

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ:  
«ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΚΑΙ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗ ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΟΥ,  
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΟΥ ΚΑΙ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΟΥ ΚΙΝΔΥΝΟΥ»**

**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ  
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**

**ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**«ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΡΙΩΝ ΑΛΓΟΡΙΘΜΩΝ ΕΡΜΗΝΕΙΑΣ ΓΟΝΟΤΥΠΙΚΗΣ  
ΑΝΤΟΧΗΣ ΤΟΥ ΙΟΥ ΤΗΣ ΑΝΟΣΟΕΠΑΡΚΕΙΑΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ (HIV-1)  
ΣΕ ΑΝΤΙΡΕΤΡΟΪΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ»**

**ΜΕΤΑΠΤ. ΦΟΙΤΗΤΡΙΑ: ΖΙΒΙΝΑΚΗ ΑΝΤΟΥΕΛΑ**

**ΑΘΗΝΑ  
Μάρτιος, 2019**



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ

Εθνικόν και Καποδιστριακόν  
Πανεπιστήμιον Αθηνών

ΙΔΡΥΘΕΝ ΤΟ 1837

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

## ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

/ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΚΑΙ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗ ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΟΥ, ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΟΥ ΚΑΙ  
ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΟΥ ΚΙΝΔΥΝΟΥ

### ΠΡΑΚΤΙΚΟ ΚΡΙΣΕΩΣ

ΤΗΣ ΣΥΝΕΔΡΙΑΣΗΣ ΤΗΣ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ ΓΙΑ ΤΗΝ  
ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Του/της Μεταπτυχιακού/κής Φοιτητή/Φοιτήτριας κ. Α. Ζ. Βασιλάκη

### Εξεταστική Επιτροπή

- Μ. Καντζαρινού, Επιβλέπων
- Θ. Χαλκιάκης
- Γ. Ριζά

Η Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή για την αξιολόγηση και εξέταση του/της  
υποψηφίου/υποψηφίας κ. Αικατερίνη Ζ. Βασιλάκη, συνεδρίασε σήμερα  
28-3-2019

Η Επιτροπή διαπίστωσε ότι η Διπλωματική Εργασία του/της κ. Ζ. Βασιλάκη με  
τίτλο

«Συγκριτική Ανάλυση των Απορριπτικών Χαρακτηριστικών  
Απορριπτικών (S.T.) και Απορριπτικών του Απορριπτικού (S.T.)  
Απορριπτικού Χαρακτηριστικού, είναι πρωτότυπη, επιστημονικά και τεχνικά άρτια και η  
βιβλιογραφική πληροφορία ολοκληρωμένη και εμπεριστατωμένη.

Η εξεταστική επιτροπή αφού έλαβε υπ' όψιν το περιεχόμενο της εργασίας και τη  
συμβολή της στην επιστήμη, με ψήφους ..... προτείνει την απονομή στον  
παραπάνω Μεταπτυχιακό Φοιτητή την απονομή του Μεταπτυχιακού Διπλώματος  
Ειδίκευσης (Master's).

Στην ψηφοφορία για την βαθμολογία ο υποψήφιος έλαβε για τον βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ»  
ψήφους ..... 4 ..... για τον βαθμό «ΛΙΑΝ ΚΑΛΩΣ» ψήφους ..... και  
για τον βαθμό «ΚΑΛΩΣ» ψήφους ..... Κατά συνέπεια, απονέμεται ο βαθμός  
«...άριστα (4)».

Τα Μέλη της Εξεταστικής Επιτροπής

- Μ. Καντζαρινού, Επιβλέπων
- Θ. Χαλκιάκης
- Γ. Ριζά

(Υπογραφή)

(Υπογραφή)

(Υπογραφή)

## Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους μαζί και έναν έναν ξεχωριστά, όσους με καθοδήγησαν και με βοήθησαν στην εκπόνηση της διπλωματικής μου εργασίας. Αρχικά και πρώτα απ' όλους θα ήθελα να ευχαριστήσω την Επίκουρη Καθηγήτρια Επιδημιολογίας και Προληπτικής Ιατρικής κ.Καντζανού Μαρία, υπεύθυνη του Εθνικού Κέντρου Αναφοράς Ρετροϊών τόσο για την αμέριστη επιστημονική και ηθική υποστήριξη όσο και για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε. Στη συνέχεια θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή της διπλωματικής μου κ Κοντογιώργη Χρήστο, Επίκουρο Καθηγητή του Εργαστήριου Υγιεινής και Προστασίας Περιβάλλοντος του Τμήματος Ιατρικής του Δημοκρίτειου Πανεπιστημίου Θράκης, για την πολύτιμη βοήθειά του και τις ουσιαστικές του παρατηρήσεις που βοήθησαν στην σύνταξη ενός αρτιότερου κειμένου.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω την βιολόγο του Εθνικού Κέντρου Αναφοράς Ρετροϊών κ Παπαχρήστου Ελένη, η οποία επιδεικνύοντας μεγάλη υπομονή με βοήθησε να γνωρίσω και να κατανοήσω τον κόσμο της γονοτυπικής αντοχής, μαθαίνοντας μου με απόλυτα επιστημονικό τρόπο τις τεχνικές προσδιορισμού. Επιπρόσθετα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επίσης βιολόγο του Εθνικού Κέντρου Αναφοράς κ.Βασιλάκη Αλέξη για την πολύτιμη βοήθεια του στη κατανόηση των αλγορίθμων ANRS, REGA και του ιδιόκτητου αλγόριθμου VIROSEQ.

Εν κατακλείδι, ευχαριστώ θερμά τον στατιστικό κ.Αθανάσιο Πετραλία για την ουσιαστική καθοδήγηση στην ανάλυση των δεδομένων της διπλωματικής μου εργασίας.

## **ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ**

|                                                                                                                                                         |          |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------|
| Πρόλογος.....                                                                                                                                           | 1        |
| Εισαγωγή.....                                                                                                                                           | 3        |
| Περίληψη.....                                                                                                                                           | 6        |
| Abstract.....                                                                                                                                           | 7        |
| <b>Μέρος 1<sup>ο</sup></b> .....                                                                                                                        | <b>8</b> |
| 1 Ο ιός της ανθρώπινης ανοσοεπάρκειας (HIV- Human ImmunodeficiencyVirus) ιστορική αναδρομή.....                                                         | 10       |
| 1.1 Χαρακτηριστικά του HIV (Human Immunodeficiency Virus).....                                                                                          | 11       |
| 1.2 Δομή γονιδιώματος HIV-1.....                                                                                                                        | 12       |
| 1.3 Ομάδες και υπότυποι του HIV-1.....                                                                                                                  | 13       |
| 1.4 Κύκλος αναδιπλασιασμού του ιού HIV-1.....                                                                                                           | 14       |
| 2 Αντιρετροϊκή Θεραπεία (Antiretroviral Therapy - ART).....                                                                                             | 17       |
| 2.1 Αντιρετροϊκά Φάρμακα (Antiretrovirals-ARVs).....                                                                                                    | 17       |
| 3 Αντοχή στα αντιρετροϊκά φάρμακα (Hiv Drug Resistance-HIVDR).....                                                                                      | 20       |
| 3.1 Βιολογική βάση αντοχής στα Αντιρετροϊκά Φάρμακα –ARVs...20                                                                                          |          |
| 3.2 Λόγοι εμφάνισης της αντοχής στα αντιρετροϊκά φάρμακα-ARVs.....                                                                                      | 22       |
| 3.3 Αντοχή σε Νουκλεοσιδικούς/ Νουκλεοτιδικούς Αναστολείς Αντίστροφης μεταγραφάσης (Nucleoside/Nucleotide Reverse Transcriptase Inhibitors –NRTIs)..... | 23       |
| 3.4 Αντοχή σε μη Νουκλεοσιδικούς Αναστολείς Αντίστροφης Μεταγραφάσης (Non-Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors - NNRTIs).....                    | 25       |
| 3.5 Αντοχή σε Αναστολείς Πρωτεάσης (Protease Inhibitors PIs)....                                                                                        | 26       |
| 3.6 Συμμόρφωση (compliance) ή προσκόλληση (adherence) το «κλειδί» για την αποφυγή ανάπτυξης αντοχής στην ART.....                                       | 27       |
| 4 Μέθοδοι ελέγχου της αντοχής στο εργαστήριο – Γονοτυπικές και Φαινοτυπικές μέθοδοι.....                                                                | 32       |

|     |                                                                                                       |    |
|-----|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 4.1 | Επιλογή κατάλληλου δείγματος και διαδικασία προσδιορισμού αντοχής.....                                | 33 |
| 4.2 | PCR- Polymerase Chain Reaction για τον πολλαπλασιασμό των περιοχών στόχων.....                        | 33 |
| 4.3 | Γονοτυπικές μέθοδοι πλήρους αλληλουχίας (sequencing).....                                             | 34 |
| 4.4 | Φαινοτυπικές μέθοδοι προσδιορισμού (Phenotypic Assay) ...                                             | 36 |
| 5   | Χρησιμότητα μεθόδων προσδιορισμού αντοχής στη κλινική πρακτική ..                                     | 38 |
| 5.1 | Συστάσεις χρήσης μεθόδων προσδιορισμού αντοχής στα φάρμακα σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες..... | 40 |
| 6   | Αλγόριθμοι γονοτυπικής αντοχής.....                                                                   | 42 |
| 6.1 | Αλγόριθμος REGA.....                                                                                  | 45 |
| 6.2 | Αλγόριθμος ANRS (Agence Nationale de Recherche sur le SIDA).....                                      | 46 |
| 6.3 | Αλγόριθμος HIVdb (Stanford University Genotypic Resistance).....                                      | 47 |
| 6.4 | Σύστημα Geno2pheno.....                                                                               | 48 |
| 6.5 | Σύστημα γονότυπου Viroseq (ViroSeq™ HIV-1 Genotyping System).....                                     | 48 |
| 7   | Μελέτες που αναφέρονται στη συγκριτική αξιολόγηση των αλγορίθμων ερμηνείας γονοτυπικής αντοχής .....  | 50 |

## **Μέρος 2<sup>ο</sup>.....57**

|       |                                                                                       |    |
|-------|---------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1     | Σκοπός της διπλωματικής εργασίας.....                                                 | 57 |
| 2     | Υλικά – Μέθοδοι.....                                                                  | 58 |
| 2.1   | Επιλογή δείγματος.....                                                                | 58 |
| 2.2   | Έλεγχος γονοτυπικής αντοχής βάσει του πρωτοκόλλου Viroseq HIV-1 Genotypic System..... | 66 |
| 2.2.1 | Διαδικασία προετοιμασίας δειγμάτων.....                                               | 71 |
| 2.2.2 | Διαδικασίες που πρέπει να ρυθμιστούν πριν ξεκινήσουμε το πείραμα.....                 | 71 |
| 2.2.3 | Απομόνωση του ιικού RNA του HIV-1 (Extraction RNA)...                                 | 71 |

|        |                                                                                  |     |
|--------|----------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 2.2.4  | Διαδικασία αντίστροφης μεταγραφής - Reverse Transcription (RT).....              | 73  |
| 2.2.5  | Διαδικασίες που πρέπει να ρυθμιστούν πριν ξεκινήσουμε τη διαδικασία της RT.....  | 73  |
| 2.2.6  | Εκτέλεση διαδικασίας RT.....                                                     | 74  |
| 2.2.7  | Διαδικασία PCR.....                                                              | 75  |
| 2.2.8  | Διαδικασίες που πρέπει να ρυθμιστούν πριν ξεκινήσουμε τη διαδικασία της PCR..... | 76  |
| 2.2.9  | Διαδικασίες πραγματοποίηση της αντίδρασης PCR.....                               | 76  |
| 2.2.10 | Διαδικασία Exo- Sap.....                                                         | 77  |
| 2.2.11 | Διαδικασία Cycle Sequencing (Ακολουθία Κύκλων).....                              | 78  |
| 2.2.12 | Πήκτωμα<br>αγαρόζης(GEL).....                                                    | 78  |
| 2.2.13 | Ρύθμιση ακολουθίας κύκλων- Cycle Sequencing.....                                 | 79  |
| 3      | Αποτελέσματα.....                                                                | 84  |
| 4      | Συζήτηση αποτελεσμάτων.....                                                      | 129 |
| 5      | Συμπεράσματα-Προτάσεις.....                                                      | 131 |
|        | BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....                                                                | 135 |

## Πρόλογος

Τα τελευταία χρόνια τα ποσοστά θνησιμότητας λόγω επίκτητης ανοσολογικής ανεπάρκειας (*Acquired Immune Deficiency Syndrome – AIDS*) παρουσιάζουν σημαντική πτώση, και σε αυτό έχει συμβάλει σημαντικά η συνεχής πρόσβαση των ασθενών που έχουν μολυνθεί από τον ιό της ανθρώπινης ανοσοεπάρκειας (*Human Immunodeficiency Virus- HIV*) στην *αντιρετροϊκή θεραπεία* ( *Antiretroviral therapy - ART*). Σήμερα υπάρχουν αντιρετροϊκά φάρμακα υψηλής δραστηριότητας (*Highly Active Antiretroviral Therapy – HAART*) , πρόκειται για εξατομικευμένο συνδυασμό διαφορετικών κατηγοριών αντιρετροϊκών φαρμάκων τα οποία συνταγογραφεί ο γιατρός στον εκάστοτε ασθενή. Τα φάρμακα αυτά λαμβάνονται εφόρου ζωής από τον ασθενή που έχει μολυνθεί από τον ιό του HIV, καθώς ο ιός δεν μπορεί να εκριζωθεί από τον ανθρώπινο οργανισμό. Η σωστή συμμόρφωση του ασθενούς με την αγωγή μπορεί αφενός μεν να καθυστερήσει ή και να εμποδίσει την εμφάνιση συμπτωμάτων και του τελικού σταδίου της νόσου, αφετέρου δε, να καταστήσει το ιϊκό φορτίο μη ανιχνεύσιμο αποτρέποντας έτσι την περαιτέρω μετάδοσή του , η θεραπεία υψηλής δραστηριότητας έχει μετατρέψει μια πρώην θανατηφόρα ασθένεια σε μια χρόνια ασθένεια, με αποτέλεσμα η συμβολή της στη κλινική πράξη να είναι υψίστης σημασίας.

Ο ιός του HIV είναι μια πολύπλοκη νοσολογική οντότητα. Ο γρήγορος ρυθμός πολλαπλασιασμού του καθώς και η ανακολουθία στη λήψη της φαρμακευτικής αγωγής έχουν ως αποτέλεσμα τη δημιουργία μεταλλαγών οι οποίες μπορεί να προσδώσουν αντοχή στον ιό και να μειώσουν τη δραστηριότητα της HAART.

Για να προσδιοριστεί εάν ένα θεραπευτικό σχήμα είναι δραστικό, υπάρχουν δυο μέθοδοι προσδιορισμού της αντοχής στα αντιρετροϊκά φάρμακα, ο γονοτυπικός προσδιορισμός και ο φαινοτυπικός προσδιορισμός. Ο προσδιορισμός που χρησιμοποιείται περισσότερο στη κλινική πράξη είναι ο γονοτυπικός προσδιορισμός, επειδή όμως η εκτίμηση της γονοτυπικής αντοχής είναι δύσκολο να εκτιμηθεί από τον κλινικό γιατρό για αυτό αναπτύχθηκαν αλγόριθμοι ερμηνείας της αντοχής.

Οι αλγόριθμοι ερμηνείας γονοτυπικής αντοχής ακολουθούν διάφορους κανόνες και ανανεώνονται συνεχώς από έμπειρους εμπειρογνώμονες. Υπάρχουν αρκετοί διαθέσιμοι αλγόριθμοι στο διαδίκτυο που παρέχονται δωρεάν προς χρήση. Έχει παρατηρηθεί όμως πως οι αλγόριθμοι παρουσιάζουν κάποιες αποκλίσεις μεταξύ τους όσον αφορά την αντοχή των αντιρετροϊκών φαρμάκων. Για παράδειγμα ένας αλγόριθμος μπορεί να θεωρεί ένα φάρμακο ευαίσθητο ενώ ένας άλλος αλγόριθμός το ίδιο φάρμακο να το θεωρεί ανθεκτικό ή ενδιάμεσης ανθεκτικότητας.

Η παρούσα μελέτη εξετάζει τρεις διαφορετικούς αλγόριθμους και παρουσιάζει σε ποια σημεία τα αποτελέσματα που δίνουν συγκλίνουν και σε ποια σημεία τα αποτελέσματα αποκλίνουν, δηλαδή σε ποια αντιρετροϊκά φάρμακα οι τρεις αλγόριθμοι δίνουν κοινό αποτέλεσμα και σε ποια δίνουν διαφορετικό αποτέλεσμα.

## Εισαγωγή

Ο HIV (Human Immunodeficiency Virus – Ιός Ανοσοανεπάρκειας του Ανθρώπου) είναι ο ιός που προκαλεί το Σύνδρομο της Επίκτητης Ανοσολογικής Ανεπάρκειας (Acquired Immune Deficiency Syndrome – AIDS). Ο ιός HIV επιδρά στα CD4 T – λεμφοκύτταρα, του ανοσοποιητικού μας συστήματος, καταστρέφοντας ή βλάπτοντας τη λειτουργία του <sup>[1]</sup>, οδηγώντας προοδευτικά σε ανοσολογική ανεπάρκεια. Ο ιός HIV αποτελεί ένα σημαντικό μολυσματικό παράγοντα δημόσιας υγείας καθώς από την αρχή της επιδημίας μέχρι σήμερα περισσότεροι από 70 εκατομμύρια άνθρωποι έχουν μολυνθεί και περίπου 35 εκατομμύρια άνθρωποι έχουν χάσει τη ζωή τους <sup>[2]</sup>.

Η HIV λοίμωξη αποτελεί μια πολύπλοκη νοσολογική οντότητα καθώς μερικά από τα βασικά χαρακτηριστικά του ιού αυτού είναι: **α)** η γενετική ποικιλομορφία, **β)** ο γρήγορος ρυθμός δημιουργίας ιικών αντιγράφων **γ)** η συχνή εισαγωγή «λαθών» κατά τη διαδικασία της αντιγραφής που οδηγούν στην εμφάνιση μεταλλαγών και **δ)** η ικανότητα ανασυνδυασμού του ιού. Παρόλα αυτά από το 1985 που έγινε η παρουσίαση του AZT (zidovudine) ως το πρώτο αντιρετροϊκό φάρμακο, μέχρι σήμερα που έχουμε αντιρετροϊκά φάρμακα υψηλής δραστηριότητας, η πορεία της HIV λοίμωξης έχει τροποποιηθεί αρκετά, αυξάνοντας σημαντικά το ποσοστό επιβίωσης και την ποιότητα ζωής των ασθενών <sup>[3,4]</sup>. Τα αντιρετροϊκά φάρμακα που υπάρχουν μέχρι σήμερα μπορούν να χωριστούν σε τρεις βασικές κατηγορίες: **1)** Νουκλεοσιδικοί Αναστολείς Αντίστροφης μεταγραφάσης NRTIs, **2)** Μη Νουκλεοσιδικοί Αναστολείς Αντίστροφης μεταγραφάσης NNRTIs, **3)** Αναστολείς Πρωτεάσης PIs, Αναστολείς Εισόδου EI <sup>[3,4]</sup>

Ο ιός HIV λόγω της γενετικής ετερογένειας που παρουσιάζει έχει την ικανότητα να αναπτύσσει αντοχή στα αντιρετροϊκά φάρμακα είτε in vitro είτε in vivo, δηλαδή ο ιός HIV αναπτύσσοντας αντοχή στα αντιρετροϊκά φάρμακα, πολλαπλασιάζεται παρουσία ικανής συγκέντρωσης φαρμάκου. Η ικανότητα του ιού να αναπτύσσει αντοχή είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με την εμφάνιση μεταλλάξεων στα γονίδια που κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες στόχους και που

κατ' επέκταση οδηγούν σε αντίστοιχες αλλαγές σε αμινοξέα. Η συσχέτιση αυτών των μεταλλάξεων με την ανταπόκριση του ασθενούς στην εκάστοτε χορηγούμενη θεραπεία τις περισσότερες φορές είναι αρκετά δύσκολο να εκτιμηθεί, καθιστώντας την ερμηνεία των αποτελεσμάτων της γονοτυπικής αντοχής σε αντιρετροϊκά φάρμακα τον κυριότερο περιορισμό, καθώς λίγοι κλινικοί γιατροί είναι ικανοί να συνειδητοποιήσουν την κλινική σημασία κάθε μετάλλαξης ανθεκτικότητας σε φάρμακο <sup>[5]</sup>. Υπάρχουν πολλές μεταλλάξεις που σχετίζονται με την ανάπτυξη αντοχής στα φάρμακα, οι οποίες μπορούν να δρουν συνεργιστικά ή ανταγωνιστικά μεταξύ τους. Εν κατακλείδι, μερικές μεταλλάξεις μπορεί να μην μειώνουν την ευαισθησία από μόνες τους, αλλά μπορούν να αντισταθμίζουν την επίδραση άλλων μεταλλάξεων ή μπορεί να είναι δείκτες εμφάνισης αντοχής στα φάρμακα <sup>[6]</sup>. Ο περιορισμός αυτός δημιούργησε εύφορο έδαφος για τη δημιουργία αλγορίθμων ερμηνείας της γονοτυπικής αντοχής, οι οποίοι βασίζονται τόσο σε βιβλιογραφικά δεδομένα όσο και σε κλινικές μελέτες και ενημερώνουν συνεχώς τους αλγόριθμους αυτούς με νέα δεδομένα.

Η συνεχής ενημέρωση και ανανέωση των αλγορίθμων είναι πολύ σημαντική καθώς αναπτύσσονται συνεχώς νέα φάρμακα και προκύπτουν νέα δεδομένα μεταλλάξεων αντοχής. Οι αλγόριθμοι αυτοί χρησιμοποιούν αλληλουχίες από τις περιοχές της πρωτεάσης, της αντίστροφης μεταγραφάσης και της γλυκοπρωτεΐνης gp41 για να εκτιμήσουν τα επίπεδα αντοχής και την ανταπόκριση στη θεραπεία. Η εκτίμηση γίνεται με τη χρήση κάποιων κανόνων και πινάκων μέσω διαδικτυακών προγραμμάτων (πχ ANRS και REGA) ή κανόνων που είναι ενσωματωμένοι στο λογισμικό (software) κάποιας εμπορικά διαθέσιμης μεθόδου (πχ Viroseq). Οι ερμηνείες της αντοχής των φαρμάκων ταξινομούνται ως (S-sensitive) για ευαίσθητα, (I-intermittent) για ενδιάμεσα και (R-resistant) για ανθεκτικά <sup>[7]</sup>. Ο έλεγχος της γονοτυπικής αντοχής αποτελεί πολύτιμο εργαλείο για την ανίχνευση της μεταδιδόμενης αντοχής φαρμάκου, παρέχει πληροφορίες για τους λόγους της ιολογικής αποτυχίας στους ασθενείς που έχουν υποβληθεί σε θεραπεία και βοηθά στη επιλογή θεραπείας δεύτερης γραμμής. Η επιλογή του κατάλληλου αλγόριθμου για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων της γονοτυπικής αντοχής

είναι σημαντική για την επιλογή της κατάλληλης αντιρετροϊκής θεραπείας που θα δοθεί τελικά στον ασθενή.

Η μελέτη αποσκοπεί στο προσδιορισμό και στη σύγκριση τριών αλγορίθμων ερμηνείας γονοτυπικής αντοχής Rega, ANRS και Viroseq. Οι τρεις αυτοί αλγόριθμοι χρησιμοποιούνται στη κλινική πρακτική για την πρόβλεψη της ανθεκτικότητας των αντιρετροϊκών φαρμάκων. Οι αλγόριθμοι όμως υπακούουν συχνά σε διαφορετικούς κανόνες και παρουσιάζουν διαφορετικές βαθμολογίες γονοτυπικής ευαισθησίας (GSS- Genotypic Susceptibility Score) με αποτέλεσμα να εμφανίζονται αποκλίσεις στα αποτελέσματα που δίνουν κάθε φορά. Με την μελέτη μας μέσω της σύγκρισης των αλγορίθμων θα δούμε σε ποια σημεία συγκλίνουν και σε ποια σημεία αποκλίνουν οι αλγόριθμοι ANRS, REGA και VIROSEQ. Η μελέτη αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί για μελλοντικές συγκρίσεις αλλά και να βοηθήσει τους κλινικούς γιατρούς στην αποτελεσματικότερη ερμηνεία της γονοτυπικής αντοχής.

Η συγκριτική αξιολόγηση μεταξύ των αλγορίθμων REGA, ANRS και VIROSEQ πραγματοποιήθηκε με τη χρήση 120 αλληλουχιών. Η επιλογή των ασθενών ήταν τυχαία καθώς χρησιμοποιήθηκαν δείγματα των 120 πρώτων ασθενών που στάλθηκαν από τα νοσοκομεία της Αθήνας αλλά και της επαρχίας για εξέταση γονοτυπικής αντοχής στο Εθνικό Κέντρο Αναφοράς Ρετροϊών, του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών. Τα δείγματα των ασθενών αναλύθηκαν με τη μέθοδο γονοτυπικής αντοχής Viroseq™ (Abbott Diagnostics, Illinois USA) και στη συνέχεια οι αλληλουχίες πέρασαν από τον αλγόριθμο Rega, ο οποίος αποτελεί και τον πρώτο αλγόριθμο που έχει αξιολογηθεί κλινικά και τον αλγόριθμο ANRS.

Ο αλγόριθμος Rega είναι διαθέσιμος από τον διαδικτυακό τόπο της βάσης δεδομένων HIV του Stanford, από το διαδικτυακό τόπο της Advance Biological Laboratories και από το διαδικτυακό τόπο της ομάδας Aevir. Ενώ ο αλγόριθμος ANRS είναι διαθέσιμος από τον διαδικτυακό τόπο του Stanford, του German Aevir Hiv-Grade και του MPGenotype <sup>[7]</sup>. Στη συνέχεια, για την ανάλυση και την επεξεργασία των δεδομένων χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πρόγραμμα SPSS.

Αξίζει να σημειωθεί πως οι τρεις βαθμολογούνται σε τρία επίπεδα ανθεκτικότητας, ευαίσθητοι (S), ενδιάμεσα ανθεκτικοί (I) και ανθεκτικοί (R) και οι ερμηνείες τους θα θεωρηθούν σύμφωνες με ένα συγκεκριμένο φάρμακο όταν οι τρεις αλγόριθμοι αποδίδουν το ίδιο επίπεδο αντοχής (S, I ή R) σε μια δεδομένη ακολουθία, ενώ οι ερμηνείες θα θεωρηθούν ως ασύμβατες όταν τουλάχιστον ένας από τους τρεις αλγορίθμους αποδίδει διαφορετικό επίπεδο αντίστασης (όλους τους πιθανούς συνδυασμούς SSI, SSR, IIS, IIR, RRS, RRI και SIR) [8].

Στη στατιστική ανάλυση θα πραγματοποιηθεί σύγκριση και ανά ζεύγη αλγορίθμων (ANRS vs REGA, ANRS vs Viroseq, REGA vs Viroseq), έλεγχος ανεξαρτησίας McNemar για εξαρτημένα δείγματα και θα υπολογιστεί ο λόγος Kappa για να ποσοτικοποιηθεί ο βαθμός συμφωνίας των τριών αυτών αλγορίθμων. Η στατιστική ανάλυση θα βοηθήσει στο να αποτυπωθούν στο τέλος της εργασίας τα συμπεράσματα της μελέτης αλλά και για να καταγραφούν προτάσεις για μελλοντική μελέτη.

## Περίληψη

**Εισαγωγή:** Ο ιός του HIV λόγω της γενετικής ετερογένειας που παρουσιάζει έχει την ικανότητα να αναπτύσσει αντοχή στα αντιρετροϊκά φάρμακα. Η ικανότητα του αυτή είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με την εμφάνιση μεταλλάξεων στα γονίδια, που κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες στόχους. Η συσχέτιση των μεταλλάξεων αυτών με την ανταπόκριση του ασθενούς στην εκάστοτε χορηγούμενη θεραπεία τις περισσότερες φορές είναι αρκετά δύσκολο να εκτιμηθεί, καθιστώντας την ερμηνεία των αποτελεσμάτων της γονοτυπικής αντοχής σε αντιρετροϊκά φάρμακα τον κυριότερο περιορισμό. Λόγω αυτού του περιορισμού δημιουργήθηκαν ομάδες αλγορίθμων ερμηνείας γονοτυπικής αντοχής, οι οποίοι βασίζονται τόσο σε βιβλιογραφικά δεδομένα όσο και σε κλινικές μελέτες.

**Σκοπός:** Σκοπός της μελέτης είναι η εκτίμηση και η σύγκριση των επιπέδων αντοχής και της ανταπόκρισης στην αντιρετροϊκή θεραπεία μέσω τριών διαθέσιμων αλγορίθμων, του REGA, του ANRS και του ιδιόκτητου αλγόριθμου της εμπορικά διαθέσιμης βάσης VIROSEQ.

**Υλικά- Μέθοδος:** Δεδομένα γονοτυπικής αντοχής από 120 ασθενείς με HIV-1 λοίμωξη ερμηνεύτηκαν για 19 αντιρετροϊκά φάρμακα με 3 αλγόριθμους.

**Αποτελέσματα:** Οι 3 αλγόριθμοι παρουσίασαν απόλυτη συμφωνία σε 2 από τα 19 φάρμακα που μελετήθηκαν: lamivudine (3TC) και emtricitabine (FTC). Στα υπόλοιπα φάρμακα παρουσιάστηκαν αποκλίσεις. Κατά τις ζευγαρώδεις συγκρίσεις οι αλγόριθμοι REGA και VIROSEQ παρουσίασαν τον υψηλότερο δείκτη συμφωνίας Kappa ( $K=0,701$ ). Επιπρόσθετα, όσον αφορά τις κατηγορίες των αντιρετροϊκών φαρμάκων, χαμηλότερη συμφωνία παρατηρείται στους περισσότερους αναστολείς πρωτεάσης (PIs), ενώ καλύτερη συμφωνία παρατηρείται Νουκλεοσιδικούς Αναστολείς Ανάστροφης μεταγραφάσης (NRTIs).

**Συμπεράσματα:** Μέσα από την εργασία αναδεικνύεται η δυσκολία της ερμηνείας των αποτελεσμάτων του γονότυπου, καθιστώντας επιτακτική τη ανάγκη για επικαιροποίηση των αλγορίθμων αλλά και αποδοχή τους για κοινή ερμηνεία των γονοτυπικών αποτελεσμάτων.

## **Abstract**

**Introduction:** The HIV virus due to the genetic heterogeneity presents the ability to develop resistance to antiretroviral drugs. This ability is perfectly linked to the appearance of mutations in the genes encoding the target proteins. The correlation of these mutations with the patient's response to treatment is often quite difficult to assess, making the interpretation of genotypic resistance results in antiretroviral drugs the major limitation. Due to this limitation, groups of genotypic resistance interpretation algorithms have been created based on both bibliographic data and clinical studies.

**Objective:** The aim of the study is to evaluate and compare resistance levels and response to antiretroviral therapy through three available algorithms, REGA, ANRS and the proprietary algorithm of the commercially available VIROSEQ database.

**Methods:** Genotypic resistance data from 120 HIV-1 infection patients were interpreted for 19 antiretroviral drugs with 3 algorithms.

**Results:** Complete concordant results among the 3 algorithms for all the drugs studied were found in 2/19 drugs: lamivudine (3TC) and emtricitabine (FTC). The rest medicines presented discrepancies. In pair-wise comparisons the REGA and VIROSEQ algorithms showed the highest Cohen's Kappa agreement ( $K = 0.701$ ). In addition, low concordance in interpretation was observed for more protease inhibitors (PIs), while results agreed highly for reverse transcriptase inhibitors (NRTIs).

**Conclusions:** This work demonstrates the difficulty of interpreting the results of the genotype, making it imperative to update the algorithms. In addition, the scientific community is needed to achieve a consensus for the interpretation of genotypic data.

# Μέρος 1<sup>ο</sup>

## 1. Ο ιός της ανθρώπινης ανοσοεπάρκειας (HIV- Human Immunodeficiency Virus) ιστορική αναδρομή

Σύμφωνα με τα μέχρι τώρα δεδομένα και τις υπάρχουσες γνώσεις, η διάδοση του ιού του HIV ξεκίνησε από τις αρχές του 20<sup>ου</sup> αιώνα <sup>[9]</sup>. Η μετάδοση του SIVcpz από τους χιμπατζήδες (Pan troglodytes troglodytes) παρουσιάστηκε για την ομάδα M και O του HIV-1 γύρω στο 1920 και για την ομάδα N του HIV-1 γύρω το 1960 στη Δυτική Κεντρική Αφρική. Ο ιός HIV-2 από το sooty mangabey (Cercopithecus atys) μεταδόθηκε στον άνθρωπο στη Δυτική Αφρική γύρω στο 1940. Μοριακές γενετικές αναλύσεις υποδεικνύουν ότι το HIV-1 εξήχθη στην Αϊτή πιθανότατα το 1966 και έφτασε στη Βόρεια Αμερική περίπου 2 χρόνια αργότερα <sup>[9]</sup>. Από τα μέσα του 1980 έχουν εξαπλωθεί διάφοροι υπότυποι της ομάδας M του HIV-1, οδηγώντας σε παγκόσμια πανδημία. Ο HIV-2 σε αντίθεση με τον HIV-1 δεν ξεπέρασε αρχικά τα όρια της Δυτικής Αφρικής, επειδή παρουσιάζει πολύ χαμηλή μολυσματικότητα. Ο ιός μόλις ξεπέρασε τα γεωγραφικά όρια της Δυτικής Αφρικής και έφτασε στη Πορτογαλία και τη Γαλλία στα μέσα της δεκαετίας του 1960, τεκμηριώθηκε πως η εξάπλωση του HIV-2 παρουσιάζει χαμηλό επιπολασμό, κυρίως στην Ευρώπη, τη Νότια Αμερική και την Ασία <sup>[10]</sup>.

Εκτιμάται πως 36,9 εκατομμύρια άνθρωποι ζουν με τον ιό του HIV παγκοσμίως, από τους οποίους 35,1 εκατομμύρια είναι ενήλικες, 18,2 εκατομμύρια γυναίκες ηλικίας 15+ ετών και 1,8 εκατομμύρια παιδιά <15 ετών. Σήμερα σε παγκόσμιο επίπεδο 3 στους 4 που ζουν με τον ιό του HIV γνωρίζουν την κατάστασή τους και 21,7 εκατομμύρια άνθρωποι βρίσκονται σε θεραπεία, λαμβάνοντας αντιρετροϊκή αγωγή. Από το 1999 ο αριθμός των νέων λοιμώξεων μειώνεται συνεχώς με απότοκο το 2017 τα νεοδιαγνωσθέντα περιστατικά να υπολογίζονται στα 1,8 εκατομμύρια. Επιπρόσθετα αξίζει να σημειωθεί πως χάρη στη συνεχή πρόσβαση στην αντιρετροϊκή θεραπεία οι θάνατοι που σχετίζονται με το AIDS έχουν μειωθεί κατά πολύ μεγάλο

ποσοστό, με λιγότερο από 1 εκατομμύριο άτομα να πεθαίνουν κάθε χρόνο από ασθένειες που σχετίζονται με το AIDS [11] .

### **1.1. Χαρακτηριστικά του HIV (Human Immunodeficiency Virus)**

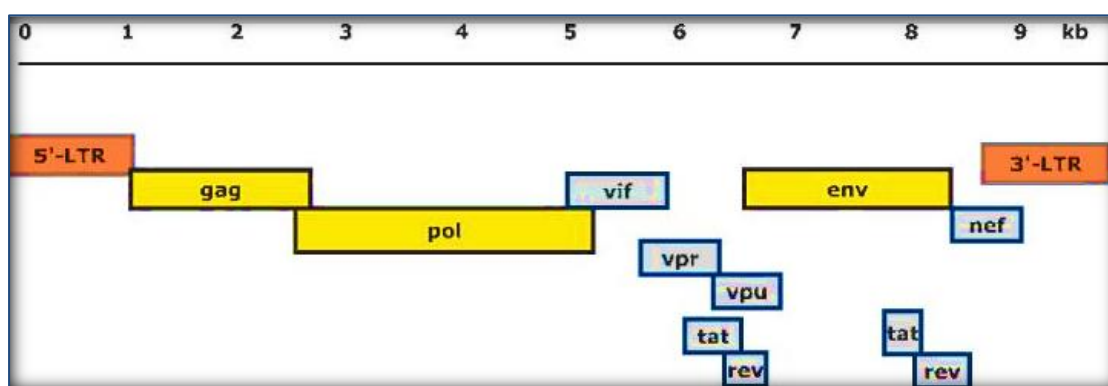
Ο ιός ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας HIV (Human Immunodeficiency Virus), ομαδοποιείται στο γένος Lentivirus στην οικογένεια Retroviridae, υποοικογένεια των Orthoretrovirinae . Με βάση τα γενετικά χαρακτηριστικά και τις διαφορές στα ιικά αντιγόνα, ο HIV ταξινομείται στους τύπους 1 και 2 (HIV-1, HIV-2). Οι ιοί ανοσοανεπάρκειας μη ανθρωπίνων πρωτεύοντων όπως ο ιός ανοσοανεπάρκειας του πιθήκου SIV (simian immunodeficiency virus) ομαδοποιούνται επίσης στο γένος Lentivirus. Οι επιδημιολογικές και φυλογενετικές αναλύσεις που είναι διαθέσιμες σήμερα υποδηλώνουν ότι ο HIV εισήχθη στον ανθρώπινο πληθυσμό από το 1920 έως το 1940. Στοιχεία επίσης δείχνουν πως προγονικά είδη του SIV και του HIV πέρασαν από πρωτεύοντα είδη στον άνθρωπο περίπου επτά φορές στο παρελθόν. Αξίζει να σημειωθεί πως ο P.Troglodytes είναι πηγή του HIV-1, ενώ ο sooty mangabey είναι πηγή του HIV-2 [10] .

### **1.2 Δομή γονιδιώματος HIV-1**

Το γονιδίωμα του HIV περιέχει τα τυπικά ρετροϊκά γονίδια gag, pol και env που πλευρίζονται από μακρές επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες ( long terminal repeats, LTRs), οι οποίες περιέχουν τον ιικό προαγωγό (viral promoter). Το καψίδιο (core) βρίσκεται στο εσωτερικό περίβλημα (matrix) και περιέχει τα ένζυμα του ιού, δηλ. την αντίστροφη μεταγραφάση (reverse transcriptase, RT) , την πρωτεάση (protease ,PR) και την ιντεγκράση (integrase, IN) . Επιπλέον, ο ιός HIV έχει έξι ρυθμιστικά γονίδια (tat, rev, nef, vif, vpr, and vpu) και θεωρείται ότι είναι "πολύπλοκος" ρετροϊός. Ο HIV-1 ανήκει στο Lentivirusgenus (lentis = αργός) της οικογένειας Retroviridae. Το βιρίον( σωματίδιο του ιού μαζί με το περίβλημα) έχει σφαιρικό σχήμα και διάμετρο 100-130nm (ή 1 / 10.000mm). Ο ιικός φάκελος αποτελείται από μια

λιπιδική μεμβράνη, η οποία προέρχεται από το κύτταρο ξενιστή και περιέχει κυτταρικές πρωτεΐνες, καθώς και περίπου 7-12 τριμερή σύμπλοκα πρωτεΐνης ιικού περιβλήματος (envelop protein Env). Το Env αποτελείται από την εξωτερική γλυκοπρωτεΐνη 120 (gp120) που μεσολαβεί στην προσκόλληση του ιού και τη διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη 41 (gp41) που είναι κρίσιμη για τη σύντηξη του ιού [10].

Το γονιδίωμα του HIV αποτελείται από δύο ταυτόσημα μόρια μονόκλωνου RNA τα οποία περικλείονται εντός του πυρήνα του σωματιδίου του ιού. Το γονιδίωμα του πρώιμου HIV, επίσης γνωστό ως προιμικό DNA δημιουργείται από την αντίστροφη μεταγραφή του ιικού γονιδιώματος του RNA σε DNA, την αποικοδόμηση του RNA και την ενσωμάτωση του διπλού κλώνου HIV στο DNA του ανθρώπινου γονιδιώματος. Το γονιδίωμα του DNA πλευρίζεται και στα δύο άκρα με μακρές επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες (long terminal repeats, LTRs) **(Εικόνα:1)**. Η περιοχή 5' LTR κωδικοποιεί τον υποκινητή για τη μεταγραφή των ιικών γονιδίων. Το πλαίσιο ανάγνωσης του γονιδίου gag, που κωδικοποιεί τις πρωτεΐνες της εξωτερικής μεμβράνης του πυρήνα (MA, p17), την καψιδική πρωτεΐνη (CA, p24), το νουκλεοκαψίδιο (NC, p7) και τη πρωτεΐνη σταθεροποίησης νουκλεϊκού οξέος ακολουθείται στη κατεύθυνση 5' προς 3' [10].



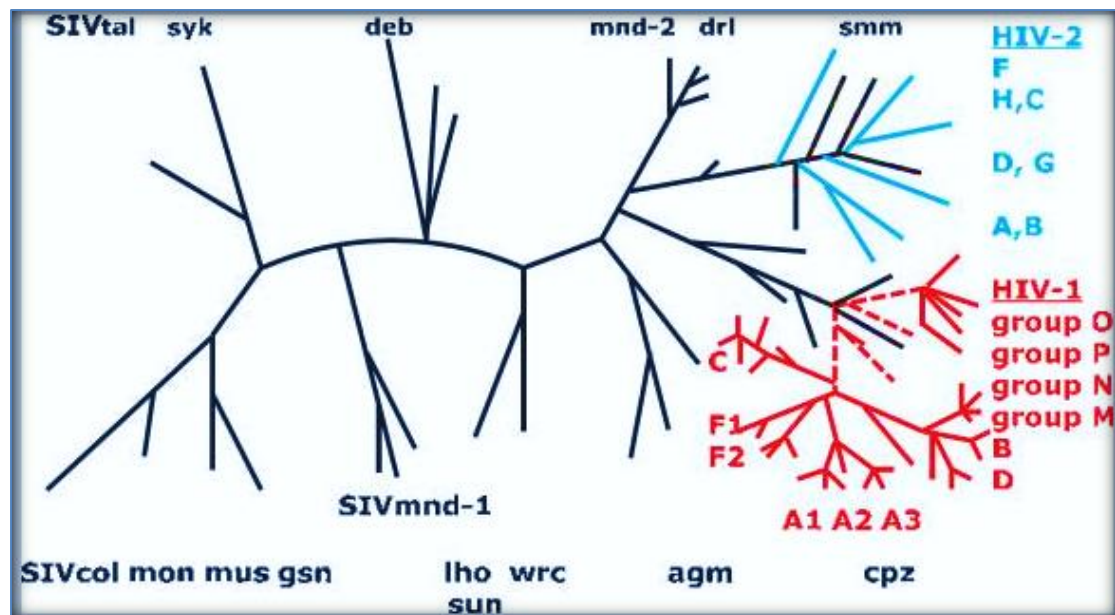
**Εικόνα 1:** Δομή και οργάνωση του γονιδιώματος του HIV-1. Παρουσιάζονται τα πλαίσια ανάγνωσης των γονιδίων που κωδικοποιούν δομικές και ρυθμιστικές πρωτεΐνες : LTR (long terminal repeat) = μακρά επανάληψη τερματικού, gag (group-specific antigen) = ομάδα-ειδικό αντιγόνο, pol (polymerase) = πολυμεράση, env (envelope) = φάκελος. Στην περίπτωση των ρυθμιστικών γονιδίων, οι πρωτεΐνες tat και rev συντίθενται από δύο περιοχές γονιδίων. Στο

HIV-2, η νρχ αντιστοιχεί στο γονίδιο νρυ. Οι 5 'και 3' αλληλουχίες νουκλεϊκού οξέος LTR δεν μεταφράζονται σε πρωτεΐνη. Το γονιδίωμα αποτελείται από 9,200-9,600 νουκλεοτίδια στην περίπτωση του HIV-1 και περίπου 9,800 νουκλεοτίδια στην περίπτωση του HIV-2 <sup>[10]</sup>.

### **1.3. Ομάδες και υποτύποι του HIV-1**

Ο HIV-1 υποδιαιρείται στις ομάδες M, N, O και P <sup>[12,13]</sup>. Με βάση τη φυλογενετική ανάλυση (**Εικόνα:2**), διάφοροι ιοί που προέρχονται από το χιμπατζή μπορούν να διανεμηθούν μεταξύ των ομάδων N και O των ανθρώπων και του SIV των γορίλλων (SIVgor) στην ομάδα P. Δεν έχει διευκρινιστεί ακόμη αν ο ιός της ομάδας P μεταδόθηκε στον άνθρωπο απευθείας από τον χιμπατζή ή από τον γορίλα. Οι ιοί της ομάδας M του HIV-1 υποδιαιρούνται σε υποτύπους A έως D, F έως H, J και K. Οι ομάδες A και D φαίνεται να είναι οι παλαιότεροι ιοί, ενώ οι υποτύποι B και D σχετίζονται πολύ στενά και ως εκ τούτου θεωρούνται υπο-υποτύποι. Ο ανασυνδυασμένος ιός HIV προέρχεται από διάφορους υποτύπους και ονομάζεται κυκλοφορούσα ανασυνδυασμένη μορφή CRF (circulating recombinant form). Περίπου 20% των ιών της ομάδας M ανήκουν σε αυτούς τους ιούς <sup>[14]</sup>.

Η ανταλλαγή ολόκληρων γονιδιακών αλληλουχιών σε μη επιλεγμένες θέσεις, παρατηρείται όταν ένα κύτταρο στόχος μολύνεται με δύο διαφορετικούς υποτύπους HIV, το φαινόμενο αυτό ονομάζεται ανασυνδιασμός. Στατιστικά, περίπου 1 στα 400 πρόσφατα παραγόμενα σωματίδια του ιού είναι ανασυνδυασμένα. Τα γενετικά νέα στελέχη του ιού αναπτύσσονται με ανασυνδυασμό που μπορεί να έχει ένα πλεονέκτημα επιλογής εντός του ξενιστή, όπως το HIV-1M: A / G (ονομαζόμενο CRF02\_AG) στη Δυτική Αφρική και το B / C (CRF07\_BC και CRF08\_BC) στην Κίνα <sup>[10]</sup>.



**Εικόνα 2:** Φυλογενετικό δέντρο των ανθρώπινων και των πιθηκοειδών Lentiviruses χρησιμοποιώντας την ανάλυση μιας ροί περιοχής των Lentiviruses. Στη δεξιά πλευρά (με κόκκινο χρώμα) εμφανίζεται ο HIV-1 με τις ομάδες M, N, O και P (διακεκομμένες γραμμές). Η διακλάδωση εντός των ομάδων M και O υποδεικνύει τους διάφορους υποτύπους. Οι ομάδες N και P δεν μπορούν να διαφοροποιηθούν σε υποτύπους. Ο HIV-1 έχει αναπτυχθεί από τη μετάδοση διαφόρων ιών ανοσολογικής ανεπάρκειας (SIVcpz) που προέρχονται από χιμπατζήδες που ανήκουν στους Pan troglodytes troglodytes troglodytes (κεντρικός χιμπατζής) αλλά όχι από τον Pan troglodytes schweinfurthii (ανατολικός χιμπατζής). Ο SIVgor των γορίλλων (Gorilla gorilla) ομαδοποιείται φυλογενετικά με την ομάδα HIV-1 P και συνεπώς δεν παρατίθεται. Ο HIV-2 και οι ομάδες του A έως H (σε μπλε χρώμα) συμπίπτουν φυλογενετικά με τους ιούς της ανοσοανεπάρκειας του mangabey (smm = maoty magabey sooty). Ο χαρακτηρισμός πρόσθετων SIVs: mnd = Mandril, dri = Drill, col = colobus monkeys, gsn = greater spot nosed monkey, mon = Mona monkey, mus = Moustached gueneon, deb = De Brazza's monkey, lho = group of L'hoesti monkeys, sun = sun tailed monkey, syk = Sykes monkeys, tal = talapoin, wrc = western red colobus, agm = African green monkey<sup>[10]</sup>.

#### 1.4. Κύκλος αναδιπλασιασμού του ιού HIV-1

Ο ιός του HIV ακολουθεί επτά συγκεκριμένα στάδια ώστε να επιτευχθεί ο αναδιπλασιασμός του. Τα στάδια αυτά καταγράφονται παρακάτω με τη σειρά που λαμβάνουν χώρα<sup>[15]</sup>:

1. Είσοδος (virus entry) και δέσμευση (binding or attachment) του ιού στο κύτταρο
2. Τη σύντηξη (fusion) του DNA
3. Την αντίστροφη μεταγραφή (reverse transcription) των ιικών γονιδίων

4. Την ενσωμάτωση (integration) στο χρωμοσωμικό DNA του κυττάρου
5. Την αναπαραγωγή (replication)
6. Τη συγκρότηση (assembly)
7. Την εκβλάστηση (budding) του ιικού σωματιδίου από το κύτταρο

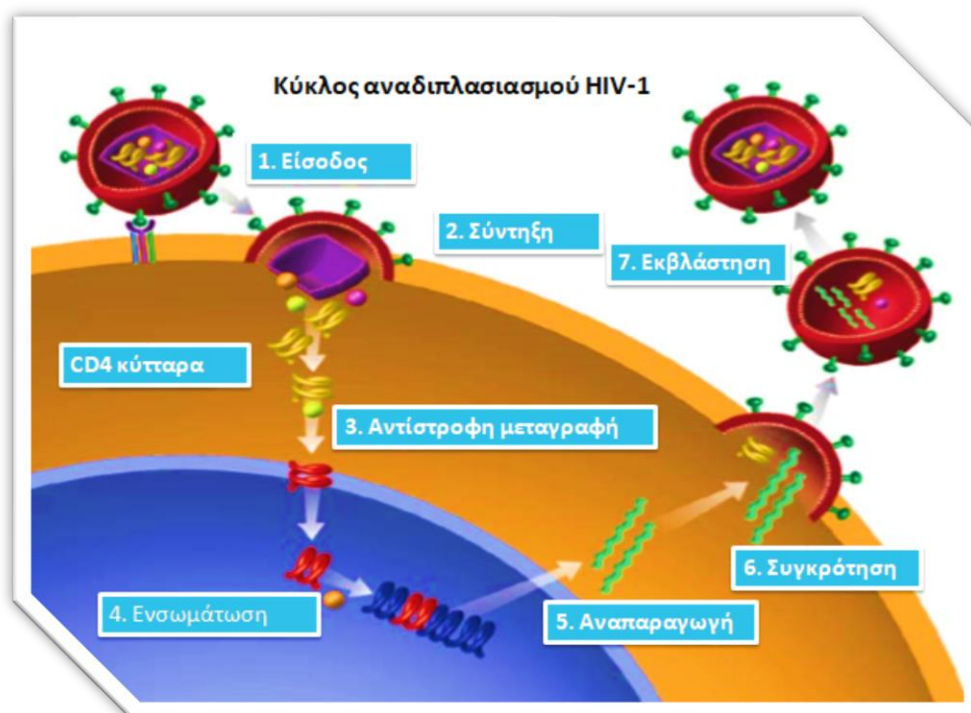
Ο HIV χρησιμοποιεί CD4 T- λεμφοκύτταρα για να αναπαραχθεί, και με τη σειρά του κάθε μολυσμένο κύτταρο CD4 παράγει εκατοντάδες νέα αντίγραφα νέων σωματιδίων HIV. Κάθε κύκλος αναπαραγωγής διαρκεί 1 έως 2 ημέρες. Έχει διάφορα στάδια (**Εικόνα: 3**) όπως αναφέραμε παραπάνω και κάθε φορά άλλα φάρμακα έναντι του ιού του HIV είναι ενεργά στα διάφορα στάδια. Αξίζει να σημειώσουμε πως τα φάρμακα για τον HIV ονομάζονται αναστολείς επειδή αναστέλλουν ή σταματούν τμήματα του κύκλου. Ο ιός HIV πρέπει αρχικά να συνδεθεί με ένα κύτταρο CD4, εκεί οι πρωτεΐνες στην εξωτερική επιφάνεια του HIV οι οποίες ονομάζονται gp41 και gp120 συνδέονται με υποδοχείς της επιφάνειας του κυττάρου CD4 ( CD4 και CCR5). Τα φάρμακα για το HIV που εμποδίζουν αυτή τη διαδικασία ονομάζονται αναστολείς εισόδου. Αυτή η οικογένεια φαρμάκων αποκλείει την προσκόλληση των πρωτεϊνών gp41 ή gp120 στον υποδοχέα CD4 ή αποκλείει τον υποδοχέα CCR5 <sup>[16]</sup>.

Τα μονοκλωνικά αντισώματα (Monoclonal antibodies mAbs) μπορούν επίσης να μπλοκάρουν αυτό το στάδιο. Μετά την προσκόλληση του HIV στο κύτταρο CD4, ο ιός απορροφάται στο κύριο σώμα του κυττάρου. Καθώς αυτό συμβαίνει, ο ιός HIV πρώτα χάνει το εξωτερικό του κέλυφος. Αυτό αφήνει ιικό καψίδιο με HIV και τρία βασικά ένζυμα (PR,RT, IN) που χρησιμοποιεί ο HIV για την αναπαραγωγή του. Το πρώτο ένζυμο είναι η αντίστροφη μεταγραφάση ( reverse transcriptase, RT). Η RT μεταβάλλει το μονόκλωνο RNA του HIV σε δίκλωνο ,για να ταιριάζει με το ανθρώπινο DNA. Υπάρχουν δύο διαφορετικοί τύποι αναστολέων RT, οι RTIs που εμποδίζουν αυτή τη διαδικασία είναι (i) οι νουκλεοσιδικοί αναστολείς (nucleoside/tide, NRTIs / NtRTIs) και (ii) μη νουκλεοσιπιδικοί αναστολείς (non-nucleoside , NNRTIs) <sup>[16]</sup>.

Ο νέος δίκλωνος HIV ιός διασχίζει τον κεντρικό πυρήνα του κυττάρου CD4, όπου ο ιός HIV είναι ενσωματωμένος στο ανθρώπινο DNA. Τα

Φάρμακα που εμποδίζουν αυτή τη διαδικασία ονομάζονται αναστολείς ιντεγκράσης, (integrase inhibitors, INIs ή INSTI). Ο πυρήνας των CD4 κυττάρων αρχίζει στη συνέχεια να παράγει πρώτες ύλες για να δημιουργήσει νέο ιό HIV. Αυτά τα μακρά σκέλη των νέων σωματιδίων του HIV πρέπει να κοπούν και να συναρμολογηθούν ώστε να δημιουργηθεί νέος ιός. Το ένζυμο που εμπλέκεται στη διαδικασία κοπής και συναρμολόγησης καλείται πρωτεάση. Τα φάρμακα HIV που εμποδίζουν αυτή τη διαδικασία ονομάζονται αναστολείς πρωτεάσης (protease inhibitors, PIs). Ο νεοσχηματισμένος ιός πρέπει στη συνέχεια να εγκαταλείψει το κύττρο. Παρόλο που δεν υπάρχουν επί του παρόντος φάρμακα για το HIV που εμποδίζουν το στάδιο αυτό, πολλά φάρμακα βρίσκονται σε εξέλιξη. Οι αναστολείς εκβλάστησης (Budding inhibitors ) σταματούν τον νέο HIV ιό από την απομάκρυνση του κυττάρου CD4. Οι αναστολείς ωρίμανσης (Maturation inhibitors) εμποδίζουν την τελική διαδικασία συναρμολόγησης <sup>[16]</sup>.

Σωματίδια του ιού μαζί με το περίβλημά του, που καλούνται βιριόλια (virions) συνεχίζουν να μολύνουν νέα κύτταρα CD4 και επαναλαμβάνουν ξανά τη διαδικασία μολύνοντας νέα κύτταρα, μέχρι το παλιό κύτταρο CD4 να πεθαίνει. Αυτή η συνεχής διαδικασία συμβαίνει εκατομμύρια φορές κάθε μέρα όταν ο ασθενής δεν ακολουθεί κάποια αντιρετροϊκή αγωγή (Antiretroviral Therapy, ART), καθώς χωρίς αντιρετροϊκή αγωγή, ο ιός του HIV είναι ένας από τους πιο ενεργούς και ταχέως αναπαραγωγικούς ιούς <sup>[16]</sup>.



**Εικόνα 3:** Κύκλος (ζωής) αναδιπλασιασμού HIV-1: 1. Είσοδος (virus entry) και δέσμευση (binding or attachment) του ιού στο κύτταρο, 2. σύντηξη (fusion) του DNA, 3. αντίστροφη μεταγραφή (reverse transcription) των ιικών γονιδίων, 4. ενσωμάτωση (integration) στο χρωμοσωμικό DNA του κυττάρου, 5. αναπαραγωγή (replication), 6. συγκρότηση (assembly), 7. εκβλάστηση (budding) του ιικού σωματιδίου από το κύτταρο <sup>[16]</sup>.

## 2. Αντιρετροϊκή Θεραπεία (Antiretroviral Therapy - ART)

### 2.1. Αντιρετροϊκά. Φάρμακα (Antiretrovirals-ARVs)

Η τυποποιημένη αντιρετροϊκή θεραπεία (ART) αποτελείται από το συνδυασμό αντιρετροϊκών φαρμάκων (ARV) για την μέγιστη καταστολή του ιού HIV και τη διακοπή της εξέλιξης της νόσου. Η ART εμποδίζει επίσης τη μετάδοση του ιού του HIV. Έχουν παρατηρηθεί τεράστιες μειώσεις στα ποσοστά επίπτωσης και θνησιμότητας όταν γίνεται χρήση ισχυρής αντιρετροϊκής θεραπευτικής αγωγής ARV, ιδιαίτερα σε πρώιμα στάδια της νόσου. Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας ( ΠΟΥ) συστήνει αντιρετροϊκή θεραπεία για όλα τα άτομα με HIV λοίμωξη όσο το δυνατόν συντομότερα μετά

τη διάγνωση χωρίς περιορισμούς στον αριθμό των CD4. Επίσης, συνιστά την παροχή προφύλαξης πριν από την έκθεση (PrEP – Pre Exposure Prophylaxis) και μετά από πιθανή έκθεση στον ιό εντός 72 ωρών (PEP- Post Exposure Prophylaxis) σε άτομα που διατρέχουν μεγάλο κίνδυνο μόλυνσης από τον ιό HIV ως πρόσθετη επιλογή πρόληψης και ως μέρος της συνολικής πρόληψης [3, 4, 17] .

Οι διαθέσιμες κατηγορίες φαρμάκων που δρουν κατασταλτικά στα διάφορα στάδια του αναπαραγωγικού κύκλου ζωής του ιού του HIV, είναι έξι. Συγκεκριμένα υπάρχουν 24 φάρμακα ARV σε έξι κατηγορίες που έχουν λάβει άδεια για τη θεραπεία του HIV-1. Παρακάτω παρουσιάζονται οι κατηγορίες:

1. Έξι Νουκλεοσιδικοί Αναστολείς Ανάστροφης μεταγραφάσης (Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors, NRTIs).
2. Πέντε Μη Νουκλεοσιδικοί Αναστολείς Ανάστροφης Μεταγραφάσης (Non- Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors, NNRTIs).
3. Εννέα Αναστολείς Πρωτεάσης (Protease Inhibitors , PIs).
4. Ένας Αναστολέας Ιντεγκράσης (Integrase inhibitors INIs).
5. Ένας Ανταγωνιστής Υποδοχέα CCR5 (CCR5 Antagonist).
6. Ένας Αναστολέας Ενσωμάτωσης (Fusion Inhibitor).

Στον παρακάτω πίνακα αναγράφεται ο κατάλογος των διαθέσιμων αντιρετροϊκών φαρμάκων που έχουν λάβει έγκριση από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Φαρμάκων (*Food and Drug Administration-FDA*) [6] .

**ΠΙΝΑΚΑΣ 1: Διαθέσιμα Αντιρετροϊκά Φάρμακα που έχουν εγκριθεί από FDA [6].**

| Ονομασία Δραστικής Ουσίας                                                                                              | Συντομογραφία | Εμπορική Ονομασία |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------|-------------------|
| <b>Νουκλεοσιδικοί Αναστολείς Ανάστροφης Μεταγραφάσης (Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors, NRTIs)</b>          |               |                   |
| Abacavir                                                                                                               | ABC           | Ziagen            |
| Didanosine                                                                                                             | ddI           | Videx             |
| Emtricitabine                                                                                                          | FTC           | Emtriva           |
| Lamivudine                                                                                                             | 3TC           | Epivir            |
| Stavudine                                                                                                              | d4T           | Zerit             |
| Tenofovir                                                                                                              | TDF           | Viread            |
| Zidovudine                                                                                                             | AZT, ZDV      | Retrovir          |
| <b>Μη Νουκλεοσιδικοί Αναστολείς Ανάστροφης Μεταγραφάσης (Non- Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors, NNRTIs)</b> |               |                   |
| Delavirdine                                                                                                            | DLV           | Rescriptor        |
| Efavirenz                                                                                                              | EFV           | Sustiva           |
| Etravirine                                                                                                             | ETR           | Intence           |
| Nevirapine                                                                                                             | NVP           | Viramune          |
| Nevirapine extended release                                                                                            | NVP XR        | Viramune XR       |
| Rilpivirine                                                                                                            | RPV           | Edurant           |
| <b>Αναστολείς Πρωτεάσης (Protease Inhibitors , PIs)</b>                                                                |               |                   |
| Atazanavir                                                                                                             | ATV           | Reyataz           |
| Darunavir                                                                                                              | DRV           | Prezista          |
| Fosamprenavir                                                                                                          | FPV           | Lexiva            |
| Indinavir                                                                                                              | IDV           | Crixivan          |
| Lopinavir/ritonavir                                                                                                    | LPV/r         | Kaletra           |
| Nelfinavir                                                                                                             | NFV           | Viracept          |
| Ritonavir                                                                                                              | RTV, /r       | Norvir            |
| Saquinavir hard gel caps                                                                                               | SQV           | Invirase          |
| Tipranavir                                                                                                             | TPV           | Aptivus           |
| <b>Αναστολείς Ιντεργράσης (Integrase inhibitors INIs).</b>                                                             |               |                   |
| Raltegravir                                                                                                            | RAL           | Isentress         |
| <b>Ανταγωνιστής Υποδοχέα CCR5 (CCR5 Antagonist).</b>                                                                   |               |                   |
| Maraviroc                                                                                                              | MVC           | Selzentry         |
| <b>Αναστολέας Ενσωμάτωσης (Fusion Inhibitor)</b>                                                                       |               |                   |
| Enfuvirtide (T20)                                                                                                      | ENF           | Fuzeon            |

Αξίζει να σημειωθεί πως πολλά ARVs μπορεί να έχουν πολλαπλά εμπορικά σήματα, ανάλογα με την εταιρεία και την τοποθεσία στην οποία κατασκευάζονται. Ορισμένα παραδείγματα αναγράφονται παρακάτω: το Efavirenz, το οποίο είναι επίσης γνωστό ως Stocrin στην Ευρώπη. Η φοσαμπρεναβίρη, η οποία είναι γνωστή ως Telzir στην Ευρώπη. Η λοπιναβίρη / ριτοναβίρη, η οποία είναι επίσης γνωστή ως Aluvia στον αναπτυσσόμενο κόσμο και το Maraviroc, το οποίο είναι επίσης γνωστό ως Celsentri στην Ευρώπη [6].

Τα αντιρετροϊκά φάρμακα σήμερα είναι ιδιαίτερα δραστικά, παρόλα αυτά όμως δεν μπορούν να επιτύχουν οριστική εκρίζωση του ιού του HIV.. Συνεπώς, ο βασικός στόχος της αντιρετροϊκής θεραπείας είναι η επίτευξη μη ανιχνεύσιμου ιικού φορτίου. Αυτό προϋποθέτει ότι η αντιρετροϊκή θεραπεία (ART) θα πρέπει να συνεχιστεί μετά την έναρξη με τους ακόλουθους βασικούς στόχους θεραπείας <sup>[18]</sup> :

1. Μέγιστη και ανθεκτική καταστολή αντιγραφής του ιού
2. Αποκατάσταση και συντήρηση της ανοσολογικής λειτουργίας
3. Μείωση της νοσηρότητας που συνδέεται με το HIV και παρατεταμένη διάρκεια επιβίωσης
4. Μείωση της πιθανότητας ανάπτυξης ανοχής
5. Πρόληψη της μετάδοσης

Σύμφωνα με αρκετές μελέτες η ART έχει τη δυνατότητα να επηρεάσει θετικά την επίπτωση του HIV σε πληθυσμιακό επίπεδο και να μειώσει τον συνολικό επιπολασμό <sup>[18]</sup> .

### 3. **Αντοχή στα αντιρετροϊκά φάρμακα (HIV Drug Resistance-HIVDR)**

#### 3.1. **Βιολογική βάση αντοχής στα Αντιρετροϊκά Φάρμακα -ARVs**

Η αντοχή στα αντιρετροϊκά φάρμακα προκαλείται από μεταλλάξεις που εμφανίζονται στα γονίδια που κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες στόχους της θεραπείας. Η γενετική αλλαγή που προκύπτει στη δομή του ιού του HIV, επηρεάζει την ικανότητα ενός συγκεκριμένου αντιρετροϊκού φαρμάκου ή συνδυασμών αντιρετροϊκών φαρμάκων να εμποδίσουν την αναπαραγωγή του ιού, συνεπώς ο ιός έχει την ικανότητα να πολλαπλασιάζεται παρουσία ικανής συγκέντρωσης φαρμάκου. Το γεγονός αυτό ενέχει τον κίνδυνο όλα τα αντιρετροϊκά φάρμακα, συμπεριλαμβανομένων τόσο των παλαιότερων όσο

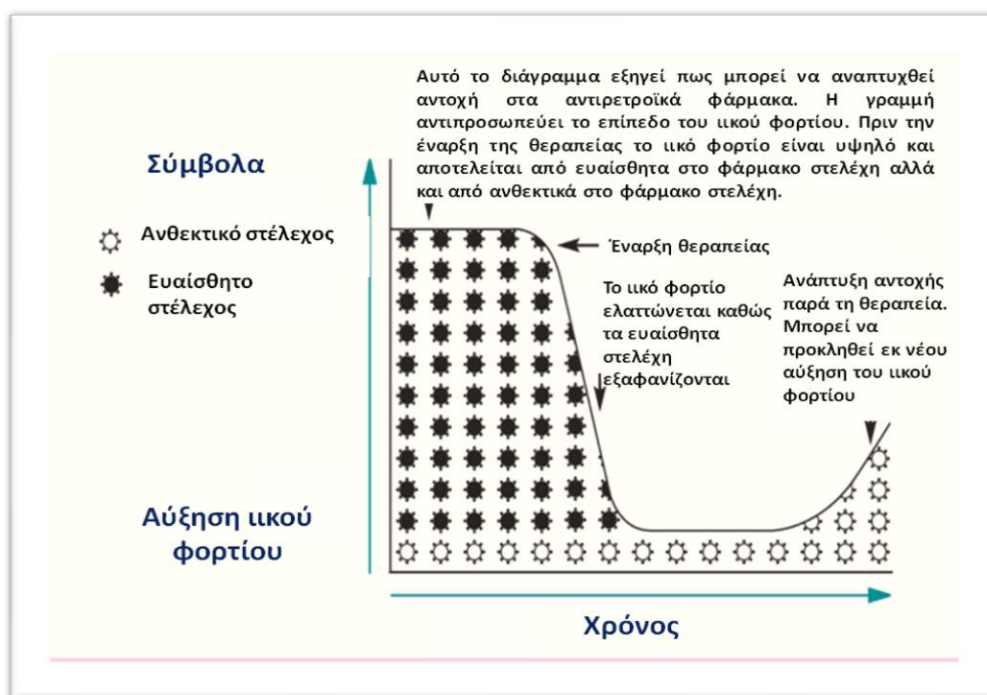
και των νέων να γίνουν εν μέρει ή πλήρως ανενεργά λόγω της εμφάνισης ανθεκτικού ιού. Η αντοχή στα αντιρετροϊκά φάρμακα μπορεί να χωριστεί σε<sup>[6,17]</sup> :

- ❖ Επίκτητη αντοχή σε αντιρετροϊκά φάρμακα (Acquired HIV Drug Resistance - HIVDR /ADR): Αναπτύσσεται σε άτομα που λαμβάνουν αντιρετροϊκή θεραπεία όταν εμφανίζονται μεταλλάξεις του ιού του HIV εξαιτίας του ιικού αναδιπλασιασμού <sup>[6]</sup> .
- ❖ Μεταδιδόμενη αντοχή σε αντιρετροϊκά φάρμακα (Transmitted HIV Drug Resistance - HIVDR/TDR): Ανιχνεύεται σε ανθρώπους που δεν παρουσιάζουν κάποιο ιστορικό προηγούμενης έκθεσης σε αντιρετροϊκή θεραπεία. Εμφανίζεται σε άτομα που έχουν μολυνθεί από ιό ο οποίος παρουσιάζει μεταλλάξεις ανθεκτικότητας σε φάρμακα <sup>[6]</sup> .
- ❖ Προ θεραπείας αντοχή σε αντιρετροϊκά φάρμακα (Pretreatment HIV Drug Resistance - HIVDR /PDR) : Ανιχνεύεται σε πρωτοθεραπευόμενους (naïve ) ασθενείς που έλαβαν αντιρετροϊκή θεραπεία, είτε σε άτομα που παρουσιάζουν προηγούμενη έκθεση σε κάποιο αντιρετροϊκό φάρμακο ξεκινώντας ή επαναλαμβάνοντας κάποια αντιρετροϊκή αγωγή πρώτης γραμμής. Η PDR αποκτάται είτε από μεταδιδόμενη αντοχή, είτε από επίκτητη, είτε από συνδυασμό των παραπάνω. Η PDR μπορεί να μεταδοθεί κατά τη στιγμή που κάποιος μολύνεται με τον ιό ή μπορεί να αποκτηθεί κατά την προηγούμενη έκθεση σε κάποιο αντιρετροϊκό φάρμακο. Προηγούμενη έκθεση σε ARV μπορεί να υπάρξει στη περίπτωση των γυναικών που λαμβάνουν αντιρετροϊκά φάρμακα (prevention of mother-to-child transmission -PMTCT ) ώστε να αποφευχθεί η κάθετη μετάδοση του ιού, είτε σε άτομα που έλαβαν προφυλακτική αγωγή προ της έκθεσης στον ιό (pre-exposure prophylaxis –PrEP), είτε σε άτομα που ξεκινούν ξανά κάποια αντιρετροϊκή θεραπεία πρώτης γραμμής την οποία είχαν σταματήσει χωρίς να υπάρχει κάποια τεκμηριωμένη ιολογική αποτυχία <sup>[17]</sup> .

### **3.2. Λόγοι εμφάνισης της αντοχής στα αντιρετροϊκά φάρμακα- ARVs**

Ο ιός του HIV πολλαπλασιάζεται με πολύ γρήγορο ρυθμό με αποτέλεσμα να δημιουργούνται δισεκατομμύρια ιοί καθημερινά. Εκτιμάται πως περίπου  $10^9$  ιικά σωματίδια/ μέρα παράγονται σε ένα μολυσμένο άτομο<sup>[19]</sup>. Η μοριακή βάση της μεταβλητότητας του HIV-1 είναι ένα ένζυμο, το ένζυμο της αντίστροφης μεταγραφάσης το οποίο είναι ιδιαίτερα ευαίσθητο στη δημιουργία σφαλμάτων <sup>[19]</sup>. Ο ρυθμός αντικαταστάσεων νουκλεοτιδίων που εισάγονται με το ένζυμο αντίστροφη μεταγραφάση είναι περίπου  $10^{-4}$  ανά νουκλεοτίδιο ανά κύκλο αντιγραφής με αποτέλεσμα να εμφανίζεται μια μεταλλαγή ανά γονιδίωμα την ημέρα <sup>[19]</sup>. Επιπρόσθετα εισαγωγές, διαγραφές και επαναλήψεις συμβάλουν στη γενετική ετερογένεια του ιού HIV-1. Επειδή κατά τη αντιγραφή του ιού δημιουργούνται λάθη κάθε νέα γενιά ιών διαφέρει ελαφρώς από την προηγούμενη. Αυτές οι αλλαγές που προκύπτουν ονομάζονται μεταλλάξεις. Μερικές μεταλλάξεις λαμβάνουν χώρα σε τμήματα του ιού στα οποία στοχεύουν ορισμένα αντιρετροϊκά φάρμακα. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα αυτά τα στελέχη του ιού να εμφανίζουν ανθεκτικότητα στα φάρμακα.

Τα ανθεκτικά στα φάρμακα στελέχη του ιού ποικίλλουν, με απότοκο ορισμένα να εμφανίζονται εξαιρετικά ανθεκτικά ενώ ορισμένα λιγότερο ανθεκτικά. Όταν ξεκινά η δράση ενός φαρμάκου κατά του HIV, τα στελέχη του HIV που είναι απόλυτα ευαίσθητα σε αυτό το φάρμακο αρχίζουν να εξαφανίζονται με γρήγορους ρυθμούς, ενώ παραμένουν τα ανθεκτικά στο φάρμακο στελέχη. Εάν ο αναδιπλασιασμός του HIV δεν καταστέλλεται πλήρως, τα ανθεκτικά στελέχη του ιού μπορούν να συνεχίσουν να αναπαράγονται παρά την παρουσία του φαρμάκου. Στο παρακάτω διάγραμμα **(Διάγραμμα:1)** μπορούμε να δούμε πως δημιουργείται η αντοχή στα αντιρετροϊκά φάρμακα <sup>[20]</sup>.



**Διάγραμμα 1:** Σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας ανάπτυξης αντοχής<sup>[20]</sup>

### 3.3 Αντοχή σε Νουκλεοσιδικούς/ Νουκλεοτιδικούς Αναστολείς Αντίστροφης μεταγραφάσης (Nucleoside/Nucleotide Reverse Transcriptase Inhibitors –NRTIs)

Οι μηχανισμοί που εμπλέκονται στην αντοχή των NRTIs είναι δυο<sup>[6]</sup>:

- 1) Ο μηχανισμός που εμποδίζει την ενσωμάτωση του νουκλεοσιδικού/νουκλεοτιδικού αναλόγου, και
- 2) Ο μηχανισμός που βοηθάει στο να απομακρυνθεί το ανάλογο από τη νεοσυντιθέμενη αλυσίδα.

Ο πρώτος μηχανισμός, ο οποίος είναι ο κύριος μηχανισμός αντοχής στους περισσότερους NRTIs <sup>[21]</sup> έγκειται στη διάκριση. Δηλαδή ο μηχανισμός αυτός περιλαμβάνει μεταλλάξεις οι οποίες εμφανίζονται στη περιοχή δέσμευσής ή κοντά στη περιοχή δέσμευσης φαρμάκου του γονιδίου της αντίστροφης μεταγραφάσης, με αποτέλεσμα οι μεταλλάξεις αυτές να εμποδίζουν τη δέσμευση και την ενσωμάτωση του φαρμάκου στην αλυσίδα

του DNA. Στην ουσία οι μεταλλάξεις επιτρέπουν στην αντίστροφη μεταγραφάση να κάνει διάκριση μεταξύ των τερματικών αλυσίδας διδεοξυ-NRTI και των φυσικώς παραχθέντων dNTPs του κυττάρου, εμποδίζοντας έτσι την ενσωμάτωση των NRTIs σε μία αναπτυσσόμενη ιική αλυσίδα DNA [6].

Ο δεύτερος μηχανισμός αφορά τις μεταλλάξεις αναλόγων θυμιδίνης (Thymidine Analogue Mutations, TAMs) επειδή επιλέγονται από τα ανάλογα θυμιδίνης (thymidine) ζιδοβουδίνης (zidovudine) και σταβουδίνης (stavudine). Οι NRTIs ασκούν ένα φραγμένο αποτέλεσμα συνδέοντας ένα μη αναμενόμενο μονοφωσφορικό νουκλεοσιδικό ανάλογο στο 3' άκρο της αναπτυσσόμενης προϊμικής αλυσίδας DNA. Αυτό αποτελεσματικά τερματίζει την επέκταση της αλυσίδας και τελικά, αναστέλλει την αναπαραγωγή του ιού. Ωστόσο, αυτή η διαδικασία μπορεί να αντιστραφεί με αντίδραση αντίστροφης μεταγραφάσης η οποία απομακρύνει το κατάλοιπο τερματισμού της αλυσού και επαναφέρει ένα επεκτάσιμο αρχικό τεμάχιο. Αυτή η αντίστροφη αντίδραση του πολυμερισμού του DNA ονομάζεται πυροφωσφορόλυση και επιτρέπει την αντίστροφη μεταγραφή και τη σύνθεση του DNA [6, 21].

Οι πιο συνηθισμένες μεταλλάξεις που έγκειται στη διάκριση είναι οι: M184V/I, K65R, K70E/G, L74V, Y115F και το σύμπλοκο μεταλλάξεων Q151M. Η μετάλλαξη M184V/I προκαλεί φαινοτυπική αντοχή υψηλού επιπέδου σε Lamivudine (3TC) και σε Emtricitabine (FTC), ενώ προκαλεί χαμηλή φαινοτυπική διασταυρούμενη αντοχή σε Abacavir (ABC) και σε μικρότερο βαθμό σε Didanosine (DDI), επιπρόσθετα αυξάνει την ευαισθησία σε Tenofovir (TDF) και Zidovudine (AZT). Η μετάλλαξη K65R προκαλεί ενδιάμεση αντοχή σε Tenofovir (TDF), Abacavir (ABC), Didanosine (DDI), Lamivudine (3TC) και Emtricitabine (FTC), χαμηλή αντοχή σε -Stavudine (D4T) και αυξημένη ευαισθησία σε Zidovudine (AZT) [6,21].

Οι μεταλλάξεις αναλόγων θυμιδίνης (TAMs) περιλαμβάνουν τις εξής: M41L, D67N, K70R, L210W, T215F/Y και K219Q/E. Αν και επιλέγονται μόνο από σχήματα που περιέχουν zidovudine (AZT) και stavudine (D4T) τα ανάλογα θυμιδίνης παρέχουν διασταυρούμενη αντίσταση σε tenofovir (TDF), abacavir (ABC) και didanosine (DDI) [6,21].

Οι ιοί που περιέχουν ήδη πολλαπλά ανάλογα θυμιδίνης είναι πιο πιθανό να αναπτύξουν επιπλέον TAMs όταν υποβληθούν σε θεραπεία με tenofovir (TDF), abacavir (ABC) και didanosine (DDI) αντί των K65R ή L74V και τις κανονικές μεταλλάξεις διάκρισης που σχετίζονται με αυτούς τους NRTIs. Πράγματι, η παρουσία των 4-5 TAMs συν M184V είναι ένα από τα πλέον κοινά πρότυπα μεταλλάξεων που σχετίζονται με αντοχή υψηλού επιπέδου σε όλους τους NRTIs [6].

Το σύμπλοκο μεταλλάξεων Q151M σχετίζεται με υψηλή αντοχή σε zidovudine (AZT), stavudine (D4T), abacavir (ABC) και didanosine (DDI) και χαμηλή ενδιάμεση αντοχή σε tenofovir (TDF), lamivudine (3TC) και emtricitabine (FTC) [6].

### **3.4 Αντοχή σε μη Νουκλεοσιδικούς Αναστολείς Αντίστροφης Μεταγραφάσης (Non-Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors - NNRTIs)**

Ο μηχανισμός αντοχής στους μη Νουκλεοσιδικούς Αναστολείς της Αντίστροφης Μεταγραφάσης – NNRTIs παρουσιάζεται πιο απλός από τον προηγούμενο μηχανισμό. Όλα τα διαθέσιμα NNRTIs έχουν σχεδιαστεί ώστε να συνδέονται με αμινοξέα που βρίσκονται σε έναν υδρόφοβο θύλακα σύνδεσης στην αντίστροφη μεταγραφάση. Αυτός ο θύλακας δεν είναι πραγματικά μέρος της ενεργού θέσης του ενζύμου αλλά είναι πάρα πολύ κοντά στην ενεργό περιοχή. Αξίζει να σημειωθεί πως αυτός ο θύλακας στην πραγματικότητα δεν υπάρχει όταν το φάρμακο δεν είναι παρόν. Οι NNRTIs ανοίγουν τον θύλακα και κατά τη διαδικασία εμποδίζουν μερικές από τις κινήσεις του ενζύμου, με αποτέλεσμα να μην μπορεί να πραγματοποιηθεί η σύνθεση του DNA χωρίς αυτές τις κινήσεις [6].

Υπάρχουν τέσσερα κοινά χρησιμοποιούμενα NNRTIs: nevirapine (NVP), efavirenz (EFV), etravirine (ETR) και rilpivirine (RPV), λόγω όμως περιορισμένων κλινικών δεδομένων και πολύπλοκων δοσολογιών η

delaviridine χρησιμοποιείται σπάνια. Οι NNRTIs παρουσιάζουν χαμηλό γενετικό φραγμό στην αντίσταση. Η αντοχή υψηλού επιπέδου σε nevirapine (NVP) απαιτεί μία μετάλλαξη, η αντοχή υψηλού επιπέδου σε efavirenz (EFV) απαιτεί μία έως δύο μεταλλάξεις και η υψηλή αντοχή σε etravirine (ETR) απαιτεί δύο μεταλλάξεις. Το γενετικό εμπόδιο της αντίστασης φαίνεται να είναι χαμηλότερο για rilpivirine (RPV) από ό, τι για etravirine (ETR) και πιθανώς χαμηλότερο από ότι σε efavirenz (EFV) [6].

Οι μεταλλάξεις NNRTI που εμφανίζονται πιο συχνά είναι οι : L100I, K101EP, K103NS, V106AM, Y181CIV, Y188L, G190ASE και M230L. Οι μεταλλάξεις K101EP, K103NS, V106AM, Y181CIV, Y188L, G190ASE και M230L προκαλούν αντοχή υψηλού επιπέδου σε nevirapine (NVP). Οι μεταλλάξεις L100I, K101EP, K103NS, Y188L, G190ASE και M230L προκαλούν αντοχή ενδιάμεσου ή υψηλού επιπέδου σε efavirenz (EFV). Οι μεταλλάξεις L100I, K101EP, Y181CIV, Y188L, G190ASE και M230L σχετίζονται με μειωμένη ευαισθησία σε etravirine (ETR) ή και rilpivirine (RPV) [6].

### **3.5 Αντοχή σε Αναστολείς Πρωτεάσης (Protease Inhibitors PIs)**

Συνολικά εννέα αναστολείς πρωτεάσης-PI έχουν εγκριθεί από τον αμερικανικό FDA, παρόλα αυτά το ritonavir χρησιμοποιείται αποκλειστικά σε υπο-θεραπευτικές δόσεις για να ενισχύσει τα επίπεδα άλλων PIs (δηλώνεται με 'r' μετά το PI). Το nelfinavir (NFV) δεν μπορεί να ενισχυθεί από ritonavir και χρησιμοποιείται σπάνια λόγω της μη βέλτιστης αντιϊκής αποτελεσματικότητάς που παρουσιάζει. Το indinavir/r (IDV/r) παρόλο που παρουσιάζει ισχυρή αντιϊκή δραστηριότητα, συνδέεται με υψηλά ποσοστά νεφρικής τοξικότητας και για αυτό σπάνια χρησιμοποιείται ή μελετάται. Μεταξύ των υπόλοιπων PIs τρία χρησιμοποιούνται πιο συχνά, το atazanavir/r (ATV/r), το lopinavir/r (kaletra- LPV/r) και το darunavir/r (DRV/r). Το Atazanavir/r (ATV/r) και το darunavir/r (DRV/r) αποτελούν συστατικά της συνιστώμενης θεραπείας πρώτης γραμμής στις τρέχουσες κατευθυντήριες

οδηγίες ενώ το lopinavir/r (kaletra- LPV/r) θεωρείται αποδεκτή εναλλακτική λύση. Το fosamprenavir / r ( FPV/r) και το saquinavir / r (SQV/r) θεωρούνται αποδεκτές επιλογές για θεραπεία πρώτης γραμμής αλλά δεν έχουν μελετηθεί αρκετά σε κλινικές πράξεις ρουτίνας [6] .

Οι μεταλλάξεις PIs που εμφανίζονται πιο συχνά είναι οι : D30N, V32I, M46IL, G48VM, I50VL, I54VTALM, L76V, V82ATFS, I84V, N88S και L90M. Η μετάλλαξη η οποία επιλέγεται από το nelfinavir (NFV) και η μετάλλαξη I50VL που επιλέγεται από το atazanavir (ATV/r), προκαλούν αντοχή υψηλού επιπέδου σε ένα μόνο PI. Ενώ οι υπόλοιπες μεταλλάξεις μειώνουν την ευαισθησία σε δυο ή περισσότερα PIs. Το Lopinavir / r (kaletra- LPV/r) και το darunavir/r ( DRV/r) έχουν τα υψηλότερα γενετικά εμπόδια στην αντίσταση [6] .

### **3.6 Συμμόρφωση (compliance) ή προσκόλληση (adherence) το «κλειδί» για την αποφυγή ανάπτυξης αντοχής στην ART**

Όπως αναφέραμε και παραπάνω το να τηρεί ένας οροθετικός ασθενής κατά γράμμα τις οδηγίες που έχει λάβει από τον εκάστοτε γιατρό για την σωστή λήψη της αντιρετροϊκής θεραπείας, αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση για την εξασφάλιση της ιολογικής επιτυχίας. Σήμερα όμως, τόσο στις επιστημονικές όσο και στις κλινικές πρακτικές υπάρχει μια πληθώρα σύγχρονων ορολογιών όσων αφορά την σωστή λήψη της αγωγής από τους ασθενείς με HIV. Το γεγονός αυτό καθιστά δύσκολη την πρακτική ποσοτικοποίηση αυτής της έννοιας. Αρχικά ο πρώτος ορισμός που προτάθηκε ήταν ο όρος συμμόρφωση (compliance), που συνδέεται μόνο με την ικανότητα του ασθενούς να ακολουθεί την κλινική συνταγή. Στη συνέχεια επινοήθηκε ο όρος της προσκόλλησης (adherence), καθώς η σχέση μεταξύ του συνταγογράφου ιατρού και του ασθενούς έγινε ολοένα και πιο σημαντική. Το 1999, ορίζεται η προσκόλληση ως «τον τρόπο με τον οποίο τα άτομα κρίνουν μια προσωπική ανάγκη για μια φαρμακευτική αγωγή σε σχέση με τις ανησυχίες τους για τις ενδεχόμενες δυσμενείς συνέπειες» [22] . Ο ορισμός αυτός αναθεωρήθηκε αργότερα και διατυπώθηκε ως εξής « συμμόρφωση

είναι ο βαθμός στον οποίο η φαρμακευτική συμπεριφορά ενός ατόμου, ακολουθώντας μια διατροφή ή / και πραγματοποιώντας αλλαγές στον τρόπο ζωής, αντιστοιχεί σε συμφωνημένες συστάσεις από έναν πάροχο υγειονομικής περίθαλψης» [23].

Το 2012 εισήχθη μια νέα ταξινόμηση. Η νέα ορολογία ήταν το αποτέλεσμα μιας τριετούς έρευνας που ξεκίνησε από τις ευρωπαϊκές ερευνητικές ομάδες στον τομέα της σωστής λήψης των φαρμάκων (Βελτίωση των εμποδίων για συμμόρφωση: πολιτικές για την ασφαλή, αποτελεσματική και αποδοτική χρήση των φαρμάκων στην Ευρώπη). Το έργο ABC (Ascertaining Barriers for Compliance), έλαβε υπόψη την έννοια της προσκόλλησης καθώς και τους παράγοντες που μειώνουν την τήρηση της θεραπείας και πως αυτοί οι παράγοντες θα μπορούσαν να αντιμετωπιστούν από διάφορες πολιτικές. Το έργο ABC αναγνώρισε τρεις διαδικασίες που απαιτούνται να γίνουν σε μια ξεχωριστή ανάλυση: «Προσκόλληση σε φάρμακα», «Διαχείριση προσκόλλησης» και «Επιστήμες που σχετίζονται με την προσκόλληση» [24]. Σύμφωνα με τα παραπάνω ο ορισμός της προσκόλλησης άλλαξε και διατυπώθηκε ως « η διαδικασία με την οποία οι ασθενείς παίρνουν τα φάρμακά τους όπως έχει οριστεί». Η έννοια θεωρήθηκε ότι περιλαμβάνει τρεις ξεχωριστές φάσεις: την έναρξη, την εφαρμογή και τη διακοπή. Οι διαδικασίες αυτές μπορούν να οριστούν ως εξής:

1. Έναρξη (Initiation) : Η στιγμή που ο ασθενής παίρνει την πρώτη δόση ενός συνταγογραφούμενου φαρμάκου.
2. Διακοπή (Discontinuation) : Η στιγμή κατά την οποία ο ασθενής σταματά να παίρνει το συνταγογραφούμενο φάρμακο.
3. Εφαρμογή (Implementation) : Ο βαθμός στον οποίο η πραγματική δοσολογία ενός ασθενούς αντιστοιχεί στο συνταγογραφούμενο δοσολογικό σχήμα, από την έναρξη μέχρι την τελευταία δόση.

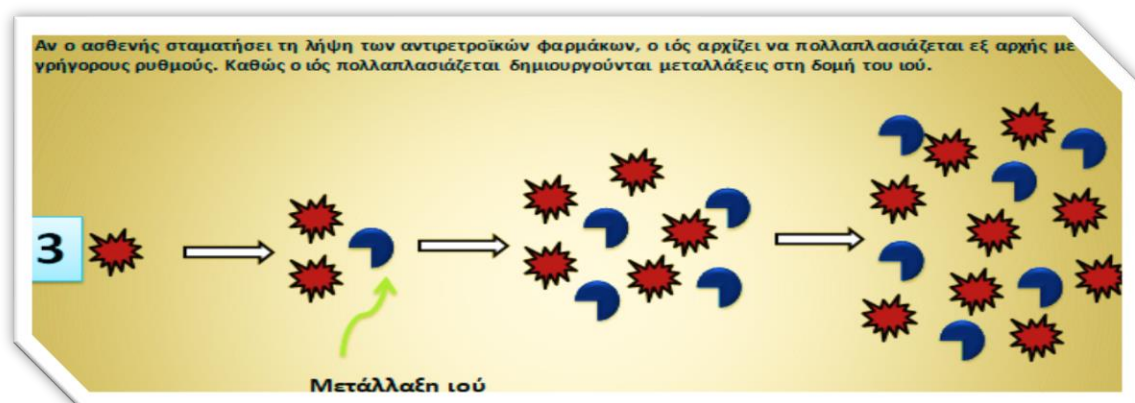
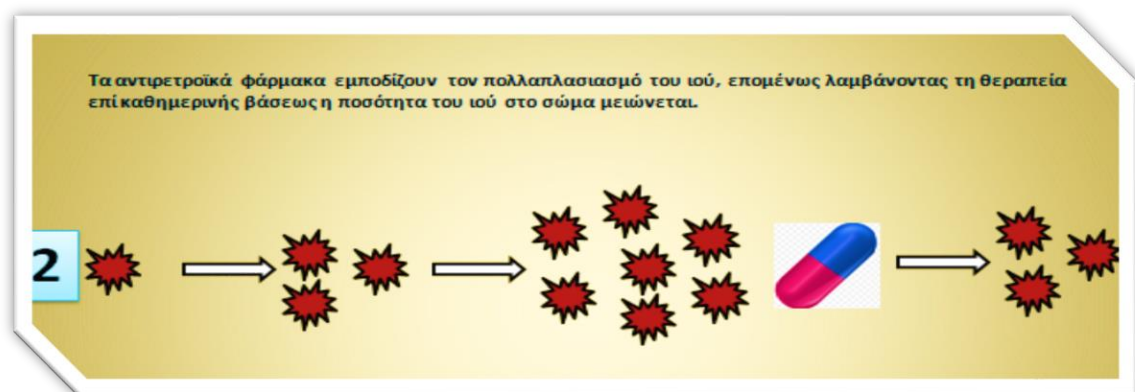
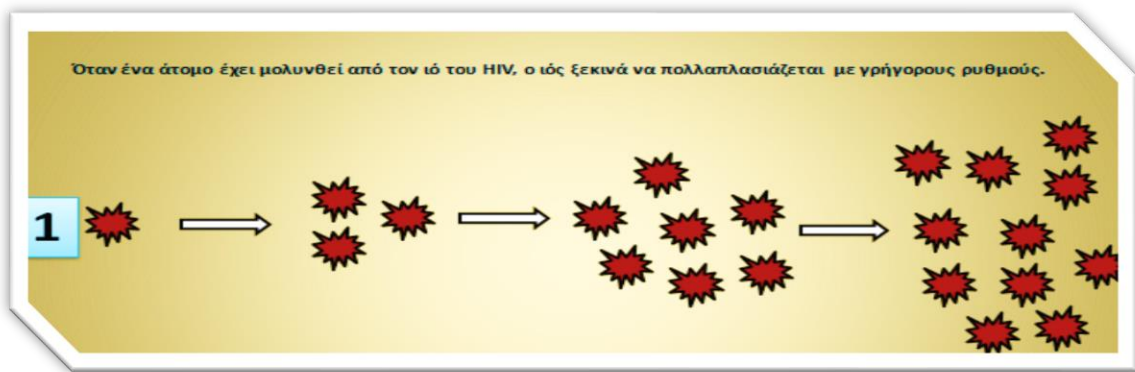
Στο σημείο αυτό αξίζει να σημειωθεί πως για να έχουμε σωστή αντιμετώπιση των περιστατικών με λοίμωξη από HIV πρέπει να ακολουθηθούν πέντε βασικά βήματα [25]:

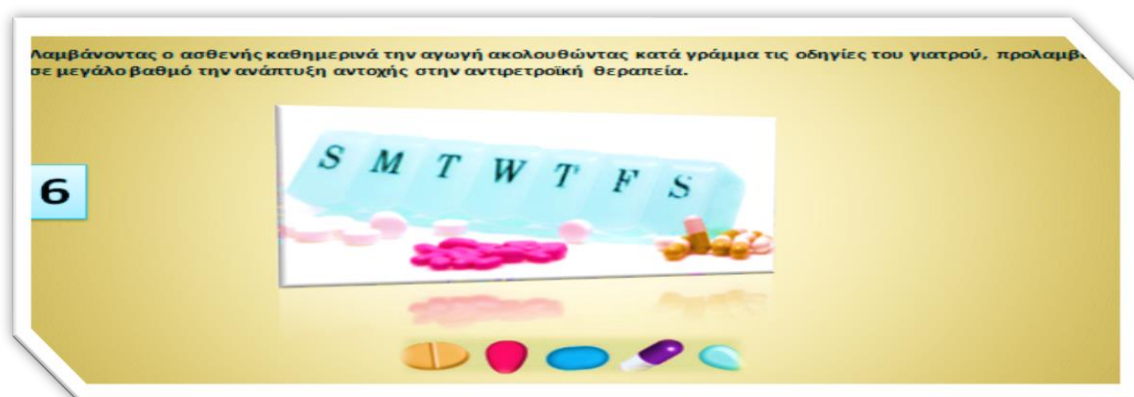
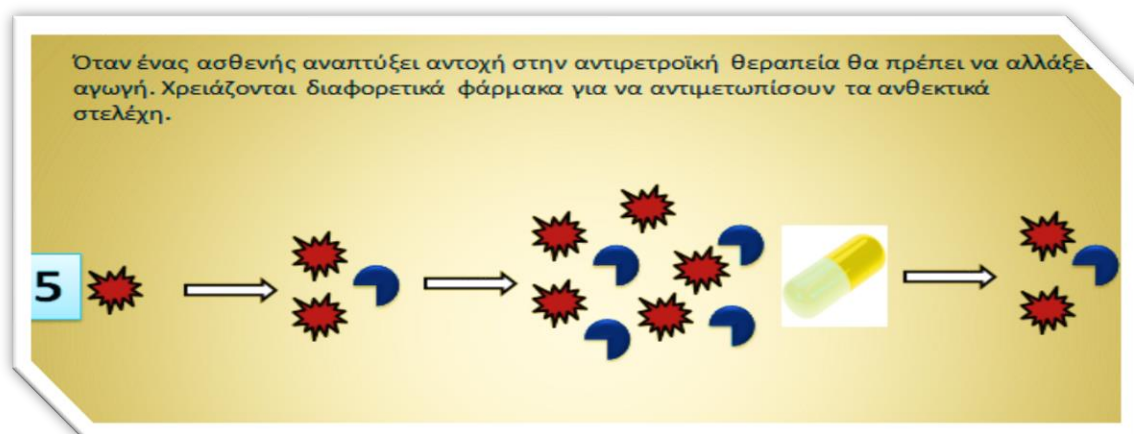
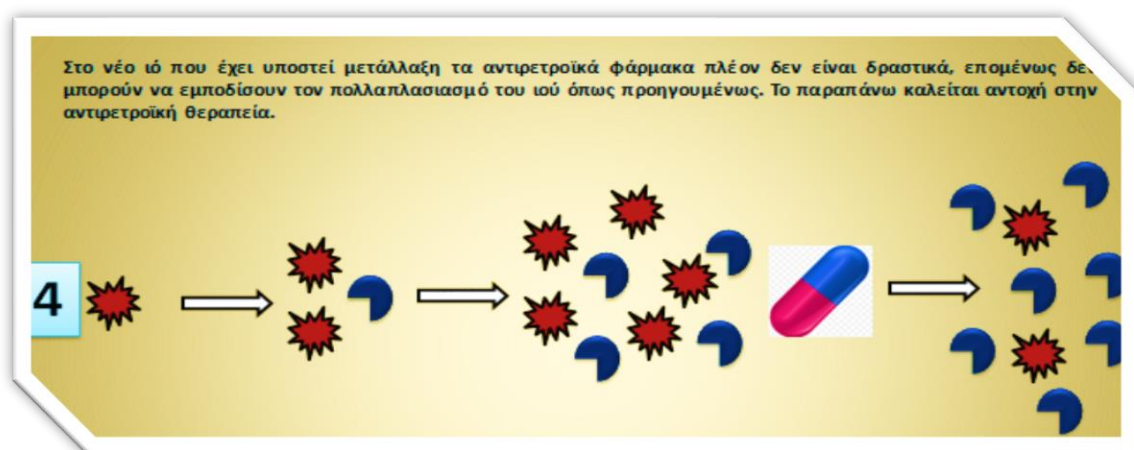
4. Διάγνωση
5. Διασύνδεση με πάροχο υγείας
6. Παραμονή στην ιατρική φροντίδα
7. Προσκόλληση στην ART
8. Καταστολή του ιού

Υπάρχουν διάφοροι παράγοντες που θα μπορούσαν να επηρεάσουν θετικά ή αρνητικά τις φάσεις που σχετίζονται με την συμμόρφωση στην ART<sup>[26]</sup> :

- Αρχικά το επιλεγμένο σχήμα ARV. Τα φάρμακα αυτά ή ο συνδυασμός των αντιρετροϊκών φαρμάκων μπορούν να οδηγήσουν σε διάφορες ανεπιθύμητες παρενέργειες και σε διάφορους περιορισμούς, επηρεάζοντας έτσι το πρόγραμμα του ασθενούς και τη δυνατότητα λήψης άλλων απαιτούμενων φαρμάκων
- Η σχέση με τον πάροχο υγείας, όπου συγκαταλέγεται ο χρόνος που αφιερώνει ο αρμόδιος γιατρός στη παροχή συμβουλών, πληροφόρησης και δημιουργίας σχέσης εμπιστοσύνης με τον ασθενή.
- Να δεχτεί ο ασθενής την ART μαζί με τα πλεονεκτήματα και τα μειονεκτήματά που έχει.
- Το κοινωνικό και οικογενειακό περιβάλλον μπορεί να πείσει τον ασθενή να συνεχίσει την ART ενθαρρύνοντας και επιτηρώντας τον ή αντίθετα να τον αποθαρρύνει ή να επικρίνει τον ασθενή.

Παρακάτω παρουσιάζεται διαγραμματικά **(Διάγραμμα:2)** πως μπορεί να αποφευχθεί σε μεγάλο βαθμό η ανάπτυξη αντοχής στην αντιρετροϊκή θεραπεία. Όπως παρατηρούμε η συμμόρφωση στην εκάστοτε θεραπεία είναι το «κλειδί».





**Διάγραμμα 2:** Διαγραμματική απεικόνιση αποφυγής ανάπτυξης αντοχής.

#### **4. Μέθοδοι ελέγχου της αντοχής στο εργαστήριο – Γονοτυπικές και Φαινοτυπικές μέθοδοι**

Η εμφάνιση ανθεκτικού ιού ο οποίος προκαλεί αντίσταση στα αντιρετροϊκά φάρμακα μπορεί να εκτιμηθεί μέσω δύο βασικών μεθόδων προσδιορισμού, των γονοτυπικών μεθόδων (Genotypic assays) και των φαινοτυπικών μεθόδων (Phenotypic assays). Οι γονοτυπικές δοκιμασίες προσδιορίζουν την παρουσία μεταλλάξεων που είναι γνωστό ότι προσδίδουν μειωμένη ευαισθησία στα φάρμακα, επίσης ο έλεγχος γονοτυπικής αντοχής χρησιμοποιείται για να βοηθήσει στην επιλογή ενός σχήματος ARV κατά την έναρξη ή την αλλαγή της αντιρετροϊκής θεραπείας [15]. Από την άλλη οι φαινοτυπικές δοκιμασίες προσδιορισμού μετρούν το βαθμό στον οποίο το στέλεχος του ιού του HIV του ατόμου θα πολλαπλασιαστεί σε διαφορετικές συγκεντρώσεις αντιρετροϊκών φαρμάκων [15]. Ενκατακλείδι όπως και στις γονοτυπικές μεθόδους προσδιορισμού έτσι και στις φαινοτυπικές ο έλεγχος της αντοχής χρησιμοποιείται για να γίνει η καταλληλότερη επιλογή σχήματος αντιρετροϊκών φαρμάκων κατά την έναρξη ή την αλλαγή της αντιρετροϊκής θεραπείας [27].

Οι τρέχουσες εμπορικά διαθέσιμες γονοτυπικές και φαινοτυπικές μέθοδοι ελέγχουν τον ιό του HIV-1 που απομονώνεται από το πλάσμα. Μετά την απομόνωση του RNA (Extraction RNA), τα γειτονικά γονίδια πρωτεάσης (protease) και ανάστροφης μεταγραφάσης (reverse transcriptase -RT) μεταγράφονται σε cDNA και κατόπιν ενισχύονται χρησιμοποιώντας αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction -PCR) για να δημιουργηθεί επαρκές DNA για γονοτυπική ή φαινοτυπική εξέταση [28].

##### **4.1 Επιλογή κατάλληλου δείγματος και διαδικασία προσδιορισμού αντοχής**

Βασική προϋπόθεση για τον προσδιορισμό της γονοτυπικής αντοχής αποτελεί πρώτον η επιλογή του κατάλληλου δείγματος και δεύτερον η απομόνωση και ο πολλαπλασιασμός της αλληλουχίας του στελέχους που

θέλουμε να μελετήσουμε. Αξίζει να σημειωθεί πως η ποσότητα του DNA πρέπει να είναι επαρκής για την ανάλυση, ανεξάρτητα από τη μέθοδο που θα χρησιμοποιηθεί [29].

Η χρήση του πλάσματος ενδείκνυται για τον προσδιορισμό της αντοχής καθώς η εμφάνιση αντοχής στο προϊικό DNA παρουσιάζει μια αρκετά μεγάλη καθυστέρηση. Ο χρόνος ημιζωής του HIV-1 στο πλάσμα είναι περίπου 6 ώρες με αποτέλεσμα να μπορεί να απομονωθεί μόνο ο ιός που αντιγράφεται ενεργά, έτσι η αλληλουχία του ιού πλάσματος αντιπροσωπεύει τα quasispecies (πλήθος στελεχών που διαφέρουν γενετικά μεταξύ τους) που επιλέχθηκαν πρόσφατα με αντιρετροϊκή θεραπευτική αγωγή. Από την άλλη πλευρά η απομόνωση μονοπύρηνων κυττάρων περιφερικού αίματος (Peripheral Blood Monocyte Cells- PBMCs) για τον έλεγχο της αντοχής σε προϊικό DNA υστερεί αρκετά σε σχέση με HIV-1 RNA του πλάσματος [29].

#### **4.2. PCR- Polymerase Chain Reaction για τον πολλαπλασιασμό των περιοχών στόχων**

Η δοκιμή αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης PCR δίνει ένα ποσοτικοποίησιμο αποτέλεσμα, δηλαδή μπορεί να ανιχνεύσει την ποσότητα του ιού που υπάρχει στο δείγμα. Η ποσότητά αυτή του ιού στο δείγμα δίνεται ως αντίγραφα ανά χιλιοστόλιτρο (αντίγραφα/ml), η ευαισθησία της δοκιμής είναι συνήθως 50 αντίγραφα/ml. Αξίζει να υπογραμμιστεί πως κάτω από 50 αντίγραφα/ml το αποτέλεσμα αναφέρεται ως μη ανιχνεύσιμο [30].

Η PCR χρησιμοποιείται α) για να διαπιστωθεί πότε κάποιος που έχει μολυνθεί από τον ιό του HIV θα πρέπει να αρχίσει αντιρετροϊκή θεραπεία, β) για να καθοριστεί η ανταπόκριση του ασθενούς στη θεραπεία, γ) για την παρακολούθηση της εξέλιξης της θεραπευτικής αγωγής ή της ανάπτυξης αντοχής στη θεραπεία, δ) για να βοηθήσει τους κλινικούς γιατρούς στο να λάβουν αποφάσεις σχετικά με τα συνδυαστικά σχήματα φαρμάκων που χορηγούνται στους ασθενείς. Είναι πολύ σημαντικό να τονιστεί πως η

ποσοτική PCR δεν πρέπει να χρησιμοποιείται ως διαγνωστική εξέταση για τον ιό HIV επειδή μπορεί να εμφανιστούν ψευδώς θετικά και ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα [30] .

Θα ήταν χρήσιμο να καταγραφούν οι παράγοντες από τους οποίους εξαρτάται η ευαισθησία μιας δοκιμής PCR. Η ευαισθησία της PCR εξαρτάται α) από τις φυσικοχημικές συνθήκες της αντίδρασης, β) τους εκκινητές που θα επιλεγούν, γ) το μήκος του στόχου που πολλαπλασιάζεται, δ) τον υπότυπο του δείγματος και την ε) αποφυγή της επιμόλυνσης του δείγματος [31] .

#### **4.3. Γονοτυπικές μέθοδοι**

Οι γονοτυπικές μέθοδοι πλήρους αλληλουχίας περιλαμβάνουν την ανάλυση πλήρους αλληλουχίας ,την ανίχνευση σημειακών μεταλλάξεων και τις μεθόδους ανάλυσης ανά κωδικόνιο. Έχοντας ως βάση τον πολλαπλασιασμό του προϊόντος της PCR χρησιμοποιούν εκκινητές, δεοξυνουκλεοτίδια (dNTPs), πολυμεράση και διδεοξυνουκλεοτίδια (ddNTPs). Διδεοξυνουκλεοτίδια ενσωματώνονται στη νέα αλυσίδα του DNA με αποτέλεσμα να αναστέλλεται με αυτόν τον τρόπο η σύνθεσή της καθώς στη θέση 3' άκρο του σακχάρου της δεσοξυριβόζης δεν υπάρχει υδροξύλιο, επομένως δεν μπορεί να σχηματιστεί φωσφοδιεστερικός δεσμός με το επόμενο δεοξυνουκλεοτίδιο. Αυτή η τυχαία ενσωμάτωση των διδεοξυνουκλεοτιδίων στη καινούργια αλυσίδα του DNA προκαλεί τη δημιουργία κάποιων τμημάτων που παρουσιάζουν διαφορές στο μοριακό τους βάρος και τα οποία διαχωρίζονται με τη μέθοδο της ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης-αγαρόζης. Για να είναι εφικτή η ανίχνευση αυτών των τμημάτων στο πήκτωμα, γίνεται σήμανση των εκκινητών ή των διδεοξυνουκλεοτιδίων με φθορίζουσες χρωστικές [32] .

##### **❖ Σήμανση διδεοξυνουκλεοτιδίων**

##### **❖ Σήμανση εκκινητών**

Επί του παρόντος υπάρχουν δύο εμπορικά διαθέσιμες μέθοδοι αλληλούχισης πληθυσμών για την γονοτυπική αντοχή. Η μέθοδος ViroSeq™

HIV-1 genotyping system ( Abbot Diagnostics, USA) και η μέθοδος TruGene™ HIV-1 genotyping system ( Siemens Medical Solution Diagnostics, USA). Και οι δύο μέθοδοι είναι εγκεκριμένες από τον FDA. Η μέθοδος Viroseq περιλαμβάνει διάφορα στάδια : την εκχύλιση του νουκλεϊκού οξέος ( RNA extraction), τη διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφάσης (reverse transcription-RT), την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (polymerase chain reaction-PCR), την αντίδραση της αλληλούχησης (sequencing), το λογισμικό ευθυγράμμισης της αλληλουχίας και ερμηνείας της αντοχής στα αντιρετροϊκά φάρμακα [32] .

Και τα δύο συστήματα είναι συγκρίσιμα και δεν έχουν περιγραφεί σημαντικές αποκλίσεις όσον αφορά τις γενικές επιδόσεις, έχει αποδειχθεί ότι η χρήση διαφορετικών συστημάτων ερμηνείας στην ίδια ακολουθία έχει ως αποτέλεσμα ποικίλες βαθμολογίες αντίστασης. Ωστόσο, ούτε η έκθεση που δίνει η μέθοδος ViroSeq ούτε η έκθεση της TruGene συνδέονταν με σοβαρά σφάλματα ερμηνείας. Επιπλέον, οι μέθοδοι ViroSeq και TruGene έχουν δοκιμαστεί για απόδοση στην ανάλυση όλων των υποτύπων της ομάδας M. Και οι δύο δοκιμασίες έχουν εγκριθεί για χρήση μόνο σε υποτύπο B του ιού HIV και παρόλο που ο υπότυπος B είναι ευρέως διαδεδομένος στην Ευρώπη και τη Βόρεια Αμερική, αντιπροσωπεύει μόνο το 11% των μολύνσεων HIV-1 παγκοσμίως. Η απόδοση στην ανάλυση υποτύπων μη B είναι συγκρίσιμη και για τα δύο συστήματα, αλλά έχει αναφερθεί υψηλότερο ποσοστό αποτυχίας σε σύγκριση με τον υπότυπο B. Η προσαρμογή σε υποτύπους μη-B μπορεί να αποτελέσει πρόκληση για μελλοντική επικαιροποίηση [32] .

Οι τροποποιήσεις στη διαδικασία εκχύλισης για τις μεθόδους ViroSeq και TruGene είτε με την εφαρμογή ενός σταδίου υπερφυγοκέντρωσης είτε με τη χρήση συστημάτων προετοιμασίας δειγμάτων πριν από την έναρξη της διαδικασίας επιτρέπουν τη δοκιμή αντοχής σε φάρμακα σε δείγματα με ιικό φορτίο έως και 100 αντίγραφα / ml [32] .

Καταλήγουμε πως δεν προτιμάται κάποια μέθοδος έναντι της άλλης. Η επιλογή για τη χρήση της μεθόδου ViroSeq ή της μεθόδου TruGene θα πρέπει να εξαρτάται από τη διαθεσιμότητα δειγμάτων και τον εξοπλισμό που μπορεί να είναι ήδη διαθέσιμος στο εργαστήριο. Ανεξάρτητα από τη

μέθοδο που χρησιμοποιείται, πρέπει να ληφθεί υπόψη ότι οι τακτικές επικαιροποιήσεις των εκθέσεων σχετικά με την αντίσταση σε φάρμακα είναι υποχρεωτικές για να συμπεριλάβουν τόσο τα νέα φάρμακα που συνεχώς βγαίνουν, όσο και τις νέες μεταλλάξεις που προκύπτουν . Τέλος, όλα τα γενοτυπικά δεδομένα θα πρέπει να συνοδεύονται από εκθέσεις εμπειρογνομόνων και θα πρέπει να χρησιμοποιούνται μόνο στο πλαίσιο των μεμονωμένων παραμέτρων που σχετίζονται με τον ασθενή, συμπεριλαμβανομένου του ιστορικού θεραπείας [32] .

#### **4.4. Φαινοτυπικές μέθοδοι προσδιορισμού (Phenotypic Assay)**

Οι Φαινοτυπικές μέθοδοι προσδιορισμού της αντοχής στα αντιρετροϊκά φάρμακα αν και παρουσιάζουν αρκετά μεγάλη ποικιλία, ακολουθούν όμως μια κοινή αρχή.

Αρχικά απομονώνεται ο ιός είτε από το πλάσμα του ασθενούς είτε από μονοκύρηνα κύτταρα περιφερικού αίματος PBMCs (Peripheral Blood Monocyte Cells). Έπειτα από την απομόνωση του ιού, δημιουργούνται νέοι ιοί οι οποίοι περιέχουν τις αλληλουχίες που έχουν ληφθεί από τον ασθενή, στα αντίστοιχα γονίδια στόχους . Στη συνέχεια ο ιός που έχει παραχθεί είτε από *in vivo* καλλιέργεια, είτε μέσω της διαδικασίας του ανασυνδιασμού, χρησιμοποιείται για να μολύνει κύτταρα υπό την παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων αντιρετροϊκών φαρμάκων- ARVs. Καταλαβαίνουμε λοιπόν πως οι μέθοδοι αυτοί μετρούν την αντιγραφή του ιού σε κυτταροκαλλιέργεια παρουσία διαδοχικών αραιώσεων αντιρετροϊκών φαρμάκων [33].

Η συνεχής αυτή παρακολούθηση και καταγραφή της αναστολής της αντιγραφής του ιού σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις αντιρετροϊκών φαρμάκων δημιουργεί μια σιγμοειδή καμπύλη δόσης- αντίδρασης (dose-response curve). Η καμπύλη αυτή αποτυπώνει τη συγκέντρωση του ARV που αναστέλλει την αντιγραφή του ιού κατά 50% (Inhibitory Concentration 50%, IC<sub>50</sub> ) και προκύπτει διαιρώντας τη συγκέντρωση του εκάστοτε φαρμάκου που είναι απαραίτητο για να ανασταλεί το 50% του πολλαπλασιασμού του στελέχους που μελετάται (IC<sub>50mt</sub>), προς τη συγκέντρωση του φυσικού τύπου ιού

(IC<sub>50</sub>wt). Αυτός ο λόγος που προκύπτει χαρακτηρίζεται ως πολλαπλάσιο αντοχής (Fold Change, FC) και υπολογίζεται σύμφωνα με τον παρακάτω τύπο [34] :

$$FC = \frac{IC_{50}mt}{IC_{50}wt}$$

Αξίζει να σημειώσουμε πως απαιτούνται επίπεδα του HIV-1 στο πλάσμα  $\geq 1000$  αντίγραφα/ml για τη δοκιμασία της φαινοτυπικής ευαισθησίας. Οι δοκιμασίες για τον προσδιορισμό της σημασίας μιας συγκεκριμένης μείωσης της ευαισθησίας στα αντιρετροϊκά φάρμακα χαρακτηρίζεται από τρία κατώφλια (cut-offs) για κάθε φάρμακο. Με τον όρο cut-off εννοούμε το όριο εκτιμώμενης αντοχής όπου πάνω από το οποίο θεωρείται ότι ένας ιός έχει αναπτύξει αντοχή. Τα cut-offs χωρίζονται στις παρακάτω κατηγορίες [6] :

- ❖ Τεχνικά κατώφλια ή κατώφλια επαναληψιμότητας (technical or reproducibility cut-off): Γίνεται εκτίμηση της επαναληψιμότητας της ανάλυσης για τα αντιρετροϊκά φάρμακα. Τα τεχνικά κατώφλια μας πληροφορούν αν το αποτέλεσμα που λαμβάνουμε είναι στατιστικά σημαντικό [6] .
- ❖ Βιολογικά κατώφλια (Biological cut-off): Αναφέρεται στο εύρος των τιμών IC<sub>50</sub> που απαιτούνται για την αναστολή των ιών φυσικού τύπου σε κάθε φάρμακο σε παύει ασθενείς, δηλαδή ασθενείς που δεν έχουν λάβει αντιρετροϊκή θεραπεία. Η κλινική σημασία των βιολογικών κατωφλίων είναι περιορισμένη [6] .
- ❖ Κλινικά cut-offs (clinical cut-off): Αναφέρεται στην εκτίμηση της αντοχής που συνδέεται με αυξημένη ή μειωμένη πιθανότητα ανταπόκρισης σε κάθε αντιρετροϊκό φάρμακο [6] .

Δύο φαινοτυπικοί προσδιορισμοί είναι διαθέσιμοι, το Phenosense™ (Monogram Biosciences) και το Antivirogram™ (Virco). Ο προσδιορισμός Phenosense παρουσιάζεται πιο ευαίσθητος από το Antivirogram, καθώς οι μικρές διαφορές που προκύπτουν στη ανίχνευση της ανθεκτικότητας σε ARVs είναι κλινικά σημαντικές [6] .

## **5. Χρησιμότητα μεθόδων προσδιορισμού αντοχής στη κλινική πρακτική**

Η μετάδοση ανθεκτικών σε φάρμακα στελεχών του ιού έχει τεκμηριωθεί και σχετίζεται με ανεπαρκή ιολογική ανταπόκριση στην αρχική αντιρετροϊκή θεραπεία που έχει χορηγηθεί. Έχει παρατηρηθεί ότι στις χώρες υψηλού εισοδήματος, περίπου το 10% έως 17% των ατόμων που δεν έχουν λάβει ART παρουσιάζουν μεταλλάξεις σε τουλάχιστον ένα φάρμακο ARV. Οι μεταδιδόμενοι ιοί, μέχρι και 8% αλλά γενικά < 5% θα παρουσιάσουν αντοχή σε περισσότερες από μια τάξεις. Η μεταδιδόμενη αντίσταση παρουσιάζεται πιο συχνά σε NNRTI και NRTI, ενώ παρουσιάζεται λιγότερο συχνή σε PI και σπάνια σε INSTI [18].

Καταλαβαίνουμε πως οι δοκιμές αντοχής μπορούν να κατευθύνουν την επιλογή της κατάλληλης θεραπευτικής αγωγής και να βελτιστοποιήσουν τη ιολογική ανταπόκριση σε άτομα με οξεία ή πρώιμη HIV λοίμωξη, σε έγκυες γυναίκες που έχουν διαγνωστεί με HIV ή σε άτομα που θα ξεκινήσουν την ART μετά τη διάγνωση του HIV. Η δοκιμή της αντοχής είναι απαραίτητη σε αυτές τις περιπτώσεις και η μέθοδος προσδιορισμού που προτιμάται είναι η μέθοδος της γονοτυπικής αντοχής. Αξίζει να σημειωθεί πως αν το άτομο είναι πρόθυμο να ξεκινήσει θεραπεία και να συνεργαστεί με τον θεράποντα γιατρό, τότε η έναρξη της θεραπείας δεν θα πρέπει να καθυστερήσει εν αναμονή των αποτελεσμάτων των δοκιμών αντοχής. Μπορεί να χορηγηθεί αντιρετροϊκή θεραπεία και μόλις ο γιατρός λάβει τα αποτελέσματα αντοχής να τροποποιήσει την αγωγή, αν αυτό είναι απαραίτητο [18].

Εάν ο ασθενής δεν λάβει αντιρετροϊκή θεραπεία οι ανθεκτικοί ιοί μπορούν να μειωθούν τόσο πολύ που μπορεί να καταστούν και μη ανιχνεύσιμοι από τις μεθόδους προσδιορισμού της γονοτυπικής αντοχής. Ωστόσο όταν ξεκινήσει η ART ακόμα και τα χαμηλά επίπεδα ανθεκτικών ιών μπορούν να αυξήσουν τον κίνδυνο αποτυχίας της θεραπείας. Συνεπώς αν η ART αναβληθεί πρέπει να διεξαχθεί δοκιμασία αντοχής κατά την πρώιμη HIV

λοίμωξη. Σε αυτή την περίπτωση, το αποτέλεσμα της γονοτυπικής αντοχής θα πρέπει να χρησιμοποιείται για την επιλογή των θεραπευτικών αγωγών όταν το άτομο ξεκινά ART. Μπορεί επίσης να εξεταστεί η επανάληψη της δοκιμασίας αντοχής στην αρχή της θεραπείας, επειδή ένας ασθενής μπορεί να αποκτήσει ανθεκτικό σε φάρμακα ιό στο διάστημα μεταξύ της εισαγωγής του του στην ιατρική φροντίδα και της έναρξης της ART [18].

Η ερμηνεία των αποτελεσμάτων της αντοχής πριν από την έναρξη της ART σε άτομα με χρόνια HIV λοίμωξη, είναι περίπλοκη. Ο ρυθμός με τον οποίο μεταβιβάζονται οι σχετιζόμενες με τη αντίσταση μεταλλάξεις που επανέρχονται στον ιό φυσικού τύπου δεν έχει περιγραφεί, αλλά οι μεταλλάξεις που υπάρχουν κατά τη στιγμή της μετάδοσης του HIV είναι πιο σταθερές από εκείνες που επιλέχθηκαν υπό πίεση φαρμάκου. Συχνά είναι δυνατό να ανιχνευθούν μεταλλάξεις σχετιζόμενες με την αντίσταση σε ιούς που είχαν μεταδοθεί αρκετά χρόνια νωρίτερα. Παρόλο που καμία προοπτική μελέτη δεν έδωσε άμεση απάντηση για το κατά πόσο η δοκιμή αντοχής σε φάρμακα πριν από την έναρξη της θεραπείας αποφέρει όφελος σε αυτόν τον πληθυσμό, δεδομένα από αρκετές μελέτες, συμπεριλαμβανομένης μίας προοπτικής κλινικής δοκιμής, υποδεικνύουν ότι οι ιολογικές ανταποκρίσεις σε άτομα με βασικές μεταλλάξεις αντίστασης δεν είναι οι βέλτιστες [18].

Για την ανίχνευση της αντοχής στη κλινική πράξη προτιμάται η γονοτυπική μέθοδος προσδιορισμού έναντι των φαινοτυπικών μεθόδων. Η επιλογή του γονότυπου ως προτιμώμενη μέθοδος προσδιορισμού της αντοχής βασίστηκε στο χαμηλό κόστος, τον ταχύτερο χρόνο διεξαγωγής, στη μεγαλύτερη ευαισθησία που παρουσιάζει ο προσδιορισμός του γονότυπου στην ανίχνευση μεικτών πληθυσμών φυσικού και ανθεκτικού τύπου ιού και στην ευκολότερη ερμηνεία των αποτελεσμάτων της δοκιμής. Εάν η θεραπεία αναβληθεί μπορεί να γίνει επανάληψη της γονοτυπικής αντοχής λίγο πριν την έναρξη της ART, καθώς ο ασθενής μπορεί να έχει αποκτήσει ανθεκτικότητα σε κάποιο φάρμακο. Η τυποποιημένη διαδικασία γονοτυπικής αντοχής σε άτομα που δεν έχουν λάβει αντιρετροϊκή αγωγή, προϋποθέτει έλεγχο για μεταλλάξεις στα γονίδια RT και PR. Να σημειωθεί πως η δοκιμασία γονοτυπικής αντοχής επόμενης γενιάς που αναλύει το προϊκό DNA στα

κύτταρα-ξενιστές μπορεί να ληφθεί υπόψη όταν η συμβατική δοκιμασία ανθεκτικότητας δεν είναι επιτυχής ή δεν είναι διαθέσιμη για ασθενείς που ξεκινούν θεραπεία <sup>[18]</sup>.

### **5.1. Συστάσεις χρήσης μεθόδων προσδιορισμού αντοχής στα φάρμακα σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες**

Στον **Πίνακα:2** παρατηρούμε τις συστάσεις των κατευθυντήριων οδηγιών όσον αφορά την χρήση μεθόδων προσδιορισμού αντοχής στα αντιρετροϊκά φάρμακα <sup>[18]</sup>.

#### **Πίνακας 2:Συστάσεις χρήσης μεθόδων προσδιορισμού αντοχής στα φάρμακα<sup>[18]</sup>**

| <b>Συστάσεις χρήσης μεθόδων προσδιορισμού αντοχής στα φάρμακα (Drug-Resistance Assays)</b>                                                                                                                                                      |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Κλινικό καθεστώς και σύσταση</b>                                                                                                                                                                                                             | <b>Αιτιολογία</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| <b>Οξεία ή πρώιμη λοίμωξη HIV</b><br><br>Συνιστάται διεξαγωγή μεθόδου προσδιορισμού αντοχής στα φάρμακα, προτιμάται η γονοτυπική δοκιμασία. Η θεραπεία δεν πρέπει να καθυστερεί ενώ αναμένεται το αποτέλεσμα της δοκιμής αντοχής.               | Οι δοκιμασίες αντοχής μπορούν να καθορίσουν αν έχει μεταδοθεί κάποιος ανθεκτικός ιός με αποτέλεσμα η αγωγή να μην είναι δραστική και κάποιο φάρμακο να μην είναι πια ευαίσθητο. Μόλις οι κλινικοί γιατροί λάβουν την απάντηση της γονοτυπικής αντοχής μπορούν να τροποποιήσουν την αγωγή. Ο γονοτυπικός προσδιορισμός προτιμάται από το φαινοτυπικό λόγω του χαμηλότερου κόστους, του ταχύτερου χρόνου ολοκλήρωσης της διαδικασίας και της μεγαλύτερης ευαισθησίας που παρουσιάζει στην ανίχνευση μεικτών πληθυσμών ιών φυσικού και ανθεκτικού τύπου. |
| Αν η αντιρετροϊκή αγωγή αναβληθεί, πρέπει να γίνει επανάλληψη της γονοτυπικής αντοχής κατά την έναρξη της θεραπείας.                                                                                                                            | Να γίνει επανάλληψη της γονοτυπικής αντοχής όταν ξεκινήσει ο ασθενής την ART, καθώς μπορεί να έχει αποκτήσει κάποιο ανθεκτικό στέλεχος στο φάρμακο (π.χ επαναμόλυνση).                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| <b>Πρωτοθεραπευόμενοι (Naïve) ασθενείς με χρόνια λοίμωξη HIV</b><br><br>Ο έλεγχος αντοχής συνίσταται αμέσως μετά τη διάγνωση της HIV λοίμωξης ώστε να γίνει η επιλογή της αρχικής ART. Προτιμάται η γονοτυπική αντοχή ως μέθοδος προσδιορισμού. | Ο μεταδιδόμενος ιός HIV με βασική αντοχή σε τουλάχιστον 1 φάρμακο παρουσιάζεται στο 10% έως 17% των ασθενών και παρατηρείται υποβέλτιστη ιολογική ανταπόκριση σε ασθενείς με βασικές ανθεκτικές μεταλλάξεις των ARV στο καθορισμένο σχήμα. Ορισμένες μεταλλάξεις αντίστασης σε φάρμακα μπορούν να παραμείνουν ανιχνεύσιμες για χρόνια σε ασθενείς που δεν έχουν υποβληθεί σε θεραπεία με χρόνια HIV.                                                                                                                                                  |
| Στις έγκυες η θεραπεία μπορεί να ξεκινήσει πριν τη λήψη των αποτελεσμάτων της αντοχής.                                                                                                                                                          | Εάν είναι απαραίτητο, η θεραπευτική αγωγή ART μπορεί να τροποποιηθεί μόλις είναι διαθέσιμα τα αποτελέσματα των δοκιμών αντοχής.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| Αν η αντιρετροϊκή αγωγή αναβληθεί, πρέπει να γίνει επανάλληψη της γονοτυπικής αντοχής κατά την έναρξη της θεραπείας.                                                                                                                            | Να γίνει επανάλληψη της γονοτυπικής αντοχής όταν ξεκινήσει ο ασθενής την ART, καθώς μπορεί να έχει αποκτήσει κάποιο ανθεκτικό στέλεχος στο φάρμακο (π.χ επαναμόλυνση).<br><br>Ο γονοτυπικός προσδιορισμός προτιμάται από το φαινοτυπικό λόγω του χαμηλότερου κόστους, του ταχύτερου χρόνου                                                                                                                                                                                                                                                            |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | ολοκλήρωσης της διαδικασίας και της μεγαλύτερης ευαισθησίας που παρουσιάζει στην ανίχνευση μιγμάτων ιών φυσικού και ανθεκτικού τύπου.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| Εάν εξετάζεται η χρήση ενός ανταγωνιστή CCR5, θα πρέπει να πραγματοποιηθεί ένας προσδιορισμός τροπισμού συν-υποδοχέα                                                                                                                                                                                                                                                         | Μια δοκιμασία τροπισμού συν-υποδοχέα πρέπει να διεξάγεται κάθε φορά που εξετάζεται η χρήση ενός ανταγωνιστή συν-υποδοχέα CCR5. Επίσης συνιστάται η δοκιμή τροπισμού με συν-υποδοχέα σε ασθενείς που εμφανίζουν ιολογική αποτυχία σε ανταγωνιστή CCR5.<br><br>Φαινοτυπική δοκιμασία τροπισμού προτιμάται για τον προσδιορισμό της χρήσης συν-υποδοχέων HIV-1, ενώ γονοτυπική δοκιμασία τροπισμού θα πρέπει να θεωρηθεί ως μια εναλλακτική δοκιμή για την πρόβλεψη της χρήσης συν-υποδοχέων HIV-1. Επίσης μπορεί να χρησιμοποιηθεί δοκιμασία προϊκού τροπισμού DNA για ασθενείς με μη ανιχνεύσιμο HIV-1 RNA όταν ένας ανταγωνιστής CCR5 προορίζεται για χρήση σε ένα νέο σχήμα θεραπείας. |
| <b>Ασθενείς με ιολογική αποτυχία</b><br><br>Συνιστάται η δοκιμή αντοχής στα φάρμακα σε ασθενείς με συνδυασμό ART με επίπεδα HIV RNA > 1.000 αντίγραφα /mL.<br><br>Σε ασθενείς με επίπεδα HIV RNA > 500 αντίγραφα / mL αλλά <1.000 αντίγραφα / mL, ο έλεγχος μπορεί να μην είναι επιτυχής αλλά θα πρέπει επίσης να εκτελεστεί                                                 | Η δοκιμή αντοχής στα φάρμακα μπορεί να βοηθήσει στον προσδιορισμό του ρόλου της αντίστασης στην αποτυχία του θεραπευτικού σχήματος και στη μεγιστοποίηση της ικανότητας του κλινικού ιατρού να επιλέξει δραστικά φάρμακα για το νέο σχήμα.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| Οι δοκιμές αντοχής πρέπει να γίνονται ενώ ο ασθενής λαμβάνει ART ή εάν αυτό δεν είναι εφικτό, εντός 4 εβδομάδων μετά τη διακοπή της ART. Εάν έχουν παρέλθει περισσότερες από 4 εβδομάδες η δοκιμή αντοχής μπορεί να είναι χρήσιμη για την πορεία της θεραπείας. Ωστόσο, οι προηγούμενες επιλεγμένες μεταλλάξεις μπορούν να χαθούν λόγω έλλειψης επιλεκτικής πίεσης φαρμάκου. | Η απουσία ανιχνεύσιμης αντίστασης σε τέτοιους ασθενείς πρέπει να ερμηνεύεται με προσοχή κατά το σχεδιασμό των επακόλουθων θεραπευτικών αγωγών ARV, καθώς οι μεταλλάξεις μπορεί να εξασθενίσουν με το χρόνο.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| Μια τυπική δοκιμασία γονοτυπικής αντοχής προτιμάται γενικά για ασθενείς που παρουσιάζουν ιολογική αποτυχία στο πρώτο ή το δεύτερο σχήμα τους και για εκείνους με μη σύνθετα μοντέλα ανθεκτικότητας.                                                                                                                                                                          | Ο γονοτυπικός προσδιορισμός προτιμάται από το φαινοτυπικό λόγω του χαμηλότερου κόστους, του ταχύτερου χρόνου ολοκλήρωσης της διαδικασίας και της μεγαλύτερης ευαισθησίας                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| Όλα τα προηγούμενα και τρέχοντα αποτελέσματα δοκιμών αντοχής φαρμάκων θα πρέπει να επανεξετάζονται και να λαμβάνονται υπόψη κατά το σχεδιασμό ενός νέου σχήματος για έναν ασθενή που παρουσιάζει ιολογική αποτυχία.                                                                                                                                                          | Οι μεταλλάξεις αντίστασης σε φάρμακα ενδέχεται να εξασθενίσουν με το χρόνο και οι μεταλλάξεις που ανιχνεύθηκαν σε προηγούμενες δοκιμές αντοχής μπορεί να μην ανιχνεύονται στις τρέχουσες δοκιμές, αν και παραμένουν κλινικά σημαντικές.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| Όταν εμφανίζεται ιολογική αποτυχία ενώ ο ασθενής είναι σε σχήμα βασισμένο σε INSTI, θα πρέπει να διεξάγεται γονοτυπικός έλεγχος για την αντίσταση INSTI για να καθοριστεί εάν θα συμπεριληφθούν φάρμακα αυτής της κατηγορίας σε επακόλουθα θεραπευτικά σχήματα.                                                                                                              | Οι γονοτυπικοί προσδιορισμοί παρέχουν πληροφορίες σχετικά με την αντοχή στις μεταλλάξεις που σχετίζονται με NRTI-, NNRTI-, PI- και INSTI. Σε ορισμένες περιπτώσεις, οι δοκιμές αντοχής INSTI πρέπει να παραγγελθούν χωριστά.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| Η προσθήκη φαινοτυπικών μεθόδων σε γονοτυπικές μεθόδους γενικά προτιμάται σε ασθενείς με γνωστά ή πιθανολογούμενα περίπλοκα μοτίβα αντοχής φαρμάκων.                                                                                                                                                                                                                         | Ο φαινοτυπικός έλεγχος μπορεί να παρέχει πρόσθετες χρήσιμες πληροφορίες σε ασθενείς με σύνθετα μοτίβα μετάλλαξης αντίστασης σε φάρμακα.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| <b>Ασθενείς με υποβέλτιστη καταστολή ιικού φορτίου</b><br><br>Συνιστάται η δοκιμή αντοχής στα φάρμακα σε ασθενείς με υποβέλτιστη καταστολή του ιικού φορτίου μετά την έναρξη της ART.                                                                                                                                                                                        | Η δοκιμή μπορεί να καθορίσει τον ρόλο της ανθεκτικότητας στην υποβέλτιστη καταστολή των ιών και μπορεί να βοηθήσει τον κλινικό ιατρό να αναγνωρίσει τον αριθμό των δραστικών φαρμάκων που είναι διαθέσιμα στο τρέχον σχήμα ώστε να αξιολογήσει την ανάγκη για ένα νέο σχήμα.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| <b>Έγκυες με HIV</b><br><br>Ο έλεγχος της γονοτυπικής αντοχής συνιστάται για όλες τις έγκυες πριν την έναρξη της ART και για εκείνες που στην εγκυμοσύνη παρουσιάζουν ανιχνεύσιμα επίπεδα RNA του HIV ενώ λαμβάνουν θεραπεία.                                                                                                                                                | Οι στόχοι της ART σε εγκύους με HIV είναι η επίτευξη μέγιστης καταστολής του ιού και η πρόληψη της κάθετης μετάδοσης του HIV στο έμβρυο. Η δοκιμή γονοτυπικής αντοχής θα βοηθήσει τον κλινικό γιατρό στην επιλογή του βέλτιστου σχήματος για τον ασθενή. Ωστόσο, η θεραπεία δεν θα πρέπει να καθυστερεί ενώ αναμένεται αποτελέσματα δοκιμών αντοχής. Το αρχικό σχήμα μπορεί να τροποποιηθεί αν χρειαστεί όταν υπάρχουν διαθέσιμα αποτελέσματα δοκιμών αντοχής.                                                                                                                                                                                                                          |
| <b>Ασθενείς με μη ανιχνεύσιμο ιικό φορτίο ή χαμηλού επιπέδου ιαιμία</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | Αυτή η δοκιμή μπορεί να παρέχει πληροφορίες σχετικά με προηγούμενες κυκλοφορούντες ανθεκτικές ιικές μεταλλαγές που αρχιοθετούνται στο προϊκό DNA. Οι αυτές δοκιμασίες μπορεί να χάνουν μερικές ή όλες τις προηγούμενες μεταλλάξεις αντίστασης που έχουν εμφανιστεί και συνεπώς θα πρέπει να ερμηνεύονται με                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |

|                                                                                                                                                                                                                                          |                                                                                                           |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>Δοκιμασίες αντοχής HIV-1 σε προϊκό DNA μπορεί να είναι χρήσιμες σε ασθενείς με HIV RNA κάτω από το όριο ανίχνευσης ή σε ασθενείς με ιαμία χαμηλού επιπέδου, όπου η γονοτυπική ανάλυση του HIV RNA είναι απίθανο να είναι επιτυχής</p> | <p>προσοχή. Η κλινική χρησιμότητα των δοκιμασιών προϊκού DNA του HIV-1 δεν έχει προσδιοριστεί πλήρως.</p> |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|

## 6. Αλγόριθμοι γονοτυπικής αντοχής

Η δοκιμή ανθεκτικότητας σε φάρμακα βελτιώνει σημαντικά την ανταπόκριση στην αντιρετροϊκή θεραπεία σε ασθενείς με HIV-1 σύμφωνα με τις τρέχουσες κατευθυντήριες γραμμές <sup>[18]</sup>. Η γνώση σχετικά με τις τεχνολογίες για τη μέτρηση της αντοχής στα φάρμακα είναι σημαντική για πολλούς λόγους, αρχικά υπάρχουν διαφορές μεταξύ των διαφορετικών μεθόδων που χρησιμοποιούνται, έπειτα τα αποτελέσματα των δοκιμών αντοχής εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από την αξιοπιστία και την ακρίβεια της χρησιμοποιούμενης μεθόδου· και τέλος οι τεχνικές πτυχές της ερμηνείας των αποτελεσμάτων της αντοχής στα φάρμακα πρέπει να εξεταστούν ώστε να δίνεται η καλύτερη δυνατή ερμηνεία κάθε φορά. Οι γονοτυπικές και φαινοτυπικές μέθοδοι αντοχής αυξάνουν ολοένα και περισσότερο την τεχνική τους ποιότητα με αποτέλεσμα η προσοχή να μετατοπίζεται στα συστήματα ερμηνείας της γονοτυπικής αντοχής. Η ερμηνεία βασίζεται στη γνώση των μεταλλάξεων που συνδέονται με την αντοχή στα φάρμακα, καθώς και στις συσχετίσεις μεταξύ του γονότυπου και του φαινοτύπου και της κλινικής ανταπόκρισης, οι οποίες ενσωματώνονται σε συστήματα βασισμένα σε κανόνες. Όλα τα συστήματα ερμηνείας γονοτυπικής αντοχής συγκλίνουν προς την **πρόβλεψη** της κλινικής απόκρισης του ασθενή <sup>[35]</sup>. Η χρησιμότητα του ελέγχου της αντοχής στα φάρμακα είναι σημαντική ώστε να ληφθούν καίριες αποφάσεις θεραπείας σε ασθενείς με HIV, ιδιαίτερα βοηθώντας την επιλογή της κατάλληλης αντιρετροϊκής θεραπείας σε πολυθεραπευόμενους ασθενείς.

Σήμερα έχουν αναπτυχθεί συστήματα ερμηνείας και αλγόριθμοι για τη διευκόλυνση της ερμηνείας των αποτελεσμάτων της αντοχής στα αντιρετροϊκά φάρμακα. Τα διάφορα συστήματα και αλγόριθμοι ερμηνείας ενημερώνονται περιοδικά, ενσωματώνοντας νέες μεταλλάξεις και πληροφορίες σχετικά με την αντοχή στα νέα φάρμακα. Ωστόσο, η ερμηνεία

ορισμένων μεταλλακτικών προτύπων είναι συχνά δύσκολη λόγω της πολυπλοκότητας των αποτελεσμάτων της αντοχής, καθώς οι μεταλλάξεις ποικίλουν τόσο από ασθενή σε ασθενή όσο και από υπότυπο σε υπότυπο με αποτέλεσμα το γενετικό υπόβαθρο των μεταλλάξεων να είναι διαφορετικό κάθε φορά <sup>[35]</sup> . Επίσης κάποιες μεταλλάξεις μπορούν να δράσουν είτε ανταγωνιστικά είτε συνεργατικά με αποτέλεσμα να δυσχεραίνεται η διαδικασία της ερμηνείας των αποτελεσμάτων της αντοχής. Τα συστήματα ερμηνείας αντίστασης βασίζονται σε αλγόριθμους οι οποίοι είναι εξελιγμένοι και βασίζονται σε κανόνες εμπειρογνομόνων. Οι αλγόριθμοι μπορεί να είναι ελεύθερα διαθέσιμοι σε ιστότοπους ή να συνδέονται με εμπορικές δοκιμές αντοχής στα φάρμακα, οι λεγόμενοι ιδιόκτητοι αλγόριθμοι. Οι συχνότεροι αλγόριθμοι ερμηνείας αντοχής αντιρετροϊκών φαρμάκων που χρησιμοποιούνται είναι:

- Stanford HIVRT&PR (HIVdb program)
- geno2pheno
- Retrogram
- Rega
- ANRS
- Trugene (Siemens)
- ViroSeq (Abbott)

Οι αλγόριθμοι ερμηνείας αντοχής εμπλουτίζονται με πληροφορίες είτε από τους ειδικούς εμπειρογνώμονες οι οποίοι συντάσσουν κανόνες που βασίζονται στη διεθνή βιβλιογραφία, είτε χρησιμοποιούνται τεχνικές βιοπληροφορικής όπου μέσα από μαθηματικά μοντέλα γίνεται πρόβλεψη του φαινότυπου από τον γονότυπο. Ο βασικός στόχος της ύπαρξης των αλγορίθμων ερμηνείας των αποτελεσμάτων της γονοτυπικής αντοχής είναι η πρόβλεψη του κλινικού αποτελέσματος και να βοηθήσει τους κλινικούς γιατρούς στο έργο τους αυτό. Οι κλινικοί γιατροί δυσκολεύονται να ερμηνεύσουν τα αποτελέσματα της γονοτυπικής αντοχής και αυτό φαίνεται από διάφορες μελέτες. Συγκεκριμένα στη μελέτη των Salaman et al <sup>[36]</sup> μέσω ενός ερωτηματολογίου εξετάστηκε η γνώση των κλινικών γιατρών πάνω στις

μεταλλάξεις της γονοτυπικής αντοχής. Η μελέτη έδειξε πως μόνο το 24% των ερωτηθέντων μπόρεσε να προσδιορίσει τουλάχιστον μία μετάλλαξη για καθεμία από τις 4 ομάδες φαρμάκων που αναφέρθηκαν και το 36% δεν μπόρεσε να ταυτίσει τις μεταλλάξεις με καμία από τις ομάδες φαρμάκων. Καταλαβαίνουμε λοιπόν πως είναι πάρα πολύ σημαντική η ερμηνεία των αποτελεσμάτων της αντοχής για τον κλινικό γιατρό και σε αυτό συμβάλουν οι διάφοροι αλγόριθμοι. Παρακάτω παρουσιάζονται κάποια βασικά χαρακτηριστικά των αλγορίθμων που χρησιμοποιούνται πιο συχνά αλλά και στη παρούσα μελέτη.

### **6.1 Αλγόριθμος REGA**

Ο αλγόριθμος REGA αποτελεί τον πρώτο αλγόριθμο ερμηνείας γονοτυπικής αντοχής ο οποίος επικυρώθηκε κλινικά από μια κοορτή ασθενών στους οποίους χορηγήθηκε θεραπεία διάσωσης (savage therapy) και εκτιμήθηκε η ανταπόκρισή τους σε αυτή σε διάστημα 3 μηνών [37]. Ο αλγόριθμος REGA είναι ελεύθερα διαθέσιμος και προσβάσιμος μέσω της ιστοσελίδας του Stanford, της Γερμανικής ιστοσελίδας Arevir καθώς και από τον διαδικτυακό τόπο της Advanced Biological Laboratories. Τους κανόνες που διέπουν τον αλγόριθμο REGA μπορούμε να τους βρούμε στο διαδικτυακό τόπο του REGA Institute. Ο αλγόριθμος αυτός δημιουργήθηκε για καθημερινή χρήση στη κλινική πρακτική. Οι κανόνες ερμηνείας έχουν δημιουργηθεί από εσωτερικά ενδοεργαστηριακά δεδομένα, από δημοσιευμένες βιβλιογραφικές αναφορές και από περιλήψεις. Αρχικά το έργο πραγματοποιούνταν από έναν εξειδικευμένο εμπειρογνώμονα με πολυετή εμπειρία, αλλά στις μέρες μας μια ειδική ομάδα εμπειρογνομόνων συνεδριάζει κάθε χρόνο και επικαιροποιεί τους κανόνες σε ετήσια βάση. Στις τελευταίες εκδόσεις του αλγορίθμου παρατηρούμε πως χρησιμοποιείται κυρίως η τεχνική της συλλογής και της επεξεργασίας των δεδομένων [7].

Ο αλγόριθμος REGA είναι ένας περίπλοκος αλγόριθμος και αυτό αποδεικνύεται λαμβάνοντας υπόψη τις συνεργιστικές και τις ανταγωνιστικές

αλληλεπιδράσεις των διαφόρων μεταλλάξεων. Τα αποτελέσματα του αλγόριθμου αποδίδονται σε τρία επίπεδα αντοχής: αντοχή (Resistant), ενδιάμεση αντοχή (Intermediate resistant) και ευαισθησία (Sensitive). Ο στόχος του αλγόριθμου είναι να προβλέψει την επικείμενη θεραπευτική αποτυχία έχοντας συνυπολογίσει ένα μεγάλο σύνολο μικρών μεταλλάξεων, οι οποίες συνυπολογίζονται επίσης με τις κύριες μεταλλάξεις. Καταλαβαίνουμε λοιπόν πως ο μεγάλος αριθμός των μικρών μεταλλάξεων μπορεί να προσδώσει υψηλά επίπεδα αντοχής αλλά να μειώσει το γενετικό φραγμό ο οποίος οδηγεί σε ανάπτυξη αντοχής. Επιπρόσθετα μερικές από τις μεμονωμένες μεταλλάξεις αυτού του αλγόριθμου δεν οδηγούν σε υψηλά επίπεδα αντοχής. Αντ' αυτού παρουσιάζονται κάποιες μεταλλάξεις-κλειδιά σε μια διαδικασία ανάπτυξης αντοχής, η οποία οδηγεί σε υψηλά επίπεδα αντοχής ή παρουσιάζονται μεταλλάξεις που είναι δείκτες επικείμενης αποτυχίας σε θεραπεία [7].

Κατά συνέπεια των παραπάνω ο αλγόριθμος αυτός δίνει καλύτερα αποτελέσματα για την πρώιμη αποτυχία, δηλαδή κάνει καλύτερη πρόβλεψη του βραχυπρόθεσμου θεραπευτικού αποτελέσματος αλλά δεν δίνει στον κλινικό γιατρό επαρκείς πληροφορίες για το χειρισμό πολυανθεκτικών ασθενών. Είναι πολύ σημαντικό να αναφερθεί πως ο αλγόριθμος REGA δεν λαμβάνει υπόψη του τον συνυπολογισμό συνδυαστικών φαρμακευτικών σχημάτων με απότοκο ένα φάρμακο να παρουσιάζεται ως ανενεργό όταν γίνεται η χορήγησή του ως σχήμα μονοθεραπείας, ενώ στα πλαίσια ενός πολλαπλού θεραπευτικού σχήματος φαρμάκων να διατηρείται μερική ενεργότητα. Ενκατακλείδι να συμπληρώσουμε πως ο REGA λαμβάνει υπόψη του τους υπότυπους του HIV-1, ενώ οι κανόνες που συνεχώς επικαιροποιούνται καλύπτουν πλέον και τους μη B-υπότυπους και έχουν αναπτυχθεί κανόνες αντοχής και για τον HIV-2 [7].

## **6.2 Αλγόριθμος ANRS (Agence Nationale de Recherche sur le SIDA)**

Ο αλγόριθμος ANRS HIV-1 έχει Γαλλική προέλευση και εξειδικεύεται στη γονοτυπική αντοχή φαρμάκων. Παρουσιάζει μεγάλη απήχηση επειδή οι κανόνες του βασίζονται στη συσχέτιση των μεταλλάξεων ανθεκτικότητας σε φάρμακα και των ιολογικών αποτελεσμάτων, με στοιχεία που παίρνουν από μια μεγάλη βάση δεδομένων η οποία περιλαμβάνει ασθενείς που αποτυγχάνουν στην αντιρετροϊκή θεραπεία. Ο ANRS είναι διαθέσιμος από το διαδικτυακό τόπο του Stanford, από το Γερμανικό Avenir HIV-Grade και από το MPGenotype. Αξίζει να σημειωθεί πως η πληροφορία εισάγεται στο σύστημα από τον εκάστοτε χρήστη είτε σαν αλληλουχία πλήρους μήκους, είτε ως λίστα μεταλλαγών. Όταν ολοκληρώνεται η διαδικασία το φάρμακο κατατάσσεται σε τρία επίπεδα αντοχής: αντοχή (Resistant), ενδιάμεση αντοχή (Intermediate resistant) και ευαίσθησία (Sensitive). Οι κανόνες επικαιροποιούνται σε ετήσια βάση, βάσει της διεθνούς βιβλιογραφίας και είναι διαθέσιμοι στο διαδίκτυο [7].

### **6.3 Αλγόριθμος HIVdb (Stanford University Genotypic Resistance)**

Ο αλγόριθμος HIVdb πιθανότατα είναι ο πιο ευρέως γνωστός αλγόριθμος, είναι διαθέσιμος στο κοινό από το διαδικτυακό τόπο του Stanford και από το Γερμανικό Avenir HIV-1 Grade είτε με τη μορφή κώδικα είτε με τη μορφή λίστας μεταλλάξεων. Η πληροφορία εισάγεται από το χρήστη στο διαδικτυακό τόπο, έπειτα γίνεται σύγκριση με τη συναινετική αλληλουχία αναφοράς του υπότυπου B, με αποτέλεσμα να προκύπτει μια ομάδα μεταλλαγών. Η ομάδα αυτή των μεταλλαγών που προκύπτει χρησιμοποιείται ως εργαλείο στη βάση δεδομένων αντοχής [7].

Ο αλγόριθμος βασίζεται σε έναν πίνακα στον οποίο κάθε μετάλλαξη αντιστοιχεί σε μια αριθμητική ρήτρα (penalty). Οι μεταλλάξεις χωρίζονται σε δύο ομάδες: (α) αυτές που έχουν σχέση με την αντοχή (Resistance Mutations), και (β) σε αυτές οι οποίες συνεισφέρουν στην αντοχή (Other Mutations). Αξίζει να υπογραμμιστεί πως όσες μεταλλάξεις προκαλούν υπερευαίσθησία μετρώνται αρνητικά στο τελικό άθροισμα που προκύπτει. Το

τελικό αυτό άθροισμα χρησιμοποιείται από το πρόγραμμα για να αποτυπωθούν τα τελικά αποτελέσματα σε τέσσερα επίπεδα αντοχής: (1) Ευαισθησία (Sensitive), (2) Δυνητική αντοχή χαμηλού επιπέδου (potential low-level resistance), (3) Ενδιάμεση αντοχή (Intermediate resistance), και (4) υψηλή αντοχή (high level resistance). Ο αλγόριθμος HIVdb όπως και οι προηγούμενοι αλγόριθμοι που αναφερθήκαμε παραπάνω, ανανεώνονται σε τακτά χρονικά διαστήματα από μια ομάδα ειδικών εμπειρογνομόνων, επίσης παρέχεται η δυνατότητα στους χρήστες να κάνουν διάφορα σχόλια για τη λειτουργία του αλγόριθμου, τα οποία λαμβάνονται σοβαρά υπόψη για καλύτερη δυνατή ανανέωση του προγράμματος <sup>[38]</sup>.

#### **6.4 Σύστημα Geno2pheno**

Το σύστημα Geneo2pheno αποτελεί μια προσέγγιση μηχανικής μάθησης της πρόβλεψης του φαινότυπου από το γονότυπο, είναι ελεύθερα προσβάσιμος από το German Avenir. Είναι ένα φιλικό προς τον χρήστη εργαλείο, το οποίο αποτελείται από περισσότερα από 800 ζεύγη γονότυπου – φαινότυπου. Χρησιμοποιεί δέντρα απόφασης και μηχανές φορέα υποστήριξης για να φτάσει στο συμπέρασμα της φαινοτυπικής ευαισθησίας στα φάρμακα. Τα δέντρα απόφασης προσφέρουν το πλεονέκτημα ότι η γνώση μπορεί να εξαχθεί ως κανόνας για τον εντοπισμό ενός μονοπατιού από τη ρίζα ενός δέντρου σε ένα φύλλο. Για να διευκολυνθεί η ερμηνεία των προβλέψεων φαινοτύπου αντοχής, η έξοδος του Geno2pheno περιλαμβάνει βαθμολογίες αντίστασης που λαμβάνονται από τη σύγκριση της προβλεπόμενης τιμής και της κατανομής των αλλαγών που παρατηρούνται σε ασθενείς που δεν υποβλήθηκαν σε θεραπεία <sup>[38]</sup>.

## **6.5 Σύστημα γονότυπου Viroseq (ViroSeq™ HIV-1 Genotyping System)**

Το σύστημα γονότυπου ViroSeq™ HIV-1 [39] προορίζεται για χρήση στην ανίχνευση γονιδιωματικών μεταλλάξεων του ιού του HIV, όπου οι μεταλλάξεις αυτές προσδίδουν αντίσταση σε συγκεκριμένους τύπους αντιρετροϊκών φαρμάκων. Δηλαδή το σύστημα Viroseq δρα ως βοηθητικό στοιχείο στη παρακολούθηση και στη θεραπεία της HIV λοίμωξης. Ανιχνεύει μεταλλάξεις στις περιοχές RT και πρωτεάσης του γονιδίου ρολ και παρέχει μια αναφορά που υποδεικνύει γενετικές ενδείξεις ιικής αντοχής. Να σημειωθεί πως το λογισμικό ViroSeq χρησιμοποιεί έναν ιδιόκτητο αλγόριθμο για την ανάλυση των μεταλλάξεων και τη δημιουργία αναφοράς για την αντοχή σε φάρμακα. Ο αλγόριθμος καθορίζει τη σχετική επίδραση των μεταλλάξεων στα πλαίσια ανοικτής ανάγνωσης ανάστροφης μεταγραφάσης και πρωτεάσης στην ανάπτυξη αντοχής στα αντιρετροϊκά φάρμακα. Μεταλλάξεις που περιλαμβάνονται στον αλγόριθμο βασίστηκαν σε:

- Μεταλλάξεις που έχουν κλινική χρησιμότητα όπως έχουν καθιερωθεί από το FDA.
- Μεταλλαγές που αναφέρονται ως πρωτογενείς και δευτερογενείς σύμφωνα με τις συστάσεις της Διεθνούς Οργάνωσης AIDS-ΗΠΑ. Ο κατάλογος αυτός ενημερώνεται περιοδικά και μπορεί να βρεθεί στο δικτυακό τόπο IAS-USA (<http://www.iasusa.org/>).
- Προοπτικές και αναδρομικές μελέτες
- Μεταλλάξεις που ενσωματώθηκαν βασισμένες σε πρόσφατες αναφορές που δημιουργήθηκαν από ειδικούς εμπειρογνώμονες.

Ο αλγόριθμος αναπτύχθηκε για να εξετάσει όλους τους πιθανούς συνδυασμούς μεταλλάξεων που μπορούν να προσδώσουν αντίσταση σε ένα δεδομένο φάρμακο. Χρησιμοποιήθηκε ένα σύστημα αριθμητικής βαθμολόγησης δομημένο έτσι ώστε οι συνδυασμοί μεταλλάξεων που είναι γνωστό ότι δημιουργούν αντίσταση θα πρέπει να αποδίδουν ένα επίπεδο ενδείξεων αντοχής αν ανιχνευτούν στην ανάλυση. Για να προσδιοριστεί το επίπεδο των ενδείξεων αντίστασης σε ένα δεδομένο φάρμακο, οι τιμές των

μεταλλάξεων που είναι παρούσες και σχετικές με το φάρμακο αυτό αθροίζονται δίνοντας συνολική βαθμολογία για το φάρμακο αυτό. Για κάθε φάρμακο, μία συγκεκριμένη θέση κωδικονίου μετριέται μόνο μία φορά χρησιμοποιώντας τη υψηλότερη βαθμολογία μετάλλαξης μεταξύ των μεταλλάξεων που υπάρχουν σε εκείνη την θέση κωδικονίου.

Ένα χαμηλό συνολικό σκορ (κάτω από το 0,5) ερμηνεύεται ως ανεπαρκές για αντίσταση, ενώ μια μέτρια συνολική βαθμολογία (μεταξύ 0,5 και 1) ερμηνεύεται ως πιθανή αντίσταση και ένα υψηλό συνολικό σκορ (1.0 ή μεγαλύτερο) ερμηνεύεται ως ανθεκτικό <sup>[39]</sup>. Καταλαβαίνουμε λοιπόν ότι τα αποτελέσματα του αλγόριθμου αποδίδονται σε τρία επίπεδα αντοχής: αντοχή (Resistant), ενδιάμεση αντοχή (Intermediate resistant) και ευαισθησία (Sensitive).

## **7. Μελέτες που αναφέρονται στη συγκριτική αξιολόγηση των αλγορίθμων ερμηνείας γονοτυπικής αντοχής**

Αναφέραμε παραπάνω πως έχουν αναπτυχθεί αρκετοί αλγόριθμοι οι οποίοι είναι βασισμένοι σε διάφορους κανόνες ώστε να βοηθήσουν τους κλινικούς γιατρούς στην ερμηνεία της γονοτυπικής αντοχής. Αυτοί οι αλγόριθμοι ανανεώνονται συνεχώς με νέα δεδομένα και πολλές φορές δεν είναι σύγχρονοι μεταξύ τους όσον αφορά την εισχώρηση των νέων δεδομένων, επιπρόσθετα ο καθένας από αυτούς βασίζεται σε διαφορετικούς κανόνες. Όλα τα προσφερθέντα, αναπόφευκτα οδήγησαν τους επιστήμονες στο να κάνουν συγκριτική αξιολόγηση των αλγορίθμων ερμηνείας γονοτυπικής αντοχής ώστε να διαπιστώσουν τυχόν αποκλίσεις αλλά και να δουν τα σημεία που συμφωνούν. Παρακάτω θα αναφερθούμε σε μελέτες που έχουν γίνει στο παρελθόν πάνω στη συγκριτική αξιολόγηση διάφορων αλγορίθμων γονοτυπικής αντοχής, ώστε να μπορέσουμε στη συνέχεια να βγάλουμε συμπεράσματα όσον αφορά και τα αποτελέσματα της δικής μας μελέτης.

Στη βόρεια Καλιφόρνια οι Ravela και συν <sup>[8]</sup> απομόνωσαν στελέχη από 2.045 άτομα, οι αλληλουχίες αυτές (2.045) ελέχθησαν για 15 φάρμακα. Επομένως σαν σύνολο είχαν 30.675 ερμηνείες (2.045 αλληλουχίες \* 15 φάρμακα). Οι επιστήμονες εφάρμοσαν τέσσερις αλγόριθμους στις ακολουθίες των απομονωμένων στελεχών, αξίζει να σημειωθεί πως οι αλγόριθμοι ήταν ελεύθερα προσβάσιμοι στο κοινό. Οι αλγόριθμοι που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι:

- ✓ ANRS-3-02
- ✓ TRUGENE VG-1-6
- ✓ REGA 5.5
- ✓ HIVdb -8-02

Οι ερμηνείες της ανθεκτικότητας των φαρμάκων ταξινομήθηκαν ως S (sensitive) για ευαίσθητα, I ( intermediate ) για ενδιάμεση ευαισθησία και R (resistant ) για ανθεκτικότητα. Από τις 30.675 ερμηνείες, το 4,4% ήταν εντελώς διαφορετικές μεταξύ τους, με τουλάχιστον έναν αλγόριθμο να αποδίδει ένα S και τον άλλον ένα R, Το 29,2% ήταν εν μέρει ασύμβατοι , με έναν τουλάχιστον αλγόριθμο να αποδίδει έναν S και έναν άλλο I ή τουλάχιστον έναν αλγόριθμο που αντιστοιχεί σε ένα I και έναν άλλον σε R. και το 66,4% έδειξε πλήρη συμφωνία, δηλαδή και οι τέσσερις αλγόριθμοι έδιναν την ίδια ερμηνεία. Στη μελέτη αυτή τα 2/3 των αλγορίθμων συμφώνησαν απόλυτα μεταξύ τους, ενώ παρατηρήθηκαν διαφωνίες σε νουκλεοσιδικά ανάλογα. Το συμπέρασμα της μελέτης ήταν πως είναι πολύ σημαντικό να ερμηνεύονται τα αποτελέσματα από τους ειδικούς και ειδικότερα αυτά τα αποτελέσματα των ασθενών που εμφανίζουν πολλές και πολύπλοκες μεταλλάξεις.

Σε μια άλλη μελέτη οι De Luka και συν<sup>[40]</sup> εξέτασαν 261 άτομα τα οποία είχαν λάβει ισχυρή αντιρετροϊκή θεραπεία για τουλάχιστον 3 μήνες και εμφάνισαν ιολογική αποτυχία. Στη μελέτη αυτή οι επιστήμονες αξιολόγησαν τη συσχέτιση της βαθμολογίας γονοτυπικής ευαισθησίας (GSS- genotypic

susceptibility score) του σχήματος σύμφωνα με 11 συστήματα ερμηνείας. Τα συστήματα ερμηνείας που χρησιμοποιήθηκαν ήταν :

- ✓ Stanford hivdb (ανανέωση Ιούνιο 2001)
- ✓ ANRS AC11 (ανανέωση Νοέμβριος 2000)
- ✓ Rega 4.0(ανανέωση 2000)
- ✓ GuideLines 3.0 (Φεβρουάριος 2001)
- ✓ Retrogram 1.4 (ανανέωση Μάιος 2001)
- ✓ RCGb (ανανέωση 2000)
- ✓ HIVresistanceWeb (ανανέωση 2000)
- ✓ Mene´ndez-Ariasb ( ανανέωση 2000)
- ✓ CHL 3.2 (ανανέωση 2001)
- ✓ Detroit Medical Center (ανανέωση 2000)
- ✓ Sao Paulo University (ανανέωση 2001)

Η ανάλυση αυτή έδειξε πως 3/11 αλγόριθμους (ANRS AC11, REGA 4.0, GuideLines 3.0) έκαναν στατιστικά σημαντική πρόβλεψη ανταπόκρισης στη θεραπεία στους 3 μήνες, ενώ 4/11 αλγόριθμους (GuideLines 3.0, HIVdb, HIVresistanceWeb, Retrogram 1.4) στους 6 μήνες. Το συμπέρασμα στο οποίο κατέληξε η μελέτη αυτή είναι πως οι διαφορές που παρουσιάζονται στους διάφορους αλγόριθμους μπορούν να επηρεάσουν τόσο την κατάλληλη επιλογή της αντιρετροϊκής θεραπείας ώστε να ανταποκριθεί ο εκάστοτε ασθενής, όσο και την κλινική πορεία του κάθε ασθενή.

Οι επιστημονική ομάδα των Snoeck και συν <sup>[41]</sup> εξέτασαν την πρόβλεψη ανταπόκρισης των ασθενών στην αντιρετροϊκή θεραπεία μέσω 4 διαφορετικών αλγόριθμων ερμηνείας. Οι αλληλουχίες συλλέχθηκαν μέσω μιας παγκόσμιας προσπάθειας για τη δημιουργία μιας βάσης δεδομένων με ακολουθίες υποτύπων μη B, και συγκεντρώθηκαν δημογραφικές και κλινικές πληροφορίες για τους ασθενείς. Οι αλγόριθμοι που χρησιμοποιήθηκαν ήταν :

- ✓ Rega 6.3
- ✓ HIVDB (08/04)
- ✓ ANRS (07/04)
- ✓ VGI 8.0

Η συγκεκριμένη μελέτη παρατήρησε μικρές αποκλίσεις οι οποίες οφείλονταν σε κάποιους συνδυασμούς μεταλλαγών, δηλαδή συνολικά οι διαφορετικοί αλγόριθμοι συμφώνησαν καλά στο επίπεδο αντοχής που σημειώθηκε.

Οι Vegne και συν <sup>[42]</sup> εξέτασαν δείγματα από 428 ασθενείς, από τους οποίους 272 ήταν μη θεραπευμένοι, δηλαδή ασθενείς που δεν λάμβαναν κάποια θεραπεία και 156 ασθενείς που λάμβαναν θεραπεία. Χρησιμοποιήθηκαν 3 αλγόριθμοι οι:

- ✓ ANRS 3/2002
- ✓ Stanford HIVdb 8/2003
- ✓ REGA 5.5 2002

Όλοι οι αλγόριθμοι ερμήνευσαν ως ευαίσθητη (sensitive-S) , την πλειοψηφία των αλληλουχιών των ασθενών που δεν είχαν λάβει προηγουμένως κάποια θεραπεία. Ο αλγόριθμος REGA βαθμολόγησε τις περισσότερες αλληλουχίες ως ενδιάμεσα ανθεκτικές (intermediate –I) για τους περισσότερους PIs, ενώ σχεδόν καμία ακολουθία δεν βαθμολογήθηκε ως ενδιάμεσα ανθεκτική από τον αλγόριθμο ANRS. Όσον αφορά τον πληθυσμό των ασθενών που είχαν υποβληθεί σε θεραπεία η πλειοψηφία των αλληλουχιών βαθμολογήθηκαν επίσης ως ευαίσθητες (sensitive- S) από τους 3 αλγόριθμους. Ενώ ο αριθμός των ενδιάμεσων ανθεκτικών και ανθεκτικών αποτελεσμάτων αυξήθηκε για όλους τους αλγόριθμους. Πάλι ο αλγόριθμος REGA βαθμολόγησε αρκετές αλληλουχίες ως ενδιάμεσα ανθεκτικές για τους PIs αλλά και για τους RTIs.

Η μελέτη αυτή κατέληξε πως οι αποκλίσεις που παρατηρήθηκαν στους μη θεραπευμένους ασθενείς αφορούσαν ως επί το πλείστον διαφορές στην ερμηνεία της αντοχής σε αναστολείς πρωτεάσης λόγω της ύπαρξης μεταλλάξεων αντοχής σε αλληλουχίες μη B υπότυπων. Ενώ οι αποκλίσεις που παρατηρήθηκαν στους ασθενείς που είχαν λάβει θεραπεία αφορούσαν διαφορές στην ερμηνεία αντοχής στα νουκλεοσιδικά ανάλογα.

Οι Kijjak και συν <sup>[43]</sup> εξέτασαν δεδομένα από 293 άτομα για 14 αντιρετροϊκά φάρμακα, ελέγχοντας αν οι 3 διαφορετικοί αλγόριθμοι που χρησιμοποίησαν παρουσιάζουν συγκλίσεις ή αποκλίσεις ως προς το αποτέλεσμα. Οι ερμηνείες της ανθεκτικότητας των φαρμάκων ταξινομήθηκαν ως S (sensitive) για ευαίσθητα, I ( intermediate ) για ενδιάμεση ευαισθησία και R (resistant ) για ανθεκτικότητα. Οι 3 αλγόριθμοι που χρησιμοποιήθηκαν είναι:

- ✓ Stanford University Database (SU)
- ✓ TruGene (Visible Genetics, Canada) (VG)
- ✓ VirtualPhenotype (Virco, Belgium) (VP)

Απόλυτη συμφωνία ως προς τα επίπεδα της ανθεκτικότητας των φαρμάκων παρατηρήθηκε σε 40/293 δείγματα. Χαμηλή συμφωνία στην ερμηνεία παρατηρήθηκε για τους περισσότερους αναστολείς της νουκλεοσιδικής ανάστροφης μεταγραφάσης (NRTIs), ενώ τα αποτελέσματα συμφώνησαν σε μεγάλο βαθμό για όλους τους μη νουκλεοσιδικούς αναστολείς της ανάστροφης μεταγραφάσης (NNRTIs) και τους περισσότερους αναστολείς πρωτεάσης (PIs). Σε ζευγαρώδεις συγκρίσεις, διαπιστώθηκαν ανακολουθίες μεταξύ SU και VP σε πάνω από το 50% των δειγμάτων ενώ το επίπεδο διαφωνίας μεταξύ VG και VP υπερέβαινε το 40%. Το συμπέρασμα στο οποίο κατέληξε αυτή η εργασία είναι πως η ερμηνεία της γονοτυπικής αντοχής είναι ιδιαίτερα δύσκολη, και πως οι αλγόριθμοι πρέπει να ακολουθούν μια κοινή γραμμή.

Μια άλλη ομάδα επιστημόνων οι Fox και συν <sup>[44]</sup> μελέτησαν τη συμφωνία μεταξύ των συστημάτων γονοτυπικής ερμηνείας για την πρόβλεψη της αντοχής στο TVP/r και DRV/r. Οι ερμηνείες της ανθεκτικότητας των φαρμάκων ταξινομήθηκαν ως S (sensitive) για ευαίσθητα, I ( intermediate) για ενδιάμεση ευαισθησία και R (resistant ) για ανθεκτικότητα όπως και στις προηγούμενες μελέτες. Χρησιμοποιήθηκαν δεδομένα από το EuroSIDA, η οποία είναι μια προοπτική, παρατηρητική

ομάδα περισσότερων από 14.200 ασθενών με HIV-1 από 93 κέντρα σε 31 ευρωπαϊκές χώρες, συν το Ισραήλ και της Αργεντινής. Οι αλγόριθμοι που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι:

- ✓ REGA: version 7.1 □
- ✓ ANRS: version 2006 □
- ✓ Stanford University: version 4.2.9 □
- ✓ Kohlbrenner et al: 2004

Η μελέτη κατέληξε πως ήταν ανεπαρκής προς μέτρια για τον προσδιορισμό της αντοχής σε TPV/r και ότι η συνάφεια μεταξύ των επιπέδων αντοχής ήταν χαμηλή για το DRV/r.

Μια άλλη ομάδα επιστημόνων οι Martin Stürmer και συν [45] μελέτησαν 26 δείγματα ασθενών οι οποίοι είχαν μολυνθεί με τον ιό του HIV-1. Οι επιστήμονες σύγκριναν τα αποτελέσματα που έλαβαν χρησιμοποιώντας εννέα διαφορετικά συστήματα ερμηνείας ανθεκτικότητας για τον γονότυπο του HIV-1 και εντόπισαν μοτίβα μετάλλαξης που ευθύνονται για διαφορές μεταξύ αυτών των συστημάτων. Οι γονότυποι HIV-1 για τους 26 ασθενείς ελήφθησαν χρησιμοποιώντας το ViroSeq HIV-1 Genotyping System (Applied Biosystems). Τα 9 συστήματα/αλγόριθμοι ερμηνείας ανθεκτικότητας που χρησιμοποιήθηκαν ήταν:

- ✓ Virtual Phenotype 1.4 και 1.5 (VPT; Virco, Mechelen, Belgium)
- ✓ Geno2Pheno 1 (G2P; <http://cartan.gmd.de/geno2pheno.html>)
- ✓ Report 2.5 (AB; Applied Biosystems)
- ✓ Stanford HIVSEQprogram Beta test 2001 <http://hivdb.stanford.edu/>
- ✓ ANRS AC11 2000 (ANRS : ABL, Luxembourg)
- ✓ Detroit Medical Center (DMC; ABL)
- ✓ Grupo de Aconselhamento Viroológico (GAV; ABL)
- ✓ CHL 3.2 (CHL; ABL)
- ✓ Rega 5.0 (REGA; ABL)

Οι αλγόριθμοι VPT και G2P διαθέτουν δυο επίπεδα αντίστασης, δηλαδή βαθμολογούν ένα αποτέλεσμα ως ανθεκτικό (resistant-R) ή ευαίσθητο (sensitive-S), το STF έχει πέντε διαφορετικά επίπεδα αντίστασης ,

ενώ τα υπόλοιπα συστήματα διαθέτουν τρία επίπεδα αντίστασης ανθεκτικό, ευαίσθητο, ενδιάμεσης ανθεκτικότητας (resistant-R, sensitive-S, intermediate-I). Για λόγους απλούστευσης, τα πέντε διαφορετικά επίπεδα που δόθηκαν από το STF μειώθηκαν σε τρία: ευαίσθητα (συμπεριλαμβανόμενων των δειγμάτων που ερμηνεύονται ως δυνητικά χαμηλής αντοχής και χαμηλής αντοχής), ενδιάμεσα και ανθεκτικά. Τα φάρμακα για τα οποία μελετήθηκε η αντοχή άνηκαν στη κατηγορία των NRTIs (ZDV, ddI, ddC, d4T, 3TC και ABC), στη κατηγορία των NNRTIs (NVP, DLV και EFV), και PIs (IDV, RTV, SQV, NFV και APV). Οι αλγόριθμοι που χρησιμοποιήθηκαν παρουσίασαν αποκλίσεις στη μελέτη αυτή με αποτέλεσμα να καταδεικνύεται πως οι αλγόριθμοι αυτοί είναι επιρρεπής στην αποτύπωση διακριτών αποτελεσμάτων. Στη παρούσα μελέτη ο μεγαλύτερος βαθμός συσχέτισης με βάση το βαθμολογικό σκορ βρέθηκε για τα ακόλουθα φάρμακα:

- ✓ nelfinavir (23/26)
- ✓ indinavir, ritonavir, saquinavir (22/26)
- ✓ zidovudine, nevirapine (21/26)
- ✓ lopinavir, efavirenz (18/26)
- ✓ amprenavir, delavirdine (17/26)
- ✓ stavudine, abacavir (13/26)
- ✓ zalcitabine (7/26)
- ✓ didanosine (5/26)

Η μελέτη αυτή κατέληξε στο συμπέρασμα πως παρά τις αποκλίσεις που υπάρχουν μεταξύ των αλγορίθμων δεν θα προτιμούσαμε κάποιον αλγόριθμο έναντι κάποιου άλλου, αυτό όμως που πρέπει να γίνει είναι να εφαρμοστούν καθολικοί κανόνες και να οριστούν τυποποιημένα επίπεδα αντοχής για την πρόβλεψη της ανθεκτικότητας στα φάρμακα ώστε να εξαλείφει η σύγχυση που προκαλείται κατά τη σύγκριση των αποτελεσμάτων με τη χρήση διαφορετικών συστημάτων γονοτυπικής ερμηνείας.

# Μέρος 2<sup>ο</sup>

## 1. Σκοπός της διπλωματικής εργασίας

Σκοπός της μελέτης είναι η εκτίμηση και η σύγκριση των επιπέδων αντοχής και της ανταπόκρισης στην αντιρετροϊκή θεραπεία μέσω τριών διαθέσιμων αλγορίθμων, του REGA, του ANRS και του ιδιόκτητου αλγόριθμου της εμπορικά διαθέσιμης βάσης VIROSEQ.

Στη μελέτη μας απομονώθηκαν στελέχη από 120 ασθενείς οι οποίοι είχαν ανιχνεύσιμο ιϊκό φορτίο. Οι 120 αλληλουχίες ελέχθησαν για 19 αντιρετροϊκά φάρμακα, δηλαδή συνολικά μελετήθηκαν 2.280 αλληλουχίες (120 αλληλουχίες \* 19 φάρμακα). Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση των στελεχών είναι η μέθοδος ViroSeq™ HIV-1 Genotyping System v2.0 η οποία διαθέτει επίσης έναν ιδιόκτητο αλγόριθμο ο οποίος μέσα από ένα σύστημα αριθμητικής βαθμολόγησης αποδίδει τρία επίπεδα αντοχής, αντοχή (Resistant), ενδιάμεση αντοχή (Intermediate resistant) και ευαισθησία (Sensitive). Στη συνέχεια εφαρμόσαμε άλλους δυο αλγόριθμους στις αλληλουχίες των απομονωμένων στελεχών, τον αλγόριθμο REGA και τον αλγόριθμο ANRS, οι οποίοι είναι ελεύθερα προσβάσιμοι στο διαδίκτυο.

Στόχος της παρούσας μελέτης είναι να διερευνηθεί το επίπεδο συμφωνίας αλλά και διαφωνίας των τριών (3) αυτών ευρέως χρησιμοποιούμενων αλγορίθμων σε δεκαεννιά (19) αντιρετροϊκά φάρμακα σε δείγματα εκατό είκοσι (120) ασθενών. Το παραπάνω αποτελεί πολύ σημαντικό γεγονός καθώς σύμφωνα με τις κατευθυντήριες γραμμές η χρησιμότητα της δοκιμής ανθεκτικότητας των αντιρετροϊκών φαρμάκων είναι υψίστης σημασίας στη κλινική πρακτική. Από τα αποτελέσματα της γονοτυπικής αντοχής, τα οποία ερμηνεύονται μέσω των αλγορίθμων, οι

κλινικοί γιατροί καθορίζουν την εκάστοτε αγωγή των ασθενών. Επομένως, αποτελεί επιτακτική ανάγκη να εξετάζονται οι διάφοροι αλγόριθμοι γονοτυπικής αντοχής και οι ανακολουθίες που ενδεχομένως παρουσιάζουν καθώς υπακούν σε διαφορετικούς κανόνες ο καθένας ώστε να ενημερωθούν οι κλινικοί γιατροί πριν χορηγήσουν νέα αγωγή στους ασθενείς ή αλλάξουν την παλιά.

## **2. Υλικά – Μέθοδοι**

### **2.1 Επιλογή δείγματος**

Έγινε έλεγχος γονοτυπικής αντοχής σε εκατό είκοσι (120) τυχαία δείγματα ασθενών (**Πίνακας: 3.1, 3.2**) που στάλθηκαν σχεδόν από όλα τα μεγάλα νοσοκομεία της Αθήνας αλλά και από κάποια της επαρχίας (**Πίνακας: 3**). Είναι σημαντικό να υπογραμμιστεί πως τα δείγματα των ασθενών ήρθαν με ψευδώνυμα στο Εθνικό Κέντρο Αναφοράς Ρετροϊών και στο εργαστήριο σε κάθε δείγμα δόθηκε ένας μοναδικός αριθμός αρχείου. Όπως αναφέραμε παραπάνω εξετάστηκαν τυχαία τα 120 πρώτα δείγματα που ήρθαν στο εργαστήριο και σε όλες τις περιπτώσεις χρησιμοποιήθηκε το πλάσμα των ασθενών, επιπρόσθετα όλοι οι ασθενείς είχαν ανιχνεύσιμο ιικό φορτίο (**Πίνακας: 3.3**). Στην περίπτωση μας επειδή θα μελετήσουμε και θα συγκρίνουμε τα αποτελέσματα αντοχής με τους τρεις διαφορετικούς αλγόριθμους, τα δημογραφικά στοιχεία δεν θα τα χρησιμοποιήσουμε στη παρούσα μελέτη. Τα δημογραφικά χαρακτηριστικά στη φάση αυτή δεν μας είναι χρήσιμα καθώς μελετάμε αποκλειστικά και μόνο το επίπεδο συμφωνίας και διαφωνίας των τριών αλγορίθμων γονοτυπικής αντοχής που επιλέχτηκαν να μελετηθούν, μελετάμε δηλαδή τρεις διαφορετικούς τρόπους ερμηνείας της γονοτυπικής αντοχής.

**Πίνακας 3: Καταγραφή νοσοκομείων που έστειλαν δείγματα στο Εθνικό Κέντρο Αναφοράς Ρετροϊών**

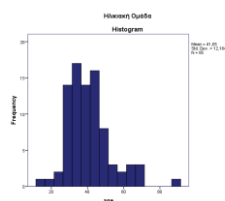
| <b>Νοσοκομεία και μονάδες παραλαβής δειγμάτων</b> |
|---------------------------------------------------|
| <b>251 ΓΕΝ. ΝΟΣΟΚ. ΑΕΡΟΠΟΡΙΑΣ</b>                 |
| <b>251 ΓΝΑ - ΙΑΤΡΕΙΟ ΕΙΔΙΚΩΝ ΛΟΙΜΩΞΕΩΝ</b>        |
| <b>Γ.Ν.Α. «Γ. ΓΕΝΝΗΜΑΤΑΣ»</b>                     |
| <b>ΓΝΑ «ΙΠΠΟΚΡΑΤΕΙΟ» - ΚΕΝΤΡΟ ΑΙΜΟΡΡΟΦΙΛΙΚΩΝ</b>  |
| <b>ΓΝΑ ΑΛΕΞΑΝΔΡΑ</b>                              |
| <b>ΓΝΑ ΛΑΪΚΟ ΠΦ-ΜΕΛ</b>                           |
| <b>Δ.Θ.Κ.Α. - ΥΓΕΙΑ<br/>ΕΥΑΓΓΕΛΙΣΜΟΣ - ΜΕΛ</b>    |
| <b>ΙΠΠΟΚΡΑΤΕΙΟ - ΜΕΛ</b>                          |
| <b>ΛΑΪΚΟ ΝΟΣ. - ΑΙΜΟΡΡΟΦΙΛΙΚΟΙ</b>                |
| <b>ΛΑΪΚΟ ΝΟΣ. Α Π.Π.Κ. - ΕΡΓ. ΛΟΙΜΩΞΕΩΝ</b>       |
| <b>ΛΑΪΚΟ ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ - ΠΑΘ/ΚΗ ΦΥΣ/ΓΙΑ</b>          |
| <b>Π.Γ.Ν. ΑΛΕΞ/ΠΟΛΗΣ - Μ.Ε.Λ.</b>                 |
| <b>Π.Γ.Ν.Α. ΑΤΤΙΚΟΝ - ΧΑΙΔΑΡΙ - Δ.Π.Π.Κ.</b>      |
| <b>Π.Γ.Ν.Ε.Ε.Σ. - ΜΟΝΑΔΑ ΛΟΙΜΩΞΕΩΝ</b>            |
| <b>ΠΑΙΔΩΝ ΑΓ. ΣΟΦΙΑ - Α ΠΑΙΔ. ΠΑΝ. ΚΛΙΝ.</b>      |
| <b>ΣΙΣΜΑΝΟΓΛΕΙΟ - ΜΟΝΑΔΑ ΛΟΙΜΩΞΕΩΝ</b>            |
| <b>ΤΖΑΝΕΙΟ ΝΟΣ. ΠΕΙΡΑΙΑ - Β Π.Κ.</b>              |
| <b>ΥΓΕΙΑ</b>                                      |

Μελετήσαμε αλληλουχίες από 120 ασθενείς, όπως αναφέραμε τα δημογραφικά στοιχεία δεν μας είναι απαραίτητα στη μελέτη αλλά αξίζει να καταγράψουμε κάποια βασικά χαρακτηριστικά του δείγματος μας. Τα δείγματα ήταν ανώνυμα, το παραπτεμπτικό είχαν έναν ειδικό κωδικό που χαρακτήριζε το δείγμα. Στη περίπτωση μας διαθέτουμε στοιχεία φύλου και ηλικίας για 67 άντρες και 18 γυναίκες, ενώ λείπει η ηλικία από τα παραπτεμπτικά για 29

άντρες και για 1 γυναίκα. Επίσης σε 5 παραπεμπτικά λείπει η ηλικία και το φύλο.

**Πίνακας 3.1 Μέτρα Θέσης για την ηλικία των ασθενών**

| Descriptives |                                  |             |           |            |
|--------------|----------------------------------|-------------|-----------|------------|
|              |                                  |             | Statistic | Std. Error |
| age          | Mean                             |             | 41,05     | 1,319      |
|              | 95% Confidence Interval for Mean | Lower Bound | 38,42     |            |
|              |                                  | Upper Bound | 43,67     |            |
|              | 5% Trimmed Mean                  |             | 40,35     |            |
|              | Median                           |             | 40,00     |            |
|              | Variance                         |             | 147,974   |            |
|              | Std. Deviation                   |             | 12,164    |            |
|              | Minimum                          |             | 14        |            |
|              | Maximum                          |             | 88        |            |
|              | Range                            |             | 74        |            |
|              | Interquartile Range              |             | 14        |            |
|              | Skewness                         |             | 1,110     | ,261       |
|              | Kurtosis                         |             | 2,250     | ,517       |



**Διάγραμμα 3: Μέσος όρος ηλικίας των ασθενών**

Στον **Πίνακα 3.1** βλέπουμε τα μέτρα θέσης για τους ασθενείς:

- Ο μέσος όρος (Mean) ηλικίας των ασθενών είναι 41,05 έτη.
- Η διάμεσος (Median) για την μεταβλητή age (ηλικία) είναι τα 40 έτη.
- Η διακύμανση (Variance) για την μεταβλητή age είναι 147,974. Η διακύμανση είναι ο μέσος όρος των τετραγωνικών αποκλίσεων των τιμών από την μέση τιμή.
- Η τυπική απόκλιση (Standard Deviation) για την μεταβλητή age είναι 12,164 έτη. Αξίζει να σημειωθεί πως η τυπική απόκλιση δείχνει πόσο πολύ « απλώνονται» οι τιμές της κατανομής γύρω από το μέσο όρο. Η τυπική απόκλιση εκφράζεται σε μονάδες μέτρησης ίδιες με αυτές του μέσου όρου, και όσο μικρότερη είναι τόσο πιο κοντά στο μέσο όρο είναι οι περισσότερες τιμές της κατανομής. Αν πολλές τιμές της κατανομής βρίσκονται μακριά από το μέσο όρο τότε η τυπική απόκλιση είναι μεγαλύτερη.
- Το εύρος (Range) για την μεταβλητή age είναι 74. Το εύρος είναι η έκταση του μικρότερου διαστήματος που περιέχει όλα τα δεδομένα και προκύπτει από τη διαφορά της μικρότερης
- Η ελάχιστη (Minimum) τιμή ηλικίας που παρατηρείται είναι τα 14 έτη.
- Η μέγιστη (Maximum) τιμή ηλικίας που παρατηρείται είναι τα 88 έτη.
- Η Ασυμμετρία (Skewness) για την μεταβλητή age είναι 1,110. Ο συντελεστής ασυμμετρίας (skewness) δίνει πληροφορίες για την ασυμμετρία της κατανομής των δεδομένων. Τιμές κοντά στο μηδέν παρέχουν ενδείξεις ότι η κατανομή των παρατηρήσεων είναι συμμετρική. Αρνητικές τιμές του συντελεστή ασυμμετρίας είναι ένδειξη ότι η κατανομή παρουσιάζει αρνητική ή αριστερή ασυμμετρία. Τέλος η κατανομή είναι θετικά ή δεξιά ασύμμετρη όταν έχουμε θετικές τιμές. Όταν η κατανομή είναι θετικά ασύμμετρη ο μέσος των παρατηρήσεων είναι μεγαλύτερος από τη διάμεσο, η οποία είναι μεγαλύτερη με την σειρά της από την κορυφή. Το ακριβώς αντίθετο ισχύει για την περίπτωση της αρνητικής ασυμμετρίας. Δηλαδή ο μέσος είναι μικρότερος από τη διάμεσο η οποία είναι μικρότερη από την κορυφή. Για την περίπτωση της συμμετρικής κατανομής αυτά τα τρία μέτρα ταυτίζονται.
- Η Κύρτωση (Kurtosis) για την μεταβλητή age είναι 2,250. Ο συντελεστής κύρτωσης αναφέρεται στην κυρτότητα της κατανομής των δεδομένων. Αρνητικές τιμές σημαίνουν ότι η κατανομή είναι πλατύκυρτη ενώ θετικές τιμές ότι είναι λεπτόκυρτη. Τιμές κοντά στο μηδέν είναι ένδειξη ότι η κατανομή είναι μεσόκυρτη. Για την μεταβλητή age οι τιμές είναι κοντά στο μηδέν, επομένως φαίνεται η κατανομή να είναι κανονική, όμως δεν είναι.

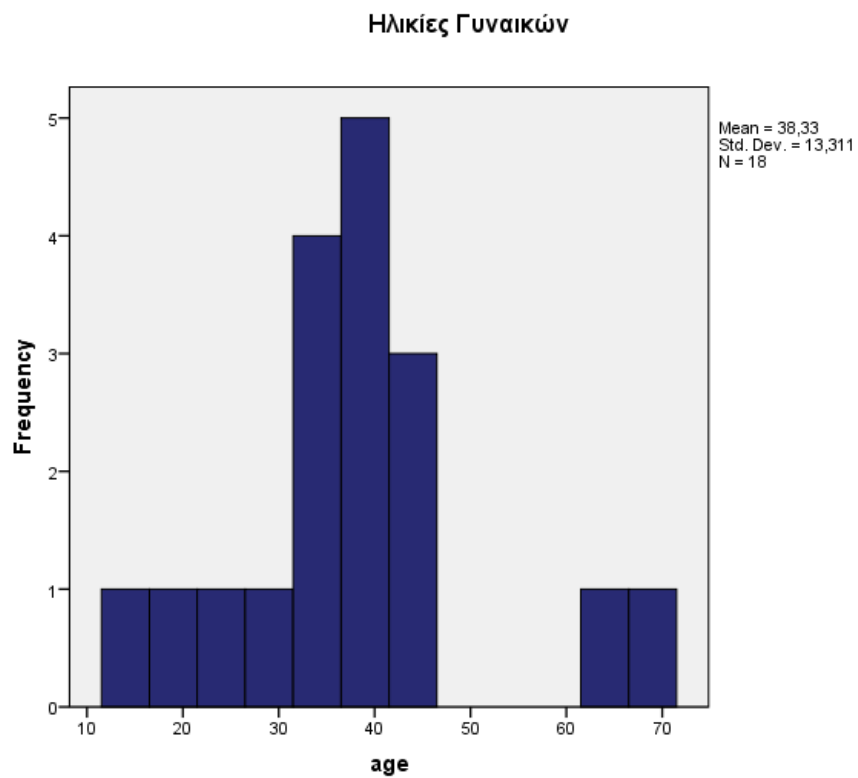
Στον **Πίνακα 3.2** παρουσιάζονται τα μέτρα θέσης για ηλικία των ασθενών ανά φύλο, ενώ στα **Διαγράμματα 4 και 5** ο μέσος όρος ηλικιών ανά φύλο.

**Πίνακας 3.2 Μέτρα θέσης ηλικίας ασθενών ανά φύλο**

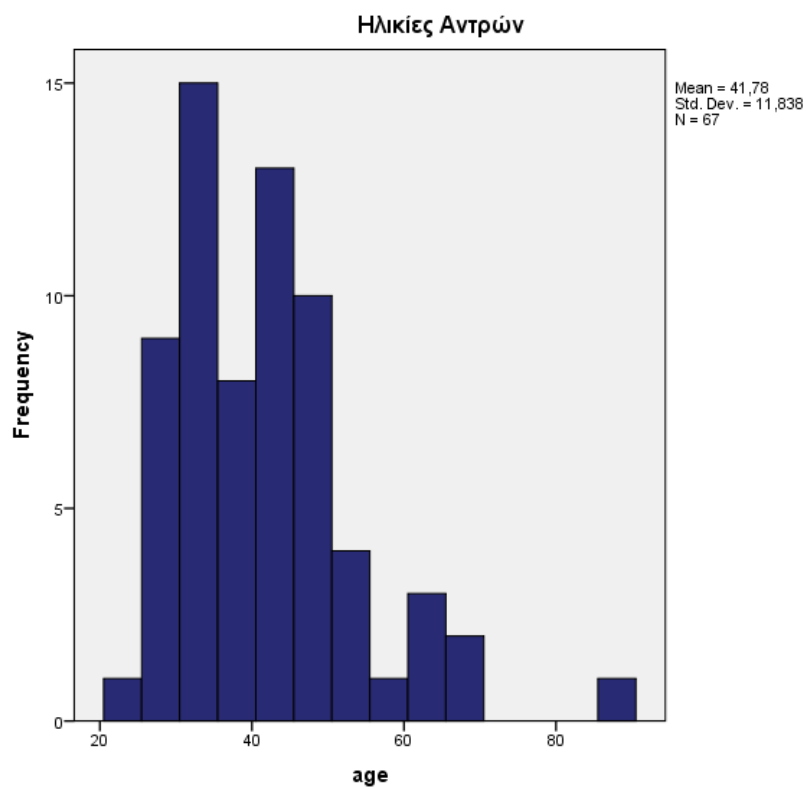
| Descriptives <sup>a</sup> |        |                                  |             |            |
|---------------------------|--------|----------------------------------|-------------|------------|
|                           | SEX    |                                  | Statistic   | Std. Error |
| AGE                       | FEMALE | Mean                             | 38,33       | 3,137      |
|                           |        | 95% Confidence Interval for Mean | Lower Bound | 31,71      |
|                           |        |                                  | Upper Bound | 44,95      |
|                           |        | 5% Trimmed Mean                  | 37,87       |            |
|                           |        | Median                           | 39,00       |            |
|                           |        | Variance                         | 177,176     |            |
|                           |        | Std. Deviation                   | 13,311      |            |
|                           |        | Minimum                          | 14          |            |
|                           |        | Maximum                          | 71          |            |
|                           |        | Range                            | 57          |            |
|                           |        | Interquartile Range              | 10          |            |
|                           |        | Skewness                         | ,679        | ,536       |
|                           |        | Kurtosis                         | 1,671       | 1,038      |
|                           | MALE   | Mean                             | 41,78       | 1,446      |
|                           |        | 95% Confidence Interval for Mean | Lower Bound | 38,89      |
|                           |        |                                  | Upper Bound | 44,66      |
|                           |        | 5% Trimmed Mean                  | 40,78       |            |
|                           |        | Median                           | 41,00       |            |
|                           |        | Variance                         | 140,146     |            |
|                           |        | Std. Deviation                   | 11,838      |            |
|                           |        | Minimum                          | 23          |            |
|                           |        | Maximum                          | 88          |            |
|                           |        | Range                            | 65          |            |
|                           |        | Interquartile Range              | 16          |            |
|                           |        | Skewness                         | 1,358       | ,293       |
|                           |        | Kurtosis                         | 2,670       | ,578       |

a. There are no valid cases for age when SEX = ,000. Statistics cannot be computed for this level.

- Για τις γυναίκες ο μέσος όρος (Mean) ηλικίας είναι τα 38,33 έτη ενώ για τους άντρες τα 41,78 έτη.
- Η διάμεσος (Median) για τις γυναίκες είναι τα 39 έτη, ενώ για τους άντρες είναι τα 41 έτη.
- Η διακύμανση (Variance) για την μεταβλητή age στη κατηγορία των γυναικών είναι 177,176, ενώ για την κατηγορία των αντρών είναι 140,146.
- Η τυπική απόκλιση (Standard Deviation) για την μεταβλητή στη κατηγορία των γυναικών είναι 13,311, ενώ για την κατηγορία των αντρών είναι 11,838.
- Το εύρος(Range) για την μεταβλητή age στη κατηγορία των γυναικών είναι 57, ενώ για την κατηγορία των αντρών είναι 65.
- Στη κατηγορία των γυναικών η μικρότερη (Minimum) ηλικία που παρατηρείται είναι αυτή των 14 ετών, ενώ στη κατηγορία των αντρών αυτή των 23 ετών.
- Στη κατηγορία των γυναικών η μέγιστη (Maximum) ηλικία που παρατηρείται είναι αυτή των 71 ετών, ενώ στη κατηγορία των αντρών αυτή των 88 ετών.
- Η Ασυμμετρία (Skewness) για την μεταβλητή age είναι στη κατηγορία των γυναικών είναι 0,679, ενώ για την κατηγορία των αντρών είναι 1,358.
- Η Κύρτωση (Kurtosis) για την μεταβλητή age στη κατηγορία των γυναικών είναι 1,671, ενώ για την κατηγορία των αντρών είναι 2,670.



**Διάγραμμα 4: Μέσος όρος ηλικιών για τις γυναίκες**



**Διάγραμμα 5: Μέσος όρος ηλικιών για τους άντρες**

Είναι σημαντικό να υπογραμμίσουμε πως σε όλα τα δείγματα (120) είχε προηγηθεί μέτρηση ιικού φορτίου πριν την διεξαγωγή της μεθόδου της γονοτυπικής αντοχής. Αποτελέσματα ιικού φορτίου έχουμε και για τους 120 ασθενείς (**Πίνακας 3.3**). Όταν λέμε ιικό φορτίο εννοούμε τη ποσότητα του ιού στον οργανισμό, δηλαδή η εξέταση ιικού φορτίου παρουσιάζει την ποσότητα του RNA του HIV που κυκλοφορεί στο αίμα και μετριέται με αντίγραφα/ml. Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται τα μέτρα θέσης για το ιικό φορτίο.

- Ο μέσος όρος (Mean) για το ιικό φορτίο είναι 214897,4167 αντίγραφα/ml.
- Η διάμεσος (Median) για το ιικό φορτίο είναι 61200,0000 αντίγραφα/ml.
- Η διακύμανση (Variance) για το ιικό φορτίο είναι 165876258005,875.
- Η τυπική απόκλιση (Standard Deviation) για το ιικό φορτίο είναι 407279,09105 αντίγραφα/ml
- Το εύρος (Range) για το ιικό φορτίο είναι 2678740,00
- Η ελάχιστη (Minimum) τιμή του ιικού φορτίου που παρουσιάζεται είναι 1260,00 αντίγραφα/ml.
- Η μέγιστη (Maximum) τιμή του ιικού φορτίου που παρουσιάζεται είναι 2680000 αντίγραφα/ml
- Η Ασυμμετρία (Skewness) για την μεταβλητή viral\_load είναι 3,668.
- Η Κύρτωση (Kurtosis) για την μεταβλητή viral\_load είναι 16,144.

**Πίνακας 3.3: Μέτρα θέσης για το ιικό φορτίο των ασθενών**

| Descriptives |                                  |             |             |             |
|--------------|----------------------------------|-------------|-------------|-------------|
|              |                                  |             | Statistic   | Std. Error  |
| viral_load   | Mean                             |             | 214897,4167 | 37179,32423 |
|              | 95% Confidence Interval for Mean | Lower Bound | 141278,6414 |             |
|              |                                  | Upper Bound | 288516,1920 |             |

|                     |                  |      |
|---------------------|------------------|------|
| 5% Trimmed Mean     | 145047,2222      |      |
| Median              | 61200,0000       |      |
| Variance            | 165876258005,875 |      |
| Std. Deviation      | 407279,09105     |      |
| Minimum             | 1260,00          |      |
| Maximum             | 2,68E+6          |      |
| Range               | 2678740,00       |      |
| Interquartile Range | 195725,00        |      |
| Skewness            | 3,668            | ,221 |
| Kurtosis            | 16,144           | ,438 |

## **2.2 Έλεγχος γονοτυπικής αντοχής βάσει του πρωτοκόλλου Viroseq HIV-1 Genotypic System**

Πριν περάσουμε στην αναλυτική καταγραφή του πρωτοκόλλου ViroSeq™ HIV-1 Genotyping System v2.0 [39] που ακολουθήθηκε αξίζει να παρουσιάσουμε κάποιους πίνακες σχετικά με τα αντιδραστήρια και τις συνθήκες αποθήκευσης των αντιδραστηρίων καθώς και τον εξοπλισμό που χρησιμοποιήθηκε.

Το σύστημα γονοτύπου ViroSeq™ HIV-1[39] βασίζεται σε έξι κύριες διαδικασίες:

- ❖ Προετοιμασία δείγματος (Sample Preparation)
- ❖ Αντίστροφη μεταγραφή (Reverse Transcription -RT)
- ❖ Αντίδραση αλυσιδωτής πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction -PCR)
- ❖ Ακολουθία κύκλου (Cycle Sequencing)
- ❖ Αυτόματη ανίχνευση αλληλουχίας (Automated Sequence Detection)
- ❖ Ανάλυση λογισμικού (Software Analysis)

Στον **Πίνακα:4** καταγράφονται τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν σύμφωνα με το πρωτόκολλο ViroSeq™ HIV-1 Genotyping System v2.0 στα διάφορα στάδια της πειραματικής διαδικασίας.

## ViroSeq™ HIV-1 Genotyping System v2.0

| ViroSeq™ HIV-1 Sample Preparation Module                                                          | ViroSeq™ HIV-1 RT-PCR Module                                                                                                                                                                                                                                                                                             | ViroSeq™ HIV-1 Sequencing Module                                                                                                                                                                                        | ViroSeq™ HIV-1 8E5 Control Module                                                                                    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>❖ HIV Viral Lysis Buffer</li> <li>❖ RNA Diluent</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>❖ RT Mix</li> <li>❖ RNase Inhibitor</li> <li>❖ MuLV Reverse Transcriptase</li> <li>❖ HIV PCR Mix</li> <li>❖ AmpliTaq Gold® DNA Polymerase</li> <li>❖ AmpErase® UNG</li> <li>❖ DTT (100 mM)</li> <li>❖ DNA Mass Ladder</li> <li>❖ Agarose Gel Loading Buffer</li> <li>❖</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>❖ HIV SEQ Mix A</li> <li>❖ HIV SEQ Mix B</li> <li>❖ HIV SEQ Mix C</li> <li>❖ HIV SEQ Mix D</li> <li>❖ HIV SEQ Mix F</li> <li>❖ HIV SEQ Mix G</li> <li>❖ HIV SEQ Mix H</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>❖ HIV-1 8E5 Positive Control</li> <li>❖ HIV-1 8E5 Negative Control</li> </ul> |

**Πίνακας 4 : Αντιδραστήρια βάσει πρωτόκολλου ViroSeq™ HIV-1 Genotyping System v2.0**

Εκτός από τα παραπάνω αντιδραστήρια που παρέχονται από ViroSeq Assay Kit υπάρχουν κάποια επιπλέον υλικά που είναι απαραίτητα για την διεκπεραίωση της πειραματικής διαδικασίας τα οποία δεν παρέχονται από το kit. Στον **Πίνακα:5** αναγράφονται τα επιπλέον αναλώσιμα που και τον εργαστηριακό εξοπλισμό που χρησιμοποιήσαμε.

## Αναλώσιμα και Εξοπλισμός που δεν παρέχονται από το ViroSeq Assay Kit

|                                                                                                            |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Ρύγχη πιπτετών από 10 έως 1000μl (Aerosol-resistant tips, RNase-free)                                      |
| Πήκτωμα αγαρόζης, που περιέχει βρωμιούχο αιθίδιο                                                           |
| Σύστημα ηλεκτροφόρησης πηκτής αγαρόζης (κιβώτιο πηκτώματος με παροχή ισχύος 10V / cm γέλης αγαρόζης)       |
| Αλουμινόχαρτο                                                                                              |
| Θάλαμος βιολογικής ασφάλειας (BioSafety hood, laminar flow, clean hood)                                    |
| Φυγόκεντρος, γρήγορη περιστροφή μικροσωληναρίων (2.000 x g)                                                |
| Ψυκτική φυγόκεντρος(21.000 έως 25.000 x g), με ερμητικά σφραγισμένο στροφείο για σωληνάρια των 1.5 mL      |
| Φυγόκεντρος με ρότορα μικροπλάκας                                                                          |
| CENTRI SEP 96™ Well Plates                                                                                 |
| Αιθανόλη, 70% (για καθαρισμό)                                                                              |
| Ισοπροπανόλη 100%, άνυδρη (βαθμός ACS)                                                                     |
| Πιπέτες που μπορούν να διοχετεύουν με σιφώνιο από 0 έως 1000 μL                                            |
| Βιδωτά σωληνάρια, 1,5 mL (αποστειρωμένα, χωρίς RNase / DNase), πρέπει να αντέχουν σε 21,000 έως 25,000 x g |
| Οξικό νάτριο ( 3,0 M, pH 5,2)                                                                              |
| Ρυθμιστικό διάλυμα TBE, 10X                                                                                |
| Λυχνία υπεριώδους φωτός (λυχνία UV 300 nm)                                                                 |
| Αναμικτήρας Vortex, κεφαλή πλατφόρμας (2500 rpm)                                                           |
| Αποστειρωμένο/ αποιονισμένο νερό, χωρίς RNase / DNase                                                      |
| Καταψύκτης και ψυγείο για σωστή φύλαξη των αντιδραστηρίων, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.        |

### Πίνακας 5: Επιπλέον αναλώσιμα και εξοπλισμός που χρησιμοποιήθηκε

Επιπρόσθετα κάτι τελευταίο που πρέπει να καταγραφεί πριν την παρουσίαση της πειραματικής διαδικασίας είναι οι συνθήκες αποθήκευσης τόσο των δειγμάτων των ασθενών όσο και των αντιδραστηρίων ώστε να μην έχουμε ψευδή ή ακαθόριστα αποτελέσματα.

Η αποθήκευση των δειγμάτων πλάσματος πρέπει να γίνεται στους – 65 έως - 80°C.Επίσης δεν θα πρέπει να γίνεται φύλαξη για παραπάνω από 6 μήνες και τα δείγματα πλάσματος δεν πρέπει να παγώσουν-ξεπαγώσουν περισσότερο από δύο φορές.

Στον **Πίνακα 6** παρουσιάζονται οι συνθήκες αποθήκευσης των αντιδραστηρίων του ViroSeq Assay Kit.

## Συνθήκες φύλαξης ViroSeq Assay Kit

| Ενότητες πειράματος                                     | Συνθήκες αποθήκευσης                                                    | Σχόλια                                                                                                                                                                                                                                                    |
|---------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| ViroSeq™ HIV-1 Sample Preparation ViroSeq™ HIV-1 RT-PCR | -15 έως -25°C                                                           | Αφού ανοιχτούν, τα ακόλουθα συστατικά πρέπει να μεταφερθούν και να αποθηκευτούν στην ενισχυμένη περιοχή(amplified DNA area ) στους 2 έως 8 ° C: <ul style="list-style-type: none"> <li>• DNA Mass Ladder</li> <li>• Agarose Gel Loading Buffer</li> </ul> |
| ViroSeq™ HIV-1 8E5 Control                              | -15 έως -25°C                                                           | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Απόψυξη ενός φιαλιδίου θετικού και αρνητικού μάρτυρα του πλάσματος κάθε φορά.</li> <li>• Χρήση με κάθε εκτέλεση του δείγματος.</li> <li>• Μη κατάψυξη εκ νέου.</li> </ul>                                        |
| ViroSeq™ HIV-1 Sequencing                               | Περιοχή μετά την ενίσχυση (Post-Amplification area )<br>-15 έως -25 ° C | Αυτά τα υλικά είναι ευαίσθητα στο φως, επομένως πρέπει να αποφευχθεί η παρατεταμένη έκθεση στο φως.                                                                                                                                                       |

**Πίνακας 6: Συνθήκες φύλαξης ViroSeq Assay Kit**

### **2.2.1 Διαδικασία προετοιμασίας δειγμάτων**

**Σημείωση:** Ο χρόνος ολοκλήρωσης 12 δειγμάτων κυμαίνεται συνολικά στις 2,5 έως 3,0 ώρες. **Σημαντικό!** Εκτελούμε αυτή τη διαδικασία στην περιοχή προενίσχυσης 1(Pre-Amplification Area 1)

### **2.2.2 Διαδικασίες που πρέπει να ρυθμιστούν πριν ξεκινήσουμε το πείραμα**

1. Καλύπτουμε την φυγόκεντρο ψύξης ( $4^{\circ}\text{C}$ ) με το καπάκι σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.
2. Ξεπαγώνουμε τα δείγματα πλάσματος καθώς και ένα θετικό και ένα αρνητικό μάρτυρα σε θερμοκρασία δωματίου ( $15$  έως  $25^{\circ}\text{C}$ ).
3. Για λόγους ασφαλείας κάθε φορά κρατάμε μόνο ένα σωληνάριο δείγματος ανοιχτό.

### **2.2.3 Απομόνωση του ιϊκού RNA του HIV-1 (Extraction RNA)**

1. Αρχικά βγάζουμε τα δείγματα να ξεπαγώσουν σε θερμοκρασία δωματίου.
2. Βάζουμε το Viral Lysis buffer στο κλίβανο  $37^{\circ}\text{C}$ .
3. Στη Hood ετοιμάζουμε τα σωληνάκια που θα χρειαστούμε. Στα σωληνάκια γράφουμε τους αριθμούς των δειγμάτων που θα δουλέψουμε αναλογικά 1,2 ,3.....καθώς και το σύμβολο του θετικού και αρνητικού μάρτυρα ( positive (+), negative (-) )
4. Αφού ξεπαγώσουν τα δείγματα τα κάνουμε vortex για 3-5 δευτερόλεπτα για να αναμιχθούν.
5. Με ένα έγχρωμο μαρκαδόρο μαρκάρουμε τα σωληνάκια από την μεριά που είναι το «αυτάκι» του βιδωτού σωληναρίου (RNase- and DNase-free ) , αυτό θα μας βοηθήσει στο να μη καταστρέψουμε το pellet όταν εμφανιστεί.

6. Έπειτα μέσα στη Hood προσθέτουμε 1 ml πλάσμα σε όλα τα σωληνάρια.
7. Τοποθετούμε τα δείγματα στη φυγόκεντρο ψύξης στους 4 ° C στις 16400 rpm για 70 λεπτά με το σημάδι προσανατολισμό τοποθετημένο προς την έξω πλευρά.
8. Φτιάχνουμε αιθανόλη 70% και την τοποθετούμε στο ψυγείο στους 4 °C.
9. Βγάζουμε προσεκτικά τα δείγματα από την φυγόκεντρο μόλις περάσουν τα 70 λεπτά.
10. Απομακρύνουμε όλο το υπερκείμενο με την πιπέτα. Μπαίνουμε αντίθετα από το σημάδι που έχουμε κάνει με τον μαρκαδόρο με μεγάλη προσοχή ώστε να μην καταστρέψουμε το pellet, το οποίο πολύ πιθανόν να μην είναι ορατό.
11. Έπειτα προσθέτουμε 600 μl Viral lysis buffer σε κάθε σωληνάριο ( το Viral lysis buffer μόλις το βγάλουμε από το κλίβανο το ανακινούμε απαλά διότι κάνει αφρό ).
12. Κάνουμε κάλο vortex στα δείγματα για 3-5 δευτερόλεπτα και τα αφήνουμε για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (15 έως 25 ° C) για να εξασφαλιστεί η πλήρης λύση του ιού.
13. Κάνουμε spin down στα δείγματα.
14. Προσθέτουμε 600 μl ισοπροπανόλη θερμοκρασίας δωματίου (15 έως 25 ° C) και κάνουμε vortex.
15. Φυγοκεντρούμε τα δείγματα στις 14500 rpm για 17 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου..
16. Αφαιρούμε με μεγάλη προσοχή το υπερκείμενο Προσέχουμε μην αφαιρέσουμε το pellet, το οποίο μπορεί να μην είναι απόλυτα ορατό.
17. Προσθέτουμε 1 ml κρύα αιθανόλη 70% (4 ° C) σε κάθε σωληνάριο.
18. Κάνουμε vortex τα δείγματα για 3-5 δευτερόλεπτα ώστε να γίνει ανάμιξη.
19. Φυγοκεντρούμε στις 14500 rpm για 7 λεπτά.
20. Βγάζουμε από το ψυγείο το RNA diluent και το τοποθετούμε στην βάση με τον πάγο, πρέπει να είναι στους 4 ° C.
21. Αφαιρούμε όλο το υπερκείμενο από τα δείγματα, κάνουμε full spin down και τα αφήνουμε να στεγνώσουν για περίπου 10 λεπτά σε

- θερμοκρασία δωματίου (15 έως 25 ° C) ώστε να εξατμιστεί η αιθανόλη. Προσέχουμε να μην μας ξεραθεί το pellet σε αυτό το στάδιο.
22. Στη συνέχεια ανατρέχουμε στο ιικό φορτίο των δειγμάτων και ανάλογα με αυτό προσθέτουμε σε κάθε σωληνάριο 50 μl RNA diluent (αν το ιικό φορτίο είναι < 18000) , και 100 μl RNA diluent (αν το ιικό φορτίο είναι > 18000). Σε αυτό το στάδιο προσπαθούμε να σπάσουμε το pellet. Προσέχουμε πάρα πολύ μην μείνει ποσότητα του pellet στο tip της πιπέτας.
23. Κάνουμε έντονο Vortex στα δείγματα για 10 δευτερόλεπτα για την επανεναιώρηση του pellet. Υπάρχει πιθανότητα να παραμείνει κάποιο αδιάλυτο υλικό.
24. Τοποθετούμε τα δείγματα στους 4<sup>0</sup> C για μισή ώρα ώστε να γίνει ενυδάτωση του pellet.
25. Είναι σημαντικό να υπογραμμίσουμε πως μόλις ολοκληρωθεί η διαδικασία του extraction είτε συνεχίζουμε την υπόλοιπη διαδικασία είτε αποθηκεύουμε τα δείγματα σε βαθιά κατάψυξη ( -65 έως -80 ° C) ώστε να τα δουλέψουμε άλλη μέρα. Δεν πρέπει να καταψύχουμε – αποψύχουμε το RNA περισσότερο από δύο φορές και να φυλάσσουμε το RNA για περισσότερο από δύο εβδομάδες.

#### **2.2.4 Διαδικασία αντίστροφης μεταγραφής - Reverse Transcription (RT)**

**Σημαντικό:** Εκτελούμε αυτήν τη διαδικασία στην περιοχή προενίσχυσης 2 (Pre-Amplification Area 2).

#### **2.2.5 Διαδικασίες που πρέπει να ρυθμιστούν πριν ξεκινήσουμε τη διαδικασία της RT**

1. Αποψύχουμε τα δείγματα RNA.
2. Κάνουμε vortex στα δείγματα για 3-5 δευτερόλεπτα.

3. Στη Hood ετοιμάζουμε τα σωληνάρια της PCR (0.2 mL MicroAmp® Reaction Tube ). Σε κάθε σωληνάριο γράφουμε τον αριθμό πειράματος και τον αριθμό δείγματος.
4. Βγάζουμε από το ψυγείο τα αντιδραστήρια :
  - ✓ MuLV Reverse Transcriptase
  - ✓ DTT
  - ✓ RNase Inhibitor
  - ✓ HIV RT Mix

Τα ένζυμα MuLV Reverse Transcriptase και RNase Inhibitor τα τοποθετούμε στην βάση με τον πάγο ενώ τα άλλα τα αφήνουμε σε θερμοκρασία δωματίου.

5. Ανοίγουμε το cycler, προγραμματίζουμε το κατάλληλο πρόγραμμα και το αφήνουμε να ζεσταθεί με το καπάκι ανοιχτό.

#### **2.2.6 Εκτέλεση διαδικασίας RT**

1. Κάνουμε vortex στα δείγματα και up and down με τη πιπέτα.
2. Στη συνέχεια προσθέτουμε 10μl RNA στα σωληνάρια που ετοιμάσαμε προηγουμένως.
3. Τοποθετούμε τα σωληνάρια στο cycler. Το cycler το έχουμε ρυθμίσει στις παρακάτω θερμοκρασίες:
  - ✓ 65 ° C για 30 λεπτά
  - ✓ 42 ° C για 5 λεπτά
  - ✓ 42 ° C για 60 λεπτά
  - ✓ 99 ° C για 5 λεπτά
  - ✓ 4 ° C για > 10 λεπτά
4. Όσο τα δείγματα είναι στο cycler φτιάχνουμε το master mix σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα:

| Αντιδραστήρια              | Όγκος για 1 Αντίδραση (μL) | Όγκος για 5 Αντίδρασεις (μL) | Όγκος για 15 Αντίδρασεις (μL) |
|----------------------------|----------------------------|------------------------------|-------------------------------|
| HIV RT Mix                 | 8                          | 40                           | 120                           |
| RNase Inhibitor            | 1                          | 5                            | 15                            |
| MuLV Reverse Transcriptase | 1                          | 5                            | 15                            |
| DTT, 100mM                 | 0,4                        | 2,0                          | 6,0                           |
| <b>Τελικός όγκος</b>       | <b>10,4</b>                | <b>52,0</b>                  | <b>156,0</b>                  |

5. Τοποθετούμε το master mix στο ψυγείο στους 4 ° C μέχρι να το χρησιμοποιήσουμε.
6. Όταν το cyclor περάσει τα 5 λεπτά στους 42 ° C κάνουμε παύση (pause) στο cyclor προσθέτουμε σε κάθε σωληνάριο 10μl master mix. και στη συνέχεια κάνουμε επανεκκίνηση (resume) του cyclor.
7. Μετά την ολοκλήρωση του προγράμματος RT κρατάμε τα δείγματα στο cyclor για τουλάχιστον 10 λεπτά στους 4 ° C, αλλά δεν υπερβαίνουμε τις 18 ώρες.
8. Όταν ολοκληρωθεί το πρόγραμμα είτε προχωράμε στη διαδικασία της PCR είτε σταματάμε τη διαδικασία σε αυτό το σημείο και φυλάμε τα δείγματα στους -15 έως -25 ° C μέχρι να είμαστε έτοιμοι να εκτελέσουμε τη PCR. Είναι σημαντικό να μην αποθηκεύσουμε τα δείγματα για περισσότερο από δύο εβδομάδες.

### **2.2.7 Διαδικασία PCR**

**Σημαντικό:** Εκτελούμε αυτήν τη διαδικασία στην περιοχή προενίσχυσης 2 (Pre-Amplification Area 2).

### **2.2.8 Διαδικασίες που πρέπει να ρυθμιστούν πριν ξεκινήσουμε τη διαδικασία της PCR**

1. Εάν τα δείγματα ήταν στο ψυγείο τα αφήνουμε να ξεπαγώσουν σε θερμοκρασία δωματίου (15 έως 25 ° C).
2. Ξεπαγώνουμε το αντιδραστήριο HIV PCR Mix.
3. Κάνουμε vortex για 3-5 δευτερόλεπτα.
4. Βγάζουμε τα αντιδραστήρια AmpliTaq Gold® DNA Polymerase και AmpErase® UNG από το ψυγείο και τα τοποθετούμε σε βάση με πάγο . Πρέπει να είναι σε θερμοκρασία 4 ° C.
5. Κάνουμε vortex για 3-5 δευτερόλεπτα.

### **2.2.9 Διαδικασίες πραγματοποίησης της αντίδρασης PCR**

1. Προετοιμάζουμε το master mix σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα:

| Αντιδραστήρια                | Όγκος για 1 Αντίδραση (μL) | Όγκος για 5 Αντίδρασεις (μL) | Όγκος για 15 Αντίδρασεις (μL) |
|------------------------------|----------------------------|------------------------------|-------------------------------|
| HIV PCR Mix                  | 29,5                       | 147,5                        | 442,5                         |
| AmpliTaq Gold DNA Polymerase | 0,5                        | 2,5                          | 7,5                           |
| AmpErase UNG                 | 1                          | 5                            | 15                            |
| <b>Τελικός όγκος</b>         | <b>31</b>                  | <b>155</b>                   | <b>465</b>                    |

**Σημείωση:** Προετοιμάζουμε πάντα επαρκή ποσότητα για 1 επιπλέον αντίδραση για να αντισταθμίσουμε την απώλεια στο πιπετάρισμα.

1. Κάνουμε vortex το PCR Mastermix για 3-5 δευτερόλεπτά.
2. Τοποθετούμε το Mastermix στους 4 ° C μέχρι να το χρησιμοποιήσουμε.
3. Προσθέτουμε 30 μL PCR Mastermix σε κάθε σωληνάριο αντίδρασης RT που περιέχει HIV-1 cDNA. Ο τελικός όγκος τώρα στα σωληνάρια είναι 50 μl.

4. Χρησιμοποιούμε μόνο τον θερμικό ανακυκλωτή- *cycler* GeneAmp® 9600 ή 9700 που βρίσκεται στην περιοχή εργασίας 3.
5. Ρυθμίζουμε το πρόγραμμα θερμικής ανακύκλωσης ως εξής:

| Θερμοκρασία ° C | Χρόνος                                         | Κύκλοι |
|-----------------|------------------------------------------------|--------|
| 50              | 10 min                                         | 1      |
| 93              | 12 min                                         | 1      |
| 93              | 20 sec                                         | 40     |
| 64              | 45 sec                                         | 40     |
| 66              | 3 min                                          | 40     |
| 72              | 10 min                                         | 1      |
| 4               | Μπορούμε να τα κρατήσουμε σε αυτή τη κατάσταση | -      |

6. Μεταφέρουμε τα σωλήνες στον θερμικό κυκλοποιητή- *cycler* και ξεκινάμε το πρόγραμμα.
7. Όταν ολοκληρωθεί το πρόγραμμα είτε προχωράμε στα επόμενα βήματα είτε σταματάμε τη διαδικασία και φυλάμε τα δείγματα στους -15 έως -25 ° C. Δεν πρέπει να αφήσουμε τα σωληνάρια σε αναμονή για περισσότερο από 24 ώρες διότι το ένζυμο UNG μπορεί να καταστρέψει το ενισχυμένο DNA μας.

#### **2.2.10 Διαδικασία καθαρισμού του PCR προϊόντος με Exo- Sap**

*Μόλις τελειώσει η PCR προχωράμε την διαδικασία exo-sap*

1. Προσθέτουμε 3  $\mu$ l *exo-sap* σε κάθε δείγμα
2. Κάνουμε *vortex* τα δείγματα και *spin down*.
3. Τέλος τοποθετούμε τα δείγματα στο *cycler* στο αντίστοιχο πρόγραμμα για 30 λεπτά.

### **2.2.11 Διαδικασία Cycle Sequencing**

**Σημαντικό:** Εκτελούμε αυτή τη διαδικασία στην περιοχή 3 μετά την ενίσχυση (Post-Amplification Area 3).

### **2.2.12 Διαδικασία καθαρισμού με αιθανόλη και οξικό οξύ**

1. Σε ένα σωληνάριο προσθέτουμε 10ml αιθανόλη και 400μl οξικό οξύ .
2. Κάνουμε vortex για να αναμιχθεί το δείγμα.
3. Προσθέτουμε 52μl από το παραπάνω μίγμα σε κάθε φρεάτιο στη πλάκα μας με τη πολυκάναλη πιπέτα.
4. Σκεπάζουμε την πλάκα μας με αλουμινόχαρτο.
5. Κάνουμε καλό vortex στη πλάκα μας.
6. Φυγοκεντρούμε τη πλάκα μας στις 2000 στροφές για 20 λεπτά.
7. Μόλις σταματήσει η φυγόκεντρος βγάζουμε με μεγάλη προσοχή το αλουμινόχαρτο.
8. Στη συνέχεια φτιάχνουμε φάκελλο με απορροφητικό χαρτί και αναποδογυρίζουμε την πλάκα.
9. Φυγοκεντρούμε την πλάκα όντας ανάποδα με το απορροφητικό χαρτί στις 150 στροφές για 1 λεπτό.
10. Φτιάχνουμε αιθανόλη 70%.
11. Βγάζουμε το Hli-dI φορμαμίδιο να ξεπαγώσει.
12. Προσθέτουμε 150μl από την αιθανόλη 70% σε κάθε φρεάτιο της πλάκας.
13. Φυγοκεντρούμε στις 2000 στροφές για 5 λεπτά.
14. Αναποδογυρίζουμε την πλάκα σε απορροφητικό χαρτί.
15. Φυγοκεντρούμε στις 150 στροφές για 1 λεπτό.
16. Έπειτα αφήνουμε την πλάκα να στεγνώσει για περίπου 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
17. Προσθέτουμε σε κάθε φρεάτιο της πλάκας 20μl Hli-dI φορμαμίδιο Hi-di.
18. Τοποθετούμε στη πλάκα αλουμινόχαρτο.
19. Κάνουμε vortex.
20. Κάνουμε spin down.

21. Τοποθετούμε την πλάκα στο cyclor για αποδιάταξη (95 για 2 λεπτά και 4 μέχρι να χρησιμοποιηθεί).
22. Τέλος τοποθετούμε την πλάκα στον αναλυτή αφού πρώτα έχουμε προγραμματίσει.

### **2.2.13 Πήκτωμα αγαρόζης (GEL)**

1. Ξεπαγώνουμε το DNA Mass Ladder σε θερμοκρασία δωματίου (15 έως 25 ° C).Αφού ξεπαγώσει κάνουμε Vortex 10 έως 15 δευτερόλεπτα για να αναμειχθεί πριν από τη χρήση.
2. Ξεπαγώνουμε το Agarose Gel Loading Buffer σε θερμοκρασία δωματίου. Αφού ξεπαγώσει κάνουμε Vortex 10 έως 15 δευτερόλεπτα για να αναμειχθεί πριν από τη χρήση.
3. Φτιάχνουμε πήκτωμα αγαρόζης 1%. Σε μια κωνική φιάλη ρίχνουμε 100 ml TBE και 1,29gr αγαρόζη και τα τοποθετούμε για πέντε λεπτά στο φούρνο μικροκυμάτων.
4. Μόλις βγάλουμε από τον φούρνο μικροκυμάτων τη κωνική φιάλη προσθέτουμε 8 ml από την χρωστική στη κωνική και ρίχνουμε το μείγμα στο μπανάκι το Gel.
5. Όταν στεγνώσει το gel, αρχίζουμε να φορτώνουμε τα δείγματα. Το πρώτο πηγαδάκι το φορτώνουμε τελευταίο με 8 ml από το Marker.
6. Σε ένα κομμάτι παραφίλμ τοποθετούμε 5ml χρωστικής και 5ml δείγματος τα ανακατεύω με up and down με την πιπέτα και ένα ένα τα φορτώνω στο gel. Αυτή τη διαδικασία την κάνω για όλα τα δείγματα.
7. Εφαρμόζουμε ηλεκτροφόρηση στα δείγματα. Η διαδικασία αυτή διαρκεί περίπου 30 λεπτά.
8. Εφαρμόζουμε υπεριώδη ακτινοβολία -UV στο gel μας.
9. Φωτογραφίζουμε το gel μας, ώστε να δούμε τις μπάντες που έχουν σχηματιστεί.
10. Σύμφωνα με τη φωτογραφία και ανάλογα με την ένταση κάθε ζώνης αποφασίζουμε τι αραίωση θα χρειαστεί να γίνει (1/10 : 90ml απιονισμένο

νερό και 10μl δείγμα, 1/5: 80μl απιονισμένο νερό και 20μl δείγμα, 1/2: 35μl απιονισμένο νερό και 35μl δείγμα, στον αρνητικό μάρτυρα προσθέτουμε μόνο 15μl απιονισμένο νερό).

#### **2.2.14 Διαδικασία αντίδρασης sequencing**

**Σημείωση:** Χρησιμοποιούμε μόνο τον θερμικό ανακυκλωτή (cycler) GeneAmp® 9600 ή 9700 που βρίσκεται στην περιοχή εργασίας 3. Προγραμματίζουμε το cycler πριν από τη ρύθμιση της αντίδρασης.

**Σημαντικό:** Τα αντιδραστήρια αλληλούχησης (δεν είναι μόνο primers) είναι ευαίσθητα στο φως επομένως δεν τα εκθέτουμε στο φως για παρατεταμένες περιόδους.

1. Ξεπαγώνουμε τα μίγματα αλληλούχησης του HIV-1 σε θερμοκρασία δωματίου (15 έως 25 ° C).
2. Χρησιμοποιούμε μια πλάκα αντίδρασης 96 φρεατίων (96-well Reaction Plate) και φορτώνουμε τα δείγματα σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα (όπου Pr = primer και όπου Δ.= δείγμα ) :

|   | 1            | 2            | 3            | 4            | 5            | 6            | 7            | 8            | 9            | 10            | 11            | 12            |
|---|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|---------------|---------------|---------------|
| A | Pr. A<br>Δ.1 | Pr. A<br>Δ.2 | Pr. A<br>Δ.3 | Pr. A<br>Δ.4 | Pr. A<br>Δ.5 | Pr. A<br>Δ.6 | Pr. A<br>Δ.7 | Pr. A<br>Δ.8 | Pr. A<br>Δ.9 | Pr. A<br>Δ.10 | Pr. A<br>Δ.11 | Pr. A<br>Δ.12 |
| B | Pr. B<br>Δ.1 | Pr. B<br>Δ.2 | Pr. B<br>Δ.3 | Pr. B<br>Δ.4 | Pr. B<br>Δ.5 | Pr. B<br>Δ.6 | Pr. B<br>Δ.7 | Pr. B<br>Δ.8 | Pr. B<br>Δ.9 | Pr. B<br>Δ.10 | Pr. B<br>Δ.11 | Pr. B<br>Δ.12 |
| C | Pr. C<br>Δ.1 | Pr. C<br>Δ.2 | Pr. C<br>Δ.3 | Pr. C<br>Δ.4 | Pr. C<br>Δ.5 | Pr. C<br>Δ.6 | Pr. C<br>Δ.7 | Pr. C<br>Δ.8 | Pr. C<br>Δ.9 | Pr. C<br>Δ.10 | Pr. C<br>Δ.11 | Pr. C<br>Δ.12 |
| D | Pr. D<br>Δ.1 | Pr. D<br>Δ.2 | Pr. D<br>Δ.3 | Pr. D<br>Δ.4 | Pr. D<br>Δ.5 | Pr. D<br>Δ.6 | Pr. D<br>Δ.7 | Pr. D<br>Δ.8 | Pr. D<br>Δ.9 | Pr. D<br>Δ.10 | Pr. D<br>Δ.11 | Pr. D<br>Δ.12 |
| E | Pr. F<br>Δ.1 | Pr. F<br>Δ.2 | Pr. F<br>Δ.3 | Pr. F<br>Δ.4 | Pr. F<br>Δ.5 | Pr. F<br>Δ.6 | Pr. F<br>Δ.7 | Pr. F<br>Δ.8 | Pr. F<br>Δ.9 | Pr. F<br>Δ.10 | Pr. F<br>Δ.11 | Pr. F<br>Δ.12 |
| F | Pr. G<br>Δ.1 | Pr. G<br>Δ.2 | Pr. G<br>Δ.3 | Pr. G<br>Δ.4 | Pr. G<br>Δ.5 | Pr. G<br>Δ.6 | Pr. G<br>Δ.7 | Pr. G<br>Δ.8 | Pr. G<br>Δ.9 | Pr. G<br>Δ.10 | Pr. G<br>Δ.11 | Pr. G<br>Δ.12 |
| G | Pr. H<br>Δ.1 | Pr. H<br>Δ.2 | Pr. H<br>Δ.3 | Pr. H<br>Δ.4 | Pr. H<br>Δ.5 | Pr. H<br>Δ.6 | Pr. H<br>Δ.7 | Pr. H<br>Δ.8 | Pr. H<br>Δ.9 | Pr. H<br>Δ.10 | Pr. H<br>Δ.11 | Pr. H<br>Δ.12 |
| H | KENO         |              |              |              |              |              |              |              |              |               |               |               |

1. Σε κάθε φρεάτιο εργαζόμαστε ως εξής :

| Αντιδραστήριο                                                                                                                                                              | Όγκος για μια αντίδραση (μl) |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------|
| Προσθέτουμε τους παρακάτω primers σε κάθε φρεάτιο :<br>HIV SEQ Mix A<br>HIV SEQ Mix B<br>HIV SEQ Mix C<br>HIV SEQ Mix D<br>HIV SEQ Mix F<br>HIV SEQ Mix G<br>HIV SEQ Mix H | 12                           |
| Αραιωμένο προϊόν PCR                                                                                                                                                       | 8                            |
| <b>Τελικός όγκος</b>                                                                                                                                                       | <b>20</b>                    |

3. Τοποθετούμε το κάλυμμα πάνω από την πλάκα μας. Πάνω στη πλάκα γράφουμε τον αριθμό του πειράματος.
4. Κάνουμε vortex στη πλάκα 5-10 δευτερόλεπτα.
5. Μεταφέρουμε τη πλάκα στον θερμικό κυκλοποιητή (thermal cycler).
6. Ρυθμίζουμε το cycler ως εξής:

| Θερμοκρασία (°C) | Χρόνος                                      | Κύκλοι |
|------------------|---------------------------------------------|--------|
| 96               | 10 sec                                      | 25     |
| 50               | 5 sec                                       |        |
| 60               | 4 min                                       |        |
| 4                | Μπορούμε να κρατήσουμε την πλάκα σε αναμονή | -      |

**Σημαντικό:** Δεν αφήνουμε τα δείγματά μας σε αναμονή για περισσότερο από 24 ώρες. Αποθηκεύουμε τα δείγματά μας σε θερμοκρασία -15 έως -25 ° C.

7. Τοποθετούμε την πλάκα στο cycler.

8. Όταν ολοκληρωθεί το πρόγραμμα είτε προχωράμε στο επόμενο βήμα (βήμα καθαρισμού), είτε σταματάμε σε αυτό το στάδιο και αποθηκεύουμε τα δείγματα στους -15 έως -25 ° C.

Αξίζει να σημειωθεί πως δεν φυλάσσουμε τα δείγματα για περισσότερο από 3 ημέρες στους -15 έως -25 ° C.

Αφού ολοκληρωθεί όλη η παραπάνω διαδικασία λαμβάνουμε μια λίστα με τα αποτελέσματα από τη βάση του Viroseq. Η λίστα αυτή παρουσιάζει αν οι τρεις κατηγορίες φαρμάκων που εξετάζονται (NRTI, NNRTI, PI) παρουσιάζουν στα φάρμακα που κατατάσσονται σε αυτές τις κατηγορίες ευαισθησία (sensitive), ενδιάμεση αντοχή (intermediate resistant) και αντοχή (resistant). Η λίστα αυτή αποτυπώνεται παρακάτω:

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                                                                    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|
|  <b>ViroSeq® HIV-1 Antiretroviral Drug Resistance Report</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                                                                    |
| Patient ID: —                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | Institution Name: —                                                                |
| Accession Number: —                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | Report Generated by: Administrator                                                 |
| Sample Name: 223630                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | Report Date & Time: Jul 6, 2018 3:24:11 PM                                         |
| <b>Drug Resistance:</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |                                                                                    |
| <b>NRTI Class</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | <b>Evidence of Resistance</b>                                                      |
| EMTRIVA® (emtricitabine, FTC)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | None                                                                               |
| EPIVIR® (lamivudine, 3TC)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | None                                                                               |
| RETROVIR® (zidovudine, ZDV)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | None                                                                               |
| VIDEX® (didanosine, ddl)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | None                                                                               |
| VIREAD® (tenofovir, TDF)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | None                                                                               |
| ZERIT® (stavudine, d4T)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | None                                                                               |
| ZIAGEN® (abacavir, ABC)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | None                                                                               |
| <b>NNRTI Class</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | <b>Evidence of Resistance</b>                                                      |
| EDURANT® (rilpivirine, RPV)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | None                                                                               |
| INTELENCE® (etravirine, ETR)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | None                                                                               |
| SUSTIVA® (efavirenz, EFV)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | None                                                                               |
| VIRAMUNE® (nevirapine, NVP)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | None                                                                               |
| <b>PI+ Class</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | <b>Evidence of Resistance</b>                                                      |
| APTIVUS® (tipranavir, TPV)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | None                                                                               |
| CRIVIAN® (indinavir, IDV)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | None                                                                               |
| FORTOVA SE® / INVIRASE® (saquinavir, SQV)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | None                                                                               |
| KALETRA® (lopinavir + ritonavir, LPV)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | None                                                                               |
| LEXIVA® (fosamprenavir, FPV)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | None                                                                               |
| PREZISTA® (darunavir, DRV)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | None                                                                               |
| REYATAZ® (atazanavir, ATV)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | None                                                                               |
| VIRACEPT® (nelfinavir, NFV)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | None                                                                               |
| <p>* NOTE: At least one mutation used to determine Evidence of Resistance for this drug has not been fully validated.</p> <p>** NOTE: At least one mutation used to determine Evidence of Resistance for this drug has not been clinically verified.</p> <p>*** NOTE: For at least one mutation used to evaluate Evidence of Resistance for this drug, both notes above apply.</p> <p>+ Evidence of Resistance for Protease Inhibitors estimates response to ritonavir-boosted regimens. Refer to section titled "Notes on Evidence of Resistance"</p> |                                                                                    |
| <b>Notes on Evidence of Resistance:</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |                                                                                    |
| Resistance                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | Mutations present constitute a high level of genetic evidence for viral resistance |
| Possible Resistance                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | Mutations present suggest the possibility of viral resistance                      |
| None                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | There is insufficient evidence for viral resistance                                |
| <p>The protease inhibitor (PI) evidence of resistance interpretations were developed to estimate the expected virological response to standard doses of protease inhibitors with pharmacokinetic boosting by ritonavir. This has become the most common method of administering each of the protease inhibitors, except nelfinavir (ref. 1), to ensure adequate drug</p>                                                                                                                                                                               |                                                                                    |

**Εικόνα 4: Αποτέλεσμα από τη βάση Viroseq**

Αφού λάβαμε αυτή τη λίστα περάσαμε τις αλληλουχίες μας από τον αλγόριθμο REGA ο οποίος είναι ελεύθερα διαθέσιμος στον διαδικτυακό τόπο <https://rega.kuleuven.be/cev/avd/software/rega-algorithm> , και από τον ANRS ο οποίος είναι επίσης ελεύθερα διαθέσιμος στον παρακάτω διαδικτυακό τόπο <http://www.hivfrenchresistance.org/> . Στη συνέχεια φτιάξαμε ένα excel όπου σε κάθε ένα από τους 120 ασθενείς αντιστοιχούν 19 φάρμακα τα οποία είναι χωρισμένα σε τρεις κατηγορίες ( NRTI, NNRTI, PI) και τρία επίπεδα ανθεκτικότητας (S,I,R), στους τρεις διαφορετικούς αλγόριθμους (VIROSEQ, REGA,ANRS).

Το excel αυτό πέρασε αυτόματα από το στατιστικό πρόγραμμα SPSS, όπου έγινε η κωδικοποίηση και κατ' επέκταση η στατιστική ανάλυση των δεδομένων. *Πραγματοποιήθηκε έλεγχος ανεξαρτησίας McNemar για εξαρτημένα δείγματα και υπολογίστηκε ο λόγος Karrra για να ποσοτικοποιηθεί ο βαθμός συμφωνίας των τριών αυτών αλγόριθμων.*

### 3. Αποτελέσματα

Αρχικά παρουσιάζεται ένας συγκεντρωτικός πίνακας αποτελεσμάτων με τα επίπεδα της αντοχής των 19 αντιρετροϊκών φαρμάκων βάσει των 3 διαφορετικών αλγορίθμων. Βλέπουμε στον πίνακα τις τρεις κατηγορίες των αντιρετροϊκών φαρμάκων, NRTIs, NNRTIs, PIs και τα αποτελέσματα που δίνουν οι τρεις διαφορετικοί αλγόριθμοι. Όταν κάποιο φάρμακο παρουσιάζει αντοχή χαρακτηρίζεται ως ανθεκτικό (resistant) και συμβολίζεται με R, αν κάποιο φάρμακο παρουσιάζει ενδιάμεση ανθεκτικότητα (intermediate resistant) συμβολίζεται με I και τέλος αν το φάρμακο παρουσιάζει ευαισθησία (sensitive) συμβολίζεται με S.

Στον Πίνακα 1 παρατηρούμε:

- Απόλυτη συμφωνία σε 2 από τα 19 φάρμακα, το FTC και το 3TC. Με τον όρο απόλυτη συμφωνία εννοούμε πως και οι τρεις αλγόριθμοί μας (ANRS, REGA, VIROSEQ) παρουσιάζουν πανομοιότυπα αποτελέσματα στα συγκεκριμένα φάρμακα.
- Στην κατηγορία των PIs ενώ οι αλγόριθμοι REGA και VIROSEQ δίνουν ίδια αποτελέσματα κατά μεγάλο ποσοστό, ο αλγόριθμος ANRS παρουσιάζει σημαντικές διαφοροποιήσεις στα φάρμακα : ATV/r, LPV/r, SQV/r και TPV/r.
- Διαφοροποίηση βλέπουμε στη κατηγορία NNRTIs στο φάρμακο RPV. Ο αλγόριθμος REGA παρουσιάζει ενδιάμεση αντοχή (I) σε 21 (17,5%)

από τους 120 ασθενείς , ενώ ο αλγόριθμος ANRS παρουσιάζει ενδιάμεση αντοχή (I) σε 4 (3,3%) από τους 120 ασθενείς και ο

- αλγόριθμος VIROSEQ παρουσιάζει ενδιάμεση αντοχή (I) σε 2 (1,7%) από τους 120 ασθενείς.
- Επίσης στη κατηγορία των NNRTIs παρατηρούμε πως ενώ οι αλγόριθμοι REGA και VIROSEQ παρουσιάζουν σχεδόν ίδιες τιμές στα φάρμακα ETR και NVP, ο αλγόριθμος ANRS παρουσιάζει κάποιες διαφοροποιήσεις.

**Πίνακας 1 :** Γονοτυπική ερμηνεία αντοχής σε αντιρετροϊκά φάρμακα, δειγμάτων ατόμων οι οποίοι έχουν μολυνθεί από τον ιό HIV-1 μέσω τριών διαφορετικών αλγορίθμων (n=120)

|               | ANRS Algorithm   |                               |                  | REGA Algorithm   |                               |                  | Viroseq Database |                               |                  |
|---------------|------------------|-------------------------------|------------------|------------------|-------------------------------|------------------|------------------|-------------------------------|------------------|
| Drugs*        | Resistant<br>(R) | Intermediate resistant<br>(I) | Sensitive<br>(S) | Resistant<br>(R) | Intermediate resistant<br>(I) | Sensitive<br>(S) | Resistant<br>(R) | Intermediate resistant<br>(I) | Sensitive<br>(S) |
| <b>NRTIs</b>  |                  |                               |                  |                  |                               |                  |                  |                               |                  |
| ABC           | 2 (1,7%)         | 4 (3,3%)                      | 114 (95%)        | 1 (0,8%)         | 1 (0,8%)                      | 118 (98,3%)      | 1 (0,8%)         | 2 (1,7%)                      | 117 (97,5%)      |
| AZT           | 6 (5 %)          | 0 (0%)                        | 114 (95%)        | 1 (0,8%)         | 5 (4,2%)                      | 114 (95%)        | 2 (1,7%)         | 5 (4,2%)                      | 113 (94,2%)      |
| D4T           | 6 (5%)           | 0 (0%)                        | 114 (95%)        | 1 (0,8%)         | 5 (4,2%)                      | 114 (95%)        | 2 (1,7%)         | 5 (4,2%)                      | 113 (94,2%)      |
| DDI           | 1 (0,8%)         | 0 (0%)                        | 119 (99,2%)      | 2 (1,7%)         | 1 (0,8%)                      | 117 (97,5%)      | 1 (0,8%)         | 1 (0,8%)                      | 118 (98,3%)      |
| FTC           | 6 (5%)           | 0 (0%)                        | 114 (95%)        | 6 (5%)           | 0 (0%)                        | 114 (95%)        | 6 (5%)           | 0 (0%)                        | 114 (95%)        |
| 3TC           | 6 (5%)           | 0 (0%)                        | 114 (95%)        | 6 (5%)           | 0 (0%)                        | 114 (95%)        | 6 (5%)           | 0 (0%)                        | 114 (95%)        |
| TDF           | 1 (0,8%)         | 0 (0%)                        | 119 (99,2%)      | 1 (0,8%)         | 0 (0%)                        | 119 (99,2%)      | 0 (0%)           | 2 (1,7%)                      | 118 (98,3%)      |
| <b>NNRTIs</b> |                  |                               |                  |                  |                               |                  |                  |                               |                  |
| EFV           | 14(11,7%)        | 0 (0%)                        | 106 (88,3%)      | 12(10%)          | 1 (0,8%)                      | 107 (89,3%)      | 11 (9,2%)        | 1 (0,8%)                      | 108 (90%)        |
| ETR           | 3 (2,5%)         | 18 (15%)                      | 99 (82,5%)       | 0 (0%)           | 2 (1, 7%)                     | 118 (98,3%)      | 0 (0%)           | 2 (1,7%)                      | 118 (98,3%)      |
| NVP           | 14(11,7%)        | 18(15%)                       | 88 (73,3%)       | 12(10%)          | 1(0,8%)                       | 107 (89,2%)      | 12 (10%)         | 2 (1,7%)                      | 106 (88,3%)      |
| RPV           | 22(18,3%)        | 4(3,3%)                       | 94(78,3%)        | 1(0,8%)          | 21(17,5%)                     | 98(81,7%)        | 0(0%)            | 2(1,7%)                       | 118(98,3%)       |
| <b>PIs</b>    |                  |                               |                  |                  |                               |                  |                  |                               |                  |
| ATV/r         | 5(4,2%)          | 28(23,3%)                     | 87(72,5%)        | 0(0%)            | 0(0%)                         | 120(100%)        | 0(0%)            | 0(0%)                         | 120(100%)        |
| DRV/r         | 0(0%)            | 0(0%)                         | 120(100%)        | 0(0%)            | 0(0%)                         | 120(100%)        | 0(0%)            | 0(0%)                         | 120(100%)        |
| FPV/r         | 0(0%)            | 0(0%)                         | 120(100%)        | 0(0%)            | 0(0%)                         | 120(100%)        | 0(0%)            | 0(0%)                         | 120(100%)        |
| IDV/r         | 0(0%)            | 0(0%)                         | 120(100%)        | 0(0%)            | 0(0%)                         | 120(100%)        | 0(0%)            | 0(0%)                         | 120(100%)        |
| LPV/r         | 0(0%)            | 1(0,8%)                       | 119(99,2%)       | 0(0%)            | 0(0%)                         | 120(100%)        | 0(0%)            | 0(0%)                         | 120(100%)        |
| NFV           | 0(0%)            | 0(0%)                         | 120(100%)        | 0(0%)            | 1(0,8%)                       | 119(99,2%)       | 0(0%)            | 0(0%)                         | 120(100%)        |
| SQV/r         | 20(16,7%)        | 24(20%)                       | 76(63,3%)        | 0(0%)            | 0(0%)                         | 120(100%)        | 0(0%)            | 0(0%)                         | 120(100%)        |
| TPV/r         | 83(69,2%)        | 7(5,8%)                       | 30(25%)          | 0(0%)            | 0(0%)                         | 120(100%)        | 0(0%)            | 0(0%)                         | 120(100%)        |

\* NRTIs : Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors, NNRTIs : Non- Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors, PIs : Protease Inhibitors, ABC : Abacavir, AZT : Zidovudine, D4T: Stavudine , DDI : Didanosine , FTC: Emtricitabine , 3TC: Lamivudine , TDF: Tenofovir, EFV: Efavirenz, ETR: Etravirine , NVP: Nevirapine , RPV: Nevirapine, ATV/r : Atazanavir , DRV/r: Darunavir , FPV/r: Amprenavir, IDV/r: Indinavir , LPV/r: Kaletra, NFV: Nelfinavir, SQV/r : Saquinavir, TPV/r: Tripranavir

Με μια αναλυτικότερη προσέγγιση στον παραπάνω πίνακα **(Πίνακας:1)** παρατηρούμε τα ακόλουθα:

### **Κατηγορία NRTIs**

- ❖ **Αντιρετροϊκό φάρμακο ABC:** Ο αλγόριθμος **ANRS** παρουσιάζει ανθεκτικότητα (Resistant-R) σε 2/120 (1,7%) ασθενείς, ενδιάμεση ανθεκτικότητα (Intermediate resistant - I) σε 4/120 ασθενείς (3,3%) και ευαισθησία (Sensitive-S) σε 114/120 (95%) ασθενείς. Ο αλγόριθμος **REGA** παρουσιάζει ανθεκτικότητα (Resistant-R) σε 1/120 (0,8%) ασθενή, ενδιάμεση ανθεκτικότητα (Intermediate resistant - I) σε 1/120 ασθενή (0,8%) και ευαισθησία (Sensitive-S) σε 118/120 (98,3%) ασθενείς. Ο ιδιόκτητος αλγόριθμος της βάσης **VIROSEQ** παρουσιάζει ανθεκτικότητα (Resistant-R) σε 1/120 (0,8%) ασθενή, ενδιάμεση ανθεκτικότητα (Intermediate resistant - I) σε 2/120 (1,7%) ασθενείς και ευαισθησία (Sensitive-S) σε 117/120 (97,5%) ασθενείς.
- ❖ **Αντιρετροϊκό φάρμακο AZT:** Ο αλγόριθμος **ANRS** παρουσιάζει ανθεκτικότητα (Resistant-R) σε 6/120 (5%) ασθενείς, ενδιάμεση ανθεκτικότητα (Intermediate resistant - I) σε 0/120 ασθενείς (0%) και ευαισθησία (Sensitive-S) σε 114/120 (95%) ασθενείς. Ο αλγόριθμος **REGA** παρουσιάζει ανθεκτικότητα (Resistant-R) σε 1/120 (0,8%) ασθενή, ενδιάμεση ανθεκτικότητα (Intermediate resistant - I) σε 5/120 ασθενείς (4,2%) και ευαισθησία (Sensitive-S) σε 114/120 (95%) ασθενείς. Ο ιδιόκτητος αλγόριθμος της βάσης **VIROSEQ** παρουσιάζει ανθεκτικότητα (Resistant-R) σε 2/120 (1,7%) ασθενείς, ενδιάμεση ανθεκτικότητα (Intermediate resistant - I) σε 5/120 (4,2%) ασθενείς και ευαισθησία (Sensitive-S) σε 113/120 (94,2%) ασθενείς.
- ❖ **Αντιρετροϊκό φάρμακο D4T:** Ο αλγόριθμος **ANRS** παρουσιάζει ανθεκτικότητα (Resistant-R) σε 6/120 (5%) ασθενείς, ενδιάμεση ανθεκτικότητα (Intermediate resistant - I) σε 0/120 ασθενείς (0%) και ευαισθησία (Sensitive-S) σε 114/120 (95%) ασθενείς. Ο αλγόριθμος **REGA** παρουσιάζει ανθεκτικότητα (Resistant-R) σε 1/120 (0,8%) ασθενή, ενδιάμεση ανθεκτικότητα (Intermediate resistant - I) σε 5/120

ασθενείς (4,2%) και ευαισθησία (Sensitive-S) σε 114/120 (95%) ασθενείς. Ο ιδιόκτητος αλγόριθμος της βάσης **VIROSEQ** παρουσιάζει ανθεκτικότητα (Resistant-R) σε 2/120 (1,7%) ασθενείς, ενδιάμεση ανθεκτικότητα (Intermediate resistant - I) σε 5/120 (4,2%) ασθενείς και ευαισθησία (Sensitive-S) σε 113/120 (94,2%) ασθενείς.

❖ **Αντιρετροϊκό φάρμακο DDI:** Ο αλγόριθμος **ANRS** παρουσιάζει ανθεκτικότητα (Resistant-R) σε 1/120 (0,8%) ασθενή, ενδιάμεση ανθεκτικότητα (Intermediate resistant - I) σε 0/120 ασθενείς (0%) και ευαισθησία (Sensitive-S) σε 119/120 (99,2%) ασθενείς. Ο αλγόριθμος **REGA** παρουσιάζει ανθεκτικότητα (Resistant-R) σε 2/120 (1,7%) ασθενείς, ενδιάμεση ανθεκτικότητα (Intermediate resistant - I) σε 1/120 ασθενή (0,8%) και ευαισθησία (Sensitive-S) σε 117/120 (97,5%) ασθενείς. Ο ιδιόκτητος αλγόριθμος της βάσης **VIROSEQ** παρουσιάζει ανθεκτικότητα (Resistant-R) σε 1/120 (0,8%) ασθενή, ενδιάμεση ανθεκτικότητα (Intermediate resistant - I) σε 1/120 (0,8%) ασθενή και ευαισθησία (Sensitive-S) σε 118/120 (98,3%) ασθενείς.

❖ **Αντιρετροϊκό φάρμακο FTC:** Ο αλγόριθμος **ANRS** παρουσιάζει ανθεκτικότητα (Resistant-R) σε 6/120 (5%) ασθενείς, ενδιάμεση ανθεκτικότητα (Intermediate resistant - I) σε 0/120 ασθενείς (0%) και ευαισθησία (Sensitive-S) σε 114/120 (95%) ασθενείς. Ο αλγόριθμος **REGA** παρουσιάζει ανθεκτικότητα (Resistant-R) σε 6/120 (5%) ασθενείς, ενδιάμεση ανθεκτικότητα (Intermediate resistant - I) σε 0/120 ασθενείς (0%) και ευαισθησία (Sensitive-S) σε 114/120 (95%) ασθενείς. Ο ιδιόκτητος αλγόριθμος της βάσης **VIROSEQ** παρουσιάζει ανθεκτικότητα (Resistant-R) σε 6/120 (5%) ασθενείς, ενδιάμεση ανθεκτικότητα (Intermediate resistant - I) σε 0/120 (0%) ασθενείς και ευαισθησία (Sensitive-S) σε 114/120 (95%) ασθενείς.

❖ **Αντιρετροϊκό φάρμακο 3TC:** Ο αλγόριθμος **ANRS** παρουσιάζει ανθεκτικότητα (Resistant-R) σε 6/120 (5%) ασθενείς, ενδιάμεση ανθεκτικότητα (Intermediate resistant - I) σε 0/120 ασθενείς (0%) και ευαισθησία (Sensitive-S) σε 114/120 (95%) ασθενείς. Ο αλγόριθμος **REGA** παρουσιάζει ανθεκτικότητα (Resistant-R) σε 6/120 (5%) ασθενείς, ενδιάμεση ανθεκτικότητα (Intermediate resistant - I) σε 0/120 ασθενείς (0%) και ευαισθησία (Sensitive-S) σε 114/120 (95%) ασθενείς.

ασθενείς. Ο ιδιωτικός αλγόριθμος της βάσης **VIROSEQ** παρουσιάζει ανθεκτικότητα (Resistant-R) σε 6/120 (5%) ασθενείς, ενδιάμεση ανθεκτικότητα (Intermediate resistant - I) σε 0/120 (0%) ασθενείς και ευαισθησία (Sensitive-S) σε 114/120 (95%) ασθενείς.

- ❖ **Αντιρετροϊκό φάρμακο TDF:** Ο αλγόριθμος **ANRS** παρουσιάζει ανθεκτικότητα (Resistant-R) σε 1/120 (0,8%) ασθενή, ενδιάμεση ανθεκτικότητα (Intermediate resistant - I) σε 0/120 ασθενείς (0%) και ευαισθησία (Sensitive-S) σε 119/120 (99,2%) ασθενείς. Ο αλγόριθμος **REGA** παρουσιάζει ανθεκτικότητα (Resistant-R) σε 1/120 (0,8%) ασθενή, ενδιάμεση ανθεκτικότητα (Intermediate resistant - I) σε 0/120 ασθενείς (0%) και ευαισθησία (Sensitive-S) σε 119/120 (99,2%) ασθενείς. Ο ιδιόκτητος αλγόριθμος της βάσης **VIROSEQ** παρουσιάζει ανθεκτικότητα (Resistant-R) σε 0/120 (0%) ασθενείς, ενδιάμεση ανθεκτικότητα (Intermediate resistant - I) σε 2/120 (1,7%) ασθενείς και ευαισθησία (Sensitive-S) σε 118/120 (98,3%) ασθενείς.

### **Κατηγορία NNRTIs**

- ❖ **Αντιρετροϊκό φάρμακο EFV:** Ο αλγόριθμος **ANRS** παρουσιάζει ανθεκτικότητα (Resistant-R) σε 14/120 (11,7%) ασθενείς, ενδιάμεση ανθεκτικότητα (Intermediate resistant - I) σε 0/120 ασθενείς (0%) και ευαισθησία (Sensitive-S) σε 106/120 (88,3%) ασθενείς. Ο αλγόριθμος **REGA** παρουσιάζει ανθεκτικότητα (Resistant-R) σε 12/120 (10%) ασθενείς, ενδιάμεση ανθεκτικότητα (Intermediate resistant - I) σε 1/120 ασθενή (0,8%) και ευαισθησία (Sensitive-S) σε 107/120 (89,2%) ασθενείς. Ο ιδιόκτητος αλγόριθμος της βάσης **VIROSEQ** παρουσιάζει ανθεκτικότητα (Resistant-R) σε 11/120 (9,2%) ασθενείς, ενδιάμεση ανθεκτικότητα (Intermediate resistant - I) σε 1/120 (0,8%) ασθενή και ευαισθησία (Sensitive-S) σε 108/120 (90%) ασθενείς.
- ❖ **Αντιρετροϊκό φάρμακο ETR:** Ο αλγόριθμος **ANRS** παρουσιάζει ανθεκτικότητα (Resistant-R) σε 3/120 (2,5%) ασθενείς, ενδιάμεση ανθεκτικότητα (Intermediate resistant - I) σε 18/120 ασθενείς (15%) και ευαισθησία (Sensitive-S) σε 99/120 (82,5%) ασθενείς. Ο αλγόριθμος

**REGA** παρουσιάζει ανθεκτικότητα (Resistant-R) σε 0/120 (0%) ασθενείς, ενδιάμεση ανθεκτικότητα (Intermediate resistant - I) σε 2/120 ασθενή (1,7%) και ευαισθησία (Sensitive-S) σε 118/120 (98,3%) ασθενείς. Ο ιδιόκτητος αλγόριθμος της βάσης **VIROSEQ** παρουσιάζει ανθεκτικότητα (Resistant-R) σε 0/120 (0%) ασθενείς, ενδιάμεση ανθεκτικότητα (Intermediate resistant - I) σε 2/120 (1,7%) ασθενείς και ευαισθησία (Sensitive-S) σε 118/120 (98,3%) ασθενείς.

❖ **Αντιρετροϊκό φάρμακο NVP:** Ο αλγόριθμος **ANRS** παρουσιάζει ανθεκτικότητα (Resistant-R) σε 14/120 (11,7%) ασθενείς, ενδιάμεση ανθεκτικότητα (Intermediate resistant - I) σε 18/120 ασθενείς (15%) και ευαισθησία (Sensitive-S) σε 88/120 (73,3%) ασθενείς. Ο αλγόριθμος **REGA** παρουσιάζει ανθεκτικότητα (Resistant-R) σε 12/120 (10%) ασθενείς, ενδιάμεση ανθεκτικότητα (Intermediate resistant - I) σε 1/120 ασθενή (0,8%) και ευαισθησία (Sensitive-S) σε 107/120 (89,2%) ασθενείς. Ο ιδιόκτητος αλγόριθμος της βάσης **VIROSEQ** παρουσιάζει ανθεκτικότητα (Resistant-R) σε 12/120 (10%) ασθενείς, ενδιάμεση ανθεκτικότητα (Intermediate resistant - I) σε 2/120 (1,7%) ασθενείς και ευαισθησία (Sensitive-S) σε 106/120 (88,3%) ασθενείς.

❖ **Αντιρετροϊκό φάρμακο RPV:** Ο αλγόριθμος **ANRS** παρουσιάζει ανθεκτικότητα (Resistant-R) σε 22/120 (18,3%) ασθενείς, ενδιάμεση ανθεκτικότητα (Intermediate resistant - I) σε 4/120 ασθενείς (3,3%) και ευαισθησία (Sensitive-S) σε 94/120 (78,3%) ασθενείς. Ο αλγόριθμος **REGA** παρουσιάζει ανθεκτικότητα (Resistant-R) σε 1/120 (0,8%) ασθενή, ενδιάμεση ανθεκτικότητα (Intermediate resistant - I) σε 21/120 (17,5%) ασθενείς και ευαισθησία (Sensitive-S) σε 98/120 (81,7%) ασθενείς. Ο ιδιόκτητος αλγόριθμος της βάσης **VIROSEQ** παρουσιάζει ανθεκτικότητα (Resistant-R) σε 0/120 (0%) ασθενείς, ενδιάμεση ανθεκτικότητα (Intermediate resistant - I) σε 2/120 (1,7%) ασθενείς και ευαισθησία (Sensitive-S) σε 118/120 (98,3%) ασθενείς.

### Κατηγορία PIs

- ❖ **Αντιρετροϊκό φάρμακο ATV/r:** Ο αλγόριθμος **ANRS** παρουσιάζει ανθεκτικότητα (Resistant-R) σε 5/120 (4,2%) ασθενείς, ενδιάμεση ανθεκτικότητα (Intermediate resistant - I) σε 28/120 ασθενείς (23,3%) και ευαισθησία (Sensitive-S) σε 87/120 (72,5%) ασθενείς. Ο αλγόριθμος **REGA** παρουσιάζει ανθεκτικότητα (Resistant-R) σε 0/120 (0%) ασθενείς, ενδιάμεση ανθεκτικότητα (Intermediate resistant - I) σε 0/120 (0%) ασθενείς και ευαισθησία (Sensitive-S) σε 120/120 (100%) ασθενείς. Ο ιδιόκτητος αλγόριθμος της βάσης **VIROSEQ** παρουσιάζει ανθεκτικότητα (Resistant-R) σε 0/120 (0%) ασθενείς, ενδιάμεση ανθεκτικότητα (Intermediate resistant - I) σε 0/120 (0%) ασθενείς και ευαισθησία (Sensitive-S) σε 120/120 (100%) ασθενείς.
- ❖ **Αντιρετροϊκό φάρμακο DRV/r:** Ο αλγόριθμος **ANRS** παρουσιάζει ανθεκτικότητα (Resistant-R) σε 0/120 (0%) ασθενείς, ενδιάμεση ανθεκτικότητα (Intermediate resistant - I) σε 0/120 ασθενείς (0%) και ευαισθησία (Sensitive-S) σε 120/120 (100%) ασθενείς. Ο αλγόριθμος **REGA** παρουσιάζει ανθεκτικότητα (Resistant-R) σε 0/120 (0%) ασθενείς, ενδιάμεση ανθεκτικότητα (Intermediate resistant - I) σε 0/120 (0%) ασθενείς και ευαισθησία (Sensitive-S) σε 120/120 (100%) ασθενείς. Ο ιδιόκτητος αλγόριθμος της βάσης **VIROSEQ** παρουσιάζει ανθεκτικότητα (Resistant-R) σε 0/120 (0%) ασθενείς, ενδιάμεση ανθεκτικότητα (Intermediate resistant - I) σε 0/120 (0%) ασθενείς και ευαισθησία (Sensitive-S) σε 120/120 (100%) ασθενείς.
- ❖ **Αντιρετροϊκό φάρμακο FPV/r:** Ο αλγόριθμος **ANRS** παρουσιάζει ανθεκτικότητα (Resistant-R) σε 0/120 (0%) ασθενείς, ενδιάμεση ανθεκτικότητα (Intermediate resistant - I) σε 0/120 ασθενείς (0%) και ευαισθησία (Sensitive-S) σε 120/120 (100%) ασθενείς. Ο αλγόριθμος **REGA** παρουσιάζει ανθεκτικότητα (Resistant-R) σε 0/120 (0%) ασθενείς, ενδιάμεση ανθεκτικότητα (Intermediate resistant - I) σε 0/120 (0%) ασθενείς και ευαισθησία (Sensitive-S) σε 120/120 (100%) ασθενείς. Ο ιδιόκτητος αλγόριθμος της βάσης

**VIROSEQ** παρουσιάζει ανθεκτικότητα (Resistant-R) σε 0/120 (0%) ασθενείς, ενδιάμεση ανθεκτικότητα (Intermediate resistant - I) σε 0/120 (0%) ασθενείς και ευαισθησία (Sensitive-S) σε 120/120 (100%) ασθενείς.

❖ **Αντιρετροϊκό φάρμακο IDV/r:** Ο αλγόριθμος **ANRS** παρουσιάζει ανθεκτικότητα (Resistant-R) σε 0/120 (0%) ασθενείς, ενδιάμεση ανθεκτικότητα (Intermediate resistant - I) σε 0/120 ασθενείς (0%) και ευαισθησία (Sensitive-S) σε 120/120 (100%) ασθενείς. Ο αλγόριθμος **REGA** παρουσιάζει ανθεκτικότητα (Resistant-R) σε 0/120 (0%) ασθενείς, ενδιάμεση ανθεκτικότητα (Intermediate resistant - I) σε 0/120 (0%) ασθενείς και ευαισθησία (Sensitive-S) σε 120/120 (100%) ασθενείς. Ο ιδιόκτητος αλγόριθμος της βάσης **VIROSEQ** παρουσιάζει ανθεκτικότητα (Resistant-R) σε 0/120 (0%) ασθενείς, ενδιάμεση ανθεκτικότητα (Intermediate resistant - I) σε 0/120 (0%) ασθενείς και ευαισθησία (Sensitive-S) σε 120/120 (100%) ασθενείς.

❖ **Αντιρετροϊκό φάρμακο LPV/r:** Ο αλγόριθμος **ANRS** παρουσιάζει ανθεκτικότητα (Resistant-R) σε 0/120 (0%) ασθενείς, ενδιάμεση ανθεκτικότητα (Intermediate resistant - I) σε 1/120 ασθενή (0,8%) και ευαισθησία (Sensitive-S) σε 119/120 (99,2%) ασθενείς. Ο αλγόριθμος **REGA** παρουσιάζει ανθεκτικότητα (Resistant-R) σε 0/120 (0%) ασθενείς, ενδιάμεση ανθεκτικότητα (Intermediate resistant - I) σε 0/120 (0%) ασθενείς και ευαισθησία (Sensitive-S) σε 120/120 (100%) ασθενείς. Ο ιδιόκτητος αλγόριθμος της βάσης **VIROSEQ** παρουσιάζει ανθεκτικότητα (Resistant-R) σε 0/120 (0%) ασθενείς, ενδιάμεση ανθεκτικότητα (Intermediate resistant - I) σε 0/120 (0%) ασθενείς και ευαισθησία (Sensitive-S) σε 120/120 (100%) ασθενείς.

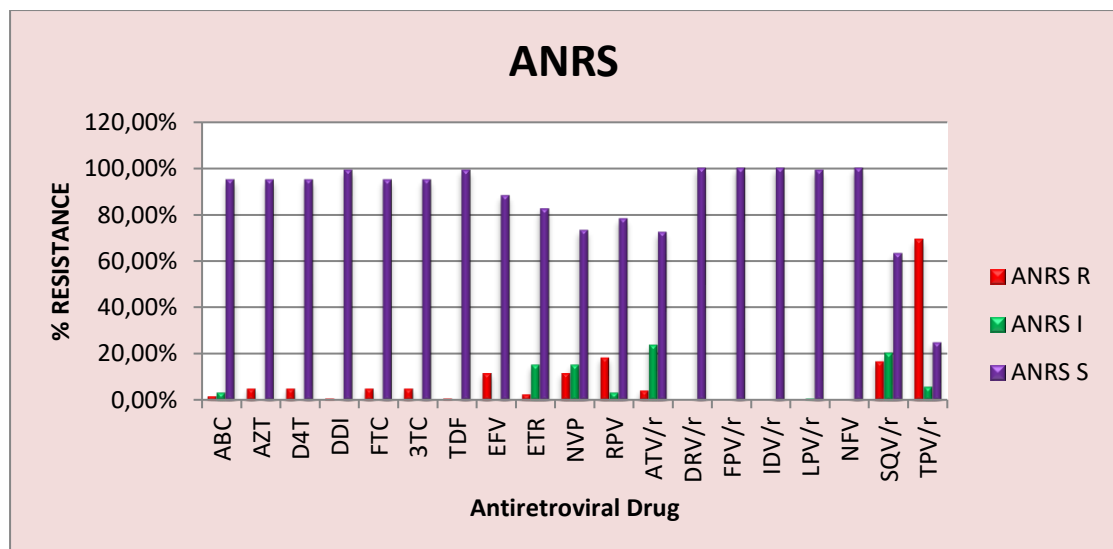
❖ **Αντιρετροϊκό φάρμακο NFV:** Ο αλγόριθμος **ANRS** παρουσιάζει ανθεκτικότητα (Resistant-R) σε 0/120 (0%) ασθενείς, ενδιάμεση ανθεκτικότητα (Intermediate resistant - I) σε 0/120 ασθενείς (0%) και ευαισθησία (Sensitive-S) σε 120/120 (100%) ασθενείς. Ο αλγόριθμος **REGA** παρουσιάζει ανθεκτικότητα (Resistant-R) σε 0/120 (0%) ασθενείς, ενδιάμεση ανθεκτικότητα (Intermediate

resistant - I) σε 1/120 (0,8%) ασθενή και ευαίσθησία (Sensitive-S) σε 119/120 (99,2%) ασθενείς. Ο ιδιόκτητος αλγόριθμος της βάσης **VIROSEQ** παρουσιάζει ανθεκτικότητα (Resistant-R) σε 0/120 (0%) ασθενείς, ενδιάμεση ανθεκτικότητα (Intermediate resistant - I) σε 0/120 (0%) ασθενείς και ευαίσθησία (Sensitive-S) σε 120/120 (100%) ασθενείς.

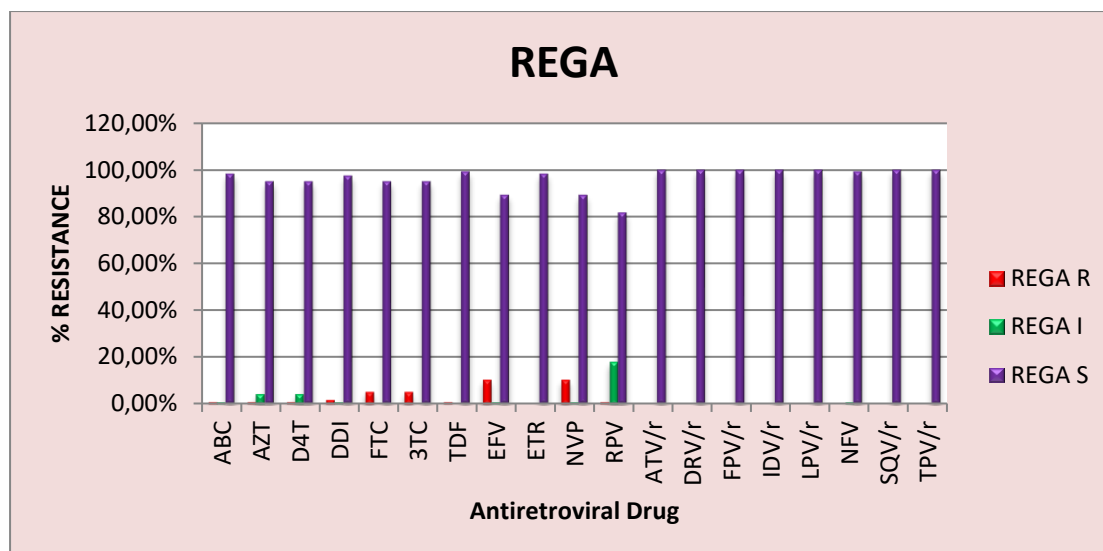
❖ **Αντιρετροϊκό φάρμακο SQV/r** : Ο αλγόριθμος **ANRS** παρουσιάζει ανθεκτικότητα (Resistant-R) σε 20/120 (16,7%) ασθενείς, ενδιάμεση ανθεκτικότητα (Intermediate resistant - I) σε 24/120 ασθενείς (2%) και ευαίσθησία (Sensitive-S) σε 76/120 (63,3%) ασθενείς. Ο αλγόριθμος **REGA** παρουσιάζει ανθεκτικότητα (Resistant-R) σε 0/120 (0%) ασθενείς, ενδιάμεση ανθεκτικότητα (Intermediate resistant - I) σε 0/120 (0%) ασθενείς και ευαίσθησία (Sensitive-S) σε 120/120 (100%) ασθενείς. Ο ιδιόκτητος αλγόριθμος της βάσης **VIROSEQ** παρουσιάζει ανθεκτικότητα (Resistant-R) σε 0/120 (0%) ασθενείς, ενδιάμεση ανθεκτικότητα (Intermediate resistant - I) σε 0/120 (0%) ασθενείς και ευαίσθησία (Sensitive-S) σε 120/120 (100%) ασθενείς.

❖ **Αντιρετροϊκό φάρμακο TPV/r** : Ο αλγόριθμος **ANRS** παρουσιάζει ανθεκτικότητα (Resistant-R) σε 83/120 (69,2%) ασθενείς, ενδιάμεση ανθεκτικότητα (Intermediate resistant - I) σε 7/120 ασθενείς (5,8%) και ευαίσθησία (Sensitive-S) σε 30/120 (25%) ασθενείς. Ο αλγόριθμος **REGA** παρουσιάζει ανθεκτικότητα (Resistant-R) σε 0/120 (0%) ασθενείς, ενδιάμεση ανθεκτικότητα (Intermediate resistant - I) σε 0/120 (0%) ασθενείς και ευαίσθησία (Sensitive-S) σε 120/120 (100%) ασθενείς. Ο ιδιόκτητος αλγόριθμος της βάσης **VIROSEQ** παρουσιάζει ανθεκτικότητα (Resistant-R) σε 0/120 (0%) ασθενείς, ενδιάμεση ανθεκτικότητα (Intermediate resistant - I) σε 0/120 (0%) ασθενείς και ευαίσθησία (Sensitive-S) σε 120/120 (100%) ασθενείς.

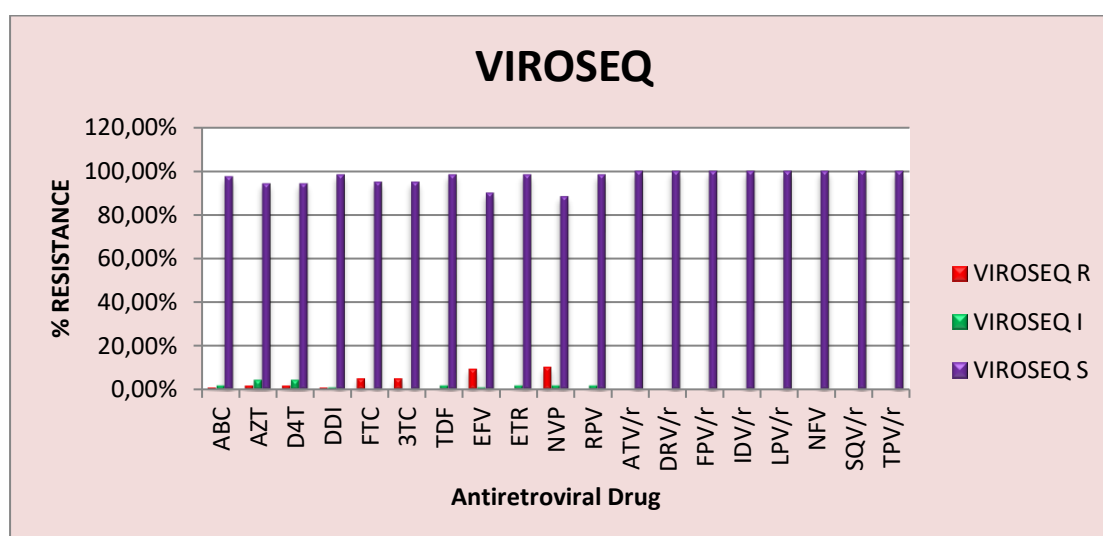
Στα παρακάτω διαγράμματα (**Διάγραμμα: 1, Διάγραμμα: 2, Διάγραμμα: 3**) παρουσιάζονται όσα καταγράφηκαν και παραπάνω. Συγκεκριμένα παρατηρούμε την ποσοστιαία αναλογία αντοχής των 19 φαρμάκων όπως παρουσιάστηκε στους αλγόριθμους ANRS, REGA και VIROSEQ . Η αντοχή των αντιρετροϊκών φαρμάκων τοποθετείται σε τρία επίπεδα: ανθεκτικότητα φαρμάκου (R), ενδιάμεση ανθεκτικότητα φαρμάκου (I) και ευαισθησία φαρμάκου (S).



**Διάγραμμα 1 : Αλγόριθμος ANRS**



**Διάγραμμα 2: Αλγόριθμος REGA**



**Διάγραμμα 3: Ιδιόκτητος αλγόριθμος VIROSEQ**

Στα παραπάνω διαγράμματα παρατηρούμε:

- ❖ Και οι τρεις αλγόριθμοι τα υψηλότερα ποσοστά τα παρουσιάζουν στο επίπεδο της ευαισθησίας(S) των αντιρετροϊκών φαρμάκων.
- ❖ Το αντιρετροϊκό φάρμακο TPV/r παρατηρούμε πως στον αλγόριθμο ANRS παρουσιάζει μεγαλύτερο ποσοστό στο επίπεδο της αντοχής (R),

ενώ οι αλγόριθμοι REGA και VIROSEQ παρουσιάζουν μηδενικά ποσοστά στο επίπεδο της αντοχής (R) καθώς παρουσιάζουν 100% ευαισθησία (S).

- ❖ Παρατηρούμε ίδια ποσοστά και στους τρεις αλγόριθμους για τα αντιρετροϊκά φάρμακα FTC και 3TC.
- ❖ Το αντιρετροϊκό φάρμακο RPV παρουσιάζει κοντινά ποσοστά στο επίπεδο της ενδιάμεσης αντοχής (I) στους αλγόριθμους ANRS και VIROSEQ, ενώ για το επίπεδο της αντοχής (R) παρουσιάζει πιο κοντινά ποσοστά στους αλγόριθμους REGA και VIROSEQ.
- ❖ Τα αντιρετροϊκά φάρμακα DRV/r, FPV/r, IDV/r παρατηρούμε στα διαγράμματα πως παρουσιάζουν ίδια ποσοστά και στους τρεις αλγόριθμους.
- ❖ Τα αντιρετροϊκά φάρμακα ATV/r, LPV/r, SQV/r και TPV/r παρουσιάζουν πανομοιότυπα ποσοστά και στα τρία επίπεδα (R/I/S) στους αλγόριθμους REGA και VIROSEQ.

Κάνοντας χρήση του προγράμματος SPSS και του λόγου Cohens's Kappa, έγινε συγκριτική αξιολόγηση της ερμηνείας των γονοτυπικών δεδομένων των αλγορίθμων. Η σύγκριση της ερμηνείας των αποτελεσμάτων γονοτυπικής αντοχής μεταξύ ANRS, REGA και VIROSEQ πραγματοποιήθηκε ανά ζεύγη. Δηλαδή έγινε σύγκριση ANRS vs REGA, ANRS vs VIROSEQ και REGA vs VIROSEQ. Στους παρακάτω πίνακες (Πίνακας: 2, Πίνακας: 4, Πίνακας: 5) παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της σύγκρισης αυτής ανά κατηγορία ομάδας φαρμάκων (NRTIs, NNRTIs, PIs).

**Πίνακας 2:** Συγκριτική αξιολόγηση αποτελεσμάτων ερμηνείας γονοτυπικής αντοχής για τους NRTIs ανά ζεύγη: ANRS VS REGA, ANRS VS VIROSEQ, REGA VS VIROSEQ.

| NRTIs |         | ANRS | REGA                | VIROSEQ             |
|-------|---------|------|---------------------|---------------------|
| ABC   | ANRS    | -    | 0,363(pvalue=0,002) | 0,544(pvalue=0,000) |
|       | REGA    | -    | -                   | 0,797(pvalue=0,000) |
|       | VIROSEQ | -    | -                   | -                   |
| AZT   | ANRS    | -    | 0,571(pvalue=0,000) | 0,602(pvalue=0,000) |
|       | REGA    | -    | -                   | 0,839(pvalue=0,000) |
|       | VIROSEQ | -    | -                   | -                   |
| D4T   | ANRS    | -    | 0,571(pvalue=0,000) | 0,602(pvalue=0,000) |
|       | REGA    | -    | -                   | 0,839(pvalue=0,000) |
|       | VIROSEQ | -    | -                   | -                   |
| DDI   | ANRS    | -    | 0,495(pvalue=0,000) | 0,664(pvalue=0,000) |
|       | REGA    | -    | -                   | 0,797(pvalue=0,000) |
|       | VIROSEQ | -    | -                   | -                   |
| FTC   | ANRS    | -    | 1,000(pvalue=0,000) | 1,000(pvalue=0,000) |
|       | REGA    | -    | -                   | 1,000(pvalue=0,000) |
|       | VIROSEQ | -    | -                   | -                   |
| 3TC   | ANRS    | -    | 1,000(pvalue=0,000) | 1,000(pvalue=0,000) |
|       | REGA    | -    | -                   | 1,000(pvalue=0,000) |
|       | VIROSEQ | -    | -                   | -                   |
| TDF   | ANRS    | -    | 1,000(pvalue=0,008) | 0,330(pvalue=1,000) |
|       | REGA    | -    | -                   | 0,330(pvalue=1,000) |
|       | VIROSEQ | -    | -                   | -                   |

Στον **Πίνακα: 2** γίνεται χρήση του λόγου Kappa ώστε να ποσοτικοποιηθεί ο βαθμός συμφωνίας των τριών αλγορίθμων για τους NRTIs, οι αλγόριθμοι όπως αναφέραμε και παραπάνω αξιολογούνται ανά ζεύγη. Πριν προχωρήσουμε στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων πρέπει να ειπωθεί ποια τιμή πρέπει να λαμβάνει το Kappa ώστε να προκύψει όσο το δυνατόν καλύτερη συμφωνία των αποτελεσμάτων. Αξίζει να σημειωθεί πως η ερμηνεία του Kappa δεν είναι εύκολο να ερμηνευτεί όσον αφορά την ακρίβεια μιας μόνο

παρατήρησης. Παρακάτω παρουσιάζεται ένας πίνακας ο οποίος δίνει δύο κατευθυντήριες γραμμές για την ερμηνεία του Kappa, μια των Landis and Koch (1977) <sup>[46]</sup> και μια άλλη του Altman (1991) <sup>[47]</sup> η τελευταία είναι ελαφρώς προσαρμοσμένη σε αυτή των Landis and Koch.

**Πίνακας 3:** Ερμηνεία του λόγου Kappa σύμφωνα με τους Landis and Koch (1977) και του Altman (1991) <sup>[46,47]</sup>.

| Επίπεδα τιμών Kappa | Ισχύς Kappa            |                    |
|---------------------|------------------------|--------------------|
|                     | Landis και Koch (1977) | Altman (1991)      |
| <0.00               | Κακή συμφωνία          | -                  |
| 0.00-0.20           | Ελάχιστη συμφωνία      | Κακή συμφωνία      |
| 0.21-0.40           | Ανεπαρκής συμφωνία     | Ανεπαρκής συμφωνία |
| 0.41-0.60           | Μέτρια συμφωνία        | Μέτρια Συμφωνία    |
| 0.61-0.80           | Ουσιαστική συμφωνία    | Καλή συμφωνία      |
| 0.81-1.00           | Σχεδόν τέλεια συμφωνία | Πολύ καλή συμφωνία |

Ο πίνακας 2 θα αξιολογηθεί με βάση την πρόταση του Altman (1991) καθώς και όλοι οι πίνακες που θα ακολουθήσουν παρακάτω και αφορούν τον λόγο Kappa. Παρακάτω παρουσιάζονται αναλυτικά τα αποτελέσματα της σύγκρισης των Kappa ( **Πίνακας :2**).

#### Αντιρετροϊκό φάρμακο ABC

- **ANRS VS REGA:** Ο συντελεστής Cohen's Kappa είναι 0,363 αυτό είναι το ποσοστό συμφωνίας πέρα από την τυχαία συμφωνία. Με βάση τις κατευθυντήριες γραμμές του Altman (1991) η συγκεκριμένη τιμή του Kappa αντιπροσωπεύει **ανεπαρκή συμφωνία**. Επιπλέον δεδομένου ότι το  $p\text{-value} = 0,000$  αυτό σημαίνει πως  $p\text{-value} < 0,05$  επομένως ο συντελεστής kappa μας είναι στατιστικά σημαντικός διαφορετικός από το μηδέν.
- **ANRS VS VIROSEQ:** Ο συντελεστής Cohen's Kappa είναι 0,544 αυτό είναι το ποσοστό συμφωνίας πέρα από την τυχαία συμφωνία. Με βάση τις κατευθυντήριες γραμμές του Altman (1991) η συγκεκριμένη τιμή του Kappa αντιπροσωπεύει **μέτρια συμφωνία**. Επιπλέον δεδομένου ότι

το  $p\text{-value} = 0,000$  αυτό σημαίνει πως  $p\text{-value} < 0,05$  επομένως ο συντελεστής kappa μας είναι στατιστικά σημαντικός διαφορετικός από το μηδέν.

- **REGA VS VIROSEQ:** Ο συντελεστής Cohen's Kappa είναι 0,797 αυτό είναι το ποσοστό συμφωνίας πέρα από την τυχαία συμφωνία. Με βάσει τις κατευθυντήριες γραμμές του Altman (1991) η συγκεκριμένη τιμή του Kappa αντιπροσωπεύει **καλή συμφωνία**. Επιπλέον δεδομένου ότι το  $p\text{-value} = 0,000$  αυτό σημαίνει πως  $p\text{-value} < 0,05$  επομένως ο συντελεστής kappa μας είναι στατιστικά σημαντικός διαφορετικός από το μηδέν.

#### Αντιρετροϊκό φάρμακο AZT

- **ANRS VS REGA:** Ο συντελεστής Cohen's Kappa είναι 0,571 αυτό είναι το ποσοστό συμφωνίας πέρα από την τυχαία συμφωνία. Με βάσει τις κατευθυντήριες γραμμές του Altman (1991) η συγκεκριμένη τιμή του Kappa αντιπροσωπεύει **μέτρια συμφωνία**. Επιπλέον δεδομένου ότι το  $p\text{-value} = 0,000$  αυτό σημαίνει πως  $p\text{-value} < 0,05$  επομένως ο συντελεστής kappa μας είναι στατιστικά σημαντικός διαφορετικός από το μηδέν.
- **ANRS VS VIROSEQ:** Ο συντελεστής Cohen's Kappa είναι 0,602 αυτό είναι το ποσοστό συμφωνίας πέρα από την τυχαία συμφωνία. Με βάσει τις κατευθυντήριες γραμμές του Altman (1991) η συγκεκριμένη τιμή του Kappa αντιπροσωπεύει **μέτρια συμφωνία**. Επιπλέον δεδομένου ότι το  $p\text{-value} = 0,000$  αυτό σημαίνει πως  $p\text{-value} < 0,05$  επομένως ο συντελεστής kappa μας είναι στατιστικά σημαντικός διαφορετικός από το μηδέν.
- **REGA VS VIROSEQ:** Ο συντελεστής Cohen's Kappa είναι 0,839 αυτό είναι το ποσοστό συμφωνίας πέρα από την τυχαία συμφωνία. Με βάσει τις κατευθυντήριες γραμμές του Altman (1991) η συγκεκριμένη τιμή του Kappa αντιπροσωπεύει **πολύ καλή συμφωνία**. Επιπλέον δεδομένου ότι το  $p\text{-value} = 0,000$  αυτό

σημαίνει πως  $pvalue < 0,05$  επομένως ο συντελεστής kappa μας είναι στατιστικά σημαντικός διαφορετικός από το μηδέν.

#### Αντιρετροϊκό φάρμακο D4T

- **ANRS VS REGA:** Ο συντελεστής Cohen's Kappa είναι 0,571 αυτό είναι το ποσοστό συμφωνίας πέρα από την τυχαία συμφωνία. Με βάσει τις κατευθυντήριες γραμμές του Altman (1991) η συγκεκριμένη τιμή του Kappa αντιπροσωπεύει **μέτρια συμφωνία**. Επιπλέον δεδομένου ότι το  $pvalue = 0,000$  αυτό σημαίνει πως  $pvalue < 0,05$  επομένως ο συντελεστής kappa μας είναι στατιστικά σημαντικός διαφορετικός από το μηδέν.
- **ANRS VS VIROSEQ:** Ο συντελεστής Cohen's Kappa είναι 0,602 αυτό είναι το ποσοστό συμφωνίας πέρα από την τυχαία συμφωνία. Με βάσει τις κατευθυντήριες γραμμές του Altman (1991) η συγκεκριμένη τιμή του Kappa αντιπροσωπεύει **μέτρια συμφωνία**. Επιπλέον δεδομένου ότι το  $pvalue = 0,000$  αυτό σημαίνει πως  $pvalue < 0,05$  επομένως ο συντελεστής kappa μας είναι στατιστικά σημαντικός διαφορετικός από το μηδέν.
- **REGA VS VIROSEQ:** Ο συντελεστής Cohen's Kappa είναι 0,839 αυτό είναι το ποσοστό συμφωνίας πέρα από την τυχαία συμφωνία. Με βάσει τις κατευθυντήριες γραμμές του Altman (1991) η συγκεκριμένη τιμή του Kappa αντιπροσωπεύει **πολύ καλή συμφωνία**. Επιπλέον δεδομένου ότι το  $pvalue = 0,000$  αυτό σημαίνει πως  $pvalue < 0,05$  επομένως ο συντελεστής kappa μας είναι στατιστικά σημαντικός διαφορετικός από το μηδέν.

#### Αντιρετροϊκό φάρμακο DDI

- **ANRS VS REGA:** Ο συντελεστής Cohen's Kappa είναι 0,495 αυτό είναι το ποσοστό συμφωνίας πέρα από την τυχαία συμφωνία. Με βάσει τις κατευθυντήριες γραμμές του Altman (1991) η συγκεκριμένη τιμή του Kappa αντιπροσωπεύει **μέτρια συμφωνία**.

Επιπλέον δεδομένου ότι το  $pvalue = 0,000$  αυτό σημαίνει πως  $pvalue < 0,05$  επομένως ο συντελεστής kappa μας είναι στατιστικά σημαντικός διαφορετικός από το μηδέν.

- **ANRS VS VIROSEQ:** Ο συντελεστής Cohen's Kappa είναι 0,664 αυτό είναι το ποσοστό συμφωνίας πέρα από την τυχαία συμφωνία. Με βάσει τις κατευθυντήριες γραμμές του Altman (1991) η συγκεκριμένη τιμή του Kappa αντιπροσωπεύει **καλή συμφωνία**. Επιπλέον δεδομένου ότι το  $pvalue = 0,000$  αυτό σημαίνει πως  $pvalue < 0,05$  επομένως ο συντελεστής kappa μας είναι στατιστικά σημαντικός διαφορετικός από το μηδέν.
- **REGA VS VIROSEQ:** Ο συντελεστής Cohen's Kappa είναι 0,797 αυτό είναι το ποσοστό συμφωνίας πέρα από την τυχαία συμφωνία. Με βάσει τις κατευθυντήριες γραμμές του Altman (1991) η συγκεκριμένη τιμή του Kappa αντιπροσωπεύει **καλή συμφωνία**. Επιπλέον δεδομένου ότι το  $pvalue = 0,000$  αυτό σημαίνει πως  $pvalue < 0,05$  επομένως ο συντελεστής kappa μας είναι στατιστικά σημαντικός διαφορετικός από το μηδέν.

#### Αντιρετροϊκό φάρμακο FTC

- **ANRS VS REGA:** Ο συντελεστής Cohen's Kappa είναι 1,000 αυτό είναι το ποσοστό συμφωνίας πέρα από την τυχαία συμφωνία. Με βάσει τις κατευθυντήριες γραμμές του Altman (1991) η συγκεκριμένη τιμή του Kappa αντιπροσωπεύει **πολύ καλή συμφωνία**. Επιπλέον δεδομένου ότι το  $pvalue = 0,000$  αυτό σημαίνει πως  $pvalue < 0,05$  επομένως ο συντελεστής kappa μας είναι στατιστικά σημαντικός διαφορετικός από το μηδέν.
- **ANRS VS VIROSEQ:** Ο συντελεστής Cohen's Kappa είναι 1,000 αυτό είναι το ποσοστό συμφωνίας πέρα από την τυχαία συμφωνία. Με βάσει τις κατευθυντήριες γραμμές του Altman (1991) η συγκεκριμένη τιμή του Kappa αντιπροσωπεύει **πολύ καλή συμφωνία**. Επιπλέον δεδομένου ότι το  $pvalue = 0,000$  αυτό

σημαίνει πως  $pvalue < 0,05$  επομένως ο συντελεστής kappa μας είναι στατιστικά σημαντικός διαφορετικός από το μηδέν.

- **REGA VS VIROSEQ:** Ο συντελεστής Cohen's Kappa είναι 1,000 αυτό είναι το ποσοστό συμφωνίας πέρα από την τυχαία συμφωνία. Με βάσει τις κατευθυντήριες γραμμές του Altman (1991) η συγκεκριμένη τιμή του Kappa αντιπροσωπεύει **πολύ καλή συμφωνία**. Επιπλέον δεδομένου ότι το  $pvalue = 0,000$  αυτό σημαίνει πως  $pvalue < 0,05$  επομένως ο συντελεστής kappa μας είναι στατιστικά σημαντικός διαφορετικός από το μηδέν.

#### Αντιρετροϊκό φάρμακο 3TC

- **ANRS VS REGA:** Ο συντελεστής Cohen's Kappa είναι 1.000 αυτό είναι το ποσοστό συμφωνίας πέρα από την τυχαία συμφωνία. Με βάσει τις κατευθυντήριες γραμμές του Altman (1991) η συγκεκριμένη τιμή του Kappa αντιπροσωπεύει **πολύ καλή συμφωνία**. Επιπλέον δεδομένου ότι το  $pvalue = 0,000$  αυτό σημαίνει πως  $pvalue < 0,05$  επομένως ο συντελεστής kappa μας είναι στατιστικά σημαντικός διαφορετικός από το μηδέν.
- **ANRS VS VIROSEQ:** Ο συντελεστής Cohen's Kappa είναι 1,000 αυτό είναι το ποσοστό συμφωνίας πέρα από την τυχαία συμφωνία. Με βάσει τις κατευθυντήριες γραμμές του Altman (1991) η συγκεκριμένη τιμή του Kappa αντιπροσωπεύει **πολύ καλή συμφωνία**. Επιπλέον δεδομένου ότι το  $pvalue = 0,000$  αυτό σημαίνει πως  $pvalue < 0,05$  επομένως ο συντελεστής kappa μας είναι στατιστικά σημαντικός διαφορετικός από το μηδέν.
- **REGA VS VIROSEQ:** Ο συντελεστής Cohen's Kappa είναι 1,000 αυτό είναι το ποσοστό συμφωνίας πέρα από την τυχαία συμφωνία. Με βάσει τις κατευθυντήριες γραμμές του Altman (1991) η συγκεκριμένη τιμή του Kappa αντιπροσωπεύει **πολύ καλή συμφωνία**. Επιπλέον δεδομένου ότι το  $pvalue = 0,000$  αυτό

σημαίνει πως  $pvalue < 0,05$  επομένως ο συντελεστής kappa μας είναι στατιστικά σημαντικός διαφορετικός από το μηδέν.

#### Αντιρετροϊκό φάρμακο TDF

- **ANRS VS REGA:** Ο συντελεστής Cohen's Kappa είναι 1.000 αυτό είναι το ποσοστό συμφωνίας πέρα από την τυχαία συμφωνία. Με βάσει τις κατευθυντήριες γραμμές του Altman (1991) η συγκεκριμένη τιμή του Kappa αντιπροσωπεύει **πολύ καλή συμφωνία**. Επιπλέον δεδομένου ότι το  $pvalue = 0,008$  αυτό σημαίνει πως  $pvalue < 0,05$  επομένως ο συντελεστής kappa μας είναι στατιστικά σημαντικός διαφορετικός από το μηδέν.
- **ANRS VS VIROSEQ:** Ο συντελεστής Cohen's Kappa είναι 0.330 αυτό είναι το ποσοστό συμφωνίας πέρα από την τυχαία συμφωνία. Με βάσει τις κατευθυντήριες γραμμές του Altman (1991) η συγκεκριμένη τιμή του Kappa αντιπροσωπεύει **ανεπαρκής συμφωνία**. Επιπλέον δεδομένου ότι το  $pvalue = 1.000$  αυτό σημαίνει πως  $pvalue > 0,05$  επομένως ο συντελεστής kappa μας δεν είναι στατιστικά σημαντικός διαφορετικός από το μηδέν.
- **REGA VS VIROSEQ:** Ο συντελεστής Cohen's Kappa είναι 0.330 αυτό είναι το ποσοστό συμφωνίας πέρα από την τυχαία συμφωνία. Με βάσει τις κατευθυντήριες γραμμές του Altman (1991) η συγκεκριμένη τιμή του Kappa αντιπροσωπεύει **ανεπαρκής συμφωνία**. Επιπλέον δεδομένου ότι το  $pvalue = 1.000$  αυτό σημαίνει πως  $pvalue > 0,05$  επομένως ο συντελεστής kappa μας δεν είναι στατιστικά σημαντικός διαφορετικός από το μηδέν.

**Πίνακας 4:** Συγκριτική αξιολόγηση αποτελεσμάτων ερμηνείας γονοτυπικής αντοχής για τους NNRTIs ανά ζεύγη: ANRS VS REGA, ANRS VS VIROSEQ, REGA VS VIROSEQ.

| NNRTIs |         | ANRS | REGA                | VIROSEQ             |
|--------|---------|------|---------------------|---------------------|
| EFV    | ANRS    | -    | 0,875(pvalue=0,000) | 0,786(pvalue=0,000) |
|        | REGA    | -    | -                   | 0,823(pvalue=0,000) |
|        | VIROSEQ | -    | -                   | -                   |
| ETR    | ANRS    | -    | 0,060(pvalue=0,000) | 0,016(pvalue=0,000) |
|        | REGA    | -    | -                   | 0,492(pvalue=0,033) |
|        | VIROSEQ | -    | -                   | -                   |
| NVP    | ANRS    | -    | 0,475(pvalue=0,000) | 0,482(pvalue=0,000) |
|        | REGA    | -    | -                   | 0,794(pvalue=0,000) |
|        | VIROSEQ | -    | -                   | -                   |
| RPV    | ANRS    | -    | 0,410(pvalue=0,000) | 0,018(pvalue=0,000) |
|        | REGA    | -    | -                   | 0,055(pvalue=0,000) |
|        | VIROSEQ | -    | -                   | -                   |

Στον **Πίνακα: 4** γίνεται χρήση του λόγου Kappa ώστε να ποσοτικοποιηθεί ο βαθμός συμφωνίας των τριών αλγορίθμων για τους NNRTIs, οι αλγόριθμοι όπως αναφέραμε και παραπάνω αξιολογούνται ανά ζεύγη.

#### Αντιρετροϊκό φάρμακο EFV

- **ANRS VS REGA:** Ο συντελεστής Cohen's Kappa είναι 0.875 αυτό είναι το ποσοστό συμφωνίας πέρα από την τυχαία συμφωνία. Με βάσει τις κατευθυντήριες γραμμές του Altman (1991) η συγκεκριμένη τιμή του Kappa αντιπροσωπεύει **πολύ καλή συμφωνία**. Επιπλέον δεδομένου ότι το pvalue = 0,000 αυτό σημαίνει πως  $pvalue < 0,05$  επομένως ο συντελεστής kappa μας είναι στατιστικά σημαντικός διαφορετικός από το μηδέν.
- **ANRS VS VIROSEQ:** Ο συντελεστής Cohen's Kappa είναι 0.786 αυτό είναι το ποσοστό συμφωνίας πέρα από την τυχαία συμφωνία. Με βάσει τις κατευθυντήριες γραμμές του Altman (1991) η συγκεκριμένη τιμή του Kappa αντιπροσωπεύει **καλή συμφωνία**. Επιπλέον δεδομένου ότι το pvalue = 0,000 αυτό σημαίνει πως

$p\text{value} < 0,05$  επομένως ο συντελεστής kappa μας είναι στατιστικά σημαντικός διαφορετικός από το μηδέν.

- **REGA VS VIROSEQ:** Ο συντελεστής Cohen's Kappa είναι 0.823 αυτό είναι το ποσοστό συμφωνίας πέρα από την τυχαία συμφωνία. Με βάσει τις κατευθυντήριες γραμμές του Altman (1991) η συγκεκριμένη τιμή του Kappa αντιπροσωπεύει **πολύ καλή συμφωνία**. Επιπλέον δεδομένου ότι το  $p\text{value} = 0,000$  αυτό σημαίνει πως  $p\text{value} < 0,05$  επομένως ο συντελεστής kappa μας είναι στατιστικά σημαντικός διαφορετικός από το μηδέν.

#### Αντιρετροϊκό φάρμακο ETR

- **ANRS VS REGA:** Ο συντελεστής Cohen's Kappa είναι 0.060 αυτό είναι το ποσοστό συμφωνίας πέρα από την τυχαία συμφωνία. Με βάσει τις κατευθυντήριες γραμμές του Altman (1991) η συγκεκριμένη τιμή του Kappa αντιπροσωπεύει **κακή συμφωνία**. Επιπλέον δεδομένου ότι το  $p\text{value} = 0,000$  αυτό σημαίνει πως  $p\text{value} < 0,05$  επομένως ο συντελεστής kappa μας είναι στατιστικά σημαντικός διαφορετικός από το μηδέν.
- **ANRS VS VIROSEQ:** Ο συντελεστής Cohen's Kappa είναι 0.016 αυτό είναι το ποσοστό συμφωνίας πέρα από την τυχαία συμφωνία. Με βάσει τις κατευθυντήριες γραμμές του Altman (1991) η συγκεκριμένη τιμή του Kappa αντιπροσωπεύει **κακή συμφωνία**. Επιπλέον δεδομένου ότι το  $p\text{value} = 0,000$  αυτό σημαίνει πως  $p\text{value} < 0,05$  επομένως ο συντελεστής kappa μας είναι στατιστικά σημαντικός διαφορετικός από το μηδέν.
- **REGA VS VIROSEQ:** Ο συντελεστής Cohen's Kappa είναι 0.492 αυτό είναι το ποσοστό συμφωνίας πέρα από την τυχαία συμφωνία. Με βάσει τις κατευθυντήριες γραμμές του Altman (1991) η συγκεκριμένη τιμή του Kappa αντιπροσωπεύει **μέτρια συμφωνία**. Επιπλέον δεδομένου ότι το  $p\text{value} = 0.033$  αυτό σημαίνει πως  $p\text{value} < 0,05$  επομένως ο συντελεστής kappa μας είναι στατιστικά σημαντικός διαφορετικός από το μηδέν.

#### Αντιρετροϊκό φάρμακο NVP

- **ANRS VS REGA:** Ο συντελεστής Cohen's Kappa είναι 0.475 αυτό είναι το ποσοστό συμφωνίας πέρα από την τυχαία συμφωνία. Με βάση τις κατευθυντήριες γραμμές του Altman (1991) η συγκεκριμένη τιμή του Kappa αντιπροσωπεύει **μέτρια συμφωνία**. Επιπλέον δεδομένου ότι το  $p\text{-value} = 0,000$  αυτό σημαίνει πως  $p\text{-value} < 0,05$  επομένως ο συντελεστής kappa μας είναι στατιστικά σημαντικός διαφορετικός από το μηδέν.
- **ANRS VS VIROSEQ:** Ο συντελεστής Cohen's Kappa είναι 0.482 αυτό είναι το ποσοστό συμφωνίας πέρα από την τυχαία συμφωνία. Με βάση τις κατευθυντήριες γραμμές του Altman (1991) η συγκεκριμένη τιμή του Kappa αντιπροσωπεύει **μέτρια συμφωνία**. Επιπλέον δεδομένου ότι το  $p\text{-value} = 0,000$  αυτό σημαίνει πως  $p\text{-value} < 0,05$  επομένως ο συντελεστής kappa μας είναι στατιστικά σημαντικός διαφορετικός από το μηδέν.
- **REGA VS VIROSEQ:** Ο συντελεστής Cohen's Kappa είναι 0.794 αυτό είναι το ποσοστό συμφωνίας πέρα από την τυχαία συμφωνία. Με βάση τις κατευθυντήριες γραμμές του Altman (1991) η συγκεκριμένη τιμή του Kappa αντιπροσωπεύει **καλή συμφωνία**. Επιπλέον δεδομένου ότι το  $p\text{-value} = 0.000$  αυτό σημαίνει πως  $p\text{-value} < 0,05$  επομένως ο συντελεστής kappa μας είναι στατιστικά σημαντικός διαφορετικός από το μηδέν.

#### Αντιρετροϊκό φάρμακο RPV

- **ANRS VS REGA:** Ο συντελεστής Cohen's Kappa είναι 0.410 αυτό είναι το ποσοστό συμφωνίας πέρα από την τυχαία συμφωνία. Με βάση τις κατευθυντήριες γραμμές του Altman (1991) η συγκεκριμένη τιμή του Kappa αντιπροσωπεύει **μέτρια συμφωνία**. Επιπλέον δεδομένου ότι το  $p\text{-value} = 0,000$  αυτό σημαίνει πως  $p\text{-value} < 0,05$  επομένως ο συντελεστής kappa μας είναι στατιστικά σημαντικός διαφορετικός από το μηδέν.

- **ANRS VS VIROSEQ:** Ο συντελεστής Cohen's Kappa είναι 0.018 αυτό είναι το ποσοστό συμφωνίας πέρα από την τυχαία συμφωνία. Με βάσει τις κατευθυντήριες γραμμές του Altman (1991) η συγκεκριμένη τιμή του Kappa αντιπροσωπεύει **κακή συμφωνία**. Επιπλέον δεδομένου ότι το  $p\text{-value} = 0,000$  αυτό σημαίνει πως  $p\text{-value} < 0,05$  επομένως ο συντελεστής kappa μας είναι στατιστικά σημαντικός διαφορετικός από το μηδέν.
- **REGA VS VIROSEQ:** Ο συντελεστής Cohen's Kappa είναι 0.055 αυτό είναι το ποσοστό συμφωνίας πέρα από την τυχαία συμφωνία. Με βάσει τις κατευθυντήριες γραμμές του Altman (1991) η συγκεκριμένη τιμή του Kappa αντιπροσωπεύει **κακή συμφωνία**. Επιπλέον δεδομένου ότι το  $p\text{-value} = 0.000$  αυτό σημαίνει πως  $p\text{-value} < 0,05$  επομένως ο συντελεστής kappa μας είναι στατιστικά σημαντικός διαφορετικός από το μηδέν.

**Πίνακας 5:** Συγκριτική αξιολόγηση αποτελεσμάτων ερμηνείας γονοτυπικής αντοχής για τους PIs ανά ζεύγη: ANRS VS REGA, ANRS VS VIROSEQ, REGA VS VIROSEQ.

| PIs   |         | ANRS | REGA                              | VIROSEQ                           |
|-------|---------|------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| ATV/r | ANRS    | -    | 0,000 <sup>a</sup> (pvalue=0,000) | 0,000 <sup>d</sup> (pvalue=0,000) |
|       | REGA    | -    | -                                 | f                                 |
|       | VIROSEQ | -    | -                                 | -                                 |
| DRV/r | ANRS    | -    | b                                 | e                                 |
|       | REGA    | -    | -                                 | f                                 |
|       | VIROSEQ | -    | -                                 | -                                 |
| FPV/r | ANRS    | -    | b                                 | e                                 |
|       | REGA    | -    | -                                 | f                                 |
|       | VIROSEQ | -    | -                                 | -                                 |
| IDV/r | ANRS    | -    | b                                 | e                                 |
|       | REGA    | -    | -                                 | f                                 |
|       | VIROSEQ | -    | -                                 | -                                 |
| LPV/r | ANRS    | -    | 0,000 <sup>a</sup> (pvalue=0,000) | 0,000 <sup>d</sup> (pvalue=0,000) |
|       | REGA    | -    | -                                 | f                                 |
|       | VIROSEQ | -    | -                                 | -                                 |
| NFV   | ANRS    | -    | 0,000 <sup>c</sup> (pvalue=0,000) | e                                 |
|       | REGA    | -    | -                                 | 0,000 <sup>d</sup> (pvalue=0,000) |
|       | VIROSEQ | -    | -                                 | -                                 |
| SQV/r | ANRS    | -    | 0,000 <sup>a</sup> (pvalue=0,000) | 0,000 <sup>d</sup> (pvalue=0,000) |
|       | REGA    | -    | -                                 | f                                 |
|       | VIROSEQ | -    | -                                 | -                                 |
| TPV/r | ANRS    | -    | 0,000 <sup>a</sup> (pvalue=0,000) | 0,000 <sup>d</sup> (pvalue=0,000) |
|       | REGA    | -    | -                                 | f                                 |
|       | VIROSEQ | -    | -                                 | -                                 |

<sup>a</sup> No statistics are computed because REGA algorithm is a constant

<sup>b</sup> No statistics are computed because ANRS algorithm and REGA algorithm are constant

<sup>c</sup> No statistics are computed because ANRS algorithm is a constant

<sup>d</sup> No statistics are computed because VIROSEQ algorithm is a constant

<sup>e</sup> No statistics are computed because ANRS algorithm and VIROSEQ algorithm are constant

<sup>f</sup> No statistics are computed because REGA algorithm and VIROSEQ algorithm are constant

Στον Πίνακα: 5 γίνεται χρήση του λόγου Kappa ώστε να ποσοτικοποιηθεί ο βαθμός συμφωνίας των τριών αλγορίθμων για τους PIs, οι αλγόριθμοι όπως αναφέραμε και παραπάνω αξιολογούνται ανά ζεύγη. Στον παραπάνω πίνακα παρατηρούμε πως εμφανίζεται συχνά το μήνυμα “constant”, αυτό μεταφράζεται ως σταθερά. Δηλαδή έναν ένα φάρμακο παρουσιάζει ίδιο επίπεδο αντοχής στους δύο διαφορετικούς αλγόριθμους τότε η μεταβλητή που αντιπροσωπεύει την αντοχή του φαρμάκου θα είναι σταθερή και το SPSS θα παράγει το παραπάνω μήνυμα. Σε μια τέτοια περίπτωση το Kappa μπορεί να αποδειχθεί ότι είναι μηδέν είτε απροσδιόριστη μορφή.

#### Αντιρετροϊκό φάρμακο ATV/r

- **ANRS VS REGA:** Ο συντελεστής Cohen's Kappa είναι 0.000 αυτό είναι το ποσοστό συμφωνίας πέρα από την τυχαία συμφωνία. Με βάσει τις κατευθυντήριες γραμμές του Altman (1991) η συγκεκριμένη τιμή του Kappa αντιπροσωπεύει **κακή συμφωνία**. Επιπλέον δεδομένου ότι το  $p\text{-value} = 0,000$  αυτό σημαίνει πως  $p\text{-value} < 0,05$  επομένως ο συντελεστής kappa μας είναι στατιστικά σημαντικός διαφορετικός από το μηδέν.
- **ANRS VS VIROSEQ:** Ο συντελεστής Cohen's Kappa είναι 0.000 αυτό είναι το ποσοστό συμφωνίας πέρα από την τυχαία συμφωνία. Με βάσει τις κατευθυντήριες γραμμές του Altman (1991) η συγκεκριμένη τιμή του Kappa αντιπροσωπεύει **κακή συμφωνία**. Επιπλέον δεδομένου ότι το  $p\text{-value} = 0,000$  αυτό σημαίνει πως  $p\text{-value} < 0,05$  επομένως ο συντελεστής kappa μας είναι στατιστικά σημαντικός διαφορετικός από το μηδέν.
- **REGA VS VIROSEQ:** Ο συντελεστής Cohen's Kappa παρουσιάζει απροσδιόριστη μορφή καθώς οι αλγόριθμοι REGA και VIROSEQ παρουσιάζουν ίδιο επίπεδο αντοχής. Για να γίνει κατανοητό το παραπάνω κοιτάμε ξανά τα ποσοστά στον πίνακα 1 στην κατηγορία PIs για το φάρμακο ATV/r. Παρατηρούμε πως οι αλγόριθμοι REGA και VIROSEQ παρουσιάζουν ακριβώς τα ίδια ποσοστά για (R):0%, (I):0%, και (S): 100%. Επομένως η μεταβλητή που αντιπροσωπεύει

την αντοχή του φαρμάκου είναι σταθερή. Σε μια τέτοια περίπτωση το Kappa μπορεί να αποδειχθεί ότι είναι μηδέν είτε απροσδιόριστη μορφή.

#### Αντιρετροϊκό φάρμακο DRV/r

- **ANRS VS REGA:** Ο συντελεστής Cohen's Kappa παρουσιάζει απροσδιόριστη μορφή καθώς οι αλγόριθμοι ANRS και REGA παρουσιάζουν ίδιο επίπεδο αντοχής. Για να γίνει κατανοητό το παραπάνω κοιτάμε ξανά τα ποσοστά στον πίνακα 1 στην κατηγορία PIs για το φάρμακο DRV/r. Παρατηρούμε πως οι αλγόριθμοι ANRS και REGA παρουσιάζουν ακριβώς τα ίδια ποσοστά για (R):0%, (I):0%, και (S): 100%. Επομένως η μεταβλητή που αντιπροσωπεύει την αντοχή του φαρμάκου είναι σταθερή. Σε μια τέτοια περίπτωση το Kappa μπορεί να αποδειχθεί ότι είναι μηδέν είτε απροσδιόριστη μορφή.
- **ANRS VS VIROSEQ:** Ο συντελεστής Cohen's Kappa παρουσιάζει απροσδιόριστη μορφή καθώς οι αλγόριθμοι ANRS και VIROSEQ παρουσιάζουν ίδιο επίπεδο αντοχής. Για να γίνει κατανοητό το παραπάνω κοιτάμε ξανά τα ποσοστά στον πίνακα 1 στην κατηγορία PIs για το φάρμακο DRV/r. Παρατηρούμε πως οι αλγόριθμοι ANRS και VIROSEQ παρουσιάζουν ακριβώς τα ίδια ποσοστά για (R):0%, (I):0%, και (S): 100%. Επομένως η μεταβλητή που αντιπροσωπεύει την αντοχή του φαρμάκου είναι σταθερή. Σε μια τέτοια περίπτωση το Kappa μπορεί να αποδειχθεί ότι είναι μηδέν είτε απροσδιόριστη μορφή.
- **REGA VS VIROSEQ:** Ο συντελεστής Cohen's Kappa παρουσιάζει απροσδιόριστη μορφή καθώς οι αλγόριθμοι REGA και VIROSEQ παρουσιάζουν ίδιο επίπεδο αντοχής. Για να γίνει κατανοητό το παραπάνω κοιτάμε ξανά τα ποσοστά στον πίνακα 1 στην κατηγορία PIs για το φάρμακο DRV/r. Παρατηρούμε πως οι αλγόριθμοι REGA και VIROSEQ παρουσιάζουν ακριβώς τα ίδια ποσοστά για (R):0%,

(I):0%, και (S): 100%. Επομένως η μεταβλητή που αντιπροσωπεύει την αντοχή του φαρμάκου είναι σταθερή. Σε μια τέτοια περίπτωση το Καρρα μπορεί να αποδειχθεί ότι είναι μηδέν είτε απροσδιόριστη μορφή.

#### Αντιρετροϊκό φάρμακο FPV/r

- **ANRS VS REGA:** Ο συντελεστής Cohen's Kappa παρουσιάζει απροσδιόριστη μορφή καθώς οι αλγόριθμοι ANRS και REGA παρουσιάζουν ίδιο επίπεδο αντοχής. Για να γίνει κατανοητό το παραπάνω κοιτάμε ξανά τα ποσοστά στον πίνακα 1 στην κατηγορία Pls για το φάρμακο FPV/r. Παρατηρούμε πως οι αλγόριθμοι ANRS και REGA παρουσιάζουν ακριβώς τα ίδια ποσοστά για (R):0%, (I):0%, και (S): 100%. Επομένως η μεταβλητή που αντιπροσωπεύει την αντοχή του φαρμάκου είναι σταθερή. Σε μια τέτοια περίπτωση το Καρρα μπορεί να αποδειχθεί ότι είναι μηδέν είτε απροσδιόριστη μορφή.
- **ANRS VS VIROSEQ:** Ο συντελεστής Cohen's Kappa παρουσιάζει απροσδιόριστη μορφή καθώς οι αλγόριθμοι ANRS και VIROSEQ παρουσιάζουν ίδιο επίπεδο αντοχής. Για να γίνει κατανοητό το παραπάνω κοιτάμε ξανά τα ποσοστά στον πίνακα 1 στην κατηγορία Pls για το φάρμακο FPV/r. Παρατηρούμε πως οι αλγόριθμοι ANRS και VIROSEQ παρουσιάζουν ακριβώς τα ίδια ποσοστά για (R):0%, (I):0%, και (S): 100%. Επομένως η μεταβλητή που αντιπροσωπεύει την αντοχή του φαρμάκου είναι σταθερή. Σε μια τέτοια περίπτωση το Καρρα μπορεί να αποδειχθεί ότι είναι μηδέν είτε απροσδιόριστη μορφή.
- **REGA VS VIROSEQ:** Ο συντελεστής Cohen's Kappa παρουσιάζει απροσδιόριστη μορφή καθώς οι αλγόριθμοι REGA και VIROSEQ παρουσιάζουν ίδιο επίπεδο αντοχής. Για να γίνει κατανοητό το παραπάνω κοιτάμε ξανά τα ποσοστά στον πίνακα 1 στην κατηγορία Pls για το φάρμακο FPV/r. Παρατηρούμε πως οι αλγόριθμοι REGA και VIROSEQ παρουσιάζουν ακριβώς τα ίδια ποσοστά για (R):0%, (I):0%, και (S): 100%. Επομένως η μεταβλητή που αντιπροσωπεύει

την αντοχή του φαρμάκου είναι σταθερή. Σε μια τέτοια περίπτωση το Kappa μπορεί να αποδειχθεί ότι είναι μηδέν είτε απροσδιόριστη μορφή.

#### Αντιρετροϊκό φάρμακο IDV/r

- **ANRS VS REGA:** Ο συντελεστής Cohen's Kappa παρουσιάζει απροσδιόριστη μορφή καθώς οι αλγόριθμοι ANRS και REGA παρουσιάζουν ίδιο επίπεδο αντοχής. Για να γίνει κατανοητό το παραπάνω κοιτάμε ξανά τα ποσοστά στον πίνακα 1 στην κατηγορία Pls για το φάρμακο FPV/r. Παρατηρούμε πως οι αλγόριθμοι ANRS και REGA παρουσιάζουν ακριβώς τα ίδια ποσοστά για (R):0%, (I):0%, και (S): 100%. Επομένως η μεταβλητή που αντιπροσωπεύει την αντοχή του φαρμάκου είναι σταθερή. Σε μια τέτοια περίπτωση το Kappa μπορεί να αποδειχθεί ότι είναι μηδέν είτε απροσδιόριστη μορφή.
- **ANRS VS VIROSEQ:** Ο συντελεστής Cohen's Kappa παρουσιάζει απροσδιόριστη μορφή καθώς οι αλγόριθμοι ANRS και VIROSEQ παρουσιάζουν ίδιο επίπεδο αντοχής. Για να γίνει κατανοητό το παραπάνω κοιτάμε ξανά τα ποσοστά στον πίνακα 1 στην κατηγορία Pls για το φάρμακο FPV/r. Παρατηρούμε πως οι αλγόριθμοι ANRS και VIROSEQ παρουσιάζουν ακριβώς τα ίδια ποσοστά για (R):0%, (I):0%, και (S): 100%. Επομένως η μεταβλητή που αντιπροσωπεύει την αντοχή του φαρμάκου είναι σταθερή. Σε μια τέτοια περίπτωση το Kappa μπορεί να αποδειχθεί ότι είναι μηδέν είτε απροσδιόριστη μορφή.
- **REGA VS VIROSEQ:** Ο συντελεστής Cohen's Kappa παρουσιάζει απροσδιόριστη μορφή καθώς οι αλγόριθμοι REGA και VIROSEQ παρουσιάζουν ίδιο επίπεδο αντοχής. Για να γίνει κατανοητό το παραπάνω κοιτάμε ξανά τα ποσοστά στον πίνακα 1 στην κατηγορία Pls για το φάρμακο FPV/r. Παρατηρούμε πως οι αλγόριθμοι REGA και VIROSEQ παρουσιάζουν ακριβώς τα ίδια ποσοστά για (R):0%, (I):0%, και (S): 100%. Επομένως η μεταβλητή που αντιπροσωπεύει την αντοχή του φαρμάκου είναι σταθερή. Σε μια τέτοια περίπτωση

το Καρρα μπορεί να αποδειχθεί ότι είναι μηδέν είτε απροσδιόριστη μορφή.

#### Αντιρετροϊκό φάρμακο LPV/r

- **ANRS VS REGA:** Ο συντελεστής Cohen's Kappa είναι 0.000 αυτό είναι το ποσοστό συμφωνίας πέρα από την τυχαία συμφωνία. Με βάση τις κατευθυντήριες γραμμές του Altman (1991) η συγκεκριμένη τιμή του Kappa αντιπροσωπεύει **κακή συμφωνία**. Επιπλέον δεδομένου ότι το  $p\text{-value} = 0,000$  αυτό σημαίνει πως  $p\text{-value} < 0,05$  επομένως ο συντελεστής kappa μας είναι στατιστικά σημαντικός διαφορετικός από το μηδέν.
- **ANRS VS VIROSEQ:** Ο συντελεστής Cohen's Kappa είναι 0.000 αυτό είναι το ποσοστό συμφωνίας πέρα από την τυχαία συμφωνία. Με βάση τις κατευθυντήριες γραμμές του Altman (1991) η συγκεκριμένη τιμή του Kappa αντιπροσωπεύει **κακή συμφωνία**. Επιπλέον δεδομένου ότι το  $p\text{-value} = 0,000$  αυτό σημαίνει πως  $p\text{-value} < 0,05$  επομένως ο συντελεστής kappa μας είναι στατιστικά σημαντικός διαφορετικός από το μηδέν.
- **REGA VS VIROSEQ:** Ο συντελεστής Cohen's Kappa παρουσιάζει απροσδιόριστη μορφή καθώς οι αλγόριθμοι REGA και VIROSEQ παρουσιάζουν ίδιο επίπεδο αντοχής. Για να γίνει κατανοητό το παραπάνω κοιτάμε ξανά τα ποσοστά στον πίνακα 1 στην κατηγορία Pls για το φάρμακο LPV/r. Παρατηρούμε πως οι αλγόριθμοι REGA και VIROSEQ παρουσιάζουν ακριβώς τα ίδια ποσοστά για (R):0%, (I):0%, και (S): 100%. Επομένως η μεταβλητή που αντιπροσωπεύει την αντοχή του φαρμάκου είναι σταθερή. Σε μια τέτοια περίπτωση το Καρρα μπορεί να αποδειχθεί ότι είναι μηδέν είτε απροσδιόριστη μορφή.

#### Αντιρετροϊκό φάρμακο NFV

- **ANRS VS REGA:** Ο συντελεστής Cohen's Kappa είναι 0.000 αυτό είναι το ποσοστό συμφωνίας πέρα από την τυχαία συμφωνία. Με βάση τις κατευθυντήριες γραμμές του Altman (1991) η συγκεκριμένη τιμή του Kappa αντιπροσωπεύει **κακή συμφωνία**. Επιπλέον δεδομένου ότι το  $p\text{-value} = 0,000$  αυτό σημαίνει πως  $p\text{-value} < 0,05$  επομένως ο συντελεστής kappa μας είναι στατιστικά σημαντικός διαφορετικός από το μηδέν.
- **ANRS VS VIROSEQ:** Ο συντελεστής Cohen's Kappa παρουσιάζει απροσδιόριστη μορφή καθώς οι αλγόριθμοι ANRS και VIROSEQ παρουσιάζουν ίδιο επίπεδο αντοχής. Για να γίνει κατανοητό το παραπάνω κοιτάμε ξανά τα ποσοστά στον πίνακα 1 στην κατηγορία Pls για το φάρμακο NFV. Παρατηρούμε πως οι αλγόριθμοι ANRS και VIROSEQ παρουσιάζουν ακριβώς τα ίδια ποσοστά για (R):0%, (I):0%, και (S): 100%. Επομένως η μεταβλητή που αντιπροσωπεύει την αντοχή του φαρμάκου είναι σταθερή. Σε μια τέτοια περίπτωση το Kappa μπορεί να αποδειχθεί ότι είναι μηδέν είτε απροσδιόριστη μορφή.
- **REGA VS VIROSEQ:** Ο συντελεστής Cohen's Kappa είναι 0.000 αυτό είναι το ποσοστό συμφωνίας πέρα από την τυχαία συμφωνία. Με βάση τις κατευθυντήριες γραμμές του Altman (1991) η συγκεκριμένη τιμή του Kappa αντιπροσωπεύει **κακή συμφωνία**. Επιπλέον δεδομένου ότι το  $p\text{-value} = 0,000$  αυτό σημαίνει πως  $p\text{-value} < 0,05$  επομένως ο συντελεστής kappa μας είναι στατιστικά σημαντικός διαφορετικός από το μηδέν.

#### Αντιρετροϊκό φάρμακο SQV/r

- **ANRS VS REGA:** Ο συντελεστής Cohen's Kappa είναι 0.000 αυτό είναι το ποσοστό συμφωνίας πέρα από την τυχαία συμφωνία. Με βάση τις κατευθυντήριες γραμμές του Altman (1991) η συγκεκριμένη τιμή του Kappa αντιπροσωπεύει **κακή συμφωνία**. Επιπλέον δεδομένου ότι το  $p\text{-value} = 0,000$  αυτό σημαίνει πως

$p\text{value} < 0,05$  επομένως ο συντελεστής kappa μας είναι στατιστικά σημαντικός διαφορετικός από το μηδέν.

- **ANRS VS VIROSEQ:** Ο συντελεστής Cohen's Kappa είναι 0.000 αυτό είναι το ποσοστό συμφωνίας πέρα από την τυχαία συμφωνία. Με βάσει τις κατευθυντήριες γραμμές του Altman (1991) η συγκεκριμένη τιμή του Kappa αντιπροσωπεύει **κακή συμφωνία**. Επιπλέον δεδομένου ότι το  $p\text{value} = 0,000$  αυτό σημαίνει πως  $p\text{value} < 0,05$  επομένως ο συντελεστής kappa μας είναι στατιστικά σημαντικός διαφορετικός από το μηδέν.
- **REGA VS VIROSEQ:** Ο συντελεστής Cohen's Kappa παρουσιάζει απροσδιόριστη μορφή καθώς οι αλγόριθμοι REGA και VIROSEQ παρουσιάζουν ίδιο επίπεδο αντοχής. Για να γίνει κατανοητό το παραπάνω κοιτάμε ξανά τα ποσοστά στον πίνακα 1 στην κατηγορία Pls για το φάρμακο SQV/r. Παρατηρούμε πως οι αλγόριθμοι REGA και VIROSEQ παρουσιάζουν ακριβώς τα ίδια ποσοστά για (R):0%, (I):0%, και (S): 100%. Επομένως η μεταβλητή που αντιπροσωπεύει την αντοχή του φαρμάκου είναι σταθερή. Σε μια τέτοια περίπτωση το Kappa μπορεί να αποδειχθεί ότι είναι μηδέν είτε απροσδιόριστη μορφή.

#### Αντιρετροϊκό φάρμακο TPV/r

- **ANRS VS REGA:** Ο συντελεστής Cohen's Kappa είναι 0.000 αυτό είναι το ποσοστό συμφωνίας πέρα από την τυχαία συμφωνία. Με βάσει τις κατευθυντήριες γραμμές του Altman (1991) η συγκεκριμένη τιμή του Kappa αντιπροσωπεύει **κακή συμφωνία**. Επιπλέον δεδομένου ότι το  $p\text{value} = 0,000$  αυτό σημαίνει πως  $p\text{value} < 0,05$  επομένως ο συντελεστής kappa μας είναι στατιστικά σημαντικός διαφορετικός από το μηδέν.
- **ANRS VS VIROSEQ:** Ο συντελεστής Cohen's Kappa είναι 0.000 αυτό είναι το ποσοστό συμφωνίας πέρα από την τυχαία συμφωνία. Με βάσει τις κατευθυντήριες γραμμές του Altman (1991) η συγκεκριμένη τιμή του Kappa αντιπροσωπεύει **κακή συμφωνία**.

Επιπλέον δεδομένου ότι το  $p\text{-value} = 0,000$  αυτό σημαίνει πως  $p\text{-value} < 0,05$  επομένως ο συντελεστής kappa μας είναι στατιστικά σημαντικός διαφορετικός από το μηδέν.

- **REGA VS VIROSEQ:** Ο συντελεστής Cohen's Kappa παρουσιάζει απροσδιόριστη μορφή καθώς οι αλγόριθμοι REGA και VIROSEQ παρουσιάζουν ίδιο επίπεδο αντοχής. Για να γίνει κατανοητό το παραπάνω κοιτάμε ξανά τα ποσοστά στον πίνακα 1 στην κατηγορία Pls για το φάρμακο TPV/r. Παρατηρούμε πως οι αλγόριθμοι REGA και VIROSEQ παρουσιάζουν ακριβώς τα ίδια ποσοστά για (R):0%, (I):0%, και (S): 100%. Επομένως η μεταβλητή που αντιπροσωπεύει την αντοχή του φαρμάκου είναι σταθερή. Σε μια τέτοια περίπτωση το Kappa μπορεί να αποδειχθεί ότι είναι μηδέν είτε απροσδιόριστη μορφή.

### **Σύγκριση Kappa total για ANRS VS REGA, ANRS VS VIROSEQ, REGA VS VIROSEQ**

Πίνακας: 6 Kappa total

|         | ANRS | REGA                            | VIROSEQ                          |
|---------|------|---------------------------------|----------------------------------|
| ANRS    | -    | 0,286( $p\text{-value}=0,000$ ) | 0,243 ( $p\text{-value}=0,000$ ) |
| REGA    | -    | -                               | 0,701 ( $p\text{-value}=0,000$ ) |
| VIROSEQ | -    | -                               | -                                |

Στον Πίνακα 6 παρουσιάζονται τα συνολικά Kappa συγκρίνοντας τους αλγορίθμους ανά ζεύγη. Παρατηρούμε τα ακόλουθα:

#### **1. ANRS VS REGA KAPAA TOTAL**

Ο συντελεστής Cohen's Kappa total στην σύγκριση των αλγορίθμων ANRS και REGA είναι 0.286 αυτό είναι το ποσοστό συμφωνίας πέρα από την τυχαία συμφωνία. Με βάση τις κατευθυντήριες γραμμές του Altman (1991) η συγκεκριμένη τιμή του Kappa αντιπροσωπεύει **ανεπαρκή συμφωνία**.

Επιπλέον δεδομένου ότι το  $p\text{value} = 0.000$  αυτό σημαίνει πως  $p\text{value} < 0.05$  επομένως ο συντελεστής kappa μας είναι στατιστικά σημαντικός διαφορετικός από το μηδέν.

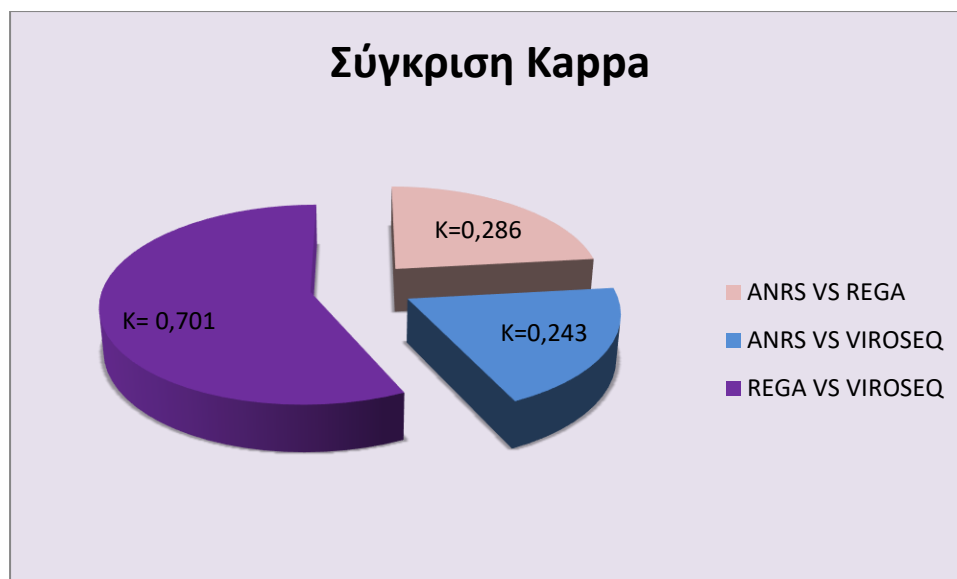
## **2. ANRS VS VIROSEQ KAPPA TOTAL**

Ο συντελεστής Cohen's Kappa total στην σύγκριση των αλγορίθμων ANRS και VIROSEQ είναι 0.243 αυτό είναι το ποσοστό συμφωνίας πέρα από την τυχαία συμφωνία. Με βάσει τις κατευθυντήριες γραμμές του Altman (1991) η συγκεκριμένη τιμή του Kappa αντιπροσωπεύει **ανεπαρκή συμφωνία**. Επιπλέον δεδομένου ότι το  $p\text{value} = 0.000$  αυτό σημαίνει πως  $p\text{value} < 0.05$  επομένως ο συντελεστής kappa μας είναι στατιστικά σημαντικός διαφορετικός από το μηδέν.

## **3. REGA VS VIROSEQ KAPPA TOTAL**

Ο συντελεστής Cohen's Kappa total στην σύγκριση των αλγορίθμων REGA και VIROSEQ είναι 0.701 αυτό είναι το ποσοστό συμφωνίας πέρα από την τυχαία συμφωνία. Με βάσει τις κατευθυντήριες γραμμές του Altman (1991) η συγκεκριμένη τιμή του Kappa αντιπροσωπεύει **καλή συμφωνία**. Επιπλέον δεδομένου ότι το  $p\text{value} = 0.000$  αυτό σημαίνει πως  $p\text{value} < 0.05$  επομένως ο συντελεστής kappa μας είναι στατιστικά σημαντικός διαφορετικός από το μηδέν.

Παρατηρούμε (**Πίνακας 6, Διάγραμμα 4**) επομένως από τις παραπάνω συγκρίσεις πως μεγαλύτερο βαθμό συμφωνίας παρουσιάζουν οι αλγόριθμοι REGA και VIROSEQ.



Διάγραμμα 4: Σύγκριση Kappa ανά ζεύγη

#### Σύγκριση Kappa ανά κατηγορία αντιρετροϊκών φαρμάκων

Παρακάτω γίνεται σύγκριση ανά ζεύγη αλγορίθμων (ANRS VS REGA, ANRS VS VIROSEQ, REGA VS VIROSEQ) ανά κατηγορία αντιρετροϊκών φαρμάκων (NRTIs, NNRTIs, PIs).

Πίνακας:7

| Drugs_category ANRS Vs REGA | Kappa                 |
|-----------------------------|-----------------------|
| NRTIs                       | 0,718 (pvalue=0,000)  |
| NNRTIs                      | 0,455 (pvalue=0,000)  |
| PIs                         | -0,001 (pvalue=0,000) |

Στον πίνακα 7 γίνεται σύγκριση του συντελεστή συμφωνίας Cohen's Kappa για τις τρεις κατηγορίες των αντιρετροϊκών φαρμάκων NRTIs, NNRTIs, PIs ανάμεσα στους αλγόριθμους ANRS και REGA.

- Στη κατηγορία των NRTIs παρατηρούμε πως Ο συντελεστής Cohen's Kappa στην σύγκριση των αλγορίθμων ANRS και REGA είναι 0.718 αυτό είναι το ποσοστό συμφωνίας πέρα από την τυχαία συμφωνία. Με

βάσει τις κατευθυντήριες γραμμές του Altman (1991) η συγκεκριμένη τιμή του Kappa αντιπροσωπεύει **καλή συμφωνία**. Επιπλέον δεδομένου ότι το  $pvalue = 0.000$  αυτό σημαίνει πως  $pvalue < 0.05$  επομένως ο συντελεστής kappa μας είναι στατιστικά σημαντικός διαφορετικός από το μηδέν.

- Στη κατηγορία των NNTRIs παρατηρούμε πως Ο συντελεστής Cohen's Kappa στην σύγκριση των αλγορίθμων ANRS και REGA είναι 0.455 αυτό είναι το ποσοστό συμφωνίας πέρα από την τυχαία συμφωνία. Με βάσει τις κατευθυντήριες γραμμές του Altman (1991) η συγκεκριμένη τιμή του Kappa αντιπροσωπεύει **μέτρια συμφωνία**. Επιπλέον δεδομένου ότι το  $pvalue = 0.000$  αυτό σημαίνει πως  $pvalue < 0.05$  επομένως ο συντελεστής kappa μας είναι στατιστικά σημαντικός διαφορετικός από το μηδέν.
- Στη κατηγορία των PIs παρατηρούμε πως Ο συντελεστής Cohen's Kappa στην σύγκριση των αλγορίθμων ANRS και REGA είναι -0.001 αυτό είναι το ποσοστό συμφωνίας πέρα από την τυχαία συμφωνία. Παρατηρούμε αρνητική τιμή, αρνητικές τιμές εμφανίζονται γενικά σπάνια και δηλώνουν πως **η παρατηρούμενη αναλογία συμφωνίας είναι μικρότερη της συμφωνίας που περιμένουμε λόγω της τυχαιότητας**. Επιπλέον δεδομένου ότι το  $pvalue = 0.000$  αυτό σημαίνει πως  $pvalue < 0.05$  επομένως ο συντελεστής kappa μας είναι στατιστικά σημαντικός διαφορετικός από το μηδέν.

#### Πίνακας :8

| Drugs_category ANRS Vs VIROSEQ | Kappa                |
|--------------------------------|----------------------|
| NRTIs                          | 0,730 (pvalue=0,000) |
| NNRTIs                         | 0,342 (pvalue=0,000) |
| PIs                            | 0,000 (pvalue=0,000) |

Στον πίνακα 8 γίνεται σύγκριση του συντελεστή συμφωνίας Cohen's Kappa για τις τρεις κατηγορίες των αντιρετροϊκών φαρμάκων NRTIs, NNRTIs, PIs ανάμεσα στους αλγόριθμους ANRS και VIROSEQ.

- Στη κατηγορία των NTRIs παρατηρούμε πως Ο συντελεστής Cohen's Kappa στην σύγκριση των αλγορίθμων ANRS και VIROSEQ είναι 0.730 αυτό είναι το ποσοστό συμφωνίας πέρα από την τυχαία συμφωνία. Με βάσει τις κατευθυντήριες γραμμές του Altman (1991) η συγκεκριμένη τιμή του Kappa αντιπροσωπεύει **καλή συμφωνία**. Επιπλέον δεδομένου ότι το  $p\text{value} = 0.000$  αυτό σημαίνει πως  $p\text{value} < 0.05$  επομένως ο συντελεστής kappa μας είναι στατιστικά σημαντικός διαφορετικός από το μηδέν.
- Στη κατηγορία των NNTRIs παρατηρούμε πως Ο συντελεστής Cohen's Kappa στην σύγκριση των αλγορίθμων ANRS και VIROSEQ είναι 0.342 αυτό είναι το ποσοστό συμφωνίας πέρα από την τυχαία συμφωνία. Με βάσει τις κατευθυντήριες γραμμές του Altman (1991) η συγκεκριμένη τιμή του Kappa αντιπροσωπεύει **ανεπαρκή συμφωνία**. Επιπλέον δεδομένου ότι το  $p\text{value} = 0.000$  αυτό σημαίνει πως  $p\text{value} < 0.05$  επομένως ο συντελεστής kappa μας είναι στατιστικά σημαντικός διαφορετικός από το μηδέν.
- Στη κατηγορία των PIs παρατηρούμε πως Ο συντελεστής Cohen's Kappa στην σύγκριση των αλγορίθμων ANRS και VIROSEQ είναι 0.000 αυτό είναι το ποσοστό συμφωνίας πέρα από την τυχαία συμφωνία. Με βάσει τις κατευθυντήριες γραμμές του Altman (1991) η συγκεκριμένη τιμή του Kappa αντιπροσωπεύει **κακή συμφωνία**. Επιπλέον δεδομένου ότι το  $p\text{value} = 0.000$  αυτό σημαίνει πως  $p\text{value} < 0.05$  επομένως ο συντελεστής kappa μας είναι στατιστικά σημαντικός διαφορετικός από το μηδέν.

## Πίνακας: 9

| Drugs_category REGA Vs VIROSEQ | Kappa                |
|--------------------------------|----------------------|
| <b>NRTIs</b>                   | 0,869 (pvalue=0,000) |
| <b>NNRTIs</b>                  | 0,562 (pvalue=0,000) |
| <b>PIs</b>                     | 0,000 (pvalue=0,000) |

Στον πίνακα 9 γίνεται σύγκριση του συντελεστή συμφωνίας Cohen's Kappa για τις τρεις κατηγορίες των αντιρετροϊκών φαρμάκων NRTIs, NNRTIs, PIs ανάμεσα στους αλγόριθμους REGA και VIROSEQ.

- Στη κατηγορία των NTRIs παρατηρούμε πως Ο συντελεστής Cohen's Kappa στην σύγκριση των αλγορίθμων REGA και VIROSEQ είναι 0.869 αυτό είναι το ποσοστό συμφωνίας πέρα από την τυχαία συμφωνία. Με βάσει τις κατευθυντήριες γραμμές του Altman (1991) η συγκεκριμένη τιμή του Kappa αντιπροσωπεύει **πολύ καλή συμφωνία**. Επιπλέον δεδομένου ότι το pvalue = 0.000 αυτό σημαίνει πως pvalue<0.05 επομένως ο συντελεστής kappa μας είναι στατιστικά σημαντικός διαφορετικός από το μηδέν.
- Στη κατηγορία των NNTRIs παρατηρούμε πως Ο συντελεστής Cohen's Kappa στην σύγκριση των αλγορίθμων REGA και VIROSEQ είναι 0.562 αυτό είναι το ποσοστό συμφωνίας πέρα από την τυχαία συμφωνία. Με βάσει τις κατευθυντήριες γραμμές του Altman (1991) η συγκεκριμένη τιμή του Kappa αντιπροσωπεύει **μέτρια συμφωνία**. Επιπλέον δεδομένου ότι το pvalue = 0.000 αυτό σημαίνει πως pvalue<0.05 επομένως ο συντελεστής kappa μας είναι στατιστικά σημαντικός διαφορετικός από το μηδέν.
- Στη κατηγορία των PIs παρατηρούμε πως Ο συντελεστής Cohen's Kappa στην σύγκριση των αλγορίθμων REGA και VIROSEQ είναι 0.000 αυτό είναι το ποσοστό συμφωνίας πέρα από την τυχαία συμφωνία. Με βάσει τις κατευθυντήριες γραμμές του Altman (1991) η συγκεκριμένη τιμή του Kappa αντιπροσωπεύει **κακή συμφωνία**. Επιπλέον δεδομένου ότι το pvalue = 0.000 αυτό σημαίνει πως

$p\text{-value} < 0.05$  επομένως ο συντελεστής  $kappa$  μας είναι στατιστικά σημαντικός διαφορετικός από το μηδέν.

### Έλεγχος ανεξαρτησίας McNemar (ANRS VS REGA, ANRS VS VIROSEQ, REGA VS VIROSEQ)

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε έλεγχος McNemar, η δοκιμή McNemar χρησιμοποιείται για να διαπιστωθεί εάν υπάρχουν διαφορές στα ποσοστά μιας εξαρτώμενης μεταβλητής δυο σχετικών ομάδων. Στη δική μας περίπτωση θα συγκριθούν οι αλγόριθμοι ανά ζεύγη (ANRS VS REGA, ANRS VS VIROSEQ, REGA VS VIROSEQ) και τα ποσοστά αντοχής (sensitive, intermediate, resistant) που παρουσιάζει το κάθε φάρμακο στον εκάστοτε αλγόριθμο.

Στους παρακάτω πίνακες (Πίνακας 10, 11 και 12) παρατηρούμε τα αποτελέσματα της δοκιμής McNemar.

### Έλεγχος ανεξαρτησίας McNemar ANRS VS REGA

Για την σύγκριση των αλγορίθμων ANRS και REGA το πρόγραμμα SPSS μας δίνει τα αποτελέσματα που αποτυπώνονται στον πίνακα 10. Έχουμε αποτέλεσμα για τα φάρμακα 3TC, FTC και TDF. Παρακάτω θα αναλύσουμε αναλυτικά τα αποτελέσματα του ακόλουθου πίνακα ώστε να γίνει κατανοητή η αποτύπωση του αποτελέσματος.

- **Αντιρετροϊκό φάρμακο 3TC:** Η μηδενική υπόθεση ( $H_0$ ) είναι πως τα ποσοστά αντοχής (resistant, intermediate, sensitive) του αλγόριθμου ANRS είναι ίσα με αυτά του αλγόριθμου REGA. Ενώ η εναλλακτική υπόθεση ( $H_1$ ) είναι πως τα ποσοστά αυτά διαφέρουν, δηλαδή:

**H<sub>0</sub>: Μηδενική Υπόθεση**

- $P_{1(R)} = P'_{1(R)}$
- $P_{2(I)} = P'_{2(I)}$
- $P_{3(S)} = P'_{3(S)}$

**H<sub>1</sub>: Εναλλακτική Υπόθεση**

- $P_{1(R)} \neq P'_{1(R)}$
- $P_{2(I)} \neq P'_{2(I)}$
- $P_{3(S)} \neq P'_{3(S)}$

Στον πίνακα 10 παρατηρούμε πως το Exact sig (2-sided) λαμβάνει την τιμή 1.000. Επομένως βλέποντας το τεστ McNemar  $pvalue = 1.000 > 0.05$  άρα δεν απορρίπτουμε την υπόθεση ισότητας των ποσοστών, άρα τα τρία αυτά ποσοστά είναι ίσα.

- **Αντιρετροϊκό φάρμακο FTC:** Η μηδενική υπόθεση (H<sub>0</sub>) είναι πως τα ποσοστά αντοχής( resistant, intermediate, sensitive) του αλγόριθμου ANRS είναι ίσα με αυτά του αλγόριθμου REGA. Ενώ η εναλλακτική υπόθεση (H<sub>1</sub>) είναι πως τα ποσοστά αυτά διαφέρουν, δηλαδή:

**H<sub>0</sub>: Μηδενική Υπόθεση**

- $P_{1(R)} = P'_{1(R)}$
- $P_{2(I)} = P'_{2(I)}$
- $P_{3(S)} = P'_{3(S)}$

**H<sub>1</sub>: Εναλλακτική Υπόθεση**

- $P_{1(R)} \neq P'_{1(R)}$
- $P_{2(I)} \neq P'_{2(I)}$
- $P_{3(S)} \neq P'_{3(S)}$

Στον πίνακα 10 παρατηρούμε πως το Exact sig (2-sided) λαμβάνει την τιμή 1.000. Επομένως βλέποντας το τεστ McNemar  $pvalue = 1.000 > 0.05$  άρα δεν απορρίπτουμε την υπόθεση ισότητας των ποσοστών, άρα τα τρία αυτά ποσοστά είναι ίσα.

- **Αντιρετροϊκό φάρμακο TDF:** Η μηδενική υπόθεση (H<sub>0</sub>) είναι πως τα ποσοστά αντοχής( resistant, intermediate, sensitive) του αλγόριθμου ANRS είναι ίσα με αυτά του αλγόριθμου REGA. Ενώ η εναλλακτική υπόθεση (H<sub>1</sub>) είναι πως τα ποσοστά αυτά διαφέρουν, δηλαδή:

**H<sub>0</sub>: Μηδενική Υπόθεση**

- $P_{1(R)} = P'_{1(R)}$
- $P_{2(I)} = P'_{2(I)}$
- $P_{3(S)} = P'_{3(S)}$

**H<sub>1</sub>: Εναλλακτική Υπόθεση**

- $P_{1(R)} \neq P'_{1(R)}$
- $P_{2(I)} \neq P'_{2(I)}$
- $P_{3(S)} \neq P'_{3(S)}$

Στον πίνακα 10 παρατηρούμε πως το Exact sig (2-sided) λαμβάνει την τιμή 1.000. Επομένως βλέποντας το τεστ McNemar  $pvalue = 1.000 > 0.05$  άρα δεν απορρίπτουμε την υπόθεση ισότητας των ποσοστών, άρα τα τρία αυτά ποσοστά είναι ίσα.

## Πίνακας: 10

**McNemar\_ANRS Vs REGA**

|     | Exact sig (2-sided) |
|-----|---------------------|
| 3TC | 1,000               |
| FTC | 1,000               |
| TDF | 1,000               |

Έλεγχος ανεξαρτησίας McNemar ANRS VS VIROSEQ

Για την σύγκριση των αλγορίθμων ANRS και VIROSEQ το πρόγραμμα SPSS μας δίνει τα αποτελέσματα που αποτυπώνονται στον πίνακα 11. Έχουμε αποτέλεσμα για τα φάρμακα 3TC, FTC. Παρακάτω θα αναλύσουμε αναλυτικά τα αποτελέσματα του ακόλουθου πίνακα ώστε να γίνει κατανοητή η αποτύπωση του αποτελέσματος.

- **Αντιρετροϊκό φάρμακο 3TC:** Η μηδενική υπόθεση (H<sub>0</sub>) είναι πως τα ποσοστά αντοχής( resistant, intermediate, sensitive) του αλγόριθμου ANRS είναι ίσα με αυτά του αλγόριθμου VIROSEQ. Ενώ η εναλλακτική υπόθεση (H<sub>1</sub>) είναι πως τα ποσοστά αυτά διαφέρουν, δηλαδή:

**H<sub>0</sub>: Μηδενική Υπόθεση**

- $P_{1(R)} = P'_{1(R)}$
- $P_{2(I)} = P'_{2(I)}$
- $P_{3(S)} = P'_{3(S)}$

**H<sub>1</sub>: Εναλλακτική Υπόθεση**

- $P_{1(R)} \neq P'_{1(R)}$
- $P_{2(I)} \neq P'_{2(I)}$
- $P_{3(S)} \neq P'_{3(S)}$

Στον πίνακα 11 παρατηρούμε πως το Exact sig (2-sided) λαμβάνει την τιμή 1.000. Επομένως βλέποντας το τεστ McNemar  $pvalue = 1.000 > 0.05$  άρα δεν απορρίπτουμε την υπόθεση ισότητας των ποσοστών, άρα τα τρία αυτά ποσοστά είναι ίσα.

- **Αντιρετροϊκό φάρμακο FTC:** Η μηδενική υπόθεση ( $H_0$ ) είναι πως τα ποσοστά αντοχής( resistant, intermediate, sensitive) του αλγόριθμου ANRS είναι ίσα με αυτά του αλγόριθμου VIROSEQ. Ενώ η εναλλακτική υπόθεση ( $H_1$ ) είναι πως τα ποσοστά αυτά διαφέρουν, δηλαδή:

**$H_0$ : Μηδενική Υπόθεση**

- $P_{1(R)} = P'_{1(R)}$
- $P_{2(I)} = P'_{2(I)}$
- $P_{3(S)} = P'_{3(S)}$

**$H_1$ : Εναλλακτική Υπόθεση**

- $P_{1(R)} \neq P'_{1(R)}$
- $P_{2(I)} \neq P'_{2(I)}$
- $P_{3(S)} \neq P'_{3(S)}$

Στον πίνακα 11 παρατηρούμε πως το Exact sig (2-sided) λαμβάνει την τιμή 1.000. Επομένως βλέποντας το τεστ McNemar  $pvalue = 1.000 > 0.05$  άρα δεν απορρίπτουμε την υπόθεση ισότητας των ποσοστών, άρα τα τρία αυτά ποσοστά είναι ίσα.

**Πίνακας:11**

**McNemar\_ANRS Vs VIROSEQ**

|     | Exact sig (2-sided) |
|-----|---------------------|
| 3TC | 1,000               |
| FTC | 1,000               |

## Έλεγχος ανεξαρτησίας McNemar REGA VS VIROSEQ

Για την σύγκριση των αλγορίθμων REGA και VIROSEQ το πρόγραμμα SPSS μας δίνει τα αποτελέσματα που αποτυπώνονται στον πίνακα 12. Έχουμε αποτέλεσμα για τα φάρμακα 3TC, FTC και ETR. Παρακάτω θα αναλύσουμε αναλυτικά τα αποτελέσματα του ακόλουθου πίνακα ώστε να γίνει κατανοητή η αποτύπωση του αποτελέσματος.

- **Αντιρετροϊκό φάρμακο 3TC:** Η μηδενική υπόθεση ( $H_0$ ) είναι πως τα ποσοστά αντοχής( resistant, intermediate, sensitive) του αλγόριθμου REGA είναι ίσα με αυτά του αλγόριθμου VIROSEQ. Ενώ η εναλλακτική υπόθεση ( $H_1$ ) είναι πως τα ποσοστά αυτά διαφέρουν, δηλαδή:

### **$H_0$ : Μηδενική Υπόθεση**

- $P_{1(R)} = P'_{1(R)}$
- $P_{2(I)} = P'_{2(I)}$
- $P_{3(S)} = P'_{3(S)}$

### **$H_1$ : Εναλλακτική Υπόθεση**

- $P_{1(R)} \neq P'_{1(R)}$
- $P_{2(I)} \neq P'_{2(I)}$
- $P_{3(S)} \neq P'_{3(S)}$

Στον πίνακα 12 παρατηρούμε πως το Exact sig (2-sided) λαμβάνει την τιμή 1.000. Επομένως βλέποντας το τεστ McNemar  $pvalue = 1.000 > 0.05$  άρα δεν απορρίπτουμε την υπόθεση ισότητας των ποσοστών, άρα τα τρία αυτά ποσοστά είναι ίσα.

- **Αντιρετροϊκό φάρμακο FTC:** Η μηδενική υπόθεση ( $H_0$ ) είναι πως τα ποσοστά αντοχής( resistant, intermediate, sensitive) του αλγόριθμου REGA είναι ίσα με αυτά του αλγόριθμου VIROSEQ. Ενώ η εναλλακτική υπόθεση ( $H_1$ ) είναι πως τα ποσοστά αυτά διαφέρουν, δηλαδή:

### **$H_0$ : Μηδενική Υπόθεση**

- $P_{1(R)} = P'_{1(R)}$
- $P_{2(I)} = P'_{2(I)}$
- $P_{3(S)} = P'_{3(S)}$

### **$H_1$ : Εναλλακτική Υπόθεση**

- $P_{1(R)} \neq P'_{1(R)}$
- $P_{2(I)} \neq P'_{2(I)}$
- $P_{3(S)} \neq P'_{3(S)}$

Στον πίνακα 12 παρατηρούμε πως το Exact sig (2-sided) λαμβάνει την τιμή 1.000. Επομένως βλέποντας το τεστ McNemar  $pvalue = 1.000 > 0.05$  άρα δεν απορρίπτουμε την υπόθεση ισότητας των ποσοστών, άρα τα τρία αυτά ποσοστά είναι ίσα.

- **Αντιρετροϊκό φάρμακο ETR:** Η μηδενική υπόθεση ( $H_0$ ) είναι πως τα ποσοστά αντοχής( resistant, intermediate, sensitive) του αλγόριθμου REGA είναι ίσα με αυτά του αλγόριθμου VIROSEQ. Ενώ η εναλλακτική υπόθεση ( $H_1$ ) είναι πως τα ποσοστά αυτά διαφέρουν, δηλαδή:

**$H_0$ : Μηδενική Υπόθεση**

- $P_{1(R)} = P'_{1(R)}$
- $P_{2(I)} = P'_{2(I)}$
- $P_{3(S)} = P'_{3(S)}$

**$H_1$ : Εναλλακτική Υπόθεση**

- $P_{1(R)} \neq P'_{1(R)}$
- $P_{2(I)} \neq P'_{2(I)}$
- $P_{3(S)} \neq P'_{3(S)}$

Στον πίνακα 12 παρατηρούμε πως το Exact sig (2-sided) λαμβάνει την τιμή 1.000. Επομένως βλέποντας το τεστ McNemar  $pvalue = 1.000 > 0.05$  άρα δεν απορρίπτουμε την υπόθεση ισότητας των ποσοστών, άρα τα τρία αυτά ποσοστά είναι ίσα.

## Πίνακας:12

**McNemar\_REGA Vs VIROSEQ**

|     | Exact sig (2-sided) |
|-----|---------------------|
| 3TC | 1,000               |
| ETR | 1,000               |
| FTC | 1,000               |

Στον παρακάτω πίνακα (**Πίνακας :13**) παρουσιάζεται μια συγκεντρωτική απλουστευμένη εξήγηση όλων των ανωτέρω, δηλαδή αποτυπώνεται με ξεκάθαρο τρόπο σε ποια σημεία οι αλγόριθμοί μας συγκλίνουν και σε ποια

αποκλίνουν ώστε να γίνει απόλυτα κατανοητό σε ποια φάρμακα έχουμε διαφορές όσον αφορά την συμφωνία των αλγορίθμων . Για τον παρακάτω πίνακα βασιστήκαμε στις τιμές Cohen's Kappa οι οποίες έχουν αναφερθεί αναλυτικά παραπάνω.

**Πίνακας 13:** Συμφωνία 3 αλγορίθμων, συγκριτική αξιολόγηση ανά ζεύγη

| Drugs*        | ANRS VS REGA                                                                        | ANRS VS VIROSEQ           | REGA VS VIROSEQ           |
|---------------|-------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------|---------------------------|
| <b>NRTIs</b>  | <b>Καλή συμφωνία</b>                                                                | <b>Καλή συμφωνία</b>      | <b>Πολύ καλή συμφωνία</b> |
| ABC           | Ανεπαρκής συμφωνία                                                                  | Μέτρια συμφωνία           | Καλή συμφωνία             |
| AZT           | Μέτρια συμφωνία                                                                     | Μέτρια συμφωνία           | Πολύ καλή συμφωνία        |
| D4T           | Μέτρια συμφωνία                                                                     | Μέτρια συμφωνία           | Πολύ καλή συμφωνία        |
| DDI           | Μέτρια συμφωνία                                                                     | Καλή συμφωνία             | Καλή συμφωνία             |
| FTC           | Πολύ καλή συμφωνία                                                                  | Πολύ καλή συμφωνία        | Πολύ καλή συμφωνία        |
| 3TC           | Πολύ καλή συμφωνία                                                                  | Πολύ καλή συμφωνία        | Πολύ καλή συμφωνία        |
| TDF           | Πολύ καλή συμφωνία                                                                  | Ανεπαρκής συμφωνία        | Ανεπαρκής συμφωνία        |
| <b>NNRTIs</b> | <b>Μέτρια συμφωνία</b>                                                              | <b>Ανεπαρκής συμφωνία</b> | <b>Μέτρια συμφωνία</b>    |
| EFV           | Πολύ καλή συμφωνία                                                                  | Πολύ καλή συμφωνία        | Πολύ καλή συμφωνία        |
| ETR           | Κακή συμφωνία                                                                       | Κακή συμφωνία             | Μέτρια συμφωνία           |
| NVP           | Μέτρια συμφωνία                                                                     | Μέτρια συμφωνία           | Καλή συμφωνία             |
| RPV           | Μέτρια συμφωνία                                                                     | Κακή συμφωνία             | Κακή συμφωνία             |
| <b>PIs</b>    | η παρατηρούμενη αναλογία συμφωνίας < συμφωνίας που περιμένουμε λόγω της τυχαιότητας | <b>Κακή συμφωνία</b>      | <b>Κακή συμφωνία</b>      |
| ATV/r         | <b>Κακή συμφωνία</b>                                                                | <b>Κακή συμφωνία</b>      | Απροσδιόριστο             |
| DRV/r         | Απροσδιόριστο                                                                       | Απροσδιόριστο             | Απροσδιόριστο             |
| FPV/r         | Απροσδιόριστο                                                                       | Απροσδιόριστο             | Απροσδιόριστο             |
| IDV/r         | Απροσδιόριστο                                                                       | Απροσδιόριστο             | Απροσδιόριστο             |
| LPV/r         | <b>Κακή συμφωνία</b>                                                                | <b>Κακή συμφωνία</b>      | <b>Κακή συμφωνία</b>      |
| NFV           | <b>Κακή συμφωνία</b>                                                                | Απροσδιόριστο             | <b>Κακή συμφωνία</b>      |
| SQV/r         | <b>Κακή συμφωνία</b>                                                                | <b>Κακή συμφωνία</b>      | Απροσδιόριστο             |
| TPV/r         | <b>Κακή συμφωνία</b>                                                                | <b>Κακή συμφωνία</b>      | Απροσδιόριστο             |

NRTIs : Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors, NNRTIs : Non- Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors, PIs : Protease Inhibitors, ABC : Abacavir, AZT : Zidovudine, D4T: Stavudine , DDI : Didanosine , FTC: Emtricitabine , 3TC: Lamivudine , TDF: Tenofovir, EFV: Efavirenz, ETR: Etravirine , NVP: Nevirapine , RPV: Nevirapine, ATV/r : Atazanavir , DRV/r: Darunavir , FPV/r: Amprenavir, IDV/r:Indinavir , LPV/r: Kaletra, NFV: Nelfinavir, SQV/r : Saquinavir, TPV/r: Tripranavir

#### **4. Συζήτηση αποτελεσμάτων**

Απόλυτη συμφωνία παρατηρείται σε 2 από τα 19 αντιρετροϊκά φάρμακα το FTC (Empricitabine) και το 3TC (Lamivudine), σύμφωνα με το στατιστικό πρόγραμμα SPSS. Τα ανωτέρω φάρμακα ανήκουν στη κατηγορία των NRTIs. Για το αντιρετροϊκό φάρμακο FTC οι αλγόριθμοι ANRS, REGA και VIROSEQ παρουσίασαν ανθεκτικότητα (resistant- R) στο 5% (6/120) των ασθενών, ενδιάμεση ανθεκτικότητα (intermediate resistant- I) στο 0% (0/120) των ασθενών και ευαίσθησία (sensitive-s) στο 95% (114/120) των ασθενών. Όσον αφορά το αντιρετροϊκό φάρμακο 3TC οι 3 αλγόριθμοι παρουσίασαν τα ίδια ακριβώς ποσοστά. Ο συντελεστής Cohen's Kappa στη συγκριτική αξιολόγηση των αλγορίθμων ανά ζεύγη, ANRS VS REGA, ANRS VS VIROSEQ και REGA VS VIROSEQ για τα φάρμακα FTC και 3TC λαμβάνουν την τιμή Kappa=1 με  $p\text{-value}=0,000$ . Ο συντελεστής Kappa αντιπροσωπεύει το ποσοστό συμφωνίας πέρα από την τυχαία συμφωνία και σύμφωνα με τις κατευθυντήριες γραμμές του Altmat (1991) <sup>[47]</sup> η παρούσα τιμή του Kappa αντιπροσωπεύει πολύ καλή συμφωνία. Επιπρόσθετα δεδομένου ότι το  $p\text{-value}=0,000$  αυτό σημαίνει πως  $p\text{-value}<0,05$  επομένως ο συντελεστής Kappa είναι στατιστικά σημαντικός διαφορετικός από το μηδέν. Εν κατακλείδι η σύγκριση ανά ζεύγη των 3 αλγορίθμων για τον έλεγχο ανεξαρτησίας McNemar, έδειξε πως τα ποσοστά που αναφέραμε παραπάνω είναι ίσα μεταξύ τους αφού το  $p\text{-value}=1$  μεγαλύτερο του 0,05.

Στη κατηγορία των NRTIs παρατηρείται πως οι αλγόριθμοι REGA VS VIROSEQ παρουσίασαν την καλύτερη συμφωνία με το συντελεστή Cohen's Kappa να λαμβάνει την τιμή 0,869. Επομένως και τα αντιρετροϊκά φάρμακα της κατηγορίας των NRTIs (ABC,AZT,D4T,DDI,FTC,3TC) παρουσίασαν την καλύτερη συμφωνία στους αλγόριθμους REGA και VIROSEQ, εκτός από το αντιρετροϊκό φάρμακο TDF. Το TDF παρουσίασε καλύτερα ποσοστά συμφωνίας στην σύγκριση των αλγορίθμων ANRS VS REGA (Kappa=1), ενώ στη σύγκριση REGA VS VIROSEQ και ANRS VS VIROSEQ η σύγκριση παρουσίασε χαμηλά ποσοστά συμφωνίας (Kappa= 0,330).

Στη κατηγορία των NNRTIs στην σύγκριση ανά ζεύγη των αλγορίθμων παρατηρείται, οι αλγόριθμοι ANRS VS REGA ( $\kappa=0,455$ ) και REGA VS VIROSEQ ( $\kappa=0,562$ ) να παρουσιάζουν καλύτερη συμφωνία από ότι οι αλγόριθμοι ANRS VS VIROSEQ ( $\kappa=0,342$ ). Πολύ καλή συμφωνία παρατηρείται και στους τρεις αλγόριθμους για το αντιρετροϊκό φάρμακο EFV, με τον συντελεστή Cohen's Kappa να λαμβάνει την τιμή 0,875 για την σύγκριση ANRS VS REGA, 0,823 για την σύγκριση REGA VS VIROSEQ και 0,786 για την σύγκριση ANRS VS VIROSEQ. Το αντιρετροϊκό φάρμακο ETR παρουσίασε κακή συμφωνία στη σύγκριση ANRS VS REGA και ANRS VS VIROSEQ με τον δείκτη συμφωνίας Cohen's Kappa να λαμβάνει τις τιμές 0,060 και 0,016 αντίστοιχα. Από την άλλη πλευρά η σύγκριση REGA VS VIROSEQ για το ETR μας έδωσε μέτρια συμφωνία ( $\kappa=0,492$ ). Αξίζει να σημειωθεί πως ενώ βλέπουμε καλύτερα αποτελέσματα συμφωνίας μεταξύ των αλγορίθμων REGA και VIROSEQ, το αντιρετροϊκό φάρμακο RPV παρουσιάζει καλύτερα ποσοστά συμφωνίας στους αλγόριθμους ANRS και REGA. Το RPV στη σύγκριση ANRS VS REGA παρουσιάζει μέτρια συμφωνία αφού  $\kappa=0,410$ , ενώ στη σύγκριση ANRS VS VIROSEQ και REGA VS VIROSEQ κακή συμφωνία αφού  $\kappa=0,018$  και  $\kappa=0,055$  αντίστοιχα.

Στη κατηγορία των PIs παρατηρείται πως όλοι οι αλγόριθμοι παρουσιάζουν είτε κακή συμφωνία είτε η συμφωνία δεν προσδιορίζεται. Στις περιπτώσεις που καταγράφεται χαμηλή σύγκριση πιθανολογείται πως οφείλεται στην εισχώρηση από κάθε αλγόριθμο διαφορετικής βαθμολογίας σε κάθε μετάλλαξη ή συνδυασμό μεταλλάξεων. Επιπρόσθετα η ασυμφωνία που παρατηρείται στους PIs μπορεί να οφείλεται στον μεγάλο αριθμό των πρωτογενών και των δευτερογενών μεταλλάξεων οι οποίες έχουν συσχετιστεί με την αντοχή στη κατηγορία αυτών των φαρμάκων.

Εν κατακλείδι, ο έλεγχος ανεξαρτησίας McNemar στη σύγκριση ανά ζεύγη ANRS VS REGA για τα αντιρετροϊκά φάρμακα 3TC, FTC και TDF παρουσίασε τιμή  $p\text{-value}=1,000$  στη σύγκριση ANRS VS VIROSEQ την ίδια τιμή την είχαμε μόνο για τα φάρμακα 3TC και FTC, ενώ στη σύγκριση REGA

VS VIROSEQ η ανωτέρω τιμή αποτυπώθηκε για τα φάρμακα 3TC,FTC και ETR. Όταν έχουμε τιμή  $pvalue=1,000$  σημαίνει πως δεν απορρίπτεται η υπόθεση ισότητας των ποσοστών που παρουσιάζουν οι αλγόριθμοι στις διάφορες κατηγορίες, με απότοκο τα ποσοστά να είναι ίσα.

## **5.Συμπεράσματα-προτάσεις**

Η χρήση αντιρετροϊκής αγωγής υψηλής δραστηριότητας (HAART-Highly Active Antiretroviral Therapy) οδήγησε σε σημαντική πτώση το ποσοστό θνησιμότητας των ασθενών με AIDS με αποτέλεσμα από μια θανατηφόρος νόσος στις μέρες μας να έχει μετατραπεί σε μια μακροχρόνια νόσος. Είναι σημαντικό όμως να ειπωθεί πως η συμμόρφωση στη θεραπεία καθώς και η τήρηση κατά γράμμα των οδηγιών των κλινικών γιατρών από τους ασθενείς μπορεί να καταστήσει το ιικό φορτίο μη ανιχνεύσιμο, αν όμως ο ασθενής δεν παρουσιάζει καλή συμμόρφωση στη θεραπεία μπορεί να προκληθεί αντοχή στην αντιρετροϊκή θεραπεία. Η παρακολούθηση της αντοχής στην αντιρετροϊκή θεραπεία είναι σημαντικό να παρακολουθείται τόσο πριν την έναρξη της αγωγής όσο και κατά τη διάρκεια. Η χρησιμότητα της δοκιμής ανθεκτικότητας των αντιρετροϊκών φαρμάκων είναι τεράστια στη κλινική πρακτική και καταδεικνύεται από τις κατευθυντήριες γραμμές <sup>[18]</sup>.

Οι γονοτυπικές δοκιμές έχουν πιο ευρεία χρήση από τις φαινοτυπικές δοκιμές προσδιορισμού καθώς είναι πιο γρήγορες, πιο απλές και πιο οικονομικές. Οι γονοτυπικές όμως δοκιμές λόγω της πολυπλοκότητας των αποτελεσμάτων απαιτούν ερμηνεία αυτών, για αυτό το λόγο σχεδιάστηκαν διαφορετικά συστήματα-αλγόριθμοι που βοηθούν στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων. Παλαιότερες μελέτες υποστηρίζουν πως μπορεί να υπάρχει κάποιο επίπεδο ανακολουθίας στην ερμηνεία των γονοτυπικών δεδομένων μεταξύ των διαφορετικών αλγορίθμων καθώς διαφορετικοί αλγόριθμοι ερμηνείας χρησιμοποιούν διαφορετικούς κανόνες για την πρόβλεψη ευαισθησίας στα φάρμακα, συνεπώς τα αποτελέσματα μπορεί να φέρουν κάποιες διαφορές<sup>[48,49,50]</sup>.

Στη παρούσα μελέτη απομονώθηκαν στελέχη από 120 άτομα τα οποία είχαν μολυνθεί με τον ιό του HIV-1 και είχαν ανιχνεύσιμο ιικό φορτίο, οι 120 αλληλουχίες ελέχθησαν για 19 αντιρετροϊκά φάρμακα, με αποτέλεσμα να ληφθούν συνολικά 2.280 ερμηνείες. Εφαρμόστηκαν 3 αλγόριθμοι στις ακολουθίες των απομονωμένων στελεχών:

- Ο ANRS- version n<sup>o</sup> 28 / ανανέωση Απρίλιος 2018
- Ο REGA v10.0.0 /ανανέωση 22 Μαΐου 2017
- Ο ιδιόκτητος αλγόριθμος VIROSEQ- Genotyping Software v3.0.1.6

Οι συγκεκριμένοι αλγόριθμοι ταξινομούν τις ερμηνείες της ανθεκτικότητας των φαρμάκων σε τρία επίπεδα, οι ιοί δηλαδή βαθμολογούνται και κατατάσσονται σε τρία επίπεδα αντίστασης/αντοχής στο φάρμακο, ως ευαίσθητοι (Sensitive-S), ενδιάμεσα ανθεκτικοί (Intermediate resistance-I) και ανθεκτικοί (Resistance-R). Οι ερμηνείες θεωρήθηκαν ασύμφωνες για ένα συγκεκριμένο φάρμακο όταν τουλάχιστον ένας από τους τρεις αλγόριθμους αποδίδει διαφορετικό επίπεδο αντίστασης (όλους τους δυνατούς συνδυασμούς SSI, SSR, IIS, IIR, RRS, RRI και SIR). Κάθε αλγόριθμος αποδίδει διαφορετικό βαθμολογικό σκορ σε κάθε μετάλλαξη καθώς ακολουθούν διαφορετικούς κανόνες. Μπορεί στη συγκεκριμένη περίπτωση να χρησιμοποιήθηκαν αλγόριθμοι οι οποίοι ταξινομούν τα σε τρία επίπεδα τις ερμηνείες της ανθεκτικότητας όμως είναι σημαντικό να τονίσουμε πως μπορεί ενδεχομένως να προκληθούν κάποιες ανακολουθίες στα αποτελέσματα της σύγκρισης των τριών αλγορίθμων, καθώς ακολουθούν κανόνες που δεν είναι πανομοιότυποι.

Παρατηρήθηκε πως τα υψηλότερα ποσοστά συμφωνίας καταγράφηκαν στην ανά ζεύγη σύγκριση στους αλγορίθμους REGA και VIROSEQ, απόλυτη συμφωνία παρατηρήθηκε σε 2/19 φάρμακα και από τους τρεις αλγόριθμους που μελετήθηκαν, το FTC και το 3TC. Υψηλότερα ποσοστά συμφωνίας παρατηρήθηκαν στη κατηγορία των NRTIs, ενώ τα χαμηλότερα ποσοστά συμφωνίας παρατηρήθηκαν στη κατηγορία των PIs. Αξίζει να σημειωθεί πως

ενώ γενικά παρατηρήθηκε καλύτερη συμφωνία στους αλγόριθμους REGA και VIROSEQ, το αντιρετροϊκό φάρμακο RPV παρουσίασε καλύτερη συμφωνία στους αλγόριθμους ANRS και REGA.

Από τα παραπάνω γίνεται κατανοητό πως οι αλγόριθμοι γονοτυπικής ερμηνείας παρουσιάζουν κάποιες αποκλίσεις στα αποτελέσματα τους. Στη παρούσα μελέτη περιοριστήκαμε να συγκρίνουμε μόνο τα αποτελέσματα που δίνουν οι αλγόριθμοι αναφορικά με τα τρία επίπεδα ανθεκτικότητας (S,I,R) και να δούμε σε πρώτο χρόνο αν όντως παρουσιάζονται κάποιες διαφορές, δεν κοιτάξαμε καθόλου τις μεταλλάξεις. Αξίζει όμως να σημειωθεί πως η παρουσία πολλαπλών μεταλλάξεων που σχετίζονται με τα αντιρετροϊκά φάρμακα περιπλέκει την ερμηνεία των γονοτυπικών αποτελεσμάτων και είναι ένας από τους βασικούς λόγους που υπάρχουν ασυμφωνίες ανάμεσα στους αλγόριθμους. Επομένως ένας λόγος που εμφανίζονται αποκλίσεις μεταξύ των αλγορίθμων είναι το διαφορετικό σκορ που λαμβάνει κάθε μετάλλαξη από τους 3 διαφορετικούς αλγόριθμους.

Παραπάνω αναφέρθηκαν οι περίοδοι που έχουν ανανεωθεί οι 3 αλγόριθμοι, βλέπουμε πως ο ANRS είναι ο πιο πρόσφατα αναθεωρημένος αλγόριθμος, ακολουθεί ο REGA ο οποίος αποτελεί και τον πρώτο αλγόριθμο ερμηνείας γονοτυπικής αντοχής και τελευταίος αυτός που έχει υποστεί ανανέωση πιο παλιά από όλους είναι ο VIROSEQ. Συνεπώς στη μελέτη μας δεν μελετήθηκαν αλγόριθμοι οι οποίοι ενημερώθηκαν κατά τη διάρκεια της ίδια χρονικής περιόδου με αποτέλεσμα εκείνοι που έχουν ανανεωθεί πιο πρόσφατα να διαθέτουν πληθώρα νέων δεδομένων που δεν διαθέτουν οι υπόλοιποι. Το γεγονός αυτό περιπλέκει τα αποτελέσματα καθώς οι αλγόριθμοι δεν είναι σύγχρονοι μεταξύ τους όσον αφορά την εισχώρηση νέων δεδομένων. Έτσι μπορούν ενδεχομένως να δικαιολογηθούν οι αποκλίσεις που παρουσιάζονται.

Στη παρούσα μελέτη όπως τονίστηκε και παραπάνω θέλαμε να εξετάσουμε αν συμφωνούν ή διαφωνούν οι συγκεκριμένοι αλγόριθμοι ώστε ανάλογα με τα αποτελέσματα να προχωρήσουμε σε πιο αναλυτική μελέτη αργότερα και να εντρυφήσουμε στο θέμα αυτό. Δηλαδή στη μελέτη μας δεν εξετάστηκε εάν ο ασθενής λαμβάνει πρώτη φορά αγωγή ή αν έχει λάβει

κάποια στιγμή και την είχε διακόψει, δεν εξετάστηκε αν πρόκειται για πολυανθεκτικούς ασθενείς, ούτε εξετάστηκε η ενδεχόμενη λήψη συνδυαστικών φαρμακευτικών σκευασμάτων . Επίσης δεν εξετάστηκε η συμμόρφωση του ασθενή στη θεραπεία. Όλα τα παραπάνω συνηγορούν στο να υπάρχουν αποκλίσεις στους αλγόριθμους καθώς κάθε αλγόριθμος δίνει άλλο βαθμολογικό σκορ ανάλογα την μετάλλαξη που παρουσιάζεται.

Επιπλέον το ενδιάμεσο επίπεδο ανθεκτικότητας δεν παρουσιάζεται παρόμοιο σε όλους τους αλγόριθμους, για παράδειγμα ο αλγόριθμος ANRS έχει υψηλότερη βαθμολογία από ότι ο αλγόριθμος REGA.

Πρέπει να υπογραμμιστεί πως είναι πολύ σημαντικό ο κλινικός γιατρός να λαμβάνει σωστή ερμηνεία των γονοτυπικών δεδομένων καθώς με αυτό τον τρόπο ο κλινικός γιατρός μπορεί να κάνει κατάλληλες τροποποιήσεις στο θεραπευτικό σχήμα, επομένως μπορεί έτσι να μειωθεί η επίδραση των ανθεκτικών στελεχών του ιού στα φάρμακα και να υπάρξει καλύτερη έκβαση της θεραπείας. Δεν πρέπει να ξεχνάμε όμως πως η επιλογή της κατάλληλης θεραπείας δεν έγκειται μόνο στην εκτίμηση της αντοχής που παρέχει ο αλγόριθμος αλλά και από το πόσο ακολουθεί ο ασθενής την αγωγή του, από την φαρμακοκινητική ικανότητα του φαρμάκου αλλά και από τις αλληλεπιδράσεις των διαφόρων σκευασμάτων. Όλα τα παραπάνω αποτελούν έναυσμα για περαιτέρω μελέτη του συγκεκριμένου θέματος.

Το συμπέρασμα στο οποίο καταλήγουμε είναι πως οι αλγόριθμοι παρουσιάζουν κάποιες διαφοροποιήσεις ως προς τα αποτελέσματά τους, καθώς ο υπολογισμός της αντοχής όπως αναφέρθηκε και παραπάνω έχει ως βάση ένα άθροισμα βαρύτητας (weight scores) όπως ονομάζεται. Το άθροισμα αυτό κάθε φορά προσαρμόζεται από τους εκάστοτε συντάκτες των αλγόριθμων με απότοκο να μην είναι λίγες οι φορές που δεν λαμβάνεται υπόψη η δραστηριότητα του φαρμάκου. Καταλαβαίνουμε λοιπόν πως συγκρίνονται αλγόριθμοι οι οποίοι δεν είναι σύγχρονοι μεταξύ τους . Διαφορετικοί κανόνες και έλλειψη συνέπειας στη γλώσσα προγραμματισμού τους αποτελούν κάποιους από τους βασικούς παράγοντες που μπορούν να οδηγήσουν σε διαφορετικές ερμηνείες για την ίδια ακολουθία, οδηγώντας έτσι σε σύγχυση της γνώμης των κλινικών γιατρών. Μέσα από την εργασία

καταδεικνύεται η μεγάλη δυσκολία ερμηνείας των αποτελεσμάτων του γονότυπου με απότοκο να είναι αναγκαία η επικαιροποίηση των αλγορίθμων. Τα αποτελέσματά μας, μας δείχνουν πως πρέπει να γίνει μια κοινή προσπάθεια τόσο από την εθνική όσο και από τη διεθνή κοινότητα ώστε να υπάρχει μια κοινή ερμηνεία των γονοτυπικών αποτελεσμάτων, πρέπει δηλαδή να ακολουθείται μια κοινή γραμμή ώστε να επιτρέπονται άμεσες συγκρίσεις μεταξύ των αλγορίθμων ερμηνείας. Εν κατακλείδι, αξίζει να σημειωθεί πως δεν μπορεί να αναφερθεί ποιος από αυτούς τους αλγόριθμους ερμηνείας είναι καλύτερος με αποτέλεσμα το τελικό συμπέρασμα της παρούσας μελέτης να περιορίζεται στην ύπαρξη ανακολουθίας στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων γονοτυπικής αντοχής από διαφορετικούς αλγόριθμους και στην ανάγκη για περαιτέρω διερεύνηση για να καθοριστεί ποιο είναι το καλύτερο σύστημα ερμηνείας ως οδηγός αντιρετροϊκής θεραπείας.

## **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

- 1) HIV/AIDS - Symptoms and causes [Internet]. Mayo Clinic. 2018 [cited 3 June 2018]. Available from: <https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/hiv-aids/symptoms-causes/syc-20373524>
- 2) Weber T I., and . Harrison W R., (2016). Tackling the problem of HIV drug resistance. *Postepy Biochem*, [Internet] pp.273-279. [Accessed 4 Jun. 2018]. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28132481>
- 3) ΚΕΝΤΡΟ ΕΛΕΓΧΟΥ & ΠΡΟΛΗΨΗΣ ΝΟΣΗΜΑΤΩΝ (ΚΕ.ΕΛ.Π.ΝΟ.) ΓΡΑΦΕΙΟ HIV ΛΟΙΜΩΞΗΣ & ΣΕΞΟΥΑΛΙΚΩΣ ΜΕΤΑΔΙΔΟΜΕΝΩΝ ΝΟΣΗΜΑΤΩΝ. (2017). [ebook] Αθήνα: ΚΕΕΛΠΝΟ. [Accessed 4 Jun. 2018]. Available at: [https://keelpno.gr/Portals/0/Αρχεία/HIV/2017/KATEΥΘ.%20ΟΔΗΓΙΕ%20ΧΟΡ.%20ΑΝΤΙΡΕΤΡΟΪΚΗΣ%20ΑΓΩΓΗΣ%20%20\(eacs%208.1\)%20\(2\)%20\(2\)](https://keelpno.gr/Portals/0/Αρχεία/HIV/2017/KATEΥΘ.%20ΟΔΗΓΙΕ%20ΧΟΡ.%20ΑΝΤΙΡΕΤΡΟΪΚΗΣ%20ΑΓΩΓΗΣ%20%20(eacs%208.1)%20(2)%20(2))
- 4) Guidelines. (2017). 9th ed. [ebook] EACS. [Accessed 10 Jun. 2018]. Available at: [http://www.eacsociety.org/files/guidelines\\_9.0-english.pdf](http://www.eacsociety.org/files/guidelines_9.0-english.pdf)
- 5) Kuritzkes, D. (2011). Drug resistance in HIV-1. *Current Opinion in Virology*, [online] 1(6), pp.582-589. [Accessed 7 Jun. 2018]. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3232467/>
- 6) Tang, M. and Shafer, R. (2012). HIV-1 Antiretroviral Resistance. *Drugs*, [online] 72(9), pp.e1-e25. [Accessed 4 Jun. 2018]. Available at: <https://link.springer.com/article/10.2165/11633630-000000000-00000>
- 7) Vercauteren, J. and Vandamme, A. (2006). Algorithms for the interpretation of HIV-1 genotypic drug resistance information. *Antiviral Research*, [online] 71(2-3), pp.335-342. [Accessed 2 Jun. 2018]. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16782210>
- 8) Ravela, J., Betts, B., Brun-Vézinet, F., Vandamme, A., Descamps, D., Van Laethem, K., Smith, K., Schapiro, J., Winslow, D., Reid, C. and Shafer, R. (2003). HIV-1 Protease and Reverse Transcriptase Mutation Patterns Responsible for Discordances Between Genotypic Drug Resistance Interpretation Algorithms. *JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*, [online] 33(1), pp.8-14. [Accessed 3 Jun. 2018]. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12792349>

- 9) Faria N, Rambaut A, Suchard M, Baele G, Bedford T, Ward M et al. The early spread and epidemic ignition of HIV-1 in human populations. *Science* [Internet]. 2014 [cited 16 May 2018];346(6205):56-61. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4254776/>
- 10) Seitz, R. Human Immunodeficiency Virus (HIV). *Transfusion Medicine and Hemotherapy* [Internet]. 2016 [cited 28 July 2018];43(3):203-222. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4924471/>
- 11) UNAIDS DATA 2018 [Internet]. 2018 [cited 13 November 2018]. Available from: [http://www.unaids.org/sites/default/files/media\\_asset/unaids-data-2018\\_en.pdf](http://www.unaids.org/sites/default/files/media_asset/unaids-data-2018_en.pdf)
- 12) Simon F, Maucière P, Roques P, Loussert-Ajaka I, Müller-Trutwin M, Saragosti S et al. Identification of a new human immunodeficiency virus type 1 distinct from group M and group O. *Nature Medicine* [Internet]. 1998 [cited 18 May 2018];4(9):1032-1037 Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9734396/>
- 13) Vallari A, Holzmayer V, Harris B, Yamaguchi J, Ngansop C, Makamche F et al. Confirmation of Putative HIV-1 Group P in Cameroon. *Journal of Virology* [Internet]. 2010 [cited 22 July 2018];85(3):1403-1407. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21084486/>
- 14) Ward M, Lycett S, Kalish M, Rambaut A, Leigh Brown A. Estimating the Rate of Intersubtype Recombination in Early HIV-1 Group M Strains. *Journal of Virology* [Internet]. 2012 [cited 17 September 2018];87(4):1967-1973. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23236072/>
- 15) AIDSinfo Glossary [Internet]. 9th ed. US: Department of Health and Human Services (HHS); 2018 [cited 21 November 2018]. Available from: [https://aidsinfo.nih.gov/contentfiles/glossaryhivrelatedterms\\_english.pdf](https://aidsinfo.nih.gov/contentfiles/glossaryhivrelatedterms_english.pdf)
- 16) Kirchhoff F. HIV Life Cycle: Overview. *Encyclopedia of AIDS* [Internet]. 2013 [cited 16 June 2018];:1-9. Available from: [https://www.researchgate.net/publication/278689737\\_HIV\\_Life\\_Cycle\\_Overview](https://www.researchgate.net/publication/278689737_HIV_Life_Cycle_Overview)
- 17) WHO | Antiretroviral (ARV) toolkit [Internet]. Who.int. 2018 [cited 17 June 2018]. Available from: [http://www.who.int/hiv/topics/vct/arv\\_toolkit/en/](http://www.who.int/hiv/topics/vct/arv_toolkit/en/)
- 18) Guidelines for the Use of Antiretroviral Agents in HIV-1-Infected Adults and Adolescents [Internet]. Department of Health and Human Services; 2018 [cited 12 June 2018]. Available from: <https://aidsinfo.nih.gov/contentfiles/lvguidelines/AdultandAdolescentGL.pdf>
- 19) Santoro M, Perno C. HIV-1 Genetic Variability and Clinical Implications. *ISRN Microbiology* [Internet]. 2013 [cited 20 August 2018];2013:1-20. Available from: <https://www.semanticscholar.org/paper/HIV-1-Genetic-Variability->

[and-Clinical-Implications-Santoro-Perno/c9401ab6b8e4b121786d1b31ac1150a3f24f580f](#)

- 20) Taking your HIV treatment - What is drug resistance? [Internet]. Aidsmap.com. 2018 [cited 13 April 2018]. Available from: <http://www.aidsmap.com/What-is-drug-resistance/page/1327026/>
- 21) Clavel F. Mechanisms of HIV Drug Resistance [Internet]. Prn.org. 2004 [cited 18 August 2018]. Available from: [https://www.prn.org/index.php/management/article/hiv\\_drug\\_resistance\\_mechanisms\\_277](https://www.prn.org/index.php/management/article/hiv_drug_resistance_mechanisms_277)
- 22) Horne R, Weinman J. Patients' beliefs about prescribed medicines and their role in adherence to treatment in chronic physical illness. *Journal of Psychosomatic Research* [Internet]. 1999 [cited 5 June 2018];47(6):555-567. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10661603>
- 23) ADHERENCE TO LONG-TERM THERAPIES: EVIDENCE FOR ACTION [Internet]. World Health Organization. 2011 [cited 10 September 2018]. Available from: [http://www.who.int/chp/knowledge/publications/adherence\\_report/en/](http://www.who.int/chp/knowledge/publications/adherence_report/en/)
- 24) Vrijens B, De Geest S, Hughes D, Przemyslaw K, Demonceau J, Ruppert T et al. A new taxonomy for describing and defining adherence to medications. *British Journal of Clinical Pharmacology* [Internet]. 2012 [cited 18 November 2018];73(5):691-705. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22486599/>
- 25) Kay E, Batey D, Mugavero M. The HIV treatment cascade and care continuum: updates, goals, and recommendations for the future. *AIDS Research and Therapy* [Internet]. 2016 [cited 11 November 2018];13(1). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27826353/>
- 26) Iacob S, Iacob D, Jugulete G. Improving the Adherence to Antiretroviral Therapy, a Difficult but Essential Task for a Successful HIV Treatment—Clinical Points of View and Practical Considerations. *Frontiers in Pharmacology* [Internet]. 2017 [cited 25 October 2018];8. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5703840/>
- 27) Mayer K, Hanna G, D'Aquila R. Clinical Use of Genotypic and Phenotypic Drug Resistance Testing to Monitor Antiretroviral Chemotherapy. *Clinical Infectious Diseases* [Internet]. 2001 [cited 14 August 2018];32(5):774-782. Available from: <https://academic.oup.com/cid/article/32/5/774/359877>
- 28) Shafer R. Genotypic Testing for HIV-1 Drug Resistance [Internet]. Hivinsite.ucsf.edu. 2004 [cited 17 August 2018]. Available from: <http://hivinsite.ucsf.edu/InSite?page=kb-03-02-07#S9X>
- 29) Zhang M, Versalovic J. HIV Update. *Pathology Patterns Reviews* [Internet]. 2002 [cited 15 September 2018];118(suppl\_1):S26-S32. Available from: [https://academic.oup.com/ppr/article-abstract/118/suppl\\_1/S26/2291775?redirectedFrom=fulltext](https://academic.oup.com/ppr/article-abstract/118/suppl_1/S26/2291775?redirectedFrom=fulltext)
- 30) Fearon M. The Laboratory Diagnosis of HIV Infections. *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology* [Internet].

- 2005 [cited 20 August 2018];16(1):26-30. Available from:  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2095005/>
- 31) Bastien P, Procop G, Reischl U. Quantitative Real-Time PCR Is Not More Sensitive than "Conventional" PCR. *Journal of Clinical Microbiology* [Internet]. 2008 [cited 18 August 2018];46(6):1897-1900. Available from:  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2446855/>
  - 32) Stürmer M, Reinheimer C. Description of Two Commercially Available Assays for Genotyping of HIV-1. *Intervirology* [Internet]. 2012 [cited 21 August 2018];55(2):134-137. Available from:  
<https://www.karger.com/Article/PDF/332010>
  - 33) Cortez K, Maldarelli F. Clinical Management of HIV Drug Resistance. *Viruses* [Internet]. 2011 [cited 22 August 2018];3(4):347-378. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3185705/>
  - 34) Sampah M, Shen L, Jilek B, Siliciano R. Dose-response curve slope is a missing dimension in the analysis of HIV-1 drug resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [Internet]. 2011 [cited 22 August 2018];108(18):7613-7618. Available from:  
<http://www.pnas.org/content/108/18/7613>
  - 35) De Mendoza C, Lourdes A, García, M. F, Pérez-Elías J, Gutiérrez F, Llibre J et al. HIV-1 Genotypic Drug Resistance Interpretation Rules – 2009 Spanish Guidelines. *AIDS REVIEWS* [Internet]. 2009 [cited 16 September 2018];11(1):39-51. Available from:  
<http://www.aidsreviews.com/resumen.php?id=1033&indice=2009111&u=unp>
  - 36) Salama C, Policar M, Cervera C. Knowledge of Genotypic Resistance Mutations Among Providers of Care to Patients with Human Immunodeficiency Virus. *Clinical Infectious Diseases* [Internet]. 2003 [cited 21 September 2018];36(1):101-104. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12491209>
  - 37) Van Laethem K, De Luca A, Antinori A, Cingolani A, Perno C, Vandamme A. A genotypic drug resistance interpretation algorithm that significantly predicts therapy response in HIV-1-infected patients. [Internet]. 2002 [cited 24 August 2018];:123-129. Available from: <https://core.ac.uk/download/pdf/34255985.pdf>
  - 38) Liu T, Shafer R. Web Resources for HIV Type 1 Genotypic-Resistance Test Interpretation. *Clinical Infectious Diseases* [Internet]. 2006 [cited 21 October 2018];42(11):1608-1618. Available from:  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2547473/>
  - 39) ViroSeq 2.8 English 5002961-RevA 3130 | Management Of Hiv/Aids | Polymerase Chain Reaction [Internet]. *Scribd*. 2011 [cited 14 November 2018]. Available from:  
<https://www.scribd.com/document/50423457/ViroSeq-2-8-English-5002961-RevA-3130#>
  - 40) De Luca A, Cingolani A, Di Giambenedetto S, Trotta M, Baldini F, Rizzo M et al. Variable Prediction of Antiretroviral Treatment Outcome by Different Systems for Interpreting Genotypic Human Immunodeficiency Virus Type 1 Drug Resistance. *The Journal of*

- Infectious Diseases [Internet]. 2003 [cited 15 December 2018];187(12):1934-1943. Available from:  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15535412>
- 41) Snoeck J, Kantor R, Shafer R, Van Laethem K, Deforche K, Carvalho A et al. Discordances between Interpretation Algorithms for Genotypic Resistance to Protease and Reverse Transcriptase Inhibitors of Human Immunodeficiency Virus Are Subtype Dependent. Antimicrobial Agents and Chemotherapy [Internet]. 2006 [cited 2 January 2019];50(2):694-701. Available from:  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1366873/>
  - 42) Vergne L, Snoeck J, Aghokeng A, Maes B, Valea D, Delaporte E et al. Genotypic drug resistance interpretation algorithms display high levels of discordance when applied to non-B strains from HIV-1 naive and treated patients. FEMS Immunology & Medical Microbiology [Internet]. 2006 [cited 6 January 2019];46(1):53-62. Available from:  
<https://academic.oup.com/femspd/article/46/1/53/598331>
  - 43) Kijak G, Rubio A, Pampuro S, Zala C, Cahn P, Galli R et al. Discrepant results in the interpretation of HIV-1 drug-resistance genotypic data among widely used algorithms. HIV Medicine [Internet]. 2003 [cited 5 January 2019];4(1):72-78. Available from:  
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1046/j.1468-1293.2003.00131.x>
  - 44) Fox Z, Cozzi-Lepri A, Clotet B, Kjaer J, Phillips A, Lundgren J. Concordance between genotypic interpretation systems for predicting resistance to tipranavir/r and darunavir/r: results from the EuroSIDA study [Internet]. *Chip.dk*. 2007 [cited 6 January 2019]. Available from:  
[https://www.chip.dk/Portals/0/Files/EACS\\_poster071007\\_zoe\\_ksh.pdf](https://www.chip.dk/Portals/0/Files/EACS_poster071007_zoe_ksh.pdf)
  - 45) Stürmer M, Doerr H, Staszewski S, Preiser W. Comparison of nine resistance interpretation systems for HIV-1 genotyping. Antiviral therapy [Internet]. 2003 [cited 7 September 2018];:239-44. Available from:  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12924541?dopt=Abstract>
  - 46) Cohen's kappa in SPSS Statistics - Procedure, output and interpretation of the output using a relevant example | Laerd Statistics [Internet]. *Statistics.laerd.com*. 2019 [cited 20 June 2018]. Available from: <https://statistics.laerd.com/spss-tutorials/cohens-kappa-in-spss-statistics.php>
  - 47) Cohen's kappa in SPSS Statistics - Procedure, output and interpretation of the output using a relevant example | Laerd Statistics [Internet]. *Statistics.laerd.com*. 2019 [cited 20 June 2018]. Available from: <https://statistics.laerd.com/spss-tutorials/cohens-kappa-in-spss-statistics.php>
  - 48) Muñoz M, Carmona R, Pérez-Alvarez L, Cilla G, Suarez M, Delgado E et al. Analysis of discrepancies in the interpretation of antiretroviral drug resistance results in HIV-1 infected patients of Basque Country, Spain. Journal of Clinical Virology [Internet]. 2005 [cited 10 September 2018];33(3):224-229. Available from:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1386653204003440?via%3Dihub>

- 49) Liu L, May S, Richman D, Hecht F, Markowitz M, Daar E et al. Comparison of algorithms that interpret genotypic HIV-1 drug resistance to determine the prevalence of transmitted drug resistance. AIDS [Internet]. 2008 [cited 27 October 2018];22(7):835-839. Available from:  
[https://journals.lww.com/aidsonline/fulltext/2008/04230/Comparison\\_of\\_algorithms\\_that\\_interpret\\_genotypic.5.aspx](https://journals.lww.com/aidsonline/fulltext/2008/04230/Comparison_of_algorithms_that_interpret_genotypic.5.aspx)
- 50) Poonpiriya V, Sungkanuparph S, Leechanachai P, Pasomsub E, Watipun C, Chunhakan S et al. A study of seven rule-based algorithms for the interpretation of HIV-1 genotypic resistance data in Thailand. Journal of Virological Methods [Internet]. 2008 [cited 15 November 2018];151(1):79-86. Available from:  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166093408001171?via%3Dihub>