I+I47V+T215D/E+L100I+K103N (n=8), (4) M41L+T215L (n=3) (slika 18). Kliničke, demografske i molekularne značajke tih transmisijskih klastera uspoređene su u tablici 16. Iako su u neke od tih klastera bile uključene i lokalne sekvence uzorkovane u prethodnoj analizi, u tablici 16 su prikazane značajke vezane za ispitanike koji su uključeni u ovo istraživanje. Najčešća mutacija utvrđena u prethodnoj analizi bila je NRTI mutacija T215S te je ta mutacija ostala i najprevalentnijom u novoj analizi. Filogenetska analiza pokazala je prisutnost velikog lokalnog transmisijskog klastera s T215S mutacijom koji je sadržavao sekvence iz prethodne i nove analize. Unutar tog klastera detektiran je i pod-klaster sa mutacijama T215S+L210W. Identificiran je i jedan lokalni transmisijski klaster s obrascem mutacija povezanim s rezistencijom na tri klase lijekova (NRTI+NNRTI+PI). Klaster je bio formiran od 8 sekvenci uzorkovanih u Hrvatskoj i jedne sekvence uzorkovane u Ujedinjenom Kraljevstvu. Sekvenca uzorkovana u Ujedinjenom Kraljevstvu nosila je slijedeći obrazac mutacija: (NRTI) T215Y + (NNRTI) L100I, K103N + (PI) V32I, M46L, I47A, V82A, dok su sekvence uzorkovane u Hrvatskoj nosile mutacije: (NRTI) T215E/D + (NNRTI) L100I, K103N + (PI) V32I, I47V. Na filogenetskom stablu bio je prisutan i jedan transmisijski par s vrlo kompleksnim obrascem mutacija. Jedna sekvenca uzorkovana je u Hrvatskoj sa slijedećim obrascem mutacija: (NRTI) M184MIV, T215S, L210W + (NNRTI) K101E, Y181C, G190A, P225PH + (PI) I84V, dok je druga bila uzorkovana u Srbiji te je nosila vrlo sličan obrazac mutacija: (NRTI) M184MIV, L210W, T215S + (NNRTI) K101E, Y181C, G190A, P225H + (PI) M46I, I84V. Transmisijski par bio je povezan s aLRT vrijednosti > 0.96, što pokazuje da su vrlo vjerovatno sekvence epidemiološki povezane. Za neke od SDRM mutacija nije utvrđen daljnji prijenos kroz analizirani period 2014. - 2017. Neke od tih sekvenci koje su nosile mutacije T69D, G190E, K219Q i K219R+M41L bile su dio velikih transmisijskih klastera, dok druge sekvence smutacijama K103N, G140A, G190A i M41L+T215D nisu bile dio transmisijskih klastera, a sekvenca s obrascem mutacija T215D+L210W formirala je transmisijski par s lokalnom sekvencom iz prethodne analize koja je nosila isti obrazac mutacija (slika 18).

Tablica 16. Kliničke, demografske i molekularne karakteristike lokalnih transmisijskih klastera koji su sudjelovali u aktivnom prijenosu SDRM mutacija tijekom razdoblja 2014. - 2017. godine

TK sa SDRM mutacijama	T215S	T215S +L210W	K101E	V32I+I47V+ T215D/E+ K103N+L100I	M41L +T215L
Ukupan broj ispitanika unutar TK, n (%)	20 (100)	9 (100)	14(100)	8 (100)	3 (100)
tMRCA, godina	1992	2009	2008	2008	2011
Spol, n (%) Muškarci Žene Transseksualci	 20 (100) / /	 9 (100) / /	 12 (85,7) 1 (5,9) 1 (5,9)	 8 (100) / /	 3 (100) / /
Rizični čimbenik za infekciju, n (%) Homoseksualni spolni odnos Heteroseksalni spolni odnos	 20 (100) /	 9 (100) /	 13 (92,9) 1 (7,1)	 8 (100) /	 3 (100) /
Pretpostavljena zemlja zaraze, n (%) Hrvatska Izvan Hrvatske Nepoznatno	 18 (90) 2 (10) /	 9 (100) / /	 12 (85,7) 1 (5,9) 1 (5,9)	 7 (87,5) 1 (12,5) /	 3 (100) /
Stadij HIV-1 infekcije pri ulasku u skrb, n (%) Recentna faza infekcije Kronična faza infekcije	 4 (20) 16 (80)	 / 9 (100)	 1 (7,1) 13 (92,9)	 2 (25) 6 (75)	 3 (100) /
Utvrđen AIDS pri ulasku u skrb, n (%) Da Ne	 6 (30) 14 (70)	 1 (11.1) 8 (89,9)	 4 (28,6) 10 (71,4)	 / 8 (100)	 / 3 (100)
Dob, medijan (Q1-Q3), godine	37.0 (29.0-40.0)	26.0 (21.8-26.5)	47.5 (43.0-52.5)	29.5 (25.3-35.5)	40.0 (36.0-47.0)

TK: transmisijski klaster; MSM: spolni odnos između muškaraca; tMRCA: procijenjeno vrijeme najrecentnijeg pretka; Q1, Q3: prva i treća kvartila; n: broj ispitanika.

5.5.4. Karakterizacija istaknutih transmisijskih klastera

Karakteristike 15 transmisijskih klastera s ≥ 5 lokalnih sekvenci prikazane su u tablici 17. Najveći klaster identificiran na filogenetskom stablu je ekspandirajući transmisijski klaster koji sadržava ukupno 80 sekvenci, od toga 77 sekvenci je uzorkovano u Hrvatskoj, 2 u Sloveniji, a jedna u Poljskoj. Ukupno je 20 sekvenci bilo uzorkovano u prethodnoj analizi (20/77, 26%), dok je 57 sekvenci uzorkovano u novoj analizi (57/77, 74%). Spolni odnos između muškaraca bio je najčešći prijavljeni put prijenosa (52/57, 91,2%), dok su 4 ispitanika (4/57, 7%) prijavila spolni odnos između muškarca i žene, a za jednog ispitanika put prijenosa bio je nepoznat (1/57, 1,8%). Ispitanici su ušli u kliničku skrb tijekom 2014. (16/57, 28,1%), 2015. (21/57, 36,8%), 2016. (9/57, 15,8%) i 2017. (11/57, 19,3%) godine. Klaster 2 je ekspandirajući transmisijski klaster koji je sadržava 53

sekvence, od čega su 52 uzorkovane u Hrvatskoj, a jedna u Ujedinjenom Kraljevstvu. Ukupno su 22 sekvence bile uzorkovane u prethodnoj analizi (22/52, 42,3%), dok je 30 sekvenci uzorkovano u novoj analizi (30/52, 57,7%). Glavna karakteristika ovog klastera je prisutnost SDRM mutacije T215S kod velikog broja sekvenci iz prethodne i nove analize. Čak 38 sekvenci nosilo je T215S mutaciju, od čega ih je 20 uzorkovano u novoj analizi. Unutar tog klastera moguće je izdvojiti pod-klaster, Klaster 12. Taj novoformirani klaster sadržava 11 sekvenci, od čega su 2 uzorkovane u prethodnoj analizi (2/11, 18,2%), a 9 u novoj analizi (9/11, 81,8%). Sekvence iz prethodne analize nosile su SDRM mutaciju T215S, dok su sekvence iz nove analize nosile su SDRM mutacije T215S+L210W. Spolni odnos između muškaraca bio je najčešći prijavljeni put prijenosa (24/30, 80%), a 6 ispitanika (6/30, 20%) je prijavilo spolni odnos između muškarca i žene kao vjerojatni čimbenik za infekciju. Ispitanici su ušli u kliničku skrb tijekom 2014. (10/30, 33,3%), 2015. (6/30, 20%), 2016. (6/30, 20%) i 2017. (8/30, 26,7%) godine. Klaster 3 je novoformirani transmisijski klaster koji sadržava 51 sekvencu, od čega je 40 sekvenci uzorkovano u Hrvatskoj, 8 u Poljskoj, 2 u Sloveniji, a jedna u SAD-u. Spolni odnos između muškaraca bio je najčešći prijavljeni put prijenosa (36/40, 90%), 3 ispitanika (3/40, 7,5%) prijavilo je spolni odnos između muškarca i žene, dok je jedan ispitanik (1/40, 2,5%) prijavio i.v. primjenu droga kao vjerojatni čimbenik za infekciju. Ispitanici su ušli u kliničku skrb tijekom 2014. (2/40, 5%), 2015. (10/40, 25%), 2016. (14/40, 35%) i 2017. (14/40, 35%) godine. Klaster 4 sadržava ukupno 46 sekvenci, od čega su 32 uzorkovane u Hrvatskoj, a 14 ih je uzorkovano u Njemačkoj. Hrvatske sekvence pripadale su prethodnoj (7/32, 21,9%) i novoj analizi (25/32, 78,1%). Dvije sekvence iz nove analize nosile su SDRM mutacije K219Q i G190E. Spolni odnos između muškaraca bio je jedini prijavljeni put prijenosa. Ispitanici su ušli u kliničku skrb tijekom 2014. (12/25, 48%), 2015. (5/25, 20%), 2016. (2/25, 8%) i 2017. (13/25, 52%) godine. Klaster 5 je ekspandirajući transmisijski klaster koji sadržava ukupno 33 sekvence, od čega je 27 sekvenci uzorkovano u Hrvatskoj, 4 u Njemačkoj, a jedna u Sloveniji. Ukupno su 3 sekvence bile uzorkovane u prethodnoj analizi (3/28, 10,7%), dok je 25 sekvenci uzorkovano u novoj analizi (25/28, 89,3%). Dvije sekvence iz nove analize nosile su SDRM mutacije T69D i M41L+K219R. Spolni odnos između muškaraca bio je najčešći prijavljeni put prijenosa (22/25, 88%), a 3 ispitanika (3/25, 12%) je prijavilo spolni odnos između muškarca i žene kao vjerojatni čimbenik za infekciju. Ispitanici su ušli u kliničku skrb tijekom 2014. (5/25, 20%), 2015. (5/25, 20%), 2016. (9/25, 36%) i 2017. (6/25, 24%) godine. Klaster 6 je ekspandirajući transmisijski klaster koji sadržava ukupno 22 sekvence, od čega je 21 sekvenca uzorkovana u Hrvatskoj, a jedna u Sloveniji. Hrvatske sekvence bile su uzorkovane tijekom prethodne (3/21, 14,3%) i nove analize (18/21, 85,7%). Svi ispitanici osim jednog su prijavili spolni odnos između muškaraca (17/18, 94,4%), a jedan (1/18, 5,6%) je prijavio spolni odnos između muškarca i žene kao vjerojatni čimbenik za infekciju. Ispitanici su ušli u kliničku skrb tijekom 2014. (4/18, 22,2%),

2015. (2/18, 11,1%), 2016. (2/18, 11,1%) i 2017. (10/18, 55,6%) godine. Klaster 7 je novoformirani transmisijski klaster koji sadržava ukupno 17 sekvenci, od čega ih je 13 uzorkovano u Hrvatskoj, 3 u Srbiji, a jedna u Sloveniji. Svi ispitanici osim jednog su prijavili spolni odnos između muškaraca (12/13, 92,3%), a jedan (1/13, 7,7%) je prijavio spolni odnos između muškarca i žene kao vjerojatni čimbenik za infekciju. Ispitanici su ušli u kliničku skrb tijekom 2014. (8/13, 61,5%), 2015. (1/13, 7,7%), 2016. (1/13, 7,7%) i 2017. (3/13, 23,1%) godine. Klaster 8 je isključivo lokalni, novoformirani transmisijski klaster koji sadržava ukupno 15 sekvenci, od čega ih 14 nosi K101E mutaciju. Svi ispitanici osim jednog su prijavili spolni odnos između muškaraca (14/15, 93,3%), a jedan (1/15, 6,7%) je prijavio spolni odnos između muškarca i žene kao vjerojatni čimbenik za infekciju. Ispitanici su ušli u kliničku skrb tijekom 2014. (8/15, 53,3%), 2015. (1/15, 6,7%), 2016. (1/15, 6,7%) i 2017. (5/15, 33,3%) godine. Klaster 9 je ekspandirajući transmisijski klaster koji sadržava ukupno 14 sekvenci, od čega je 12 uzorkovano u Hrvatskoj, jedna u Sloveniji i jedna u Ujedinjenom Kraljevstvu. Ukupno su 2 sekvence bile uzorkovane u prethodnoj analizi (2/12, 16,7%), dok je 10 sekvenci uzorkovano u novoj analizi (10/12, 83,3%). Svi ispitanici osim jednog su prijavili spolni odnos između muškaraca (9/10, 90%), a jedan (1/10, 10%) je prijavio spolni odnos između muškarca i žene kao vjerojatni čimbenik za infekciju. Ispitanici su ušli u kliničku skrb tijekom 2014. (2/10, 20%), 2015. (4/10, 40%), 2016. (1/10, 10%) i 2017. (3/10, 30%) godine. Klaster 10 je novoformirani transmisijski klaster koji sadržava ukupno 9 sekvenci, od čega je ih je 8 uzorkovano u Hrvatskoj, a jedna u Ujedinjenom Kraljevstvu. Sve sekvence nosile su SDRM mutacije povezane sa rezistencijom na tri klase lijekova (NRTI+NNRTI+PI). Sekvenca uzorkovana u Velikoj Britaniji nosila je sljedeći obrazac SDRM mutacija: (NRTI) T215Y + (NNRTI) L100I, K103N + (PI) V32I, M46L, I47A, V82A, dok su sekvence uzorkovane u Hrvatskoj nosile mutacije (NRTI) T215E/D + (NNRTI) L100I, K103N + (PI) V32I, I47V. Spolni odnos između muškaraca bio je jedini prijavljeni put prijenosa. Ispitanici su ušli u kliničku skrb tijekom 2014. (2/8, 25%), 2015. (3/8, 37,5%), 2016. (2/8, 25%) i 2017. (1/8, 12,5%) godine. Klaster 11 je ekspandirajući transmisijski klaster koji sadržava ukupno 30 sekvenci, od čega ih je 14 bilo uzorkovano u Hrvatskoj, a 16 u Sloveniji. Hrvatske sekvence pripadale su prethodnoj (8/14, 57,1%) i novoj analizi (6/14, 42,9%). Svi ispitanici prijavili su spolni odnos između muškaraca kao rizični čimbenik za infekciju, a ušli su u kliničku skrb tijekom 2015. godine. Klaster 13 je novoformirani transmisijski klaster koji sadržava 8 sekvenci uzorkovanih u Hrvatskoj. Najčešći prijavljeni put prijenosa bio je spolni odnos između muškaraca (5/8, 62,5%), jedan ispitanik (1/8, 12,5%) je prijavio spolni odnos između muškarca i žene, dok je za dva ispitanika put prijenosa bio nepoznat (2/8, 25%). Ispitanici su ušli u kliničku skrb tijekom 2015. (3/8, 37,5%), 2016. (2/8, 25%) i 2017. (3/8, 37,5%) godine. Od preostala dva transmisijska klastera Klaster 14 je ekspandirajući, a Klaster 15 novoformirani transmisijski klaster. Klaster 14 sadržava ukupno 24 sekvence, od čega ih je 10

uzorkovano u Hrvatskoj, 8 u Češkoj, 4 u Slovačkoj i 2 u Njemačkoj. Hrvatske sekvence bile su uzorkovane tijekom prethodne (2/10, 20%) i nove analize (8/10, 80%). Svi ispitanici prijavili su spolni odnos između muškaraca kao rizični čimbenik za infekciju, a ušli su u kliničku skrb tijekom 2015. (4/8, 50%), 2016. (3/8, 37,5%) i 2017. (1/8, 12,5%) godine. Klaster 15 sadržava 21 sekvencu, od čega ih je 5 uzorkovano u Hrvatskoj, a 16 u Sloveniji. Svi ispitanici osim jednog prijavili su spolni odnos između muškaraca kao vjerojatni čimbenik za infekciju (4/5, 80%), a jedan ispitanik (1/5, 20%) je prijavio spolni odnos između muškarca i žene. Svi ispitanici ušli su u kliničku skrb tijekom 2015. godine.

Tablica 17. Prikaz karakteristika 15 transmisijskih klastera s >5 lokalnih sekvenci.

TK, ukupan broj sekvenci, (n)	Sekvence uzorkovane u Hrvatskoj, n (%)	aLRT	Geografsko podrijetlo kontrolnih sekvenci	SDRM mutacije unutar TK, (n)	Tip TK	Ukupna analiza TK			Pojedinačna analiza TK		
						tMRCA, srednja vrijednost	tMRCA, medijan	tMRCA, 95% HPD	tMRCA, srednja vrijednost	tMRCA, medijan	tMRCA, 95% HPD
1 (80)	77 (96)	0.99	Poljska, Slovenija	/	Ekspandirajući	1998.3	1998.5	1994.1-2002.2	1998.5	1998.6	1994.7-2001.8
2 (53)	52 (98)	0.97	Ujedinjeno Kraljevstvo	T215S (38), T215S+L210W (9)	Ekspandirajući	1992.1	1992.3	1988.7-1997.1	1993.01	1992.9	1988.4-1997.9
3 (51)	40 (78)	0.91	Poljska, Slovenija, SAD	/	Novo-formirani	2003.3	2003.4	2006.6-2011.8	2003.8	2003.9	2006.6-2011.8
4 (46)	32 (70)	0.95	Njemačka	K219Q (1), G190E (1)	Ekspandirajući	1990.4	1990.9	1985.4 - 1995.1	1995.5	1995.6	1993.8-1996.9
5 (33)	27 (82)	0.94	Slovenija, Njemačka	M41L+K219R (1); T69D (1)	Ekspandirajući	1993.2	1993.3	1987.2-1999.7	1993.01	1992.9	1988.4-1997.9
6 (22)	21 (95)	0.90	Slovenija	/	Ekspandirajući	2005.3	2005.5	2001.9-2008.3	2004.7	2004.8	2001-9-2007.5
7 (17)	13 (76)	0.99	Srbija, Slovenia	/	Novo-formirani	2005.1	2005.4	2001.7-2008.1	2004.5	2004.7	2001.4-2007.1
8 (15)	15 (100)	0.94	/	K101E (14)	Novo-formirani	2008.7	2008.8	2005.8-2011.6	2009.1	2009.2	2006.7-2011.3
9 (14)	12 (85,7)	0.97	Slovenija, Ujedinjeno Kraljevstvo		Ekspandirajući	1996.2	1996.4	2002.7 – 1989.6	1998.3	1998.6	1992.8-2003.1
10 (9)	8 (89)	0.93	Ujedinjeno Kraljevstvo	V32I+I47V+T215D +K103N+ L100I (8)	Novo-formirani	2008.2	2008.1	2005.9-2010.6	2006.9	2007.1	2004.1-2009.7
11 (30)	14 (47)	0.99	Slovenija	/	Ekspandirajući	1992.3	1992.4	1986.7-1995.5	N	N	N

12 (11)	11 (100)	0.96	/	T215S (2), T215S+L210W (9)	Ekspandirajući	2009.1	2009.2	2006.6-2011.5	N	N	N
13 (8)	8 (100)	0.99	/	/	Novo-formirani	2007.2	2007.4	2002.3-2011.6	N	N	N
14 (24)	10 (42)	0.98	Češka, Slovačka, Njemačka	/	Ekspandirajući	1992.5	1992.2	1987.5-1998.1	N	N	N
15 (21)	5 (24)	0.99	Slovenija	/	Ekspandirajući	1995.7	1995.9	1992.1-1999.6	N	N	N

TK: transmisijski klaster; SDRM: mutacije iz skupine "Surveillance for drug resistance"; tMRCA: procijenjeno vrijeme najrecentnijeg pretka.

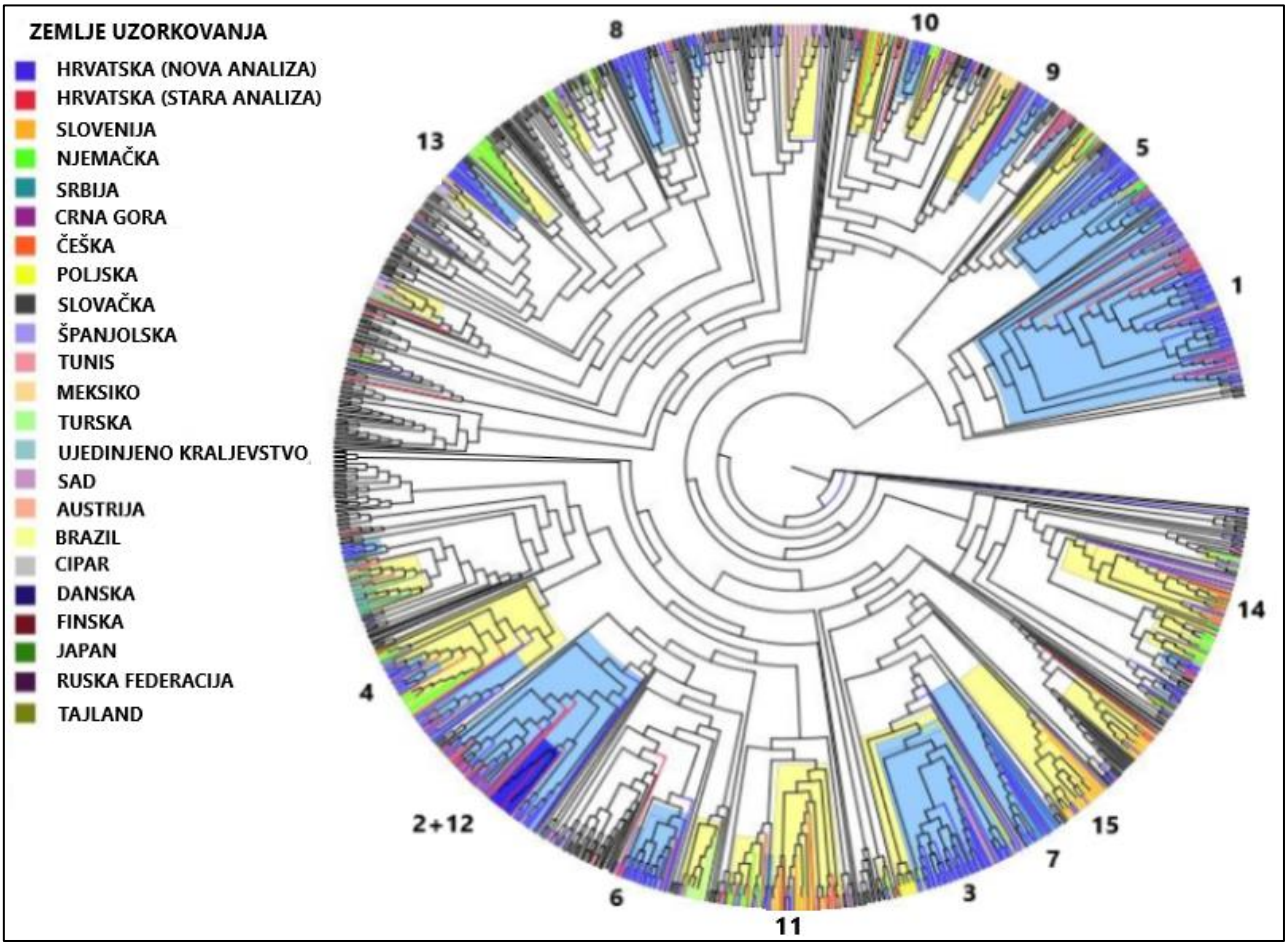
5.5.5. Analiza geografske distribucije sekvenci podtipa B

Radi boljeg razumijevanja lokalne epidemiologije HIV-1 infekcije, u filogenetsku analizu sekvenci podtipa B uvršteno je geografsko podrijetlo svih kontrolnih sekvenci koje su sudjelovale u transmisijskim klasterima. Od 663 kontrolne sekvence uključene u filogenetsku analizu, 239 ih je sudjelovalo u transmisijskim klasterima (239/663, 36,1%). Kontrolne sekvence uglavnom su bile uzorkovane u Njemačkoj (61/239, 25,5%), Sloveniji (52/239, 21,8%) i Srbiji (25/239, 10,5%). Ostale kontrolne sekvence uzorkovane su u Španjolskoj (15/239, 6,3%), SAD-u (15/239, 6,3%), Češkoj (14/239, 5,9%), Poljskoj (10/239, 4,2%), Meksiku (9/239, 3,8%), Crnoj Gori (8/239, 3,3%), Turskoj (8/239, 3,3%), Ujedinjenom Kraljevstvu (7/239, 2,9%), Slovačkoj (5/239, 2,1%), Tajlandu (3/239, 1,3%), Japanu (3/239, 1,3%), Rusiji (3/239. 1,3%), Tunisu (1/239, 0,4%) i Cipru (1/239, 0,4%) (slika 19). Od 329 lokalnih sekvenci podtipa B, 238 ih je sudjelovalo u lokalnim transmisijskim klasterima (238/329, 72,3%), a 86 u miješanim transmisijskim klasterima (86/329, 26,7%). Na filogenetskom stablu detektirana su 23 miješana transmisijska klastera. Većina miješanih klastera sadržavala je po jednu sekvencu uzorkovanu u Hrvatskoj (16/86, 18,6%), a po jedan klaster je sadržavao 4 (4/86, 4,7%), 3 (3/86, 3,5%) ili 2 (2/86, 2,3%) sekvence uzorkovane u Hrvatskoj. Sekvence unutar miješanih klastera bile su različitog geografskog podrijetla, a šest klastera sadržavalo je sekvence uzorkovane u Hrvatskoj i jednoj od idućih zemalja: Njemačka (klaster od 11 sekvenci, od čega je 10 uzorkovano u Njemačkoj), Slovenija (klaster od 10 sekvenci, od čega je 9 uzorkovano u Sloveniji), Srbija (dva klastera; klaster od 9 sekvenci, od čega je 8 uzorkovano u Srbiji; klaster od 3 sekvence, od čega su 2 uzorkovane u Srbiji), SAD (klaster od 15 sekvenci, od čega je 14 uzorkovano u SAD-u) i Meksiko (klaster od 10 sekvenci, od čega je 9 uzorkovano u Meksiku). Klasteri koji su bili su miješani sa sekvencama uzorkovanim u dvije ili više različitih zemalja prikazani su u tablici 18. Preostala četiri miješana transmisijska klastera sadržavala su 32 (32/86, 37,2%), 14 (14/86, 16,3%), 10 (10/86, 11,6%) i 5 (5/86, 5,8%) sekvenci uzorkovanih u Hrvatskoj, a njihove karakteristike te geografsko podrijetlo kontrolnih sekvenci objašnjeno je u tablici 17.

Tablica 18. Geografsko podrijetlo miješanih transmisijskih klastera sa sekvencama uzorkovanim u >2 zemlje.

	Zemlja uzorkovanja (broj sekvenci uključenih u transmisijski klaster)	Ukupan broj sekvenci
Klaster 1	Njemačka (6), Hrvatska (3), Srbija (3), Japan (1)	13
Klaster 2	Crna Gora (6), Njemačka (4), Hrvatska (1)	11
Klaster 3	Turska (8), Hrvatska (1), Rusija (1), Tajland (1)	11
Klaster 4	Španjolska (8), Hrvatska (1), Tunis (1)	10
Klaster 5	Srbija (6), Hrvatska (1), Slovenija (1), Rusija (1), Tajland(1)	10
Klaster 6	Njemačka (7), Hrvatska (1), Poljska (1), Cipar (1)	10
Klaster 7	Njemačka (2), Slovenija (2), Tajland (2), Hrvatska (1), Ujedinjeno Kraljevstvo (1), Ruska Federacija (1)	9

Klaster 8	Njemačka (4), Hrvatska (1), Slovenija (1), Češka (1), Slovačka (1)	8
Klaster 9	Hrvatska (4), Njemačka (3), Japan (1)	8
Klaster 10	Španjolska (5), Hrvatska (1), Slovenija (1)	7
Klaster 11	Njemačka (3), Španjolska (2), Hrvatska (1), Poljska (1)	7
Klaster 12	Hrvatska (2), Njemačka (2), Srbija (1), Ujedinjeno Kraljevstvo (1)	6
Klaster 13	Njemačka (2), Hrvatska (1), Japan (1)	4

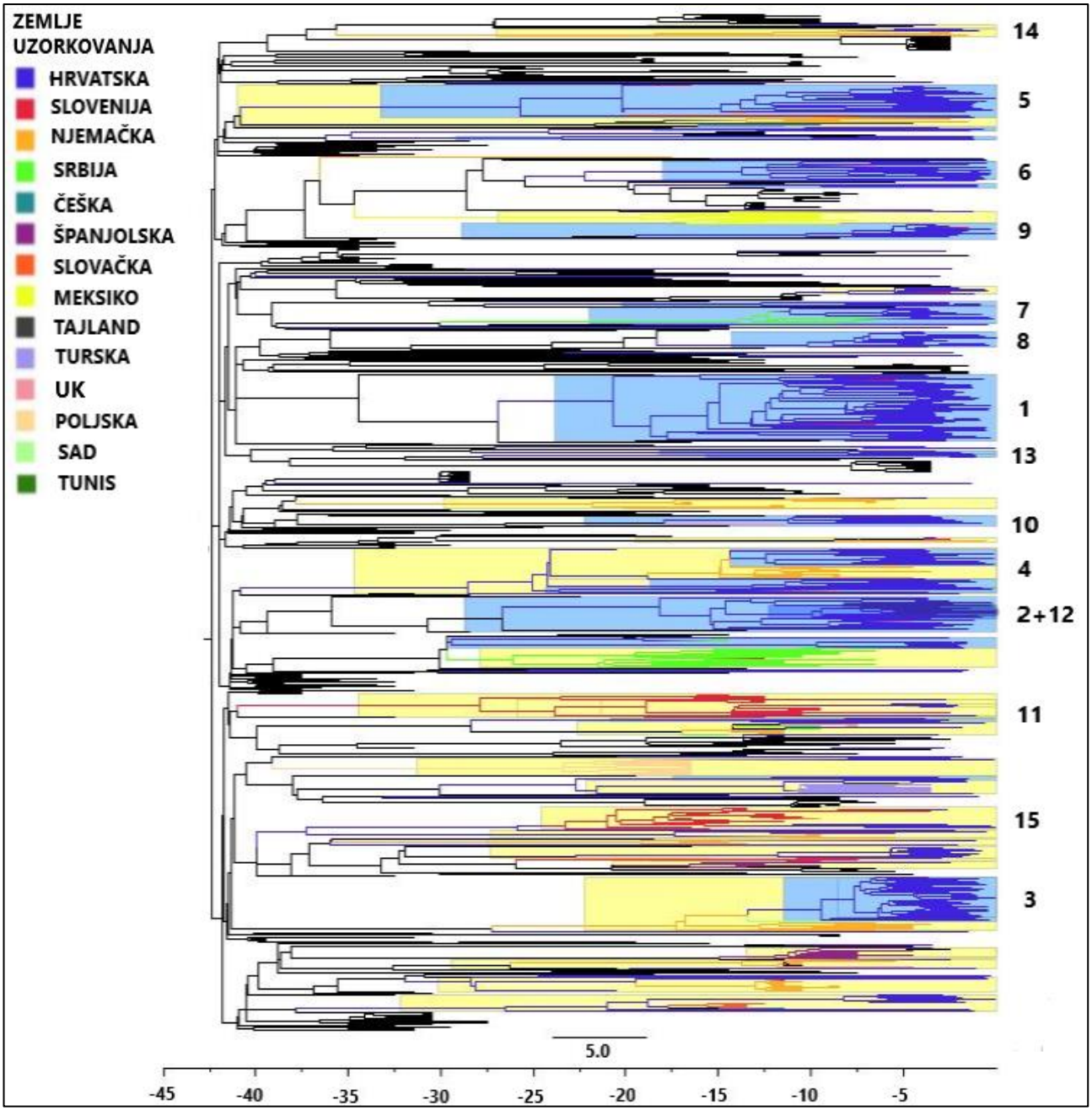


Slika 19. Prikaz filogenetskog stabla dobivenog pomoću Maximum Likelihood pristupa koje sadržava lokalne sekvence podtipa B uzorkovane u Hrvatskoj (prethodna i nova analiza) i pripadajuće kontrolne sekvence uzorkovane izvan Hrvatske te njihovo geografsko podrijetlo. Grane koje prikazuju lokalne sekvence i kontrolne sekvence koje sudjeluju u transmisijskim klasterima obojene su prema legendi na slici 19. Grane koje prikazuju kontrolne sekvence izvan transmisijskih klastera obojene su crno. Lokalni transmisijski klasteri istaknuti su plavom bojom, dok su miješani transmisijski klasteri istaknuti žutom bojom. Transmisijski klasteri koji sadrže >5 lokalnih sekvenci (tablica 17) označeni su pripadajućim rednim brojevima.

5.6. Filodinamička analiza sekvenci podtipa B

Bayesov horizontalni pristup korišten je za procjenu vremenskog razdoblja u kojem je došlo do razvoja HIV-1 epidemije u Hrvatskoj određujući vrijeme razvoja najrecentnijeg pretka lokalnih transmisijskih klastera. Ova analiza je postavljena za 356 sekvenci podtipa B i njihove odgovarajuće kontrolne sekvence (n=571). Konstruirano filogenetsko stablo dobiveno Bayesovim pristupom (slika 20) bilo je istovjetno filogenetskom stablu dobivenom Maximum Likelihood pristupom (slika 18), odnosno svi transmisijski klasteri pozicionirani filogenetskom analizom bili su prisutni i na filodinamičkom stablu. Procijenjene tMRCA vrijednosti za 15 transmisijskih klastera koji sadrže >5 lokalnih sekvenci prikazane su u tablici 17.

Rezultati filodinamičke analize predviđaju da se epidemija HIV-1 infekcije u Hrvatskoj inicijalno razvila u vremenskom periodu između 1985. i 1995. godine te da je bila predvođena ekspanzijom Klastera 4. Tijekom 90-ih došlo je do pojave nekoliko transmisijskih klastera pa tako progenitor Klastera 5 potječe iz 1993. (95% HPD 1987.2 - 1997.7), progenitor Klastera 9 iz 1996. (95% HPD, 1989.6 - 2002.7), a progenitor Klastera 1 iz 1998. godine (95% HPD, 1994.1 - 2002.2). Transmisija HIV-1 varijanti koje nose SDRM mutacije bila je predvođena progenitorima Klastera 2, 8, 10 i 12. Klaster 2 je najveći transmisijski klaster povezan sa širenjem rezistencije u Hrvatskoj koji nosi SDRM mutaciju T215S, a njegov progenitor potječe iz 1992. godine (95% HPD, 1988.7 - 1997.1). Klaster 12 je pod-klaster Klastera 2 koji nosi SDRM mutacije T215S+L210W, a razvio se u novije vrijeme te njegov progenitor potječe iz 2009. godine (95% HPD, 2006.6 - 2011.5). Korijen čvora Klastera 8, koji nosi SDRM mutaciju K101E, potječe iz 2008. godine (95% HPD, 2005.8 - 2011.6), dok Klaster 10, odgovoran za transmisiju HIV-1 varijanti rezistentnih na tri klase lijekova, potječe iz 2008. godine (95% HPD, 2005.9 - 2010.6). Tijekom 2000-ih dolazi do razvoja lokalnih transmisijskih klastera 3, 6, 7 i 13. Klaster 3 potječe iz 2003. godine (95% HPD, 2006.6 - 2011.8), progenitori Klastera 6 i 7 iz 2005. godine (95% HPD, 2001.9 - 2008.3; 2001.7 - 2008.1), dok se Klaster 13 razvio u 2007. godini (95% HPD, 2002.3 - 2011.6). Preostali klasteri prikazani u tablici 16 su miješani transmisijski klasteri 11, 14 i 15. Ti klasteri su se vjerojatno razvili tijekom 90-ih, odnosno Klasteri 11 i 14 su vjerojatno nastali 1992. godine (95% HPD, 1986.7 - 1995.5; 1987.5 - 1998.1), dok se Klaster 15 pojavio 1995. godine (95% HPD, 1992.1 – 1999.6).



Slika 20. Prikaz filogenetskog stabla dobivenog pomoću Bayesovog horiznontalnog pristupa koje sadržava lokalne sekvence podtipa B uzorkovane u Hrvatskoj (nova analiza) i pripadajuće kontrolne sekvence uzorkovane izvan Hrvatske. Grane koje prikazuju lokalne sekvence i kontrolne sekvence koje sudjeluju u transmisijskim klasterima obojene su prema legendi na slici 20. Grane koje prikazuju kontrolne sekvence izvan transmisijskih klastera obojene su crno. Lokalni transmisijski klasteri istaknuti su plavom bojom, dok su miješani transmisijski klasteri istaknuti žutom bojom. Transmisijski klasteri koji sadrže >5 lokalnih sekvenci (tablica 17) označeni su pripadajućim rednim brojevima. Vremenska skala postavljena je u 5-godišnjim intervalima, a kao početna točka uzeto je vrijeme uzorkovanja posljednje sekvence (2017.92).

5.7. Statistička analiza karakteristika ispitanika

U ovo istraživanje uključene su 403 prethodno neliječene HIV-om zaražene osobe koje su ušle u kliničku skrb KZIB-a u periodu 2014. - 2017. godine. Kliničke, demografske i molekularne karakteristike svih ispitanika unutar kohorte uspoređene su s karakteristikama ispitanika koji se nalaze unutar ili izvan transmisijskih klastera te s ispitanicima sa ili bez primarne rezistencije HIV-1 na antiretrovirusne lijekove (tablica 19).

Ispitanici unutar transmisijskih klastera, u usporedbi sa ispitanicima izvan transmisijskih klastera, vjerojatnije su bili dijagnosticirani u ranoj recentnoj fazi HIV-1 infekcije (OR, 3.7; 95% CI, 1.3 - 14.5; P = 0.009); inficirani sa HIV-1 podtipom B (OR, 9.2; 95% CI, 4.4 - 19.3; P = <.0001); prijavili spolni odnos s muškarcima kao rizični čimbenik za infekciju (OR, 5.1; 95% CI, 2.3 - 11.1; P = <.0001); prijavili Hrvatsku kao zemlju u kojoj je vjerojatno došlo do zaraze (OR, 2.4; 95% CI, 1.1 - 4.9; P = 0.014) (tablica 19). Kod 66 ispitanika utvrđena je infekcija s rezistentnim varijantama HIV-1 (66/403, 16,4%). Udio ispitanika s primarnom rezistencijom HIV-1 dijagnosticiranih u ranoj recentnoj fazi infekcije (12/81, 14,8%) i kroničnoj fazi infekcije (54/322, 16,7%) bio je podjednak. Ispitanici s primarnom rezistencijom HIV-1, u odnosu na ispitanike bez primarne rezistencije, vjerojatnije su prijavili spolni odnos s muškarcima kao rizični čimbenik za infekciju (OR, 0.2; 95% CI, 0.06 – 1.1; P = 0.042) te ušli u kliničku skrb bez simptoma AIDS-a (OR, 7.1; 95% CI, 1.7 – 29.7; P = 0.002) (tablica 19).

Tablica 19. Usporedba kliničkih, demografskih i molekularnih karakteristika između: (1) Svih ispitanika; (2) Ispitanika unutar transmisijskih klastera; (3) Ispitanika izvan transmisijskih klastera; (4) Ispitanika s primarnom rezistencijom HIV-1; (5) Ispitanika bez primarne rezistencije HIV-1.

	Svi ispitanici	Ispitanici u TK	Ispitanici izvan TK	P-vrijednost	Ispitanici bez SDRM mutacija	Ispitanici s SDRM mutacijama	P-vrijednost
Ispitanici, n (%)	403 (100)	347 (86,1)	56 (13,9)		337 (83,6)	66 (16,4)	
Spol, n (%)[b] Muškarci Žene Transseksualci*	 381 (94,5) 21 (5,2) 1 (0,3)	 330 (95,1) 16 (4,6) 1 (0,3)	 51 (91,1) 5 (8,9) /	0.192	 316 (93,8) 20 (5,9) 1 (0,3)	 65 (98,5) 1 (1,5) /	0.223
Put prijenosa, n (%)[a] MSM HETERO IDU* Nepoznat*	 358 (88,8) 39 (9,7) 3 (0,7) 3 (0,7)	 319 (91,9) 24 (6,9) 2 (0,6) 2 (0,6)	 39 (69,6) 15 (26,8) 1 (1,8) 1 (1,8)	 <.0001	 294 (87,3) 37 (10,9) 3 (0,9) 3 (0,9)	 64 (97,0) 2 (3,0) / /	 0.042

Pretpostavljena zemlja zaraze n, (%)[a] Hrvatska Izvan Hrvatske Nepoznato	348 (86,4) 52 (12,9) 3 (0,7)	305 (87,9) 39 (11,2) 3 (0,9)	43 (76,8) 13 (23,2) /	0.014	294 (87,2) 41 (12,2) 2 (0,6)	59 (89,4) 6 (9,1) 1 (1,5)	0.495
Stadij infekcije pri ulasku u skrb, n (%)[a] Recentna faza infekcije Kronična faza infekcije	81 (20,1) 322 (79,9)	77 (22,2) 270 (77,8)	4 (7,1) 52 (92,9)	0.009	69 (20,5) 268 (79,5)	12 (18,2) 54 (81,8)	0.670
Utvrđen AIDS pri ulasku u skrb, n (%)[a] Da Ne	75 (18,6) 328 (81,4)	59 (17,0) 288 (83,0)	16 (28,6) 40 (71,4)	0.039	61 (18,1) 276 (81,9)	2 (3,0) 64 (97,0)	0.002
HIV podtip, n (%)[a] B non-B	368 (91,3) 35 (8,7)	329 (94,8) 18 (5,2)	38 (67,9) 18 (32,1)	<.0001	303 (89,9) 34 (10,1)	64 (97,0) 2 (3,0)	0.066
Primarna rezistencija, n (%)[a]	66 (100)	61 (17,6)	5 (8,9)	0.140	/	66 (100)	
Dob, medijan (Q1-Q3)[c], godine	36 (29.0-43.0)	35.0 (28.0-43.0)	39.0 (33.0-45.0)	0.019	36.0 (29.0-43.0)	37.0 (28.0-45.8)	0.681
Broj CD4+ T-limfocita, medijan (Q1 i Q3)[c], stanice po µL	325.0 (142.0-515.5)	325.0 (148.3-532.5)	305.0 (95.0-460.0)	0.155	330.0 (148.0-515.0)	275.5 (89,8-533,5)	0.253
Viremija u plazmi, medijan (Q1-Q3)[c], log kopija HIV-1-RNA po Ml	4.9 (4.4-5.5)	4.9 (4.4-5.5)	4.9 (4.2-5.4)	0.633	4.9 (4.4-5.5)	5.01 (4.4-5.7)	0.156

TK: transmisijski klaster; SDRM: mutacije iz skupine ‘’surveillance drug resistance mutation’’; MSM: spolni odnos između muškaraca; HETERO: spolni odnos između muškarca i žene; IDU: i.v. primjena droga; Q1, Q3: prva i treća kvartila; n: broj ispitanika; a: povezanost između kategorijskih varijabli ispitana je sa hi-kvadratom; b: povezanost između kategorijskih varijabli ispitana je sa Fisherovim egzaktnim testom; c: povezanost između kontinuiranih varijabli ispitana je sa Mann–Whitney-Wilcoxon-ovim testom; *: varijable s malim brojem uzoraka isključene su iz sume proporcija i statističke analize.

6. RASPRAVA

Ovim istraživanjem karakterizirana je epidemija HIV-1 infekcije u Hrvatskoj pomoću kliničkih, socio-demografskih, molekularnih i virusoloških podataka prikupljenih od neliječenih HIV-om zaraženih osoba. Uz to, jedan dio istraživanja bio je fokusiran na analizu transmisijskih mreža koje sudjeluju u aktivnom širenje HIV-1 infekcije i rezistentnih virusnih varijanti u Hrvatskoj. Specifičnost ove studije je i zbog velikog broja uključenih ispitanika. Većina nacionalnih epidemioloških studija prosječno uključuju oko 30-50% ispitanika od ukupnog broja osoba ušlih u kliničku skrb, dok je u ovu analizu uključeno >90% neliječenih HIV-om zaraženih osoba koje su ušle u kliničku skrb KZIB-a u vremenskom periodu od siječnja 2014. do prosinca 2017. godine. Razlog tome leži u činjenici da je Hrvatska zemlja niske prevalencije HIV-1 infekcije (<0,1%) te je liječenje za sve HIV-om zaražene osobe centralizirano. Svi bolesnici se liječe u KZIB-u u Zagrebu, a u skrb ulaze kroz institucionalne centre za dobrovoljno i anonimno testiranje, centre za dobrovoljno i anonimno testiranje u društvenoj zajednici ili se upućuju iz zdravstvenih ustanova. Elektronska baza podataka se vodi od 1997. godine te obuhvaća sustavno vođenje kliničkih, socio-demografskih, virusoloških i molekularnih podataka za sve bolesnike u kliničkoj skrbi. U većini drugih zemalja skrb nije centralizirana već se sastoji od više zdravstvenih jedinica koje su organizirane unutar državnih klinika, sveučilišnih klinika ili bolnica [151-153]. Iz tog razloga većina zemalja ne posjeduje jedinstveni registar podataka koji objedinjuje podatke o svim HIV-om zaraženim osobama te nisu ni u mogućnosti napraviti epidemiološku studiju koja bi uključivala ovako visok postotak ispitanika.

Rezultati ovog rada pokazali su da je u ukupnom broju svih ispitanika udio spolnog prijenosa bio vrlo visoko zastupljen (98,5%), dok je prijenos i.v. primjenom droga bio vrlo nisko zastupljen (0,7%). HIV-1 infekcija bila je koncentrirana u skupini mlađih muškaraca koji imaju spolne odnose s muškarcima s udjelom od 89% i medijanom dobi od 36 godina. Ispitanici su uglavnom ušli u kliničku skrb u kroničnoj fazi HIV-1 infekcije s medijanom apsolutnog broja CD4+ T-limfocita koji je iznosio 325.0 stanica/μL. Prema internacionalnoj definiciji kasnog uključenja u kliničku skrb (engl. *late presentation to care*), HIV-om zaražene osobe s apsolutnim brojem CD4+-T-limfocita <350 stanica/μL su kasni prezenteri (engl. *late presenters*) [154]. Iz toga proizlazi da unutar analizirane kohorte >50% ispitanika su kasni prezenteri, dok je 18% ispitanika imalo kliničke simptome AIDS-a. Ti rezultati ukazuju da se velik broj HIV-om zaraženih osoba u kasnijoj fazi bolesti i u lošijem kliničkom stanju uključuje u kliničku skrb u Hrvatskoj. Ipak, čini se da je u usporedbi s podatcima objavljenim u prethodnoj nacionalnoj studiji, koja je obuhvatila razdoblje od 1999. do 2004. godine, trend ranijeg uključivanja u skrb nešto povoljniji. Tijekom tog perioda 34% ispitanika je ušlo u skrb s kliničkim simptomima AIDS-a, dok je medijan apsolutnog

broja CD4+ T-limfocita iznosio 276 stanica/μL [155]. Blago povoljniji trend dijelom se može objasniti sve većim i ranijim odazivom na testiranja u HIV centrima za besplatno i anonimno savjetovanje, ali i prosvjetnim mjerama Nacionalnog programa za prevenciju HIV-1/AIDS-a čiji cilj je smanjiti širenje HIV-1 infekcije smanjenjem rizičnog ponašanja u općoj i ključnim populacijama (MSM, IDU, osobe koje imaju veći broj spolnih partnera) [22].

Epidemija HIV-1 infekcije u Hrvatskoj je specifična po vrlo visokoj prevalenciji primarne rezistencije HIV-1 na antiretrovirusne lijekove, što je prvi put bilo pokazano u prethodnoj nacionalnoj studiji iz 2009. godine [85]. U tu studiju bilo je uključeno 118 neliječenih HIV-om zaraženih osoba (118/180, 65,6%) koje su tijekom 2-godišnjeg perioda (2006. - 2008.) ušle u skrb KZIB-a. Prevalencija primarne rezistencije iznosila je 22%. U ovom radu analiza je rađena na 403 ispitanika (403/436, 92,4%) koji su tijekom 4-godišnjeg perioda ušli u skrb KZIB-a, a prevalencija primarne rezistencije iznosila je 16,4%, pri čemu nije uočeno povećanje već blagi pad primarne rezistencije tijekom ispitivanog perioda od 2014. do 2017. godine. Iako se čini da je primarna rezistencija tijekom zadnjih 10 godina u padu, došlo je do značajnih promjena vrsta i obrazaca SDRM mutacija povezanih s razvojem rezistencije na antiretrovirusne lijekove.

U prethodnoj nacionalnoj studiji visoka primarna rezistencija bila je atribuirana lokalnim prijenosom mutiranog virusa koji je nosio NRTI mutaciju T215S u transmisijskom klasteru MSM-a. Tijekom tog perioda prevalencija primarne rezistencije na NRTI je bila visoka (19,5%), a na NNRTI je bila niska (2,5%) te nisu bile otkrivene mutacije povezane s primarnom rezistencijom na PI. Rezultati ove studije pokazali su da je revertant T215S ostao najprevalentnijom SDRM mutacijom i tijekom nove analize te je ukupno detektiran u 30 ispitanika (7,4%). S tom mutacijom, u ispitivanoj kohorti najprevalentnija je bila primarna rezistencija na NRTI, detektirana u 46 ispitanika (11,4%). Prisutnost NNRTI mutacija utvrđena je kod 27 ispitanika (6,7%), od čega je 15 ispitanika nosilo K101E mutaciju (3,7%). Primarna rezistencija na PI utvrđena je kod 10 ispitanika te je bila najniže zastupljena (2,5%). Velika učestalost rezistencije na NRTI i NNRTI odraz je učestalog korištenja tih lijekova u Hrvatskoj, ali i nešto niže genetske barijere u odnosu na PI. Mutacije povezane s rezistencijom na PI se rjeđe razvijaju u HIV-1 bolesnika koji uzimaju terapiju baziranu na PI, u odnosu na mutacije povezane s rezistencijom na NRTI/NNRTI koje se češće razvijaju u HIV-1 bolesnika koji uzimaju terapiju baziranu na tim virusnim inhibitorima [156-158]. Čini se da na to utječe uzak koncentracijski raspon iznad kojeg je razina PI dovoljno niska da dozvoljava minimalnu virusnu replikaciju, a opet dovoljno visoka da spriječi razvoj i ekspanziju mutiranih varijanti virusa [159-160]. U novoj analizi otkrivena je i primarna rezistencija na tri klase lijekova NRTI+NNRTI+PI kod 9 ispitanika, od čega je 8 nosilo obrazac SDRM mutacija: (NRTI) T215D/E + (NNRTI) L100I, K103N + (PI) I47V, V32I. Filogenetskom analizom je utvrđena

transmisijska poveznica s jednom sekvencom uzorkovanom u Ujedinjenom Kraljevstvu koja je nosila vrlo sličan obrazac mutacija. Preostali ispitanik nosio je obrazac SDRM mutacija: (NRTI) M184MIV, L210W, T215S + (NNRTI) K101E, Y181C, G190A, P225PH + (PI) I84V, a nađen je u transmisijskom paru sa sekvencom uzorkovanom u Srbiji koja je nosila vrlo sličan obrazac mutacija. Obzirom da u kliničkoj skrbi KZIB-a ne postoje liječeni HIV-1 bolesnici koji su doživjeli virusološki neuspjeh liječenja uslijed pojave ovako teških oblika rezistencije, postoji indikacija da se u oba slučaja radi o pojavi trostruke rezistencije uslijed zaraze hrvatskih ispitanika sa osobama iz drugih zemalja inficiranim s multirezistentnim varijantama virusa. Nakon inicijalnog međugraničnog prijenosa multirezistentnih virusnih varijanti vrlo vjerovatno je tijekom vremena došlo do njihovog lokalnog širenja te razvoja transmisijskog klastera, čiji nastanak je filodinamičkom analizom predviđen između 2005. i 2010. godine.

Prevalencija primarne rezistencije u europskim zemljama je praćena putem SPREAD programa. Program SPREAD organiziran je pod pokroviteljstvom Europskog Društva za Translacijsko Antiretrovirusno Istraživanje (engl. *European Society for Translational Antiviral Research,* ESAR) [86]. Od 2002. godine SPREAD program kontinuirano prikuplja podatke o neliječenim novodijagnosticiranim HIV-om zaraženim osobama. U posljednjoj SPREAD analizi sudjelovalo je 26 zemalja: Austrija, Belgija, Bugarska, Cipar, Češka, Danska, Finska, Francuska, Grčka, Hrvatska, Irska, Izrael, Italija, Litva, Latvija, Luksemburg, Nizozemska, Norveška, Njemačka, Poljska, Rumunjska, Srbija, Slovačka, Slovenija, Španjolska i Švedska. Analizirani su podatci za 4140 ispitanika dijagnosticiranih sa HIV-1 infekcijom tijekom razdoblje od 2008. do 2010. godine. Prevalencija primarne rezistencije u Europi u tom periodu je iznosila 8,3%. Prevalencija mutacija povezanih s rezistencijom na NRTI je iznosila 4,5% te je bila više u odnosu na prevalenciju mutacija povezanih s rezistencijom na NNRTI (2,9%) i PI (2%). Najzastupljenija NRTI mutacija bila je T215S, a najzastupljenija NNRTI mutacija bila je K103N. Uspoređujući rezultate nacionalnih analiza (uključujući prethodnu analizu, 2006. - 2008. i novu analizu, 2014. - 2017.) s rezultatima SPREAD analize ukupna prevalencija primarne rezistencije u Hrvatskoj je bila i ostala visoko iznad europskog prosjeka. Također većina zemalja u regiji bilježi nižu prevalenciju primarne rezistencije u odnosu na Hrvatsku. Ipak, važno je napomenuti da raznolikost u dizajnu istraživanja, broju uključenih ispitanika (engl. *national coverage*) i uporabi interpretacijskih algoritama može utjecati na usporedbu podataka između zemalja.

Lunar i sur. su pokazali da u Sloveniji prevalencija primarne rezistencije iznosi 2,4% [87]. Istraživanje je obuhvatilo 163 neliječene novodijagnosticirane HIV-om zaražene osobe koje su ušle u kliničku skrb od 2011. do 2016. godine (163/308, 54,5%). SDRM mutacije nađene su kod 4 ispitanika (2,4%), od čega je NNRTI mutacija K103N detektirana kod 2 ispitanika, dok su NRTI

mutacije T68D i T215D detektirane svaka kod po jednog ispitanika. U istraživanju Stanojević i sur. analiziran je obrazac SDRM mutacija povezanih s razvojem primarne rezistencije HIV-1 u Srbiji [88]. U studiju su bili uključeni neliječene novodijagnosticirane HIV-om zaražene osobe koje su ušle u kliničku skrb od 2002. do 2011. godine (181/583, 31,1%). Primarna rezistencija iznosila je 8,8%. Najčešće su bile NRTI mutacije, odnosno timidinski analozi na RT pozicijama 210, 215 i 219 koji su nađeni u ukupno 43,7% rezistentnih uzoraka. U studiji je detektirana rezistencija na dvije klase lijekova kod 3 ispitanika sa sljedećim obrascima mutacija: **(1)** (NRTI) K65R, Q151M + (NNRTI) Y181C; **(2)** (NRTI) K219Q + (NNRTI) K103N; **(3)** (NRTI) K65R, M184V + (NNRTI) K103N. Uz to, kod 2 ispitanika je utvrđena rezistencija na tri klase lijekova sa sljedećim obrascima: **(1)** (NRTI) M41L, L74I, V75T, T215Y, K219N + (NNRTI) K101E, Y181C, G190A + (PI) M46I, I84V, L90M; **(2)** (NRTI) L74I, Y115F, M184V + (NNRTI) K103N + (PI) L23I, M46I, I54V, V82F, L90M. Posljednja bugarska nacionalna studija analizirala je prevalenciju primarne rezistencije HIV-1 tijekom razdoblja od 1988. do 2011. godine [89]. Rezistencija je analizirana kod 305 od ukupno 1446 ispitanika (21,1%), koliko ih je ušlo u kliničku skrb tijekom promatranog perioda. SDRM mutacije su detektirane kod 16 ispitanika (5,2%). Kod 11 ispitanika radilo o mutacijama povezanim s rezistencijom na NRTI (3,6%), dok je kod 5 ispitanika utvrđena rezistencija na NNRTI (1,6%), a kod 3 ispitanika rezistencija na PI (0,9%). Najprevalentnije su bile mutacije sljedećim redom: (NRTI) T215C/D/S, M41L, K219Q i F77L; (NNRTI) Y181C, K103N, V106M i G190E; (PI) D30N, N88D i M46L. Kod 2 ispitanika nađena je rezistencija na dvije klase lijekova sa sljedećim obrascem mutacija: (NRTI) M41L, T215D + (PI) D30N, N88D, dok je kod jednog ispitanika utvrđen obrazac mutacija: (NRTI) F77L, T215C + (NNRTI) Y181C. Paraskevis i sur. prikazali su rezultate analize primarne rezistencije HIV-1 u Grčkoj među neliječenim novodijagnosticiranim HIV-om zaraženim osobama koje su uključene u kliničku skrb od 2003. do 2015. godine [90]. Analiza je provedena među 3,428 ispitanika od ukupno 8,694 ispitanika (39,4%), koliko ih je ušlo u kliničku skrb tijekom promatranog perioda. Primarna rezistencija utvrđena je kod 205 ispitanika (5,98%). Najčešće su bile mutacije povezane srezistencijom na NNRTI (3,8%), od čega su najfrekventnije bile E138A, E138Q, K103N i V179D. Mutacije povezane s rezistencijom na NRTI bile su prisutne kod 78 ispitanika (2,3%), dok su mutacije povezane s rezistencijom na PI detektirane kod 35 ispitanika (1,02%). Rezistencija na više klasa lijekova je pronađena kod 100 ispitanika. Kod 35 ispitanika radilo se o rezistenciji na NRTI/NNRTI, potom kod 35 ispitanika na NNRTI/PI, kod 19 ispitanika na NRTI/PI, a 11 ispitanika bilo je rezistentno na NRTI/NRTI/PI.

Nekoliko zemalja u regiji prijavilo je visoku prevalenciju primarne rezistencije HIV-1 koja je usporediva sa podatcima iz Hrvatske. U istraživanju Andreis i sur. analizirana je prevalencija primarne rezistencije HIV-1 u sjevernoj Italiji [161]. Primarna rezistencija je analizirana kod 750 (750/762, 98,4%) neliječenih novodijagnosticiranih HIV-om zaraženih osoba iz Veneto regije koje

su ušle u kliničku skrb u razdoblju od 2013. do 2016. godine. Mutacije povezane s razvojem rezistencije nađene su kod 92 ispitanika (12,3%), od čega je 28 ispitanika nosilo NNRTI mutaciju E138A (3,8%). Rezistencija na više klasa lijekova je pronađena kod 9 ispitanika. Kod 5 ispitanika radilo se o rezistenciji na NRTI/NNRTI, kod 2 ispitanika detektirana je rezistencija na NRTI/PI, a po jedan ispitanik je bio rezistentan na NNRTI/PI i na NRTI/NRTI/PI. U radu nije objavljen točan popis svih nađenih mutacija, kao ni obrazaca mutacija kod pojedinih ispitanika. Andreis i sur. koristili su interpretacijski algoritman za analizu mutacija povezanih s razvojem rezistencije koji je se nalazi u sklopu programa za analizu nukleotidnih slijedova virusa i poravnavanja sa referentnim sojem HIV HXB2, Viroseq HIV Genotyping System. Taj interpretacijski algoritam koristi bazu mutacija među kojima su i polimorfne mutacije koje ne spadaju u grupu primarnih mutacija povezanih sa razvojem rezistencije. Iako je E138A mutacija nađena i među ispitanicima uključenim u ovo istraživanje, ipak nije prijavljena u ovom radu budući da se radi o sekundarnoj mutaciji koja samostalno ne utječe na razvoj primarne rezistencije HIV-1. Razlike u tumačenju značenja mutacija između različitih studija ukazuju na važnost korištenja univerzalne liste mutacija povezanih sprimarnom rezistencijom HIV-1, kao što je SDRM lista objavljena od strane svjetske zdravstvene organizacije (engl. *World Health Organisation*, WHO) [137].

Temereanca i sur. su pokazali vrlo visoku prevalenciju primarne rezistencije u Rumunjskoj [91]. U istraživanje su bile uključene 62 neliječene novodijagnosticirane HIV-om zaražene osobe koje su ušle u kliničku skrb tijekom vremenskog perioda od 1997. do 2011 godine (podatak o ukupnom broju novodijagnosticiranih osoba tijekom navedenog perioda nije dostupan u radu). SDRM mutacije povezane s razvojem rezistencije nađene su kod 9 ispitanika (14,8%), od čega je 8 ispitanika nosilo NRTI mutaciju (13,1%), a po dva ispitanika su nosila mutaciju povezanu srazvojem rezistencije na NNRTI (3,3%) i PI (3,3%). Najčešće mutacije bile su timidinski analozi K70R i K219Q, a obje su nađene kod 3 ispitanika (4,9%). Dva ispitanika nosila su obrazac mutacija povezanih s razvojem rezistencije na NRTI/NNRTI**: (1)** (NRTI) M184V + (NNRTI) V179F, Y181C; **(2)** (NRTI) D67N, K70R, T215F, K219Q + (NNRTI) V106M, Y188C, dok je jedan ispitanik nosio obrazac mutacija povezan s razvojem rezistencije na NRTI/PI: (NRTI) D67N, T69D, K70R, L74I, M184V, T215F, K219Q + (PI) L24I, M46I, I47V, F53L, I54V, V82A. U Mađarskoj su rezultati analize primarne rezistencije HIV-1 bili vrlo slični [92]. U analizu je uključeno 30 neliječenih novodijagnosticiranih HIV-om zaraženih osoba koje su ušle u skrb tijekom razdoblje od 2008. do 2010. godine (podatak o ukupnom broju novodijagnosticiranih osoba tijekom navedenog perioda nije dostupan u radu). SDRM mutacije su nađene kod 5 ispitanika te je ukupna prevalencija primarne rezistencije iznosila 16,6%. Kod 3 ispitanika nađene su NRTI mutacije M41L+T215E (10%), a kod 2 ispitanika nađena je NNRTI mutacija K103N (6,6%). Primarna rezistencija na PI nije bila detektirana tijekom navedenog perioda. Iako su obje zemlje prijavile vrlo visoku

prevalenciju primarne rezistencije HIV-1, zbog malog broja uključenih ispitanika moguća je pristranost rezultata obje studije.

U sklopu SPREAD studije analizirana je prisutnost mutiranih varijanti virusa povezanih s rezistencijom na InSTI u Europi. Analiza je provedena tijekom perioda od 2006. do 2007. godine, prije početka njihove primjene u kliničkoj praksi. U istraživanje je uključeno 300 ispitanika od ukupno 1950 (15,4%), koliko ih je ušlo u SPREAD program tijekom navedenog perioda. Rezultati studije pokazali su da prije kliničke uporabe InSTI u Europi nisu bile prisutne rezistentne varijante virusa koje bi mogle ugroziti njihov učinak. InSTI su visoko-potentni lijekovi koji osiguravaju brzo i učinkovito smanjenje viremije, a unatoč tome bolesnicima omogućuju tolerabilnost i sigurnost kod dugotrajnog korištenja. Zbog svojih pozitivnih karakteristika kombinirana terapija bazirana na InSTI se u smjernicama antiretrovirusnog liječenja trenutno preporučuje kao primarna terapija kod neliječenih novodijagnosticiranih HIV-1 bolesnika [162]. Upravo zbog njihove povećane uporabe u posljednje vrijeme te nešto niže genetičke barijere prve generacije InSTI (ELV, RAL), pojava varijanti HIV-1 rezistentnih na InSTI je očekivana [163]. S druge strane, prema IAS smjernicama za antiretrovirusno liječenje i praćenje HIV-1 infekcije, nadziranje pojave rezistencije na InSTI se preporučuje u onih bolesnika koji su doživjeli virusološki neuspjeh liječenja povezan s razvojem rezistencije na InSTI ili na druge klase lijekova [163].

Zbog vrlo visoke prevalencije primarne rezistencije HIV-1 na RTI i PI u analiziranoj kohorti analizirala sam primarnu rezistenciju na InSTI kod odabranih ispitanika. InSTI se koriste u liječenju HIV-1 infekcije u Hrvatskoj od 2015. godine, a prvi slučajevi pojave rezistencije su zabilježeni u liječenih bolesnika tijekom 2016. godine [164]. Planinic i sur. tada su našli mutacije povezane s rezistencijom na InSTI kod 5 ispitanika koji su doživjeli virusološki neuspjeh liječenja prilikom uzimanja terapije bazirane na InSTI (5/18, 27,8%). Radilo se o mutacijama E92Q (11,1%), Q148R (5,6%) i N155H (11,1%) koje uzrokuju rezistenciju na ELV i RAL. Iz tog razloga primarnu rezistenciju HIV-1 na InSTI nisam analizirala kod ispitanika koji su ušli u kliničku skrb od 2014. do 2016. godine, već samo kod ispitanika koji su ušli u kliničku skrb tijekom 2017. godine. U uzorku od 100 ispitanika pronađena je jedna primarna mutacija G140A (1%) i tri sekundarne mutacije T97A (1%), Q146QH (1%), D232N (1%). Uz to je utvrđena i visoka prevalencija S230N polimorfizma (49%) koji nije povezan sa smanjenom osjetljivošću na InSTI. Ovim radom potvrđena je visoka osjetljivost ispitanika na InSTI, a slične rezultate prijavile su i druge studije. Chehadeh i sur. analizirali su primarnu rezistenciju HIV-1 na InSTI kod 53 neliječene novodijagnosticirane HIV-om zaražene osobe u Kuvajtu [165]. Nije pronađena niti jedna primarna mutacija povezana s rezistencijom na InSTI, međutim kod 6 ispitanika (13,3%) utvrđena je sekundarna mutacija L74M/I, dok je kod jednog utvrđena sekundarna mutacija E157Q (2,2%).

Jedna studija iz subsaharske Afrike obuhvatila je 425 neliječenih HIV-om zaraženih osoba iz Kenije, Nigerije, Južnoafričke Republike, Ugande i Zambije [166]. Inzaule i sur. su analizirali prisutnost rezistentnih varijanti virusa pomoću tehnologije NGS. Zaključili su da pri frekvenciji <20% prevalencija primarnih mutacija povezanih s rezistencijom iznosi 2,4%, a detektirali su mutacije sa sljedećom distribucijom: T66A/I (0,7%), E92G (0,5%), Y143C/S (0,7%), S147G (0,2%) i Q148R (0,5%). Prisutnost sekundarnih mutacija: L74I/M (10,4%), Q95K (0,5%), T97A (4%), E157Q (0,7%) i G163R/K (0,7%) detektirana je pri frekvenciji ≥20%, a njihova ukupna prevalencija iznosila je 15,1%. U istraživanju Andreis i sur. analizirana je prevalencija primarne rezistencije HIV-1 na InSTI u sjevernoj Italiji. U istraživanje je uključeno 484 neliječenih novodijagnosticiranih HIV-om zaraženih osoba iz Veneto regije koje su ušle u kliničku skrb tijekom razdoblja od 2013. do 2016. godine. Pronađena je jedna primarna InSTI mutacija Y143C (0,2%), dok je kod 13 ispitanika utvrđena sekundarna mutacija E157Q (2,7%) [161].

U ovom istraživanju svim ispitanicima određen je i podtip virusa HIV-1. Važnost određivanja podtipa virusa radi molekularne karakterizacije HIV-1 infekcije je višestruka. Podtip virusa je iznimno značajan za interpretaciju biološke značajnosti pojedinih mutacija vezanih za rezistenciju HIV-1 na lijekove [167-169]. Analiza podtipa virusa omogućuje i razjašnjavanje specifičnih epidemiologija vezanih uz pojedine zemlje ili regije ili uz rizične skupine koje sudjeluju u širenju infekcije. Primjerice u Europi (zemlje zapadne i centralne Europe) dominira infekcija sHIV-1 podtipom B, a u većini zemalja je vezana uz osobe iz MSM skupine [34, 170-172]. Infekcija s non-B podtipovima uglavnom je ograničena na skupinu heteroseksualnih radnih migranata koji dolaze iz područja žarišta infekcije tim podtipovima (poput subsaharske Afrike) i pojedinih Europljana koji su epidemiološki povezani s osobama iz tih područja te u osoba koje i.v. koriste droge [173, 174]. Hrvatska spada u skupinu zemalja jugoistočne Europe u kojoj je prevalencija HIV-1 podtipova vrlo raznolika [175]. Primjerice non-B podtipovi dominiraju u Albaniji (podtip A) i Rumunjskoj (podtip F1). Podtip B dominira u Bugarskoj, Crnoj Gori, Grčkoj, Mađarskoj, Sloveniji, Srbiji i Turskoj, međutim distribucija non-B podtipova među tim zemljama se uvelike razlikuje. U Bugarskoj i Grčkoj je najzastupljeniji non-B podtip A, u Srbiji podtip G, u Turskoj podtipovi F i C, u Mađarskoj podtipovi A, C i F, dok Slovenija bilježi zarazu s nekoliko CRF-ova i non-B podtipova kao što su CRF02_AG, CRF01_AE, A1, F1 i D.

Prvi literarni podatci o distribuciji HIV-1 podtipova u Hrvatskoj objavljeni su 2009. godine [39]. U istraživanje je uključeno 145 HIV-om zaraženih osoba koje su ušle u kliničku skrb tijekom razdoblja od 2000. do 2003. godine. Infekcija s podtipom B zabilježena je u 73,8% ispitanika te je ulavnom bila vezana uz osobe iz MSM skupine i osobe koje i.v. koriste droge. Infekcija s non-B podtipovima utvrđena je u 26,2% ispitanika te je uglavnom bila vezana uz skupinu radnih migranata

(posebice pomoraca) i njihovih stalnih pratnerica. Distribucija non-B podtipova bila je sljedeća: podtip A (2,1%), podtip C (6,9%), podtip F (0,7%), CRF01_AE (2,1%), CRF05_DF (1,4%), CRF06_cpx (0,7%), CRF10_CD (2,1%) (19). Najčešći non-B podtip bio je CRF02_AG (8,9%), čije žarište infekcije se većinom nalazi u državama središnjeg dijela Afrike [175]. Iduća studija o molekularnoj heterogenosti HIV-1 izrađena je u sklopu analize primarne rezistencije HIV-1 2013. godine [85]. Utvrđeno je da tijekom perioda od 2006. do 2008. godine HIV-1 podtip B i dalje dominira u širenju HIV-1 infekcije u Hrvatskoj. Kod 105 osoba (89%) detektirana je infekcija s podtipom B, a kod većine se radilo o zarazi putem homoseksualnog spolnog odnosa (MSM skupina). Non-B podtipovi bili zastupljeni kod preostalih 13 ispitanika, a otkriveni su u osoba koje su se zarazile putem spolnog odnosa između muškarca i žene. Distribucija non-B podtipova bila je sljedeća: podtip A (5%), podtip C (2,5%), CRF02_AG (1,7%), CRF01_AE (0,8%) i podtip D (0,8%).

Rezultati genotipizacije HIV-1 u ovom istraživanju pokazali su usporedivu distribuciju podtipova, čak 91,3% kohorte bilo je zaraženo HIV-1 podtipom B, a većina je pripadala MSM skupini. Od non-B podtipova jedino su podtip A1, podtip C i podtip CRF02_AG bili zastupljeni u >1% ukupne kohorte. Filogenetska analiza sekvenci podtipa A1, B i C je pokazala da je ukupno 86,1% ispitanika sudjelovalo u transmisijskim klasterima, od čega je 74,8% sudjelovalo u lokalnim transmisijskim klasterima. Suprotno početnoj pretpostavljenoj hipotezi tijekom promatranog razdoblja nije došlo do povećanja trenda novodijagnosticiranih HIV-om zaraženih osoba koji se grupiraju u lokalne transmisijske lance, već je trend uključivanja tijekom godina uglavnom bio vrlo sličan. Filogenetskom analizom sekvenci podtipa A1 utvrđeno je da 71% ispitanika pripada transmisijskim klasterima, od čega je jedan klaster bio lokalnog karaktera. Za razliku od prehodnih nacionalnih istraživanja, u kojima je infekcija non-B podtipovima bila atribuirana osobama iz heteroseksualne skupine, čak 76% ispitanika zaraženo HIV-om podtipa A1 pripadalo je MSM skupini. Filogenetska analiza podtipa C pokazala je da 85,6% ispitanika pripada unutar 2 transmisijska para i dva transmisijska klastera, a kod većine je rizični čimbenik za zarazu bio heteroseksualni spolni odnos.

Zbog vrlo visoke zastupljenosti HIV-1 podtipa B u analiziranoj kohorti daljnja rasprava će biti usmjerena na analizu transmisijskih mreža koje sadržavaju tu formu virusa. Zbog iznimne molekularne heterogenosti virusa HIV-1 filogenetskom analizom je moguće utvrditi precizan evolucijski i epidemiološki obrazac kod uzoraka međusobno prikupljenih tijekom vrlo kratkog vremenskog perioda. Posebno korisno u sveobuhvatnoj analizi molekularne epidemiologije HIV-1 infekcije je izrada i filodinamičke analize [176-178]. Korištenjem ovih sofisticiranih metoda opisivanje transmisijskih mreža podrazumijeva identifikaciju socio-demografskih i epidemioloških

karakteristika vezanih uz formiranje klastera, kvantitativni opis transmisijskih klastera te u konačnici pojašnjenje kako se virusne linije međusobno miješaju u određene epidemiološke jedinice [87-92, 128-132].

Prva filogenetska analiza sekvenci podtipa B uzorkovanih u Hrvatskoj (2006. - 2008.) izrađena je u sklopu analize primarne rezistencije HIV-1 2013. godine [85]. Filogenetikom je identificirano 8 transmisijskih klastera, a najveći klaster sadržavao je 19 lokalnih sekvenci sa SDRM mutacijom T215S. Svi ispitanici unutar klastera pripadali su MSM skupini. U tom istraživanju lokalnim sekvencama nisu bile pridružene odgovarajuće kontrolne sekvence, stoga su detektirani samo lokalni transmisijski klasteri, a epidemiološka poveznica je ostala nepoznata kod svih ispitanika (41,7%) koji nisu pripadali lokalnim transmisijskim klasterima. Filogenetska analiza izrađena u sklopu ove disertacije uključila je sekvence uzorkovane u prethodnoj analizi (2006. - 2008.), novoj analizi (2014. - 2017.) i pripadajuće kontrolne sekvence. Kod većine sekvenci uzorkovanih u prethodnoj analizi, kod kojih je epidemiološka poveznica ostala nepoznata, utvrđeno je da pripadaju miješanim transmisijskim klasterima koji sadržavaju sekvence uzorkovane u regionalnim zemljama (Slovenija, Njemačka, Poljska, Srbija) i lokalne sekvence uzorkovane tijekom nove analize.

U sklopu ove disertacije utvrđeno je da velik broj lokalnih sekvenci iz nove analize (88%) sudjeluje u formiranju lokalnih i miješanih transmisijskih klastera. Ovi rezultati usporedivi su s epidemiološkim studijama drugih zemalja, iako je većina prijavila udio klasteriranja <50% [179-183], dok su slične rezultate objavili Lunar i sur. 2016. godine u epidemiološkoj studiji iz Slovenije [87]. Na postotak klasteriranja važnu ulogu ima način uzorkovanja ispitanika – što je veći broj ispitanika unutar užeg vremenskog perioda uključen u filogenetsku analizu, time je i razina klasteriranja viša [184]. U ovom istraživanju uključeno je >90% HIV-om zaraženih osoba koje su ušle u skrb tijekom uzastopnog 4-godišnjeg perioda. Većina epidemioloških studija nije u mogućnosti uključiti tako velik postotak ispitanika unutar nekog određenog vremenskog perioda te pribjegavaju metodi nasumičnog uzorkovanja (engl. *dense sampling*) određenog broja ispitanika unutar nekog zadanog vremenskog okvira. Iz navedenog je moguće zaključiti da je zbog iznimno velikog broja ispitanika uključenih u ovu analizu razina klasteriranja viša u odnosu na rezultate drugih studija. Na udio klasteriranja utječu i metode definiranja transmisijskih klastera. Većina epidemioloških studija definirala je transmisijske klastere pri genetičkoj udaljenost <0.45 sa pseudoreplikacijskom podrškom (engl. *bootstraping*) od 70-90% [179-183]. Felsensteinova pseudoreplikacijska analiza služi za procjenu vjerodostojnosti izraženog filogenetskog stabla. Metoda se zasniva na stvaranju "pseudo uzoraka" izmjenjujući unutar sekvenci nukleotide po određenom modelu zamjene. Novo stablo napravljeno je s novim sekvencama, a taj proces se

provodi određenim brojem iteracija (prosječno 100-1000 puta). Nova stabla uspoređuju se soriginalnim stablom, a ako je čvor novog stabla jednak originalnom pridodaje mu se vrijednost 1 (u suprotnom vrijednost 0). Ovisno o broju iteracija koje se zadaju programu dolazi do ponavljanja rekonstrukcije stabala, a postotak čvorova sa vrijednosti 1 bilježi se kao bootstraping vrijednost (>70% se smatra solidnom podrškom) [185]. U ovom istraživanju, kao i u istraživanju Lunar i sur., nije korištena bootstraping metoda u izradi filogenetskog stabla, već je jačina podrške grana procijenjena s aLRT metodom. Metoda aLRT uspoređuje vjerojatnosti najboljeg rasporeda i drugog najboljeg rasporeda oko grana od interesa, a standardna null hipoteza "dužina grane je 0" je zamijenjena s hipotezom "grana je neispravna" [186]. Ta metoda je znantno brža od pseudoreplikacijske analize te zahtijeva izradu jednog filogenetskog stabla, za razliku od pseudoreplikacijske analize kojom dolazi do višestruke izrade stabala (prosječno 100-1000 puta). S druge strane, razina preciznosti i jačine analize ostaje vrlo slična kao i kod konvencionalnih metoda izrade stabala, a Anisimova i sur. navode čak nešto višu razinu osjetljivosti tih parametara kod aLRT metode [186].

Filogenetskom analizom sekvenci podtipa B utvrđen je lokalan karakter epidemije HIV-1 infekcije u Hrvatskoj. Čak 72,3% ispitanika sudjelovalo je u lokalnim transmisijskim mrežama, a uglavnom su pripadali MSM skupini mlađe životne dobi. Do sličnih zaključaka došle su i druge europske epidemiološke studije u kojima je uočeno da je HIV-1 infekcija koncentrirana među MSM skupinom inficiranom s HIV-1 podtipom B [181, 187-189].

Preostali ispitanici (uglavnom MSM) sudjelovali su u miješanim transmisijskim klasterima, a u većini slučajeva bili su epidemiološki povezani s osobama iz regionalnih zemalja (Slovenija, Srbija, Njemačka, Poljska). Ipak je kod određenog broja ispitanika indikativno da su se zarazili u drugim zemljama, kao što je Španjolska, SAD, Turska ili Ujedinjeno Kraljevstvo. Valja napomenuti da na filogenetskom stablu nije utvrđena niti jedna poveznica lokalnih sekvenci sa sekvencama uzorkovanim u Mađarskoj i Italiji, iako se radi o susjednim zemljama. Literaturni podatci o međugraničnoj HIV-1 transmisiji navode povećan utjecaj rizičnog ponašanja na širenje infekcije među osobama različite nacionalnosti. Tako na mogućnost zaraze HIV-om u inozemstvu utječe korištenje alkohola/droga prije spolnih odnosa, prisustvovanje zabavama s ciljem spolnog odnosa te inozemna putovanja radi ostvarivanja spolnih odnosa [190]. Istraživanje Von de Berghe i sur. navodi da seksualna mobilnost i obrazac ponašanja prilikom putovanja u inozemstvo uvelike utječe na širenje HIV-1 infekcije i drugih spolno prenosivih bolesti među Europljanima MSM skupine [191]. Čini se da je putovanje u inozemstvo postalo dijelom životnih navika i identiteta kod MSM skupine, pri čemu putovanje na destinacije na kojima je socijalizacija s osobama unutar iste skupine povećana, pozitivno utječe na taj trend jer na taj način osobe izbjegavaju intoleranciju unutar

vlastitog mjesta stanovanja [192]. Na odabir destinacije putovanja utječu i anti-diskriminatorne politike pojedinih zemalja. Tako je većina zemalja zapadne Europe implementirala anti-diskriminatorne zakone koji se tiču LGBT zajednice (kolektivnost lezbijki, homosekualnih, biseksualnih i transrodnih/transseksualnih osoba) pa sukladno tome gradovi poput Barcelone, Pariza, Berlina i Londona bilježe porast u LGBT turizmu. Studija EMIS (engl. *European MSM Internet study*) je pokazala da većina Europljana iz MSM skupine turistički putuje u Španjolsku, Francusku i Njemačku, gdje se formiraju mreže seksualnog rizičnog ponašanja koje doprinose širenju HIV-1 infekcije među Europljanima MSM skupine [193].

Značajan broj ispitanika sa SDRM mutacijama (92,4%) bili su uključeni u transmisijske klastere, a time je potvrđeno aktivno širenje rezistentnih varijanti virusa HIV-1 u Hrvatskoj. Većina ispitanika sa SDRM mutacijama nalazila se unutar lokalnih transmisijskih klastera (83,6%), pri čemu je transmisijski klaster sa SDRM mutacijom T215S najveći klaster koji je sudjelovao u širenju rezistencije u zemlji. Filodinamičkom analizom ustanovljeno je da je transmisijski klaster T215S jedan od najranije formiranih klastera u zemlji, a inicijalno se razvio 1992. godine. Revertantske mutacije poziciji 215 u RT su među najčešćim mutacijama detektiranim kod neliječenih osoba te mogu perzistirati godinama [194-195]. Te varijante virusa nastaju reverzijom virusnih sojeva s mutacijom T215F/Y koji se primarno razvijaju pod selekcijskim pritiskom liječenja s d4T i AZT. Čini se da virusne varijante koje nose 215C/D/S mutacije imaju replikacijski kapacitet poput divljeg tipa virusa, dok virusne varijante sa 215F/Y mutacijom imaju smanjeni replikacijski kapacitet te u odsutstvu liječenja sa d4T ili AZT vrlo brzo revertiraju u navedene varijante. U Hrvatskoj kombinacije antiretrovirusnog tretmana koje uključuju AZT ili d4T počele su se koristiti ranih 90-ih, međutim njihovo korištenje se uvelike smanjilo tijekom zadnjih 30 godina. Korištenje AZT se u 2017. godini smanjilo na <5%, dok se d4T ne propisuje u liječenju od 2012. godine. Novijih se godina najčešće koriste sljedeće kombinacije kao inicijalni tretman za neliječene novodijagnosticirane HIV-om zaražene osobe: 2 NRTI (ABC/FTC/3TC/TDF) + INSTI (DOL/RAL). Ipak, visoka prevalencija T215S revertanta u osoba zaraženih HIV-om u Hrvatskoj je postala značajkom lokalne HIV-1 infekcije i podsjetnikom o jednoj vrlo značajnoj terapiji u zemlji.

Uz SDRM mutaciju T215S, u ovoj disertaciji je dokazan značajan utjecaj SDRM mutacija K101E, T215S+L210W i T215E/L/S+L100I+K103N+V32I+I47V na aktivno širenje primarne rezistencije u zemlji. Analizom njihove kliničke značajnosti uočena je rezistencija od niske do izrazito visoke na pojedine klase lijekova. Primjerice SDRM mutacija T215S uzrokuje nisku razinu rezistencije na AZT, dok u kombinaciji sa SDRM mutacijom L210W uzrokuje umjerenu rezistenciju na AZT i nisku razinu rezistencije na ABC i TDF. Mutacija K101E uzrokuje umjerenu rezistenciju na NVP i RPV te nisku razinu rezistencije na preostale NNRTI. Obrazac mutacija

T215E/L/S+L100I9K103N+V32I+I47V uzrokuje visoku razinu rezistencije na NNRTI lijekove EFV, NVP i RPV i PI lijek FVP/r te umjerenu rezistenciju na većinu preostalih NNRTI i PI. Rezistentne varijante virusa s navedenim SDRM mutacijama nađene su isključivo unutar lokalnih transmisijskih klastera. Iako su pojedinačne karakteristike transmisijskih klastera bilo vrlo različite, kao što je dob ispitanika unutar klastera, prevalencija kliničkog AIDS-a pri inicijalnoj dijagnozi te procijenjeni vremenski period nastanka pojedinih klastera, važno je napomenuti da su svi ispitanici (osim jednog) pripadali MSM skupini. Od svih transmisijskih klastera razvoj klastera s trostrukom rezistencijom je posebice zanimljiv. Njegov inicijalni nastanak je filodinamičkom analizom procijenjen u 2008. godini, dok je sekvenca iz Ujedinjenog Kraljevstva kod koje je filogenetskom analizom uočena epidemiološka poveznica sa sekvencama iz tog klastera uzorkovana 2006. godine. Klaster zasad čini 8 ispitanika, no kako su se osobe uključivale u kliničku skrb tijekom cijelog promatranog perioda (2014. - 2017.), za očekivati je da će se tijekom idućih godina uključiti još HIV-om zaraženih osoba s ovako teškim oblikom primarne rezistencije u skrb KZIB-a.

Iako je ovom disertacijom djelomično razjašnjena epidemiologija HIV-1 infekcije u Hrvatskoj te je određena prevalencija mutacija povezanih s rezistencijom na antiretrovirusne lijekove, vrlo teško je odrediti razlog tako visoke stope primarne rezistencije i širenja rezistentnih varijanti u Hrvatskoj u odnosu na podatke iz regionalnih zemalja. Lunar i sur. su u svojoj kohorti od 163 ispitanika filogenetskom analizom utvrdili prisutnost samo 4 SDRM mutacije, pri čemu niti jedna nije sudjelovala u aktivnom širenju rezistencije u Sloveniji [87]. Jovanovic i sur. su napravili opsežnu filogenetsku i filodinamičku analizu kojom su rekonstruiralni epidemiologiju HIV-1 infekcije u Srbiji, međutim u tom istraživanju nisu analizirali širenje rezistentnih formi virusa unutar zemlje [182]. Alexiev i sur. su filogenetskom analizom sekvenci uzorkovanih u Bugarskoj pokazali da je unatoč SDRM mutacijama nađenih kod 16 ispitanika identificiran samo jedan transmisijski par s istim obrascem mutacija [89]. Istraživanje Paraskevis i sur. pokazalo je da je prevalencija primarne rezistencije HIV-1 u Grčkoj nešto niža u odnosu na europski prosjek, međutim uočena je visoka stopa aktivnog širenja primarne rezistencije, posebice NNRTI mutacija u osoba iz MSM skupine inficiranih s HIV-om podtipa A [90]. Iz navedenog je moguće izvesti zaključak da je visoka prevalencija primarne rezistencije u Hrvatskoj uvjetovana visokom stopom širenja određenih varijanti virusa (posebice T215S i K101E varijante) putem lokalnih transmisijskih mreža koje uključuju značajan udio ispitanika iz MSM skupine.

Kod nekih SDRM mutacija nije uočeno da utječu na daljnje širenje primarne rezistencije u zemlji, već su takve mutacije detektirane kod izoliranih slučajeva. Moguće je da su se pojedinci s tim SDRM mutacijama inicijalno zarazili u inozemstvu ili u kontaktu sa HIV-om zaraženim osobama iz Hrvatske koje su doživjele virusološki neuspjeh liječenja izazvan tim mutacijama, no

zbog smanjenog virusnog fitnesa nije došlo do daljnjeg prijenosa takvih mutiranih varijanti. Primjerice, za SDRM mutacije M46I, T69D, G190E, K219Q i K219R poznato je da imaju smanjeni virusni fitnes u odnosu na divlji tip virusa, stoga takve mutacije u odsutsvu selekcijskog pritiska lijeka pod kojim su nastale vrlo brzo revertiraju u divlji tip virusa [196]. Svi ispitanici koji su nosili te SDRM mutacije bili su uključeni u miješane transmisijske klastere, ali niti jedna sekvenca unutar tih klastera (niti kontrolna niti lokalna) nije nosila te mutacije.

Genotipizacija HIV-1, uključujući određivanje rezistencije na antiretrovirusne lijekove, unazad zadnjih 20 godina provodi se pomoću tehnologije SS. Razumijevanje razvoja rezistencije HIV-1, ali i kontroliranje uspješnog liječenja kod bolesnika s virusološkim neuspjehom liječenja mogući su upravo zahvaljujući konvencionalnom sekvenciranju [197-199]. Usprkos velikim pomacima u liječenju HIV-1 infekcije zahvaljujući ovoj metodi, razvoj novih tehnologija omogućuje povećanu osjetljivost u detekciji rijetkih virusnih varijanti, što ima vrlo važnu ulogu u sveobuhvatnoj procjeni rezistencije HIV-a. Genotipiziranje HIV-1 temeljeno na metodi SS može razlučiti virusne varijante prisutne u ≤20% ukupne viralne populacije, dok je razina razlučivosti metode NGS ≥1%. Udio rezistentnih varijanti u virusnoj populaciji ovisi i o stadiju HIV-1 infekcije prilikom ulaska u kliničku skrb, pri čemu neke studije navode da je detekcija primarne rezistencije tehnologijom SS viša u osoba dijagnosticiranih u akutnoj fazi infekcije u odnosu na osobe dijagnosticirane u kroničnoj fazi infekcije, iako to nije bilo potvrđeno u ovoj disertaciji [77, 78]. Nasuprot tome tehnologijom NGS moguće je detektirati rijetke virusne varijante HIV-1 neovisno o stadiju HIV-1 infekcije, međutim klinička značajnost tih rezistentnih varijanti virusa još uvijek je predmetom diskusije [93, 94, 108-111], a mnoge istraživačke grupe pokušavaju definirati njihovu ulogu u širenju rezistencije i progresiji bolesti [200-203].

U ovom dijelu istraživanja prisutnost rijetkih virusnih varijanti testirana je u kliničkim uzorcima nasumično odabranih 48 ispitanika primjenom tehnologije NGS. Cilj je bio odrediti međusobnu sukladnost između dviju platformi za sekvenciranje analizom SDRM mutacija i kliničku značajnost rijetkih virusnih varijanti. Rezultati sekvenciranja su pokazali da je međusobna podudarnost bila detektirana kod većine uzoraka (n=39/47, 82,9%). Djelomična podudarnost detektirana je u dva uzorka, u kojima je metoda NGS detektirala sve mutacija identificirane metodom SS te još dodatne mutacije koje su bile prisutne pri razini razlučivosti između 5,2% i 11,6%. Potpuna nesukladnost uočena je u šest uzoraka, od čega u 4 uzorka razlog je bila detektirana mutacija T215S pri razini razlučivosti ispod detekcije metode SS (između 9,5% i 11,6%). U preostala dva uzorka nesukladnost je utvrđena radi detekcije različitih obrazaca mutacija primjenom tih dviju platformi. Slične rezultate prijavile su i druge istraživačke grupe koje su pokazale da metoda NGS ima sposobnost detekcije mutacija koje ostaju nezapažene konvencionalnom metodom

SS te da je djelomična nesukladnost između dviju platformi moguća [204-208]. Dessilly i sur. su evaluirali sukladnost između platformi analizirajući SDRM mutacije kod 67 uzoraka. Sekvenciranje za 41 uzorak je bilo uspješno, a u 80,5% je detektiran identičan obrazac mutacija. Nesuglasnost je uočena u 8 uzoraka, od čega je u 6 uzoraka metoda NGS detektirala mutacije pri frekvenciji ispod razine razlučivosti metode SS, a u preostala 2 uzorka mutacije inicijalno detektirane s metodom SS nisu bile potvrđene s metodom NGS [204]. Tzou i sur. su analizirali mutacije u HIV-1 RT i PR genima primjenom metoda SS i NGS u 138 kliničkih uzoraka, od čega je u 79% utvrđena potpuna sukladnost između platformi. U 26 uzoraka utvrđene su dodatne mutacije metodom NGS, dok je u 4 uzorka jedino metoda SS detektirala prisutnost mutacija [205].

Suprotno rezultatima studija gdje je pokazano da rijetke rezistentne varijante mogu utjecati na razvoj primarne rezistencije HIV-a u ovom istraživanju detektirane rijetke virusne varijante nisu pokazale kliničku značajnost, odnosno nisu doprinijele razvoju virusološkog neuspjeha liječenja. Primjerice Vandenhende i sur. su zaključili da niskofrekventne rezistentne varijante detektirane prije liječenja te nakon virusološkog neuspjeha kod bolesnika koji su primali prvi puta antiretrovirusnu terapiju mogu biti uzrokom razvoja rezistencije [93]. U istraživanju je detektirana prisutnost niskofrekventnih rezistentnih varijanti s tehnologijom NGS kod više od dvije trećine ispitanika. Opažanja ovog istraživanja bila su u skladu i s drugim istraživanjima kliničke značajnosti rijetkih rezistentnih varijanti u neliječenih i liječenih HIV-om zaraženih osoba. U tim istraživanjima je uočeno da u nekim slučajevima rijetke rezistentne varijante mogu smanjiti osjetljivost na antiretrovirusne lijekove [94, 108, 109]. S druge strane istraživanje Raymond i sur. je pokazalo da rijetke rezistentne varijante nemaju nikakav učinak na virusološki neuspjeh liječenja kod neliječenih HIV-om zaraženih osoba, a Dalmat i sur. su potvrdili ova opažanja te su virusološki neuspjeh kod ispitanika s detektiranim niskofrekventnim rezistentnim varijantama pripisali lošoj adherenciji [110, 111]. Iako ovim radom nije utvrđen utjecaj rijetkih rezistentnih varijanti na razvoj primarne rezistencije virusa HIV-1, cilj je bio naglasiti važnost uvođenja novih tehnologija u rutinsku kliničku dijagnostiku i njihova kombiniranja s već uhodanim metodama, posebice u kompleksnim kliničkim slučajevima s uzastopnim virusološkim neuspjehom u kojima je vrlo teško odrediti efektivnu antiretrovirusnu terapiju.

Istraživanje napravljeno u sklopu ove doktorske disertacije predstavlja prvu sveobuhvatnu analizu molekularne epidemiologije HIV-1 infekcije u Hrvatskoj. Utvrđeno je da je epidemija lokalna te uglavnom raširena među pripadnicima MSM skupine mlađe životne dobi. Unatoč niskoj prevalenciji epidemije HIV-a u Hrvatskoj ustanovljena je izrazito visoka prevalencija primarne rezistencije na antiretrovirusne lijekove koja se unutar zemlje poglavito širi putem lokalnih transmisijskih mreža i rizičnog homoseksualnog spolnog odnosa među pripadnicima MSM skupine.

Za većinu mutacija povezanih s razvojem primarne rezistencije je potvrđeno da su klinički relevantne, što ukazuje na potrebu za kontinuiranim nadzorom primarne rezistencije pri ulasku novih bolesnika u kliničku skrb. Unatoč izrazito niskoj prevalenciji primarne rezistencije na InSTI, zbog pojave prvih slučajeva rezistencije u liječenih bolesnika tijekom protekle 4 godine te zbog izrazito visoke prevalencije rezistencije na druge klase lijekova, praćenje primarne rezistencije na InSTI je prijeko potrebno. Analizom uzoraka metodom NGS pokazano je kako ta tehnologija omogućuje visoku osjetljivost pri detekciji rijetkih virusnih varijanti te se u skorije vrijeme očekuje njezino uključivanje u rutinsku dijagnostiku infektivnih bolesti. Podatci prikupljeni ovim istraživanjem mogu poslužiti kao osnova za razvoj prevencijskih strategija u liječenju HIV-1 infekcije u Hrvatskoj i u svijetu, primjerice detekcije transmisijskih klastera u "stvarnom vremenu'' i trenutne intervencije. U zemljama sa sličnom epidemiologijom, gdje je prisutna visoka prevalencija primarne rezistencije te je većina HIV-om zaraženih osoba međusobno epidemiološki povezana putem transmisijskih mreža, taj pristup predstavlja jedan novi način preveniranja daljnjeg širenja HIV-1 epidemije.

7. ZAKLJUČCI

1. Hrvatska je zemlja s visokom prevalencijom primarne rezistencije HIV-1 na antiretrovirusne lijekove.

2. Prevalencija primarne rezistencije podjednaka je u ispitanika uključenih u kliničku skrb u ranoj i kroničnoj fazi HIV-1 infekcije.

3. Analizom primarne rezistencije HIV-1 utvrđeno je da tijekom promatranog razdoblja od 2014. do 2017. godine nije došlo do značajnog povećanja postotka novodijagnosticiranih bolesnika s primarnom rezistencijom HIV-1 na antiretrovirusne lijekove.

4. Analizom primarne rezistencije virusa HIV-1 utvrđena je viša prevalencija rezistencije na NRTI skupinu lijekova u odnosu na NNRTI i PI skupine lijekova.

5. Analizom primarne rezistencije virusa HIV-1 utvrđena je vrlo niska primarna rezistencija na InSTI skupinu lijekova.

6. Analizom učestalosti pojedinih mutacija pokazano je da je T215S mutacija, koja je povezana s razvojem rezistencije na NRTI, najčešća mutacija u ispitivanoj kohorti.

7. Analizom molekularne distribucije HIV-1 podtipova pokazano je da je HIV-1 podtip B najzastupljeniji u ispitivanoj kohorti.

8. Filogenetskom analizom je potvrđen visok postotak klasteriranja te formiranja lokalnih transmisijskih klastera u ispitivanoj kohorti.

9. Filogenetskom analizom je pokazano da tijekom razdoblja od 2014. do 2017. godine nije došlo do povećanja trenda novodijagnosticiranih HIV-1 zaraženih osoba koji se grupiraju u lokalne transmisijske lance.

10. Filogenetskom analizom je pokazano da velik broj detektiranih rezistentnih varijanti virusa sudjeluje u aktivnom širenju primarne rezistencije u Hrvatskoj.

11. Primjenom tehnologije NGS determinirana je viša stopa mutacija povezanih s rezistencijom virusa HIV-1 na antiretrovirusne lijekove u odnosu na korištenje tehnologije SS, međutim nije uvrđena klinička značajnost rijetkih rezistentnih varijanti virusa HIV-1.

8. KRATKI SADRŽAJ NA HRVATSKOM JEZIKU

Cilj ove doktorske disertacije bio je istražiti molekularnu epidemiologiju HIV-1 infekcije među prethodno neliječenim HIV-om zaraženim osobama iz Hrvatske. U istraživanje je uključeno 403 ispitanika, odnosno 92,4% svih HIV-om zaraženih osoba koje su ušle u kliničku skrb u Hrvatskoj tijekom vremenskog perioda od 2014. do 2017. godine. Prevalencija primarne rezistencije HIV-1 na inhibitore reverzne transkriptaze (RTI), proteaze (PI) i integraze (InSTI) analizirana je tehnologijom sekvenciranja po Sangeru. Ukupna prevalencija primarne rezistencije na antiretrovirusnu terapiju (ART) iznosila je 16,4%. Prevalencija rezistencija prema pojedinim klasama lijekova, nukleozidnim RTI (NRTI), nenukleozidnim RTI (NNRTI), PI i InSTI iznosila je 11,4%, 6,7%, 2,5% i 1%. U istraživanju je utvrđena i primarna rezistencija na tri klase lijekova kod 2,2% ispitanika. Uz to, 48 ispitanika je nasumično odabrano za analizu mutacija povezanih s primarnom rezistencijom na ART pomoću tehnologije sekvenciranja nove generacije, a dodatne mutacije su pronađene u 6 uzoraka. Filogenetska analiza pokazala je visok postotak klasteriranja (347/403, 86,1%) i identificirala aktivno širenje više mutacija povezanih s rezistencijom u Hrvatskoj, čak i širenje rezistencije na tri klase lijekova. Najveći klaster s mutacijom povezanom s primarnom rezistencijom na ART bio je T215S klaster, formiran od 53 ispitanika, a filodinamičkom analizom je njegov razvoj procijenjen u 1992. godini. Rezultati ove studije ukazuju na kontinuiranu potrebu za nadziranjem primarne rezistencije HIV-1 i razvoja transmisijskih klastera u Hrvatskoj.

Ključne riječi: HIV-1, molekularna epidemiologija, primarna rezistencija HIV-1, transmisijski klasteri, sekvenciranje tehnologijom nove generacije

9. KRATKI SADRŽAJ NA ENGLESKOM JEZIKU

Molecular diversity of human immunodeficiency virus type 1 and the role of transmission chains in the local spread of infection in Croatia

Maja Oroz, 2020.

The aim of this study was to investigate the molecular epidemiology of HIV-1 infection in treatment-naive HIV-1 infected persons from Croatia. Study included 403 persons, representing 92,4% of all HIV-1 positive individuals entering clinical care in Croatia in 2014-2017. The prevalence of transmitted drug resistance (TDR) to reverse transcriptase inhibitors (RTI), protease inhibitors (PI) and integrase strand-transfer inhibitors (InSTI) was assesed by Sanger sequencing. Overall prevalence of TDR was 16,4%. According to drug classes, resistance to nucleoside RTI (NRTI), non-nucleoside RTI (NNRTI), PI and InSTI was found in 11,4%, 6,7%, 2,5% and 1% of individuals, respectively. Triple-class resistance was determined in 2,2% of individuals. In addition, 48 individuals were randomly selected for next generation sequencing and additional TDR mutations were detected in 6 samples. Phylogenetic analysis showed high rate of clustering (347/403, 86,1%) and identified forward transmission of multiple TDR mutations in Croatia, even that of triple-class resistance. The largest cluster harbouring TDR consisted of 53 persons with T215S mutation and phylodinamic analysis estimated to originate in the year 1992. This data shows a continuing need for pre-treatment HIV-1 resistance testing and surveillance of local transmission networks in Croatia.

Keywords: HIV-1, molecular epidemiology, HIV-1 primary resistance, transmission clusters, next-generation sequencing

10. POPIS LITERATURE

1. Okoye AA, Picker LJ. CD4(+) T-cell depletion in HIV infection: mechanisms of immunological failure. Immunol Rev 2013;254:54-64.

2. Coleman W, Tsongalis G. Molecular Pathology: The Molecular Basis of Human Disease. 1. izd. London: Elsevier; 2009, str. 300-301.

3. Zazzi M, Hu H, Prosperi M. The global burden of HIV-1 drug resistance in the past 20 years. Peer J 2018;6:e4848

4. Faria NR, Rambaut A, Suchard MA i sur. HIV epidemiology. The early spread and epidemic ignition of HIV-1 in human populations. Science 2014;346:56-61.

5. Wertheim JO, Leigh Brown AJ, Hepler NL i sur. The global transmission network of HIV-1. J Infect Dis 2014;209:304-313.

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

7. Frost SD, Pillay D. Understanding drivers of phylogenetic clustering in molecular epidemiological studies of HIV. J Infect Dis 2015;211:856-858.

8. Salemi M, Strimmer K, Hall WW i sur. Dating the common ancestor of SIVcpz and HIV-1 group M and the origin of HIV-1 subtypes using a new method to uncover clock-like molecular evolution. FASEB J 2001;15:276-278.

9. Lemey P, Pybus OG, Wang B i sur. Tracing the origin and history of the HIV-2 epidemic. Proc Natl Acad Sci U S A 2003;100:6588-6592.

10. Vahlne A. A historical reflection on the discovery of human retroviruses. Retrovirology. 2009;6:40.

11. Gilbert PB, McKeague IW, Eisen G i sur. Comparison of HIV-1 and HIV-2 infectivity from a prospective cohort study in Senegal. Stat Med 2003;22:573-593.

12. Reeves JD, Doms RW. Human Immunodeficiency Virus Type 2. J Gen Virol 2002;83:1253-1265.

13. Peeters M, Sharp PM. Genetic diversity of HIV-1: the moving target. AIDS 2000;14Suppl 3: S129-S140.

14. Hirsch VM, Olmsted RA, Murphy-Corb M, Purcell RH, Johnson PR. An African primate lentivirus (SIV_{sm}) closely related to HIV-2. Nature 1989;339:389-392.

15. Gao F, Yue L, White AT i sur. Human infection by genetically diverse SIVsm-related HIV-2 in West Africa. Nature 1992;358:495-499.

16. Hahn BH, Shaw GM, De Cock KM, Sharp PM. AIDS as a zoonosis: scientific and public health implications. Science 2000;287:607-614.

17. Peeters M, Honore C, Huet T i sur. Isolation and partial characterization of an HIV-related virus occurring naturally in chimpanzees in Gabon. AIDS 1989;3:625-630.

18. Gao F, Bailes E, Robertson DL i sur. Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes troglodytes*. Nature 1999;397:436-441.

19. Sharp PM, Hahn BH. Prehistory of HIV-1. Nature 2008;455:605-606.

20. Swanstrom R, Coffin J. HIV-1 pathogenesis: the virus. Cold Spring Harb Perspect Med 2012;2:a007443.

21. The Joint United Nations Programme on HIV/AIDS (UNAIDS); 2019 [pristup: 15.09.2019.] Dostupno na: https://www.unaids.org/en/resources/fact-sheet.

22. Hrvatski zavod za javno zdravstvo; 2018 [pristup 01.09.2019.] Dostupno na: https://www.hzjz.hr/sluzba-epidemiologija-zarazne-bolesti/epidemiologija-hiv-infekcije-i-aids-a-u-hrvatskoj/

23. Hemelaar J, Gouws E, Ghys PD. Global trends in molecular epidemiology of HIV-1 during 2000-2007. AIDS 2011;25:679-689.

24. Simon F, Mauclere P, Roques P i sur. Identification of a new human immunodeficiency virus type 1 distinct from group M and group O. Nat Med 1998;4:1032-1037.

25. Hemelaar J. The origin and diversity of the HIV-1 pandemic. Trends Mol Med 2012;18:182-192.

26. Korber B, Gaschen B, Yusim K, Thakallapally R, Kesmir C, Detours V. Evolutionary and immunological implications of contemporary HIV-1 variation. Br Med Bull 2001;58:19-42.

27. Robertson DL, Anderson JP, Bradac JA i sur. HIV-1 nomenclature proposal. Science 2000;288:55-56.

28. HIV Sequence Database: HIV Circulating Recombinant Forms (CRFs); 2019 [pristup 18.09.2019.] Dostupno na: https://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/CRFs/CRFs.html

29. Hemelaar J, Gouws E, Ghys PD, Osmanov S. Global and regional distribution of HIV-1 genetic subtypes and recombinants in 2004. AIDS 2006;20:W13-23.

30. Abecasis AB, Wensing AM, Paraskevis D, Vercauteren J, Theys K, Van de Vijver DA i sur. HIV-1 subtype distribution and its demographic determinants innewly diagnosed patients in Europe suggest highly compartmentalized epidemics. Retrovirology 2013;10:7.

31. Hemelaar J, Elangovan R, Yun J, Dickson-Tetteh L, Fleminger I, Kirtley S i sur. Global and regional molecular epidemiology of HIV-1, 1990-2015: a systematic review, global survey, and trend analysis. Lancet Infect Dis 2019;19:143-155.

32. Casado C, Urtasun I, Saragosti S i sur. Different distribution of HIV type 1 genetic variants in European patients with distinct risk practices. AIDS Res Hum Retroviruses 2000;16:299-304.

33. Kuiken C, Thakallapalli R, Esklid A, de Ronde A. Genetic analysis reveals epidemiologic patterns in the spread of human immunodeficiency virus. J Epidemiol 2000;152:814-822.

34. 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;46:180-189.

35. Carvalho A, Costa P, Triunfante V, Branca F, Rodrigues F, Santos CL i sur. Analysis of al ocal HIV-1 epidemic in Portugal highlights established transmission of non-B and non-G subtypes. J. Clin Microbiol 2015;53:1506-1514.

36. Esteves A, Parreira R, Piedade J, Venenno T, Franco M, Germano de Sousa J i sur. Spreading of HIV-1 subtype G and envB/gagG recombinant strains among injecting drug users in Lisbon, Portugal. AIDS Res Hum Retrovir 2003;19:511-517.

37. Paraskevis D, Magiorkinis E, Magiorkinis G, Sypsa V, Paparizos V, Lazanas M. Increasing prevalence of HIV-1 subtype A in Greece: estimating epidemic history and origin. J Infect Dis 2007;196:1167-1176.

38. Paraschiv S, Otelea D, Dinu M, Maxim D, Tinischi M. Polymorphisms and resistance mutations in the protease and reverse transcriptase genes of HIV-1F subtype Romanian strains. Int J Infect Dis 2007;11:123-128.

39. Ramirez-Piedad MK, Židovec Lepej S, Yerly S, Begovac J. High prevalence of non-B HIV-1 subtypes in seamen and their sexual partners in Croatia. J Med Virol 2009;81:573-577.

40. German Advisory Committee Blood (Arbeitskreis Blut), Subgroup 'Assessment of Pathogens Transmissible by Blood'. Human Immunodeficiency Virus (HIV). Transfus Med Hemother 2016;43:203-222.

41. Fanales-Belasio E, Raimondo M, Suligoi B, Butto S. HIV virology and pathogenetic mechanisms of infection: a brief overview. Ann Ist Super Sanita 2010;46:5-14.

42. Alkhatib G, Broder CC, Berger EA. Cell type-specific fusion cofactors determine human immunodeficiency virus type 1 tropism for T-cell lines versus primary macrophages. J Virol 1996; 70:5487-5494.

43. Engelman AN, Singh PK. Cellular and molecular mechanisms of HIV-1 integration targeting. Cell Mol Life Sci 2018;75:2491-2507.

44. Hoffmann C, Rockstoh JK. HIV. 19 izd. Hamburg: Medizin Vokus Verlag, Hamburg; 2011, str. 66-68.

45. Troyer RM, McNevin J, Liu Y i sur. Variable fitness impact of HIV-1 escape mutations to cytotoxic T lymphocyte (CTL) response. PLoS Pathog 2009;5:e1000365.

46. Zhuang J, Jetzt AE, Sun G i sur. Human immunodeficiency virus type 1 recombination: rate, fidelity, and putative hot spots. J Virol 2002;76:11273-11282.

47. Ramirez BC, Simon-Loriere E, Galetto R, Negroni M. Implications of recombination for HIV diversity. Virus Res 2008;134:64-73.

48. Wei X, Ghosh SK, Taylor ME i sur. Viral dynamics in human immunodeficiency virus type 1 infection. Nature 1995;373:117-122.

49. Martinez-Picado J, Martınez MA. HIV-1 reverse transcriptase inhibitor resistance mutations and fitness: A view from the clinic and ex vivo. Virus Res 2008;134:104-123.

50. Rawson JMO, Nikolaitchik OA, Keele BF, Pathak VK, Hu WS. Recombination is required for efficient HIV-1 replication and the maintenance of viral genome integrity. Nucleic Acids Res 2018;46:10535-10545.

51. Clementi M, Lazzarin A. Human immunodeficiency virus type 1 fitness and tropism: concept, quantification, and clinical relevance. Clin Microbiol Infect 2010;16:1532-1538.

52. Moutouh L, Corbeil J, Richman DD. Recombination leads to the rapid emergence of HIV-1 dually resistant mutants under selective drug pressure. Proc Natl Acad Sci USA 1996;93:6106-6111.

53. Mendell GL, Bennett JE, Dolin R. Principles and practice of infectious diseases. 7. izd. Philadelphia: Elsevier; 2010, str. 2323-2337.

54. Hrvatska udruga za borbu protiv HIV-1 i virusnog hepatitisa; 2011 [pristup: 20.09.2019.] Dostupno: http://huhiv.hr/kako-izgleda-tijek-hiv-infekcije-i-koji-su-simptomi-prisutni/.

55. Cohen MS, Shaw GM, McMichael AJ, Haynes BF. Acute HIV-1infection. N Engl J Med 2011;364:1943-1954.

56. Wei X, Decker JM, Wang S, Hui H, Kappes JC, Wu X. Antibody neutralization and escape by HIV-1. Nature 2003;422:307-312.

57. Vanhamel J, Bruggemans A, Debyser Z. Establishment of latent HIV-1 reservoirs: what do we really know? J Virus Erad 2019;5:3-9.

58. Harrold SM, Wang G, McMahon DK i sur. Recovery of replication-competent HIV type 1-infected circulating monocytes from individuals receiving antiretroviral therapy. AIDS Res Hum Retroviruses 2002;18:427-34.

59. Zhang H, Dornadula G, Beumont M i sur. Human immunodeficiency virus type 1 in the semen of men receiving highly active antiretroviral therapy. N Engl J Med 1998;339:1803-1809.

60. Hellmuth J, Valcour V, Spudich S. CNS reservoirs for HIV: implications for eradication. J Virus Erad 2015;1:67-71.

61. Roederer M, Dubs JG, Anderson MT, Raju PA, Herzenberg LA, Herzenberg LA.CD8 naive T cell counts decrease progressively in HIV-infected adults. J Clin Invest 1995;95:2061-2066.

62. Sieg SF, Bazdar DA, Harding CV, Lederman MM. Differential expression of interleukin-2 and gamma interferon in human immunodeficiency virus disease. J Virol 2001;75:9983-9985.

63. Mudd JC, Lederman MM. CD8 T cell persistence in treated HIV infection. Curr Opin HIV AIDS 2014;9:500-505.

64. Margolick JB, Munoz A, Donnenberg AD i sur. Failure of T-cell homeostasis preceding AIDS in HIV-1 infection. The Multicenter AIDS Cohort Study. Nat Med 1995;1:674-680.

65. Roederer M, Dubs JG, Anderson MT, Raju PA, Herzenberg LA, Herzenberg LA. CD8 naive T cell counts decrease progressively in HIV-infected adults. J Clin Invest 1995;95:2061-2066.

66. Shirai A, Cosentino M, Leitman-Klinman SF, Klinman DM. Human immunodeficiency virus infection induces both polyclonal and virus-specific B cell activation. J Clin Invest 1992;89:561-566.

67. Nagase H, Agematsu K, Kitano K i sur. Mechanism of hypergammaglobulinemia by HIV infection: circulating memory B-cell reduction with plasmacytosis. Clin Immunol 2001;100:250-259.

68. Moir S, Malaspina A, Ogwaro KM i sur. HIV-1 induces phenotypic and functional perturbations of B cells in chronically infected individuals. Proc Natl Acad Sci USA 2001;98:10362-10367.

69. Arts EJ, Hazuda DJ. HIV-1 Antiretroviral Drug Therapy. Cold Spring Harb Perspect Med 2012;2:a007161.

70. European AIDS Clinical Society (EACS) Guidelines, Version 9.1.; 2018 [pristup 22.09.2019.] Dostupno na: http://www.eacsociety.org/files/2018_guidelines-9.1-english.pdf.

71. Saag MS, Benson CA, Gandhi RT. Antiretroviral Drugs for Treatment and Prevention of HIV Infection in Adults: 2018 Recommendations of the International Antiviral Society-USA Panel. JAMA 2018;320:379-396.

72. U.S. Food and Drug Administration (FDA): Antiretroviral drugs used in the treatment of HIV infection; 2019 [pristup 23.09.2019.] Dostupno na: https://aidsinfo.nih.gov/understanding-HIV-1ids/fact-sheets/21/58/fda-approved-hiv-medicines.

73. European Medicines Agency (EMA): HIV and AIDS; 2019 [pristup 23.09.2019.] Dostupno na: https://www.ema.europa.eu/en/HIV-1ids.

74. Abram ME, Ferris AL, Shao W, Alvord WG, Hughes SH. Nature, position, and frequency of mutationsmade in a single cycle of HIV-1 replication. J Virol 2010;84:9864–9878.

75. Olabode AS, Kandathil SM, Lovell SC, Robertson DL. Adaptive HIV-1 evolutionary trajectories are constrained by protein stability. Virus Evol 2017;3:vex019.

76. Quinones-Mateu ME, Arts EJ. Fitness of drug resistant HIV-1: methodology and clinical implications. Drug Resist Updat 2002;5:224-33.

77. Yanik EL, Napravnik S, Hurt CB i sur. Prevalence of transmitted antiretroviral drug resistance differs between acutely and chronically HIV-infected patients. J Acquir Immune Defic Syndr 2012;61:258-262.

78. Salomon H, Wainberg MA, Brenner B i sur. Prevalence of HIV-1 resistant to antiretroviral drugs in 81 individuals newly infected by sexual contact or injecting drug use. Investigators of the Quebec Primary Infection Study. AIDS 2000;14:F17-23.

79. Vanhamel J, Bruggemans A, Debyser Z. Establishment of latent HIV-1 reservoirs: what do we really know? J Virus Erad 2019;5:3-9.

80. Smith DM, Wong JK, Shao H i sur. Long-term persistence of transmitted HIV drug resistance in male genital tract secretions: implications for secondary transmission. J Infect Dis 2007;196:356-360.

81. Kiessling AA, Fitzgerald LM, Zhang D i sur. Human immunodeficiency virus in semen arises from a genetically distinct virus reservoir. AIDS Res Hum Retroviruses 1998;14Suppl 1:S33-41.

82. Van Zyl G, Bale MJ, Kearney MF. HIV evolution and diversity in ART-treated patients. Retrovirology 2018;15:14.

83. World Health Organisation (WHO): Update of recommendations on first- and second-line antiretroviral regimens; 2019 [pristup 30.03.2020.] Dostupno na: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/325892/WHO-CDS-HIV-19.15-eng.pdf?ua=1

84. Begovac J, Zekan A, Skoko-Poljak D. Twenty years of human immunodeficiency virus infection in Croatia-an epidemic that is still in an early stage. Coll Antropol. 2006; 30:17-23.

85. Grgic I, Židovec Lepej S, Lunar MM i sur. The prevalence of transmitted drug resistance in newly diagnosed HIV-infected individuals in Croatia: the role of transmission clusters of men who have sex with men carrying the T215S surveillance drug resistance mutation. AIDS Res Hum Retroviruses 2013;29:329-336.

86. Hofstra, LM, Sauvageot N, Albert J i sur. Transmission of HIV Drug Resistance and the Predicted Effect on Current First-line Regimens in Europe. Clin Infect Dis 2016;62:655-663.

87. Lunar MM, Židovec Lepej S, Tomažič J i sur. HIV-1 transmitted drug resistance in Slovenia and its impact on predicted treatment effectiveness: 2011-2016 update. PLoS One 2018;13:e0196670.

88. Stanojevic M, Siljic M, Salemovic D i sur.Ten years survey of primary HIV-1 resistance in Serbia: the occurrence of multiclass resistance. AIDS Res. Hum Retroviruses 2014;30:634-641.

89. Alexiev I, Shankar A, Wensing AM i sur. Low HIV-1 transmitted drug resistance in Bulgaria against a background of high clade diversity. J Antimicrob Chemother 2015;70:1874-1880.

90 Paraskevis D, Kostaki E, Magiorkinis G i sur. Prevalence of drug resistance among HIV-1 treatment-naive persons in Greece during 2003-2015: transmitted drug resistance is due to onward transmissions. Infect Genet Evol 2017;54:183-191.

91. Temereanca A, Ene L, Mehta S i sur. Transmitted HIV drug resistance in treatment-naive Romanian persons. J Med Virol 2013;85:1139-1147.

92. Mezei M, Ay E, Koroknai A i sur. Molecular epidemiological analysis of env and pol sequences in newly diagnosed HIV type 1-infected, untreated persons in Hungary. AIDS Res Hum Retroviruses 2011;27:1243-1247.

93. Vandenhende MA, Bellecave P, Recordon-Pinson P i sur. Prevalence and evolution of low frequency HIV drug resistance mutations detected by ultra deep sequencing in patients experiencing first line antiretroviral therapy failure. PLoS One 2014;9:e86771.

94. Johnson JA, Li JF, Wei X i sur. Minority HIV-1 drug resistance mutations are present in antiretroviral treatment-naive populations and associate with reduced treatment efficacy. PLoS Med 2008;5:e158.

95. Young FE. The role of the FDA in the effort against AIDS. Public Health Rep 1988;103:242-245.

96. Tantillo C, Ding J, Jacobo-Molina A i sur. Locations of anti-AIDS drug binding sites and resistance mutations in the three-dimensional structure of HIV-1 reverse transcriptase. Implications for mechanisms of drug inhibition and resistance. J Mol Biol 1994;243:369-387.

97. Lv Z, Chu Y, Wang Y. HIV protease inhibitors: a review of molecular selectivity and toxicity. HIV AIDS (Auckl) 2015;7:95-104.

98. Anstett K, Brenner B, Mesplede T, Wainberg MA. HIV drug resistance against strand transfer integrase inhibitors. Retrovirology 2017;14:36.

99. Blanco JL, Marcelin AG, Katlama C, Martinez E. Dolutegravir resistance mutations: lessons from monotherapy studies. Curr Opin Infect Dis 2018;31:237-245.

100. Tang MW, Shafer RW. HIV-1 antiretroviral resistance: scientific principles and clinical applications. Drugs 2012;72:1-25.

101. Karger BL, Guttman A. DNA sequencing by Capillary Electrophoresis. Electrophoresis 2009;30 Suppl 1:S196-S202.

102. Stanford University: Stanford University HIV Drug Resistance Database [Pregledano: prosinac, 2016. - rujan, 2019.] Dostupno na: http://hivdb.stanford.edu/DR/.

103. Grant PM, Zolopa AR. The use of resistance testing in the management of HIV-1-infected patients. Curr Opin HIV AIDS 2009;4:474-80.

104. Gibson RM, Schmotzer CL, Quinones-Mateu ME. Next-generation sequencing to help monitor patients infected with HIV: ready for clinical use? Curr Infect Dis Rep 2014;16:401.

105. Illumina: An introduction to Next-Generation Sequencing Technology; 2015 [Pregledano 25.09.2019] Dostupno na:
https://www.illumina.com/documents/products/illumina_sequencing_introduction.pdf

106. Cooper GM, Hausman RE. The Cell: A Molecular Approach. 6 izd. Washington, D.C.: ASM Press; 2013: str 164-167.

107. Gianella S, Richman DD. Minority variants of drug-resistant HIV. J Infect Dis 2010;202:657-666.

108. Chen X, Zou X, He J, Zheng J, Chiarella J, Kozal MJ. HIV Drug Resistance Mutations (DRMs) Detected by Deep Sequencing in Virologic Failure Subjects on Therapy from Hunan Province, China. PLOS One 2016;11:e0149215.

109. Todesco E, Rodriguez C, Morand-Joubert L i sur. Improved detection of resistance at failure to a tenofovir, emtricitabine and efavirenz regimen by ultradeep sequencing. J Antimicrob Chemother 2015;70:1503-1506.

110. Raymond S, Nicot F, Pallier C i sur. Impact of HIV-1 minority variants on the virus response to a rilpivirine-based first line regimen. Clin Infect Dis 2018;66:1588-1594.

111. Dalmat RR, Makhsous N, Pepper GG i sur. Limited Marginal Utility of Deep Sequencing for HIV Drug Resistance Testing in the Age of Integrase Inhibitors. J Clin Microbiol 2018;56:e01443-18.

112. Giardina F, Romero-Severson EO, Albert J, Britton T, Leitner T. Inference of Transmission Network Structure from HIV Phylogenetic Trees. PLoS Comput Biol 2017;13:e1005316.

113. Liljeros F, Edling CR, Amaral LAN, Stanley HE, Aberg Y. The web of human sexual contacts. Nature 2001;411:907-908.

114. Graw F, Leitner T, Ribeiro RM. Agent-based and phylogenetic analyses reveal how HIV-1 moves between risk groups: injecting drug users sustain the heterosexual epidemic in Latvia. Epidemics 2012;4:104-116.

115. Stumpf MP, Wiuf C, May RM. Subnets of scale-free networks are not scale-free: sampling properties of networks. Proc Natl Acad Sci USA 2005;102:4221-4224.

116. Grenfell BT, Pybus OG, Gog JR i sur. Unifying the epidemiological and evolutionary dynamics of pathogens. Science 2004;303:327-332.

117. Yang Z, Rannala B. Molecular phylogenetics: principles and practice. Nat Rev Genet 2012;13:303-314.

118. Svennblad B, Erixon P, Oxelman B, Britton T. Fundamental differences between the methods of maximum likelihood and maximum posterior probability in phylogenetics. Syst Biol 2006;55:116-121.

119. Wohl S, Schaffner SF, Sabeti PC. Genomic Analysis of Viral Outbreaks. Annu Rev Virol 2016;3:173-195.

120. Kuhnert D, Wu CH, Drummond AJ. Phylogenetic and epidemic modeling of rapidly evolving infectious diseases. Infect Genet Evol 2011;11:1825-1841.

121. Drummond AJ, Rambaut A. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. BMC Evol Biol 2007;7:214.

122. Castro-Nallar E, Perez-Losada M, Burton GF, Crandall KA. The evolution of HIV: inferences using phylogenetics. Mol Phylogenet Evol 2012;62:777-792.

123. Leitner T. Phylogenetics in HIV transmission: taking within-host diversity into account. Curr Opin HIV AIDS 2019;14:181-187.

124. Leitner T, Escanilla D, Franzen C, Uhlen M, Albert J. Accurate reconstruction of a known HIV-1 transmission history by phylogenetic tree analysis. Proc Natl Acad Sci USA 1996; 93:10864-10869.

125. Lemey P, Derdelinckx I, Rambaut A i sur. Molecular footprint of drug-selective pressure in a human immunodeficiency virus transmission chain. J Virol 2005;79:11981-11989.

126. Bruhn CA, Audelin AM, Helleberg M i sur. The origin and emergence of an HIV-1 epidemic: from introduction to endemicity. AIDS 2014;28:1031-1040.

127. Wertheim JO, Leigh Brown AJ, Hepler NL i sur. The global transmission network of HIV-1. J Infect Dis 2014;209:304-313.

128. Esbjornsson J, Mild M, Audelin A i sur. HIV-1 transmission between MSM and heterosexuals, and increasing proportions of circulating recombinant forms in the Nordic countries. Virus Evol 2016;2:vew010.

129. Grabowski MK, Lessler J, Redd AD i sur. The role of viral introductions in sustaining community-based HIV epidemics in rural Uganda: evidence from spatial clustering, phylogenetics, and egocentric transmission models. PLoS Med 2014;11:e1001610.

130. Kostaki EG, Flampouris A, Karamitros T i sur. Spatiotemporal Characteristics of the Largest HIV-1 CRF02_AG Outbreak in Spain: Evidence for Onward Transmissions. Front Microbiol 2019;10:370.