Mutacije povezane s rezistencijom virusa ljudske imunodeficijencije tipa 1 na antiretrovirusne lijekove

Planinić, Ana

Doctoral thesis / Disertacija

2014

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:752606

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-19**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

Ana Planinić

MUTACIJE POVEZANE S REZISTENCIJOM VIRUSA LJUDSKE IMUNODEFICIJENCIJE TIPA 1 NA ANTIRETROVIRUSNE LIJEKOVE

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2014.

University of Zagreb

FACULTY OF SCIENCE
DIVISION OF BIOLOGY

Ana Planinić

MUTATIONS ASSOCIATED WITH ANTIVIRAL DRUG RESISTANCE IN HIV-1

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2014.

Ovaj doktorski rad izrađen je u Odjelu za molekularnu dijagnostiku i protočnu citometriju Klinike za infektivne bolesti ˝Dr. Fran Mihaljević˝, Zagreb, pod vodstvom dr.sc. Snježane Židovec Lepej, znanstvene savjetnice, u sklopu Sveučilišnog poslijediplomskog doktorskog studija Biologije pri Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Dio ovog istraživanja izrađen je u Laboratoriju za molekularnu genetiku Nacionalnog instituta za infektivne bolesti ˝Prof. dr. Matei Bals˝, Bukurešt, Rumunjska.

Zahvaljujem se mentorici dr. sc. Snježani Židovec Lepej na pruženoj pomoći i savjetima pri izradi doktorskog rada.

Zahvaljujem se i na pomoći prof. dr. sc. Josipa Begovca koji mi je pomogao pri analizi rezultata ovog doktorskog rada.

Kolegicama iz Odjela za molekularnu dijagnostiku i protočnu citometriju Klinike za infektivne bolesti, prof. biol. Bruni Bolarić, dr. sc. Ivani Grgić, mag. mol. biol. Ivani Baća Vrakela, mag. mol. biol. Lani Gorenec, mag. med. biok. Janji Iščić-Beš, mag. mol. biol. Nataši Kutela Krilić, Jasni Ćosić, bacc. med. lab. diagn., zahvaljujem na savjetima i ugodnom okruženju tijekom zajedničkog rada.

Zahvalila bih se svim djelatnicima Laboratorija za molekularnu genetiku Nacionalnog instituta za infektivne bolesti ˝Prof. dr. Matei Bals˝ u Bukureštu, a posebno dr. sc. Danu Otelea i dr.sc. Simoni Paraschiv, koji su mi pomogli pri izradi dijela rezultata ovog istraživanja.

Hvala mojoj Matei, Marijani, Maji i Luciji koje su uz mene od početka školovanja.

Mojim roditeljima i sestri hvala na beskrajnoj podršci što mi je pružaju cijeli život.

Ana Planinić

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Doktorski rad

MUTACIJE POVEZANE S REZISTENCIJOM VIRUSA LJUDSKE IMUNODEFICIJENCIJE TIPA 1 NA ANTIRETROVIRUSNE LIJEKOVE

ANA PLANINIĆ
Klinika za infektivne bolesti ″Dr. Fran Mihaljević″, Mirogojska 8, 10 000 Zagreb

Cilj ovog istraživanja bio je odrediti prevalenciju rezistencije virusa ljudske imunodeficijencije tipa 1 (*Human immunodeficiency virus* type 1, HIV-1) na antiretrovirusne lijekove u liječenih zaraženih osoba primjenom dvije metode (analiza u jednoj vremenskoj točki i metoda kumulativne rezistencije), analizirati učestalost pojave klinički značajnih mutacija povezanih s rezistencijom na antiretrovirusne lijekove, odrediti distribuciju subtipova HIV-a, te na odabranim uzorcima usporediti metodu ″ultra-deep″-sekvenciranja (UDS) sa standardnom metodom sekvenciranja. Prevalencija rezistencije HIV-a na lijekove i subtipove HIV-a odredila se analizom dijela regije *pol* genoma virusa i različitim intepretativnim algoritmima u osoba s virološkim neuspjehom u periodu od 2008. do kraja 2012. Mutacije povezane s rezistencijom HIV-a na antiretrovirusne lijekove detektirane su u 50% uzoraka, od kojih je najzastupljenija M184V (26.7% uzoraka). Rezistencija na nukleozidne inhibitore reverzne transkriptaze dokazana je u 39.5%, na nenukleozidne inhibitore reverzne transkriptaze u 42%, a na inhibitore proteaze u 5.8% uzoraka. Većina ispitanika (71%) bila je zaražena subtipom B HIV-1. Značajna razlika između dviju metoda za procjenu prevalencije rezistencije nije opažena za ispitivanu skupinu. UDS je detektiralo 65 od 85 (77.3%) mutacija koje nisu otkrivene standardnom metodom sekvenciranja. Ovim istraživanjem po prvi se put procijenila prevalencija rezistencije HIV-a na antiretrovirusne lijekove u liječenih bolesnika iz Hrvatske te analizirali obrasci mutacija u uvjetima selektivnog pritiska antiretrovirusnih lijekova. UDS je pokazalo prisutnost mutacija niske prevalencije koje su mogući uzrok neuspjeha terapije bolesnika te pružilo dodatne informacije o genetičkoj raznolikosti virusa.

(107 stranica, 13 slika, 27 tablica, 156 literaturna navoda, jezik izvornika hrvatski)

Rad je pohranjem u Središnjoj biološkoj knjižnici, Rooseveltov trg 6 i u Nacionalnoj sveučilišnoj knjižnici

Ključne riječi: HIV tipa 1, antiretrovirusno liječenje, subtip HIV-a tipa 1, ultra-deep-sekvenciranje

Mentor: dr.sc. Snježana Židovec Lepej, znanstvena savjetnica

Ocjenjivači: izv. prof. dr. sc. Dijana Škorić, dr. sc. Maja Šantak, viša znan. sur., dr. sc. Andreja Ambriović Ristov, viša znan. sur.
Rad prihvaćen: 10.04.2014.

University of Zagreb
Faculty of Science
Division of Biology

Doctoral thesis

MUTATIONS ASSOCIATED WITH ANTIVIRAL DRUG RESISTANCE IN HIV-1

ANA PLANINIĆ

University Hospital for Infectous Diseases ˝Dr. Fran Mihaljević˝, Mirogojska 8, 10 000, Zagreb

The aim of this study was to: determine the prevalence of *Human immunodeficiency virus* type 1 (HIV-1) resistance to antiretroviral drugs in treatment-experienced patients using two methods (single-point analysis, cumulative model), the distribution of HIV subtypes, analyze frequency of clinicaly relevant resistance mutations, and to compare results of ultra-deep sequencing (UDS) with standard sequencing method on selected samples. The prevalence of resistance and viral subtypes were determined by analyzing HIV *pol* genomic region and by applying different resistance interpretation algorithms in persons with treatment failure in the period 2008-2012. Resistance mutations were detected in 50% of samples and the most frequent was M184V (26.7% of samples). The resistance to nucleoside analogues reverse transcriptase inhibitors was found in 39.5%, to non-nucleoside analogues reverse transcriptase inhibitors in 42% and to protease inhibitors in 5.8% of samples. The majority of patients were infected with HIV-1 subtype B (71%). No significant difference was found between two methods when estimating the prevalence of resistance to drugs. A total of 65 out of 85 (77.3%) mutations revealed by UDS were not identified by standard sequencing method. For the first time in Croatia, this study showed the prevalence of HIV-resistance to antiretroviral drugs in patients subjected to treatment and analyzed the patterns of mutations in an enviroment under drug presure. UDS identified minor drug-resistance variants which may be the reason of treatment failure and revealed additional information about genetic variability of the virus.

(107 pages, 13 figures, 27 tables, 156 references, original in Croatian)

Thesis is doposited in The Central Biological Library, Rooseveltov trg 6, and National and University Library

Key words: HIV type 1, antiretroviral treatment, HIV-1 subtype, ultra-deep sequencing

Supervisor: Snježana Židovec Lepej, PhD, Scientific Adviser

Rewievers: Dijana Škorić, PhD, Associate Professor, Maja Šantak, PhD, Senior Associated Researcher, Andreja Ambriović Ristov, PhD, Senior Associated Researcher

Thesis accepted: 10.04.2014.

SADRŽAJ

1. UVOD 1

1.1. Definicija problema 1

1.2. Ciljevi rada 1

1.3. Radne hipoteze 2

1.4. Zadaci rada i metodologija istraživanja 2

2. LITERATURNI PREGLED 4

2.1. Virus ljudske imunodeficijencije 4

2.1.1. Klasifikacija HIV-1 4

2.1.2. Struktura i genom HIV-1 6

2.1.3. Ciklus i tropizam HIV-1 9

2.1.4. Genska varijabilnost i fitnes HIV-1 10

2.1.5. Imunopatogeneza HIV-1-infekcije 11

2.1.6. Epidemiologija HIV-1-infekcije 12

2.1.7. Antiretrovirusno liječenje 12

2.1.7.1. Inhibitori reverzne transkriptaze 13

2.1.7.2. Inhibitori proteaze 15

2.1.7.3. Inhibitori integraze 16

2.1.7.4. Inhibitori ulaska virusa u stanicu 16

2.1.8. Rezistencija na antiretrovirusne lijekove 17

2.1.8.1. Rezistencija na nukleozidne i nukleotidne inhibitore reverzne transkriptaze 20

2.1.8.2. Rezistencija na nenukleozidne inhibitori reverzne transkriptaze 22

2.1.8.3. Rezistencija na inhibitore proteaze 22

2.1.8.4. Rezistencija na inhibitore integraze 24

2.1.8.5. Rezistencija na inhibitore ulaska virusa u stanicu 24

2.1.9. Laboratorijske metode za određivanje rezistencije HIV-a na antiretrovirusne lijekove 25

2.1.9.1. Genotipizacijski testovi 25

2.1.9.2. Metode detekcije manjinskih HIV-1-rezistentnih varijanti 31

2.1.10. Istraživanja prevalencije rezistencije HIV-a na antiretrovirusne lijekove u Europi 33

3. MATERIJALI I METODE 35

3.1. Ispitanici 35

3.2. Biološki uzorci 35

3.3. Reagencije 36

3.3.1. Kompleti reagencija za kvantifikaciju HIV-1-RNA 36

3.3.2. Komplet reagencija za izolaciju HIV-1-RNA 36

3.3.3. Komplet reagencija za određivanje genotipske rezistencije HIV-a na antiretrovirusne lijekove 36

3.3.4. Kompleti reagencija za potrebe sekvenciranja amplikona HIV-1-RT i -PR metodom ˝ultra-deep˝-sekvenciranja 36

3.3.5. Kompleti reagencije za protočnu citometriju 37

3.4. Oprema i potrošni materijal 38

3.5. Metode 40

3.5.1. Kvantifikacija HIV-1-RNA u plazmi 40

3.5.2. Izolacija RNA za test rezistencije i genotipizaciju HIV-1 40

3.5.3. Sekvenciranje gena *pol* HIV-1 41

3.5.3.1. RT-PCR 41
3.5.3.2. CLIP-reakcija sekvenciranja PCR-amplikona 41
3.5.3.3. Elektroforeza i analiza sekvenci 42
3.5.3.4. Određivanje rezistencije HIV-a na antiretrovirusne lijekove 42
3.5.4. Genotipizacija HIV-a 43
3.5.5. Određivanje prevalencije rezistencije HIV-1 na antiretrovirusne lijekove 44
3.5.5.1. Metoda 1-analiza u jednoj vremenskoj točki 44
3.5.5.2. Metoda 2-model kumulativne rezistencije 44
3.5.6. Sekvenciranje amplikona HIV-1-RT i -PR metodom ″ultra deep″-sekvenciranja 45
3.5.6.1. Izolacija RNA i sinteza cDNA za sekvenciranje amplikona HIV-1-RT i -PR 45
3.5.6.2. Sinteza amplikona za sekvenciranje amplikona HIV-1-RT i -PR 46
3.5.6.3. EmPCR 46
3.5.6.4. Postupak sekvenciranja na sekvenceru GS Junior 47
3.5.7. Imunofenotipizacija limfocita periferne krvi protočnom citometrijom 48
3.5.8. Baza podataka 48
3.5.9. Statistička analiza 48
4. REZULTATI 49
4.1. Ispitanici 49
4.2. Mutacije povezane s rezistencijom na antiretrovirusne lijekove 50
4.2.1. Mutacije povezane s rezistencijom na NRTI 50
4.2.2. Mutacije povezane s rezistencijom na NNRTI 50
4.2.3. Mutacije povezane s rezistencijom na PI 56
4.3. Rezistencija HIV-a na antiretrovirusne lijekove prema algoritmu Trugene 59
4.4. Interpretacija i usporedba genotipske rezistencije HIV-1 prema algoritmima ANRS, Stanford HIVdb i Rega 59
4.5. Analiza nesukladnih rezultata rezistencije primjenom tri bioinformatička algoritma 63
4.6. Analiza nesukladnosti rezultata testova rezistencije obzirom na subtipove HIV-a 64
4.7. Usporedba interpretacije genotipizacijskih podataka jednog algoritma s drugim 64
4.8. Genotipizacija HIV-1 65
4.9. Prevalencija rezistencije HIV-1 na antiretrovirusne lijekove 67
4.9.1. Određivanje prevalencije rezistencije HIV-a na antiretrovirusne lijekove metodom analize u jednoj vremenskoj točki (metoda 1) 68
4.9.2. Određivanje prevalencije rezistencije HIV-a na antiretrovirusne lijekove metodom analize kumulativne rezistencije (metoda 2) 69
4.10. Detekcija rijetkih rezistentnih varijanti HIV-1 metodom ″ultra-deep″-sekvenciranja 71
5. RASPRAVA 74
6. ZAKLJUČCI 84
7. LITERATURA 85
8. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA 101
9. ŽIVOTOPIS 103

1. UVOD

Virus ljudske imunodeficijencije tipa 1 (HIV-1, engl. *Human immunodeficiency virus* type 1) je RNA-virus koji se ubraja u porodicu *Retroviridae*, rod *Lentivirus* (1). Infekcija s HIV-1 uzrokuje progresivnu depleciju CD4+-T-limfocita i trajnu hiperaktivaciju imunosnog sustava zaraženih osoba i ako se ne liječi uzrokuje smrt. HIV-1-infekcija se liječi vrlo djelotvornim antiretrovirusnim lijekovima (HAART, engl. *Highly active antiretroviral treatment*) koji su se pokazali učinkovitim u kontroliranju progresije HIV-a i produženju života, ali korist od njih može biti kompromitirana razvojom rezistencije (2). U bolesnika koji imaju mjerljivu viremiju u plazmi usprkos antiretrovirusnom liječenju razumno je za pretpostaviti da je nastala rezistencija HIV-a na antiretrovirusne lijekove (3, 4).

1.1. Definicija problema

Na molekularnoj razini rezistencija se povezuje s mutacijama koje uzrokuju promjenu aminokiselinskog sastava aktivnih mjesta enzima koji su ciljne strukture antiretrovirusnih lijekova. Rezistencija HIV-a na antiretrovirusne lijekove ograničava mogućnost potpune supresije virusne replikacije u zaraženih osoba i predstavlja važnu prepreku postizanju virološkog uspjeha liječenja (nemjerljiva viremija u plazmi) (5). Procjena prevalencije rezistencije i obrasca mutacija povezanih s rezistencijom na pojedine klase antiretrovirusnih lijekova u liječenih bolesnika omogućava analizu puteva rezistencije HIV-a na molekularnoj razini i pruža mogućnost procjene potrebe dizajna novih generacija lijekova (6, 7).
Literaturni podatci o prevalenciji rezistencije HIV-a na antiretrovirusne lijekove u bolesnika s virološkim neuspjehom liječenja izrazito su varijabilni, a studije su metodološki vrlo različite.
Prevalencija rezistencije HIV-a na antiretrovirusne lijekove u liječenih bolesnika iz Hrvatske nije poznata.

1.2. Ciljevi rada

1. Odrediti prevalenciju rezistencije HIV-a na inhibitore reverzne transkriptaze (NRTI/NtRTI, engl. *Nucleoside/nucleotide reverse transcriptase inhibitors*) (NNRTI, engl. *Non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors*) i inhibitore proteaze (PI, engl. *Protease inhibitors*) primjenom dvije metode (analize u jednoj vremenskoj točki uz primjenu odgovarajućeg denominatora i modela kumulativne rezistencije) te učestalost pojedinih mutacija koje uzrokuju rezistenciju na pojedine klase antiretrovirusnih lijekova.

2. Usporediti kliničku značajnost mutacija prema referentnom algoritmu Standford HIV Database, algoritmu proizvođača testa Trugene i drugim interpretativnim algoritmima (algoritam ANRS, algoritam Rega) posebice u kontekstu genotipa virusa (genotip B versus non-B-genotipovi).

3. Odrediti distribuciju genotipova HIV-a.

4. Na odabranim uzorcima primijeniti metodu ˝ultra-deep˝-sekvenciranja (UDS) za detekciju varijanti koje čine <20% virusne populacije te rezultate usporediti s onima dobivenim standardnom metodom sekvenciranja.

1.3. Radne hipoteze

1. M184V je najčešća mutacija koja uzrokuje rezistenciju HIV-a na NRTI u liječenih bolesnika iz Hrvatske dok je K103N najčešća mutacija koja uzrokuje rezistenciju na NNRTI.

2. Prevalencija rezistencije HIV-a na NRTI i NNRTI u liječenih bolesnika iz Hrvatske veća je od prevalencije rezistencije na PI.

1.4. Zadaci rada i metodologija istraživanja

1. *Odabir pacijenata za istraživanje prema uključnim kriterijma*

U istraživanje uključiti sve HIV-om zaražene osobe koje su liječene HAART-om u Ambulanti za HIV/AIDS Klinike za infektivne bolesti u Zagrebu i Referentnom centru za dijagnostiku i liječenje HIV/AIDS-a R. Hrvatske u razdoblju od siječnja 2008. do kraja prosinca 2012. Dodatni kriterij za uključivanje u istraživanje je nepotpuna supresija virusne replikacije (granica mjerljivosti 50 kopija HIV-1-RNA po mL plazme) tijekom liječenja i viremija u plazmi veća od 1000 kopija HIV-1-RNA po mL.
HIV-om zaražene osobe mlađe od 18 godina i trudnice isključiti iz istraživanja.

2. *Sekvenciranje gena pol HIV-1*

RNA iz plazme HIV-1 zaraženih osoba izolirati primjenom reagensa QIAmp Viral RNA Mini Kit.
Sekvencu gena *pol* odrediti Sangerovom dideoksi-metodom primjenom reagensa Trugene HIV-1 Genotyping kit te rezultate usporediti s rezultatima UDS metode na odabranim uzorcima.

3. *Određivanje rezistencije HIV-a na antiretrovirusne lijekove*

Sekvencu gena *pol* HIV-a bolesnika uključenih u istraživanje usporediti sa sekvencom divljeg tipa virusa (genotip B) te utvrditi postojanje mutacija vezanih uz rezistenciju na antiretrovirusne lijekove. Biološku značajnost mutacija interpretirati sukladno preporukama The International AIDS Society–USA (ISA-USA) Drug Resistance Mutations Group (5).
Dobivene rezultate interpretacije značajnosti mutacija usporediti s rezultatima tri druga algoritma: algoritam Trugene, algoritam ANRS i algoritam Rega.

4. *Odrediti genotip virusa*

Genotip HIV-a liječenih bolesnika odrediti primjenom bioinformatičkog algoritma REGA HIV-1 subtyping tool version 2.0 i sekvence gena *pol* virusa.

5. *Odrediti prevalenciju rezistencije HIV-a na antiretrovirusne lijekove*

Prevalenciju rezistencije na antiretrovirusne lijekove odrediti za svaku kalendarsku godinu od 2008. do kraja 2012. primjenom dviju metoda: analize u jednoj vremenskoj točki uz primjenu odgovarajućeg denominatora i modela kumulativne rezistencije. Denominator će uključiti sve bolesnike liječene antiretrovirusnim lijekovima tijekom određene kalendarske godine. Rezistencija na određenu klasu antiretrovirusnih lijekova bit će definirana kao postojanje najmanje jedne klinički značajne mutacije povezane sa smanjenom osjetljivosti na antiretrovirusne lijekove u toj klasi sukladno zaključcima The International AIDS Society–USA (ISA-USA) Drug Resistance Mutations Group (5).

2. LITERATURNI PREGLED

2.1 Virus ljudske imunodeficijencije

Sindrom stečene imunodeficijencije (AIDS, engl. *Acquired immunodeficiency syndrom*) prvi je put opisan 1981. u homoseksualaca s kroničnom multiplom limfadenopatijom i neuobičajenim oportunističkim infekcijama (primjerice pneumonija uzrokovana s *Pneumocystis jirovecii*) te malignim bolestima (Kapošijev sarkom) iz Sjedinjenih Američkih Država (SAD). Istraživači iz Pasteurovog Instituta u Parizu su 1983. iz bioptata limfnog čvora bolesnika izolirali virus koji je nazvan virus udružen s limfadenopatijom (LAV, fr. *Lymphadénopathie associé virus*), a 1984. identičan je virus dokazan i u SAD-u te nazvan ljudskim virusom leukemije T-limfocita (HTLV, engl. *Human T-cell leukemia virus*). Od 1986. koristi se isključivo naziv virus ljudske imunodeficijencije (HIV, engl. *Human immunodeficiency virus*). Temeljem dokaza virusnog genoma, epidemioloških i kliničkih podataka o bolesnicima te povezanosti s deficijencijom stanične imunosti, HIV je prepoznat kao etiološki uzročnik AIDS-a. Temeljna istraživanja iz područja molekularne biologije i virologije HIV-a omogućila su razvoj brojnih antiretrovirusnih lijekova (8).

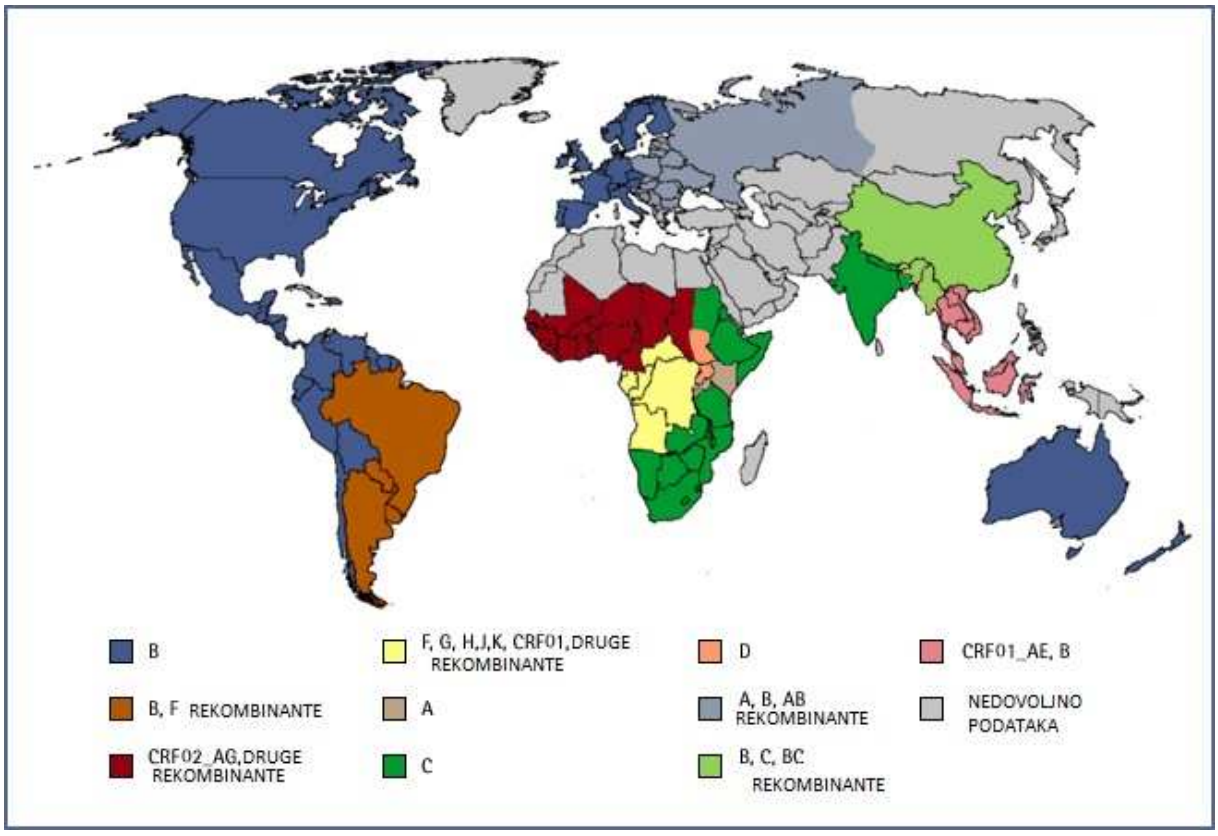
HIV je retrovirus (porodica *Retroviridae*, rod *Lentivirus*) koji se klasificira u dva tipa: HIV-1 i HIV-2 (1). Temeljem slijeda aminokiselina, homologija između HIV-1 i 2 iznosi 40-60% (ovisno o subtipovima). Evolucijska i filogenetska istraživanja pokazuju da HIV-1 potječe od virusa imunodeficijencije majmuna (SIV, engl. *Simian immunodeficiency virus*) koji inficira čimpanze *Pan troglodytes troglodytes* (SIV_{cpz}) i rasprostranjen je u području Kameruna (9). Najstariji biološki uzorak koji sadrži HIV-1-RNA je uzorak tkiva ZR59 bolesnika iz grada Léopoldvillea u Demokratskoj Republici Kongo iz 1959. Filogenetska i bioinformatička istraživanja koja uspoređuju sekvence genoma uzoraka HIV-a prikupljenih u razdoblju od 80-ih godina prošlog stoljeća do danas te uzorka ZR59 ukazuju na to da je do prijenosa virusa s čimpanzi na ljude došlo oko 1931. Pretpostavlja se da je do prijenosa virusa s čimpanzi na ljude došlo u nekoliko neovisnih događaja u razdoblju prije 1908. g., no pandemija HIV-a u svijetu započela je krajem 20. stoljeća s pojavom urbanizacije i globalizacije (10).

2.1.1. Klasifikacija HIV-1

HIV-1 klasificira se u četiri grupe koje su nastale tijekom tri neovisna prijenosa SIV_{cpz} na ljude: grupa M (engl. *Major*), grupa O (engl. *Outlier*), grupa N (engl. *Non-M/Non-O*) i grupa P. Grupa P otkrivena je 2009. u Pasteurovom Institutu u Parizu analizom sekvence HIV-a

bolesnice iz Kameruna koja je filogenetski srodna SIV-u koji inficira gorile (SIV_{gor}) (8, 11, 12). Grupa M odgovorna je za većinu infekcija s HIV-1 u svijetu i dijeli se na devet subtipova (A, B, C, D, F, G, H, J i K). Pojedini subtipovi se dijele i na varijante (primjerice subtipovi A i F se dijele na varijante A1-A4, odnosno F1-F2). Varijabilnost na razini sekvence nukleotida unutar jednog subtipa HIV-a iznosi 15-20%, a između različitih subtipova 25-35%. Dostupnost kompletnih genomskih sekvenci HIV-a omogućila je i detaljniju klasifikaciju virusa te otkrivanje izolata koji su produkt rekombinacije dijelova genoma koji pripadaju različitim subtipovima (11). Ukoliko se rekombinantni virus dokaže u tri ili više epidemiološki nepovezane osobe, službeno se klasificira kao cirkulirajuća rekombinantna forma (CRF, engl. *Circulating recombinant form*), a podatci o CRF se pohranjuju u bazi Los Alamos Sequence (13). Procjenjuje se da su CRF odgovorne za oko 20% infekcija HIV-om u svijetu, a u nekim dijelovima svijeta rekombinante su i dominantni oblici virusa (3, 5, 6).

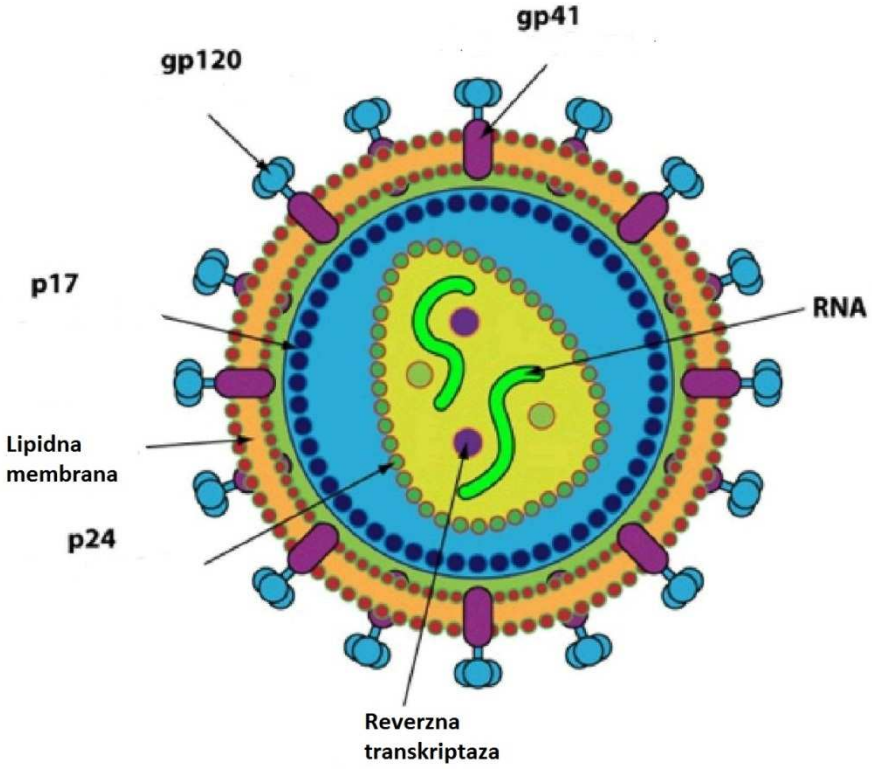
Hemelaar i sur. su istražili molekularnu epidemiologiju HIV-infekcije u svijetu analizom rezultata genotipizacije 65 913 uzoraka koji su u razdoblju od 2000. do 2007. prikupljeni u 109 zemalja (14). Rezultati ovog istraživanja pokazali su da je 48% infekcija HIV-om u svijetu uzrokovano subtipom C, 12% infekcija subtipom A te 11% infekcija subtipom B. Najčešće CRF su CRF02_AG (8%) i CRF01_AE (5%). Ostali subtipovi HIV-a su rijetki (subtip G 5%, subtip D 2%), a procjenjuje se da je globalna zastupljenost subtipova F, H, J i K zajedno manja od 1% (14). Subtip C je odgovoran za skoro 50% infekcije HIV-1 u svijetu te prevladava u zemljama s najvišom stopom prevalencije poput Južnoafričke Republike i Bocvane te u zemljama s brojnim stanovništvom poput Indije. Subtip B je dominantni subtip HIV-a u razvijenim zemljama relativno niske prevalencije infekcije (<10%). Geografska rasprostranjenost pojedinih subtipova HIV-1 na pojedinim kontinentima je različita. Subtip B je najzastupljeniji subtip HIV-1 u Sjevernoj i Južnoj Americi, Zapadnoj i dijelu Južne Europe, Japanu i Australiji. Subtip A je najčešći subtip HIV-a u zemljama Istočne Europe (bivši Sovjetski Savez) te u dijelu Afrike (DR Kongo i Tanzanija). Subtip C najzastupljeniji je u većini zemalja Subsaharske Afrike, Etiopiji i Indiji, subtip D u Libiji i Tanzaniji dok se subtip F često nalazi u zemljama Zapadne Afrike. U nekim geografskim regijama CRF su postale dominantni sojevi HIV-a. Primjerice, CRF01_AE je najzastupljeniji soj HIV-a u zemljama Sjeveroistočne Azije, CRF02_AG u zemljama Zapadne Afrike, a CRF07_BC i CRF08_BC u Kini (Slika 1) (14).



Slika 1: Geografska rasprostranjenost glavnih subtipova HIV-1 i cirkulirajućih rekombinantnih formi (CRF) (prerađeno s http://www.pbs.org/wgbh/pages/frontline/aids/atlas/clade.html).

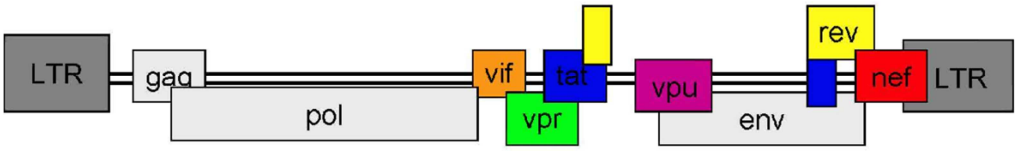
2.1.2. Struktura i genom HIV-1

Virion HIV-1 ima promjer 100 nm i sadrži dvije molekule jednolančane (+)ssRNA međusobno nekovalentno vezane na 5´-kraju. Molekule RNA vezane su za proteine nukleokapside (p7) i virusne enzime unutar virusne kapside koja se sastoji od glavnog strukturnog proteina p24. Virusna kapsida okružena je ovojnicom koja se sastoji od virusnog proteina matriksa (p17) i lipidne membrane koja sadrži 72 glikoproteinska kompleksa sastavljena od trimera veznog glikoproteina gp120 i transmembranskog glikoproteina gp41. Glikoproteini gp120 i gp41 su produkti gena *env* i imaju važnu ulogu u vezanju viriona za stanične receptore i koreceptore kao i u fuziji virusa s ciljnom stanicom. Virusna čestica sadrži i enzime nužne za replikaciju virusa i formiranje novih viriona: reverznu transkriptazu (RT), integrazu (p32) i proteazu (p10). Tijekom životnog ciklusa virusa, tj. nakon ulaska virusne kapside u citoplazmu ciljne stanice, virusna reverzna transkriptaza prevodi jednolančanu genomsku RNA u dvolančanu DNA, a nastala provirusna DNA se u jezgri ugrađuje u stanični genom pomoću virusne integraze (Slika 2) (8, 15).



Slika 2: Struktura viriona HIV-1: virusna ovojnica-glikoproteini gp120 i gp41; p17-protein matriksa; p24-glavni strukturni protein (prerađeno s http://www.grin.com/object/external_document.232224/af5e4a0a1adf5d3b7bfe139f4c039ffb_LARGE.png).

Genom HIV-1 veličine 9.8 kb sadrži 9 gena. Poput drugih retrovirusa, genom HIV-1 sadrži gene *gag*, *pol* i *env* čiji su produkti važni strukturni proteini i enzimi odgovorni za replikaciju virusa. Geni *gag* (engl. *group antigen*) i *env* (engl. *envelope*) kodiraju za nukleokapsidu i glikoproteine virusne membrane, a gen *pol* (engl. *polymerase*) kodira za virusne enzime reverznu transkriptazu, proteazu i integrazu (15). *Gag*- i *pol*-mRNA molekule prevode se u glikoproteinske polipetide koje virusne proteaze (kodirane genom *pol*) cijepaju u funkcionalne proteine. Produkt gena *env* je glikoprotein kojeg proteaza domaćina cijepa na gp120 i gp41 koji se spajaju u trimere te ugrađuju u virusnu ovojnicu. Ostalih šest virusnih gena (*vif*, *vpu*, *vpr*, *tat*, *rev* i *nef*) ubrajaju se u regulatorne i/ili dodatne gene te kodiraju sintezu proteina važnih za virusnu replikaciju i infektivnost viriona (Tablica 1). LTR (engl. *Long terminal repeat*) regije na krajevima virusnog genoma ne kodiraju virusne proteine, ali važne su za ugradnju provirusne DNA u genom stanice domaćina (Slika 3) (16).



Slika 3: Genom HIV-1 (preuzeto s http://hivbook.com/tag/viral-genome/).

Tablica 1: Geni i genski produkti virusa ljudske imunodeficijencije tipa 1 (HIV-1).

Gen	Protein	Funkcija proteina
gag	prekursor (53kDa)	prekursor Gag poliproteina
	p17	matriks (MA), važan za stabilnost viriona
	p24	kapsida (CA), važan za sazrijevanje viriona
	p7	nukleokapsida, vezana za ssRNA, važna za pakiranje RNA
	p6	važna uloga u formiranju i otpuštanju virusnih čestica
env	prekursor (160kDa)	glikoproteini ovojnice
	gp120	protein membrane, posreduje u vezanju receptora, važan za određivanje tropizma
	gp41	transmembranski protein, posreduje u fuziji virusa i stanice
pol	prekursor	enzimi
	p66/p51	reverzna polimeraza (DNA polimeraza i RNaza H)
	p10	polimeraza, posreduje u cijepanju *gag* i *gag/pol* poliproteina
	p32	integraza, pospješuje integraciju provirusa
tat	p14	transkripcijski i posttranskripcijski regulator, aktivira transkripciju provirusne DNA
rev	p19	posttranskipcijski regulator
nef	p27	rani regulatorni proteini, povećava kinetiku virusne replikacije
vif	p23	čimbenik infektivnosti virusa
vpu	p16	pospješuje sazrijevanje i otpuštanje virusa
vpr	p15	slabo aktivira transkripciju provirusne DNA

2.1.3. Ciklus i tropizam HIV-1

Ciklus HIV-1 može se podijeliti u dvije faze. Prva faza uključuje početne događaje infekcije HIV-om: vezanje viriona za stanicu domaćina, ulazak virusne kapside u citoplazmu, reverznu transkripciju, ulazak provirusne dvolančane DNA u jezgru stanice domaćina i ugradnju u genom domaćinske stanice. Druga faza ciklusa započinje transkripcijom virusnih strukturnih gena što vodi k sintezi virusnih proteina i formiranju novih virusnih čestica (Slika 4) (8).

Infekcija HIV-om započinje vezanjem virusnog glikoproteina gp120 za molekulu CD4 na membrani ciljne stanice. Molekula CD4 je eksprimirana na membrani T-limfocita, monocita, dendritičkih stanica i stanica mikroglije i primarni je stanični receptor za HIV-1. Preduvjet vezanja viriona HIV-1 za staničnu membranu je i vezanje gp120 za koreceptor, tj. jedan od kemokinskih receptora (CCR5 ili CXCR4) (17, 18). Molekule CCR5 i CXCR4 ubrajaju se u porodicu transmembranskih proteina koji vežu G-protein. Uporaba kemokinskih koreceptora CCR5 i/ili CXCR4 za ulazak HIV-a u stanicu naziva se koreceptorskim **tropizmom virusa (**19, 20). Sojevi HIV-a koji koriste koreceptor CCR5 nazivaju se R5-virusima ili CCR5-tropički virusima, dok se sojevi HIV-a koji koriste koreceptor CXCR4 nazivaju X4-virusima ili CXCR4-tropički virusima. Pojedini sojevi HIV-a koriste oba kemokinska koreceptora za ulazak u stanicu (sojevi dvojnog tropizma). R5-sojevi HIV-1 dominiraju u ranoj fazi infekcije i vjerojatno su odgovorni za većinu infekcije HIV-om u svijetu. U bolesnika s kasnom simptomatskom HIV-bolesti može doći do promjene tropizma virusa te pojave X4-sojeva virusa (3-4% liječenih osoba) **(**19, 20).

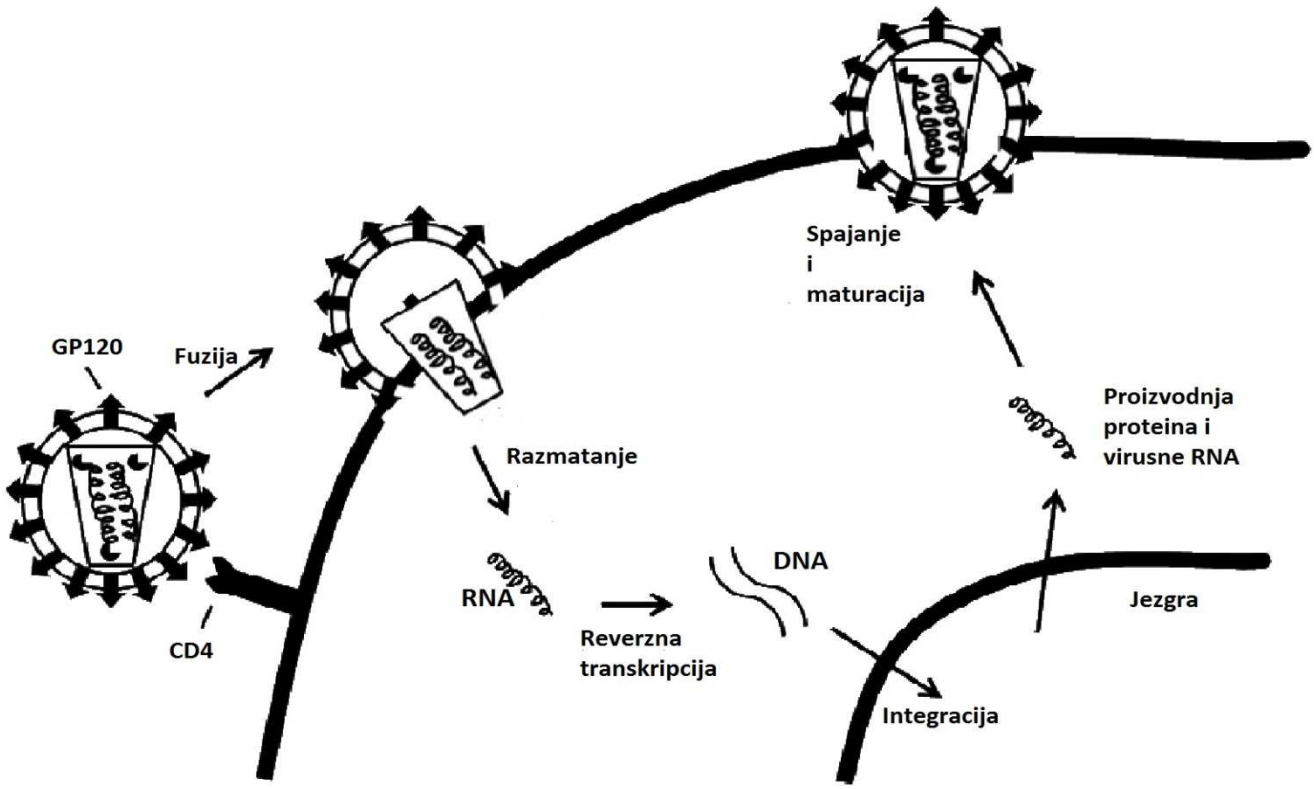
Nakon fuzije stanične membrane i viriona, ulaska virusne kapside u stanicu domaćina i oslobađanja virusne RNA dolazi do reverzne transkripcije. Rezultat reverzne transkripcije je dvolančana HIV-1-DNA s LTR-regijama na svakom kraju. Aktivacija stanice je preduvjet uspješne ugradnje provirusne DNA u genom domaćinske stanice (15). Nakon aktivacije ciljne stanice, stanični transkripcijski faktor NF-κB se veže na promotore LTR-regija virusne DNA i pokreće transkripciju genoma HIV-1 u RNA pomoću stanične RNA-polimeraze. U ranoj fazi transkripcije sintetiziraju se regulatorni proteini HIV-a poput Tat i Rev koji potiču virusnu replikaciju u aktiviranim T-limfocitima. U ranom stadiju virusne replikacije za koji je karakteristična manja količina proteina Rev, transkripti se sporije prenose iz stanice što omogućava stvaranje molekula mRNA koje kodiraju za regulatorne proteine kao što je Tat (15). Povećavanjem količine proteina Rev u ciljnoj stanici dolazi do ubrzanog prijenosa transkripata iz jezgre koji kao neprekrojeni ili pojedinačno prekrojeni, kodiraju za kasne

virusne proteine uključujući strukturne proteine nukleokapside i ovojnice te se zajedno s reverznom transkriptazom, integrazom i virusnom proteazom pakiraju u nove virusne čestice. Novonastali virus kojeg čine dvije kopije HIV-1-RNA, proteini *gag* i enzimi *pol* putuje prema površini stanice, a virusna proteaza cijepa velike prekursorske molekule u funkcionalne virusne proteine (Slika 4). Ciklus virusa završava formiranjem zrelih virusnih čestica koje pupanjem izlaze iz ciljne stanice, tj. CD4+-T-limfocita. Proces pupanja virusa u monocitima i makrofagima rezultira nakupljanjem virusnih čestica unutar staničnih vakuola (15).

2.1.4. Genska varijabilnost i fitnes HIV-1

HIV-1 je genski iznimno varijabilan virus. Najvažniji uzrok genske varijabilnosti HIV-1 je izostanak 3´→ 5´-endonukleazne aktivnosti virusne reverzne transkriptaze što onemogućuje provjeru komplementarnosti nukleotida koji se ugrađuju u rastući lanac DNA. Izostanak 3´→ 5´-endonukleazne aktivnosti reverzne transkriptaze HIV-1 uzrokuje delecije, insercije ili duplikacije nukleotida s frekvencijom od 10^{-4} do 10^{-5}. Osim pogrešaka u reverznoj transkripciji, genskoj varijabilnosti HIV-1 pridonosi i intenzivna replikacija virusa u organizmu domaćina (10^{9}-10^{10} viriona/dan) kao i velik ukupni broj domaćina u svijetu (21, 22). Intenzivna virusna replikacija i visoka stopa mutacija rezultiraju formiranjem velikog broja genski srodnih virusnih varijanti virusne populacije. Ta populacija se naziva kvazispecijes. Kvazispecijes karakteriziraju stalne genske promjene, kompeticija i selekcija unutar zaražene osobe. Rekombinacija između virusnih varijanti pridonosi heterogenosti virusnog kvazispecijesa (22-24).

Virusni fitnes opisuje replikativnu prilagodbu virusa na okoliš, odnosno njegovu sposobnost za stvaranje novih infektivnih viriona u određenim okolišnim uvjetima. Tijekom replikacije sintetiziraju se različite genomske varijante koje su podložne stalnoj kompeticiji i selekciji. Novonastale varijante višeg fitnesa često dominiraju u odnosu na varijante nižeg fitnesa zbog brže prilagodbe kvazispecijesa određenom okolišu. Kompeticija različitih varijanti u određenom okolišu dinamičan je proces koji u konačnici određuje fitnes cijele virusne populacije i igra ključnu ulogu u njegovoj modifikaciji. U tom se smislu virusni fitnes može gledati kao parametar koji se kontinuirano mijenja u rastućoj virusnoj populaciji (21, 23, 25, 26).



Slika 4: Ciklus HIV-1 (prerađeno s http://jac.oxfordjournals.org/content/51/3/493/F1.expansion).

2.1.5. Imunopatogeneza HIV-1- infekcije

Infekcija s HIV-1 uzrokuje smanjenje broja CD4+-T-limfocita, hiperaktivaciju stanične i citokinske imunosti te brojne kvalitativne i kvantitativne promjene efektorskih mehanizama urođene i specifične imunosti koje u konačnici uzrokuju imunodeficijenciju (8). Akutna HIV-1-infekcija započinje ulaskom virusa u organizam, najčešće putem sluznica reproduktivnih organa (spolni prijenos), krvi (transfuzija krvi ili krvnih pripravaka), placente (vertikalni prijenos s majke na dijete) ili dojenjem. Akutna faza infekcije je u velikog broja zaraženih bez kliničkih simptoma dok se u dijela zaraženih prezentira simptomima sličnima infekciji virusima influence. U početku akutne faze infekcije virus se intenzivno replicira u aktiviranim memorijskim CD4+-T-limfocitima (najčešće CCR5+-stanicama). Nakon aktivacije specifične stanične imunosti, posebice citotoksičnih CD8+-T-limfocita (CTL) specifičnih za HIV, dolazi do smanjenja virusne replikacije te privremene kontrole infekcije. U početku kronične faze infekcije uspostavlja se faza kliničke latencije bez simptoma bolesti. Dužina faze kliničke latencije iznimno je varijabilna i može trajati od 2 do 15 godina. Međutim, kontinuirana replikacija virusa, hiperaktivacija imunosnog sustava te poremećaj funkcije timusa postepeno

dovode do intenziviranja replikacije virusa te povećanja opsega imunodeficijencije stanične imunosti. U simptomatskoj i kasnoj simptomatskoj fazi bolesti nastaju brojne oportunističke infekcije i maligne bolesti koje su najčešće i uzrok smrti neliječenih zaraženih osoba (15, 16).

2.1.6. Epidemiologija HIV-1-infekcije

HIV-1-infekcija jedan je od najvećih globalnih zdravstvenih problema u svijetu. Temeljem procjene Svjetske zdravstvene organizacije, 2012. u svijetu je bilo zaraženo oko 35.3 milijuna ljudi (3.3 milijuna djece). Tijekom 2012., s HIV-1 zarazilo se oko 2.3 milijuna ljudi, a od posljedica AIDS-a umrlo je 1.6 milijuna ljudi (27).

U Hrvatskoj je u razdoblju od 1985. do studenog 2013. infekcija s HIV-1 otkrivena u 1102 osoba od čega je 420 osoba oboljelo od AIDS-a. U navedenom vremenskom periodu ukupno 176 osoba je umrlo od AIDS-a. Godišnja učestalost HIV-infekcije u Hrvatskoj kreće se u vrijednostima od 12 do 17 na milijun stanovnika što Hrvatsku uvrštava u zemlje niske učestalosti HIV- infekcije (prosječna vrijednost za zemlje EU/EEA u 2011. iznosila je 57 na milijun stanovnika). Većina zaraženih osoba u Hrvatskoj su muškarci (85.5%), a dominira spolni put prijenosa infekcije (87%). Infekcija HIV-om u Hrvatskoj najčešće se bilježi u grupama povećanog rizika poput muškaraca koji imaju spolne odnose s muškarcima (MSM, engl. *Men who have sex with men*) (56.1% zaraženih osoba) (28).

2.1.7. Antiretrovirusno liječenje

Antiretrovirusni lijekovi uspješno inhibiraju pojedine faze ciklusa HIV-1 no ne mogu eradicirati virus. Cilj primjene vrlo djelotvornog antiretrovirusnog liječenja, tj. HAART-a koje se sastoji od kombinacije najmanje tri lijeka, je maksimalna supresija virusne replikacije. Supresija virusne replikacije omogućuje postepenu rekonstituciju imunosnog sustava zaražene osobe što u konačnici dovodi do smanjenja morbiditeta i mortaliteta povezanog s HIV-om. Stoga je osnovni cilj primjene antiretrovirusnih lijekova produženje životnog vijeka i poboljšanje kvalitete života bolesnika. Stručna društva koja se bave problematikom liječenja HIV-infekcije (European AIDS Clinical Society, International AIDS Society-USA) preporučuju započinjanje antiretrovirusnog liječenja u osoba kod kojih je broj CD4+-T-limfocita po μL periferne krvi manji od 350. Antiretrovirusno liječenje se može preporučiti i osobama s više od 350 stanica po μL, najčešće u svrhu prevencije infekcije HIV-negativnih partnera (15).

Uspješnost supresije virusne replikacije primjenom antiretrovirusnih lijekova procjenjuje se kvantifikacijom HIV-1-RNA u plazmi liječene osobe. U razdoblju od 4 do 6 mjeseci nakon započinjanja antiretrovirusnog liječenja, viremija u plazmi (broj kopija HIV-1-RNA po mL) bolesnika kod kojih je postignut virološki uspjeh liječenja niža je od granice detekcije PCR-testova u realnom vremenu (20-40 kopija HIV-1-RNA po mL). Nepotpuno smanjenje virusne replikacije, tj. mjerljiva viremija u plazmi nakon 6 mjeseci liječenja definiraju se kao virološki neuspjeh liječenja. Perzistentna replikacija virusa (procijenjena mjerljivom viremijom u plazmi) u bolesnika liječenih HAART-om najčešće se povezuje s rezistencijom virusa na antiretrovirusne lijekove (tzv. sekundarna rezistencija) (15, 29-32). Važnu ulogu u postizanju virološkog uspjeha liječenja imaju i čimbenici poput adherencije bolesnika te apsorpcije i metabolizma lijekova.

Američka agencija za lijekove (FDA, engl. *Food and drugs administration*) i Europska agencija za lijekove (EMA, engl. *European medicines agency*) su do kraja 2013. odobrile ukupno 34 lijeka (pojedinačni lijekovi ili kombinirani pripravci) za liječenje HIV-infekcije koji se klasificiraju temeljem ciljnih struktura (15). Ciljne strukture antiretrovirusnih lijekova su pojedine faze ciklusa virusa: (1) ulazak virusa u stanicu domaćina (inhibitori ulaska virusa), (2) reverzna transkripcija (NRTI/NtRTI i NNRTI), integracija provirusne DNA u genom domaćinske stanice (inhibitor integraze) i sazrijevanje virusnih čestica (PI) (Slika 5) (33).

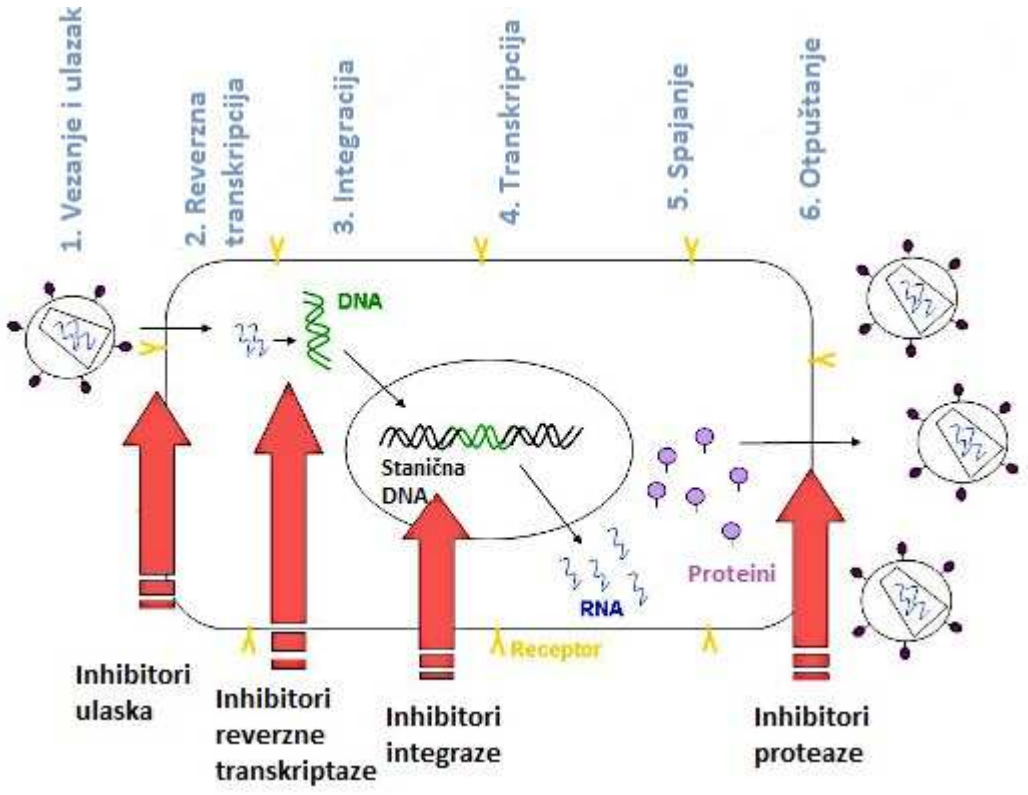
Liječenje HIV-1-infekcije jednim antiretrovirusnim lijekom ne dovodi do dugotrajne supresije virusne replikacije već do nastanka rezistencije virusa na lijek (stoga se HAART temelji na kombinaciji nekoliko antiretrovirusnih lijekova iz različitih klasa s ciljem maksimalne supresije virusne replikacije. Najčešće se primjenjuju kombinacije dva NRTI i jednog NNRTI ili PI dok se u bolesnika kod kojih je već otkrivena rezistencije virusa na lijekove primjenjuju i inhibitor integraze te antagonist CCR5-koreceptora.

2.1.7.1. Inhibitori reverzne transkriptaze

Glavna ciljna struktura NRTI i NNRTI je enzim reverzna transkriptaza (RT) koja katalizira sintezu dvolančane virusne DNA koristeći jednolančanu virusnu RNA kao kalup. RT je multifunkcijski enzim te iskazuje aktivnost RNA- i DNA-ovisne DNA-polimeraze, aktivnost RNaze H te enzimsku aktivnost prijenosa i zamjene lanaca. RT se sastoji od dvije podjedinice veličine 66 i 51 kDA (p66 i p51) koje su podijeljene u domene (˝fingers˝, ˝thumb˝, ˝palm˝ i ˝conection˝). Nazivi za određene domene proizlaze iz trodimenzionalne strukture podjedinice

p66 koja se često uspoređuje s desnom rukom. Aktivno mjesto za DNA-polimeraznu aktivnost s konzerviranim aminokiselinskim ostacima Asp110, Asp185 i Asp186 koji vežu dva divalentna kationa magnezija (Mg2+) potrebna za katalizu te regijom YMDD (Y183-M184-D185-D-186), smješteno je unutar ˝palm˝-domene podjedinice p66 (33-35).

Lijekovi iz NRTI skupine dijele se na nukleozidne inhibitore zidovudin (ZDV/AZT), lamivudin (3TC), stavudin (d4T), didanozin (ddI), zalcitabin (ddC), abakavir (ABC) i emtricitabin (FTC) te nukleotidni inhibitor ili aciklički nukleozidni fosfonat tenofovir (TDF).



Slika 5: Ciljne strukture antiretrovirusnih lijekova (prerađeno s https://www.bcm.edu/departments/molecular-virology-and-microbiology/hivaids).

Zalcitabin se od 2006. ne primijenjuje u ljudi zbog teških nuspojava liječenja. Nakon endocitoze u stanicu domaćina, nukleozidni i nukleotidni inhibitori RT fosforiliraju se u aktivni trifosfatni oblik te djeluju kao kompetitivni inhibitori (ili alternativni supstrati) reverznoj transkriptazi HIV-1 (15, 34). NRTI se vežu na hidrofobno mjesto u blizini aktivnog mjesta za DNA-polimerazu u ˝palm˝-domeni podjedinice p66 enzima te inhibiraju njezinu enzimsku aktivnost. Pojedini NRTI iskazuju i sposobnost vezanja na aminokiselinu Glu138 unutar podjedinice p51 (33).

U NNRTI skupinu ubrajaju se antiretrovirusni lijekovi nevirapin (NVP), delavirdin (DLV), efavirenz (EFV), etravirin (ETV) i rilpilvirin (RPV). NNRTI su nekompetitivni inhibitori RT koji se vežu na mjesto u enzimu u blizini veznog mjesta za supstrat (nukleotide). Stvoreni kompleks blokira mjesto za vezanje enzima RT što u konačnici uzrokuje značajno usporavanje polimerizacije. Za razliku od NRTI, NNRTI su biološki aktivni bez unutarstanične aktivacije (15, 33, 35). Vezanje inhibitora potiče strukturnu distorziju enzima što blokira njegovu polimeraznu aktivnost. Druga značajna promjena koja se događa uslijed vezanja NNRTI je smanjenje mobilnosti ″thumb″-domene podjedinice p66. Ta promjena uzrokuje smanjenje ili potpunu blokadu prijenosa kompleksa početnice i ciljne sekvence te elongaciju DNA-lanca u nastanku (35).

2.1.7.2. Inhibitori proteaze

Tijekom ciklusa HIV-a dolazi do aktivacije transkripcije i translacije provirusnog genoma koji je ugrađen u staničnu DNA te se sintetiziraju virusni poliproteini. Proteaza HIV-1 cijepa virusne poliproteine na manje funkcionalne proteine i na taj način omogućuje formiranje zrelih virusnih čestica (15, 33). Proteaza HIV-1 je simetrični homodimer koji se sastoji od dva identična nekovalentno vezana polipeptida sastavljena od 99 aminokiselina. Svaki monomer sadrži konzerviranu sekvencu od tri aminokiselinska ostatka (Asp25-Thr26-Gly27) s aspartilnom grupom koja ima važnu ulogu u reakciji katalize. Aktivno mjesto enzima smješteno je na dodirnoj površinu dvije podjedinice. Dio svakog monomera je i preklopnica koja se zatvara uslijed vezanja inhibitora ili supstrata za enzim. Oblik preklopnice u proteazi značajno se razlikuje od preklopnice u kompleksu proteaze i inhibitora što ukazuje na njezinu fleksibilnost koja je bitna za aktivnost enzima. Iako je enzim simetrični dimer, inhibitori se na asimetričan način vežu za njega kao i prirodni supstrati enzima (33, 36, 37). Temeljna istraživanja molekularne strukture proteaze HIV-1 omogućila su razvoj inhibitora proteaze koji se vežu na aktivno mjesto enzima. Veze između enzima proteaze i inhibitora proteaze najčešće su hidrofobne i slične su vezama između enzima i prirodnog supstrata (38-40). Svi inhibitori proteaze dijele zajednički mehanizam djelovanja: sprječavaju sazrijevanje virusnih čestica djelujući kao kompetitivni inhibitori proteaze HIV-1 u reakciji proteolize (preduvjet sazrijevanja virusnih čestica). Farmakološke značajke PI (osim nelfinavira) pojačane su kombiniranjem s malim dozama ritonavira (engl. *″boosted PI″*) što je naznačeno dodatkom ″r″ iza imena svakog lijeka (15, 33). U antivirusnom liječenju se, sukladno odobrenjima EMA i FDA koriste sakvinavir (SQV), ritonavir (RTV), indinavir (IDV), nelfinavir (NFV),

fosamprenavir (FPV), lopinavir (LPV), atazanavir (ATV), tipranavir (TPV) i darunavir (DRV).

2.1.7.3. Inhibitori integraze

Enzim integraza (IN) neophodna je za ugradnju provirusne DNA HIV-1 u genom stanice domaćina. U procesu integracije, integraza se zajedno s virusnim i staničnim proteinima veže za specifične sekvence u cDNA HIV-1 te stvara preintegracijski kompleks koji cijepa dva nukleotida s 3´-kraja svakog lanca cDNA dok se 5´-krajevi spajaju sa staničnom DNA u procesu prijenosa lanca. Nevezani 3´-krajevi naknadno se produžuju radi upotpunjavanja praznina, a dodatno obrada krajeva dovodi do potpune kovalentne ugradnje provirusne DNA u genom stanice domaćina (15, 33). Integraza je protein molekularne težine 32 kDa koji je nastao proteolitičkim cijepanjem prekursora Gag-Pol. Integraza se sastoji od N-terminalne domene s motivom cinkovog prstena, središnje domene koja ima katalitičku aktivnost i C-terminalne domene koja veže DNA. Sve tri domene sudjeluju u procesu integracije no najvažnija je središnja domena u kojoj se nalazi aktivno mjesto s konzerviranom DDE regijom (aminokiseline Asp64, Asp116, Glu152) koja koordinira cijeli proces zajedno s dvovalentnim ionom magnezija (Mg^{2+}) kao kofaktorom (33, 36, 41).
Inhibitori integraze ne sprječavaju ulazak virusa u stanicu već onemogućuju ugradnju virusnog genoma u genom stanice domaćina. U procesu integracije virusne DNA u stanični genom, antivirusni lijekovi mogu djelovati na četiri razine: tijekom vezanja integraze na virusnu DNA, obrade 3´-krajeva, prijenosa lanca i procesa upotpunjavanja praznina. Većina inhibitora integraze inhibira prijenos lanca u procesu integracije virusne DNA (15). Prvi inhibitor integraze odobren za liječenje liječenje HIV-1-infekcije je raltegravir (RAL).

2.1.7.4. Inhibitori ulaska virusa u stanicu

Ulazak HIV-1 u stanicu domaćina je ciljna struktura novih generacija antiretrovirusnih lijekova. Ulazak virusa u stanicu odvija se u nekoliko faza na koje mogu djelovati antiretrovirusni lijekovi: (1) vezanje virusa na stanični receptor, tj. molekulu CD4 (ciljna struktura inhibitora vezanja virusa za stanicu), (2) vezanje virusa na kemokinske koreceptore (ciljna struktura antagonista kemokinskih koreceptora) te (3) fuzija virusa i stanice (ciljna struktura inhibitora fuzije) (15). Za liječenje HIV-1-infekcije odobreni su antagonist CCR5-koreceptora maravirok (MVC) i inhibitor fuzije entfuvirtid (T-20).

Maravirok je selektivni antagonist koreceptora CCR5 koji se alosterički veže za njegov hidrofobni džep koji se sastoji od transmembranskih uzvojnica. Vezanjem na koreceptor, maravirok potiče konformacijske promjene unutar molekule što rezultira inhibicijom njegovog vezanja na gp120 (15, 33).

Fuzija viriona i stanične membrane poslijednja je faza ulaska virusa u stanicu. Fuzija HIV-1 i stanične membrane je kompleksan proces koji je posredovan transmembranskim glikoproteinom gp41 (15). Glikoprotein 41 je trimer koji se sastoji od polipeptida veličine 345 aminokiselina koji sadrže N-terminalnu ektodomenu, transmembransku regiju i dugu citoplazmatsku domenu (42, 43). Ektodomena sadrži dvije uzvojnica (regije HR1 i HR2) koje u procesu fuzije prolaze kroz konformacijske promjene pri čemu nastaje snop od šest uzvojnica. Uslijed konformacijske promjene, virusna ovojnica i stanična membrana se približavaju te nastaje fuzijska pora koja omogućuje fuziju viriona i stanične membrane. Inhibitori fuzije sprječavaju fuziju virusne ovojnice i membrane stanice domaćina (33).

Enfuvirtid je prvi inhibitor fuzije odobren za liječenje HIV-1-infekcije. To je sintetički peptid od 36 aminokiselina koji je strukturno kompatibilan C-terminalnoj regiji HR2. Enfuvirtid inhibira proces stvaranja šesterostruke uzvojnice vezanjem na domenu HR1 (33, 44, 45).

HAART je u Hrvatskoj dostupan od 1997. kada je registriran prvi antiretrovirusni lijek zidovudin. Broj antiretrovirusnih lijekova koji su bili dostupni u Hrvatskoj u razdoblju provođenja ovog istraživanja bio je manji u usporedbi sa zemljama EU ili SAD-om i uključivao je: (1) NRTI zidovudin, stavudin, didanozin, lamivudin, abakavir, (2) NNRTI nevirapin i efavirenz, (3) PI nelfinavir, indinavir, darunavir, lopinavir/ritonavir i ritonavir za pojačano liječenje te (4) inhibitor integraze raltegravir. Od koformuliranih pripravaka, dostupne su kombinacije zidovudin/lamuvudin, lamivudin/abakavir i tenofovir/emtricitabin. U liječenju se najčešće koriste kombinacije: zidovudin+lamivudin+efavirenc; zidovudin+lamivudin+ lopinavir/ritonavir; zidovudin+ lamivudin+nevirapin; abakavir+lamivudin+efavirenz (28, 48).

2.1.8. Rezistencija na antiretrovirusne lijekove

HAART učinkovito suprimira virusnu replikaciju, omogućuje postupnu rekonstituciju imunosnog sustava te u konačnici povećava kvalitetu života. Međutim, pojava rezistencije HIV-a na antiretrovirusne lijekove onemogućuje potpunu supresiju virusne replikacije te ograničava učinkovitost HAART-a.

Rezistencija HIV-a na antiretrovirusne lijekove posljedica je mutacija gena koji kodiraju sintezu upravo onih virusnih proteina i glikoproteina koji su ciljne strukture lijekova. Molekularna heterogenost HIV-a ima važnu ulogu u nastanku rezistencije HIV-a na antiretrovirusne lijekove. Visoka učestalost grešaka reverzne transkriptaze (~10^{-4}-10^{-5} mutacija po nukleotidu i replikacijskom ciklusu), brza virusna replikacija (nastanak 10^{9}-10^{10} viriona dnevno u zaraženog domaćina) i visoka stopa rekombinacije (2-20 događaja po replikacijskom ciklusu) uzrokuju selekciju brojnih mutacija u procesu replikacije virusa. Stoga u zaraženih domaćina nastaje heterogena populacije virusnih genoma (kvazispecijes), tj. mnoštvo genski srodnih virusnih varijanti (49, 50). Svaka virusna varijanta iskazuje različiti replikativni potencijal u različitim uvjetima. U neliječenih zaraženih osoba kvantitativno je najzastupljenija varijanta divljeg tipa (WT, engl. *Wild type*) koja ima visok replikativni potencijal. Nepotpuna supresija virusne replikacije (najčešće povezana s neadekvatnom koncentracijom antiretrovirusnih lijekova) omogućuje selekciju virusnih mutanti većeg replikacijskog potencijala. Tijekom stalne replikacije virusa u prisutnosti lijekova, najčešće se pojavljuje sve veći broj mutacija koje nastaju u svrhu povećanja virusnog fitnesa (49, 51-53). Prekid primjene antiretrovirusnih lijekova najčešće dovodi do brze replikacije divljeg tipa virusa koji ponovno postaje dominantan kvazispecijes. Međutim, virusne varijante s mutacijama koje se povezuju s rezistencijom i dalje ostaju u populaciji kvazispecijesa u plazmi i tkivima (virusni rezervoari) kao manjinske varijante koje mogu ponovno postati dominantne pod selektivnim pritiskom lijekova. Stvaranje rezistentnih mutanti i njihova replikacija unutar virusnih rezervoara (npr. limfni čvorovi), mehanizam su kojim virus izbjegava imunosne mehanizme i selektivni pritisak lijekova (49, 51-53).

Kinetika nastanka mutacija povezanih s rezistencijom HIV-a na antiretrovirusne lijekove je različita, tj. neke mutacije nastaju neposredno nakon pojave nepotpune supresije virusne replikacije (29, 54). Vjerojatnost nastanka rezistencije ovisi o antivirusnom učinku određenog lijeka. Naime, lijekovi slabijeg antivirusnog učinka stvaraju minimalni selektivni pritisak na virus što se povezuje sa sporim razvojem rezistencije. Međutim, ukoliko antiretrovirusni lijek jačeg antivirusnog učinka koji iskazuje snažan selektivni pritisak na virus, više ne može suprimirati virusnu replikaciju, najčešće dolazi do brze pojave mutacija povezanih s rezistencijom. Primjena lijekova s iznimno snažnim antivirusnim učinkom (npr. tenofovir), učinkovito smanjuju virusnu replikaciju te je pojava rezistencije relativno rijetka (49, 55-61).

Svaki antiretrovirusni lijek karakterizira različita genska barijera za rezistenciju. Genska barijera lijeka za rezistenciju definirana je kao broj mutacija koji je potreban za nastanak

rezistencije. Rezistencija virusa na antiretrovirusne lijekove s niskom genskom barijerom posljedica je samo jedne mutacije. U skupinu lijekova s niskom genskom barijerom za rezistenciju ubrajaju se lamivudin i emtricitabin (NRTI), prva generacija NNRTI, tj. efavirenz i nevirapin, inhibitor fuzije enfuvirtid i inhibitor proteaze nelfinavir. Za nastanak rezistencije na lijekove s umjerenom genskom barijerom potrebno je nekoliko mutacija. U tu skupinu spadaju inhibitor integraze raltegravir, timidinski analozi NRTI didanozin, abakavir i tenofovir, NNRTI etravirin i većina PI koji nisu pojačani s ritonavirom. U slučaju lijekova s visokom genskom barijerom potreban je velik broj mutacija za nastanak rezistencije. Lijekovi iz skupine PI darunavir i tipranavir (u kombinaciji s ritonavirom) te zidovudin i stavudin iz skupine NNRTI ubrajaju se u lijekove s visokom genskom barijerom za rezistenciju (49, 62, 63).

Obzirom na slične ili identične molekularne mehanizme antivirusnog učinka pojedinih lijekova iz određene skupine, mutacije povezane s rezistencijom najčešće uzrokuju biološki značajnu rezistenciju na nekoliko lijekova iz određene skupine (49). Opseg križne rezistencije je varijabilan, tj. neke mutacije uzrokuju rezistenciju na gotovo sve lijekove iz određene skupine dok druge mutacije uzrokuju rezistenciju na određeni lijek no mogu istovremeno povećati osjetljivost virusa na neke druge lijekove. Primjer je mutacija M184V u genu za RT koja uzrokuje rezistenciju HIV-a na lamivudin i emtricitabin no uzrokuje i povećanu osjetljivost mutiranog virusa na zidovudin i tenofovir u odnosu na divlji tip (29).

Rezistencija na antiretrovirusne lijekove dijeli se na primarnu i sekundarnu rezistenciju. **Primarna rezistencija**, tj. rezistencija u neliječenih osoba, posljedica je prirodne raznolikosti virusa ili infekcije virusom koji je već rezistentan na antiretrovirusne lijekove. **Sekundarna rezistencija** nastaje tijekom nepotpune supresije virusne replikacije tijekom antiretrovirusnog liječenja (29, 49).

Mutacije u genima za enzime proteazu i reverznu transkriptazu povezane s rezistencijom na lijekove najčešće se klasificiraju u skupinu primarnih (engl. *˝major˝*) ili sekundarnih (engl. *˝minor˝*) mutacija. **Primarne mutacije** pojavljuju se neposredno nakon gubitka kontrole virusne replikacije te samostalno uzrokuju biološki značajan gubitak osjetljivosti virusa na lijekove. Pojava primarnih mutacija najčešće uzrokuje smanjenje fitnesa virusnog kvazispecijesa u usporedbi s divljim tipom čak i bez selektivnog pritiska lijekova. Primarne mutacije povezane s rezistencijom mogu se javiti i u neliječenih osoba zbog vrlo visoke stope mutacija i brze replikacije virusa. **Sekundarne mutacije** najčešće se pojavljuju nakon selekcije primarnih mutacija i samostalno ne utječu na osjetljivost virusa na lijekove. U

kombinaciji s primarnim mutacijama, sekundarne mutacije mogu značajno povećati rezistenciju na određeni lijek (29). Varijante virusa sa sekundarnim mutacijama mogu biti detektirane kao rezultat prirodnog polimorfizma, pogotovo u genu za proteazu, kod kojih su promijenjene aminokiseline na pozicijama u enzimima koje ne utječu na rezistenciju.

Rezistencija na više antiretrovirusnih lijekova, tj. **MDR** mutacije (engl. *Multidrug resistance*) opisuje skupine mutacija koje uzrokuju križnu rezistenciju na više skupina antiretrovirusnih lijekova i stoga su biomedicinski iznimno značajne (29).

U nomenklaturi mutacija povezanih s rezistencijom HIV-a na antiretrovirusne lijekove prvo slovo označuje aminokiselinu koja je prisutna u divljem tipu HIV-a (subtip B, konsenzus sekvenca) nakon čega slijedi broj koji označava poziciju aminokiseline u sekvenci te slovo koje označuje aminokiselinu koja je prisutna u mutiranom virusu koji je rezistentan na lijek. Primjerice kratica M184V opisuje mutaciju u kojoj je metionin na poziciji 184 u enzimu RT zamijenjen valinom. Ukoliko u biološkom uzorku postoji mješavina varijanti koje na određenoj poziciji imaju više od jedne aminokiseline, komponente mješavine naznače se odvojene kosom crtom (npr. K103K/N) (29). Dio mutacija povezanih s rezistencijom na antiretrovirusne lijekove su insercije jedne ili više aminokiselina u virusni protein. Primjer ovog tipa mutacije je insercijski kompleks 69 koji se sastoji od supstitucije u kodonu 69 gena za RT (obično T9S) te insercije 2 ili više aminokiselina (S-S, S-A, S-G, ili drugo). Insercijske su mutacije u usporedbi sa supstitucijskim mutacijama rijetke i pojavljuju se u samo 2% virusa rezistentnih na NRTI (5, 29).

2.1.8.1. Rezistencija na nukleozidne i nukleotidne inhibitore reverzne transkriptaze

Mutacije povezane s rezistencijom na ovu skupinu lijekova većinom se nalaze u ″palm-″ i ″finger″-domeni RT, a povezane su s dva različita mehanizma rezistencije. Prvi mehanizam uključuje povećanu diskriminaciju NRTI/NtRTI u odnosu na prirodne dNTP-supstrate tijekom polimerizacije u aktivnom mjestu mutirane RT (mehanizam diskriminacije ili pirofosforilacija). Drugi mehanizam obuhvaća selektivno odstranjenje već ugrađenih inhibitora s kraja virusne nukleinske kiseline (mehanizam ekscizije) (64-67).

U slučaju mehanizma diskriminacije, mutacije povezane s rezistencijom sprječavaju ugradnju NRTI/NtRTI dok enzim zadržava sposobnost ugradnje prirodnih dNTP-supstrata. Diskriminacija se postiže putem steričke smetnje čime se selektivno ometa ugradnja inhibitora tijekom njegovog vezanja ili katalitičke ugradnje (65, 66).

Mutacije koje potvrđuju rezistenciju na NRTI/NtRTI mehanizmom diskriminacije (Slika 6) ometaju vezanje analoga i/ili utječu na brzinu ugradnje u DNA-lanac. Mutacije ili skupina mutacija u RT koje uzrokuju rezistenciju ovim mehanizmom uključuju mutaciju M184I/V, skupinu mutacija Q151M te mutacije koje su povezane s rezistencijom na ne-timidinske analoge kao što su K65R i L74V. Manje uobičajene mutacije koje se pojavljuju u bolesnika s virološkim neuspjehom liječenja tijekom primjene netimidinskih analoga su K65N, K70E/G i Y115F **(**68).

Drugi mehanizam nastanka rezistencije na NRTI/NtRTI je mehanizam ekscizije, tj**.** deblokiranja početnice. Pri ovom mehanizmu nastanka rezistencije, mutirana RT učinkovito ugrađuje inhibitore što trenutno blokira DNA-sintezu no inhibitori se ipak selektivno uklanjaju s kraja virusne DNA što dovodi do deblokade inhibitorom terminirane početnice i nastavka virusne replikacije (64-66, 68). Rezistenciju na NRTI/NtRTI putem mehanizma ekcizije uzrokuju mutacije povezane s rezistencijom na timidinske analoge (TAMs, engl. *Thymidine analog resistance mutations*), insercijski kompleks 69 zajedno s mutacijama povezanim s rezistencijom na više nukleozida i druge popratne mutacije (Slika 6) (64-68). Mutacije povezane s rezistencijom na timidinske analoge mogu se podijeliti u dvije skupine. Skupina TAM-I uljučuje mutacije M41L, L210W i T215Y dok skupina TAM-II obuhvaća D67N, K70R, K219E/Q i T215F (69-74).

Cons	184 M	65 K	74 L	115 Y	41 M	67 D	70 K	210 L	215 T	219 K	69 T	151 Q
3TC	VI	R									Ins	M
FTC	VI	R									Ins	M
ABC	VI	R	V	F	L			W	YF		Ins	M
ddI	VI	R	V		L			W	YF		Ins	M
TDF	***	R	*	F	L		R	W	YF		Ins	M
d4T	***	R			L	N	R	W	YF	QE	Ins	M
ZDV	***	***	*		L	N	R	W	YF	QE	Ins	M

Slika 6: Sažet prikaz mutacija povezanih s rezistencijom na NRTI/NtRTI-e. Aminokiseline sekvence divljeg tipa virusa prikazane su u prvom redu dok su aminokiseline koje nastaju kao posljedica mutacija prikazane su ispod crte. Podebljane i podcrtane mutacije uzrokuju visoku razinu rezistencije *in vivo* i *in vitro*; podebljane mutacije uzrokuju umjerenu rezistenciju; nepodebljane mutacije uzrokuju

nisku razinu rezistencije. Zvjezdice (***) predstavljaju povećanu osjetljivost na lijek ako je mutacija prisutna. Cons=konsenzus divlji tip; Ins=insercija (Preuzeto od Tang i sur.) (75).

2.1.8.2. Rezistencija na nenukleozidne inhibitore reverzne transkriptaze

NNRTI su molekule koje se alosterički vežu za hidrofobni ″džep″ (NNRTI-BP, engl. *Non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor binding pocket*) koji se nalazi u blizini aktivnog mjesta reverzne transkriptaze i na taj način mijenjaju njezinu fleksibilnost te inhibiraju njezinu sposobnost za sintezu DNA. Većina mutacija povezanih s rezistencijom na NNRTI smještene su u dijelu genoma koji kodira sintezu aminokiselina u aktivnom mjestu RT ili u njegovoj neposrednoj blizini. Genska barijera za razvoj rezistencije na NNRTI je niska i dostatna je jedna mutacija (ili 2) za pojavu rezistencije *in vivo* (15, 33, 35, 68, 76, 77).
Najčešće mutacije povezane s rezistencijom na NNRTI su K103N i Y181C, a često se javljaju i mutacije L100I, K101E, V106A, V179D, Y188L, G190A i P236L (Slika 7).

Cons	100 L	101 K	103 K	106 V	138 E	181 Y	188 Y	190 G	230 M
NVP	I	EP	NS	AM		CIV	LHC	ASE	L
EFV	I	EP	NS	AM		C	LHC	ASE	L
ETV	I	EP			K	CIV	L	ASE	L
RPV	I	EP			K	CIV	L	ASE	L

Slika 7: Sažeti prikaz mutacija povezanih s rezistencijom na NNRTI. Aminokiseline sekvence divljeg tipa prikazane su u prvom redu dok su aminokiseline s mutacijama prikazane ispod crte. Podebljane i podcrtane mutacije uzrokuju visoku razinu rezistencije; podebljane mutacije uzrokuju umjerenu rezistenciju; nepodebljane mutacije pridonose rezistenciji. Cons=konsenzus divlji tip. (Preuzeto od Tang i sur.) (75).

2.1.8.3. Rezistencija na inhibitore proteaze

Inhibitori proteaze svojom kemijskom strukturom nalikuju na prirodne supstrate proteaze HIV-1, vežu se za aktivno mjesto enzima i na taj način inhibiraju njegovu katalitičku aktivnost. Interakcije između proteaze i inhibitora većinom su hidrofobne i slične onima između enzima i supstrata (15, 33, 37, 78, 79). Rezistencija na PI posljedica je supstitucija aminokiselina koje se pojavljuju u aktivnom mjestu enzima ili u njegovoj blizini. Promjene sastava aminokiselina na određenim pozicijama mijenjaju broj i strukturu mjesta vezanja inhibitora i proteaze što dovodi do smanjene ugradnje ili vezanja inhibitora. Mutacije izvan

aktivnog mjesta enzima ne utječu samo na vezanje inhibitora već i kompenziraju za aktivnost proteaze povećavajući tako replikativnu sposobnost mutiranog virusa (5, 33, 50, 75, 77).
Genska barijera za rezistenciju na PI relativno je visoka i potrebne su najmanje dvije mutacije za razvoj rezistencije (29). Križna rezistencija unutar PI-skupine antivirusnih lijekova vrlo je česta pojava uzrokovana velikim brojem mutacija povezanih s rezistencijom na PI kao i činjenicom da različite mutacije na istim mjestima imaju različit učinak na osjetljivost virusa na inhibitore (29). Mutacije povezane s rezistencijom na PI dijele se na primarne (ili glavne) i sekundarne (ili popratne) mutacije (Slika 8). Primarne mutacije povezane s rezistencijom na PI samostalno smanjuju osjetljivost virusa na jedan ili više PI. Pojavljuju se u ranoj fazi razvoja rezistencije na određeni lijek, a smještene su u dijelu gena koji kodira sintezu aminokiselina u aktivnom mjestu virusne proteaze. Sekundarne mutacije povezane s rezistencijom na PI kodiraju sintezu aminokiselina izvan aktivnog mjesta proteaze te kompenziraju za smanjenu replikaciju povezanu s primarnim mutacijama čime dodatno smanjuju osjetljivost na PI. Većina virusa rezistentnih na PI sadrži i kompenzacijske mutacije u mjestima cijepanja polipeptida Gag. Navedene mutacije samostalno ne uzrokuju rezistenciju na PI no kompenziraju za promjene u proteazi nastale kao posljedica primarnih i sekundarnih mutacija (5, 68, 75).

Cons	30 D	32 V	46 M	47 I	48 G	50 I	54 I	76 L	82 V	84 I	88 N	90 L
ATV/r		I	IL	V	VM	L	VTAM		ATFS	V	S	M
DRV/r		I		VA		V	LM	V	F	V		
FPV/r		I	IL	VA		V	VTALM	V	ATFS	V		M
IDV/r		I	IL	VA			VTA	V	ATFS	V	S	M
LPV/r		I	IL	VA	VM	V	VTALM	V	ATFS	V		M
NFV	N		IL	VA	VM		VTALM		ATFS	V	DS	M
SQV/r					VM		VTAM		AT	V	S	M
TPV/r		I	IL	VA			VTAM		LT	V		

Slika 8: Sažet prikaz mutacija povezanih s rezistencijom na PI. Aminokiseline sekvence divljeg tipa prikazane su u prvom redu dok su aminokiseline s mutacijama prikazane ispod crte. Podebljane i podcrtane mutacije uzrokuju klinički značajnu rezistenciju; podebljane mutacije značajno pridonose rezistenciji; nepodebljane mutacije sporadično doprinose rezistenciji. Cons=konsenzus divlji tip. (Preuzeto od Tang i sur.) (75).

2.1.8.4. Rezistencija na inhibitore integraze

Vezanjem u blizini aktivnog mjesta enzima, inhibitori integraze ometaju ispravno pozicioniranje virusne DNA u odnosu na aktivno mjesto (15, 33). Mutacije u genu za integrazu mogu utjecati na reakciju prijenosa lanca kao i na obradu 3´-krajeva u procesu integracije (15).

Mutacije povezane s rezistencijom na inhibitor integraze raltegravir mogu se klasificirati u tri skupine: (i) N155H, (ii) Q148HRK+G140SA i (iii) Y143CR+T97A. Mutacije iz sve tri skupine javljaju se uz popratne mutacije poput L74M, E92Q, T97A, G136R i/ili V151I u slučaju N155H; E138K ili G140A/S u slučaju Q148HRK+G140SA te L74A/I, E92Q, T97A, I203M i/ili S230R u slučaju mutacijskog puta Y143CR+T97A (33). Obzirom na to da pojedinačne mutacije mogu smanjiti osjetljivost virusa na raltegravir za čak 10 puta, inhibitori integraze klasificiraju se u skupinu lijekova s niskom genskom barijerom za rezistenciju (5, 33, 68).

2.1.8.5. Rezistencija na inhibitore ulaska virusa u stanicu

Iako se rezistencija na maravirok može razviti putem mutacija koje dovode do promjene u tropizmu virusa te omogućuju HIV-u korištenje koreceptora CXCR4, glavni mehanizam rezistencije na maravirok uključuje pojavu brojnih mutacija u genu *env* koje omogućuju virusu kontinuirano vezanje na koreceptor CCR5 unatoč blokadi inhibitora. Mutacije povezane s rezistencijom na antagonist CCR5 povezane su s promjenama u strukturi omče gp120 HIV-1, posebice u omči V3 koja je glavna determinanta za određivanje tipa koreceptora kojeg virus koristi za vezanje na ciljne stanice (5, 33, 68, 80, 81). Mutacije koje uzrokuju rezistenciju na maravirok uključuju mutaciju T163K u omči V2, S405A u omči V4, N355Y u omči C3 te ključne mutacije za razvoj rezistencije A316T i I323C u omči V3 (5, 33,68, 80, 81). Enfuvirtid ima nisku gensku barijeru za rezistenciju. Mutacije u regiji na koju se enfuvirtid veže (kodoni 36-45 u transmembranskom proteinu gp41), primarno su odgovorne za rezistenciju na inhibitor. Ključne mutacije koje potvrđuju rezistenciju na enfurvitid su: G36D/E/V, V38EA, Q40H, N42T i N43D (5, 33, 68, 80). Pojedinačna mutacija povezana s rezistencijom na enfuvirtid obično smanjuje osjetljivost virusa na inhibitor za deset puta dok dvije mutacije obično sto puta (5, 33, 68, 80).

2.1.9. Laboratorijske metode za određivanje rezistencije HIV-a na antiretrovirusne lijekove

Rezistencija HIV-a na antiretrovirusne lijekove onemogućuje potpunu supresiju virusne replikacije te značajno ograničava uspješnost antiretrovirusnog liječenja (75, 82, 83).

Metode određivanja rezistencije HIV-a na antiretrovirusne lijekove dijele se u tri skupine: (1) genotipizacijski testovi, (2) fenotipizacijski testovi i (3) test virtualnog fenotipa. Genotipizacijski testovi otkrivaju određene mutacije u genomu virusa koje su povezane s rezistencijom na lijekove temeljem kojih se pretpostavlja relativna rezistencija virusa na antiretrovirusne lijekove (15, 29, 84). Obzirom na razinu detekcije, genotipizacijske testove dijelimo na testove koji se temelje na sekvenciranju po Sangeru i detektiraju dominantne genomske varijante u kvazispecijesu s razinom razlučivanja od oko 20% i na testove detekcije manjinskih varijanti metodom ˝ultra-deep˝-sekvenciranja (UDS).

Fenotipizacijski testovi mjere direktno enzimsku aktivnost produkata virusnih gena ili kinetiku replikacije virusa u kulturi stanica *in vitro* u prisutnosti određenih koncentracija antiretrovirusnih lijekova (15, 29, 84). Fenotipizacijski testovi rezistencije HIV-a na antiretrovirusne lijekove zaštićeni su patentima i izvode se u biotehnološkim tvrtkama na komercijalnom principu (Tablica 2).

Genotipizacijski testovi najčešće se koriste u biomedicinskim istraživanjima te omogućuju detekciju mutacija povezanih s rezistencijom prije no što se ona može dokazati fenotipizacijskim testovima. Ovi testovi omogućuju i detekciju mutacija koje ne uzrokuju rezistenciju no ukazuju na postojanje selektivnog pritiska lijeka (50, 83, 85).

Za analizu rezistencije HIV-a na antiretrovirusne lijekove u ovom istraživanju primijenjen je genotipizacijski test.

2.1.9.1. Genotipizacijski testovi

Genotipizacijski testovi za određivanje rezistencije HIV-1 na antiretrovirusne lijekove detektiraju mutacije u genomu virusa koje su povezane s rezistencijom na antiretrovirusne lijekove. Određene mutacije u genu za PR (kodoni 10-93) povezane su s rezistencijom na lijekove iz skupine PI dok su mutacije u genu za RT (kodoni 40-240) povezane s rezistencijom na lijekove iz skupina NRTI i NNRTI (50, 75, 85, 86). Prvi korak u određivanju rezistencije HIV-a na antiretrovirusne lijekove metodom genotipizacije je izolacija HIV-1-RNA iz plazme. Obzirom na to da je vrijeme poluživota HIV-1-RNA u plazmi približno 6 sati, razumno je pretpostaviti da molekule HIV-1-RNA izolirane iz plazme pripadaju

replikacijski aktivnim genomskim varijantama koje su recentno selektirane pod utjecajem antiretrovirusnih lijekova (87). Virusna RNA se reverznom transkripcijom prevodi u cDNA (uz dodatak dNTP-ova, enzima RT i početnica). Za potrebe reverzne transkripcije najčešće se koriste molekule RT porijeklom od MMLV (engl. *Moloney murine leukemia virus*) i AMV (engl. *Avian myeloblastosis virus*). Nakon reverzne transkripcije amplificiraju se ciljne regije (geni za PR i RT) metodom PCR (29, 50). Redoslijed nukleotida u sekvenci amplificiranog produkta određuje se sekvenciranjem po Sangeru što je direktno sekvenciranje, tj. ˝population-based˝-sekvenciranje.

Tablica 2: Prednosti i nedostaci genotipizacijskih i fenotipizacijskih testova za određivanje rezistencije HIV-a na antiretrovirusne lijekove.

	Genotipizacijski testovi	**Fenotipizacijski testovi**
Prednosti	Brža izvedba	Direktno i kvantitativno mjerenje rezistencije
	Niži troškovi	Jasna interpretacija rezultata
	Jednostavna tehnologija	Procjena ukupnog učinka svih mutacija (uključujući mutacije povezane s križnom rezistencijom)
	Detekcija mutacija prije pojave fenotipske rezistencije	Testiranje novih antiretrovirusnih lijekova
	Veća osjetljivost za detekciju miješane populacije virusa	Mogućnost procjene učinka interakcija između mutacija
Nedostaci	Indirektno mjerenje rezistencije	Duža izvedba
	Kompleksna interpretacija kod većeg broja mutacija	Viši troškovi
	Nedostatak standardizacije između interpretacijskih algoritama	Nedostatak standardizacije ˝cut-off˝ vrijednosti između testova
	Nemogućnost detekcije mutacijskih veza	Mogući lažni rezultati u slučaju miješane populacije virusa
	Nemogućnost predviđanja učinka nepoznatih mutacija	Fenotipizacijska procjena samo jedne HIV-1-varijante (obično dominantne) u virusnoj populaciji
	Nemogućnost detekcije manjinskih genomskih varijanti (u testovima koji se temelje na metodi sekvenciranja po Sangeru)	Nemogućnost detekcije manjinskih genomskih varijanti

Pri određivanju rezistencije HIV-a na antiretrovirusne lijekove analiziraju se sekvence nukleotida kompletnog gena za proteazu (297 nukleotida) i dio sekvence gena za reverznu transkriptazu koja kodira za aminokiseline od broja 40 do 240 u kojoj se nalazi najveći broj mutacija koje su povezane s rezistencijom na lijekove. Sekvenca nukleotida se potom prevodi u sekvencu aminokiselina i uspoređuje sa sekvencom divljeg tipa virusa (referentna sekvenca) pomoću odgovarajućeg programa radi otkrivanja mutacija povezanih s rezistencijom HIV-1 na antiretrovirusne lijekove. Završni korak analize je povezivanje genotipizacijske informacije (vrsta mutacija koje su detektirane u genu za RT ili PR) i interpretacije biološke značajnosti mutacije za rezistenciju na pojedine antiretrovirusne lijekove. Najčešće korišteni standardizirani testovi za određivanje rezistencije HIV-a na antiretrovirusne lijekove su HIV-1 TruGene™ (Bayer Healthcare Diagnostics, SAD) i ViroSeqTM (Celera Diagnostics/Abbot Molecular, SAD) (29, 50, 85).

Interpretacija biološke značajnosti mutacija otkrivenih genotipizacijskim testom temelji se na primjeni bioinformatičkih algoritama temeljenim na pravilima (engl. *˝rule-based algorithms˝*) i/ili algoritma koji se temelji na ˝virtualnom fenotipu˝ (29, 50, 85, 86). Bioinformatički algoritmi temeljeni na pravilima najčešći su pristup u interpretaciji rezultata genotipizacijskog testa. Ovaj pristup temelji se na interpretaciji biološke značajnosti mutacija pomoću specijaliziranih bioinformatičkih algoritama koje sastavljaju eksperti za područje rezistencije HIV-a na antiretrovirusne lijekove (tzv. Ekspertni panel znanstvenika) koji se redovito (svakih nekoliko mjeseci) nadopunjuju novim podatcima (50, 85, 86). U najpoznatije interpretacijske algoritme temeljene na pravilima ubrajaju se HIVdb (Stanford University Medical Center, CA, SAD), RegaInst (Rega Institute for Medical Research and University Hospitals Leuven, Katholieke Universiteit Leuven, Belgija), ANRS (Agence Nationale de Recherches sur le SIDA) i algoritam OpenGene DNA *Sequencing* System, (Bayer Healthcare LLC, Visible Genetics Inc., SAD) koji se koristi u kombinaciji sa standardiziranim testom HIV-1 TrueGene™ (Bayer Healthcare Diagnostics, SAD). Osnovna funkcija ovih bioinformatičkih algoritama je procjena vjerojatnosti aktivnosti nekog antiretrovirusnog lijeka protiv mutiranog virusa u usporedbi s aktivnošću istog lijeka protiv divljeg tipa virusa. Algoritmi se međusobno razlikuju po pravilima koja koriste za interpretaciju podataka koja su pripravili referentni laboratoriji, tj. ekspertni panel znanstvenika.

Algoritam *OpenGene DNA Sequencing System* temeljen na pravilima (˝The GuideLines ™ Rules˝) koristi se za interpretaciju obrazaca mutacija, a sastavlja ga ˝VGI Consensus Panel˝, tj. panel neovisnih stručnjaka koji se bave rezistencijom HIV-a na antiretrovirusne lijekove.

Identificirane mutacije se interpretiraju na temelju propisanih pravila VGI Consensus panela. Krajnji rezultat je izvještaj koji je utemeljen na računalnom algoritmu razvijenom unutar tih pravila koja uključuju interaktivne učinke mutacija. Prvi dio izvještaja sažima detektirane mutacije i njihov utjecaj na rezistenciju na pojedinačni lijek, tj. interpretaciju rezistencije (50, 88-91). Tri su razine interpretacije detektiranih mutacija:

(1) rezistencija ne postoji, slučaj kad nisu detektirane poznate mutacije ili smanjena osjetljivost nije povezana s mutacijama detektiranim u testu

(2) moguća rezistencija, slučaj kad su detektirane mutacije povezane sa smanjenim virološkim odgovorom u nekih, ali ne i u svih bolesnika

(3) rezistencija postoji, slučaj kad su detektirane mutacije povezane s maksimalnom redukcijom osjetljivosti.

U slučaju da ne postoji direktni ili indirektni dokaz za određivanje osjetljivosti na lijek, program interpretira rezultat u smislu ″nedostatne količine dokaza″. U slučaju da je biološka značajnost detektirane mutacije interpretirana kao ″mutacija koja uzrokuje moguću rezistenciju na određeni lijek″, preporučuje se uporaba tog lijeka samo u bolesnika koji su rezistentni na sve ostale klase lijekova. U slučaju dokazivanja mutacija povezanih s rezistencijom virusa na pojedini antiretrovirusni lijek opravdano je za pretpostaviti da postoji mala klinička korist od daljneg liječenja, no valja istaknuti da za bolesnike bez drugih terapijskih opcija (rezistencija na sve ostale lijekove), nastavak liječenja lijekovima na koje se već razvila rezistencija može imati određenu korist u smislu kontrole replikacije divljeg tipa virusa. Pri interpretaciji rezultata koji pokazuje da nije detektirana rezistencija treba istaknuti da test ne mora detektirati rezistenciju na ranije korištene lijekove jer mutacije povezane s rezistencijom na te lijekove mogu biti prisutne kao rijetke varijante koje se ne mogu detektirati ″population-based″-sekvenciranjem, tj. da se ne može isključiti njihov nepovoljni učinak na virološki odgovor pri liječenju. Algoritam daje i detaljna objašnjenja o tome kako određene mutacije mogu modulirati utjecaj drugih mutacija na osjetljivost na lijek čak i u smislu povećane osjetljivosti. Primjera radi, mutacija M184V u prisutnosti drugih mutacija povećava osjetljivost HIV-1 na zidovudin *in vitro* (50, 88-91). Svaka detektirana mutacija i preporuka o interpretaciji značajnosti detekcije mutacije rangirana je sukladno opsegu znanstveno utemeljenih literaturnih podataka odnosno mišljenja ekspertnih panela.

Algoritam *Rega* je prvi algoritam koji se pokazao uspješnim u predikciji terapijskog odgovora na antiretrovirusne lijekove koji se temelji na dokazu mutacija povezanih s rezistencijom na antiretrovirusne lijekove. Rega je kompleksan algoritam koji uzima u obzir poznate

sinergističke i antagonističke kombinacije mutacija. Literaturni podatci i vlastita iskustva stručnjaka koji su izradili algoritam temelj su interpretacijskih pravila ovog algoritma i ažuriraju se svake godine. Tri su razine kriterija za interpretaciju izolata virusa: rezistentan, srednje rezistentan i osjetljiv izolat. Ovaj algoritam poseban je po tome što pri interpretaciji rezultata uzima u obzir prisutnost većeg broja sekundarnih mutacija koje ne smanjuju osjetljivost na lijek no mogu smanjiti gensku barijeru rezistencije na lijek, posebice pri pojavi neke nove primarne mutacije. Algoritam Rega iznimno je kvalitetan u predviđanju rezistencije na lijekove i postizanja supresije virusne replikacije u bolesnika koji ranije nisu liječeni antiretrovirusnim lijekovima no ne daje dovoljno smjernica za liječenje multirezistentnih pacijenata. U analizi značajnosti mutacija povezanih s rezistencijom algoritam navodi da lijekovi na koje virus iskazuje ˝umjerenu razinu rezistencije˝ mogu biti djelomično aktivni u kombinaciji s drugim antiretrovirusnim lijekovima te pokazati barem rezidualnu aktivnost, posebice u kombinacijama više od 4 lijeka (50, 88-91).

Algoritam se temelji na pravilima dostupnim na njihovoj internetskoj stranici (http://www.rega.kuleuven.be/cev/) (92, 93).

Algoritam *ANRS* temelji se na podatcima o korelaciji između mutacija povezanih s rezistencijom na lijekove i virološkog ishoda liječenja iz baze podataka pacijenata s virološkim neuspjehom liječenja iz Francuske. Posebnost ovog algoritma jest kvalitetna analiza značajnosti mutacija virusa povezanih s rezistencijom na antiretrovirusne lijekove u kontekstu genotipa virusa, tj. identifikacija mutacija koje su u nekim genotipovima samo polimorfne varijante koje nisu vezane uz rezistenciju na lijekove. Algoritam ANRS temelji se na literaturnim podatcima o genotipskim prediktorima virološkog odgovora na abakavir, tenofovir, didanozin, lopinavir/ritonavir, sakvinavir/ritonavir, amprenavir/ritonavir i atanazavir (50, 88-91). U algoritam se unose mutacije ili sekvenca regija gena *pol*, a rezultat analize je procjena osjetljivosti na antiretrovirusne lijekove kojima mogu biti pridruženi termini osjetljiv, moguća rezistencija ili rezistentan. Podatci o rezistenciji na zalcitabin su nepotpuni i nedostatni za formiranje preporuka stoga taj lijek nije naveden u rezultatu analize. Pravila algoritma ANRS dostupna su putem interneta na (http://www.medpocket.com/) (94).

Kod algoritma *Stanford HIV Drug Resistance Datebase* sekvenca se unosi u algoritam preko formulara za analizu sekvence ili preko liste mutacija dostupne na internetskim stranicama (http://www.hivdb.stanford.edu/) (95). Koristeći formular za analizu sekvence (Sequence Analysis Form), sekvenca gena *pol* se u formatu fasta unosi u predviđeno polje i uspoređuje s referentnom sekvencom subtipa B HIV-1. Algoritam HIVdb pridružuje svakom

antiretrovirusnom lijeku jedan bod za svaku mutaciju povezanu s rezistencijom, a pridruživanje bodova se temelji na literaturnim podatcima o značajnosti mutacija za rezistenciju na pojedine antiretrovirusne lijekove kao i o povezanosti između genotipa i ranije primijenjenih antiretrovirusnih lijekova, genotipa virusa i fenotipske rezistencije kao i genotipskog obrasca mutacija i virološkog ishoda liječenja. Mutacije koje uzrokuju preosjetljivost na antiretrovirusne lijekove dobivaju negativni bod za taj lijek. Na temelju ukupnog broja bodova algoritam dodijeljuje svakom lijeku jednu od pet razina rezistencije: osjetljiv, moguća niska razina rezistencije, niska razina rezistencije, srednja razina rezistencije, visoka razina rezistencije (50, 88-91).

˝Virtualni fenotip˝ (Virco®TYPE HIV-1, Virco BVBA; Geno2Pheno, www.geno2pheno.org) alternativni je pristup u interpretaciji rezultata genotipizacijskog testa koji se temelji na usporedbi podataka dobivenih genotipizacijskim testom s bazom podataka dostupnih genotip-fenotipskih parova. Test omogućuje otkrivanje i izračunavanje učinka značajnih mutacija i parova mutacija na temelju statističke analize genotipskih i fenotipskih podataka velikog broja ranije testiranih uzoraka. Virtualni fenotip za većinu lijekova pokazuje dobru korelaciju sa stvarnim fenotipom. Glavni nedostatak ovog testa je da njegova mogućnost predviđanja ovisi o dostupnom broju odgovarajućeg seta podataka te je stoga odstupanje veće u slučaju manjeg seta podataka kao i kod novih lijekova ili kompleksnih modela rezistencije. Nadalje, usporedba pomoću virtualnog fenotipa vrši se na temelju ranije odabranih kodona, a ne cijele nukleotidne sekvence i većina genotip-fenotipskih parova u bazi podataka su dobivena od uzoraka subtipa B HIV-1 što zahtjeva oprez pri interpretaciji genotipizacijskih podataka dobivenih od uzoraka non-B-subtipova (29, 83, 85, 86, 96).

Svi trenutno dostupni testovi za određivanje rezistencije ograničeni su s nekoliko čimbenika (85, 97, 98).

i) **Količina RNA u plazmi za vrijeme testiranja trebala bi biti barem 1000 kopija/mL**. Testiranje uzoraka plazme s nižom razinom viremije ne daje dosljedne rezultate, ali tehnologija testova se poboljšava.

ii) **Nemogućnost detekcije manjinskih varijanti (genoma) unutar populacije HIV-1.** Osim ako je zastupljen s više od 20-30% u cirkulirajućoj populaciji virusa, rezistentni se virus ne može detektirati s trenutno dostupnim testovima. Varijante genoma koje nisu detektirane komercijalnim testovima mogu utjecati na virološki odgovor na liječenje.

iii) **Križna rezistencija**. Većina mutacija koja se pojavljuje tijekom liječenja uzrokuje rezistenciju na više lijekova unutar iste skupine. Kako je za postizanje trajne supresije HIV-1 nužno kombinirati lijekove iz barem dvije skupine, križna rezistencije predstavlja značajan problem. Prisutnost mutacija povezanih s križnom rezistencijom utječe na interpretaciju rezultata genotipizacijskog testa jer otežava odabir klinički najpovoljnijih antiretrovirusnih lijekova za postizanje virusne supresije.

iv) **Rezervoari HIV-1**. Kako standardni testovi mutacije povezane s rezistencijom detektiraju u plazmi, rezistentni virusni sojevi pohranjeni u provirusnoj DNA i uskladišteni u različitim dijelovima tijela ostaju nedetektirani, ali se pod selektivnim pritiskom antiretrovirusnih lijekova mogu ponovno pojaviti.

2.1.9.2. Metode detekcije manjinskih HIV-1-rezistentnih varijanti

Manjinske rezistentne varijante HIV-a zastupljene su u virusnoj populaciji svake zaražene osobe. Istraživanja distribucije manjinskih varijanti HIV-a i mutacija povezanih s rezistencijom pokazuju da su primarne mutacije povezane s rezistencijom zastupljene 1-20% u virusnoj populaciji, učestale u HIV-om zaraženih osoba (75, 99-104). Istraživanja kliničke značajnosti manjinskih primarnih mutacija povezanih s rezistencijom pokazala su da primarne mutacije povezane s rezistencijom na NNRTI kao što je K103N koje su prisutne u količinama manjim od 1% nepovoljno utječu na ishod liječenja s NNRTI i povećavaju rizik za virološki neuspjeh (99-104). Interes za istraživanje manjinskih rezistentnih varijanti HIV-a povećao se razvojem tehnologija koje su omogućile detekciju rezistentnih varijanti zastupljenih s manje od 1% u virusnoj populaciji i spoznajom da rezistentna virusna populacija postoji kao mješavina više genskih varijanti u kojoj je samo dominantna varijanta detektirana standardnim sekvenciranjem (102, 105-114). Visoko osjetljivi testovi za detekciji manjinskih rezistentnih varijanti uključuju testove za otkrivanje točkastih mutacija (engl. *Point mutations assays*) i nove tehnike sekvenciranja visoke rezolucije. Testovi točkastih mutacija detektiraju mutacije povezane s rezistencijom s frekvencijom do 0.01% u virusnoj populaciji uzorka, ali ne pružaju informaciju o cijeloj sekvenci već samo o mjestima vezanim za rezistenciju. Za razliku od njih, tehnike sekvenciranja visoke rezolucije kao što su SGS (engl. *Single genome seguencing*) i UDS (engl. *Ultra-deep sequencing*) omogućuju analizu cijele sekvence što daje mogućnost istraživanja popratnih mutacija koje su često povezane s mutacijama važnim za rezistenciju tijekom njihove selekcije (22, 83, 110). UDS je novija tehnologija sekvenciranja visoke propusnosti koja omogućuje sekvenciranje velikog broja individualnih molekula DNA

u uzorku. Na principu UDS-a temelji se i 454 Life/Science automatizirani sustav (Roche Diagnostics, SAD) koji je poslužio za detekciju manjinskih rezistentnih varijanti/mutacija HIV-a u sklopu izrade ovog doktorata. Ova metoda pogodna je za analiziranje heterogenih genoma kao što je genom HIV-a jer omogućuje detekciju mutacija zastupljenih s niskim frekvencijama te otkrivanje rijetkih varijanti virusa. Tehnologija se temelji na kombinaciji emPCR (engl. *emulsion PCR*) i pirosekvenciranja. Pirosekvenciranje je metoda sekvenciranja DNA koja se temelji na principu sekvenciranja putem sinteze, a razlikuje se od standardnog sekvenciranja po Sangerovoj metodi jer se oslanja na detekciju otpuštenog pirofosfata prilikom ugradnje nukleotida u lanac DNA. Kemoluminiscentni signal koji se proizvodi pri svakoj ugradnji komplementarnog nukleotida omogućuje određivanje slijeda nukleotida u DNA (83, 115).

U ovoj metodi sekvenciranja, HIV-1-RNA se izolira, reverzno transkribira pomoću specifičnih početnica, a rezultat su amplikoni koji nastaju prepisivanjem fragmenata odabrane regije genoma HIV-a (gen *pol*). HIV-1-početnice koje se koriste za stvaranje amplikona sadrže usmjerenu GS FLX Titanium Primer A- i Primer B-sekvencu na 5´-kraju (koja uključuje tzv. ˝key˝-sekvencu od četiri baze), sekvencu specifičnu za ciljni fragment na 3'-kraju i MID-sekvencu (engl. *Multiplex identifier*) između Primer A (B)-sekvence i specifične sekvence koja omogućuje automatsku identifikaciju uzoraka putem računalnog programa u postupku sekvenciranja. Nakon miješanja amplikona s ˝Capture˝-mikročesticama, gdje se svaka molekula DNA pomoću početnica s adapterima na 5´-kraju imobillizira na mikročesticu, provodi se emPCR radi stvaranja DNA biblioteke (klonska amplifikacija) (115, 116). Tijekom emulgiranja stvaraju se milijuni vodenih kapljica unutar kojih se amplificira svaka jedinstvena molekula DNA vezana za jednu mikročesticu. Amplificirani fragmenti DNA vezani za mikročestice prenose se na jažice pikotitarske pločice sekvencera (GS Junior) na način da samo jedna čestica bude prisutna u svakoj od nekoliko tisuća jažica (117, 118).

U reakciji pirosekvenciranja osim amplificiranog fragmenta DNA sudjeluju i dNTP-i (dCTP, dATP, dGTP i dTTP), početnice za sekvenciranje, enzimi za sekvenciranje (DNA-polimeraza, ATP-sulfuraza, luciferaza i apiraza) te supstrati adenozin 5´-fosfosulfat (APS) i luciferin. Nakon dodatka enzima za sekvenciranje, prvi od četiri dNTP-a nanosi se preko jažica pikotitarske pločice i u slučaju da je komplementaran, DNA-polimeraza katalizira njegovu ugradnju u lanac DNA. Pri svakoj ugradnji komplementarnog nukleotida stvara se fosfodiesterska veza između dNTP-a, a otpušta pirofosfat (PPi) u količini ekvivalentnoj onoj ugrađenog nukleotida. ATP-sulfuraza pretvara PPi u ATP u prisutnosti APS, a nastali ATP

aktivira luciferazu koja pretvara luciferin u oksiluciferin. Nastali svjetlosni signal čiji je intenzitet proporcionalan broju ugrađenih nukleotida detektira CCD (engl. *Charge-coupled device*) kamera u sekvenceru i bilježi u obliku signala u pirogramu. Visina svakog signala proporcionalna je broju ugrađenih nukleotida. Sporedni produkti u reakciji sekvenciranja, kao što su neugrađeni nukleotidi i ATP, razgrađuju se apirazom. Signali nastali u procesu sekvenciranja prenose se na računalo u Standard Flowgram formatu (SFF) i analiziraju računalnim programom 454 Life Science sustava za sekvenciranje (117).

2.1.10. Istraživanja prevalencije rezistencije HIV-a na antiretrovirusne lijekove u Europi

Sustavna istraživanja o prevalenciji rezistencije HIV-a na antiretrovirusne lijekove u bolesnika s virološkim neuspjehom liječenja su oskudna, metodološki vrlo heterogena a rezultati su izrazito varijabilni. U Europi je provedeno nekoliko nacionalnih istraživanja, uglavnom u Zapadnoj Europi (Ujedinjeno Kraljevstvo, Francuska, Švedska, Portugal i Danska), no valja istaknuti da se rezultati navedenih istraživanja ne mogu u potpunosti usporediti obzirom na različite kriterije uključivanja ispitanika, nacionalnu pokrivenost te različite metode analize prevalencije rezistencije na lijekove.

Pillay i sur. objavili su rezultate prevalencije rezistencije HIV-a na antiretrovirusne lijekove u Ujedinjenom Kraljevstvu (UK) koji se temlje na analizi rezultata nacionalne baze podataka s oko 4000 bolesnika (119). U navedenom istraživanju prevalencija rezistencije HIV-a na antiretrovirusne lijekove analizirana je kombinacijom analize u jednoj vremenskoj točki i kumulativnog modela rezistencije. Analiza u jednoj vremenskoj točki pokazala je visoku prevalenciju (75% do 82%) rezistencije HIV-a na ≥1 antiretrovirusnih lijekova u UK tijekom perioda praćenja od 1998. do 2002. dok je prevalencija rezistencije na ≥2 skupine lijekova bila oko 17%. Većina ispitanika uključenih u istraživanje bila je rezistentna na NRTI ili na NRTI u kombinacijom s PI (do 2000.) odnosno u kombinaciji s rezistencijom na NNRTI (od 2000.) (119).

Assoumou i sur. objavili su rezultate francuskog nacionalnog istraživanja o prevalenciji rezistencije HIV-a na lijekove u bolesnika s viremijom >50 kopija HIV-1-RNA/mL (120). Rezultati ovog istraživanja pokazali su da je 2009. u Francuskoj samo 15% liječenih bolesnika koji se prate u nacionalnom registru imalo viremiju >50 kopija/mL te da su u samo 8.9% bolesnika detektirane mutacije povezane s rezistencijom na lijekove (120).

Značajno je istaknuti i rezultate istraživanja Bontell i sur. koje opisuje prevalenciju rezistencije HIV-a na antiretrovirusne lijekove u bolesnika liječenih u Švedskoj u razdoblju

od 1997. do 2011. Rezultati ovog istraživanja pokazali su značajno smanjenje prevalencije rezistencije na NRTI i PI tijekom perioda praćenja i dokazali da se porast prevalencije rezistencije na NNRTI u Švedskoj može povezati sa infekcijom rezistentnim sojevima virusa u inozemstvu (121).

Obzirom na važnost problema rezistencije HIV-a na antiretrovirusne lijekove, provedeno je i nekoliko kolaborativnih istraživanja u Europi.

De Luca i sur. su u razdoblju od 2007. do 2008. retrospektivno analizirali prevalenciju rezistencije HIV-a na lijekove u sedam zemalja Zapadne Europe (122). Rezultati ovog istraživanja pokazali su značajno smanjenje postotka ispitanika kod kojih je sekvenciranjem regije *pol* genoma virusa otkrivena barem jedna mutacija povezana s rezistencijom na lijekove s 81% u 1997. na 71% u 2008.

Bannister i sur. objavili su rezultate procjene prevalencije rezistencije HIV-a na lijekove u prospektivnoj, opservacijskog kohorti EUROSIDA u koju je uključeno 16 599 HIV-om zaraženih osoba iz 102 klinička centra iz 31 europske zemlje, Argentine i Izraela (123). EUROSIDA nije reprezentativna nacionalna kohorta (temelji se na uključivanju određenog broja bolesnika kod kojih se započinje liječenje u svakom kolaborativnom centru) te se ne bavi problemom rezistencije (cilj istraživanja je praćenje uspješnosti primjene različitih kombinacija lijekova te praćenje nuspojava). Stoga su rezultati genotipizacijskog testa rezistencije bili dostupni samo za 1143 od ukupno 6498 analiziranih ispitanika dok se procjena prevalencije rezistencije u ostalih 5355 bolesnika temeljila na matematičkom modelu koji je uzimao u obzir vrste lijekova i broj viroloških neuspjeha liječenja (123). Temeljem navedene metodologije, autori su procjenili da je 2008. prevalencija rezistencije HIV-a na NRTI u bolesnika uključenih u projekt EUROSIDA iznosila 43%, prevalencija rezistencije na NNRTI 15% te 25% na PI. Obzirom na specifičnost metodologije, rezultate ovog istraživanja nije moguće direktno usporediti s drugim literaturnim podatcima (123). Literaturni podatci o prevalencije rezistencije HIV-a na lijekove u drugim europskim zemljama uključujući Hrvatsku za sada nisu dostupni.

3. MATERIJALI I METODE

3.1 Ispitanici

U istraživanje sam uključila sve HIV-om zaražene osobe starije od 18 godina koje su liječene HAART-om u Ambulanti za HIV/AIDS Klinike za infektivne bolesti u Zagrebu i Referentnom centru za dijagnostiku i liječenje HIV/AIDS-a Ministarstva zdravstva R. Hrvatske u razdoblju od siječnja 2008. do kraja prosinca 2012. Retrospektivni dio istraživanja obuhvatio je period od siječnja 2008. do rujna 2010. Kriteriji uključivanja u istraživanje bili su: (1) nepotpuna supresija virusne replikacije tijekom primjene antiretrovirusnih lijekova i (2) viremija u plazmi >1000 kopija HIV-1-RNA po mL. HIV-om zaražene osobe mlađe od 18 godina i trudnice nisam uključila u istraživanje.

Etičko povjerenstvo Klinike za infektivne bolesti ˝Dr. Fran Mihaljević˝ odobrilo je ovo istraživanje koje je provedeno u sklopu znanstveno-istraživačkog projekta ˝Imunološka rekonstitucija i rezistencija na lijekove u HIV-bolesnika iz Hrvatske (Ministarstvo znanosti obrazovanja i športa R. Hrvatske, šifra projekta 143-180116-0097, glavni istraživač dr.sc. S. Židovec Lepej).

3.2. Biološki uzorci

Uzorci za genotipizacijski test rezistencije HIV-a na antiretrovirusne lijekove, genotipizaciju HIV-a, kvantifikaciju HIV-1-RNA i određivanje broja CD4+-T-limfocita prikupila sam tijekom redovitih kontrolnih pregleda ispitanika u Ambulanti za HIV/AIDS ili Zavoda za infekcije imunokompromitiranih bolesnika Klinike za infektivne bolesti u Zagrebu. Tijekom ovog istraživanja nisam prikupljala dodatne biološke uzorke već sam koristila isključivo ostatni dio uzoraka koji su prikupljeni za potrebe dijagnostičke obrade bolesnika. Za potrebe genotipizacijskog testa rezistencije HIV-a na lijekove, genotipizaciju virusa te kvantifikaciju HIV-1-RNA koristila sam plazmu koja je izdvojena centrifugiranjem periferne krvi uzete venepunkcijom u sterilnu epruvetu VACUTAINER (Becton Dickinson, SAD) na 3500 x g, 10 minuta pri sobnoj temperaturi. Alikvote plazme od 1.5 mL pohranila sam pri -80°C 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).

3.3. Reagencije

3.3.1. Kompleti reagencija za kvantifikaciju HIV-1-RNA

Molekularni test za kvantifikaciju HIV-1-RNA u plazmi metodom PCR Amplicor HIV-1 Monitor Test (Roche Diagnostics, Mannheim, Njemačka), version 1.5.

Molekularni test za kvantifikaciju HIV-1-RNA u plazmi metodom real-time PCR COBAS TaqMan HIV-1 Test (Roche Diagnostics, Mannheim, Njemačka), version 2.0.

3.3.2. Komplet reagencija za izolaciju HIV-1-RNA

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

3.3.3. Komplet reagencija za određivanje genotipske rezistencije HIV-a na antiretrovirusne lijekove

Trugene HIV-1 Genotyping kit (Bayer HealthCare LLC, Tarrytown, NY, SAD).

3.3.4. Kompleti reagencija za potrebe sekvenciranja amplikona HIV-1-RT i -PR metodom ˝ultra-deep˝-sekvenciranja

NucliSENS® Nucleic Acid Extraction Reagents for easyMAG (bioMerieux SA, Marcy l´etoile, Francuska) za izolaciju HIV-1-RNA.

Komplet reagencija za sintezu cDNA (Roche Diagnostics, Mannheim, Njemačka)

FastStart High Fidelity PCR System (Roche Diagnostics, Mannheim, Njemačka) za sintezu amplikona za sekvenciranje HIV-1-RT i -PR.

Agencourt XP AMPure Kit (Agencourt Bioscience Corporation, A Beckman Coulter Company, MA, SAD) za pročišćavanje amplikona za sekvenciranje HIV-1-RT i -PR.

Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, SAD) za kvantifikaciju amplikona za sekvenciranje HIV-1-RT i -PR.

Agilent DNA 1000 Kit (Agilent Technologies, SAD) za elektroforezu produkata DNA.

GS Junior Titanium emPCR Kit (Lib-A) (Roche Diagnostics, Mannheim, Njemačka) za emPCR za sekvenciranje HIV-1-RT i -PR.

GS Junior Titanium PicoTiterPlate Kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Njemačka) i GS Junior Titanium Sequencing Kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Njemačka) za reakciju sekvenciranja amplificiranih amplikona HIV-1-RT i -PR na sekvenceru GS Junior.

3.3.5. 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, CA, SAD).

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, CA, SAD).

Monoklonsko protutijelo specifično za molekulu HLA-DR.HLA-DR-PC-7 (Beckman Coulter, Inc., Brea, CA, SAD).

ImmnunoPrep Reagent System Whole blood lysing reagent (Beckman Coulter, Inc., Brea, CA, SAD).

Flow-Count™ *Flourospheres absolute count determination* on CXP Flow Cytometry System *(Beckman Coulter, Inc., Brea, CA, SAD).*

Flow-Check™ *Flourospheres, Flow Cytometer Alignment Verification (Beckman Coulter, Inc., Brea, CA, SAD).*

IsoFlow™ *Sheath Fluid* Azide free balanced electrolyte solution *(Beckman Coulter, Inc., Brea, CA, SAD).*

3.4. Oprema i potrošni materijal

Tablica 3: Popis opreme i potrošnog materijala

Oprema/potrošni materijal	**Proizvođač**
epruvete Vacutainer	Becton Dickinson, SAD
mikropipete	Thermo Fisher Scientific, SAD
ultracentrifuga SIGMA 3K30	Sigma, Njemačka
vorteks mikser Agitateur Top-Mix 11118	Thermo Fisher Scientific, SAD
nastavci za pipete	Herbos dijagnostika, Hrvatska
etanol (96% i 70%)	T.T.T.d.o.o., Hrvatska
epruvete od 1.5 i 2 mL	Sarstedt, Njemačka
epruvete za RT-PCR	Applied Biosystems, UK
epruvete i pokrovi za epruvete za CLIP-reakciju	Applied Biosystems, UK
hladni blok	Eppendorf, Njemačka
termociklički amplifikator GeneAmp PCR System 9600	Applied Biosystems, UK
Instrument COBAS AmpliPrep	Roche Diagnostics, SAD
Instrument COBAS AMPLICOR	Roche Diagnostics, SAD
Instrument COBAS TaqMan	Roche Diagnostics, SAD
natrijev hipoklorit (0.5%)	Meteor d.d., Hrvatska
sekvencer Long-Read Tower	Bayer Health Care, Njemačka
aparat za polimerizaciju poliakrilamidnog gela	Bayer Health Care, Njemačka

Oprema/potrošni materijal	**Proizvođač**
SureFill TM, 6% gel za elektroforezu (Open Gene System)	Siemens, SAD
pištolj za ubrizgavanje gela (Open Gene System)	Bayer Health Care, Njemačka
MicroCell 500 cassettes (Open Gene System)	Siemens, SAD
TBE pufer	Euroclone, Italija
Bioanalyzer 2100	Agilent Technologies, SAD
pločice i pokrovi za pločice od 96 jažica	Eppendorf, Njemačka
PP pločice s okruglim dnom	Thermo Fisher Scientific, SAD
pločica od 96 jažica s magnetskim postoljem	Ambion, SAD
pločice od 96 jažica s ravnim dnom za test fluorescencije	Berthold Technologies, Njemačka
fluorometar	Berthold Technologies, Njemačka
GS Junior emPCR Bead Counter	Roche Diagnostics, Njemačka
sekvencer GS Junior	Roche Diagnostics, Njemačka
instrument Coulter PrepPlus 2 za pipetiranje uzoraka za protočnu citometriju	Beckman Coulter, SAD
instrument Coulter TQ-Prep za pripremu uzoraka za protočnu citometriju	Beckman Coulter, SAD
protočni citometar CYTOMICS FC 500	Beckman Coulter, SAD

3.5. Metode

3.5.1 Kvantifikacija HIV-1-RNA u plazmi

Broj kopija HIV-1-RNA u plazmi odredila sam kvantitativnim RT-PCR-testom prema uputama proizvođača primjenom dviju metoda (obzirom na vremenska razdoblja u kojima je provedeno istraživanje). Za kvantifikaciju HIV-1-RNA u uzorcima koje sam prikupila od siječnja 2008. do lipnja 2010. koristila sam standardni PCR-test COBAS AmpliPrep/COBAS AMPLICOR HIV-1 MONITOR Test version 1.5 (Roche Diagnostics, Mannheim, Njemačka) primjenom dvije verzije, tj. ultrasenzitivne metode (donja granica detekcije: 50 kopija HIV-1-RNA/mL) ili standardne metode (donja granica detekcije: 400 kopija HIV-1-RNA/mL). Broj kopija HIV-1-RNA u uzorcima koje sam prikupila od lipnja 2010. do kraja prosinca 2012. odredila sam PCR-om u stvarnom vremenu primjenom molekularnog testa COBAS AmpliPrep/COBAS Taqman HIV-1 Test, version 2.0 (Roche Diagnostics, Mannheim, Njemačka).

COBAS AmpliPrep/COBAS AMPLICOR HIV-1 MONITOR Test, version 1.5 i COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HIV-1 Test, version 2.0 su *in vitro* amplifikacijski testovi za kvantifikaciju HIV-1-RNA u plazmi. Aparat za automatiziranu izolaciju nukleinskih kiselina COBAS Ampliprep (Roche Diagnostics, Mannheim, Njemačka) koristi se za izolaciju RNA, a termociklički amplifikatori te analizatori za detekciju PCR produkata COBAS AMPLICOR, odnosno COBAS TaqMan, koriste se za amplifikaciju HIV-1-RNA i detekciju produkata PCR-reakcije. COBAS AmpliPrep/COBAS AMPLICOR HIV-1 MONITOR Test detektira koncentraciju HIV-1-RNA u rasponu u od 50-1 000 000 kopija/mL dok COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HIV-1 Test određuje koncentraciju HIV-1-RNA u rasponu od 20-10 000 000 kopija/mL.

3.5.2. Izolacija RNA za test rezistencije i genotipizaciju HIV-1

Virusnu RNA izolirala sam iz 140 μL uzorka plazme ispitanika primjenom standardiziranog kompleta reagensa QIAmp Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Njemačka), prema uputama proizvođača. Izoliranu RNA sam prikupila u 80 μL elucijskog pufera (AVE) i pohranila pri -80°C do testiranja. U proces izolacije nisam uključivala pozitivnu i negativnu kontrolu jer ne zahtjevaju izolaciju RNA.

3.5.3. Sekvenciranje gena *pol* HIV-1

Sekvenciranje dijela gena *pol* (cijeli gen za proteazu, od kodona 1-99 i 5`-dio gena za reverznu transkriptazu, kodoni od 40 do 247) izvršila sam primjenom reagensa Trugene HIV-1 Genotyping kit (Bayer HealthCare LLC, Tarrytown, NY, SAD) i računalnog algoritma za interpretaciju OpenGene DNA *Sequencing* System, Bayer Healthcare LLC (Visible Genetics, Tarrytown, NY, SAA Inc., Toronto, Ontario, Kanada) na Long read Tower sekvenceru (Visible Genetics Inc., Toronto, Ontario, Kanada) primjenom Sangerove dideoksi-metode. Postupak genotipizacijskog testa rezistencije provela sam kroz nekoliko koraka.

3.5.3.1. RT-PCR

Izoliranu RNA iz uzorka pomiješala sam s pripremljenom reakcijskom smjesom I (N-CTRL, P-CTRL) i stavila u termociklički amplifikator GeneAmp PCR System 9600 na 5 minuta pri 50°C. Nakon 5 minuta dodala sam reakcijsku smjesu II u svaku od reakcijskih mikroepruveta. Reakcija RT-PCR je tekla prema uputama proizvođača (Tablica 4). Nakon završetka reakcije, amplikone sam pohranila pri -20°C ili koristila odmah u sljedećem koraku.

Tablica 4: Uvjeti reakcije lančane reakcije polimeraze s reverznom transkripcijom u postupku sekvenciranja regije *pol* genoma HIV-1

	20 ciklusa od:	17 ciklusa od:		
90°C/ 2min	94°C/ 30s	94°C/ 30s		
50°C/ 60min	57°C/ 30s	60°C/ 30s	68°C/ 7min	
94°C/ 2min	68°C/ 2min	68°C/ 2.5min		4°C/∞

3.5.3.2. CLIP-reakcija sekvenciranja PCR-amplikona

RT-PCR produkt svakog uzorka pomiješala sam s pripremljenom CLIP-reakcijskom smjesom te dodala u mikroepruvete s ddNTP-ima. CLIP-reakcija je tekla prema uputama proizvođača (Tablica 5). Nakon CLIP-reakcije dodala sam STOP-reagens i pokrenula program za denaturaciju pri 85°C.

Tablica 5: Uvjeti CLIP-reakcije u postupku sekvenciranja regije *pol* genoma HIV-1

94°C/ 5 min	30 ciklusa od: 94°C/ 20 s 56°C/ 20 s 70°C/ 1.5 min	70°C/ 5min	4°C/∞

3.5.3.3. Elektroforeza i analiza sekvenci

Nakon CLIP-reakcije i denaturacije, dobivene fragmente koji sadrže PR- i 5`-RT-regije, analizirala sam elektroforezom u poliakrilamidnom gelu uporabom sekvencera Long read Tower. Nakon elektroforeze svaku sekvencu analizirala sam prema uputama TRUGENE HIV-1 Module Guide. Nakon završenog sekvenciranja, računalni program automatski pohranjuje dobivene sekvence u programu ″Assay Manager″. Analizu sekvence započela sam postupkom ″basecalling″ koji uključuje automatsko sravnjivanje linija, identifikaciju signala, označavanje parova baza i normalizaciju osnovne linije (″baseline″). Razmak između signala sam definirala kao 10 jedinica (″data point numbers″), a razinu detekcije heterozigota kao djelomičnu (20%+) sukladno uputama sadržanim u reagensu TRUGENE HIV-1 kit. Osim funkcije ″basecalling″, u programu je dostupna i funkcija ″basecalling inspector″ koja omogućava analiziranje pojedinačnih baza, a koristila sam je u slučaju brisanja, dodavanja ili mijenjanja baza kao i preciznog određivanja karakteristika područja i visine signala. Nakon postupka ″basecalling″, obilježila sam svaku sekvencu jednog uzorka i poslužila se funkcijom ″search and combine″. Ova funkcija omogućava sravnjivanje svake odabrane sekvence, a rezultat postupka zatim se kombinira u višestruko sravnjivanje za svaki uzorak. Prije detaljne analize sekvenci provjerila sam cijelu sekvencu u svrhu otkrivanja mogućih insercija ili delecija jer računalni program automatski ne prepoznaje insercije koje se mogu pojaviti u RT-regiji na kodonu 69, odnosno u RT-regiji na kodonu 67 u slučaju delecije.

3.5.3.4. Određivanje rezistencije HIV-a na antiretrovirusne lijekove

Sekvence gena *pol* HIV-1-bolesnika uključenih u istraživanje usporedila sam sa sekvencom divljeg tipa virusa (genotip B) te utvrdila postoje li mutacije vezane uz rezistenciju na antiretrovirusne lijekove. U ovom sam istraživanju analizirala rezistenciju na NRTI (abakavir,

zidovudin, didanozin, emtricitabin, lamivudin, stravudin, tenofovir), NNRTI (efavirenz, etravirin, nevirapin) i PI (atazanavir, darunavir, fosamprenavir, indinavir, lopinavir, nelfinavir, sakvinavir, tipranavir, ritonavir). Kliničku značajnost mutacija vezanih uz rezistenciju na pojedine klase antiretrovirusnih lijekova interpretirala sam sukladno preporukama The International AIDS Society–USA (ISA-USA) Drug Resistance Mutations Group (5).

Sekvence gena *pol* HIV-1-bolesnika analizirala sam pomoću četiri algoritma: algoritam Trugene (Bayer HealthCare LLC, Tarrytown, NY, SAD), algoritam ANRS (http://www.anrs.fr/) (94), algoritam Rega (http://www.rega.kuleuven.be/cev/) (93) i algoritam Stanford HIV Drug Resistance Datebase (http://www.hivdb.stanford.edu/) (95). Dobivene rezultate interpretacije značajnosti mutacija sam usporedila jer različiti interpretacijski algoritmi mogu različito interpretirati biološku značajnost. Navedeni algoritmi detaljno su opisani u Literaturnom pregledu.

Sekvence gena *pol* HIV-1-bolesnika duge su 846 parova baza i pohranjene su u EMBL Nucleotide Sequence Database (124) pod brojevima: HG798545, HG798546, HG798547, HG798548, HG798549, HG798550, HG798551, HG798552, HG798553, HG798554, HG798555, HG798556, HG798557, HG798558, HG798559, HG798560, HG798561, HG798562, HG798563, HG798564, HG798565, HG798566, HG798567, HG798568, HG798569, HG798570, HG798571, HG798572, HG798573, HG798574, HG798575, HG798580, HG798581, HG798582, HG798584, HG798587, HG798588, HG798589, HG798590, HG798591, HG798592, HG798593, HG798595, HG798596, HG798597, HG798598, HG798599, HG798600, HG798601, HG798602, HG798603, HG798604, HG798605, HG798606, HG798607, HG798608, HG798609, HG798610, HG798611, HG798612, HG798613, HG798614, HG798615, HG798616, HG798617, HG798618, HG798619, HG798621, HG798622, HG798624, HG798625, HG798627, HG798629, HG798630, HG798631, HG798632, HG798635, HG798636, HG798638, HG798639, HG798640, HG798641, HG798642, HG798643, HG798644, HG798645.

3.5.4. Genotipizacija HIV-a

Subtipove HIV-1-bolesnika uključenih u istraživanje odredila sam analizom sekvence gena *pol* virusa primjenom algoritma REGA HIV-1 subtyping tool version 2.0 (http://www.rega.kuleuven.be/cev/) (93). REGA HIV-1 subtyping tool version 2.0 je bioinformatički algoritam koji omogućava subtipizaciju HIV-1 temeljem analizi sekvence dijela *pol* regije genoma virusa temeljene na kombinaciji filogenetike i rekombinantnim metodama detekcije.

3.5.5. Određivanje prevalencije rezistencije HIV-1 na antiretrovirusne lijekove

Prevalenciju rezistencije na antiretrovirusne lijekove odredila sam za svaku kalendarsku godinu od 2008. do kraja 2012. primjenom dviju metoda:

(1) analiza u jednoj vremenskoj točki uz primjenu odgovarajućeg denominatora
(2) model kumulativne rezistencije.

Denominator je prema Pillay i sur. uključivao sve bolesnike liječene antiretrovirusnim lijekovima tijekom određene kalendarske godine (119). Podatak za denominatora, tj. broj HIV-om zaraženih pacijenata koji su primali HAART tijekom perioda istraživanja, dobiven je analizom podataka Referentnog centra za dijagnostiku i liječenje HIV/AIDS-a R. Hrvatske (centralizirani nacionalni sustav liječenja). Rezistenciju na određenu klasu antiretrovirusnih lijekova definirala sam kao postojanje najmanje jedne klinički značajne mutacije povezane sa smanjenom osjetljivosti na antiretrovirusne lijekove u toj klasi sukladno zaključcima The International AIDS Society–USA (ISA-USA) Drug Resistance Mutations Group (5). Primjenom navedenih metoda na temelju podataka o broju pacijenta s rezistencijom na pojedinačne skupine lijekova (NRTI, NNRTI, PI) kao i na kombinaciju lijekova (NRTI+NNRTI; NNRTI+PI; NRTI+NNRTI+PI) za svaku sam kalendarsku godinu izračunala prevalenciju rezistencije prema specifičnoj skupini lijekova kao i prema broju skupina lijekova na koje je stvorena rezistencija.

3.5.5.1. Metoda 1-analiza u jednoj vremenskoj točki

Metodom 1 prevalencija rezistencije HIV-1 na antiretrovirusne lijekove određuje se kao omjer pacijenata s dokazanom genotipskom rezistencijom i onih koji su imali barem jedan test rezistencije u određenom kalendarskom razdoblju. Za pacijente s više od jednog napravljenog testa rezistencije u godini, koristila sam rezultate zadnjeg testa u odabranom vremenskom razdoblju. Ova metoda predstavlja prosječnu analizu i ne uzima u obzir mogućnost da bi neki pacijenti mogli razviti rezistenciju na ranije korištene lijekove. Primjenom metode 1 prevalencija na rezistenciju tijekom vremena ostaje konstantna.

3.5.5.2. Metoda 2-model kumulativne rezistencije

Metoda 2 uzima u obzir kumulativnu rezistenciju koja se razvija tijekom vremena kao i ranije stvorenu rezistenciju što daje procjenu apsolutnog broja pacijenata s rezistencijom tijekom tog

razdoblja. Stoga, ako je pacijent imao zabilježene primarne mutacije povezane s rezistencijom na NRTI u 2006., a 2008. mutacije povezane s rezistencijom na NNRTI, klasificirat će se kao da je imao rezistenciju na NRTI u periodu od 2006. do 2010. i rezistenciju na NNRTI u periodu od 2008. do 2010. Primjenom ove metode apsolutni broj pacijenata s rezistencijom na bilo koju skupinu lijekova raste linearno i više je pogodna za određivanje apsolutnog broja pacijenata s rezistencijom na jednu, dvije ili tri skupine lijekova jer uključuje one pacijente kod kojih se rezistencija razvila i ranije, ali je držana pod kontrolom primjenom odgovarajuće terapije (rezistencija se može ponovno javiti uslijed povećanja viremije).

3.5.6. Sekvenciranje amplikona HIV-1-RT i -PR metodom ˝ultra-deep˝-sekvenciranja

Za ˝ultra-deep˝-sekvenciranje (UDS) odabrala sam tri uzorka ispitanika kojima sam ranije odredila rezistenciju standardnom metodom sekvenciranja. Ispitanike sam odabrala na temelju povijesti liječenja, zanimljivog profila rezistencije i kontinuiranog virološkog neuspjeha. Za ovaj dio istraživanja nisam prikupljala dodatne biološke uzorke već sam iskoristila ostatni dio uzorka koji sam koristila za standardno sekvenciranje. Cijeli postupak sekvenciranja metodom UDS provela sam prema protokolu automatiziranog sustava 454 Life/Science (Roche Diagnostics, SAD).

3.5.6.1. Izolacija RNA i sinteza cDNA za sekvenciranje amplikona HIV-1-RT i -PR

Virusnu RNA izolirala sam primjenom standardiziranog kompleta univerzalnih reagensa za ekstrakciju nukleinskih kiselina NucliSENS® Nucleic Acid Extraction Reagents for easyMAG (bioMerieux SA, Marcy l´etoile, Francuska) na instrumentu easyMAG v. 2.0. U izolaciju sam uključila i jednu negativnu (neinficirana plazma) i pozitivnu (HIV-1-inficirana plazma) kontrolu. Izoliranu RNA svakog uzorka, negativne i pozitivne kontrole, rasporedila sam u dva reda po jažicama HIV-cDNA-Primer-pločice (Tablica 6), dodala pripremljenu reakcijsku smjesu za cDNA i pokrenula reakciju sinteze cDNA prema uputama proizvođača. Nakon reakcije sinteze cDNA u svaku sam jažicu dodala RNazu H radi eliminacije preostalih RNA.

Tablica 6: Shematski prikaz HIV-cDNA-Primer-pločice

	Uzorak 1	Uzorak 2	Uzorak 3	PC	NC
A	″4R″	″4R″	″4R″	″4R″	″4R″
B					
C	″5R″	″5R″	″5R″	″5R″	″5R″
D					

3.5.6.2. Sinteza amplikona za sekvenciranje amplikona HIV-1-RT i -PR

Reakcijsku smjesu za sintezu amplikona pripremila sam prema uputama proizvođača koju sam rasporedila po jažicama u redove A-D/kolone 1-5 HIV-RTP-PCR-Primer-pločice. Potom sam sintetiziranu cDNA iz reda A, odnosno reda C HIV-cDNA-Primer-pločice, dodala u redove A i B, odnosno u redove C i D HIV-RTP-PCR-Primer-pločice (Tablica 7). Reakcija sinteze amplikona tekla je prema uputama proizvođača (Tablica 8). Sljedeće postupke pročišćavanja, kvantifikacije i odabira amplikona za finalnu smjesu napravila sam prema uputama proizvođača.

Tablica 7: Shematski prikaz HIV-RTP-PCR-Primer-pločice

	Uzorak 1	Uzorak 2	Uzorak 3	PC	NC
A	″4R″cDNA	″4R″cDNA	″4R″cDNA	″4R″pos	″4R″neg
B	″4R″cDNA	″4R″cDNA	″4R″cDNA	″4R″pos	″4R″neg
C	″5R″cDNA	″5R″cDNA	″5R″cDNA	″5R″pos	″5R″neg
D	″5R″cDNA	″5R″cDNA	″5R″cDNA	″5R″pos	″5R″neg

Tablica 8: Uvjeti reakcije sinteze amplikona u postupku sekvenciranja amplikona HIV-1-RT i -PR

95°C/ 3min	40 ciklusa od: 95°C/30s 55°C/20s 72°C/45s	72°C/ 8min	4°C/∞

3.5.6.3. EmPCR

Prije reakcije emPCR pripremila sam uljnu emulziju i reakcijske smjese Live Amp Mix A i B i provela postupak skupljanja DNA biblioteke pomoću ″Capture″-mikročestica prema uputama proizvođača. Reakcija emPCR tekla je prema uputama proizvođača (Tablica 9).

Tablica 9: Uvjeti za emPCR u postupku sekvenciranja amplikona HIV-1-RT i -PR

94°C/ 4min	40 ciklusa od: 94°C/30 s 58°C/4.5min 68°C/30 s	10°C/∞

Nakon emPCR provela sam postupak obogaćivanja mikročestica vezanih za DNA biblioteku prema uputama proizvođača, a potom procijenila broj obogaćenih mikročestica. Preporučeni broj obogaćenih mikročestica za sekvenciranje na GS Junioru je 500 000 mikročestica. Količinu obogaćenih mikročestica u talogu procijenila sam na način da sam tubicu s istaloženim mikročesticama stavila u brojač mikročestica (GS Junior Bead Counter). Donja granica ″prozora″ brojača definira količinu od 500 000 mikročestica dok gornja granica ″prozora″ brojača definira količinu od 2 milijuna mikročestica. Vrh taloga nalazio se unutar ″prozora″ brojača, ali bliže gornjoj granici, što govori da je u talogu bilo 2 milijuna obogaćenih mikročestica. Višak mikročestica do donje granice ″prozora″ brojača sam odvojila, a ostatak od 500 000 mikročestica spremila na hladno do sljedećeg postupka, sekvenciranja.

3.5.6.4. Postupak sekvenciranja na sekvenceru GS Junior

Prije pokretanja reakcije pripremila sam slojeve mikročestica koje se koriste u sekvenciranju prema uputama proizvođača (Tablica 10).

Tablica 10: Vrste mikročestica koji se koriste u postupku sekvenciranja na sekvenceru GS Junior

Sloj mikročestica	**Vrsta mikročestica**
Sloj 1	Enzyme mikročestice pre-sloj
Sloj 2	DNA i Packing mikročestice
Sloj 3	Enzyme mikročestice post-sloj
Sloj 4	PPiase mikročestice

Pripremljene slojeve mikročestica nanijela sam na PTP uređaj prema uputama proizvođača koji sam potom stavila u sekvencer. Prije pokretanja reakcije izabrala sam broj nukleotidnih ciklusa odgovarajućih za reakciju sekvenciranja HIV-1 (**200 ciklusa koji će proizvesti slijedove veličine oko 500 bp**) te način procesuiranja podataka (**Full processing for Shotgun or Paired End library**). Detaljan princip testa opisan je u Literaturnom pregledu.

3.5.7. Imunofenotipizacija limfocita periferne krvi protočnom citometrijom

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. 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. Uzorci su analizirani pomoću protočnog citometra CYTOMICS FC 500 (Beckman Coulter, SAD) i programa CXP.

3.5.8. Baza podataka

Rezultati molekularnih testova (viremija u plazmi, mutacije povezane s rezistencijom, subtip virusa) kao i drugi epidemiološki i laboratorijski podatci o ispitanicima koje sam analizirala u istraživanju (dob, spol, rizični čimbenik za infekciju HIV-om, broj CD4+-T-limfocita pri prezentaciji u kliničku skrb) pohranila sam u bazu podataka u programu Microsoft Excell.

3.5.9. Statistička analiza

U statističkoj analizi koristila sam deskriptivnu statistiku. Vrijednosti kategorijskih varijabli prikazala sam tablicama frekvencije, a vrijednosti kontinuiranih varijabli aritmetičkom sredinom, standardnom devijacijom, medijanom i interkvartilnim rangom. U analizi sam koristila program SAS v. 8.2 (SAS Institute, Cary, North Carolina, SAD).

4. REZULTATI

4.1. Ispitanici

U razdoblju od siječnja 2008. do kraja prosinca 2012., u istraživanje je uključeno 55 HIV-om zaraženih osoba (sukladno kriterijima uključivanja). Ispitanici su liječeni antiretrovirusnim lijekovima u Referentnom centru za dijagnostiku i liječenje HIV/AIDS-a R. Hrvatske, a tijekom liječenja je analizirana rezistencija HIV-a na lijekove zbog virološkog neuspjeha. Obzirom na to da je u dijela ispitanika rezistencija HIV-a na antiretrovirusne lijekove analizirana više puta (zbog opetovanih virooloških neuspjeha liječenja), tijekom istraživanja analizirani su rezultati ukupno 86 testova rezistencije. Ukupno 39 od 55 (70.9%) ispitanika uključenih u istraživanje bili su muškarci (Tablica 11). Medijan dobi ispitanika iznosio je 48.3 godine (24.9-78.6 godine). Analizom rizičnih čimbenika za infekciju HIV-om utvrdila sam da je 22 ispitanika imalo spolne odnose s muškarcima (MSM skupina), 23 ispitanika bili su heteroseksualci, a 6 ispitanika su bili intravenski korisnici opojnih droga. Za ostale je rizični čimbenik nepoznat. Medijan apsolutnog broja CD4+-T-limfocita ispitanika u vrijeme prvog testa rezistencije iznosio je 230 stanica/μL periferne krvi (1-1019 stanica/μL). Medijan viremije (broj kopija HIV-1-RNA po mL plazme) ispitanika u vrijeme prvog testa rezistencije iznosio je 4,4 $\log_{10}$ kopija/mL (3.0-7.0 $\log_{10}$ kopija/mL).

Tablica 11: Odabrani demografski i biološki parametri ispitanika uključenih u istraživanje prevalencije rezistencije HIV-a na antiretrovirusne lijekove

Odabrani parametar	Ispitanici (n=55)
Dob (medijan, 25 i 75 percentili, godine)	48.3 (24.9-78.6)
Spol, broj (%)	
Žene	16 (29.1%)
Muškarci	39 (70.9%)
Broj CD4+ T-limfocita (medijan, 25 i 75 percentili, stanice/μL)	230 (1-1019)
Viremija u plazmi (medijan, 25 i 75 percentili, log kopija HIV-1-RNA po mL)	4,4 $\log_{10}$ (3.0-7.0 $\log_{10}$)
Rizični čimbenik za infekciju	
Muškarci koji imaju spolne odnose s muškarcima	22
Heteroseksualci	23
Intravenski korisnici opojnih droga	6
Nepoznat / odbio odgovoriti/ostalo	4

Tijekom istraživanja, rezistencija HIV-a na antiretrovirusne lijekove u 32 ispitanika analizirana je jednom, u 19 ispitanika dva puta, u 2 ispitanika tri puta dok je za 2 ispitanika rezistencija testirana po pet puta.

Nakon analize pomoću kompjuterskog softvera OpenGene DNA *Sequencing* System, Bayer Healthcare LLC, radi utvrđivanja postojanja mutacija povezanih s rezistencijom, dobivene sekvence *pol* gena HIV-1 svakog uzorka interpretirane su prema preporukama The International AIDS Society–USA (ISA-USA) Drug Resistance Mutations Group (5).

4.2. Mutacije povezane s rezistencijom na antiretrovirusne lijekove

Ukupno 43/86 (50.0 %) sekvenci regije *pol* genoma HIV-1 sadržavalo je jednu ili više mutacija povezanih s rezistencijom HIV-1 na antiretrovirusne lijekove: 8 sekvenci koje su analizirane 2008. (8/14; 57.0%), 7 sekvenci koje su analizirane 2009. (7/17; 41.2%). i 2010. (7/18; 38.9%), 6 sekvenci koje su analizirane 2011. (6/17; 35.3%) te 15 sekvenci (15/20; 75.0%) koje su analizirane 2012.

4.2.1. Mutacije povezane s rezistencijom na NRTI

Ukupno 34 od 86 (39.5%) sekvenci regije *pol* genoma sadržavalo je primarne mutacije povezane s rezistencijom na NRTI. Većina NRTI mutacija bile su supstitucije na poziciji 184 u genu za RT: metionin je zamijenjen s valinom (M184V) u 26.7% (23/86) sekvenci, s izoleucinom (M184I) u 3.5% (3/86) sekvenci, dok je u 3.5% (3/86), ovisno o kvazispecijesu, metionin bio zamijenjen s obje aminokiseline (M184VI) (Tablica 12, Tablica 13). Najčešće mutacije povezane s rezistencijom na timidinske analoge (TAM) bile su M41L i T215Y koje su detektirane u 4.7% (4/86) sekvenci svaka. Od popratnih mutacija na pozicijama u genu za RT važnim za rezistenciju (engl. *major positions*) na lijekove najučestalije su detektirane supstitucije na kodonu 69 bez insercije u 10/86 (11.6%) sekvenci. U Tablici 12 prikazane su sve detektirane mutacije povezane s rezistencijom na NRTI.

4.2.2. Mutacije povezane s rezistencijom na NNRTI

U 36/86 (42.0%) sekvence regije *pol* genoma HIV-1 detektirane su primarne mutacije povezane s rezistencijom na NNRTI. Najčešća mutacija povezana s rezistencijom na NNRTI detektirana je na poziciji 103 u genu za RT gdje je lizin zamijenjen s asparaginom (K103N) u 16/86 (18.6%) sekvenci (Tablica 13, Tablica 14). Tablica 14 prikazuje sve detektirane mutacije povezane s rezistencijom na NNRTI.

Tablica 12: Mutacije povezane s rezistencijom na nukleozidne analoge inhibitore reverzne transkriptaze.

Pozicija u genu za RT	Aminokiselina u divljem tipu	Aminokiselina u mutiranom soju	Biološka značajnost mutacije za rezistenciju na antiretrovirusne lijekove*	Broj uzoraka s određenom mutacijom/ukupni broj analiziranih uzoraka
41	M	L	Primarna mutacija iz skupine TAM-I. M41L obično se javlja u kombinaciji s T215Y te zajedno s njom uzrokuje visoku razinu rezistencije na AZT i d4t i nisku razinu rezistencije na ddl, ABC i TDF.	4/86
44	E	D	Minimalno polimorfna mutacija čija se učestalost povećava u pacijenta koji su liječeni s NRTI.	1/86
62	A	V	Popratna mutacija. A62V povećava rezistenciju povezanu sa skupinom mutacija Q151M i kompenzira za smanjenu replikaciju kao posljedicu mutacije K65R.	2/86
65	K	R	K65R uzrokuje srednju razinu rezistencije na ddI, ABC, 3TC, FTC i TDF, nisku razinu rezistencije na d4T i povećanu osjetljivost na AZT	1/86
67	D	N	Popratna mutacija iz skupine TAM-II. D67N doprinosi rezistenciji na AZT i d4T.	1/86
69	T	D	Nepolimorfna popratna mutacija. T69D povezana je sa smanjenom osjetljivosti na ddl i d4T.	3/86
69	T	N/A	Popratne mutacije nepoznate kliničke značajnosti. T69N/A su mutacije selekcionirane tijekom liječenja s NRTI no učinak na rezistenciju je nedostatno istražen.	7/86
70	K	R	TAM-II-mutacija. K70R uzrokuje umjerenu rezistenciju na AZT i nisku razinu rezistencije na d4T i TDF.	1/86

Pozicija u genu za RT	Aminokiselina u divljem tipu	Aminokiselina u mutiranom soju	Biološka značajnost mutacije za rezistenciju na antiretrovirusne lijekove*	Broj uzoraka s određenom mutacijom/ukupni broj analiziranih uzoraka
74	L	V	Mutacija koja nastaje putem diskriminacije. L74V uzrokuje visoku razinu rezistencije na ddI i umjerenu rezistenciju na ABC.	3/86
118	V	I/V	Minimalno polimorfna mutacija čija se učestalost povećava u bolesnika liječenih s NRTI. U kombinaciji s E44D minimalno smanjuje osjetljivost na većinu PI.	2/86
184	M	V/I	Primarna mutacija koja nastaje mehanizmom diskriminacije. M184V/I uzrokuju visoku razinu rezistencije na 3TC i FTC i nisku razinu rezistencije na ddI i ABC što ipak nije kontraindikacija za nastavak terapije s 3TC ili FTC jer M184V/I povećavaju osjetljivost na AZT, TDF i d4T.	29/86
215	T	Y	Mutacija iz skupine I TAM-a. T215Y uzrokuje rezistenciju na AZT i d4T te smanjuje osjetljivost na ABC, ddI i TDF, ponajprije u kombinaciji s M41L i L210W.	4/86
215	T	S/L/D	Popratne ˝revertantne˝ mutacije nepoznate kliničke značajnosti. Pojavljuju se u bolesnika koji su zaraženi sojevima s mutacijom T215Y/F, posebno nakon prekida liječenja. Ne utječu na osjetljivost virusa na NRTI.	14/86
219	K	Q	K219Q smanjuje osjetljivost na AZT, avjerojatno povećava na d4T u prisutnosti K70R ili T215Y/F	1/86

RT-reverzna transkriptaza

NRTI-nukleozidni inhibitori reverzne transkriptaze; PI- inhibitori proteaze

ABC-abakavir, AZT- zidovudin, ddI-didanozin, d4T-stavudin, FTC-emtricitabin, TDF-tenofovir, 3TC-lamivudin, TAM-timidin analogne mutacije

*preuzeto od Stanford HIV Drug Resistance Datebase (95)

Tablica 13: Deset najučestalijih mutacija u genu za reverznu transkriptazu virusa ljudske imunodeficijencije tipa 1 koje su povezane s rezistencijom virusa na antiretrovirusne lijekove u ispitanika iz Hrvatske u razdoblju od 2008. do 2012.

Mutacija / **Godina**	Broj uzoraka s određenom mutacijom/ukupni broj analiziranih uzoraka				
	2008.	2009.	2010.	2011.	2012.
M184V	4/14	5/17	4/18	3/17	4/20
K103N	2/14	3/17	1/18	4/17	6/20
Y181C	1/14	1/17	1/18	1/17	6/20
T69N	4/14	0/17	0/18	0/17	3/20
M41L	0/14	1/17	2/18	1/17	0/20
T215Y	0/14	0/17	2/18	1/17	0/20
V108IV	0/14	1/17	1/18	0/17	2/20
H221Y	0/14	1/17	3/18	0/17	0/20
L74V	0/14	1/17	2/18	1/17	0/20
A62V	1/14	0/17	0/18	0/17	1/20

Tablica 14: Mutacije povezane s rezistencijom na nenukleozidne analoge inhibitore reverzne transkriptaze

Pozicija u genu za RT	Aminokiselina u divljem tipu	Aminokiselina u mutiranom soju	Biološka značajnost mutacije za rezistenciju na antiretrovirusne lijekove*	Broj uzoraka s određenom mutacijom/ukupni broj analiziranih uzoraka
90	V	I	Nepolimorfna popratna mutacija koja smanjuje osjetljivost na NNRTI za 1-5 puta. Pojavljuje se u 1-2% neliječenih bolesnika.	2/86
100	L	I	Primarna mutacija. L100I najčešće se pojavljuje uz K103N i u toj kombinaciji uzrokuje visoku razinu rezistencije na NVP i EFV te umjerenu rezistenciju na ETR i RPV.	2/86
100	L	Y	Popratna mutacija. Izrazito rijetka.	1/86
101	K	E	Primarna mutacija. K101E uzrokuje umjerenu rezistenciju na NVP i nisku razinu rezistencije na EFV, ETR i RPV.	1/86

Pozicija u genu za RT	Aminokiselina u divljem tipu	Aminokiselina u mutiranom soju	Biološka značajnost mutacije za rezistenciju na antiretrovirusne lijekove*	Broj uzoraka s određenom mutacijom/ukupni broj analiziranih uzoraka
101	K	H	K101H je rijetka mutacija koja je povezana s niskom razinom smanjene osjetljivosti na NVP, EFV i ETR kad je prisutna s drugim mutacijama povezanim s rezistencijom na NNRTI.	2/86
103	K	N	Primarna mutacija. K103N uzrokuje visoku razinu rezistencije na NVP i EFV. Nema utjecaja na osjetljivost na ETR i RPV.	16/86
106	V	A/V	Primarna mutacija. V106A uzrokuje visoku razinu rezistencije na NVP i nisku razinu rezistencije na EFV.	2/86
108	V	I/V	Nepolimorfna popratna mutacija. V108I dvostruko smanjuje osjetljivost na NVP i EFV.	5/86
138	E	G	E138G je nepolimorfna mutacija koja se javlja uslijed terapije s ETR i smanjuje osjetjivost na ETR i RPV. Utjecaj na NVP i EFV nije dovoljno istražen.	1/86
179	V	E	Nepolimorfna popratna mutacija koja se pojavljuje u 1% bolesnika koji nisu liječeni s NNRTI. Smanjuje osjetljivost na NVP i EFV za dva puta.	1/86
181	Y	C/Y/V	Primarna mutacija. Y181C uzrokuje visoku razinu rezistencije na NVP, smanjuje osjetljivost na EFV za dva puta, a na ETR I RPV za pet puta.	13/86
188	Y	L/H/F/Y	Primarna mutacija. Y188L uzrokuje visoku razinu rezistencije na NVP, EFV i RPV. Ne smanjuje osjetljivost na ETR.	5/86

Pozicija u genu za RT	Aminokiselina u divljem tipu	Aminokiselina u mutiranom soju	Biološka značajnost mutacije za rezistenciju na antiretrovirusne lijekove	Broj uzoraka s određenom mutacijom/ukupni broj analiziranih uzoraka
190	G	S	Primarna mutacija. G190S uzrokuje visoku razinu rezistencije na NVP i EFV. Sinergistički djeluje s Y181C na smanjenje osjetljivosti na ETR.	1/86
221	H	Y/H	H221Y je nepolimorfna popratna mutacija koja uz selektivni pritisak s NNRTI smanjuje njihovu osjetljivost za 1-5 puta.	5/86
225	P	H/P/S/Y	P225H je nepolimorfna popratna mutacija koja u kombinaciji s K103N doprinosi rezistenciji na EFV.	2/86
227	F	C/F	Nepolimofna popratna mutacija. F227C je rijetka mutacija koju selektira *in vitro* ETR a u kombinaciji s drugim mutacijama povezana je s visokom razinom rezistencije na sve NNRTI.	1/86
230	M	L/M	M230L uzrokuje umjerenu do visoku razinu rezistencije na sve NNRTI. Selekcionirana je *in vitro* s ETR i smanjuje osjetljivost virusa na taj lijek za 3-10 puta.	2/86
234	L	F/L	Popratna mutacija. Izrazito rijetka.	1/86
238	K	T	Nepolimorfna popratna mutacija. Rijetko se pojavljuje i obično u kombinaciji s K103N smanjuje osjetljivost na NVP i EFV.	1/86

Ostale mutacije	Polimorfne varijante	A98S, K103R, E138A, V179I	A98S je česta polimorfna mutacija koja smanjuje osjetljivost na NNRTI. K103R samostalno ne utječe na osjetljivost virusa na NNRTI, ali u kombinaciji s V179D smanjuje osjetljivost na NVP i EFV za više od deset puta. E138A može pridonijeti smanjenju osjetljivosti na ETR i RPV u kombinaciji s drugim mutacijama povezanim s rezistencijom na NNRTI. V179I je česta polimorfna mutacija selekcionirana nakon terapije s ETR i RPV. Nije dokazano da smanjuje osjetljivost na NNRTI.

RT-reverzna transkriptaza
NNRTI-nenukleozidni inhibitori reverzne transkriptaze
EFV-efavirenz, ETR-etravirin, NVP-nevirapin, RPV-rilpivirin
* preuzeto od Stanford HIV Drug Resistance Datebase (95)

4.2.3. Mutacije povezane s rezistencijom na PI

Primarne mutacije povezane s rezistencijom na PI otkrivene su u samo pet sekvenci (5/86, 5.8%) regije *pol* genoma HIV-1. Primarne mutacije M46I i L76V detektirane su u po tri sekvence (3/86, 3.5%), mutacije V32I i I47V u po 2 sekvence (2/86, 2.3%) dok su mutacije V82A i I54V detektirane u po jednoj sekvenci (Tablica 15). Najčešća sekundarna mutacija bila je L10I (Tablica 16). Sve detektirane mutacije povezane s rezistencijom na PI prikazane su u Tablici 15.

Tablica 15: Mutacije povezane s rezistencijom na inhibitore proteaze

Pozicija u genu za PR	Aminokiselina u divljem tipu	Aminokiselina u mutiranom soju	Biološka značajnost mutacije za rezistenciju na antiretrovirusne lijekove*	Broj uzoraka s određenom mutacijom/ukupni broj analiziranih uzoraka
10	L	I/V/F	Česte nepolimorfne popratne mutacije povezane s rezistencijom na većinu PI u kombinaciji s drugim mutacijama. L10F povezana je sa smanjenom osjetjivosti na sve PI osim ATV/r, SQV/r i TPV/r.	17/86
32	V	I	Primarna mutacija. V32I je mutacija u dijelu enzima PR u kojem se veže supstrat a povezana je sa smanjenom osjetljivosti na sve PI osim SQV/r.	2/86

Pozicija u genu za PR	Aminokiselina u divljem tipu	Aminokiselina u mutiranom soju	Biološka značajnost mutacije za rezistenciju na antiretrovirusne lijekove*	Broj uzoraka s određenom mutacijom/ukupni broj analiziranih uzoraka
33	L	F	Nepolimorfna popratna mutacija koju selekcioniraju FPV/r, DRV/r, LPV/r, ATV/r i TPV/r te uzrokuje rezistenciju na navedene lijekove.	3/86
33	L	I/L	Nepolimorfna popratna mutacija sličnog učinka kao L33F iako manje učestala.	2/86
35	E	G	Nepolimorfna mutacija koju selekcionira NFV a povezana je sa smanjenom osjetljivosti na TPV.	1/86
46	M	I	M46I je primarna mutacija u dijelu enzima PR u kojem se veže supstrat. Smanjuje osjetljivost na IDV/r, NFV, FPV/r, LPV/r i ATV/r u prisustvu drugih mutacija.	3/86
47	I	V	Primarna mutacija u dijelu enzima PR u kojem se veže supstrat. I47V smanjuje osjetljivost na FPV/r, ATV/r, IDV/r, LPV/r, TPV/r i DRV/r.	2/86
53	F	L	Nepolimorfna popratna mutacija koja je povezana sa smanjenom osjetljivosti na SQV/r i ATV/r.	2/86
54	I	V	I54V pridonosi rezistenciji na svaki PI osim DRV/r. Sinergistički djeluje s V82A/S/T na smanjenje osjetljivosti na PI-e.	1/86
71	A	T/V	A71T/V su polimorfizmi koji se pojavljuju u oko 2-3% neliječenih osoba, ali se njihova učestalost povećava u osoba koje su liječene s PI.	5/86
74	T	S	Nepolimorfna popratna mutacija koja je povezana sa smanjenom osjetljivosti na NFV. Pojavljuje se u oko 5% neliječenih osoba subtipa C HIV-a.	1/86

Pozicija u genu za PR	Aminokiselina u divljem tipu	Aminokiselina u mutiranom soju	Biološka značajnost mutacije za rezistenciju na antiretrovirusne lijekove*	Broj uzoraka s određenom mutacijom/ukupni broj analiziranih uzoraka
76	L	V	Primarna mutacija koja indirektno utječe na osjetljivost virusa na PI. L76V smanjuje osjetljivost virusa na FPV/r, IDV/r, LPV/r i DRV/r, a povećava osjetljivost na SQV/r, ATV/r i TPV/r.	3/86
82	V	A	Primarna mutacija u dijelu enzima PR u kojem se veže supstrat. V82A smanjuje osjetljivost na IDV/r i LPV/r. U kombinaciji s drugim mutacijama povezana je sa smanjenom osjetljivosti na NFV/r, ATV/r, SQV/r i FPV/r.	1/86
Ostale mutacije	Polimorfne varijante	K20R, M36I, I62V, L63P, V77I, V82I, L89M, I93L	Česte visoko polimorfne kompenzacijske mutacije koje kompenziraju za smanjeni fitnes povezan s primarnim mutacija koje uzrokuje rezistenciju na PI. K20R najmanje pridonosi smanjenju osjetljivosti na PI. M36I ne uzrokuje značajniju rezistenciju na PI u subtipovima B HIV-a u kombinaciji s drugim mutacijama, no zastupljena je u većini non-B subtipova. L63P je čest polimorfizam selekcioniran s PI. V77I je mutacija koju selekcionira NFV. V82I je česta polimorfna mutacija u nekih non-B subtipova; ne utječe značajnije na osjetljivost virusa na PI. L89M je čest polimorfizam koji nije povezan sa smanjenom osjetljivosti na PI. I93L je zastupljena u većini subtipova HIV-a; pri infekciji subtipom B HIV-a rijetko se dovodi u vezu s rezistencijom na PI.	

PR-proteaza

PI-inhibitori proteaze.

ATV-atazanavir, DRV-darunavir, FPV-fosamprenavir, IDV-indinavir, LPV-lopinavir, NFV-nelfinavir, SQV-sakvinavir, TPV-tipranavir, i /r-lijek kombiniran s ritonavirom.

* preuzeto od Stanford HIV Drug Resistance Datebase (95)

Tablica 16: Deset najučestalijih mutacija u genu za proteazu virusa ljudske imunodeficijencije tipa 1 koje su povezane s rezistencijom virusa na antiretrovirusne lijekove u ispitanika iz Hrvatske u razdoblju od 2008. do 2012.

Mutacija / **Godina**	Broj uzoraka s određenom mutacijom / ukupni broj analiziranih uzoraka				
	2008.	2009.	2010.	2011.	2012.
L10I	2/14	3/17	1/18	1/17	2/20
L10V	1/14	0/17	0/18	2/17	3/20
A71V	0/14	0/17	1/18	0/17	3/20
M46I	1/14	0/17	1/18	0/17	1/20
L76V	1/14	0/17	1/18	0/17	1/20
L33F	0/14	0/17	1/18	0/17	2/20
V32I	0/14	0/17	0/18	0/17	2/20
I47V	0/14	0/17	0/18	0/17	2/20
F53L	0/14	0/17	0/18	0/17	2/20
V82A	0/14	0/17	0/18	0/17	0/20

4.3. Rezistencija HIV-a na antiretrovirusne lijekove prema algoritmu Trugene

Sekvence regije *pol* genoma HIV-om zaraženih osoba liječenih antiretrovirusnim lijekovima kod kojih je dokazan virološki neuspjeh liječenja analizirane su algoritmom Trugene za interpretaciju biološke značajnosti pojedinih mutacija za rezistenciju na antiretrovirusne lijekove. Tijekom 2008. i 2009. najčešće je detektirana rezistencija na NVP i 3TC/FTC (Tablica 17). Tijekom 2010. također je detektirana rezistencija na 3TC/FTC i NVP iako je broj bioloških uzoraka s dokazanim mutacijama povezanim s rezistencijom bio niži u usporedbi s prethodnim godinama. Tijekom 2011. i 2012. uz rezistenciju na 3TC/FTC i NVP, također je učestalo detektirana i rezistencija na EFV.

4.4. Interpretacija i usporedba genotipske rezistencije HIV-1 prema algoritmima ANRS, Stanford HIVdb i Rega

Program za usporedbu interpretacije rezultata rezistencije prema tri algoritma na internetskoj stranici Stanford HIVdb (http://sierra2.stanford.edu/sierra/servlet/JSierra?action=hivalgs) korišten je za analizu svake sekvence. Pri interpretaciji rezultata primijenjene su tri razine rezistencije: ˝S˝ (engl. *˝susceptible˝*), ˝R˝(engl. *˝resistant˝*) i ˝I˝ (engl. *˝intermediate˝*).

Tablica 17: Učestalost rezistencije na antiretrovirusne lijekove u HIV-om zaraženih osoba u razdoblju od 2008. do 2012.

Godina	**Broj uzoraka s rezistencijom na lijek / ukupni broj analiziranih uzoraka**									
	2008.		**2009.**		**2010.**		**2011.**		**2012.**	
ARV lijekovi	R	MR	R	MR	R	MR	R	MR	R	MR
NRTI/NtRTI										
3TC/FTC	5/14	0/14	5/17	0/17	4/18	0/18	5/17	0/17	12/20	0/20
ABC	0/14	0/14	1/17	1/17	2/18	1/18	1/17	0/17	1/20	1/20
ddl	0/14	0/14	1/17	2/17	2/18	0/18	1/17	1/17	1/20	0/20
d4T	0/14	0/14	0/17	1/17	0/18	2/18	0/17	2/17	1/20	1/20
TDF	0/14	0/14	0/17	0/17	0/18	1/18	0/17	1/17	1/20	1/20
ZDV	0/14	0/14	0/17	1/17	1/18	2/18	0/17	2/17	0/20	1/20
NNRTI										
DLV	2/14	0/14	0/17	0/17	0/18	0/18	0/17	0/17	0/20	0/20
NVP	6/14	0/14	5/17	1/17	4/18	2/18	5/17	0/17	13/20	0/20
EFV	4/14	2/14	4/17	1/17	2/18	3/18	4/17	1/17	8/20	5/20
ETR	0/14	0/14	0/17	0/17	0/18	2/18	0/17	1/17	1/20	9/20
RPV	0/14	0/14	0/17	0/17	0/18	0/18	0/17	0/17	2/20	0/20
PI										
APV/FPV	1/14	0/14	0/17	0/17	0/18	0/18	0/17	0/17	0/20	0/20
APV/r ili FPV/r	3/14	0/14	0/17	0/17	0/18	0/18	0/17	0/17	0/20	0/20
IDV	1/14	0/14	0/17	0/17	1/18	0/18	0/17	0/17	1/20	2/20
IDV/r	0/14	1/14	0/17	0/17	1/18	0/18	0/17	0/17	0/20	3/20
SQV/r	1/14	0/14	0/17	2/17	1/18	0/18	0/17	0/17	0/20	5/20
TPV/r	0/14	1/14	0/17	0/17	0/18	0/18	0/17	0/17	0/20	2/20
ATV	0/14	1/14	0/17	0/17	1/18	0/18	0/17	0/17	2/20	1/20
ATV/r	0/14	0/14	0/17	0/17	1/18	0/18	0/17	0/1	0/20	0/20
FPV	0/14	0/14	0/17	0/17	1/18	0/18	0/17	0/71	2/20	0/20
FPV/r	0/14	0/14	0/17	0/17	1/18	0/18	0/17	0/7	2/20	0/20
LPV/r	0/14	1/14	0/17	0/17	1/18	0/18	0/17	0/17	1/20	2/20
NFV	0/14	1/14	0/17	0/17	1/18	0/18	0/17	0/17	0/20	1/20
DRV/r	0/14	0/14	0/17	0/17	0/18	0/18	0/17	0/17	0/20	2/20

R-uzorci s rezistencijom; MR-uzorci s mogućom rezistencijom
NRTI/NtRTI-nukleozidni i nukleotidni inhibitori reverzne transkriptaze; NNRTI-nenukleozidni inhibitori reverzne transkriptaze; PI-inhibitori proteaze.
Skraćenice imena antiretrovirusnih lijekova: ABC-abakavir, APV-amprenavir, ATV-atazanavir, ddI-didanozin, DLV-delavirdin, DRV-darunavir, d4T-stavudin, EFV-efavirenz, ETR-etravirin, FPV-fosamprenavir, FTC-emtricitabin, IDV-indinavir, LPV-lopinavir, NFV-nelfinavir, NVP-nevirapin, RPV-rilpivirin, SQV-sakvinavir, TDF-tenofovir, TPV-tipranavir, ZDV-zidovudin, 3TC-lamivudin, i /r-lijek kombiniran s ritonavirom.

Kako HIVdb dodjeljuje pet razina rezistencije, radi moguće usporedbe s ostala dva algoritma, razine ″osjetljiv″ i ″moguća razina rezistencije″ smatrane su razinom ″S″, ″niska razina rezistencije″ i ″srednja razina rezistencije″ smatrane su razinom ″I″, a ″visoka razina rezistencije″ smatrana je razinom ″R″. Rezultati su smatrani sukladnim ako je istoj sekvenci svaki algoritam dodijelio istu razinu rezistencije za određeni lijek. Potpuna nesukladnost interpretacije rezultata algoritama odnosila se na slučaj kad je istoj sekvenci jedan algoritam

dodijelio razinu ″S″ , a drugi razinu ″R″ za određeni lijek. Interpretacije algoritama smatrane su djelomično nesukladnim ako je istoj sekvenci istovremeno dodijeljena i ″S″ i ″I″ ili ″R″ i ″I″ razina rezistencije za određeni lijek.

Tablica 18: Interpretacija biološke značajnosti mutacija povezanih s rezistencijom HIV-a na antiretrovirusne lijekove primjenom bioinformatičkih algoritama ANRS, HIVdb i Rega (N=86).

ARV lijek	**Algoritam ANRS**			**Algoritam HIVdb**			**Algoritam Rega**		
	R	I	S	R	I	S	R	I	S
NRTI/NtRTI									
3TC	31(36.0%)	0(0%)	55(64.0%)	31(36.0%)	0(0%)	55(64.0%)	31(36.0%)	0(0%)	55(64.0%)
ABC	5(5.8%)	0(0%)	81(94.2%)	5(5.8%)	28(32.6%)	53(61.6%)	5(5.8%)	2(2.3%)	79(91.9%)
ZDV	6(7.0%)	13(15.1%)	67(78.0.%)	0(0%)	14(16.3%)	72(83.7%)	1(1.2%)	10(11.6%)	75(87.2%)
d4T	6(7.0%)	13(15.1%)	67(78.2%)	2(2.3%)	13(15.1%)	71(82.3%)	0(0%)	11(12.8%)	75(87.2%)
ddI	4(4.7%)	1(1.2%)	81(94.2%)	5(5.8%)	20(23.3%)	61(71.0%)	13(15.1%)	2(2.3%)	71(82.3%)
FTC	31(36.0%)	0(0%)	55(64.0%)	31(36.0%)	0(0%)	55(64.0%)	31(36.0%)	0(0%)	55(64.0%)
TDF	2(2.3%)	2(2.3%)	82(95.3%)	0(0%)	6(7.0%)	80(93.0%)	0(0%)	2(2.3%)	84(97.7%)
NNRTI									
EFV	34(39.5%)	0(0%)	52(60.5%)	25(29.1%)	11(12.8%)	50(58.1%)	35(40.7%)	0(0.0%)	51(63.4%)
ETR	7(8.1%)	3(3.5%)	76(88.4%)	1(1.2%)	18(21.0%)	67(78.0%)	1(1.2%)	16(18.6%)	69(80.2%)
NVP	36(41.9%)	0(0%)	50(58.1%)	35(40.7%)	9(10.5%)	42(48.8%)	37(43.0%)	2(2.3%)	47(54.7.4%)
PI									
ATV/r	1(1.2%)	0(0%)	85(98.8%)	1(1.2%)	3(3.5%)	82(95.3%)	0(0%)	3(3.5%)	83(95.1%)
DRV/r	0(0%)	2(2.3%)	84(97.7%)	0(0%)	5(5.8%)	81(94.2%)	0(0%)	6(7.0%)	80(93.0%)
FPV/r	2(2.3%)	0(0%)	84(97.7%)	5(5.8%)	1(1.2%)	80(93.0%)	1(1.2%)	4(4.7%)	81(94.2%)
LPV/r	5(5.8%)	0(0%)	81(94.2%)	1(1.2%)	5(5.8%)	80(93.0%)	1(1.2%)	4(4.7%)	81(94.2%)
NFV	0(0%)	1(1.2%)	85(98.8%)	1(1.2%)	8(9.3%)	77(89.5%)	3(3.5%)	3(3.5%)	80(93.0%)
SQV/r	1(1.2%)	4(4.7%)	81(94.2%)	0(0%)	1(1.2%)	85(98.8%)	1(1.2%)	2(2.3%)	83(97.0%)
TPV/r	16(18.6%)	3(3.5%)	67(77.9%)	0(0%)	2(2.3%)	84(97.7%)	0(0%)	2(2.3%)	84(97.7%)

NRTI/NtRTI-nukleozidni i nukleotidni inhibitori reverzne transkriptaze; NNRTI-nenukleozidni inhibitori reverzne transkriptaze; PI-inhibitori proteaze.
ABC-abakavir, ATV-atazanavir, ddI-didanozin, DRV-darunavir, d4T-stavudin, EFV-efavirenz, ETR-etravirin, FPV-fosamprenavir, FTC-emtricitabin, LPV-lopinavir, NFV-nelfinavir, NVP-nevirapin, SQV-sakvinavir, TDF-tenofovir, TPV-tipranavir, ZDV-zidovudin, 3TC-lamivudin, i /r-lijek kombiniran s ritonavirom.
Razina rezistencije: R-rezistentan; I-srednja razina rezistencije; S-osjetljiv

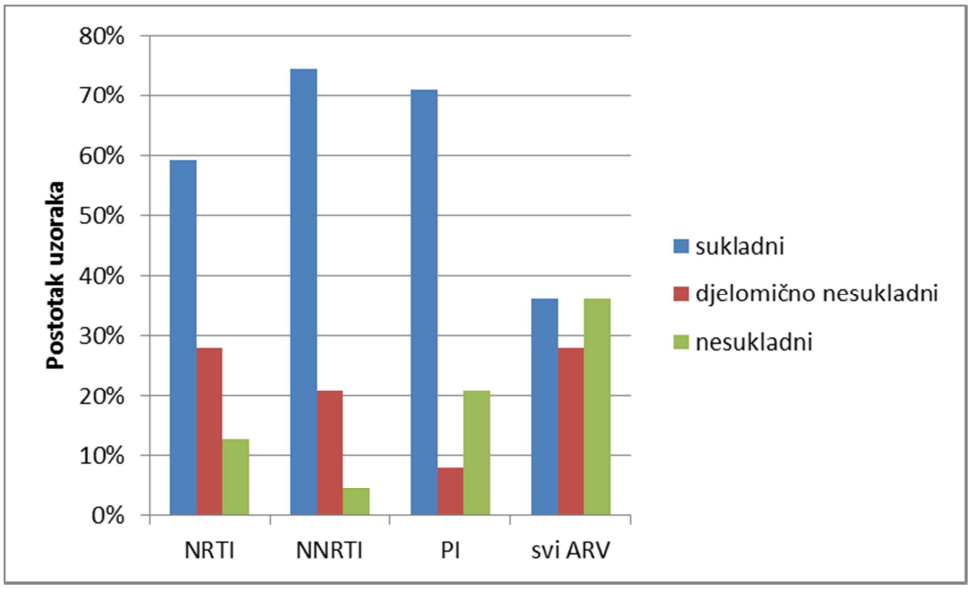
Usporedba interpretacije genotipizacije za tri algoritma bila je moguća za abakavir (ABC), atazanavir/ritonavir (ATV/r), didanozin (ddl), darunavir/ritonavir (DRV/r), stavudin (d4T), efavirenz (EFV), etravirin (ETR), fosamprenavir/ritonavir (FPV/r), emtricitabin (FTC), lopinavir/ritonavir (LPV/r), nelfinavir (NFV), nevirapin (NVP), sakvinavir/ritonavir (SQV/r), tenofovir (TDF), tipranavir/ritonavir (TPV/r), zidovudin (ZDV), lamivudin (3TC).

Usporedba rezultata sva tri algoritma nije bila moguća za delavirdin (DLV), rilpivirin (RPV), atazanavir (ATV), fosamprenavir (FPV), indinavir (IDV) i indinavir/ritonavir (IDV/r). Rega algoritam jedini analizira rezistenciju za DLV dok samo ANRS i HVdb analiziraju rezistenciju na RPV. Slično tome, rezistenciju na ATV i FPV analizira samo algoritam Rega,

rezistenciju na IDV samo algoritam ANRS dok rezistenciju na IDV/r analiziraju samo algoritmi HIVdb i Rega (Tablica 18).

Usporedba podudarnosti interpretacije rezultata analize rezistencije primjenom algoritama ANRS, HIVdb i Rega pokazala je potpunu sukladnost za svih 17 antiretrovirusnih lijekova u 36% (31/86) uzoraka. Nesukladnosti u rezultatima algoritama otkrivene su u 36% uzoraka (31/86) dok je 27.9% (24/86) bilo djelomično sukladno.

Analiza sukladnosti rezultata algoritama temeljem klase antiretrovirusnih lijekova pokazala je visoku podudarnost u interpretaciji rezistencije na NRTI (59.3% uzoraka je bilo sukladno, 28% djelomično sukladno dok je 12.8% rezultata bilo neusklađno (Slika 9).

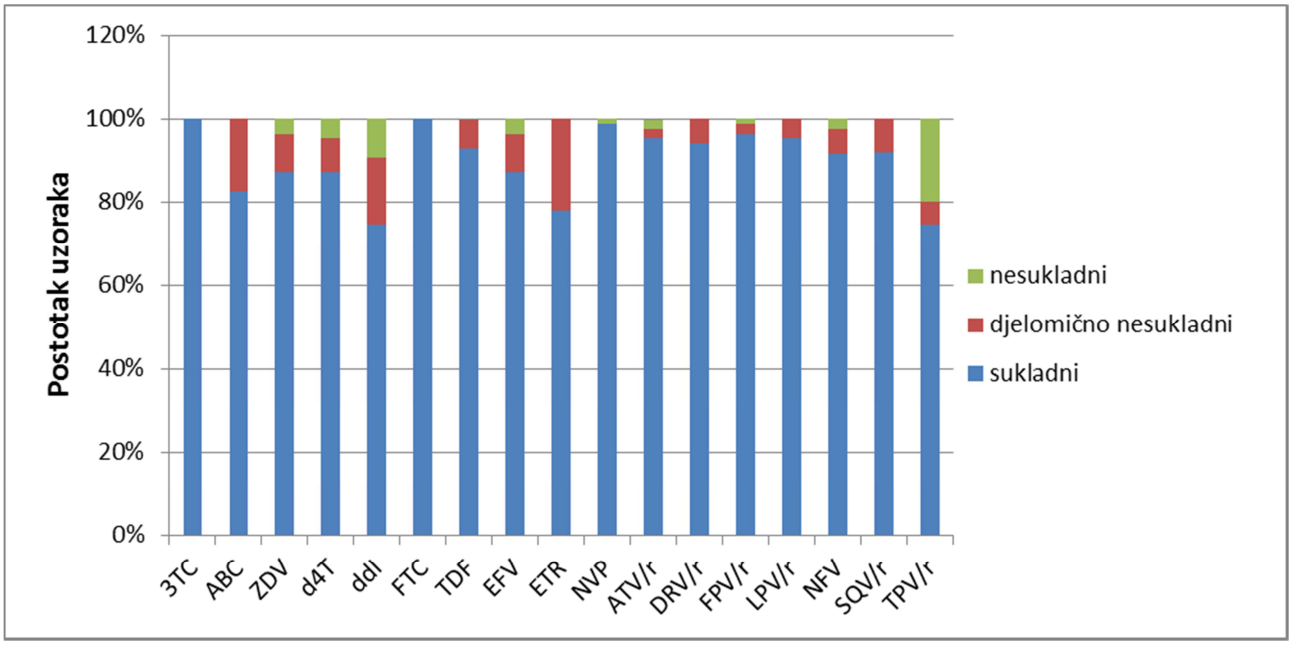


Slika 9: Sukladnost interpretacije rezultata analize rezistencije HIV-a na antiretrovirusne lijekove primjenom tri algoritma (ANRS, HIVdb i Rega) prema skupini lijekova.

Algoritmi su dali najviše sukladnih rezultata pri interpretaciji rezistencije na NNRTI (74.5%) uz samo 4.7% nesukladnosti. Najveći postotak nesukladnih rezultata opažen je pri analizi rezistencije na PI (čak 20.9% nesukladnosti) no uz vrlo mali postotak djelomičnih neusklađnosti (8.1%) te visoki postotak sukladnosti (71%) za pojedine uzorke (Slika 9).

Analiza sukladnosti interpretacije rezultata rezistencije za pojedinačne antiretrovirusne lijekove pokazala je potpunu (100%) sukladnost sva tri algoritma pri interpretaciji rezistencije na 3TC i FTC dok je čak 85 od 86 uzoraka bilo sukladno interpretirano pri analizi rezistencije na NVP, a 82 od 86 uzorka pri analizi rezistencije na LPV/r i ATV/r. Najveći broj djelomično nesukladnih rezultata opažen je pri analizi rezistencije na ABC (15/86 uzoraka).

Važno je istaknuti da je najveći broj nesukladnih rezultata dokazan pri analizi rezistencije na TPV/r (17/86 uzoraka) (Slika 10).



Slika 10: Sukladnost interpretacije rezultata analize rezistencije HIV-a na antiretrovirusne lijekove primjenom tri algoritma (ANRS, HIVdb i Rega) za sve lijekove.

4.5. Analiza nesukladnih rezultata rezistencije primjenom tri bioinformatička algoritma

Najčešći uzrok nesukladnosti pri interpretaciji rezultata rezistencije na NRTI je rezistencija na ddI (8/11 sekvenci) pri kojoj je prema algoritmu Rega soj HIV-a bio rezistentan na ddI dok je prema ANRS algoritmu bio osjetljiv. Pri analizi rezistencije na ZDV i d4T za pojedine je uzorke algoritam ANRS interpretirao rezultat testa kao rezistentan (razina ″R″) dok je prema Rega algoritmu soj bio osjetljiv na ova dva lijeka (razina ″S″).

Najčešći primjer rezultata kod nesukladnosti je bio primjer u kojem algoritam HIVdb dodjeljuje razinu ″I″ no ostala dva algoritma razinu ″S″ pri analizi rezistencije na ABC i ddI. Uz to, primjer nesukladnosti pri interpretaciji rezultata analize rezistencije na ZDV, d4T i TDF, algoritam ANRS je dodijelio razinu ″R″ a ostali algoritmi razinu ″I″.

Najčešći uzrok nesukladnosti pri interpretaciji rezultata rezistencije na NNRTI bila je rezistencija na EFV (3/4 uzoraka). Pri analizi dvije sekvence, algoritam ANRS interpretirao je rezultat testa kao osjetljiv na EFV dok je analiza algoritmom Rega pokazala rezistenciju na ovaj lijek (analiza treće sekvence dala je obrnuti rezultat algoritama). Djelomična nesukladnost uglavnom se odnosila na interpretaciju rezistencije na ETR pri kojoj je ANRS

dodijelio srednju razinu rezistencije za ETR dok je soj HIV-a prema interpretaciji ostala dva algoritma bio osjetljiv na ovaj antiretrovirusni lijek.

Većina nesukladnih rezultata (17/18 uzoraka) odnosila se na problem rezistencije na TPV/r pri čemu je algoritam ANSR konzistentno interpretirao rezultate u smislu rezistentnih sojeva HIV-a dok prema intepretaciji druga dva algoritma nije bilo rezistencije na ovaj lijek. Ostale nesukladnosti odnosile su se na rezistenciju na ATV/r i NFV (u po 2 sekvence). U slučaju ATV/r, pri analizi jedne sekvence, prema algoritmu ANRS otkrivena je rezistencija na ATV/r dok prema rezultatima algoritma Rega nije bilo rezistencije. Drugu je sekvencu HIVdb proglasio rezistentnom na ATV/r dok prema ANRS algoritmu nije otkrivena rezistencija. Obje sekvence u slučaju NFV je algoritam Rega proglasio rezistentnim dok prema algoritmu ANRS nije otkrivena rezistencija. Djelomične nesukladnosti odnosile su se na sekvence kojima je ANRS dodijelio razinu ″I″, a ostali algoritmi razinu ″S″ za TPV/r (n=2) i SQV/r (n=4).

4.6. Analiza nesukladnosti rezultata testova rezistencije obzirom na subtipove HIV-a

Četrnaest od 31 (45.2%) potpuno nesukladnih sekvenci pripadale su subtipu B HIV-a dok su ostale pripadale non-B-subtipovima: A (A1) (4/31; 12.9%), G (3/31; 9.7%) i C (1/31; 3.2%). Devet od 31 nesukladnih sekvenci non-B-subtipova HIV-a bile su rekombinante subtipova: osam sekvenci (25.8%) bile su rekombinante subtipova C i A1 dok je jedna sekvenca (3.2%) bila rekombinanta subtipova B i D. Kod najvećeg broja sekvenci s non-B-subtipovima virusa (n=15) nesukladnost se odnosila na interpretaciju rezistencije na TPV/r primjenom ANRS algoritma.

Algoritam ANRS je bio odgovoran za većinu nesukladnosti pri interpretaciji rezistencije, a najviše nesukladnosti odnosilo se na sekvence s mutacijama M36I, H69K i L89M koje se povezuju se rezistencijom na TPV/r (Tablica 19).

4.7. Usporedba interpretacije genotipizacijskih podataka jednog algoritma s drugim

Najveći postotak sukladnosti u interpretaciji rezistencije na lijekove dokazan je usporedbom rezultata HIVdb i Rega algoritama kod kojih je 52.3% (45/86) rezultata bilo u potpunosti podudarno. Ukupno 43% (37/86) rezultata bilo je u potpunosti podudarno pri analizi algoritmima ANRS i Rega dok je najmanje podudarnih rezultata (30/86, 34.9%) otkriveno usporedbom algoritama ANRS i HIVdb. Najveći postotak sukladnih rezultata dokazan je za rezultate analize rezistencije na NRTI između algoritama ANRS i Rega (68/86, 79.1%) dok je

sukladnost rezultata algoritma ANRS i HIVdb te HIVdb i Rega bila nešto niža (52/86 i 55/86). Pri analizi rezistencije na NNRTI, podudarnost algoritama HIVdb i Rega iznosila je više od 70% dok je sukladnost interpretacije rezultata analize rezistencije na PI u ova dva algoritma iznosila čak 90.7%.

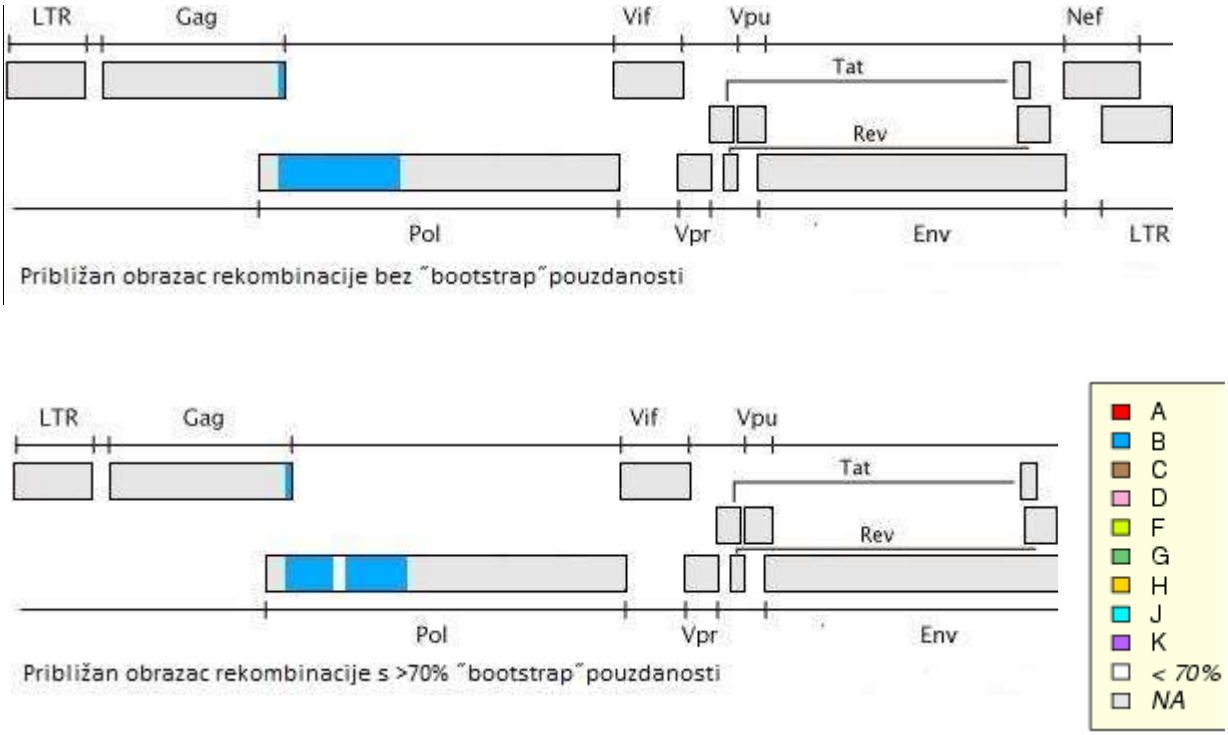
Tablica 19: Mutacije u sekvencama regije *pol* genoma HIV-a u kojima su detektirane nesukladnosti pri interpretaciji značajnosti mutacije primjenom različitih algoritama.

Antiretrovirusni lijek	Mutacija[a] (interpretacija algoritama)[b]	Odgovorni algoritam[c]
ZDV	T215Y (RIS)	ANRS
	T215S/Y (RIS)	ANRS
d4T	T215Y (RIS)	ANRS
	T215S/Y (RIS)	ANRS
	K65R (RIS)	ANRS
ddI	T69N (SIR)	Rega
	T69DN (SIR)	Rega
	T69NT (SIR/SSR)	Rega
EFV	Y188HY (SIR)	Rega
	K101E (RIS)	ANRS
NVP	K101E (RIS)	ANRS
FPV/r	M46I+L76V(SRI)	HIVdb
NFV	M46I+L76V(SIR)	Rega
ATV/r	G16EG+L33F+M46IM (RIS)	ANRS
TPV/r	M36I(V)+H69K+L89M (RSS)	ANRS

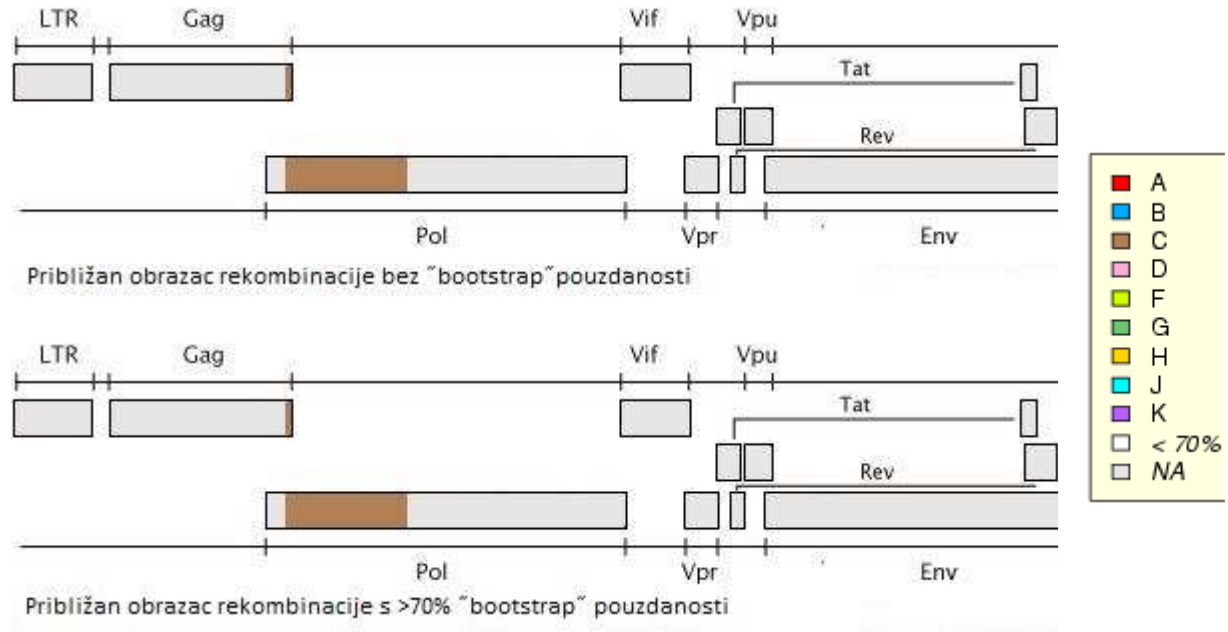
[a] Mutacija/e koja uzrokuje rezistenciju na određeni lijek prema navedenom algoritmu
[b] interpretacija algoritama prikazana slijedom ANRS-HIVdb-Rega
[c] algoritam odgovoran za zapaženu nesukladnost

4.8. Genotipizacija HIV-1

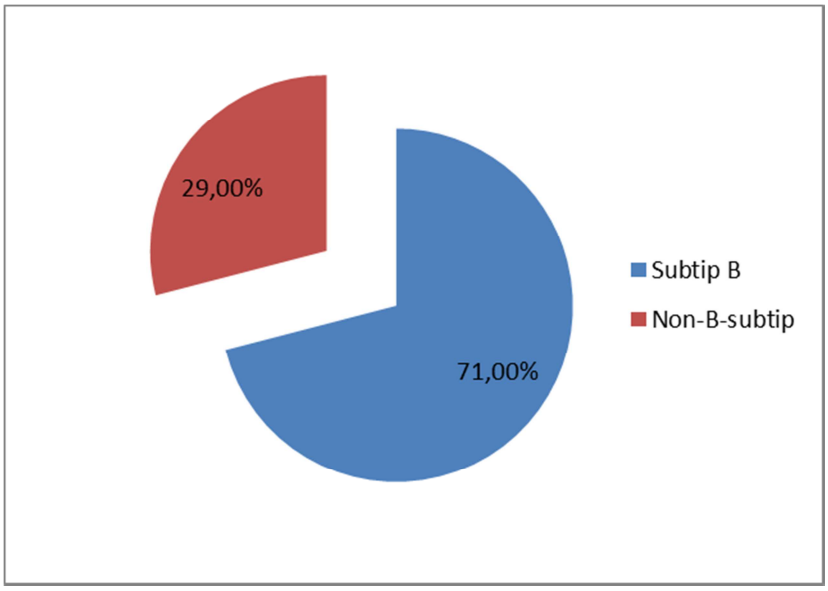
Sekvence gena *pol* 55 ispitanika uključenih u istraživanje analizirala sam primjenom bioinformatičkog algoritma REGA HIV-1 subtyping tool version 2.0 u svrhu određivanja subtipa HIV-1 (Slika 11, Slika 12). Subtip B dokazala sam u 39/55 (71%) ispitanika dok je 16 ispitanika bilo zaraženo non-B-subtipovima grupe M (Slika 13). Najčešći non-B-subtip bio je subtip A(A1) (Tablica 20). Sedam od 16 sekvenci *pol* regije HIV-1 ispitanika s non-B-subtipovima virusa bile su rekombinante subtipova virusa. U pet od 16 (31.3%) ispitanika s non-B-subtipovima virusa dokazala sam rekombinante subtipova C i A1, dok su rekombinante subtipova B i D dokazane u dva ispitanika.



Slika 11: Primjer određivanja subtipa B HIV-a analizom sekvence regije *pol* genoma virusa primjenom bioinformatičkog algoritma REGA HIV Subtyping Tool (uzorak CRO18_5).



Slika 12: Primjer određivanja subtipa C HIV-a analizom sekvence regije *pol* genoma virusa primjenom bioinformatičkog algoritma REGA HIV Subtyping Tool (uzorak CRO284).



Slika 13: Distribucija genotipova u ispitanika.

Tablica 20: Distribucija non-B-subtipova ispitanika.

Non-B-subtip	Broj ispitanika (n=16)
CRF05_DF	1 (6.3%)
subtip A(A1)	3 (18.6%)
subtip C	2 (12.5%)
subtip D	1 (6.3 %)
subtip G	2 (12.5%)

4.9. Prevalencija rezistencije HIV-1 na antiretrovirusne lijekove

Prevalenciju rezistencije na antiretrovirusne lijekove procijenila sam primjenom dvije metode: analizom u jednoj vremenskoj točki (metoda 1) i modelom kumulativne rezistencije (metoda 2) prema Pillay i sur (119). Za 55 pacijenata koji su praćeni u periodu istraživanja napravila sam najmanje jedan test rezistencije; za 58.2% pacijenta imala sam informaciju o jednom testu rezistencije, za 34.5% pacijenata o dva testa te za 7.3% pacijenata za ≥ 3 testa.

4.9.1. Određivanje prevalencije rezistencije HIV-a na antiretrovirusne lijekove metodom analize u jednoj vremenskoj točki (metoda 1)

Prevalencija rezistencije na antiretrovirusne lijekove procijenjena metodom 1 (omjer pacijenata s dokazanom genotipskom rezistencijom i onih koji su imali barem jedan test rezistencije u određenom kalendarskom razdoblju) 2009. (46.2%), 2010. (38.9%) i 2011. (42.9%) bila je statistički značajno niža u usporedbi s prevalencijom rezistencije na početku perioda praćenja (2008., 60%) te 2012. (p=0.0001) (Tablica 21).

Prevalencija rezistencije na ≥2 klase antiretovirusnih lijekova 2012. (56.3%) bila je statistički značajno veća u odnosu na prevalenciju u razdoblju od 2008. do 2011. (p=0.001) (Tablica 22).

Analiza prevalencije rezistencije temeljem klase antiretrovirusnih lijekova pokazala je da u Hrvatskoj gotovo u potpunosti dominira rezistencija na NRTI i NNRTI (pojedinačno ili u kombinaciji) dok je rezistencija na PI otkrivena samo u kombinaciji s NRTI, NNRTI ili s obje skupine lijekova (Tablica 23).

Tablica 21 : Prevalencija rezistencije virusa ljudske imunodeficijencije tipa 1 na antiretrovirusne lijekove metodom analize u jednoj vremenskoj točki.

Godina	Broj ispitanika s rezistencijom/ broj testiranih pacijenata u kalendarskoj godini	Prevalencija rezistencije
2008	6/10	60.0%*
2009	6/13	46.2%
2010	7/18	38.9%
2011	6/14	42.9%
2012	12/16	75.0%*

* statistički značajna razlika u odnosu na 2009. do 2011. (p=0.0001)

Tablica 22: Prevalencija rezistencije virusa ljudske imunodeficijencije tipa 1 na antiretrovirusne lijekove metodom analize u jednoj vremenskoj točki analizirana kao broj kompromitiranih klasa antiretrovirusnih lijekova.

Godina	≥ 1 skupine lijekova	≥ 2 skupine lijekova	3 skupine lijekova
2008	6/10 (60.0%)	3/10 (30.0%)	0
2009	6/13(46.2%)	3/13(23.1%)	0
2010	7/18 (38.9%)	4/18(22.2%)	0
2011	6/14 (42.9%)	4/14 (28.6%)	0
2012	12/16 (75.0%)	9/16 (56.3%)*	1/16 (6.3%)

* statistički značajna razlika u odnosu na prethodna vremenska razdoblja (p=0.001)

Najzastupljenije mutacije u ispitanika s dokazanom rezistencijom HIV-a na NRTI bile su M184V (5/7 pacijenata u razdoblju od 2008. do 2012.) i M41L (n=2). Rezistencija na NNRTI bila je povezana s mutacijom Y188H/L (n=4), K103N (n=1) i kombinacijom mutacija Y181C i V106A (n=1) i K101E i E138G (n=1). Rezistencija na dvije skupine antiretrovirusnih lijekova (NRTI i NNRTI) dokazana je u 22 ispitanika, a bila je povezana s nizom mutacija od kojih je najzastupljenija bila kombinacija mutacija M184V i K103N (n=4). Rezistencija na PI bila je povezana s mutacijama M46I i L76V u kombinaciji s NRTI-mutacijama (M18V+A62V, n=1), M46I, L76V i V82A u kombinaciji s NNRTI-mutacijama (K103N+V108I/V+P225H, n=1) i V32I i I47V u kombinaciji s NRTI- i NNRTI-mutacijama (M184V/I+K65R+L100I+K103N, n=1).

Tablica 23: Prevalencija rezistencije virusa ljudske imunodeficijencije tipa 1 na antiretrovirusne lijekove metodom analize u jednoj vremenskoj točki analizirana prema klasama antiretrovirusnih lijekova.

Godina	Broj pacijenata testiranih na rezistenciju	NRTI	NNRTI	PI	NRTI + NNRTI	NNRTI + PI	NRTI+PI	NRTI + NNRTI + PI
2008	10	1/10 (10.0%)	2/10 (20.0%)	0	2/10 (20.0%)	0	1/10 (10.0%)	0
2009	13	1/13 (7.7%)	2/13 (15.4%)	0	3/13 (23.1%)	0	0	0
2010	18	1/18 (5.6%)	2/18 (11.1%)	0	3/18 (16.7%)	1/18 (5.6%)	0	0
2011	14	1/14 (7.1%)	1/14 (7.1%)	0	4/14 (28.6%)	0	0	0
2012	16	1/16 (6.3%)	1/16 (6.3%)	0	8/16 (50.0%)	0	1/16 (6.3%)	1/16 (6.3%)

4.9.2. Određivanje prevalencije rezistencije HIV-a na antiretrovirusne lijekove metodom analize kumulativne rezistencije (metoda 2)

Prevalenciju rezistencije HIV-a na antiretrovirusne lijekove odredila sam i metodom analize kumulativne rezistencije tijekom opetovanih testova, tzv. metodom 2. Tijekom analize koristila sam numerator (broj ispitanika s dokazanom rezistencijom HIV-a na antiretrovirusne lijekove tijekom vremena) i denominator (broj HIV-om zaraženih osoba liječenih antiretrovirusnim lijekovima u Hrvatskoj tijekom perioda praćenja). Prevalencija rezistencije HIV-a na antiretrovirusne lijekove analizirana metodom kumulativne rezistencije tijekom

perioda praćenja kretala se od 1.1% (6/570) tijekom 2011. do 1.9% (12/639) tijekom 2012. i nije bilo statistički značajnih promjena (p=0.368) (Tablica 24).

Analiza prevalencije rezistencije temeljem klase antiretrovirusnih lijekova primjenom metode 2 također je pokazala da je rezistencija na NRTI i NNRTI (pojedinačno ili u kombinaciji) najčešća u Hrvatskoj dok je rezistencija na PI u kombinaciji s NRTI i/ili NNRTI otkrivena u četiri ispitanika (Tablica 25).

Tablica 24: Broj ispitanika s dokazanom rezistencijom HIV-a na antiretrovirusne lijekove i prevalencija rezistencije prema kumulativnom broju kompromitiranih klasa lijekova (metoda 2).

Godina	Broj ispitanika s dokazanom rezistencijom HIV-a na antiretrovirusne lijekove / ukupni broj liječenih bolesnika u Hrvatskoj tijekom određenog vremenskog perioda		
	Rezistencija na ≥ 1 klasa lijekova	Rezistencija na ≥ 2 klase lijekova	Rezistencija na 3 klase lijekova
2008	6/397 (1.5%)	3/397 (0.8%)	0
2009	6/440 (1.4 %)	3/440 (0.7%)	0
2010	7/505 (1.4%)	4/505 (0.8%)	0
2011	6/570 (1.1%)	4/570 (0.7%)	0
2012	12/639 (1.9%)	9/639 (1.4%)	1/639 (0.2%)

Tablica 25: Prevalencija rezistencije virusa ljudske imunodeficijencije tipa 1 na antiretrovirusne lijekove metodom analize kumulativne rezistencije analizirana prema klasama antiretrovirusnih lijekova.

Broj ispitanika s dokazanom rezistencijom HIV-a na antiretrovirusne lijekove									
Godina	NRTI	NNRTI	PI	NRTI + NNRTI	NNRTI + PI	NRTI + PI	NRTI + NNRTI + PI	Rezistencija na bilo koju klasu lijekova	Prevalencija rezistencije
2008	1	2	0	2	0	1	0	6	6/397 (1.5%)
2009	1	2	0	3	0	0	0	6	6/440 (1.4 %)
2010	1	2	0	3	1	0	0	7	7/505 (1.4%)
2011	1	1	0	4	0	0	0	6	6/570 (1.1%)
2012	1	1	0	8	0	1	1	12	12/639 (1.9%)

4.10. Detekcija rijetkih rezistentnih varijanti HIV-1 metodom „ultra-deep"-sekvenciranja

Mutacije povezane s rezistencijom na lijekove koje nisu detektirane standardnim sekvenciranjem već osjetljivijim tehnologijama poput UDS nazivaju se manjinske varijante, tj. sekvence. Manjinske varijante HIV-1 troje ispitanika analizirala sam metodom UDS, a dobivene rezultate usporedila s rezultatima ″population-based″-sekvenciranja. Tablica 26 prikazuje viremiju u plazmi, broj CD4+-T-limfoicita, podatke o antiretrovirusnom liječenju, rezultate ″population-based″-sekvenciranja i interpretaciju značajnosti detektiranih mutacija za rezistenciju HIV-a na antiretrovirusne lijekove u odabranih ispitanika.

Primjenom UDS-metode regije *pol* genoma HIV-1 odabranih uzoraka detektirala sam ukupno 84 mutacije. Ukupno 65 od 84 (77.3%) mutacija koje su detektirane metodom UDS nisu ranije bile otkrivene primjenom ″population-based″-sekvenciranja.

Analiza zastupljenosti varijanti s novootkrivenim mutacijama (n=65) pokazala je da su 63 od 84 zastupljene s <5% od ukupne virusne populacije, a dodatna analiza da je zastupljenost 54 od 63 varijante < 1% dok je prevalencija 9 od 63 varijanti u rasponu od 1-5%.

Primjenom UDS detektirane su sve mutacije koje su ranije otkrivene metodom ″population-based″-sekvenciranja razine detekcije oko 20% uz iznimku mutacije K103N u uzorku CRO385 (nije detektirana s UDS).

Metodom UDS u sva tri uzorka detektirane su manjinske varijante povezane s rezistencijom na sve tri skupine antiretrovirusnih lijekova. Mutacije povezane s rezistencijom na NRTI detektirane isključivo metodom UDS bile su D67N, K219Q i T69A (u dva uzorka) dok su u sva tri uzorka metodom UDS detektirane različite mutacije (Tablica 27). Najveći broj mutacija koji je detektiran isključivo metodom UDS bile su povezane s rezistencijom na PI (34/84, 40.5%) no prema IAS-USA interpretaciji većina tih mutacija (23/84, 27.4%) klasificira se kao mutacije manje biološke značajnosti za rezistenciju (engl. *″minor mutations″*).

Program ″Mutation List Analysis″ algoritma Stanford HIVdb za interpretaciju rezistencije koristila sam u procjeni učinka novootkrivenih mutacija (metodom UDS) na interpretaciju rezultata testa rezistencije. Novootkrivene mutacije u uzorku CRO385 (M46I, I47V i I50V) u potpunosti su promijenile interpretaciju testa rezistencije na PI. Prema rezultatima ″population-based″-sekvenciranja nije bilo rezistencije na PI dok je prema rezultatima UDS otkrivena visoka razina rezistencije na FPV/r, srednja razina rezistencije na DRV/r, LPV/r i

NFV/r te niska razina rezistencije na ATV/r, IDV/r i TPV/r. Novootkrivene mutacije povezane s rezistencijom na inhibitore RT (V75I, F77L i K219Q) u uzorku CRO385 također su promijenile interpretaciju testa rezistencije, tj. rezistencija na ZDV i d4T je iz razine ″osjetljiv″ promjenjena u ″srednju razinu rezistencije″, za ABC i ddI ″niska razina″ rezistencije promijenjena je u srednju razinu rezistencije dok je rezultat testa za TDF promijenjen iz ″osjetljiv″ u ″srednju razinu rezistencije″.

Tablica 26: Virološki i imunološki parametri ispitanika čiji su uzorci analizirani metodom ″ultra-deep″-sekvenciranja.

Šifra uzorka	Broj kopija HIV-1 RNA po mL plazme	Broj CD4+ T-limfocita po µL krvi	Antiretrovirusni lijekovi u vrijeme virološkog neuspjeha liječenja	Mutacije detektirane ″population-based″-sekvenciranjem[a]	Biološka značajnost mutacija za rezistenciju na lijekove (prema algoritmu Trugene)
CRO385	186 000	178	d4T, 3TC, ddI, LPV	**M184V**, T69N, **K103N**, L10I	Rezistencija na 3TC/FTC,EFV, NVP, DLV
CRO273	163 000	213	ZDV, 3TC, LPV	T74S	Nema rezistencije
CRO529	21 700	278	ddI, ABC, RAL	**M184V**, **M41L**, **L74V**, **T215Y**, **Y181C**	Rezistencija na 3TC/FTC,ABC,ddI, NVP

[a]jače otisnute mutacije-mutacije povezane s rezistencijom na antiretrovirusne lijekove (tzv. primarne mutacije prema preporuci International AIDS Society-USA)
ABC-abakavir, ddI-didanozin, DLV-delavirdin, d4T-stavudin, EFV-efavirenz, FTC-emtricitabin, LPV-lopinavir, NVP-nevirapin, RAL-raltegravir , ZDV-zidovudin, 3TC-lamivudin

Najveća promjena u interpretaciji rezultata testa rezistencije opažena je u uzorku CRO273 jer ″population-based″-sekvenciranjem nije dokazana rezistencija na antiretrovirusne lijekove. Novootkrivene mutacije (metodom UDS) u genu za proteazu (M46L, I50V, V82A i T74S) promijenile su interpretaciju rezultata testa rezistencije, posebice u smislu rezistencije na FPV/r i NFV/r (visoka razina rezistencije prema algoritmu HIVdb). Mutacije detektirane u genu za RT (A62V, D67N, L100I i K103N) promjenile su interpretaciju rezistencije za većinu inhibitora reverzne transkriptaze a posebno je značajan dokaz visoke razine rezistencije na EFV i NVP.

Novootkrivene mutacije u uzorku CRO529 (M46L, V82A/T i L90M) također su promijenile interpretaciju rezultata testa rezistencije zbog pojave visoke razine rezistencije na IDV/r i NFV/r te srednje razine rezistencije na ATV/r, FPV/r, LPV/r, SQV/r i TPV/r. Mutacije u genu za RT detektirane isključivo metodom UDS (V108I i K219Q, M184I i Y181V) nisu utjecale

na promjenu interpretacije rezistencije na inhibitore RT u odnosu na ˝population-based˝-sekvenciranje.

Tablica 27: Usporedba detekcije mutacija u regiji genoma *pol* HIV-1 povezanih s rezistencijom na antiretrovirusne lijekove metodom ˝population-based˝- i ˝ultra-deep˝- sekvenciranja.

Uzorak	Terapija kod virološkog neuspjeha	Prethodna terapija	Gen za proteazu (% zastupljenosti virusnih varijanti ˝ultra-deep˝-sekvenciranjem)		Gen za reverznu transkriptazu (% zastupljenosti virusnih varijanti ˝ultra-deep˝-sekvenciranjem)	
			Mutacije detektirane i sa SS i UDS	Mutacije detektirane samo s UDS	Mutacije detektrane i sa SS i UDS	Mutacije detektirane samo s UDS
CRO385	d4T, 3TC, ddI, LPV	EFV, ABC	G16E (95.8) I13V (98.9), L10I (96.2)	*A71T (0.31),* ***I50V (0.21)****, I54V (0.2), K20R (1.5), L10F (0.04), V77I (0.1),* ***I47V (0.04)****, I85V (0.02), G48E (0.12),* ***M46I (0.04)****, E35G (0.04), F53L (0.13)*	M184V (72.6), T69N (91.0)	***F77L (0.3), D67N (2.1), K219Q (0.3),*** *T69D (4.3),* ***V75I (0.1),*** *L210M (0.12), T69A (0.05****),*** *V75S (0.4), V179I (0.38), P236L (0.05), F227L (0.05)*
CRO273	ZDV, 3TC, LPV	d4T, ddI, EFV	M36I (99.8), I93L (98.9), T74S (98.8), L89M (98.4), G16A (93.9)	*G16E (0.8),* ***M46L (0.8)****, V11I (0.6),* ***T74P (0.6),*** *A71T (0.4), I13V (0.3),* ***I50V (0.3), V82A (0.1)***	/	*D67G (0.5),* ***A62V (0.3)****,* ***F77L (0.02), D67N (0.02)*** *K70N (0.02), V179I (5.5), K103E (4.7), A98S (1.0),* ***L100I (0.7),*** ***K103N (0.5)****, F227L (0.4), A98G (0.1)*
CRO529	ddI, ABC, RAL	ZDV, 3TC, LPV, NVP	L63P, (99.2) I62V (98.7)	*L10V (0.7),* ***L90M (0.7)****, A71V (0.6),* ***V82T (0.7),*** *L10F (0.6), M36I (1.0), I93L (0.7), L89M (0.7), G16E (0.6),* ***M46L (0.7)*** ***V82A (0.1)****, I54V (0.7) K20R (0.7) G48A (0.7)*	L74V (99.7), M184V (99.1), M41L (97.1), L210S (77.7) T215Y (89.6), Y181C (99.3), H221Y (86.3)	*T69A (2.1),* ***K219Q (0.4)*** *T215S (0.1), L210F (0.2),* ***M184I (0.05), V108I (2.5),*** *P236L (0.1),* ***Y181V (0.05)***

-jače otisnute mutacije-mutacije povezane s rezistencijom na antiretrovirusne lijekove (tzv. primarne mutacije prema preporuci International AIDS Society-USA) detektirane samo s UDS
-mutacije označene kurzivom su detektirane isključivo ˝ultra-deep˝-sekvenciranjem
ABC-abakavir, ddI-didanozin, d4T-stavudin, EFV-efavirenz, LPV-lopinavir, NVP-nevirapin, RAL-raltegravir , ZDV-zidovudin, 3TC-lamivudin

5. RASPRAVA

Rezultati ovog rada po prvi su puta pokazali prevalenciju rezistencije HIV-a na antiretrovirusne lijekove iz skupina NRTI, NNRTI i PI u liječenih osoba iz Hrvatske u petogodišnjem razdoblju kao i učestalost pojedinih mutacija povezanih s rezistencijom u genima koji kodiraju enzime RT i PT, tj. ciljne strukture antiretrovirusnih lijekova. Ovo je istraživanje dokazalo da je Hrvatska zemlja s niskom prevalencijom rezistencije HIV-a na antiretrovirusne lijekove u liječenih osoba (manje od 5% tijekom perioda praćenja za sve klase antiretrovirusnih lijekova) u usporedbi s drugim zemljama Europe i bivšeg Sovjetskog Saveza (125, 126). Analiza prevalencije rezistencije po klasama antiretrovirusnih lijekova pokazuje najveću prevalenciju rezistencije na NRTI i NNRTI (pojedinačno ili u kombinaciji) uz vrlo nisku prevalenciju rezistencije na PI (5 genotipizacijskih testova) što je u skladu s najčešće primijenjenim kombinacijama antiretrovirusnih lijekova. Analiza učestalosti pojedinih mutacija detektiranih metodom ″population-based″-sekvenciranja pokazala da je najčešća mutacija M184V u genu za RT koja uzrokuje rezistenciju virusa na lamivudin. Značajno je istaknuti da je primjena ″ultra-deep″-sekvenciranja (UDS) dokazala prisutnost većeg broja manjinskih virusnih varijanti (zastupljenost manja od 1%) koje nisu otkrivene ″population-based″-sekvenciranjem. Usporedba interpretacije biološke značajnosti pojedinih mutacija povezanih s rezistencijom primjenom bioinformatičkih algoritama pokazala je nesukladnost u čak 36% uzoraka ukazujući na važnost nastavka istraživanja u ovom području. Većina analiziranih ispitanika bila je zaražena subtipom B HIV-1.

Rezultati rezistencijskog testa za 86 uzoraka pokazali su da je rezistencija na NRTI i NNRTI dominirala tijekom cijelog perioda istraživanja dok je rezistencija na inhibitore proteaze detektirana u svega pet sekvenci. Opaženi obrasci rezistencije odraz su rezistencije na lijekove koji su dostupni pacijentima u Hrvatskoj. Dominacija rezistencije na NRTI i NNRTI, pojedinačna ili u kombinaciji i opažene mutacije odražavaju učestalost kojom su kombinacije lijekova prepisivane. Razlog niske rezistencije na PI je činjenica da su ispitanici u ovom istraživanju liječeni kombiniranim antiretrovirusnim liječenjem za razliku od pacijenata ranijih godina liječenih mono- ili dvojnom terapijom nukleozidnim inhibitorima te nepojačanim inhibitorima proteaze što je najčešće imalo za posljedicu nakupljanje virusa s visokim razinama rezistencije na više PI.

Literaturni podaci o prevalenciji rezistencije HIV-a na antiretrovirusne lijekove u bolesnika s virološkim neuspjehom liječenja izrazito su varijabilni, a studije su metodološki vrlo različite.

U većini dosadašnjih istraživanja prevalencija rezistencije na antiretrovirusne lijekove određena je praćenjem velikog broja liječenih bolesnika u jednom ili više nacionalnih centara i analizom rezultata genotipizacijskih testova koji su prikupljeni tijekom kliničkog praćenja bolesnika (127-133). Vercauteren i sur. i Audelin i sur. su modificirali metodološki pristup analizi rezistencije analizirajući incidenciju, a ne prevalenciju rezistencije HIV-a na antiretrovirusne lijekove u bolesnika iz Portugala i Danske (134, 135).

Pillay i sur. objavili su najopsežnije nacionalno istraživanje o rezistenciji HIV-a na antiretrovirusne lijekove u bolesnika iz UK-a te pokazali određene metodološke manjkavosti ranijih istraživanja od kojih valja izdvojiti potrebu da se rezultati genotipizacijskih testova stave u kontekst odgovarajućeg denominatora (cjelokupne populacije liječenih bolesnika) kao i činjenicu da analiza koja se temelji na rezultatu jednog genotipizacijskog testa nije reprezentativna jer ne uzima u obzir moguću ranije stvorenu rezistenciju (119). Uzimajući u obzir obje činjenice, Pillay i sur. su predložili metodologiju u kojoj kombinacija analize u jednoj točki i kumulativnog modela rezistencije (metoda 1, odnosno metoda 2 u ovom istraživanju) daje potpuniju procjenu prevalencije rezistencije HIV-a na lijekove. Analizirali su rezultate nacionalne baze genotipizacijskih testova rezistencije više od 4000 bolesnika liječenih u UK-u koji su prikupljeni u razdoblju od 1998. do 2002. U istraživanje su bili uključeni bolesnici stariji od 16 godina kod kojih je nakon virološkog neuspjeha liječenja analizirana rezistencija HIV-a na antiretrovirusne lijekove primjenom genotipizacijskog testa, tj. ″population-based″-sekvenciranjem. Rezistencija HIV-a na određenu skupinu antiretrovirusnih lijekova (NRTI, NNRTI i PI) definirana je kao postojanje barem jedne mutacije povezane s rezistencijom u toj skupini prema algoritmu IAS-USA (5, 119). Ovo istraživanje te predložene metode procjene prevalencije rezistencije poslužili su mi kao model za procjenu prevalencije rezistencije u liječenih pacijenata u Hrvatskoj.

U istraživanju iz UK-a uključeno je ukupno 4218 ispitanika, a u 63% ispitanika rezistencija HIV-a na antiretrovirusne lijekove testirana je samo jednom (22% ispitanika testirano je dva puta dok je 15% ispitanika testirano tri ili više puta) (119). U istraživanju koje sam provela u sklopu ove disertacije većina ispitanika (58.2%) testirana je jednom dok je samo 7.3% ispitanika testirano tri ili više puta. Ispitanici koji su testirani tri ili više puta su oni kod kojih se najčešće pojavljuju kompleksniji obrasci rezistencije, tj. više mutacija koje uzorkuju rezistenciju na više od jedne klase antiretrovirusnih lijekova.

Primjenom metode 1 (analiza prevalencije rezistencije u jednoj vremenskoj točki), prevalencija rezistencije HIV-a na ≥1 skupine lijekova u UK-u u razdoblju od 1998. do 2002.

kretala se od 75% do 82% dok je prevalencija rezistencije na ≥2 skupine lijekova bila uglavnom identična (npr. 1999. izosila je 17%) (119). U istraživanju koje sam provela u Hrvatskoj, prevalencija rezistencije HIV-a na ≥1 skupine lijekova bila je niža u usporedbi s prevalencijom u UK-u (60.0% tijekom 2008., 38.9% tijekom 2010. te 75.0% tijekom 2012.). Rezistencija na ≥2 skupine antiretovirusnih lijekova povećala se s 30.0% u 2008. na 56.3% u 2012.

U istraživanju Pillay i sur. najčešće je dokazana rezistencija na NRTI, pojedinačno ili u kombinaciji s rezistencijom na PI i /ili NNRTI. Najčešći obrazac rezistencije na 2 skupine lijekova u početku perioda praćenja (npr. od 1998. do 1999.) bila je kombinacija rezistencije na NRTI i PI no u razdoblju od 2000. do 2002. dominirala je kombinacija rezistencije na NRTI i NNRTI (119). Istraživanje koje sam provela u sklopu ove disertacije pokazalo je drugačiji obrazac rezistencije na antiretrovirusne lijekove u usporedbi s UK-om. Naime, u bolesnika liječenih u Hrvatskoj gotovo u potpunosti dominira rezistencija na NRTI i NNRTI (pojedinačno ili u kombinaciji). Najčešće opažena mutacija bila je M184V koja uzrokuje rezistenciju na NRTI (lamivudin i emtricitabin) dok je rezistencija na PI opažena samo u kombinaciji s NRTI, NNRTI ili s obje skupine. Važno je istaknuti da je tijekom perioda praćenja otkriveno smanjenje prevalencije rezistencije na pojedinačne klase lijekova, tj. NRTI (10% tijekom 2008., 6.3% tijekom 2012.) i NNRTI (20% tijekom 2008., 6.3% tijekom 2012.) dok je rezistencija na kombiniranu rezistenciju, tj. rezistenciju na NRTI i NNRTI porasla (20% tijekom 2008., 50.0% tijekom 2012.).

Primjenom metode kumulativne rezistencije, ukupan broj bolesnika s dokazanom rezistencijom na bilo koju skupinu lijekova u UK-u povećavao se s 402 (1998.) na 3460 (2002.) dok je ukupan broj ispitanika s mutacijama koje uzrokuju rezistenciju na sve tri skupine lijekova (NRTI, NNRTI i PI) porastao s 55 (1998.) na 797 (2002.) (119). U istraživanju koje sam provela u Hrvatskoj, primjenom metode analize kumulativne rezistencije, broj ispitanika s rezistencijom na bilo koju skupinu antiretrovirusnih lijekova bio je konstantan tijekom perioda praćenja.

Ukupan broj HIV-om zaraženih osoba koje se liječe antiretrovirusnim lijekovima u UK-u iznosio je 10 462 tijekom 1998., 12 594 tijekom 1999., 13 753 tijekom 2000., 17 158 tijekom 2001. i 20 329 tijekom 2002. Analiza prevalencije rezistencije HIV-a na lijekove koja uključuje analizu denominatora (ukupni broj liječenih bolesnika tijekom godine) te numeratora (broj bolesnika kod kojih je dokazana rezistencije na antiretrovirusne lijekove), prevalencija rezistencije HIV-a na antiretrovirusne lijekove (bilo koja skupina) povećala se s

4.5% tijekom 1998. na 15.3% tijekom 2000. dok je 2002. iznosila 17%. Slična dinamika tijekom vremena opažena je i tijekom analize prevalencije rezistencije po klasama antiretrovirusnih lijekova, a prevalencija rezistencije na NNRTI bila je veća u usporedbi s prevalencijom rezistencije na PI (119).

Broj HIV-om zaraženih osoba liječenih antiretrovirusnim lijekovima u Hrvatskoj (denominator) porastao je tijekom perioda praćenja (397 tijekom 2008., 639 tijekom 2012.). Prevalencija rezistencije HIV-a na antiretrovirusne lijekove u Hrvatskoj (sve klase lijekova) procijenjena kumulativnim modelom nije pokazala značajne razlike tijekom perioda praćenja (npr. 1.5% tijekom 2008., 1.9% tijekom 2012.). Dominantni obrazac rezistencije ostala je kombinacija rezistencije na NRTI i NNRTI što je u skladu s učestalosti primjene pojedinih kombinacija lijekova, tj. relativno malim brojem bolesnika liječenih s PI.

Pillay i sur. dodatno su analizirali prevalenciju rezistencije tako da su tijekom analize izdvojili mutaciju M184V u zasebnu skupinu. Mutacija M184V koja uzrokuje rezistenciju na lamivudin najčešća je pojedinačna mutacija te značajno može utjecati na ukupnu prevalenciju rezistencije. Izdvajanjem mutacije M184V iz analize, prevalencija rezistencije analizom u jednoj vremenskoj točki (metoda 1) koja je ranije iznosila 10-17% smanjila se na 5-8% tijekom perioda praćenja (119). U istraživanju koje je provedeno u Hrvatskoj, mutacija M184V nije bila izdvojena kao zasebna skupina (iako je i u ovom istraživanju upravo ta mutacija bila najčešća) zbog manjeg ukupnog broja analiziranih uzoraka. Visoka učestalost mutacije M184V koja je otkrivena u Hrvatskoj u skladu je s rezultatima drugih istraživanja koja su provedena u Europskim zemljama (134, 135). Audelin i sur. su u danskoj nacionalnoj studiji izračunali incidenciju rezistencije HIV-a na antiretrovirusne lijekove u liječenih osoba u razdoblju od 1999. do 2005 (135). Incidencija rezistencije za specifične mutacije povezane s rezistencijom pokazala je koje se mutacije prve pojavljuju nakon primjene HAART-a. Tako je najviša incidencija zapažena za M184V dok je niska incidencija zabilježena za mutacije povezane s PI što je u skladu s rezultatima ovog istraživanja gdje je M184V bila najčešća mutacija (135).

Istraživanje Vercauteeren i sur. također je pokazalo smanjenje incidencije rezistenciji u liječenih osoba u Portugalu u razdoblju od 2001. do 2006. što je u skladu s Audelin i sur. (134). Rezultati spomenutog istraživanja pokazali su značajno smanjenje incidencije na sve lijekove iz skupine NRTI, a smanjenje prevalencije rezistencije na NRTI, između ostalog, zabilježila sam i u svom istraživanju (134). Rezultati mog istraživanja djelomično su u skladu i s istraživanjem Bontell i sur. (121) koje opisuje prevalenciju rezistencije HIV-a na

antiretrovirusne lijekove u bolesnika liječenih u Švedskoj u razdoblju od 1997. do 2011. To istraživanje pokazalo je značajno smanjenje prevalencije rezistencije na NRTI i PI te porast prevalencije rezistencije na NNRTI dok je u ovom istraživanju uz smanjenje prevalencije rezistencije na NRTI zabilježeno i smanjenje prevalencije rezistencije na NNRTI (121).

Mutacija M184V biološki je vrlo značajna jer uzrokuje vrlo visoku razinu rezistencije HIV-1 na lamivudin, tj. smanjuje osjetljivost divljeg tipa virusa na lamivudin za više od 300 puta u staničnim kulturama *in vitro* (5). Zanimljivo je istaknuti da sojevi HIV-a koji sadrže mutaciju M184V imaju niži replikacijski potencijal u usporedbi s divljim tipom te da ova mutacija povećava osjetljivost virusa na antiretrovirusne lijekove zidovudin i tenofovir koji se često primjenjuju u liječenju HIV-infekcije (136). Istraživanje prevalencije rezistencije HIV-a na lijekove u bolesnika kod kojih je dokazan virološki neuspjeh liječenja pokazuju i da je mutacija M41L iz skupine mutacija TAM-I također vrlo česta, a navedene rezultate potvrdilo je i istraživanje provedeno u Hrvatskoj (136). Najčešća mutacija koja je uzrokovala rezistenciju na NNRTI u ovom istraživanju bila je K103N za koju je prethodna studija pokazala da se pojavljuje u bolesnika liječenih efavirenzom i nevirapinom, najčešće u vrlo ranoj fazi virološkog neuspjeha liječenja (136). Većina mutacija povezanih s rezistencijom na PI bile su sekundarne mutacije, tj. one koje samostalno ne uzrokuju rezistenciju virusa na ovu klasu antiretrovirusnih lijekova. Niska prevalencija rezistencije na PI u ispitanika iz Hrvatske očekivana je obzirom na to da se najčešće primjenjuju lijekovi iz ove skupine u kombinaciji s ritonavirom koji pojačava njihov antivirusni učinak te da je ukupan broj bolesnika liječenih s PI u periodu praćenja bio niži u usporedbi s brojem bolesnika liječenih s kombinacijom NRTI i NNRTI.

Biološka značajnost pojedinih mutacija regije *pol* genoma virusa za rezistenciju HIV-a na antiretrovirusne lijekove procjenjuje se primjenom bioinformatičkih algoritama. Obzirom na to da literaturni podatci pokazuju određene nepodudarnosti u interpretaciji biološke značajnosti određenih mutacija u različitim algoritmima (137-139), u ovom sam istraživanju usporedila rezultate primjene tri algoritma koji se najčešće koriste u europskim laboratorijima (ANRS, Rega i HIVdb). Rezultati pokazuju čak 36% nesukladnosti u interpretaciji biološke značajnosti pojedinih mutacija dokazanih u ovom istraživanju.

Vergne i sur. pokazali su nesukladnosti u interpretaciji biološke značajnosti pojedinih mutacija povezanih s rezistencijom HIV-a na antiretrovirusne lijekove u liječenih ispitanika, ali i u onih koji nisu ranije liječeni (tzv. primarna rezistencija) (140). Važne nesukladnosti u interpretaciji biološke značajnosti mutacija povezanih s rezistencijom u neliječenih osoba

dokazane su pri analizi primarne rezistencije na PI. Nesukladnosti se najčešće pojavljuju pri analizi non-B-subtipova HIV-a. Naime, pojedine mutacije koje u subtipa B uzrokuju biološki značajnu rezistenciju na PI, u non-B-subtipova su zapravo prirodne polimorfne varijante koje ne utječu na osjetljivost na lijekove. Najčešće nesukladnosti u liječenih bolesnika opažene su pri analizi biološke značajnosti mutacija povezanih s rezistencijom na NRTI (140).

Ravela i sur. usporedili su rezultate interpretacije biološke značajnosti mutacija u 2045 sekvenci regije *pol* genoma virusa iz ispitanika s virološkim neuspjehom liječenja primjenom četiri različita algoritma (ANRS, TRUGENE, Rega i HIVdb) (141). Ukupno 29.2% interpretacija značajnosti mutacija povezanih s rezistencijom bile su nesukladne, tj. prema najmanje jednom algoritmu nije bilo značajnih mutacija povezanih s rezistencijom dok je analiza ostalim algoritmima pokazala da postoje mutacije povezane s rezistencijom na lijekove (141).

Istraživanje Sturmera i sur., u kojem su uspoređeni rezultati analize rezistencije u 26 ispitanika primjenom čak devet bioinformatičkih algoritama pokazalo je da se nesukladnosti najčešće javljaju pri interpretaciji mutacija povezanih s rezistencijom ddI, ddc, ABC i d4T što je u skladu s rezultatima istraživanja provedenog u Hrvatskoj (142).

U ovom istraživanju analiza nesukladnosti algoritama pri interpretaciji biološke značajnosti mutacija povezanih s rezistencijom na NNRTI pokazala je visok stupanj podudarnosti. Naime, NNRTI su lijekovi s niskom genskom barijerom za rezistenciju kod kojih je za razvoj biološki značajne rezistencije najčešće dostatna samo jedna mutacija. Stoga su za lijekove iz skupine NNRTI (kao i za lamivudin iz skupine NRTI) rezultati pojedinih algoritama najčešće sukladni. Interpretacija biološke značajnosti mutacija povezanih s rezistencijom na PI je područje s najvećim brojem nesukladnosti, posebice u interpretaciji rezistencije na tipranavir (TPV/r) koji konzistentno daje iznimno veliku učestalost rezistencije. Osnovni problem pri interpretaciji značajnosti pojedinih mutacija za rezistenciju na tipranavir, tj. glavni izvor nesukladnosti su kombinacije sekundarnih PI-mutacija koje su u pojedinim non-B-subtipovima prisutne kao polimorfne varijante, a kriteriji za njihovu interpretaciju u pojedinim su algoritimima različiti. Primjerice, algoritam ANRS pri analizi rezistencije HIV-1 na tipranavir uzima u obzir mutacije M36I, H69K i L89M dok algoritam Rega uzima u obzir isključivo mutacije M36I i H69K (93, 94). Suprotno tome, algoritam HIVdb pri procjeni biološke značajnosti pojedinih mutacija za rezistenciju na tipranavir ne uzima u obzir niti jednu od navedenih mutacija (95). Obzirom na to da je svaki algoritam određen specifičnim pravilima koja opisuju specifične mutacijske obrasce te koriste različite načine interpretacije

podataka, nesukladnosti u procjeni rezistencije HIV-a na tipranavir su neizbježne. Posebno je važno istaknuti da se mutacije M36I, H69K i L89M nalaze u oko 90% non-B-subtipova virusa no isključivo kao polimorfne varijante (143). Rezultati istraživanja provedenog u Hrvatskoj pokazali su nesukladnosti u interpretaciji pojedinih mutacija za rezistenciju na tipranavir, posebice u non-B-subtipovima (15 od 31 nesukladnosti otkrivene su u non-B-subtipovima). Ovi rezultati ukazuju na to da je potrebno detaljnije istražiti ovisnost interpretacije značajnosti mutacija za rezistenciju na antiretrovirusne lijekove o subtipovima HIV-1 jer je većina algoritama dizajnirana za subtip B virusa.

Snoeck i sur. analizirali su rezistenciju HIV-a na antiretrovirusne lijekove u ispitanika zaraženih non-B-subtipovima virusa (neliječeni i liječeni ispitanici), a rezultati istraživanja su ukazali na povezanost određenih nesukladnosti s kombinacijama mutacija koje su češće u određenih subtipova virusa (144). Opažene nesukladnosti interpretacijskih algoritama u ovom istraživanju nedvojbeno ukazuju na potrebu formiranja konsenzusa pri interpretaciji testova rezistencije HIV-a na antiretrovirusne lijekove.

Obzirom na to da je subtip virusa iznimno značajan za interpretaciju biološke značajnosti pojedinih mutacija za rezistenciju HIV-a na lijekove (posebice npr. tipranavir), pri analizi rezistencije važno je odrediti i subtip virusa (145). U Europi dominira infekcija subtipom B HIV-1 (146-149). Hrvatska se ubraja u skupinu zemalja južne i jugoistočne Europe s najvećom prevalencijom subtipa B (>74%), a non-B-subtipovi uglavnom su povezani sa specifičnim putom prijenosa, tj. dominiraju u heteroseksualnih radnih migranata posebice pomoraca. Najčešći non-B-subtip u Hrvatskoj je CRF02_AG koji je najčešća forma HIV-a u većini država središnjeg dijela Afrike (150).

Distribucija subtipova HIV-a nije određena samo geografski (prema kontinentima i regijama) već ovisi i o načinu prijenosa virusa, tj. o rizičnim skupinama zaraženih osoba (145). Literaturni podatci o distribuciji subtipova HIV-a u Europi pokazuju da je u većini zemalja infekcija subtipom B vezana uz osobe iz MSM-skupine dok su non-B-subtipovi karakteristični za heteroseksualce i imigrante no postoje i određene iznimke (146-150).

Primjerice, Paraskevis i sur. pokazali su odstupanje od uobičajene distribucije subtipova HIV-1 u Grčkoj u odnosu na druge Europske zemlje analizirajući distribuciju subtipova HIV-a u 1158 ispitanika (151). Naime, u većini europskih zemalja infekcija non-B-subtipovima karakteristična za imigrante i heteroseksualne osobe, u Grčkoj je subtip A dokazan u domicilnog stanovništva koje pripada različitim rizičnim skupinama (151).

Prvo istraživanje o molekularnoj heterogenosti HIV-a u Hrvatskoj objavljeno je 2009 (152). U istraživanju je analizirana molekularna heterogenost HIV-1 u 145 HIV-om zaražene osobe čiji su biološki uzorci prikupljeni u Referentnom centru za dijagnostiku i liječenje HIV/AIDS-a R. Hrvatske u razdoblju od 2000. do 2003. Ukupno 26% ispitanika uključenih u ispitivanje bilo je zaraženo non-B-subtipovima i to: subtipom A (8%), subtipom C (26%), subtipom F (3%), CRF01_AE (8%), CRF02_AG (34%), CRF05_DF (5%), CRF06_cpx (3%), CRF10_CD (8%) (152).

Infekcija HIV-om u Hrvatskoj najčešće se širi spolnim odnosima između muškaraca, tj. unutar MSM-skupine (153). Istraživanje koje se temelji na principu RDS-a (engl. *Respondent-driven sampling*, uzorkovanje potaknuto ispitanicima) provedeno u Zagrebu pokazalo je da je prevalencija infekcije HIV-om u MSM osoba oko 5% (153). Grgić i sur. su analizirali prevalenciju primarne rezistencije HIV-a na antiretrovirusne lijekove u novodijagnosticiranih neliječenih ispitanika u Hrvatskoj u razdoblju od 2006 do 2008. te pokazali da je 89% ispitanika (n=118) uključenih u istraživanje bilo zaraženo subtipom B (većinom iz MSM-skupine) (154). Non-B-subtipovi su u istraživanju Grgić i sur. otkriveni u osoba iz heteroseksualne skupine.

Rezultati genotipizacije u istraživanju koje je dio ove disertacije pokazali su da je većina ispitanika zaražena subtipom B te da pripada MSM-skupini no da se non-B-subtipovi i dalje pojavljuju u Hrvatskoj što potvrđuje rezultate prethodnih istraživanja (153, 154). Važno je istaknuti da se u nekim europskim zemljama i u MSM-populaciji HIV-om zaraženih osoba često nalaze non-B-subtipovi (146). Primjerice, Giuliani i sur. su pokazali da je čak 13.5% (15/111) MSM-ispitanika iz Rima analiziranih u razdoblju od 2004. do 2008. bilo zaraženo non-B- subtipovima (subtip C, A1 i F1 bili su najčešći) (146).

Razina razlučivanja pojedinih virusnih varijanti u HIV-om zaraženih osoba različitim tehnikama sekvenciranja te posljedična različita osjetljivost pojedinih metoda u detekciji rijetkih rezistentnih virusnih varijanti iznimno je važna za objektivnu procjenu važnosti i opsega problema rezistencije HIV-a na antiretrovirusne lijekove (102, 110). U ovom istraživanju primijenjene su metode ˝population-based˝-sekvenciranja s razinom razlučivanja od oko 20% te UDS s razinom razlučivanja manjom od 1% (usporedba reprezentativnih uzoraka). Selektivni pritisak antiretrovirusnih lijekova može uzrokovati stvaranje rezistentnih virusnih varijanti koje čine manje od 20% ukupne virusne populacije te ih ne možemo detektirati ˝population-based˝-sekvenciranjem (155, 156). Rezultati ovog istraživanja pokazali su da primjena metode UDS omogućuje detekciju mnogo većeg broja mutacija (84 u odnosu

na 65) u usporedbi s ″population-based″-sekvenciranjem. Sve mutacije detektirane ″population-based″-sekvenciranjem detektirane su i s UDS (osim K103N). Jedna mutacija detektirana je samo ″population-based″-sekvenciranjem.

Važnost metode UDS u analizi rezistencije HIV-a na antiretrovirusne lijekove pokazalo je istraživanje Simen i sur. na 264 uzorka ispitanika koji su praćeni tijekom perioda od 5 godina (102). Mutacije povezane s rezistencijom otkrivene su ″population-based″-sekvenciranjem u 13.6% ispitanika, a metodom UDS u čak 28.3% ispitanika. Obje metode detektirale su 33 mutacije, dvije mutacije detektirane su samo ″population-based″-sekvenciranjem dok je 40 mutacija detektirano s UDS (102). U istraživanju Le i sur., 90/247 mutacija detektiranih isključivo s UDS bile su upravo mutacije povezane s biološki značajnom rezistencijom virusa na lijekove te povećanim rizikom za virološki neuspjeh liječenja (110).

U istraživanju koje sam provela u sklopu ove disertacije, primjenom metode UDS detektirala sam ukupno 28.6% (24/84) dodatnih klinički značajnih mutacija prema (IAS-USA listi mutacija) s prevalencijom <20% i to: 10.7% (9/84) mutacija povezanih s rezistencijom na NRTI, 4.8% (4/84) mutacija povezanih s rezistencijom na NNRTI i 13.1% (11/84) mutacija povezanih s rezistencijom na PI. Većina rijetkih virusnih varijanti otkrivenih u ovom istraživanju imala je prevalenciju <5% (63/84,75%) što je također u skladu s rezultatima Le i sur. koji su detektirali ukupno 62% rezistentnih virusnih varijanti s prevalencijom od 1-5% te 38% varijanti s prevalencijom od 5-20% (110). Biološku značajnost rijetkih rezistentnih virusnih varijanti za uspjeh liječenja *in vivo* dokazalo je istraživanje Simen i sur. posebice u ispitanika koji imaju veći broj rijetkih virusnih varijanti rezistentnih na NNRTI (102). Nekoliko drugih istraživanja potvrdila su povezanost detektiranih NNRTI mutacija metodom UDS i neuspjeha liječenja (109, 156). Većina mutacija otkrivenih metodom UDS u ovom istraživanju bila je povezana s rezistencijom na PI što je u skladu s rezultatima Le i sur (110). Ovaj podatak pokazuje da primjena ″population-based″-sekvenciranja potcjenjuje prevalenciju rezistencije HIV-a na PI u Hrvatskoj te da je potrebno dobivene rezultate pažljivo interpretirati.

Iako je ovo istraživanje potvrdilo nisku prevalenciju rezistencije HIV-a na sve tri skupine antiretrovirusnih lijekova što je u skladu s niskom prevalencijom epidemije HIV-a u Hrvatskoj, mogućnost za povećanje prevalencije rezistencije postoji jer je izbor lijekova za liječenje HIV-infekcije u Hrvatskoj, iako besplatan, i dalje ograničen. Iako se ″population-based″-sekvenciranje nedvojbeno dokazalo u određivanju rezistencije HIV-a na antiretrovirusne lijekove i neizostavni je dio većine laboratorija koji se bave problematikom

rezistencije HIV-a, metoda UDS značajno je promijenila dosadašnje spoznaje o genetičkoj raznolikosti i populacijskoj strukturi virusa HIV-a. Rezistencija HIV-a na antiretrovirusne lijekove ostaje globalni problem gdje u zemljama u razvoju kao što je Hrvatska zahtjeva podrobnije praćenje. Kako do danas nije otkriveno cjepivo protiv HIV-a, metoda UDS, kao tehnologija sekvenciranja nove generacije, daje optimističan pogled u budućnost u borbi protiv rezistencije HIV-a na antiretrovirusne lijekove posebno za zemlje koje i dalje pokušavaju osigurati puni pristup antiretrovirusnom liječenju.

6. ZAKLJUČCI

1. Hrvatska je zemlja s niskom prevalencijom rezistencije HIV-a na antiretrovirusne lijekove u liječenih osoba.

2. Analiza prevalencije rezistencije po klasama antiretrovirusnih lijekova pokazala je najveću prevalenciju rezistencije na NRTI i NNRTI (pojedinačno ili u kombinaciji).

3. Analiza prevalencije rezistencije po klasama antiretrovirusnih lijekova pokazala je vrlo nisku prevalenciju rezistencije na PI.

4. Analiza učestalosti pojedinih mutacija detektiranih metodom ″population-based″-sekvenciranja pokazala je da je najčešća mutacija M184V u genu za RT koja uzrokuje rezistenciju virusa na lamivudin.

5. Primjena ″ultra-deep″-sekvenciranja dokazala je prisutnost većeg broja manjinskih virusnih varijanti (zastupljenost manja od 1%) koje nisu otkrivene ″population-based″-sekvenciranjem.

6. Usporedba interpretacije biološke značajnosti pojedinih mutacija povezanih s rezistencijom primjenom tri bioinformatička algoritma pokazala je nesukladnost u čak 36% uzoraka ukazujući na važnost nastavka istraživanja u ovom području.

7. Većina analiziranih ispitanika bila je zaražena subtipom B HIV-1.

8. Od non-B-subtipova HIV-1 u ispitivanoj skupini detektirani su subtipovi A (A1), C, D, G i CRF05_DF.

7. LITERATURA

1. International Committee on the Taxonomy of Viruses Master Species List 2009 (http://talk.ictvonline.org/files/ictv_documents/m/msl/1231.aspx) (pristup 10.01.2014).

2. Volberding PA, Deeks SG. Antiretroviral therapy and management of HIV infection. Lancet. 2010; 376:49-62.

3. Thompson MA, Aberg JA, Cahn P, Montaner JS, Rizzardini G, Telenti A, Gatell JM, Günthard HF, Hammer SM, Hirsch MS, Jacobsen DM, Reiss P, Richman DD, Volberding PA, Yeni P, Schooley RT. Antiretroviral treatment of adult HIV infection: 2010 recommendations of the International AIDS Society-USA panel. JAMA. 2010; 304:321-333.

4. Clumeck N, Dedes N, Poznika A, Raffi F; EACS Executive Committee. European AIDS Clinical Society Guidelines 2013: Clinical management and treatment of HIV infected adults in Europe version 7.0. (dostupno na http://www.eacsociety.org/) (pristup prosinac 2013).

5. Johnson VA, Calvez V, Gunthard HF, Paredes R, Pillay D, Shafer RW, Wensing AM, Richman DD. Update of the drug resistance mutations in HIV-1: March 2013. Top Antivir Med. 2013; 21:6-14.

6. Nijhuis M, van Maarseveen NM, Boucher CA. Antiviral resistance and impact on viral replication capacity: evolution of viruses under antiviral pressure occurs in three phases. Handb Exp Pharmacol. 2009; 189:299-320.

7. Nikolenko GN, Delviks-Frankenberry KA, Pathak VK. A novel molecular mechanism of dual resistance to nucleoside and nonnucleoside reverse transcriptase inhibitors. J Virol. 2010; 84:5238-5249.

8. Mendell GL, Bennett JE, Dolin R. Principles and practice of infectious diseases. 7th edn. Elsevier. 2010; chapter 169.

9. Keele BF, Van Heuverswyn F, Li Y, Bailes E, Takehisa J, Santiago ML, Bibollet-Ruche F, Chen Y, Wain LV, Liegeois F, Loul S, Ngole EM, Bienvenue Y, Delaporte E, Brookfield JF, Sharp PM, Shaw GM, Peeters M, Hahn BH. Chimpanzee reservoirs of pandemic and nonpandemic HIV-1. Science. 2006; 313:523-526.

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

11. Simon-Loriere E, Rossolillo P, Negroni M. RNA structures, genomic organization and selection of recombinant HIV. RNA Biol. 2011; 8:280-286.

12. Plantier JC, Leoz M, Dickerson JE, De Oliveira F, Cordonnier F, Lemée V, Damond F, Robertson DL, Simon F. A new human immunodeficiency virus derived from gorillas. Nat Med. 2009; 15:871-872.

13. Los Alamos HIVdatebase (http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/CRFs/CRFs.html) (pristup 20.01.2014).

14. Hemelaar J, Gouws E, Ghys PD, Osmanov S: WHO-UNAIDS Network for HIV Isolation and Characterisation. Global trends in molecular epidemiology of HIV-1 during 2000-2007. AIDS. 2011; 25:679-689.

15. Hoffmann C, Rockstoh JK. HIV 2011. 19th edn. Medizin Vokus Verlag, Hamburg 2011.

16. Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik MJ. Immunobiology: the immune system in health and disease. Gar Science Pub. 2005; Chapter 11.

17. 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.

18. Oberlin E, Amara A, Bachelerie F, Bessia C, Virelizier JL, Arenzana-Seisdedos F, Schwartz O, Heard JM, Clark-Lewis I, Legler DF, Loetscher M, Baggiolini M, Moser B. The CXC chemokine SDF-1 is the ligand for LESTR/fusin and prevents infection by T-cell-line-adapted HIV-1. Nature. 1996; 382:833-835.

19. Vandekerckhove LP, Wensing AM, Kaiser R, Brun-Vézinet F, Clotet B, De Luca A, Dressler S, Garcia F, Geretti AM, Klimkait T, Korn K, Masquelier B, Perno CF, Schapiro JM, Soriano V, Sönnerborg A, Vandamme AM, Verhofstede C, Walter H, Zazzi M, Boucher CA; European Consensus Group on clinical management of tropism testing. European guidelines on the clinical management of HIV-1 tropism testing. Lancet Infect Dis. 2011; 11:394-407.

20. Židovec Lepej S, Grgić I. Novi dijagnostički test u Republici Hrvatskoj-određivanje tropizma HIV-a tipa 1. HUHIV. 2011; 12:13-17.

21. 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.

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

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

24. Lauring AS, Andino R. Quasispecies theory and the behavior of RNA viruses. PLoS Pathog. 2010; 6:e1001005.

25. Clementi M, Burioni R. Is reduction of viral fitness a valid antiviral approach? Drug Discov Today Ther Strateg. 2007; 4:267-272.

26. Quiñones-Mateu ME, Arts EJ. Fitness of drug resistant HIV-1: methodology and clinical implications. Drug Res Updat. 2002; 5:224-233.

27. Global summary of the AIDS Epidemics 2012 (dostupno na http://www.unaids.org/en/media/unaids/contentassets/documents/epidemiology/2013/gr2013/201309) (pristup 10.01.2014).

28. Hrvatski Zavod za javno zdravstvo, Epidemiologija HIV infekcije i AIDS-a u Hrvatskoj (http://hzjz.hr/?p=1887) (pristup 10.01.2014).

29. HIV resistance learning system module 2: HIV resistance and resistance testing. Virco. 2009 (dostupno na http://www.janssendiagnostics.com/uploads/File/hiv_educational_forum/Edu_module2.pdf) (pristup svibanj 2012).

30. Llibre JM, Schapiro JM, Clotet B. Clinical implications of genotypic resistance to the newer antiretroviral drugs in HIV-1-infected patients with virological failure. Clin Infect Dis. 2010; 50:872-881.

31. Aldous JL, Haubrich RH. Defining treatment failure in resource-rich settings. Curr Opin HIV AIDS. 2009; 4:459-466.

32. Deeks SG. Determinants of virological response to antiretroviral therapy: Implications for Long-Term Strategies. Clin Infect Dis. 2000; 30:177-184.

33. Menendez-Arias L. Molecular basis of human immunodeficiency virus drug resistance: An update. Antivir Res. 2010; 85:210-231.

34. Menendez-Arias L. Mechanisms of resistance to nucleoside analogue inhibitors of HIV-1 reverse transcriptase. Virus Res. 2008; 134:124-146.

35. Alcaro S, Alteri C, Artesea A, Ceccherini Silberstein F, Costa G, Ortuso F, Parrotta L, Perno CF, Svicher V. Molecular and structural aspects of clinically relevant mutations related to the approved non-nucleoside inhibitors of HIV-1 reverse transcriptase. Drug Res Updat. 2011; 14:141-149.

36. Turner BG, Summers MF. Structural biology of HIV. J Mol Biol. 1999; 285:1-32.

37. Boden D, Markowitz M. Resistance to Human immunodeficiency virus type 1 protease inhibitors. Antimic Agents and Chem. 1998; 42:2775-2783.

38. Huff JR, Kahn J. Discovery and clinical development of HIV-1 protease inhibitors. Adv Protein Chem. 2001; 56:213-251.

39. Louis JM, Ishima R, Torchia DA, Weber IT. HIV-1 protease: structure, dynamics, and inhibition. Adv Pharmacol. 2007; 55:261-298.

40. Menendez-Arias L, Tözsér J. HIV-1 protease inhibitors: effects on HIV-2 replication and resistance. Trends Pharmacol Sci. 2008; 29:42-49.

41. Haseltine WA. Molecular biology of the human immunodeficiency virus type 1. FASEB J. 1991; 5:2349-2360.

42. Menendez-Arias L, Esté JA. HIV-resistance to viral entry inhibitors. Curr Pharm Des. 2004; 10:1845-1860.

43. Roux KH, Taylor KA. AIDS virus envelope spike structure. Curr Opin Struct Biol. 2007; 17:244-252.

44. Wild C, Greenwell T, Matthews T. A synthetic peptide from HIV-1 gp41 is a potent inhibitor of virus-mediated cell-cell fusion. AIDS Res Hum Retroviruses. 1993; 9:1051-1053.

45. Kilby JM, Hopkins S, Venetta TM, DiMassimo B, Cloud GA, Lee JY, Alldredge L, Hunter E, Lambert D, Bolognesi D, Matthews T, Johnson MR, Nowak MA, Shaw GM, Saag MS. Potent suppression of HIV-1 replication in humans by T-20, a peptide inhibitor of gp41-mediated virus entry. Nat Med. 1998; 4:1302-1307.

46. US Department of health and services (http://www.hhs.gov/) (pristup 21.12.2013).

47. AIDS Drugs Online (http://www.aidsdrugsonline.com/) (pristup 21.12.2013).

48. 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.

49. Paredes R, Clotet B. Clinical management of HIV-1 resistance. Antivir Res. 2010; 85:245-265.

50. Shafer RW, Dupnik K, Winters MA, Eshleman SH. A guide to HIV-1 reverse transcriptase and protease sequencing for drug resistance studies. HIV Seq Compend. 2001; 2001:1-51.

51. Metzner KJ, Bonhoeffer S, Fischer M, Karanicolas R, Allers K, Joos B, Weber R, Hirschel B, Kostrikis LG, Gunthard HF. Emergence of minor populations of human immunodeficiency virus type 1 carrying the M184V and L90M mutations in subjects undergoing structured treatment interruptions. J Infect Dis. 2003; 188:1433-1443.

52. Quinones-Mateu ME, Arts EJ. Fitness of drug resistant HIV-1: methodology and clinical implications. Drug Res Updat. 2002; 5:224-233.

53. Clavel F, Hance AJ. HIV drug resistance. N Engl J Med. 2004; 350:1023-1035.

54. Guidance for Industry-Role of HIV Resistance Testing in Antiretroviral Drug Development. 2007 (dostupno na http://www.fda.gov/default.htm) (pristup svibanj 2012).

55. Coffin JM. HIV population dynamics in vivo: implications for genetic variation, pathogenesis, and therapy. Science. 1995; 267:483-489.

56. Condra JH, Schleif W, Blahy OM, Gabryelski LJ, Graham DJ, Quintero JC, Rhodes A, Robbins HL, Roth E, Shivaprakash M, Titus D, Yang T, Tepplert H, Squires KE, Deutsch PJ, Emini EA. *In vivo* emergence of HIV-1 variants resistant to multiple protease inhibitors. Nature. 1995; 374:569-571.

57. Domingo E, Holland JJ. RNA virus mutations and fitness for survival. Annu Rev Microbiol. 1997; 51:151-178.

58. Flexner C. HIV-protease inhibitors. N Engl J Med. 1998; 338:1281-1292.

59. Kuritzkes DR, Quinn JB, Benoit SL, Shugarts DL, Griffin A, Bakhtiari M, Poticha D, Eron JJ, Fallon MA, Rubin M. Drug resistance and virologic response in NUCA 3001, a randomized trial of lamivudine (3TC) versus zidovudine (ZDV) versus ZDV plus 3TC in previously untreated patients. AIDS. 1996; 10:975-981.

60. Molla A, Korneyeva M, Gao Q, Vasavanonda S, Schipper PJ, Mo HM, Markowitz M, Chernyavskiy T, Niu P, Lyons N, Hsu A, Granneman GR, Ho DD, Boucher CA, Leonard JM, Norbeck DW, Kempf DJ. Ordered accumulation of mutations in HIV protease confers resistance to ritonavir. Nat Med. 1996; 2:760-766.

61. Tisdale M, Myers RE, Maschera B, Parry NR, Oliver NM, Blair ED. Cross-resistance analysis of human immunodeficiency virus type 1 variants individually selected for resistance to five different protease inhibitors. Antimicrob Agents Chemother. 1995; 39:1704-1710.

62. Tsibris AM, Korber B, Arnaout R, Russ C, Lo CC, Leitner T, Gaschen B, Theiler J, Paredes R, Su Z, Hughes MD, Gulick RM, Greaves W, Coakley E, Flexner C, Nusbaum C, Kuritzkes DR. Quantitative deep sequencing reveals dynamic HIV-1 escape and large population shifts during CCR5 antagonist therapy *in vivo*. PLoS One. 2009; 4:e5683.

63. Westby M, Lewis M, Whitcomb J, Youle M, Pozniak AL, Jame, IT, Jenkins TM, Perros, M, van der Ryst E. Emergence of CXCR4 using human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) variants in a minority of HIV-1 infected patients following treatment with the CCR5 antagonist maraviroc is from a pretreatment CXCR4 using virus reservoir. J Virol. 2006; 8: 4909-4920.

64. Vivet-Boudou V, Didierjean J, Isel C, Marquet R. Nucleoside and nucleotide inhibitors of HIV-1 replication. Cell Mol Life Sci. 2006; 63:163-186.

65. Sarafianos SG, Hughes SH, Arnold E. Designing anti-AIDS drugs targeting the major mechanism of HIV-1 RT resistance to nucleoside analog drugs. Int J Biochem Cell Biol. 2004; 36:1706-1715.

66. Goldschmidt V, Marquet R. Primer unblocking by HIV-1 reverse transcriptase and resistance to nucleoside RT inhibitors (NRTIs). Int J Biochem Cell Biol. 2004; 36:1687-1705.

67. Deval J, Courcambeck J, Selmi B, Boretto J, Canard B. Structural determinants and

molecular mechanisms for the resistance of HIV-1 RT to nucleoside analogues. Curr Drug Metab. 2004; 5:305-316.

68. Shafer RW, Shapiro JM. HIV-1 Drug resistance mutations: an updated Framework for the second decade of HAART. AIDS Rev. 2008; 10:67-84.

69. Yahi N, Tamalet C, Tourrès C, Tivoli N, Ariasi F, Volot F, Gastaut JA, Gallais H, Moreau J, Fantini J. Mutation patterns of the reverse transcriptase and protease genes in human immunodeficiency virus type 1-infected patients undergoing combination therapy: survey of 787 sequences. J Clin Microbiol. 1999; 37:4099-4106.

70. Hanna GJ, Johnson VA, Kuritzkes DR, Richman DD, Brown AJ, Savara AV, Hazelwood JD, D'Aquila RT. Patterns of resistance-mutations selected by treatment of human immunodeficiency virus type 1 infection with zidovudine, didanosine, and nevirapine. J Infect Dis. 2000; 181:904-911.

71. Cozzi-Lepri A, Ruiz L, Loveday C, Phillips AN, Clotet B, Reiss P, Ledergerber B, Holkmann C, Staszewski S, Lundgren JD; the EuroSIDA Study Group. Thymidine analogue mutation profiles: factors associated with acquiring specific profiles and their impact on the virological response to therapy. Antivir Ther. 2005; 10:791-802.

72. Hu Z, Giguel F, Hatano H, Reid P, Lu J, Kuritzkes DR. Fitness comparison of thymidine analog resistance pathways in human immunodeficiency virus type 1. J Virol. 2006; 80:7020-7027.

73. Svicher V, Sing T, Santoro MM, Forbici F, Rodríguez-Barrios F, Bertoli A, Beerenwinkel, N, Bellocchi MC, Gago F, d'Arminio Monforte A, Antinori A, Lengauer T, Ceccherini Silberstein F, Perno CF. Involvement of novel mutant immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase-mutations in the regulation of resistance to nucleoside inhibitors. J Virol. 2006; 80:7186-7198.

74. Armstrong KL, Lee TH, Essex M. Replicative capacity differences of thymidine analog resistance mutations in subtype B and C human immunodeficiency virus type 1. J Virol. 2009; 83:4051-4059.

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

76. Sarafianos SG, Marchand B, Das K, Himmel D, Parniak MA, Hughes SH, Arnold E. Structure and function of HIV-1 reverse transcriptase: molecular mechanisms of polymerization and inhibition. J Mol Biol. 2009; 385:693-713.

77. Ghosn J, Chaix ML, Delaugerre C. HIV- resistance to first and second-generation non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors. AIDS Rev. 2009; 11:165-173.

78. Lefebvre E, Schiffer CA. Resilience to resistance of HIV-1 protease inhibitors: profile of darunavir. AIDS Rev. 2008; 10:131-142.

79. Shafer RW, Rhee SY, Pillay D, Miller V, Sandstrom P, Schapiro JM, Kuritzkes DR, Bennett D. HIV-1 protease and reverse transcriptase mutations for drug resistance surveillance. AIDS. 2007; 21:215-223.

80. Briz V, Poveda E, Soriano V. HIV entry inhibitors: mechanisms of action and resistance pathways. J Antimicrob Chem. 2006; 57:619-627.

81. Alkhatib G. The biology of CCR5 and CXCR4. Curr Opin HIV AIDS. 2009; 4:96-103.

82. Ceccherini Silberstein F, Cento V, Calvez V, Perno CF. The use of human immunodeficiency virus resistance tests in clinical practice. Clin Microbiol Infect. 2010; 16:1511-1517.

83. Paredes R, Clotet B. HIV drug resistance testing. Eur Infect Dis. 2008; 2:52-62.

84. Monitoring the emergence of antiretroviral resistance: report of a WHO consultation organized in collaboration with Istituto di Sanità and the International AIDS Society, Rome, 2000. World Health Organization 2001 (dostupno na http://www.who.int/emc) (pristup svibanj 2012).

85. Sen S, Tripathy SP, Paranjape RS. Antiretroviral drug resistance testing. J Postgrad Med. 2006; 52:187-193.

86. Potter SJ, Beng Chew C, Steain M, Dwyer DE, Saksena NK. Obstacles to successful antiretroviral treatment of HIV-1 infection: problems and perspectives. Indian J Med Res. 2004; 119:217-237.

87. Perelson AS, Neumann AU, Markowitz M, Leonard JM, Ho DD. HIV-1 dynamics *in vivo*: virion clearance rate, infected cell life-span, and viral generation time. Science. 1996; 271:1582-586.

88. Schmidt B, Walter H, Zeitler N, Korn K. Genotypic drug resistance interpretation systems-the cutting edge of antiretroviral therapy. AIDS Rev. 2002; 4:148-156.

89. Frentz D, Boucher CAB, Assel M, De Luca A, Fabbiani M, Incardona F, Libin P, Manca N, Muller V, O´Nuallain B, Paredes R, Prosperi M, Quiros-Roldan E, Ruiz L, Sloot PMA, Torti C, Vandamme AM, Van Laethem K, Zazzi M, van de Vijver DA. Comparison of HIV-1 genotypic resistance test: interpretation systems in predicting virological outcomes over time. PLoS One. 2010; 5:e11505.

90. Zazzi M, Romano L, Venturi G, Shafer RW, Reid C, Dal Bello F, Parolin C, Palù G, Valensin PE. Comparative evaluation of three computerized algorithms for prediction of antiretroviral susceptibility from HIV type 1 genotype. J Antimicrob Chem. 2004; 53:356-360.

91. Liu L, May S, Richman DD, Hecht FM, Markowitz M, Daar ES, Routy JP, Margolick JB, Collier AC, Woelk CH, Little SJ, Smith DM. Comparison of algorithms that interpret genotypic HIV-1 drug resistance to determine the prevalence of transmitted drug resistance. AIDS. 2008; 22:835-839.

92. Camacho R, Van Laethem K, Geretti AM, Verheyen J, Paredes R, Vandamme AM. Algorithm for the use of genotypic HIV-1 resistance data (version Rega v9.1.0). Lueven, November 2013 (dostupno na http://www.rega.kuleuven.be/cev/) (pristup prosinac 2013).

93. Algoritam Rega (http://www.rega.kuleuven.be/cev/) (pristup prosinac 2013).

94. Algoritam ANRS (http://pugliese.p.free.fr/Algo102011.pdf; dostupno na http://www.medpocket.com/) (pristup kolovoz 2013).

95. Algoritam Stanford HIVdb (http://www.hivdb.stanford.edu) (pristup kolovoz 2013).

96. Geno2pheno (www.geno2pheno.org) (pristup kolovoz 2013).

97. Shafer RW. HIV-1 drug resistance testing-a brief review of the main clinical issues. Bus Brief Long Term Health. 2004; 48998-49009.

98. Gallant JE. Antiretroviral drug resistance and resistance testing. Top HIV Med. 2005; 13:138-142.

99. Boltz VF, Zheng Y, Lockman S, Hong F, Halvas EK, McIntyre J, Currier JS, Chibowa MC, Kanyama C, Nair A, Owino-Ong'or W, Hughes M, Coffin JM, Mellors JW. Role of low-frequency HIV-1 variants in failure of nevirapine-containing antiviral therapy in women previously exposed to single-dose nevirapine. Proc Natl Acad Sci USA. 2011; 108:9202-9207.

100. Goodman DD, Zhou Y, Margot NA, McColl DJ, Zhong L, Boroto-Esoda K, Miller MD, Svarovskaia ES. Low level of the K103N HIV-1 above a threshold is associated with virological failure in treatment-naive individuals undergoing efavirenz-containing therapy. AIDS. 2011; 25:325-333.

101. Wang C, Mitsuya Y, Gharizadeh B, Ronaghi M, Shafer RW. Characterization of mutation spectra with ultra-deep pyrosequencing: application to HIV-1 drug resistance. Genome Res. 2007; 17:1195-1201.

102. Simen BB, Simons JF, Hullsiek, Novak RM, MacArthur RD, Baxter JD, Huang C, Lubeski C, Turenchalk GS, Braverman MS, Desany B, Rothberg JM, Egholm M; Terry Beirn Community Programs for Clinical Research on AIDS. Low-abundance drug-resistant viral variants in chronically HIV-infected, antiretroviral treatment-naive patients significantly impact treatment outcomes. J Infect Dis. 2009; 199:693-701.

103. Lecossier D, Shulman NS, Morand-Joubert L, Shafer RW, Joly V, Zolopa AR, Clavel F, Hance AJ. Detection of minority populations of HIV-1 expressing the K103N resistance mutation in patients failing nevirapine. J Acquir Immune Defic Syndr. 2005; 38:37-342.

104. Palmer S, Wiegand AP, Maldarelli F, Bazmi H, Mican JM, Polis M, Dewar RL, Planta A, Liu S, Metcalf JA, Mellors JW, Coffin JM. New real-time reverse transcriptase-initiated PCR assay with single-copy sensitivity for human immunodeficiency virus type 1 RNA in plasma. J Clin Microbiol. 2003; 41:4531-4536.

105. Heneine W. When do minority drug-resistant HIV-1 variants have a major clinical impact? J Infect Dis. 2010; 201:647-649.

106. Cai F, Chen H, Hicks CB, Bartlett JA, Zhu J, Gao F. Detection of minor drug-resistant populations by parallel allele-specific sequencing. Nat Methods. 2007; 4:123-125.

107. Charpentier C, Dwyer DE, Mammano F, Lecossier D, Clavel F, Hance AJ. Role of minority populations of human immunodeficiency virus type. J Virol. 2004; 78:4234-4247.

108. Johnson JA, Li JF, Morris L, Martinson N, Gray G, McIntyre J, Heneine W. Emergence of drug resistant HIV-1 after intrapartum administration of single-dose nevirapine is substantially underestimated. J Infect Dis. 2005; 192:16-23.

109. Johnson JA, L JF, Wei X, Lipscomb J, Irlbeck D, Craig C, Smith A, Bennett DE, Monsour M, Sandstrom P, Lanier ER, Heneine W. Minority HIV-1 drug resistance mutations are present in antiretroviral treatment-naive populations. PLoS Med. 2008; 5:e158.

110. Le T, Chiarella J, Simen BB, Hanczaruk B, Egholm M, Landr ML, Dieckhaus K, Rosen MI, Kozal MJ. Low-abundance HIV drug-resistant viral variants in treatment-experienced persons correlate with historical antiretroviral use. PLoS One. 2009; 4:e6079.

111. Loubse S, Balfe P, Sherman G, Hammer S, Kuhn L, Morris L. Decay of K103N mutants in cellular DNA and plasma RNA after single-dose nevirapine to reduce mother-to-child HIV transmission. AIDS. 2006; 20:995-1002.

112. Metzner KJ, Rauch P, Walter H, Boesecke C, Zollner B, Jessen H, Schewe K, Fenske S, Gellermann H, Stellbrink HJ. Detection of minor populations of drug-resistant HIV-1 in acute seroconverters. AIDS. 2005; 19:1819-1825.

113. Palmer S, Boltz V, Martinson N, Maldarelli F, Gray G, McIntyre J, Mellors J, Morris L, Coffin J. Persistence of nevirapine-resistant HIV-1 in women after single-dose nevirapine therapy for prevention of maternal-to-fetal HIV-1 transmission. Proc Natl Acad Sci USA. 2006; 103:7094-7099.

114. Paredes R, Lalama C, Ribaudo H, Schackman B, Shikuma C, Meyer W, Giguel F, Squires K, Gulick, R, Kuritzkes DR, Paredes R, Marconi VC, Campbell TB, Kuritzkes DR. Systematic evaluation of allele-specific realtime PCR for the detection of minor HIV-1 variants with pol and env resistance mutations. J Virol Methods. 2007; 146:136-146.

115. Siqueira Jr JF, Fouad AF, Rocas IN. Pyrosequencing as a tool for better understanding of human microbiomes. J Oral Microb. 2012; 4:10743.

116. Mardis ER. Next-generation DNA seqencing methods. Annu Rev Genomics Hum Genet. 2008; 9:387-402.

117. 454Life Sciences (www.454.com) (pristup svibanj 2012).

118. Rotherg JM, Leamon JH. The developmnet and impact of 454 seguencing. Nat Biotechnol. 2008; 26:1117-1124.

119. Pillay D, Green H, Matthias R, Dunn D, Phillips A, Sabin C, Evans B; UK Collaborative Group on HIV Drug Resistance. Estimating HIV-1 drug resistance in antiretroviral-treated individuals in the United Kingdom. Infect Dis. 2005; 192:967-973.

120. Assoumou L, Descamps D, Yerly S, Dos Santos G, Marcelin AG, Delaugerre C, Morand-Joubert L, Ruffault A, Izopet J, Plantier JC, Pakianather S, Montes B, Chaix ML, Wirden M, Costagliola D, Masquelier B; ANRS AC11 Resistance Group. Prevalence of HIV-1 drug resistance in treated patients with viral load >50 copies/mL in 2009: a French nationwide study. J Antimicrob Chemother. 2013; 68:1400-1405.

121. Bontell I, Häggblom A, Bratt G, Albert J, Sönnerborg A. Trends in antiretroviral therapy and prevalence of HIV drug resistance mutations in Sweden 1997-2011. PLoS One. 2013; 8:e59337.

122. De Luca A, Dunn D, Zazzi M, Camacho R, Torti C, Fanti I, Kaiser R, Sönnerborg A, Codoñer FM, Van Laethem K, Vandamme AM, Bansi L, Ghisetti V, van de Vijver DA, Asboe D, Prosperi MC, Di Giambenedetto S; SEHERE collaboration in Chain. Declining prevalence of HIV-1 drug resistance in antiretroviral treatment-exposed individuals in Western Europe. J Infect Dis. 2013; 207:1216-1220.

123. Bannister WP, Cozzi-Lepri A, Kjær J, Clotet B, Lazzarin A, Viard JP, Kronborg G, Duiculescu D, Beniowski M, Machala L, Phillips A; EuroSIDA group. Estimating prevalence of accumulated HIV-1 drug resistance in a cohort of patients on antiretroviral therapy. J Antimicrob Chemother. 2011; 66:901-911.

124. EMBL Nucleotide Sequence Database (http://www.ebi.ac.uk/ena/data/view/HG798545-HG798645) (pristup 4.12.2013).

125. Bozicevic I, Handanagi S, Zidovec Lepej S, Begovac J. The emerging and re-emerging human immunodeficiency virus epidemics in Europe. Clin Microbiol Infect. 2013; 19: 917-929.

126. Bobkova M. Current status of HIV-1 diversity and drug resistance monitoring in former USSR. AIDS Rev. 2013; 15:204-212.

127. Von Wyl V, Yerly S, Boni, J, Burgisser P, Klimkait T, Battegay M, Bernasconi E, Cavassini M, Furrer H, Hirschel B,Vernazza V, Francioli P, Bonhoeffer S, Ledergerber B, Gunthard H; the Swiss HIV Cohort Study. A long-term trends of HIV type 1 drug resistance prevalence among antiretroviral treatment-experienced patients in Switzerland. Clin Infect Dis. 2009; 48:979-987.

128. Santoro MM, Ciccozzi M, Alteri C, Montieri S, Alexiev I, Dimova I, Ceccherini Silberstein F, Beshkov D, Rezza G, Perno CF. Characterization of drug resistance mutations in HIV type 1 isolates from drug-naive and ARV-treated patients in Bulgaria. AIDS Res Hum Retroviruses. 2008; 24:1133-1138.

129. Panos G, Charatsis G, Paparizos V, Kazantzi M, Falagas ME. Prevalence of genotypic resistance to nucleoside analogues, nonnucleoside analogues, and protease inhibitors in HIV-infected persons in Athens, Greece. AIDS Res Hum Retroviruses. 2008; 24:43-51.

130. Richman DD, Morton SC, Wrin T, Hellmann N, Berry S, Shapiro MF, Bozzette SA. The prevalence of antiretroviral drug resistance in the United States. AIDS. 2004; 15:1393-1401.

131. Costagliola D, Descamps D, Assoumou L, Morand-Joubert L, Marcelin AG, Brodard V, Delaugerre C, Mackiewicz V, Ruffault A, Izopet J, Plantier JC, Tamalet C, Yerly S, Saidi S, Brun-Vezinet F, Masquelier B; Agence Nationale de Recherches sur le SIDA et les Hepatites Virales (ANRS) AC11 Resistance Study Group. Prevalence of HIV-1 drug resistance in treated patients: A french nationwide study. J Acquir Immune Defic Syndr. 2007; 46:12-18.

132. Di Giambenedetto S, Zazzi M, Corsi P, Gonnelli A, Di Pietro M, Giacometti A, Almi P, Trezzi M, Boeri E, Gianotti N, Menzo S, Del Gobbo R, Francisci D, Nerli A, Galli L, De Luca A; Antiretroviral Resistance Cohort Analysis Study Group. Evolution and predictors of

HIV type-1 drug resistance in patients failing combination antiretroviral therapy in Italy. Antivir Ther. 2009; 14:359-369.

133. Tozzi V, Zaccarelli M, Bonfigli S, Lorenzini P, Liuzzi G, Trotta MP, Forbici F, Gori C, Bertoli A, Bellagamba R, Narciso P, Perno CF, Antinori A; Collaborative Group for Clinical Use of HIV Genotype Resistance Test. Drug-class wide resistance to antiretrovirals in HIV-infected patients failing therapy: prevalence, risk factors and virological outcome. Antivir Ther. 2006; 11:553-560.

134. Vercauteren J, Deforche K, Theys K, Debruyne M, Duque LM, Peres S, Carvalho AP, Mansinho K, Vandamme AM, Camacho R. The incidence of multidrug and full class resistance in HIV-1 infected patients is decreasing over time (2001–2006) in Portugal. Retrovirology. 2008; 5:12.

135. Audelin AM, Lohse N, Obel N, Gerstoft J, Jorgensen LB. The incidence rate of HIV type-1 drug resistance in patients on antiretroviral therapy: a nationwide population-based Danish cohort study 1999-2005. Antivir Ther. 2009; 14:995-1000.

136. Ibe S, Sugiura W. Clinical significance of HIV reverse-transcriptase inhibitor-resistance mutations. Future Microb. 2011; 6:295-315.

137. Schmidt B, Korn K, Moschik B. Comparison of different algorithm fo the interpretation of genotypic data for protease inhibitors. Antivir Ther. 2000; 5:61.

138. Schmidt B, Walter H, Schwingel E. Comparison of different interpretation systems for genotypic HIV-1 drug resistance data. Antivir Ther. 2001; 6:102.

139. Shafer RW, Gonzales MJ, Brun-Vezinet F. Online comparison of HIV-1 drug resistance algorithms identifies rates and causes of discordant interpretation. Antivir Ther. 2001; 6:102.

140. Vergne L, Snoeck J, Aghokeng A, Maes B, Valea D, Delaporte E, Vandamme AM, Peeters M, Van Laethem K. Genotypic drug resistance interpretation algorithms display high levels of discordance when applied to non-B strains from HIV-1 naive and treated patients. FEMS Immunol Med Microbiol. 2006; 46:53-62.

141. Ravela J, Betts BJ, Brun-Vezinet F, Vandamme AM, Descamps D, Van Laethem K, Smith K, Schapiro JM, Winslow DL, Reid C, Shafer RW. HIV-1 protease and reverse

transcriptase mutation-patterns responsible for discordances between genotypic drug resistance interpretation algorithms. J Acq Immun Def Synd. 2003; 33:8-14.

142. Sturmer M, Doerr HW, Staszewski S, Preiser W. Comparison of nine resistance interpretation systems for HIV-1 genotyping. Antivir Ther. 2003; 8:239-244.

143. Champenois K, Bocket L, Deuffic-Burban S, Cotte L, André P, Choisy P, Yazdanpanah Y. Expected response to protease inhibitors of HIV-1 non-B subtype viruses according to resistance algorithms. AIDS. 2008; 22:1089-1089.

144. Snoeck J, Kantor R, Shafer RW, Van Laethem K, Deforche K, Carvalho AP, Wynhoven B, Soares MA, Cane P, Clarke J, Pillay C, Sirivichayakul S, Ariyoshi K, Holguin A, Rudich H, Rodrigues R, Bouzas MB, Brun-Vezinet F, Reid C, Cahn P, Brigido LF, Grossman Z, Soriano V, Sugiura W, Phanuphak P, Morris L, Weber J, Pillay D, Tanuri A, Harrigan RP, Camacho R, Schapiro JM, Katzenstein D, Vandamme AM. Discordances between interpretation algorithms for genotypic resistance to protease and reverse transcriptase inhibitors of human immunodeficiency virus are subtype dependent. Antimicrob Agents Chemother. 2006; 50:694-701.

145. Aleus A. Significance of HIV-1 genetic subtypes. Scand J Infect Dis. 2000; 32:455-463.

146. Giuliani M, Montieri S, Palamara G, Latini A, Alteri C, Perno CF, Santoro MM, Rezza G, Ciccozzi M. Non-B HIV type 1 subtypes among men who have sex with men in Rome, Italy. AIDS Res Hum Retroviruses. 2009; 25:157-164.

147. Zehender G, Ebranati E, Lai A. Population dynamics of HIV-1 subtype B in a cohort of men having sex with men in Rome, Italy. J Aquire Immune Defic Syndr. 2010; 55:156-160.

148. Longo B, Novati S, Montieri S. HIV-1 diversity among inmates of Italian prisons. J Med Virol. 2008; 80:1689-1694.

149. Riva C, Lai A, Caramma I. Transmitted HIV Type 1 drug resistance and Non-B subtypes prevalence among seroconverters and newly diagnosed patients from 1992 to 2005 in Italy. AIDS Res Hum Retroviruses. 2010; 26:41-49.

150. Stanojevic M, Alexiev I, Beshkov D, Gökengin D, Mezei M, Minarovits J, Otelea D, Paraschiv S, Poljak M, Zidovec Lepej S, Paraskevis D. HIV-1 molecular epidemiology in the Balkans: a melting pot for high genetic diversity. AIDS Rev. 2012; 14:28-36.

151. Paraskevis D, Magiorkinis E, Magiorkinis G, Sypsa V, Paparizos V, Lazanas M, Gargalianos P, Antoniadou A, Panos G, Chrysos G, Sambatakou H, Karafoulidou A, Skoutelis A, Kordossis T, Koratzanis G, Theodoridou M, Daikos GL, Nikolopoulos G, Pybus OG, Hatzakis A; Multicentre Study on HIV Heterogeneity. Increasing prevalence of HIV-1 subtype A in Greece: estimating epidemic history and origin. J Infect Dis. 2007; 196:1167-1176.

152. Ramirez-Piedad MK, Zidovec 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.

153. Bozicevic I, Dakovic Rode O, Zidovec Lepej S, Johnston LG, Stulhofer A, Dominkovic Z, Bacak V, Lukas D, Begovac J. Prevalence of sexually transmitted infections among men who have sex with men in Zagreb, Croatia. AIDS Behavior. 2009; 13:303-309.

154. Grgic I, Zidovec Lepej S, Lunar MM, Poljak M, Vince A, Vrakela IB, Planinic A, Seme K, Begovac J. 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.

155. Halvas EK, Wiegand A, Boltz VF, Kearney M, Nissley D, Wantman M, Hammer SM, Palmer S, Vaida F, Coffin JM, Mellors JW. Low frequency nonnucleoside reverse-transcriptase inhibitor-resistant variants contribute to failure of efavirenz-containing regimens in treatment-experienced patients. J Infect Dis. 2010; 201:672-680.

156. Paredes R, Lalama CM, Ribaudo HJ, Schackman BR, Shikuma C, Giguel F, Meyer WA 3rd, Johnson VA, Fiscus SA, D'Aquila RT, Gulick RM, Kuritzekes DR. AIDS Clinical Trials Group (ACTG) A5095 Team. Pre-exisiting minority drug-resistant HIV-1 variants, adherence, and risk of an antiretroviral treatment failure. J Infect Dis. 2010; 201:662-671.

8. Popis oznaka, kratica i simbola

3TC-lamivudin
ABC-abakavir
AIDS-engl. *Acquired immunodeficiency syndrome*; sindrom stečene imunodeficijencije
AMV-engl. *Avian myeloblastosis virus*; ptičji virus mijeloblastoze
ANRS-fr. *Agence Nationale de Recherche sur le SIDA*; Francuska agencija za istraživanje AIDS-a
ATV-atazanavir
CRF-engl. *Circulating recombinant form*; cirkulirajuća rekombinantna forma
d4T-stavudin
ddc-zalcitabin
ddI-didanozin
DLV-delavirdin
DRV-darunavir
EFV-efavirenz
EMA-engl. *European Medicines Agency*; Europska agencija za lijekove
ETV-etravirin
FDA-engl. *US Food and Drug Administration*; Američka agencija za hranu i lijekove
FPV-fosamprenavir
FTC-emtricitabin
HAART-engl. *Highly active antiretroviral therapy*; vrlo djelotvorno antiretrovirusno liječenje
HIV-1-engl. *Human imunodeficiency virus* type 1; virus ljudske imunodeficijencije tipa 1
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
IDV-indinavir
LAV-fr. *Lymphadenopathie associe virus*; virus udružen s limfadenopatijom
LPV-lopinavir
LTR-engl. *Long terminal repeat*; dugi ponavljajući krajevi
MDR-engl. *Multidrug resistance*; rezistencije na više lijekova
MID-*Multiplex identifier*
MMLV-engl. *Moloney murine leukemia virus*; mišji virus leukemije
MVC-maravirok
NFV-nelfinavir
NNRTI-engl. *Non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor*; nenukleozidni inhibitor reverzne transkriptaze
NNRTI-BP-engl. *Non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor binding pocket*; vezno mjesto za NRTI u RT
NRTI/NtRTI-engl. *Nucleoside/nucleotide reverse transcriptase inhibitor*; nukleozidni/nukleotidni inhibitor reverzne transkriptaze
NVP-nevirapin

PI-engl. *Protease inhibitor*, inhibitor proteaze
PR-proteaza
RAL-raltegravir
RPV-rilpivirin
RT-reverzna transkriptaza
RTV-ritonavir
SIV-engl. *Simian immunodeficiency virus*, virus imunodeficijencije majmuna
SQV-sakvinavir
T-20-enfuvirtid
TAM-engl. *Thymidine analog resistance mutation*; mutacija povezana s rezistencijom na timidinske analoge
TDF-tenofovir
TPV-tipranavir
UDS-engl. *Ultra-deep sequencing*; ˝ultra-deep˝-sekvenciranje
WT-engl. *Wild type*; 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

9. ŽIVOTOPIS

Osobni podatci	Ime i prezime	Ana Planinić
	Datum rođenja	27.05.1983.
	Adresa	Taborska 31, 10 000 Zagreb
	Telefon:	098/931 931 6
	E-mail adresa	anaplaninic@yahoo.com
Zaposlenje	02/2008-	Znanstveni novak u Odjelu za molekularnu dijagnostiku i protočnu citometriju, Klinika za infektivne bolesti ″Dr. Fran Mihaljević″
	Adresa	Mirogojska 8, Zagreb
	Telefon	01/2826 621
Obrazovanje	06/2008-	Poslijediplomski doktorski studij biologije, Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu, znanstvena grana biokemija i molekularna biologija
	2002-2007	Dodiplomski studij biologije, Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu, smjer dipl. ing. molekularne biologije Diplomski rad: ″HLA-protutijela u visokosenzibiliziranih primatelja transplantata bubrega″ Voditelj: prof. dr. sc. Vesna Kerhin Brkljačić
	1990-2002	Osnovna škola i Opća Gimnazija, Mostar, Bosna i Hercegovina
Usavršavanje	06/2009	HHMI Course: Advanced Laboratory Training Course on Viral Subversion of Immune Response, Rijeka
	12/2010	1. Collaborative HIV and Anti-HIV Drug Resistance Network CHAIN (7th Framework, EU project) Workshop in Slovenia, Ljubljana
	02/2012	″Metodološki tečajevi u biologiji-molekularna filogenija″, Institut Ruđer Bošković, Zagreb

Znanstveni radovi

Radovi u časopisima citiranim u Current Contents

1. Seme K, Zidovec Lepej S, Lunar MM, Iscic-Bes J, Planinić A, Kocjan BJ, Vince A, Poljak, M. Digene HPV Genotyping RH Test RUO: comparative evaluation with INNO-LiPA HPV Genotyping Extra Test for detection of 18 high-risk and probable high-risk human papillomavirus genotypes. J Clin Virol. 2009; 46:176-179.

1. Poljak M, Kocjan BJ, Kovanda A, Lunar MM, Zidovec Lepej S, Planinic A, Seme K, Vince A. Human papillomavirus genotype specificity of hybrid capture 2 low-risk probe cocktail. J Clin Microbiol. 2009; 47:2611-2615.

3. Grgic I, Zidovec Lepej S, Lunar MM, Poljak M, Vince A, Baca Vrakela I, Planinic A, Seme K, Begovac J. The Prevalence of Transmitted Drug Resistance in

4. Pandak N, Penavic IP, Zidovec Lepej S, Planinić A, Vukic BT, Peric Lj. Chlamydophila pneumoniae and Mycoplasma pneumoniae were not identified in sinus mucosa of patients with chronic rhinosinusitis. Eur Arch Otorhinolaryngol. 2013; (u tisku).

Ostali radovi

1. Planinić A, Židovec Lepej S. Izvješće s 15. konferencije o retrovirusnim i oportunističkim infekcijama CROI 2008, Boston, USA. HIV/AIDS Info bilten HUHIV-a. 2008; IX, ISSN 1332-7445.

2. Planinić A, Židovec Lepej S. Molekularna dijagnostika infekcije virusom hepatitisa B. HIV/AIDS Info bilten HUHIV-a. 2008; IX, ISSN 1332-7445.

Sažeci

Sažeci u časopisima citiranim u Current Contents

1. Grgic I, Baca Vrakela I, Planinic A, Gorenec L, Zidovec Lepej S. Distribution of surveillance drug resistance mutations in different HIV-1 subtypes in newly-diagnosed untreated HIV patients in Croatia. XX International conference on HIV and Hepatitis virus

drug resistance and curative strategies. June 11-17, 2011. Sheraton Hacienda del Mar, Los Cabos Mexico.

Sažeci u ostalim časopisima

1. Gorenec L, Grgić I, Planinić A, Židovec Lepej S, Vince A, Begovac J. Učestalost neodređenih rezultata QuantiFERON-tb Gold testa u HIV-om zaraženih osoba. 3. hrvatski kongres o urogenitalnim i spolno prenosivim infekcijama s međunarodnim sudjelovanjem. Knjiga sažetaka. Zagreb:Argenta d.o.o. 2011; 87-87.

2. Grgić I, Židovec Lepej S, Žunec R, Planinić A, Gorenec Lana, Vince A, Begovac J. Detekcija HLA-B*5701 u HIV-om zaraženih osoba i preosjetljivost na abakavir. 3. hrvatski kongres o urogenitalnim i spolno prenosivim infekcijama s međunarodnim. Knjiga sažetaka. Zagreb:Argenta d.o.o. 2011; 28-28.

3. Furčić I, Planinić A, Židovec Lepej S, Vince A, Saiz JC, Mas A, Nagy B. Genetic diversity of hepatitis C virus in Croatia .17th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. September 10-14, 2010. Yokohama, Japan.

4. Grgić I, Židovec Lepej S, Vince A, Gorenec L, Planinić A, Romih V, Begovac J. Increased frequency of viral loads above 100000 HIV-1 RNA copies/ml measured by Roche Cobas TaqMan assay in comparison with Cobas Amplicor assay. 2. hrvatski kongres o urogenitalnim i spolno prenosivim infekcijama s međunarodnim sudjelovanjem. Knjiga sažetaka. Zagreb:Argenta d.o.o. 2010; 24-24.

5. Furčić I, Židovec Lepej S, Planinić A, Vince A, Saiz JC, Mas A, Nagy B. Genotyping and detailed molecular analysis of hepatitis C virus in Croatia. Abstracts of the 16th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruse. October 3-7, 2009. Nice, France.

6. Grgić I, Planinić A, Vince A, Škerk V, Židovec Lepej S. Molekularna detekcija Chlamydia trachomatis DNK u različitim biološkim uzorcima. 1. hrvatski kongres o urogenitalnim i spolno prenosivim infekcijama s međunarodnim sudjelovanjem: Knjiga sažetaka. Hrvatsko društvo za urogenitalne i spolno prenosive infekcije HLZ-a, Klinika za infektivne bolesti. 2009; 81-81.

7. Planinić A, Grgić I, Židovec-Lepej S, Tešović G, Benić B, Miše B, Baće A. Markovinović L. Molecular detection of enteroviral RNA in cerebrospinal fluid. 6th Croatian Congress on

Infectious Diseases with International Participation. October 24-27, 2009. Šibenik, Hrvatska. Samobor:HDI-Hrvatsko društvo za infektivne bolesti. 2009; 75-76.

8. Planinic A, Grgic I, Gorenec L, Begovac J, Zidovec Lepej S. The prevalence and patterns of genotypic resistance to antiretroviral drugs in patients with virological failure from Croatia; 2008-2010. The 6th National HIV/AIDS congress. May 17-19, 2012. Sibiu, Romania.

9. Grgic I, Zidovec Lepej S, Planinic A, Gorenec L, Begovac J. The prevalence of HLA-B*5701 associated with hypersensitivity to abacavir in HIV-a positive individuals from Croatia. The 6th National HIV/AIDS congress. May 17-19, 2012. Sibiu, Romania.

10. Grgic I, Gorenec L, Planinic A, Zidovec Lepej S. Late presentation to care remains a problem in Croatian nationwide cohort. STI&AIDS World Congress. July 14-17, 2013. Vienna, Austria.

11. Židovec Lepej S, Planinić A, Grgić, I, Gorenec L, Begovac J. Molekularna heterogenost HIV-a u Hrvatskoj. 10. Hrvatski kongres kliničke mikrobiologije i 7. hrvatski kongress o infektivnim bolestima s međunarodnim sudjelovanjem. Listopad 24-27, 2013. Rovinj, Hrvatska.

12. Budimir J, Iščić-Beš J, Planinić A, Dušek D, Kurelac I, Vince A, Židovec Lepej S. Resistance of hepatitis B virus to lamivudine and adefovir in patients with chronic hepatitis B treated at the University Hospital for infectous diseases ˝dr. Fran Mihaljevic˝ during 2008 and 2009. 6th Croatian Congress on Infectious Diseases with International Participation. October 24-27, 2009. Šibenik. Samobor:HDI - Hrvatsko društvo za infektivne bolesti. 2009; 53-53.

13. Planinić A, Židovec Lepej S, Bolarić B, Vargović M, Grgić I, Gorenec L, Škerk V, Vince A. Detekcija DNK visokorizičnih genotipova humanih papilomavirusa standardiziranim PCR testom u stvarnom vremenu. 3. hrvatski kongres o urogenitalnim i spolno prenosivim infekcijama s međunarodnim sudjelovanjem. Knjiga sažetaka. Zagreb:Argenta d.o.o. 2011; 85-86.

14. Grgić I, Gorenec L, Planinić A, Žunec R, Židovec-Lepej S. Pharmacological screening for HLA-B*5701 alelle in HIV-1 positive individuals in Croatia. Keystone Symposia on Molecular and Cellular biology: Cell Biology of Virus Entry, replication and pathogenesis, March 26-31, 2012. Whistler, Canada.

15. Grgic I, Baca Vrakela I, Planinic A, Gorenec L, Zidovec Lepej S. T215 surveillance drug resistance mutation in newly-diagnosed untreated HIV patients in Croatia. Keystone Symposia on HIV evolution, genomics and pathogenesis. March 20-25, 2011. Whistler, Canada.