

**ΜΠΣ ΒΙΟΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ**

**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΤΜΗΜΑ ΜΑΘΗΜΑΤΙΚΩΝ

**ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

ΜΑΥΡΙΚΑΚΗ ΣΤΕΦΑΝΙΑ ΟΛΓΑ

Μελέτη διασποράς της επιδημίας HIV-1 υπότυπου A σε Ελλάδα και  
Κύπρο.

ΑΘΗΝΑ, 2018



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

### **ΒΙΟΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ**

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

Εγκρίθηκε την 2/7/2018 από την εξεταστική επιτροπή:

**ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ**

**ΒΑΘΜΙΔΑ**

**ΥΠΟΓΡΑΦΗ**

Δ. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗΣ

(επιβλέπων)

ΕΠ. ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ



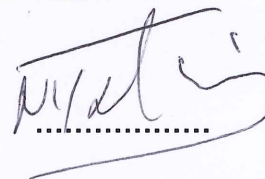
Ε. ΣΑΜΟΛΗ

ΕΠ. ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ



Ν. ΠΑΝΤΑΖΗΣ

Ε.ΔΙ.Π.





## Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα μου Δρ. Δημήτριο Παρασκευή, Επίκουρο Καθηγητή στο Εργαστήριο Υγιεινής, Επιδημιολογίας και Ιατρικής Στατιστικής της Ιατρικής Σχολής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, για την πολύτιμη βοήθεια και καθοδήγηση του στην εκπόνηση της παρούσας διπλωματικής εργασίας. Επίσης, την υποψήφια Διδάκτωρ Κωστάκη Ευαγγελία-Γεωργία για την πολύτιμη βοήθεια της έως το πέρας της διπλωματικής εργασίας και το Στασινόπουλο Νίκο για τη συμβολή του αναφορικά με την εγκατάσταση των προγραμμάτων.

Τέλος, ευχαριστώ την Δρ. Σαμόλη Ευαγγελία, Επίκουρη Καθηγήτρια, και τον Πανταζή Νίκο, μέλος Ε.ΔΙ.Π., στο Εργαστήριο Υγιεινής, Επιδημιολογίας και Ιατρικής Στατιστικής της Ιατρικής Σχολής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, μέλη της εξεταστικής επιτροπής της παρούσας διπλωματικής εργασίας.



# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ</b> .....	<b>V</b>
<b>ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ</b> .....	<b>VII</b>
<b>ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b> .....	<b>1</b>
<b>ΣΚΟΠΟΣ</b> .....	<b>3</b>
<b>ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b> .....	<b>5</b>
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΙΟΙ ΚΑΙ ΙΟΣ ΑΝΘΡΩΠΙΝΗΣ ΑΝΟΣΟΑΝΕΠΑΡΚΕΙΑΣ (HIV)</b> .....	<b>7</b>
1.1 Ιοί.....	7
1.2 Ιός Ανθρώπινης Ανοσοανεπάρκειας (HIV).....	9
1.2.1 Γενικά για τον ιό. ....	9
1.2.2 Ετερογένεια HIV.....	11
1.2.3 Γενετική ταξινόμηση του HIV.....	12
1.2.3.1 Γενετική ταξινόμηση του HIV-1. ....	12
1.2.3.2 Γενετική ταξινόμηση του HIV-2 ιού.....	16
1.3 Επιδημιολογικά δεδομένα του HIV. ....	17
1.3.1 Παγκόσμια.....	17
1.3.2 Ευρωπαϊκή ήπειρος. ....	19
1.3.3 Ελλάδα, Κύπρος, Αλβανία. ....	21
1.4 Μοριακή επιδημιολογία HIV-1 υπότυπου A.....	24

<b>ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....</b>	<b>27</b>
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ.....</b>	<b>29</b>
2.1 Γενικές πληροφορίες μεθοδολογίας.....	29
2.1.1 Φυλογενετική ανάλυση.....	30
2.1.2 Φυλογεωγραφία.....	33
2.2 Υλικό.....	35
2.3 Φυλογενετική ανάλυση.....	36
2.4 Φυλογεωγραφική ανάλυση.....	37
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....</b>	<b>39</b>
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....</b>	<b>51</b>
<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....</b>	<b>55</b>
<b>SUMMARY.....</b>	<b>57</b>
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....</b>	<b>59</b>



# ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

ΣΧΗΜΑ 1: ΓΟΝΙΔΙΩΜΑ ΤΟΥ HIV-1 ( <a href="https://www.hiv.lanl.gov">HTTPS://WWW.HIV.LANL.GOV</a> , 2017). .....	11
ΣΧΗΜΑ 2: ΠΑΓΚΟΣΜΙΑ ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΥΠΟΤΥΠΩΝ ΚΑΙ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΩΝ ΜΟΡΦΩΝ ΤΟΥ HIV-1, ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΠΕΡΙΟΔΟ 2004-2007 (HEMELAAR 2013). .....	14
ΣΧΗΜΑ 3: ΕΝ ΖΩΗ ΑΡΙΘΜΟΣ ΑΤΟΜΩΝ ΠΟΥ ΕΧΟΥΝ ΠΡΟΣΒΛΗΘΕΙ ΠΑΓΚΟΣΜΙΩΣ ΑΠΟ ΤΟΝ HIV (1990-2016) (UNAIDS 2017). .....	17
ΣΧΗΜΑ 4: ΑΡΙΘΜΟΣ ΝΕΩΝ ΛΟΙΜΩΞΕΩΝ ΑΠΟ ΤΟΝ HIV ΠΑΓΚΟΣΜΙΩΣ (1990-2016) (UNAIDS 2017).....	18
ΣΧΗΜΑ 5: ΘΑΝΑΤΟΙ ΟΦΕΙΛΟΜΕΝΟΙ ΣΤΟ AIDS ΠΑΓΚΟΣΜΙΩΣ (1990-2016) (UNAIDS 2017). .....	18
ΣΧΗΜΑ 6: ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΕΥΡΩΠΑΪΚΗΣ ΗΠΕΙΡΟΥ ΣΕ ΔΥΤΙΚΗ, ΚΕΝΤΡΙΚΗ ΚΑΙ ΑΝΑΤΟΛΙΚΗ. 20	
ΣΧΗΜΑ 7: ΔΙΑΓΝΩΣΕΙΣ HIV ΛΟΙΜΩΞΗΣ ΑΝΑ 100.000 ΠΛΗΘΥΣΜΟΥ ΣΤΗΝ ΕΛΛΑΔΑ (2004-2017) (ΚΕ.ΕΛ.Π.ΝΟ. 2017).....	21
ΣΧΗΜΑ 8: ΑΡΙΘΜΟΣ ΝΕΩΝ HIV ΛΟΙΜΩΞΕΩΝ ΣΤΗΝ ΚΥΠΡΟ (2006-2016) ( <a href="https://www.statista.com">HTTPS://WWW.STATISTA.COM</a> ) . .....	22
ΣΧΗΜΑ 9: ΑΡΙΘΜΟΣ ΝΕΩΝ HIV ΛΟΙΜΩΞΕΩΝ ΣΤΗΝ ΑΛΒΑΝΙΑ (1993-2013) (BOZICEVIC ET AL. 2014). .....	23
ΣΧΗΜΑ 10: ΕΠΕΞΗΓΗΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΦΥΛΟΓΕΩΓΡΑΦΙΑΣ (PARASKEVIS ET AL. 2009). .....	34
ΣΧΗΜΑ 11: ΦΥΛΟΓΕΝΕΤΙΚΟ ΔΕΝΔΡΟ ΑΠΟ ΤΟ ΣΥΝΟΛΟ ΤΩΝ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΩΝ HIV ΥΠΟΤΥΠΟΥ Α. ΜΠΛΕ: ΕΛΛΗΝΙΚΕΣ, ΛΑΧΑΝΙ: ΑΛΒΑΝΙΚΕΣ, ΚΟΚΚΙΝΟ: ΚΥΠΡΙΑΚΕΣ, ΓΚΡΙ: ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ. ....	40
ΣΧΗΜΑ 12: ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΕΠΙΔΗΜΙΑ. ΜΠΛΕ: ΕΛΛΗΝΙΚΕΣ, ΛΑΧΑΝΙ: ΑΛΒΑΝΙΚΕΣ, ΚΟΚΚΙΝΟ: ΚΥΠΡΙΑΚΕΣ, ΓΚΡΙ: ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ.....	41
ΣΧΗΜΑ 13: ΜΟΝΟΦΥΛΕΤΙΚΗ ΟΜΑΔΑ ΑΛΒΑΝΙΚΩΝ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΩΝ (ΛΑΧΑΝΙ ΧΡΩΜΑ) ΕΝΤΟΣ ΤΗΣ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΕΠΙΔΗΜΙΑΣ. ....	43
ΣΧΗΜΑ 14: ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑ ΕΝΟΣ ΕΠΙΜΕΡΟΥΣ ΤΟΠΙΚΟΥ ΔΙΚΤΥΟΥ ΜΕ ΣΤΕΛΕΧΗ ΑΠΟ ΚΥΠΡΟ (CY), ΣΥΓΚΕΚΡΙΜΕΝΑ ΤΟ CLUSTER «4», ΠΟΥ ΕΝΤΟΠΙΖΕΤΑΙ ΕΝΤΟΣ ΤΗΣ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΕΠΙΔΗΜΙΑΣ.....	45

ΣΧΗΜΑ 15: ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΕΠΙΔΗΜΙΑ. ΜΕ ΓΚΡΙ ΕΧΟΥΝ ΕΠΙΣΗΜΑΝΘΕΙ ΟΙ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΕΣ ΑΠΟ ΕΛΛΑΔΑ ΚΑΙ ΑΛΒΑΝΙΑ ΕΝΩ ΜΕ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΑ ΧΡΩΜΑΤΑ ΟΙ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΕΣ ΑΠΟ ΚΥΠΡΟ ΣΥΜΦΩΝΑ ΜΕ ΤΟΝ ΤΡΟΠΟ ΜΕΤΑΔΟΣΗΣ ΤΟΥ ΙΟΥ. ΣΥΓΚΕΚΡΙΜΕΝΑ, ΜΕ ΚΟΚΚΙΝΟ ΟΙ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΕΣ ΑΠΟ ΚΥΠΡΟ ΠΟΥ ΑΠΟΜΟΝΩΘΗΚΑΝ ΑΠΟ MSM, ΜΕ ΠΡΑΣΙΝΟ ΑΠΟ ΗΕΤ ΚΑΙ ΜΕ ΠΟΡΤΟΚΑΛΙ ΑΠΟ ΑΛΛΟΥΣ.....	45
ΣΧΗΜΑ 16: ΦΥΛΟΓΕΝΕΤΙΚΟ ΔΕΝΔΡΟ ΑΠΟ ΤΟ ΣΥΝΟΛΟ ΤΩΝ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΩΝ HIV ΥΠΟΤΥΠΟΥ Α, ΕΞΑΙΡΟΥΜΕΝΗΣ ΤΗΣ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΕΠΙΔΗΜΙΑΣ. ΓΑΛΑΖΙΟ: ΕΛΛΗΝΙΚΕΣ, ΚΟΚΚΙΝΟ: ΚΥΠΡΙΑΚΕΣ, ΠΟΡΤΟΚΑΛΙ: FSU, ΜΠΛΕ: ΚΑΜΕΡΟΥΝ, ΛΑΧΑΝΙ: ΚΕΝΥΑ, ΓΚΡΙ: ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ. ....	47
ΣΧΗΜΑ 17: ΜΕΤΑΔΟΣΕΙΣ ΑΠΟ ΧΩΡΕΣ ΤΗΣ ΠΡΩΗΝ ΣΟΒΙΕΤΙΚΗΣ ΈΝΩΣΗΣ ΣΕ ΚΥΠΡΟ. ΜΕ ΚΟΚΚΙΝΟ ΕΧΟΥΝ ΕΠΙΣΗΜΑΝΘΕΙ ΟΙ ΜΕΤΑΔΟΣΕΙΣ ΠΟΥ ΣΧΕΤΙΖΟΝΤΑΙ ΜΕ ΣΕΞΟΥΑΛΙΚΗ ΕΠΑΦΗ ΜΕΤΑΞΥ ΑΝΔΡΩΝ (MSM), ΜΕ ΠΡΑΣΙΝΟ ΜΕΤΑΞΥ ΕΤΕΡΟΦΥΛΟΦΙΛΩΝ (ΗΕΤ) ΚΑΙ ΜΕ ΠΟΡΤΟΚΑΛΙ ΜΕ ΑΛΛΟΥΣ ΤΡΟΠΟΥΣ. ....	49

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο ιός της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας, γνωστός ως Human Immunodeficiency Virus- HIV, είναι ο αιτιολογικός παράγοντας του συνδρόμου επίκτητης ανοσοανεπάρκειας (Acquired Immune Deficiency Syndrome, AIDS) (Barre-Sinoussi et al. 1983). Ανήκει στην κατηγορία των ρετροϊών και χαρακτηρίζεται από εκτενή γενετική ετερογένεια (Wain-Hobson 1993). Παγκοσμίως ταξινομείται σε 4 ομάδες: την ομάδα M (Major) που είναι υπεύθυνη για την πανδημία του AIDS, την ομάδα O (Outlier), την ομάδα N (New) και την ομάδα P που απομονώθηκε πρόσφατα στην Αφρική. Η ομάδα M ταξινομείται φυλογενετικά σε υπότυπους A, B, C, D, F, G, H, J και K, σε υπό-υπότυπους A1, A2, A3, A4, A6 (ή A<sub>FSU</sub>), F1 και F2, καθώς και σε ανασυνδυασμένους τύπους (Circulating Recombinant Forms, CRFs) (<https://www.hiv.lanl.gov>, 2017). Η μελέτη των αλληλουχιών του ιού με μεθόδους μοριακής επιδημιολογίας έχει συμβάλει τα μέγιστα στην κατανόηση της επιδημιολογίας του HIV. Συγκεκριμένα, έχουν εκτιμηθεί: i) η χρονολογική προέλευση της παγκόσμιας αλλά και επιμέρους επιδημιών, ii) η γεωγραφική κατανομή των υποτύπων και ανασυνδυασμένων τύπων του ιού, iii) η προέλευση της επιδημίας σε διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές, iv) ο τρόπος διασποράς μεταξύ ή εντός πληθυσμών κλπ.

Η επιδημία σε Ελλάδα και Κύπρο παρουσιάζει αρκετές ιδιαιτερότητες αναφορικά με τον επιπολασμό των υποτύπων. Οι επιδημίες και στις δύο γεωγραφικές περιοχές ξεκίνησαν περίπου στις αρχές της δεκαετίας του 1980, με κυρίαρχο υπότυπο τον B, ο οποίος έχει και τον υψηλότερο επιπολασμό στη Βόρεια Αμερική και Δυτική Ευρώπη (Beloukas et al. 2016). Όσο αφορά την Ελλάδα, τα τελευταία 15 έτη περίπου, παρατηρήθηκε μια σημαντική αύξηση του υπότυπου A, ως συνέπεια τοπικής διασποράς. Τα τελευταία έτη ο επιπολασμός του A στους νέο-διαγνωσθέντες οροθετικούς είναι παρόμοιος με του B (Paraskevis et al. 2007). Επίσης, στην Κύπρο ο επιπολασμός του υπότυπου A είναι πολύ υψηλός (~30%) (Kousiappa et al. 2009; Kousiappa et al. 2011). Η

Ελλάδα, η Κύπρος και η Αλβανία αποτελούν λίγες από τις περιοχές στην Ευρώπη όπου ο υπότυπος Α παρουσιάζει υψηλό επιπολασμό χωρίς να οφείλεται σε μετανάστευση από την Αφρική ή στην επιδημία των χρηστών ενδοφλέβιων ναρκωτικών από την Ανατολική Ευρώπη (τις χώρες πρώην Σοβιετικής Ένωσης) (Ciccozzi et al. 2005; Panayiotou et al. 2014; Nikolopoulos et al. 2008; Paraskevis et al. 2007; Salemi et al. 2008).

## ΣΚΟΠΟΣ

Βασικός σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η εύρεση της γεωγραφικής προέλευσης της HIV λοίμωξης για τα οροθετικά άτομα από Κύπρο που έχουν μολυνθεί με στελέχη υπότυπου A, η διερεύνηση του τρόπου διασποράς του ιού σε αυτά τα άτομα και ο εντοπισμός επιμέρους τοπικών επιδημιών του ιού (φυλογενετικών ομάδων) . Επιπρόσθετα, θα εξετάσουμε εάν επιβεβαιώνονται τα ευρήματα προηγούμενων μελετών που υποδεικνύουν την Ελλάδα ως χώρα προέλευσης της λοίμωξης στην Αλβανία.

Για την εκπόνηση της μελέτης, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της φυλογενετικής ανάλυσης για την εκτίμηση του προτύπου διασποράς του HIV υπότυπου A μέσω εκτίμησης των εξελικτικών σχέσεων του υπό μελέτη πληθυσμού χρησιμοποιώντας γενετικό υλικό. Έπειτα, χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της φυλογεωγραφίας προχωρήσαμε στην εκτίμηση της πιθανής γεωγραφικής προέλευσής της HIV λοίμωξης.

Η σημασία της μελέτης είναι μεγάλη δεδομένων των ιδιαιτεροτήτων της επιδημίας αλλά και των πληθυσμών από τις δύο περιοχές.



# ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ





# ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΙΟΙ ΚΑΙ ΙΟΣ ΑΝΘΡΩΠΙΝΗΣ ΑΝΟΣΟΑΝΕΠΑΡΚΕΙΑΣ (HIV).

## 1.1 Ιοί.

Οι *ιοί* είναι οργανισμοί που προκαλούν λοιμώξεις. Για αυτό και συχνά χαρακτηρίζονται ως οι *μικρότεροι λοιμογόνοι παράγοντες*. Είναι παθογενετικοί παράγοντες που αδυνατούν να αναπαραχθούν αυτόνομα, καθώς αποκλίνουν κυτταρικής δομής και αποτελούνται από νουκλεϊκό οξύ (DNA ή RNA), δηλαδή το γενετικό τους υλικό, και πρωτεΐνες. Έτσι, όταν προσβάλλουν-μολύνουν έναν οργανισμό εισέρχονται στα κύτταρά του (*κύτταρο-ξενιστής*) για να πραγματοποιήσουν όλες τις βιολογικές λειτουργίες που απαιτούνται για την αναπαραγωγή τους. Εξαιτίας, λοιπόν, του γεγονότος της αδυναμίας του αυτοδιπλασιασμού τους, αποκαλούνται *ενδοκυτταρικά παράσιτα*. Άρχισαν να μελετιούνται στα τέλη του 19<sup>ου</sup> αιώνα. Το 1892 έγινε η πρώτη αναφορά για ένα ξεχωριστό από τα βακτήρια παθογόνο παράγοντα των φυτών, γνωστό σήμερα ως *ιός του μωσαϊκού καπνού*, από τον Ρώσο επιστήμονα Dimitrii Ivanovsky. Το 1901 αναφέρθηκε το πρώτο ιογενές ανθρώπινο νόσημα *κίτρινος πυρετός*. Με την πάροδο του χρόνου, η πρόοδος στην επιστήμη της μοριακής βιολογίας επέτρεψε την αναγνώριση χιλιάδων ιών, συμπεριλαμβανομένου και του ιού ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας (HIV: Human Immunodeficiency Virus) (Flint et al. 2015).

Σύμφωνα με τα μορφολογικά χαρακτηριστικά, τη χημική σύνθεση και τον τρόπο αντιγραφής, κάθε ιός ταξινομείται από τη Διεθνή Επιτροπή Ταξινόμησης των Ιών (ICTV: International Committee on Taxonomy of Viruses) σε οικογένειες, υπό-οικογένειες, γένη και είδη (Baron, 1996).

Το γενετικό υλικό των ιών ενδέχεται να είναι DNA ή RNA. *Ρετροϊοί* ονομάζονται εκείνοι που το γενετικό τους υλικό είναι RNA και με τη βοήθεια του

ενζύμου αντίστροφη μεταγραφάση παράγεται το DNA, προκειμένου να ενσωματωθεί στο γονιδίωμα του κυττάρου-ξενιστή, ώστε να ξεκινήσουν και να ολοκληρωθούν οι απαιτούμενες διαδικασίες μέχρι την παραγωγή ιικών πρωτεϊνών, οι οποίες συγκροτούνται για να συνθέσουν τα καινούργια σωματίδια του ιού (Coffin et al. 1997). Οι ρετροϊοί ανήκουν στη μεγάλη οικογένεια ιών: *Retroviridae*, η οποία αποτελείται από δύο υπο-οικογένειες, την *Orthoretrovirinae* και την *Spumaretrovirinae*. Ένα από τα γένη που απαρτίζεται η υπο-οικογένεια *Orthoretrovirinae* είναι το γένος *Lentivirus* (λεντιών), στο οποίο συγκαταλέγεται ο HIV (ICTV, 2017).

## 1.2 Ιός Ανθρώπινης Ανοσοανεπάρκειας (HIV).

### 1.2.1 Γενικά για τον ιό.

Ο ιός της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας, παγκοσμίως γνωστός ως HIV (Human Immunodeficiency Virus), ανήκει στο γένος των λεντιών, της οικογένειας των ρετροϊών, που προσβάλλουν τα κύτταρα των πρωτεϊνών θηλαστικών. Η ανακάλυψη του HIV συνέβη το 1983 (Barre-Sinoussi et al. 1983), δύο χρόνια μετά την αναφορά των πρώτων κρουσμάτων ασθενών με AIDS το 1981 στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής (Centers for Disease Control 1981; Friedman-Kien 1981).

Ο HIV προκαλεί κατάπτωση του ανοσολογικού συστήματος του ανθρώπινου οργανισμού που προσβάλλει. Τα κύτταρα που μολύνονται είναι τα CD4+ T-λεμφοκύτταρα και τα μακροφάγα του αιμοποιητικού συστήματος (Klatzmann et al. 1984; Dalgleish et al. 1984). Έχει διαπιστωθεί πως ο HIV είναι υπεύθυνος για το σύνδρομο επίκτητης ανοσολογικής ανεπάρκειας, ευρέως γνωστό ως AIDS (Acquired Immune Deficiency Syndrome), μία από τις σημαντικότερες και μεγαλύτερες πανδημίες. Αποτελεί, λοιπόν, τον αιτιολογικό παράγοντα του AIDS.

Όταν κάποιος μολυνθεί από τον HIV, γίνεται «HIV θετικός ή οροθετικός» και παραμένει για πάντα, χωρίς απαραίτητα να εκδηλώνει συμπτώματα για χρόνια. Όμως, δε σημαίνει πως είναι φορέας του AIDS. Αυτό ίσως συμβεί με την πάροδο ετών, πράγμα που δύναται να κατασταλεί, εφόσον διαγνωσθεί εγκαίρως και χορηγηθούν κατάλληλες αντιρετροϊκές θεραπείες, προκειμένου να καταστείλουν την εξέλιξη της νόσου και να αυξήσουν την επιβίωση του ατόμου. Παρόλα αυτά, εξαιτίας της κατάπτωσης του ανοσολογικού συστήματος, η μη έγκαιρη διάγνωση του HIV, μπορεί να οδηγήσει στο τελικό στάδιο της μόλυνσης από τον ιό, δηλαδή στο AIDS, και να προκληθεί θάνατος.

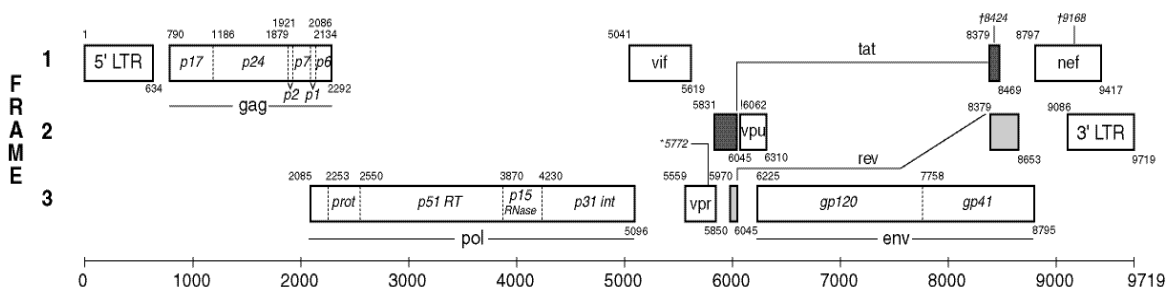
Ο HIV μεταδίδεται κυρίως από σωματικά βιολογικά υγρά όπως αίμα, κολπικά υγρά, σπέρμα και μητρικό γάλα. Οι συνηθέστεροι τρόποι μετάδοσης είναι η μη

ασφαλής σεξουαλική επαφή, η κοινή χρήση συρίγγων, η μετάγγιση μη ελεγχόμενου αίματος και ο τοκετός ή ο θηλασμός από την οροθετική μητέρα στο βρέφος.

Δύο είναι οι κύριοι τύποι του HIV, οι: HIV-1 και HIV-2. Τόσο ο HIV-1 όσο και ο HIV-2 θεωρείται πως προέρχονται από μη ανθρώπινα πρωτεύοντα της Δυτικής-Κεντρικής Αφρικής, όπου στις αρχές του 20<sup>ού</sup> αιώνα μεταφέρθηκαν στον άνθρωπο μέσω πολλαπλών ζωονοτικών λοιμώξεων του ιού των πιθηκοειδών Simian Immunodeficiency Viruses (SIV) (Paul M. Sharp and Beatrice H. Hahn 2011). Η πρώτη μετάδοση του HIV εκτιμάται πως συνέβη στη Λαϊκή Δημοκρατία του Κονγκό (DRC) στο πρώτο μισό του 20<sup>ού</sup> αιώνα (Worobey et al. 2008; Faria et al. 2014). Ο HIV-1 αρχικά όταν ανακαλύφθηκε πήρε τις ονομασίες LAV (Lymphadenopathy Associated Virus) και HTLV-III (Human T cell Lymphotropic Virus III). Εν συνεχεία, εφόσον ταυτοποιήθηκε πως πρόκειται για τον ίδιο ιό, χρησιμοποιήθηκε η κοινή ονομασία HIV-1. Ο HIV-2 διαφέρει γενετικά συγκριτικά με τον HIV-1 και είναι λιγότερο διαδεδομένος. Πιθανοί λόγοι της μικρότερης διάδοσης του HIV-2 είναι η διατήρηση χαμηλού ιικού φορτίου κατά τη διάρκεια της ασυμπτωματικής φάσης του, γεγονός που εξηγεί τα χαμηλά ποσοστά μεταδοτικότητάς του (λιγότερο παθογόνος), τη σχεδόν πλήρη απουσία μετάδοσης του ιού από μητέρα σε βρέφος και την όχι τόσο εφικτή σεξουαλική μετάδοση (Popper et al. 2000; Berry et al. 2002; Gottlieb et al. 2006; Hawes et al. 2008). Αντιθέτως, ο HIV-1 αποτελεί την αιτία της πλειονότητας των λοιμώξεων του HIV παγκοσμίως, ένεκα που αποτελεί ένα από τα ταχύτερα εξελισσόμενα ανθρώπινα παθογόνα και κατά κύριο λόγο σε εκείνον οφείλεται η πανδημία του AIDS. Παρόλα αυτά, και οι δύο ιοί δύναται να προκαλέσουν την ασθένεια του AIDS. Εν κατακλείδι, είναι λογικό να διαφέρουν οι λοιμώξεις των δύο τύπων του HIV, καθότι προέρχονται από διαφορετικούς lentivirus (SIV) μη ανθρώπινων πρωτευόντων, όπως θα επισημάνουμε εκτενέστερα σε παρακάτω παράγραφο.

## 1.2.2 Ετερογένεια HIV.

Το γονιδίωμα του ρετροϊού HIV αποτελείται από δύο ταυτόσημα, μονόκλινα μόρια RNA, μήκους 9749 νουκλεοτιδικών βάσεων το καθένα (Ratner et al. 1985). Ο HIV περιέχει πολλά κύρια γονίδια που κωδικοποιούν δομικές πρωτεΐνες, όπως και κάθε ρετροϊός, αλλά και κάποια «μη-δομικά» γονίδια που συναντάμε μόνο στον HIV. Τα τρία κύρια γονίδια του HIV είναι τα gag, pol και env, που κωδικοποιούν σημαντικές δομικές πρωτεΐνες και ένζυμα (Σχήμα 1).



Σχήμα 1: Γονιδίωμα του HIV-1 (<https://www.hiv.lanl.gov>, 2017).

Ο HIV χαρακτηρίζεται από εκτενή φυσική γενετική ετερογένεια (Wain-Hobson 1993), η οποία έχει συντελέσει σημαντικά στην παγκόσμια διασπορά της επιδημίας και έχει επιφέρει άμεσες συνέπειες στην ανάπτυξη διαγνωστικών τεστ, εμβολίων και γενικά στην αντιμετώπιση της λοίμωξης. Η γενετική ποικιλομορφία του ιού αντικατοπτρίζεται στην παθογένεση, ανοσογονικότητα και μεταδοτικότητα του. Ο ρυθμός μεταλλάξεων του ιού είναι περίπου  $3 \times 10^{-5}$  ανά νουκλεοτιδική βάση, ανά κύκλο πολλαπλασιασμού (Mansky & Temin 1995).

Η γενετική ποικιλότητα του ιού οφείλεται σε 3 παράγοντες:

1. Στο επιρρεπές σε λάθη ένζυμο της αντίστροφης μεταγραφάσης (Preston et al. 1988; Roberts et al. 1988; Preston & Dougherty 1996).
2. Στον υψηλό ρυθμό παραγωγής ιικών σωματιδίων (Wei et al., 1995).
3. Στον ομόλογο ανασυνδυασμό (Ho et al. 1995).

### **1.2.3 Γενετική ταξινόμηση του HIV.**

Η φυλογενετική ανάλυση συμβάλει στην εκτίμηση των εξελικτικών σχέσεων διαφορετικών οργανισμών ή διαφορετικών ατόμων του ίδιου οργανισμού, χρησιμοποιώντας ως δεδομένα το γενετικό τους υλικό (DNA ή RNA) ή τις αντίστοιχες πρωτεϊνικές αλληλουχίες που κωδικοποιούνται από το γενετικό τους υλικό, εφόσον υπολογιστεί πρώτα ο βαθμός γενετικής ετερογένειας σε ομόλογες περιοχές του γενετικού υλικού (δηλαδή συγκρίνοντας αντίστοιχα τμήματα του γονιδιώματος).

Με τη χρήση της φυλογενετικής ανάλυσης ο HIV, όπως έχει αναφερθεί, κατατάσσεται σε δύο αρκετά διαφορετικά είδη: HIV-1 και HIV-2. Λόγω της ταχύτητας με την οποία μεταλλάσσεται αυτός ο ιός, κάνει απαραίτητη τη χρήση πολύπλοκων εξελικτικών μοντέλων (τα οποία λαμβάνουν υπόψη το διαφορετικό ρυθμό νουκλεοτιδικών αντικαταστάσεων στο γονιδίωμα) για την κατά το δυνατό καλύτερη αναπαράσταση της εξελικτικής του ιστορίας.

#### **1.2.3.1 Γενετική ταξινόμηση του HIV-1.**

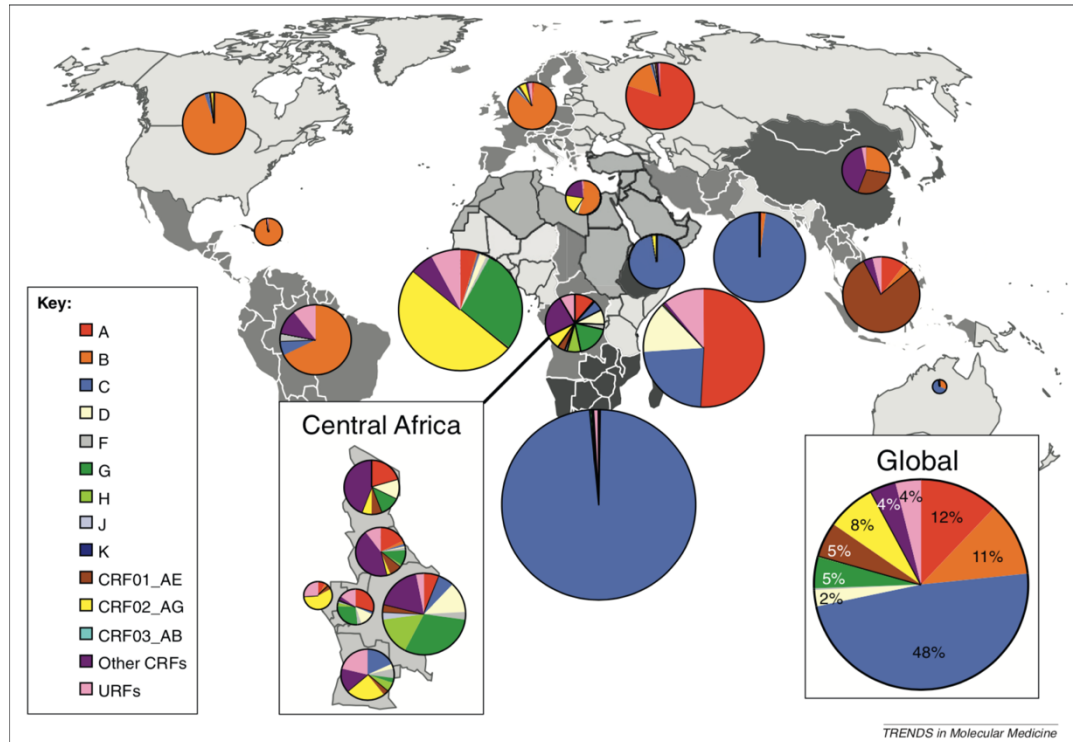
Οι φυλογενετικές αναλύσεις των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών από στελέχη του HIV-1, έδειξαν πως ο ιός ταξινομείται σε τρεις ομάδες: M (Main), O (Outlier), και N (New or non-M/non-O) (Robertson 2000). Πριν μερικά χρόνια, εντοπίστηκε μια νέα ομάδα του HIV-1, η ομάδα P, σε μια γυναίκα από το Καμερούν (Plantier et al. 2009). Κάθε μία από τις παραπάνω ομάδες αποτελεί και μια ξεχωριστή μετάδοση από στέλεχος του SIV στον άνθρωπο. Η μετάδοση των στελεχών του SIV πιθανόν έγινε μέσω της έκθεσης δερματικών ή βλεννογονικών μεμβρανών του ανθρώπου σε μολυσμένο αίμα ζώου (Hahn et al. 2000).

Στην αιχμή του ερευνητικού ενδιαφέροντος βρίσκεται η ομάδα M (Main), καθώς σε εκείνη οφείλεται η παγκόσμια επιδημία του HIV, ξεκινώντας την εξάπλωσή της από την Κεντρική Αφρική. Η ομάδα M διαχωρίζεται στους υπότυπους A, B, C, D, F, G, H, J και K, αλλά και σε υπό-υπότυπους A1, A2, A3, A4, A6 (ή A<sub>FSU</sub>), F1 και F2 (<https://www.hiv.lanl.gov>, 2017). Μεταξύ των

υποτύπων υπάρχουν διαφορές στις βιολογικές ιδιότητες, οι οποίες ενδέχεται να επηρεάζουν την ανάπτυξη ανοχής του ιού στα αντιρετροϊκά φάρμακα. Επίσης, ο χρόνος της διάδοσης μεταξύ των υποτύπων ποικίλλει καθώς και ο τρόπος μετάδοσης τους (Abecasis et al. 2013). Πέραν από τους υπότυπους και υπό-υπότυπους, έχουν ταυτοποιηθεί ανασυνδυασμένες μορφές του ιού, γνωστές ως CRFs (Circulating Recombinant Forms), των οποίων οι διαφορετικές περιοχές του γονιδιώματος του ιού ανήκουν σε 2 ή περισσότερους υπότυπους ή υπό-υπότυπους. Για να αναγνωριστεί μία καινούργια CRF, εκτός από τη μορφή μωσαϊκού που πρέπει να έχει το γονιδίωμα του HIV-1, απαιτείται να έχει εντοπιστεί σε τουλάχιστον τρία άτομα χωρίς επιδημιολογική σχέση. Στην ονοματολογία τους ακολουθεί ένας αριθμός, που αφορά στη σειρά ανακάλυψης τους και στη συνέχεια τα γράμματα των υποτύπων ή υπό-υποτύπων που απαρτίζεται το γονιδίωμα του κάθε CRF (Robertson 2000). Αντιθέτως, στην περίπτωση μωσαϊκού γονιδιώματος HIV-1 που έχει παρατηρηθεί σε ένα άτομο ή μία μικρή ομάδα επιδημιολογικά συνδεδεμένων ατόμων, χαρακτηρίζεται ως μοναδική ανασυνδυασμένη μορφή, ευρέως γνωστή ως URF (Unique Recombinant Form). Οι URFs φαίνεται μέχρι στιγμής να μην προκαλούν επιδημία. Οι διάφοροι υπότυποι και οι ανασυνδυασμένες μορφές της ομάδας M κατανέμονται διαφορετικά ανά την υφήλιο (Σχήμα 2) (Hemelaar 2013).

Η ομάδα M έχει υψηλή ομοιότητα με τον ιό που προσβάλλει τους χιμπατζήδες (SIV-cpz) και συγκεκριμένα το είδος *Pan troglodytes troglodytes* (SIV-cpzPtt) (Keele et al. 2006; Gao et al. 1999; Faria et al. 2014; Rambaut et al. 2004; Van Heuverswyn et al. 2006). Το ιικό στέλεχος SIV-cpzPtt που προσβάλλει τους χιμπατζήδες αποτέλεσε την ομάδα M και εντοπίζεται στο νοτιοανατολικό Καμερούν. Αρχικά μεταδόθηκε τοπικά και στη συνέχεια στην Κινσάσα, όπου πιθανότατα ξεκίνησε η πανδημία της ομάδας M (Keele et al., 2006; Van Heuverswyn et al., 2006). Με τη χρήση μοριακών ρολογιών, που βοηθούν στην εκτίμηση των ημερομηνιών απόκλισης μεταξύ των διαφορετικών οργανισμών ή των αλληλουχιών που προέρχονται από τον ίδιο οργανισμό ταξινομικών ειδών (Kumar 2005), εκτιμάται πως η αρχική μετάδοση (ο πιο πρόσφατος κοινός πρόγονος- time to Most Recent Common Ancestor, tMRCA) στελέχους της

ομάδας M πραγματοποιήθηκε το 1908 (95% διάστημα αξιοπιστίας: 1884-1924) (Gao *et al.*, 1999; Korber *et al.*, 2000; Salemi, 2000; Yusim *et al.*, 2001; Rousseau *et al.*, 2007; Worobey *et al.*, 2008; Wertheim and Worobey, 2009).



**Σχήμα 2:** Παγκόσμια κατανομή υποτύπων και ανασυνδυασμένων μορφών του HIV-1, κατά την περίοδο 2004-2007 (Hemelaar 2013).

Οι φυλογενετικές αναλύσεις έδειξαν πως η ομάδα O (Outlier) σχετίζεται στενότερα με τον ιό που προσβάλλει τους γορίλλες (*SIV-gor*) παρά με τον *SIV-cpz*, όμως δεν είναι σαφές εάν η αρχική μόλυνση ήταν από χιμπατζήδες ή γορίλλες (Takehisa *et al.* 2009; Van Heuverswyn *et al.* 2006; Paul M. Sharp and Beatrice H. Hahn 2011). Συγκεκριμένα, υπάρχουν δύο περιπτώσεις: 1) Το στέλεχος του SIV που σχετίζεται με την επιδημία του HIV-1 της ομάδας O που βρέθηκε σε γορίλλες υποδηλώνει πως υπάρχει ενδεχόμενο να υπήρξε ένας ενδιάμεσος ξενιστής μεταξύ χιμπατζήδων και ανθρώπων ή 2) οι χιμπατζήδες να μετέδωσαν τον ιό της ομάδας O σε γορίλλες και σε ανθρώπους ανεξάρτητα (Wertheim & Worobey 2009; D'arc *et al.* 2015). Ο αριθμός των HIV-1 κρουσμάτων της ομάδας O είναι περιορισμένος. Συναντάται στο Καμερούν, σε γειτονικές χώρες και στη



δυτική και νότιο-κεντρική Αφρική (Peeters et al. 1997). Η ομάδα O δεν είναι εξίσου διαδεδομένη με την ομάδα M. Επίσης, για την ομάδα O δεν έχουν βρεθεί υπότυποι. Με τη χρήση μοριακών ρολογιών εκτιμάται πως ο χρόνος προέλευσης της ομάδας O ήταν το 1920 (95% διάστημα αξιοπιστίας: 1890-1940) (Wertheim & Worobey 2009).

Ακολούθως, το 1995 με την απομόνωση ενός στελέχους HIV-1 από μια γυναίκα στο Καμερούν, διαπιστώθηκε πως το στέλεχος αυτό δεν ταυτοποιούνταν ούτε με στελέχη της ομάδας M αλλά ούτε με της ομάδας O. Έτσι, ανακαλύφθηκε η ομάδα N (New or non-M/ non-O) (Simon et al. 1998). Τα στελέχη του HIV-1 της ομάδας N φαίνεται να έχουν στενή συγγένεια με το ιικό στέλεχος *SIV-cpzPtt* που προσβάλλει τους χιμπατζήδες, όπως η ομάδα M, διαφέροντας όμως ως προς τη γεωγραφική προέλευση που εντοπίζεται στο νότιο-κεντρικό Καμερούν (Corbet et al. 2000; Gao et al. 1999; Keele et al. 2006; Rambaut et al. 2004; Ayoub et al. 2000). Επιπλέον, το ποσοστό των λοιμώξεων αυτής της ομάδας (ομάδα N) είναι μικρό (Simon et al. 1998; Keele et al. 2006). Λιγότερες από 20 μολύνσεις έχουν εντοπιστεί (Delaugerre et al. 2011). Επίσης, υπότυποι δεν έχουν προσδιοριστεί ακόμα, καθώς λίγα από τα στελέχη έχουν ταυτοποιηθεί και υποβληθεί σε αλληλούχηση (<https://www.hiv.lanl.gov,2017>). Τέλος, με τη χρήση μοριακών ρολογιών εκτιμάται πως ο χρόνος προέλευσης της ομάδας N ήταν το 1963 (95% διάστημα αξιοπιστίας: 1948-1977) (Wertheim & Worobey 2009).

Πριν μερικά χρόνια απομονώθηκε η ομάδα P του HIV-1, όπου μόνο δύο περιπτώσεις μολύνσεων έχουν καταγραφεί στο Καμερούν (Plantier et al. 2009; Vallari et al. 2011). Η ομάδα P φαίνεται να έχει στενή συγγένεια με τον ιό που προσβάλλει τους γορίλες (SIV-gor), υποδηλώνοντας πως οι γορίλες μόλυναν τους ανθρώπους με τον ιό της ομάδας P. Η γεωγραφική προέλευση των μεταδόσεων δεν έχει ακόμα προσδιοριστεί (D'arc et al. 2015). Ο χρόνος προέλευσης των μεταδόσεων της ομάδας P επίσης δεν έχει ακόμα εκτιμηθεί, όμως πιθανολογείται ότι οι μεταδόσεις πραγματοποιήθηκαν μεταξύ 1845 - 1989 (Sauter et al. 2011).

### 1.2.3.2 Γενετική ταξινόμηση του HIV-2 ιού.

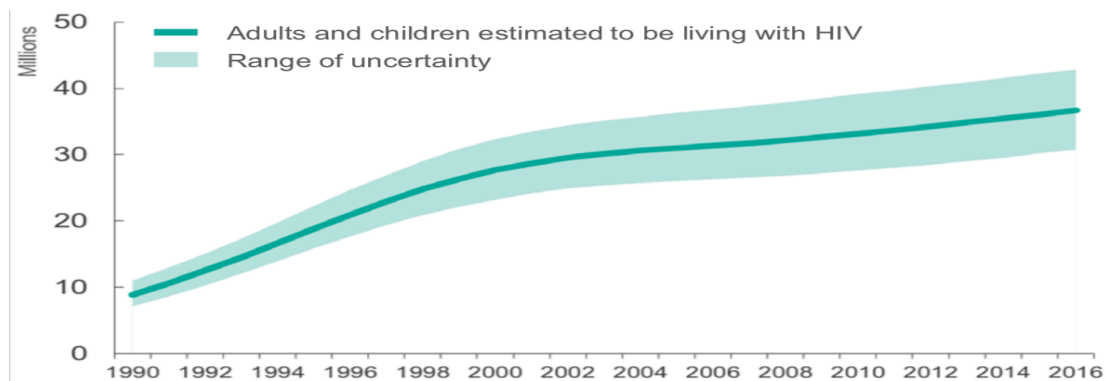
Φυλογενετικές αναλύσεις έχουν δείξει πως ο HIV-2 έχει υψηλή συγγένεια με τον SIV-sm που προσβάλλει τις μαϊμούδες και συγκεκριμένα το είδος *sooty mangabey* (*Cercopithecus atys*) στη Δυτική Αφρική (Gao et al. 1999; Keele et al. 2006; Van Heuverswyn et al. 2006; Hirsch et al. 1989; Gao F, Yue L 1992). Έρευνα που έλαβε χώρα στη Σενεγάλη της Δυτικής Αφρικής το 1985, υπέδειξε ότι ορισμένοι συμμετέχοντες είχαν αντισώματα έναντι του SIV, γεγονός το οποίο υποδηλώνει την παρουσία ενός νέου ρετροϊού (Barin et al. 1985). Το 1986 επιβεβαιώθηκε η παρατήρηση αυτή και ένας νέος ιός, ο HIV-2, απομονώθηκε και ταυτοποιήθηκε σε ασθενείς της Γαλλίας από τη Δυτική Αφρική (Clavel et al. 1987). Ο HIV-2 εντοπίζεται στη Δυτική Αφρική με υψηλότερο ποσοστό κρουσμάτων στη Γουινέα-Μπισσάου και στη νότια Σενεγάλη, όμως ο επιπολασμός του ιού φαίνεται να μειώνεται εξαιτίας της επικράτησης του HIV-1 (de Silva et al. 2008; Van Tienen et al. 2010). Έχουν παρατηρηθεί τουλάχιστον οκτώ ανεξάρτητες μεταδόσεις από τον SIV-sm στον άνθρωπο, που οδήγησαν στη δημιουργία των ομάδων A-H του HIV-2 (Diamond et al. 2004). Οι ομάδες A και B έχουν ενεργό ρόλο στην επιδημία του HIV-2, ενώ οι υπόλοιπες έχουν εντοπιστεί σε ένα-δύο ασθενείς. Η ομάδα A είναι επικρατέστερη της B, και έχει επίκεντρο τη Γουινέα-Μπισσάου, ενώ η ομάδα B αναφέρεται κυρίως στην Ακτή Ελεφαντοστού και τη Γκάνα (Faria et al. 2012). Σε πρόσφατη μελέτη απομονώθηκε στέλεχος του HIV-2 διαφορετικό από τα στελέχη των ήδη υπαρχόντων ομάδων, που εκτιμάται για ένατη ανεξάρτητη μετάδοση από τον SIV-sm στον άνθρωπο (Ayoub et al. 2013). Επίσης, ξεχωριστή μελέτη ανέφερε τον πρώτο CRF στον HIV-2 (Ibe et al. 2010). Τέλος, με τη χρήση μοριακών ρολογιών εκτιμάται πως ο χρόνος προέλευσης των ομάδων A και B ήταν το 1932 (95% διάστημα αξιοπιστίας: 1906-1955) και 1935 (95% διάστημα αξιοπιστίας: 1907-1961), αντίστοιχα (Wertheim & Worobey 2009).

## 1.3 Επιδημιολογικά δεδομένα του HIV.

### 1.3.1 Παγκόσμια.

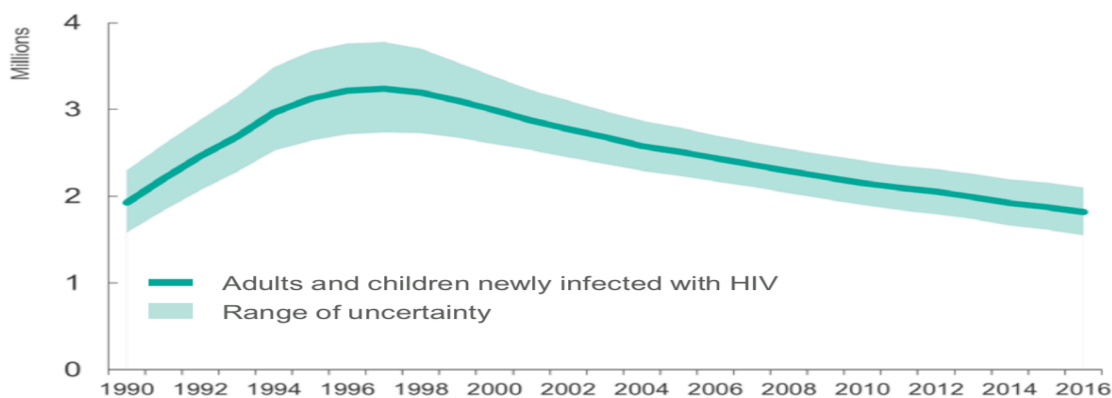
Σύμφωνα με τα παγκόσμια στατιστικά επιδημιολογικά δεδομένα από το Πρόγραμμα Ηνωμένων Εθνών για το HIV/AIDS (UNAIDS), 76.1 εκατομμύρια (65.2 εκατ.- 88.0 εκατ.) άνθρωποι έχουν προσβληθεί από τον HIV, ενώ ο αριθμός των ατόμων που έχουν πεθάνει από AIDS ανέρχεται στα 35 εκατομμύρια (28.9 εκατ.- 41.5 εκατ.), από την αρχή της πανδημίας έως σήμερα (UNAIDS 2017).

Το 2016 36.7 εκατομμύρια (30.8 εκατ.- 42.9 εκατ.) παγκοσμίως ήταν θετικά στον HIV, με το συντριπτικό αριθμό των 19.4 εκατομμυρίων (17.8 εκατ.- 21.1 εκατ.) να παρατηρείται στην Ανατολική και Νότια Αφρική. Αξίζει να σημειωθεί πως από τα 36.7 εκατομμύρια παγκοσμίως, τα 34.5 (28.8 εκατ.- 40.2 εκατ.) αναφέρονται σε ενήλικες, τα 17.8 (15.4 εκατ.- 20.3 εκατ.) σε γυναίκες ηλικίας άνω των 15 ετών και τα 2.1 (1.7 εκατ.- 2.6 εκατ.) σε παιδιά ηλικίας κάτω των 15 ετών. Μέχρι τον Ιούνιο του 2017 20.9 εκατομμύρια (18.4 εκατ.- 21.7 εκατ.) περιστατικά HIV λοίμωξης λάμβαναν αντιρετροϊκή θεραπεία (UNAIDS 2017).



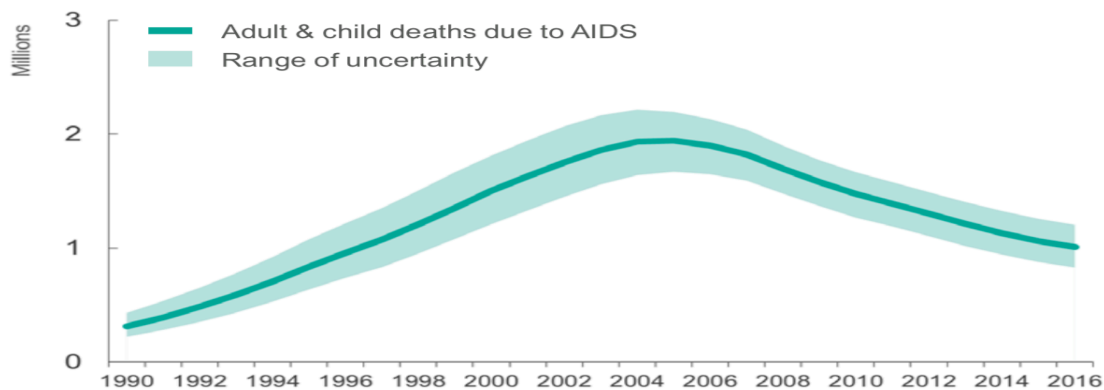
**Σχήμα 3:** Εν ζωή αριθμός ατόμων που έχουν προσβληθεί παγκοσμίως από τον HIV (1990-2016) (UNAIDS 2017).

Αναφορικά με τα νέα περιστατικά μόλυνσης με HIV, υπολογίζονται γύρω στα 1.8 εκατομμύρια (1.6 εκατ.- 2.1 εκατ.) το 2016. Συγκριτικά με το 2010, στις νέες λοιμώξεις μεταξύ ενηλίκων, παρατηρείται πτώση τάξης 11%, από 1.9 εκατομμύρια (1.6 εκατ.- 2.1 εκατ.) στα 1.7 εκατομμύρια (1.4 εκατ.- 1.91 εκατ.) το 2016. Το μεγαλύτερο ποσοστό μείωσης, 47%, των νέων κρουσμάτων σημειώθηκε μεταξύ παιδιών από το 2010. Από 300 χιλιάδες (230 χιλ.- 370 χιλ.) το 2010 καταγράφηκαν 160 χιλιάδες (100 χιλ.- 220 χιλ.) το 2016 (UNAIDS 2017).



**Σχήμα 4:** Αριθμός νέων λοιμώξεων από τον HIV παγκοσμίως (1990-2016) (UNAIDS 2017).

Τέλος, οι θάνατοι που σχετίζονται παγκοσμίως με το AIDS μειώθηκαν κατά 48%, λόγω της ταυτόχρονης χορήγησης τριών ή περισσότερων αντιρετροϊκών φαρμάκων (Highly Active Antiretroviral Therapy, HAART). Συγκεκριμένα, το 2016 1 εκατομμύριο (830 χιλ.- 1.2 εκατ.) άτομα πέθαναν από AIDS, ενώ το 2005 1.9 εκατομμύρια (1.7 εκατ.- 2.2 εκατ.) (UNAIDS 2017).



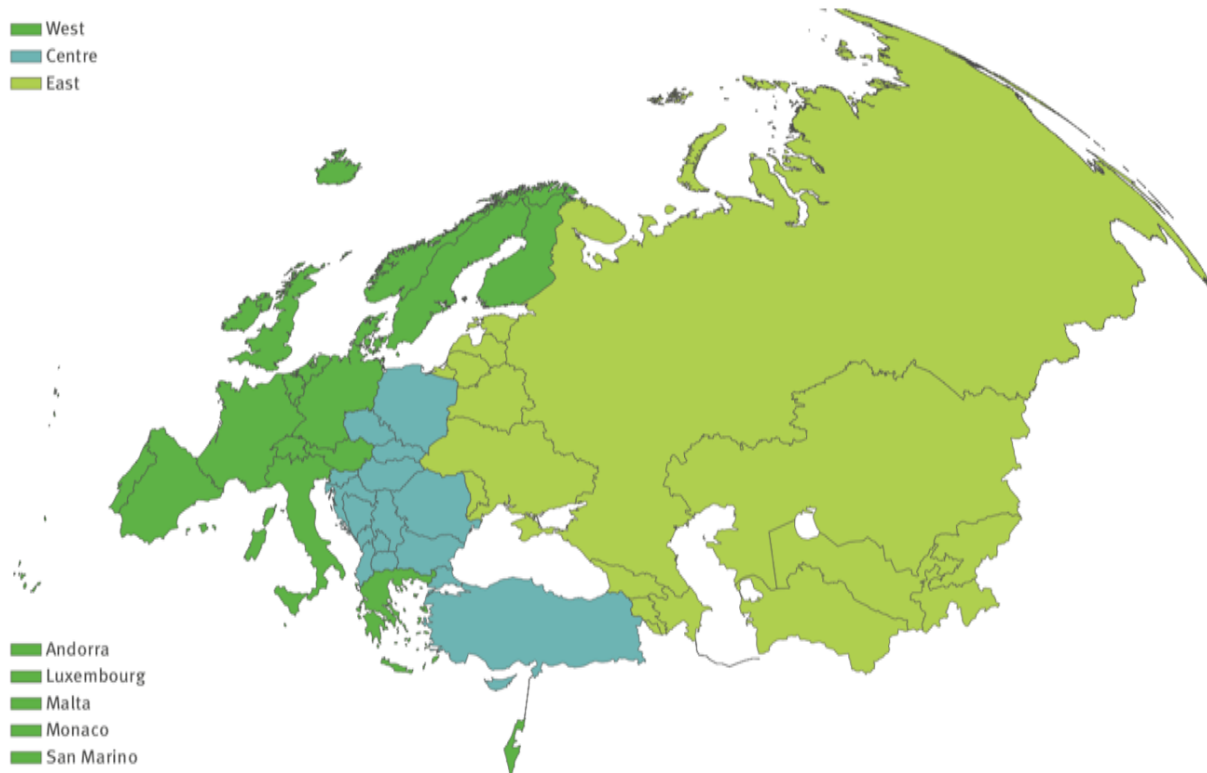
**Σχήμα 5:** Θάνατοι οφειλόμενοι στο AIDS παγκοσμίως (1990-2016) (UNAIDS 2017).

### 1.3.2 Ευρωπαϊκή ήπειρος.

Το 2016, 160.453 νέες λοιμώξεις HIV διαγνώσθηκαν στην Ευρώπη (Ευρωπαϊκή Ένωση, Ευρωπαϊκό Οικονομικό χώρο και Πρώην Σοβιετική Ένωση, Σχήμα 6) συμβάλλοντας στην αυξητική τάση των νέων διαγνώσεων. Από τις νέες αυτές λοιμώξεις, το 80% διαγνώσθηκε στην Ανατολική, το 17% στη Δυτική και το 4% στην Κεντρική Ευρώπη. Αυτό συνεπάγεται ρυθμό 18.2 νέων διαγνώσεων ανά 100 χιλιάδες πληθυσμό, όμως, με τα 103.438 νέα κρούσματα δηλωμένα από τη Ρωσία. Έτσι, από την αρχή της καταχώρησης των νέων λοιμώξεων το 1980, ο συνολικός αριθμός αγγίζει τα 2.167.684 (1.114.815 από τη Ρωσία). Ο υψηλότερος ρυθμός, ανά 100 χιλιάδες πληθυσμό, παρατηρείται στη Ρωσία (70.6) και ακολουθούν Ουκρανία (33.7), Λευκορωσία (25.2) και Μολδαβία (20.5). Επιπλέον, το 36% των νεοδιαγνωσθέντων ανήκουν στην ηλικιακή ομάδα των 30-39 ετών, ενώ το 9% στην 15-24 ετών.

Οι τρόποι μετάδοσης των νέων μολύνσεων ποικίλλουν. Το 47% αποδίδεται στην ετεροφυλοφιλική σεξουαλική επαφή, που αυξήθηκε κατά 23% το χρονικό διάστημα 2007-2016, το 24% στη σεξουαλική επαφή μεταξύ ανδρών (Men who have Sex with Men, MSM), η οποία επίσης αυξήθηκε κατά 10% τα έτη 2007-2016, και το 12% σε χρήστες ενδοφλέβιων ναρκωτικών (XEN) όπου σημειώθηκε σημαντική πτώση τάξεως 40% στο διάστημα 2007-2016.

Όσον αφορά τους θανάτους που σχετίζονται με το AIDS, το 2016 αναφέρθηκαν 4.779, με 14.897 νεοδιαγνωσθέντες με AIDS να έχουν καταγραφεί (European Centre for Disease Prevention and Control 2017).



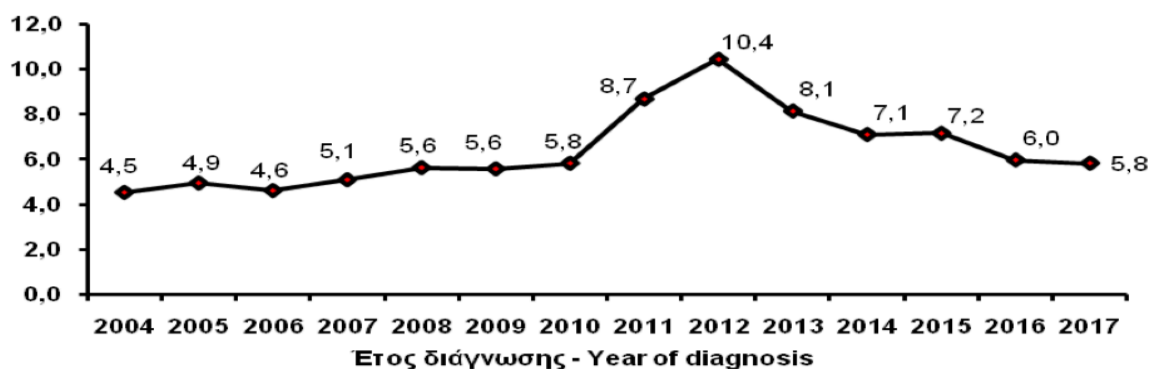
The countries covered by the report are grouped as follows:

- West, 23 countries: Andorra, Austria\*, Belgium\*, Denmark\*, Finland\*, France\*, Germany\*, Greece\*, Iceland, Ireland\*, Israel, Italy\*, Luxembourg\*, Malta\*, Monaco, Netherlands\*, Norway, Portugal\*, San Marino, Spain\*, Sweden\*, Switzerland, United Kingdom\*.
  - Centre, 15 countries: Albania, Bosnia and Herzegovina, Bulgaria\*, Croatia\*, Cyprus\*, Czech Republic\*, Hungary\*, the former Yugoslav Republic of Macedonia, Montenegro, Poland\*, Romania\*, Serbia, Slovakia\*, Slovenia\*, Turkey.
  - East, 15 countries: Armenia, Azerbaijan, Belarus, Estonia\*, Georgia, Kazakhstan, Kyrgyzstan, Latvia\*, Lithuania\*, Moldova, Russia, Tajikistan, Turkmenistan, Ukraine, Uzbekistan.
- \* Countries constituting the European Union as of 1 July 2014.

**Σχήμα 6:** Διαχωρισμός Ευρωπαϊκής ηπείρου σε Δυτική, Κεντρική και Ανατολική.

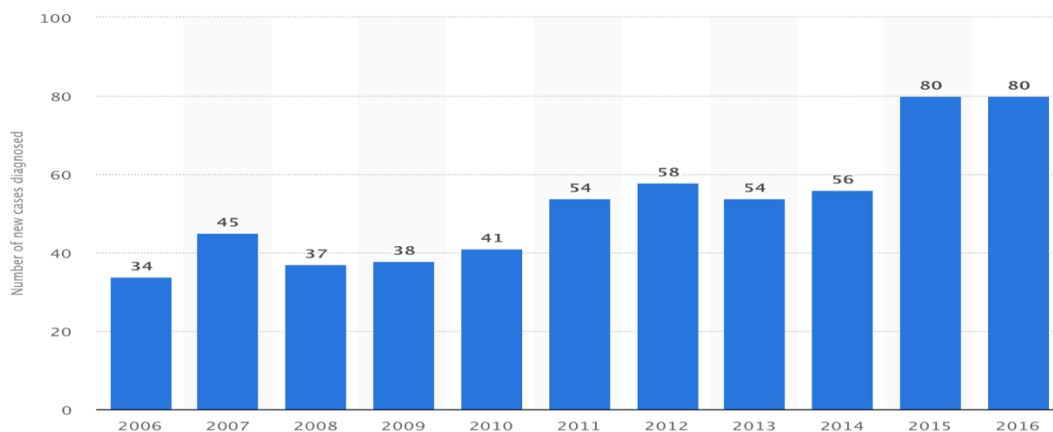
### 1.3.3 Ελλάδα, Κύπρος, Αλβανία.

Στην Ελλάδα, στο σύστημα υποχρεωτικής δήλωσης του Κέντρου Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων (ΚΕ.ΕΛ.Π.ΝΟ.), έχουν καταγραφεί μέχρι και την 31<sup>η</sup> Δεκεμβρίου του 2017 16.669 περιστατικά HIV λοίμωξης, εκ των οποίων το 82.84% αφορά άνδρες. Το 2016, 628 ήταν τα νέο-διαγνωσμένα και δηλωθέντα κρούσματα HIV λοίμωξης, με το 14.8% (93 άτομα) να έχει ήδη εμφανίσει ή αναπτύξει AIDS στη διάρκεια του έτους. Μάλιστα, στην ηλικιακή ομάδα των 30-39 ετών δηλώθηκαν οι περισσότερες νέες λοιμώξεις. Σημαντική αύξηση στην επιδημία του HIV παρατηρήθηκε το 2011-2012 που οφειλόταν κυρίως σε ΧΕΝ. Από το 2013, όμως, η επιδημία ακολουθεί πτωτική πορεία, με το μεγαλύτερο ποσοστό κρουσμάτων να αποδίδεται στη μη προφυλαγμένη σεξουαλική επαφή, κυρίως μεταξύ ανδρών (MSM). Συμπερασματικά, η απροφύλακτη σεξουαλική επαφή MSM αποτελεί την κυριότερη οδό μετάδοσης στην Ελλάδα με ποσοστό 48.7%. Αναφορικά με τις νέες περιπτώσεις AIDS, 112 διαγνώστηκαν το 2017 εκ των οποίων το 40.2% οφείλεται σε MSM, 27.6% σε ετεροφυλική σεξουαλική επαφή και σε 15.2% σε ΧΕΝ. Συνολικά, μέχρι το τέλος του 2017, 4.094 περιστατικά AIDS καταγράφηκαν, με το 83.6% να αντιστοιχεί σε άνδρες. Ο αριθμός θανάτων από AIDS ανέρχεται στα 90 άτομα το 2017. Η σημαντική μείωση στην επίπτωση του AIDS αλλά και στον αριθμό θανάτων από AIDS, αποδίδεται στην HAART (ΚΕ.ΕΛ.Π.ΝΟ. 2017).



**Σχήμα 7:** Διαγνώσεις HIV λοίμωξης ανά 100.000 πληθυσμού στην Ελλάδα (2004-2017) (ΚΕ.ΕΛ.Π.ΝΟ. 2017).

Στην Κύπρο, λιγότερες από 30 νέες περιπτώσεις HIV λοίμωξης ετησίως καταγράφονταν από το 1986 μέχρι το 2005. Από το 2005 τα νέα κρούσματα άρχισαν να αυξάνονται και την περίοδο 2011-2013 ξεπερνούσαν τα 50 ανά έτος. Η αύξηση αυτή φαίνεται να παρατηρείται στους MSM Κυπριακής εθνικότητας, η οποία οφείλεται είτε σε πραγματική αύξηση των νέων λοιμώξεων, είτε αντανακλά κάτι διαφορετικό όπως την αύξηση των εξετάσεων για τη διάγνωση του HIV. Το Υπουργείο Υγείας έχει αναφέρει 847 περιστατικά διαγνωσμένων οροθετικών ατόμων το διάστημα 1986-2013, εκ των οποίων οι 243 ανέπτυξαν AIDS και οι 128 πέθαναν (European Centre for Disease Prevention and Control n.d.). Τη χρονική περίοδο 2007-2016, 1.063 νέες περιπτώσεις είχαν καταγραφεί εκ των οποίων οι 782 αφορούν άνδρες. Τα 534 κρούσματα αφορούν μολύνσεις με ετεροφυλοφιλική σεξουαλική επαφή, τα 457 MSM και μόνο 15 XEN. Το έτος 2016 οι νέες περιπτώσεις λοίμωξης ήταν 80 και εξ' αυτών οι 46 αφορούσαν MSM, ενώ το 2009 είχαν καταγραφεί μόλις 9 HIV λοιμώξεις που αφορούσαν MSM. Επιπλέον, κατά το ίδιο χρονικό διάστημα (2007-2016), 299 άτομα διαγνώστηκαν με AIDS και οι θάνατοι που οφείλονται στην ασθένεια αυτή ανέρχονται στους 95 (European Centre for Disease Prevention and Control 2017).

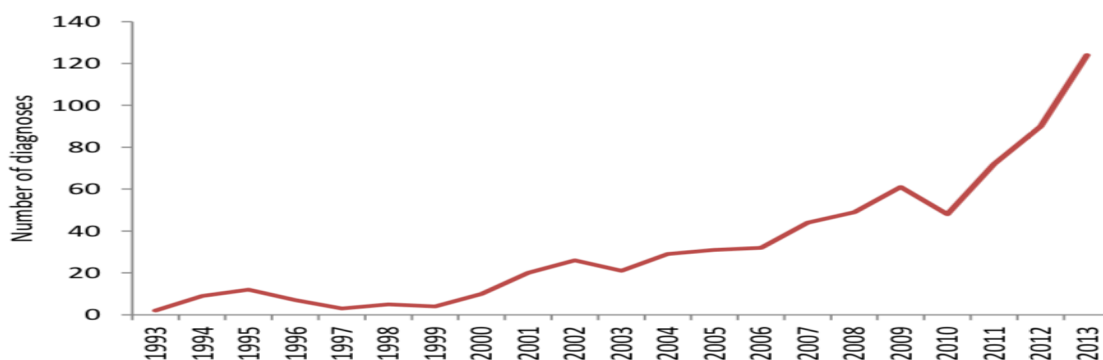


**Σχήμα 8:** Αριθμός νέων HIV λοιμώξεων στην Κύπρο (2006-2016)

(<https://www.statista.com>) .



Το πρώτο κρούσμα HIV λοίμωξης στην Αλβανία καταγράφηκε το 1993 και από τότε έχουν καταγραφεί 699 περιστατικά έως στο τέλος του 2013, με τα περισσότερα να εντοπίζονται στην πρωτεύουσα της, Τίρανα, όπου κατοικεί το 1/4 του πληθυσμού της χώρας. Από αναλύσεις, η επιδημία του HIV φαίνεται να μην κυριαρχεί σε κάποια συγκεκριμένη ομάδα κινδύνου, αλλά να σχετίζεται με ετεροφυλοφιλική σεξουαλική επαφή. Επιπλέον, η διάγνωση της μόλυνσης με HIV δε γίνεται εγκαίρως. Διακόσιοι πενήντα ασθενείς με AIDS έχουν καταγραφεί στην Αλβανία, με τα 2/3 να έχουν διαγνωσθεί στο διάστημα 2008-2012. Από τα συνολικά 699 κρούσματα HIV λοίμωξης, στα 122 αναφέρθηκε θάνατος, εκ των οποίων τα 48 αφορούσαν ασθενείς διαγνωσμένους με AIDS. Το υψηλό ποσοστό καθυστερημένης διάγνωσης, έχει ως αποτέλεσμα τον αυξημένο αριθμό θανάτων ατόμων διαγνωσμένων με HIV (Bozicevic et al. 2014). Στο διάστημα 2007- 2016, 1.007 νέα κρούσματα είχαν καταγραφεί εκ των οποίων οι 729 είναι άνδρες. Οι 115 περιπτώσεις αφορούν MSM και οι 823 ετεροφυλόφιλους, ενώ μόλις 5 XEN. Το έτος 2016, 127 ήταν οι νέες HIV λοιμώξεις, με τις 37 να καταγράφονται στην ηλικιακή ομάδα 30-39. Συνεχίζοντας την ίδια περίοδο (2007-2016), 529 άτομα αναφέρθηκαν με AIDS και στους 158 ανέρχεται ο αριθμός θανάτων που οφείλονται σε αυτόν (European Centre for Disease Prevention and Control 2017).



**Σχήμα 9:** Αριθμός νέων HIV λοιμώξεων στην Αλβανία (1993-2013) (Bozicevic et al. 2014).

## 1.4 Μοριακή επιδημιολογία HIV-1 υπότυπου A.

Ο HIV-1 υπότυπος A ανιχνεύθηκε για πρώτη φορά στην Αφρική, στα τέλη της δεκαετίας του 1970 (Tebit & Arts 2011). Ακολούθως, μεταδόθηκε σε όλη την υφήλιο (Kouliniska et al. 2002). Επιδημίες δημιουργήθηκαν στην Ανατολική Αφρική (Kouliniska et al. 2002; Paul M. Sharp and Beatrice H. Hahn 2011), σε χώρες της πρώην Σοβιετικής Ένωσης (Lazouskaya et al. 2005; Lukashov et al. 1999; NOVITSKY et al. 1998; Saad et al. 2006) και της Κεντρικής Ασίας (Khan et al. 2006; Ansari et al. 2011; Bobkov, Kazennova, Sukhanova, et al. 2004). Τοπικές επιδημίες παρατηρήθηκαν και σε άλλες χώρες όπως σε Αλβανία, Ελλάδα και Κύπρο (Panayiotou et al. 2014; Nikolopoulos et al. 2008; Paraskevis et al. 2007; Salemi et al. 2008).

Η παγκόσμια κατανομή των HIV υποτύπων είναι ετερογενής, με τη μεγαλύτερη ετερογένεια να εντοπίζεται στην Κεντρική Αφρική. Σε πρόσφατη μοριακή επιδημιολογική μελέτη βρέθηκε πως στην Ευρώπη ο υπότυπος B εντοπίζεται σε ποσοστό 68% και ο A σε 6.9% (Abecasis et al. 2013). Ο υπότυπος B ήταν κυρίαρχο στέλεχος στη Δυτική και Κεντρική Ευρώπη, ενώ την ίδια στιγμή ο A<sub>FSU</sub> (ή A6) στην Ανατολική Ευρώπη (χώρες πρώην Σοβιετικής Ένωσης, Former Soviet Union-FSU). Ο επιπολασμός των μη-B υποτύπων στην Ευρώπη αυξήθηκε τα τελευταία δέκα έτη. Οι μη-B υπότυποι εισήλθαν από κύματα μετανάστευσης από περιοχές όπου κυριαρχούν και έχουν εξαπλωθεί μέσω των πληθυσμιακών μετακινήσεων στις Ευρωπαϊκές χώρες (Beloukas et al. 2016).

Στην Ανατολική Ευρώπη ο υπότυπος A<sub>FSU</sub> (ή A6) παρατηρήθηκε στα μισά της δεκαετίας του 1990, τότε που στις χώρες της πρώην Σοβιετικής Ένωσης υπήρχαν ελάχιστα κρούσματα HIV-1 λοιμώξεων. Οι μεταδόσεις πραγματοποιούνταν μέσω σεξουαλικών επαφών (κυρίως MSM) (Bobkova 2013; Lukashov et al. 1995). Η μεγάλη επιδημία του HIV-1 υπότυπου A<sub>FSU</sub> (ή A6) ξέσπασε αρχικά στην Ουκρανία το 1994 και στη συνέχεια εξαπλώθηκε στις περισσότερες χώρες της πρώην Σοβιετικής Ένωσης, μεταξύ των XEN

(NOVITSKY et al. 1998; Bobkova 2013; Bobkov, Kazennova, Selimova, et al. 2004). Η επιδημία ξεκίνησε μετά την εισαγωγή δύο HIV-1 στελεχών στον πληθυσμό των ΧΕΝ στην Οδησσό, ένα εκ των οποίων ήταν υπότυπου Α (Nabatov et al. 2002).

Στην Ελλάδα, η επιδημία άρχισε σε κοινό χρόνο με την υπόλοιπη Ευρώπη. Συχνότερα συναντάται ο υπότυπος Β (65.4%), ακολουθούν οι μη-Β υπότυποι (27.5%) και οι ανασυνδυασμένες μορφές του ιού (6.6%). Ο υπότυπος Α είναι ο επικρατέστερος μεταξύ των μη-Β υποτύπων (20.6%) και σε αντίθεση με άλλες Ευρωπαϊκές χώρες, ο επιπολασμός του είναι αρκετά υψηλός και επικρατέστερος έναντι του υπότυπου Β μεταξύ των μόνιμων κατοίκων της χώρας. Συγκεκριμένα, εκτιμάται αύξηση του επιπολασμού του υπότυπου Α από 6% το 1984 σε 42% το 2004. Φυλογενετικές αναλύσεις έχουν δείξει πως η εισαγωγή του υπότυπου Α στην Ελλάδα έγινε μία φορά, δηλαδή υπήρξε μία μετάδοση, ίσως από την Αφρική, και εξαπλώθηκε μέσω τοπικών δικτύων, χρονολογώντας την προέλευση της επιδημίας στα τέλη του 1970 (Paraskevis et al. 2007).

Στην Αλβανία, παρατηρήθηκε υψηλός επιπολασμός μη-Β υποτύπων (65.2%) (Ciccocozzi et al. 2005). Σε επικείμενες μελέτες παρατηρήθηκε πως η επιδημία του υπότυπου Α της Αλβανίας προήλθε από την Ελλάδα (Paraskevis et al. 2007).

Όσον αφορά την Κύπρο, ο επιπολασμός του υπότυπου Α είναι πολύ υψηλός (~30%). Όμως, άγνωστη παραμένει ακόμα η γεωγραφική προέλευση της επιδημίας (Kousiappa et al. 2009; Kousiappa et al. 2011).

Τέλος, είναι σημαντικό να επισημανθεί πως, η Αλβανία, η Ελλάδα και η Κύπρος αποτελούν λίγες από τις περιοχές στην Ευρώπη, όπου ο υπότυπος Α παρουσιάζει υψηλό επιπολασμό, χωρίς να οφείλεται στην επιδημία των ΧΕΝ από την Ανατολική Ευρώπη ή σε μετανάστευση από την Αφρική.



## **ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**



## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ.

### 2.1 Γενικές πληροφορίες μεθοδολογίας.

Το DNA κάθε έμβιου οργανισμού περιέχει συσσωρευμένες πληροφορίες τόσο για την προέλευση όσο και για την εξελικτική πορεία του οργανισμού στο χρόνο. Έτσι, μελετώντας το DNA είναι δυνατόν να συνάγουμε συμπεράσματα για την εξελικτική ιστορία των οργανισμών, αλλά και τους μηχανισμούς που κατευθύνουν την εξελικτική διαδικασία. Επιπλέον, με κριτήριο τη μελέτη του γενετικού υλικού είναι δυνατόν να κατηγοριοποιήσουμε τα έμβια όντα ακριβέστερα, συγκριτικά με κλασικότερες μεθόδους. Τα παραπάνω αποτελούν αντικείμενο της μελέτης της *μοριακής εξέλιξης*, της οποίας τα βασικά πεδία είναι η μελέτη: 1) των αλλαγών που συμβαίνουν στο γενετικό υλικό, σε συνδυασμό με τη μελέτη του ρυθμού και του μοντέλου που ακολουθούν αυτές οι αλλαγές στην πορεία του χρόνου, και 2) της μοριακής φυλογένειας, με αντικείμενο τη μελέτη της εξελικτικής ιστορίας των οργανισμών βασισμένη σε μοριακά δεδομένα, αναπαριστώντας τη με δένδρα (φυλογενετικά δένδρα).

Η *Μοριακή Επιδημιολογία* είναι η μελέτη της συμβολής των γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων, που ανιχνεύονται σε μοριακό επίπεδο, στην αιτιολογία, την κατανομή της συχνότητας και την πρόληψη νοσημάτων σε ανθρώπινους οργανισμούς. Οι μέθοδοί της, μέσω των οποίων εκτιμώνται τα χαρακτηριστικά των επιμέρους επιδημιών, έχουν συμβάλει σημαντικά στο σχεδιασμό και την αποτελεσματική εφαρμογή θεραπευτικών και προληπτικών παρεμβάσεων.

Αναφορικά με τα δεδομένα, στην παρούσα μελέτη οι αλληλουχίες που αναλύθηκαν ήταν διαθέσιμες στο γονίδιο *pol*, που αποτελείται από την πρωτεάση (Protease- PR) και την αντίστροφη μεταγραφάση (Reverse Transcription- RT). Η

συγκεκριμένη περιοχή είναι γνωστή για μεταλλαγές αντοχής στα αντιρετροϊκά φάρμακα, καθιστώντας τον ιό ανθεκτικό στην θεραπεία. Κατά αυτό τον τρόπο, το γονίδιο *pol* είναι η περιοχή του συνόλου του γονιδιώματος με το μεγαλύτερο αριθμό διαθέσιμων αλληλουχιών λόγω του ελέγχου γονοτυπικής αντοχής. Ο έλεγχος γονοτυπικής αντοχής είναι η διαδικασία όπου παρατηρείται εάν η αντιρετροϊκή θεραπεία έχει ανασταλτική επίδραση στο στέλεχος του ιού.

### 2.1.1 Φυλογενετική ανάλυση.

Η φυλογενετική ανάλυση χρησιμοποιείται για την εκτίμηση των εξελικτικών ή γενεαλογικών σχέσεων του υπό μελέτη πληθυσμού, ο οποίος μπορεί να προέρχεται από τον ίδιο ή διαφορετικούς οργανισμούς, χρησιμοποιώντας ως δεδομένα το γενετικό τους υλικό ή τις πρωτεϊνικές αλληλουχίες που κωδικοποιούνται από το γενετικό υλικό. Οι πραγματικές εξελικτικές σχέσεις των υπό μελέτη οργανισμών αναπαρίστανται από ένα σχήμα με τη μορφή δένδρου, ευρέως γνωστό ως φυλογενετικό δένδρο ή φυλογενετική τοπολογία.

Η διαδικασία της φυλογενετικής ανάλυσης και η κατασκευή των φυλογενετικών δένδρων χωρίζεται σε 4 βήματα:

#### 1) Πολλαπλή στοίχιση (alignment):

Για να εκτιμήσουμε τις εξελικτικές σχέσεις μεταξύ του ίδιου ή διαφορετικών οργανισμών χρησιμοποιώντας αλληλουχίες DNA ή πρωτεϊνών, θα πρέπει να υπολογίσουμε το βαθμό ετερογένειας. Για να τις συγκρίνουμε, πρέπει να βρούμε περιοχές DNA που αντιστοιχούν σε ομόλογες περιοχές, δηλαδή περιοχές που κωδικοποιούν για παρόμοιες λειτουργίες, να τις στοιχίσουμε (align) και ακολούθως να γίνουν επιμέρους απαραίτητες διορθώσεις, στο σύνολο των συστοιχιών, σύμφωνα με το κωδικοποιημένο πλαίσιο ανάγνωσης. Η στοίχιση και η



διόρθωση έχουν σημαντικό ρόλο, καθώς αν γίνει κάτι λάθος, όλες οι επερχόμενες αναλύσεις θα είναι επισφαλείς.

Για τη στοίχιση στη μελέτη αυτή, χρησιμοποιήσαμε τον αλγόριθμο *MUSCLE* (Edgar 2004) στο πρόγραμμα *MEGA (Molecular Evolutionary Genetic Analysis) v5.2.2* (Tamura et al. 2011). Το *MUSCLE* είναι ένα σύγχρονο πρόγραμμα προοδευτικής πολλαπλής στοίχισης (progressive multiple alignment method) το οποίο εργάζεται επαναληπτικά, ώστε λάθη που είναι πιθανό να εισχωρήσουν σε αρχικά στάδια της στοίχισης, να μπορούν να αναιρεθούν σε κάποιο από τα μετέπειτα βήματα.

## 2) Καθορισμός μοντέλου νουκλεοτιδικής αντικατάστασης:

Κατά τη διάρκεια της εξέλιξης, το DNA των οργανισμών μεταβάλλεται, με αποτέλεσμα οι αλληλουχίες δύο απογόνων μετά από την πάροδο των χρόνων να διαφέρουν από την αντίστοιχη του προγόνου τους. Έτσι, σημαντική κρίνεται η εκτίμηση των γενετικών αποστάσεων, δηλαδή ο αναμενόμενος αριθμός νουκλεοτιδικών αντικαταστάσεων που έχουν συμβεί στο διάστημα εξέλιξης στις αλληλουχίες του DNA. Για το σκοπό αυτόν έχουν αναπτυχθεί τα εξελικτικά μοντέλα (evolutionary models).

## 3) Επιλογή μεθόδου κλαδοποίησης:

Υπάρχουν διαφορετικές μέθοδοι για την κατασκευή ενός φυλογενετικού δένδρου, οι οποίες χωρίζονται στις: α) μεθόδους αποστάσεων και β) μεθόδους χαρακτήρων. Οι πρώτες βασίζονται στην εκτίμηση, αρχικά, των γενετικών αποστάσεων και εν συνεχεία του φυλογενετικού δένδρου βάσει ενός αλγορίθμου που στηρίζεται σε μία ακολουθία υπολογισμών. Αντιθέτως, οι μέθοδοι χαρακτήρων βασίζονται στην εκτίμηση του τελικού φυλογενετικού δένδρου συγκρίνοντας διαφορετικές τοπολογίες βάσει ενός κριτηρίου βελτιστοποίησης, όπως η

πιθανοφάνεια ή φειδωλότητα. Στις μεθόδους χαρακτήρων περιλαμβάνονται: i) η μέθοδος μέγιστης πιθανοφάνειας (*ML-maximum likelihood*) και ii) η μέθοδος μέγιστης φειδωλότητας (*maximum parsimony*).

Στην μελέτη μας χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος μέγιστης πιθανοφάνειας. Η φιλοσοφία της φυλογενετικής ανάλυσης με τη μέθοδο μέγιστης πιθανοφάνειας είναι να υπολογιστεί το φυλογενετικό δένδρο, δηλαδή το μήκος των κλαδιών του δένδρου και οι παράμετροι του εξελικτικού μοντέλου (συχνότητα εμφάνισης νουκλεοτιδίων, ρυθμοί αντικατάστασης κτλ.), που μεγιστοποιούν την πιθανότητα να παρατηρηθούν τα υπό μελέτη δεδομένα (γενετικό υλικό ή πρωτεΐνες). Με άλλα λόγια, αποσκοπεί στο να βρεθεί η πιθανότητα να παρατηρήσουμε τα δεδομένα (*data*) δεδομένου του δένδρου ( $\tau$ ) και του εξελικτικού μοντέλου ( $\theta$ ). Δηλαδή,

$$L(\tau, \theta) = \text{Prob}(\text{data}/\tau, \theta).$$

Οι εκτιμώμενες τιμές για τις παραμέτρους  $\tau, \theta$  ( $\hat{\tau}, \hat{\theta}$ ) είναι εκείνες που μεγιστοποιούν τη συνάρτηση μέγιστης πιθανοφάνειας  $L(\tau, \theta)$ .

Το πρόγραμμα που χρησιμοποιήσαμε και βασίζεται στη μεθοδολογία της μέγιστης πιθανοφάνειας είναι το RAxML (v8.0.20) (Randomized Axelerated Maximum Likelihood) (Stamatakis 2006). Το πρόγραμμα αυτό έχει αρκετά γρήγορους χρόνους εκτέλεσης, διότι χρησιμοποιεί προηγμένα πακέτα εντολών και παράλληλη επεξεργασία. Μία πλήρης ανάλυση με το RAxML αποτελείται από δύο βήματα. Αρχικά, το πρόγραμμα κατασκευάζει έναν αριθμό bootstrap αντιγράφων, δηλαδή δημιουργεί τεχνητά σύνολα δεδομένων (γενετικού υλικού) κάνοντας δειγματοληψία με επανάθεση από τις στήλες στοίχισης του γενετικού υλικού, και βρίσκει την καλύτερη τοπολογία (δένδρο) για καθένα από αυτά. Ακολουθώς, εκτελεί μία αναζήτηση στο σύνολο των τοπολογιών αυτών και εντοπίζει τη βέλτιστη.

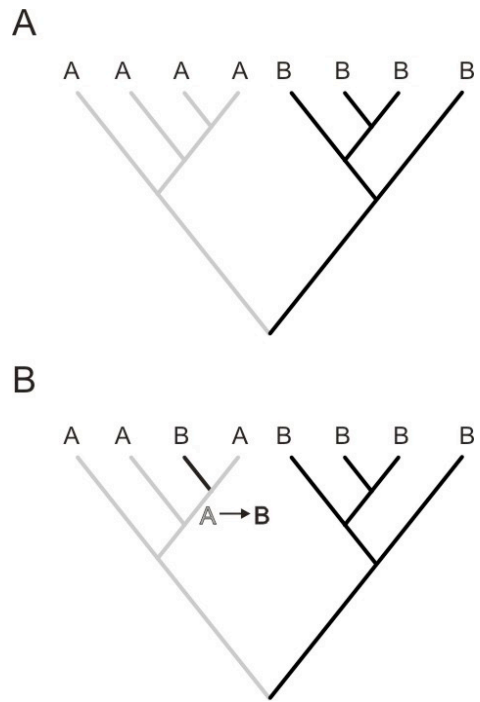
#### 4) Αξιολόγηση φυλογενετικού δένδρου:

Μετά την κατασκευή του φυλογενετικού δένδρου, για το τέλος της φυλογενετικής ανάλυσης, χρειάζεται να το αξιολογήσουμε. Συνήθως, αυτό επιτυγχάνεται με τη μέθοδο bootstrap.

### 2.1.2 Φυλογεωγραφία.

Η φυλογεωγραφία εκτιμά την γεωγραφική προέλευση της λοίμωξης και τον τρόπο διασποράς μεταξύ διαφορετικών γεωγραφικών περιοχών. Η μεθοδολογία έχει ως εξής:

Το κάτωθι δένδρο (Σχήμα 10) περιέχει 8 αλληλουχίες HIV-1 από δύο χώρες προέλευσης A και B. Οι αλληλουχίες επισημαίνονται με διαφορετικό χρώμα σύμφωνα με την χώρα προέλευσης τους. Εφόσον δεν υπάρχουν μεταδόσεις μεταξύ των δύο χωρών A και B, οι αλληλουχίες θα σχηματίζουν δύο μονοφυλετικές ομάδες (Σχήμα 10A). Ενώ, εάν ένα άτομο από τον πληθυσμό B θα μολυνθεί στη γεωγραφική περιοχή A, τότε ένας κλάδος του πληθυσμού B θα εισχωρήσει στο μονοφυλετικό κλάδο του A (Σχήμα 10B). Το γεγονός μετάδοσης του ιού συμβαίνει από τη χώρα A στη B (Paraskevis et al. 2009).



**Σχήμα 10:** Επεξήγηση μεθόδου φυλογεωγραφίας (Paraskevis et al. 2009).

## 2.2 Υλικό.

Τα υπό μελέτη δεδομένα αφορούσαν αλληλουχίες της Αλβανίας, της Ελλάδας και της Κύπρου. Αρχικά, πραγματοποιήσαμε υποτύπηση των διαθέσιμων αλληλουχιών με τη χρήση των προγραμμάτων COMET (v2.2) και REGA (v2.0) και έτσι απομονώσαμε τις αλληλουχίες υπότυπου A, δηλαδή εκείνες όπου εστιάζεται το ερευνητικό μας ενδιαφέρον στην παρούσα μελέτη. Έτσι, συνολικά το δείγμα μας απαρτιζόταν από 1.328 αλληλουχίες στο σύνολο, εκ των οποίων οι 36 ήταν από Αλβανία, οι 1.226 από Ελλάδα (με ημερομηνία δειγματοληψίας μεταξύ 1996 και 06/2015) και οι 66 από Κύπρο (με ημερομηνία δειγματοληψίας μεταξύ 2004-2012).

Για να εκτιμήσουμε τον τρόπο διασποράς του υπότυπου A αναλύσαμε τα δεδομένα μας (1.328 αλληλουχίες από Αλβανία, Ελλάδα και Κύπρο) με αλληλουχίες αναφοράς (references). Οι αλληλουχίες αναφοράς επιλέχθηκαν με δυο διαφορετικούς τρόπους.

Αρχικά θέλαμε για κάθε μία από τις 1.328 διαθέσιμες αλληλουχίες, να βρούμε τις 10 αλληλουχίες που παρουσιάζουν το μεγαλύτερο ποσοστό ομοιότητας και είναι καταχωρημένες στην βάση δεδομένων HIV Sequence database (<https://www.hiv.lanl.gov>). Το παραπάνω επετεύχθη με το BLAST search στην HIV Sequence database ορίζοντας ως παραμέτρους να μας δίνει τις 10 μοναδικά πιο όμοιες αλληλουχίες για κάθε μία διαθέσιμη αλληλουχία και περιορίζοντας την αναζήτηση στον υπότυπο A. Μετά από διαγραφή διπλό και άνω εγγραφών που προέκυψαν από το BLAST search των αλληλουχιών αναφοράς, παρέμειναν 128 αλληλουχίες με ημερομηνία δειγματοληψίας μεταξύ 1/01/1996 και 10/01/2015. Τριάντα έξι από τις 128 πιο όμοιες αλληλουχίες αναφοράς αφαιρέθηκαν λόγω μη ικανοποιητικού μήκους (έλλειψη πρωτεάσης από το γονίδιο *pol*). Έτσι, καταλήξαμε στις 92 πιο όμοιες αλληλουχίες με τις αλληλουχίες του υπό μελέτη πληθυσμού μας.

Ακολούθως, αναζητήσαμε στελέχη αναφοράς υπότυπου A τα οποία επιλέχθηκαν με τυχαία δειγματοληψία από το σύνολο των αλληλουχιών

υπότυπου A που ήταν διαθέσιμες στην HIV Sequence database. Από τις 32.082 αλληλουχίες που ήταν καταχωρημένες στην βάση ως αλληλουχίες υπότυπου A έως τον Οκτώβριο του 2017, απομονώθηκαν 3.000 με τυχαία επιλογή, αφού πρώτα επιβεβαιώθηκε ο υπότυπος τους. Τελικώς, το αρχείο των τυχαίων επιλεγμένων αλληλουχιών αποτελούνταν από 3.000 αλληλουχίες με ημερομηνία δειγματοληψίας μεταξύ των χρονολογιών 1985 και 2016.

Τέλος, πραγματοποιήθηκε στοίχιση και διόρθωση στο πρόγραμμα MEGA v5.2.2 με τη χρήση του αλγορίθμου MUSCLE του συνόλου των δεδομένων μας. Συγκεκριμένα των 3.092 αλληλουχιών αναφοράς (από το BLAST search και την τυχαία δειγματοληψία) και των 1.328 αλληλουχιών που αφορούν των υπό μελέτη πληθυσμό μας. Έτσι, το τελικό αρχείο δεδομένων που χρησιμοποιήθηκε στη επικείμενη μελέτη απαρτίζεται συνολικά από 4.420 αλληλουχίες, μήκους 897 νουκλεοτιδικών βάσεων.

### **2.3 Φυλογενετική ανάλυση.**

Η φυλογενετική ανάλυση των 4.420 αλληλουχιών μας βασίστηκε σε μεθόδους μέγιστης πιθανοφάνειας και διενεργήθηκε με το πρόγραμμα RAxML v8.0.20.

Η φυλογενετική ανάλυση με τη μέθοδο μέγιστης πιθανοφάνειας από το πρόγραμμα RAxML (HPC-BlackBox), λόγω μεγάλου όγκου δεδομένων, δεν πραγματοποιήθηκε από γραμμή εντολών, αλλά μέσω πλατφόρμας με πολλαπλούς επεξεργαστές στο CIPRES Science Gateway (<https://www.phylo.org>). Για την εκτίμηση των φυλογενετικών δένδρων με τη μέθοδο μέγιστης πιθανοφάνειας χρησιμοποιήθηκε το γενικευμένο εξελικτικό μοντέλο αντιστρέψιμου χρόνου GTR (General Time Reversible) νουκλεοτιδικής αντικατάστασης και η κατανομή Γάμμα (Γ) για την προσέγγιση και διόρθωση των διαφορετικών ρυθμών ετερογένειας μεταξύ των θέσεων του γενετικού υλικού (CAT).

## 2.4 Φυλογεωγραφική ανάλυση.

Η φυλογεωγραφική ανάλυση στη μελέτη των ιών, όπως εδώ του HIV υπότυπου A, βοηθάει στην εκτίμηση της πιθανής προέλευσης της μετάδοσης του ιού, χρησιμοποιώντας γενετικά δεδομένα με γνωστή γεωγραφική προέλευση. Στην επικείμενη μελέτη, το ερευνητικό μας ενδιαφέρον εστιάζεται στη γεωγραφική προέλευση του υπότυπου A στην Κύπρο. Επίσης, θα επιβεβαιώσουμε και τη γεωγραφική προέλευση του υπότυπου A στην Αλβανία, που σε προηγούμενη μελέτη έχει βρεθεί πως είναι ελληνική (Paraskevis et al. 2007).

Η φυλογεωγραφία διενεργήθηκε με τη χρήση του προγράμματος Mesquite v3.31 (Maddison, 2017), όπου η εκτίμηση του προγονικού χαρακτήρα επιτυγχάνεται με τη μέθοδο μέγιστης φειδωλότητας. Προσπαθεί, δηλαδή, να βρει την προγονική γεωγραφική προέλευση στο δοσμένο δένδρο, ώστε η παρατηρούμενη τοπολογία να προκύπτει από το μικρότερο δυνατό αριθμό εξελικτικών αλλαγών. Έτσι, στο δένδρο διακρίνονταν τέσσερις χρωματισμοί, που αναφέρονταν σε: 1) Αλβανία και αλληλουχίες αναφοράς από Αλβανία, 2) Ελλάδα και αλληλουχίες αναφοράς από Ελλάδα, 3) Κύπρο και αλληλουχίες αναφοράς από Κύπρο, και 4) αλληλουχίες αναφοράς εκτός από Ελλάδα, Αλβανία και Κύπρο.

Μέσα στον κλάδο της ελληνικής επιδημίας αναζητήθηκαν αλληλουχίες της Αλβανίας και της Κύπρου ώστε να εντοπισθεί ο αριθμός των μεταδόσεων από την Ελλάδα σε αυτές τις χώρες. Ως δευτερεύον ερώτημα, διερευνήθηκε πόσοι από τους Αλβανούς και τους Κυπρίους που μολύνθηκαν στην Ελλάδα ανήκουν σε τοπικά δίκτυα μετάδοσης.

Στη συνέχεια, αφαιρέσαμε τις αλληλουχίες που ανήκουν στην ελληνική επιμέρους τοπική επιδημία (τοπικό δίκτυο μετάδοσης του ιού) και πραγματοποιήσαμε εκ νέου φυλογενετική ανάλυση με μέθοδο μέγιστης πιθανοφάνειας στο πρόγραμμα RAxML (HPC-BlackBox). Για την εκτίμηση των φυλογενετικών δένδρων χρησιμοποιήθηκαν οι ίδιες παράμετροι με πριν (GTR+Γ).

Στο «καινούργιο» δένδρο, που δεν περιέχει πλέον τις αλληλουχίες που απαρτίζουν την ελληνική επιμέρους τοπική επιδημία και όσες αλληλουχίες από Αλβανία ή Κύπρο εντοπίστηκαν εντός αυτής, αναζητήσαμε τη γεωγραφική προέλευση της λοίμωξης των υπολοίπων αλληλουχιών της Αλβανίας και της Κύπρου. Για τη διεξαγωγή συμπεράσματος ελέγξαμε για κάθε μία από τις εναπομείναντες Αλβανικές και Κυπριακές αλληλουχίες εάν ανήκει σε κάποιο τοπικό δίκτυο, όπου τουλάχιστον το 70% των αλληλουχιών του δικτύου είχε συλλεγεί στην ίδια γεωγραφική περιοχή, ώστε να αποφανθούμε πως εκείνη η περιοχή αποτέλεσε την πηγή της μόλυνσης (Σχήμα 10). Επιπροσθέτως, καταγράφηκαν τα τοπικά δίκτυα που παρατηρήθηκαν μεταξύ αλληλουχιών από Αλβανία ή από Κύπρο.

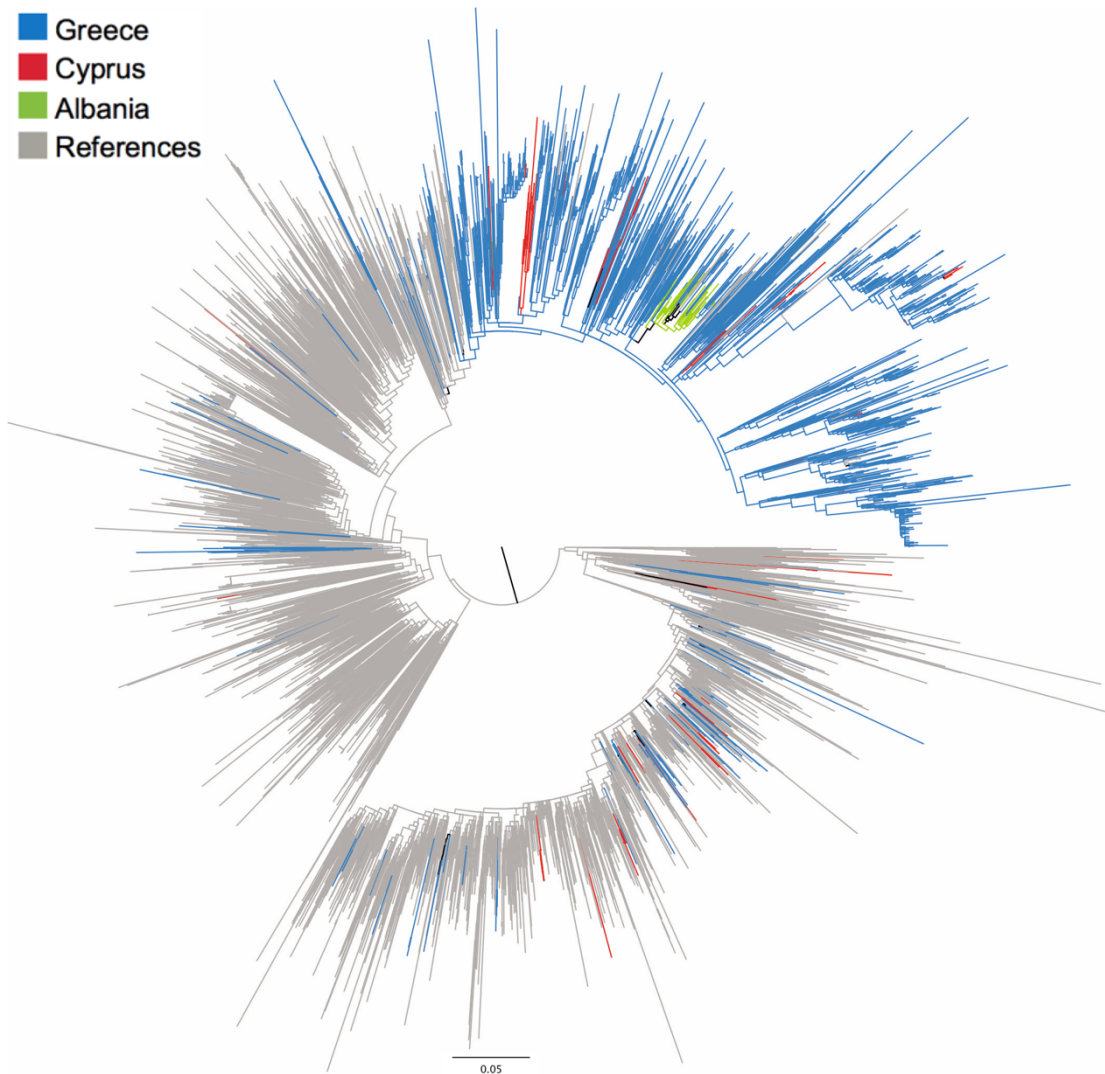


### ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.

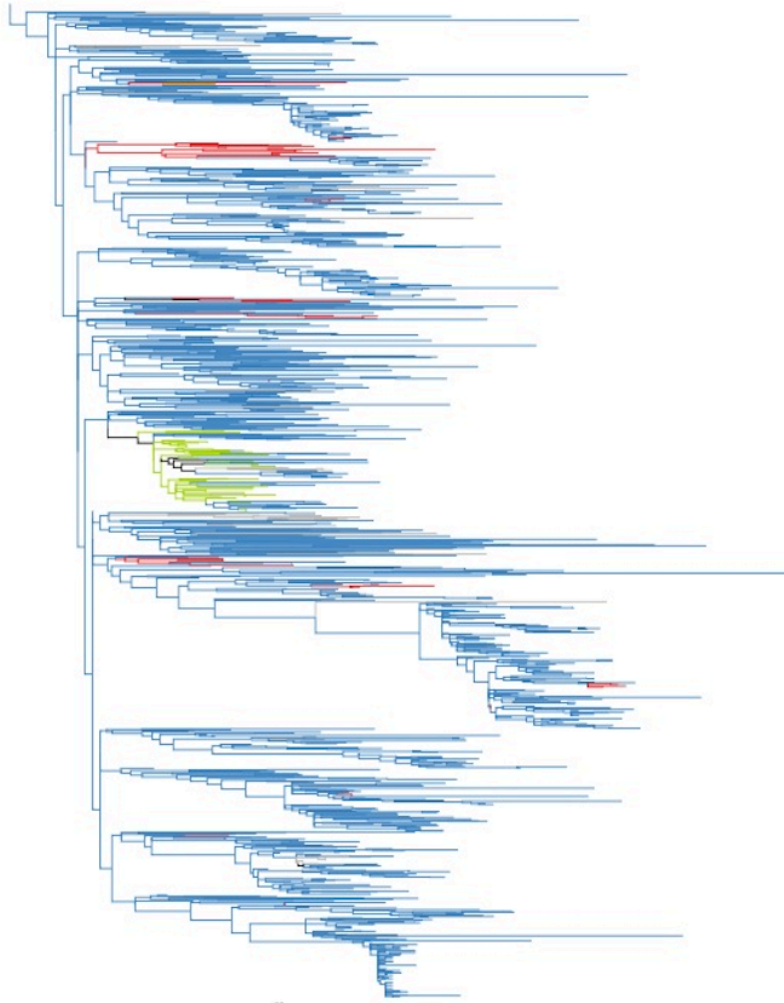
Όσον αφορά τον τρόπο μετάδοσης του ιού μεταξύ των οροθετικών με διαθέσιμη αλληλουχία από Κύπρο, το 39% (26/66) αποδίδεται σε σεξουαλική επαφή μεταξύ ανδρών (MSM), το 49% (32/66) σε ετεροφυλοφιλική σεξουαλική επαφή και το υπόλοιπο 12% (8/66) σε άλλους παράγοντες. Επίσης, οι 44 εκ των 66 (67%) μεταδόσεων της λοίμωξης αφορούν άνδρες και μόλις οι 22 (33%) γυναίκες.

Ακολούθως, παραθέτουμε το φυλογενετικό δένδρο που εκτιμήθηκε από το σύνολο των δεδομένων του HIV υπότυπου A της μελέτης (Σχήμα 11). Οι αλληλουχίες με χρώμα μπλε αντιστοιχούν στις ελληνικές, με λαχανί στις αλβανικές, με κόκκινο στις κυπριακές και με γκρι στις αλληλουχίες αναφοράς.

Παρατηρούμε ότι οι αλληλουχίες από Ελλάδα σχηματίζουν μια μεγάλη φυλογενετική ομάδα που υποδεικνύει τοπική διασπορά του ιού (επιμέρους τοπική επιδημία) (Σχήματα 11 και 12). Μέσα στην ελληνική επιδημία βρίσκονται όλες οι αλβανικές αλληλουχίες σε αντίθεση με τις κυπριακές αλληλουχίες που εντοπίζονται διάσπαρτες σε όλη την τοπολογία του υπότυπου A (Σχήματα 11 και 12).



**Σχήμα 11:** Φυλογενετικό δένδρο από το σύνολο των αλληλουχιών HIV υπότυπου Α. Μπλε: ελληνικές, λαχανί: αλβανικές, κόκκινο: κυπριακές, γκρι: αλληλουχίες αναφοράς.

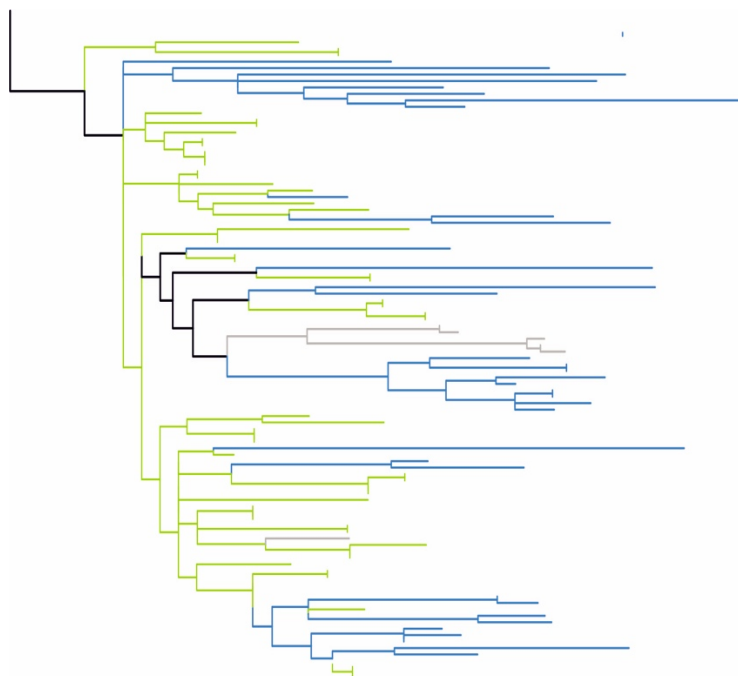


**Σχήμα 12:** Ελληνική επιδημία. Μπλε: ελληνικές, λαχανί: αλβανικές, κόκκινο: κυπριακές, γκρι: αλληλουχίες αναφοράς.

Συγκεκριμένα, μέσα στην ελληνική επιδημία εντοπίζονται και τα 36 στελέχη από Αλβανία. Οι 35 από τις 36 αλληλουχίες από Αλβανία (97%) εντοπίστηκαν να σχηματίζουν μία μονοφυλετική ομάδα που υποδεικνύει μεμονωμένη εισαγωγή του ιού από Ελλάδα και διασπορά μεταξύ του τοπικού πληθυσμού (Πίνακας 1). Επομένως, η επιδημία του υπότυπου Α στην Αλβανία επιβεβαιώνουμε πως έχει 100% ελληνική προέλευση (Σχήμα 13).

<b>Accession number</b>	<b>Clusters</b>	<b>Accession number</b>	<b>Clusters</b>	<b>Accession number</b>	<b>Clusters</b>
AL_AY611652	1	AL_AY611689	1	AL_AY611703	1
AL_AY611653	1	AL_AY611690	1	AL_AY611704	1
AL_AY611654	1	AL_AY611691	1	AL_AY611705	1
AL_AY611655	1	AL_AY611692	1	AL_AY611706	1
AL_AY611656	1	AL_AY611694	1	AL_AY611707	1
AL_AY611657	1	AL_AY611695	1	AL_AY611709	1
AL_AY611658	1	AL_AY611696	1	AL_AY611710	1
AL_AY611659	1	AL_AY611697	1	AL_AY611711	1
AL_AY611660	1	AL_AY611698	1	AL_AY611712	1
AL_AY611662	1	AL_AY611699	1	AL_AY611713	1
AL_AY611663	1	AL_AY611700	1	AL_AY611714	1
AL_AY611664	1	AL_AY611702	1	AL_AY611715	-

**Πίνακας 1:** Cluster (μονοφυλετική ομάδα) αλληλουχιών από Αλβανία που παρατηρούνται μέσα στην ελληνική επιδημία.

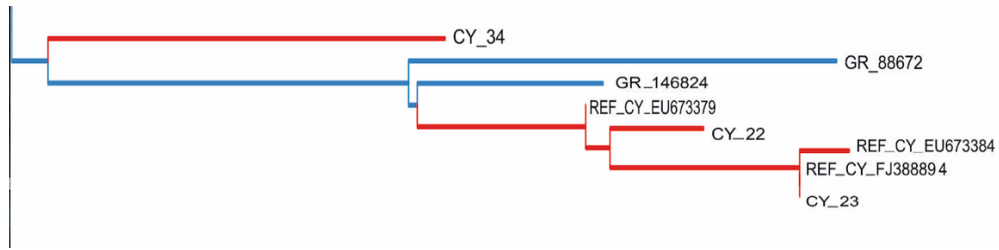


**Σχήμα 13:** Μονοφυλετική ομάδα αλβανικών αλληλουχιών (λαχανί χρώμα) εντός της ελληνικής επιδημίας.

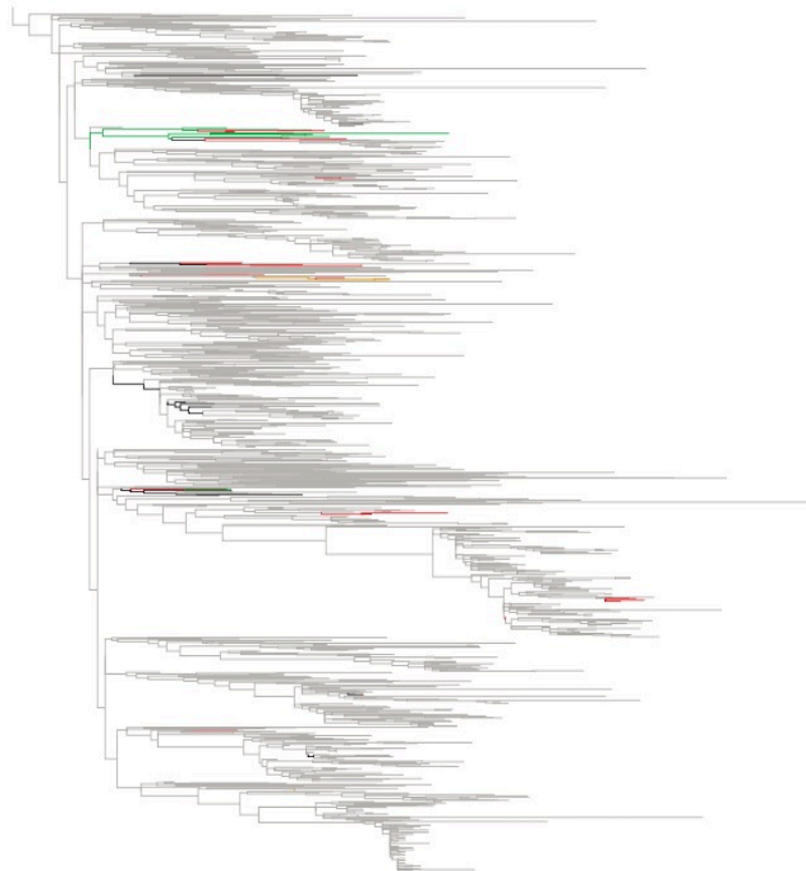
Αναφορικά με τα στελέχη από Κύπρο και την ελληνική επιδημία, οι 37 από τις 66 (56%) μεταδόσεις της HIV λοίμωξης στην Κύπρο συνέβησαν από την Ελλάδα, δηλαδή, η λοίμωξη είχε ελληνική προέλευση. Τα 30 από τα 37 (81%) στελέχη εντοπίστηκαν μέσα σε 7 επιμέρους τοπικά δίκτυα του ιού (Πίνακας 2), με εύρος από 2 έως 11 στελέχη. Επιπροσθέτως για τις αλληλουχίες που εντοπίστηκαν εντός της ελληνικής επιδημίας, οι 24 από τις 37 (65%) μεταδόσεις αποδίδονται σε σεξουαλική επαφή μεταξύ ανδρών (MSM) και οι 13 από τις 37 (35%) σε ετεροφυλοφιλική σεξουαλική επαφή (Σχήμα 15).

Accession number	Clusters	Accession number	Clusters	Accession number	Clusters
CY_292	-	CY_156	2	CY_355	6
CY_369	-	CY_140	2	CY_375	6
CY_51	1	CY_45	3	CY_287	6
CY_164	1	CY_196	3	CY_296	7
CY_357	1	CY_193	3	CY_295	7
CY_121	1	CY_34	4	CY_322	7
CY_377	1	CY_22	4	CY_350	7
CY_243	1	CY_23	4	CY_207	-
CY_209	1	CY_230	-	CY_291	-
CY_208	1	CY_118	5	CY_91	-
CY_235	1	CY_144	5	CY_182	-
CY_236	1	CY_106	5		
CY_127	1	CY_153	5		

**Πίνακας 2:** Επιμέρους τοπικά δίκτυα μετάδοσης του ιού στην Κύπρο με ελληνική προέλευση της λοίμωξης (παρατηρήθηκαν εντός της ελληνικής επιδημίας).



**Σχήμα 14:** Παράδειγμα ενός επιμέρους τοπικού δικτύου με στελέχη από Κύπρο (CY), συγκεκριμένα το cluster «4», που εντοπίζεται εντός της ελληνικής επιδημίας.



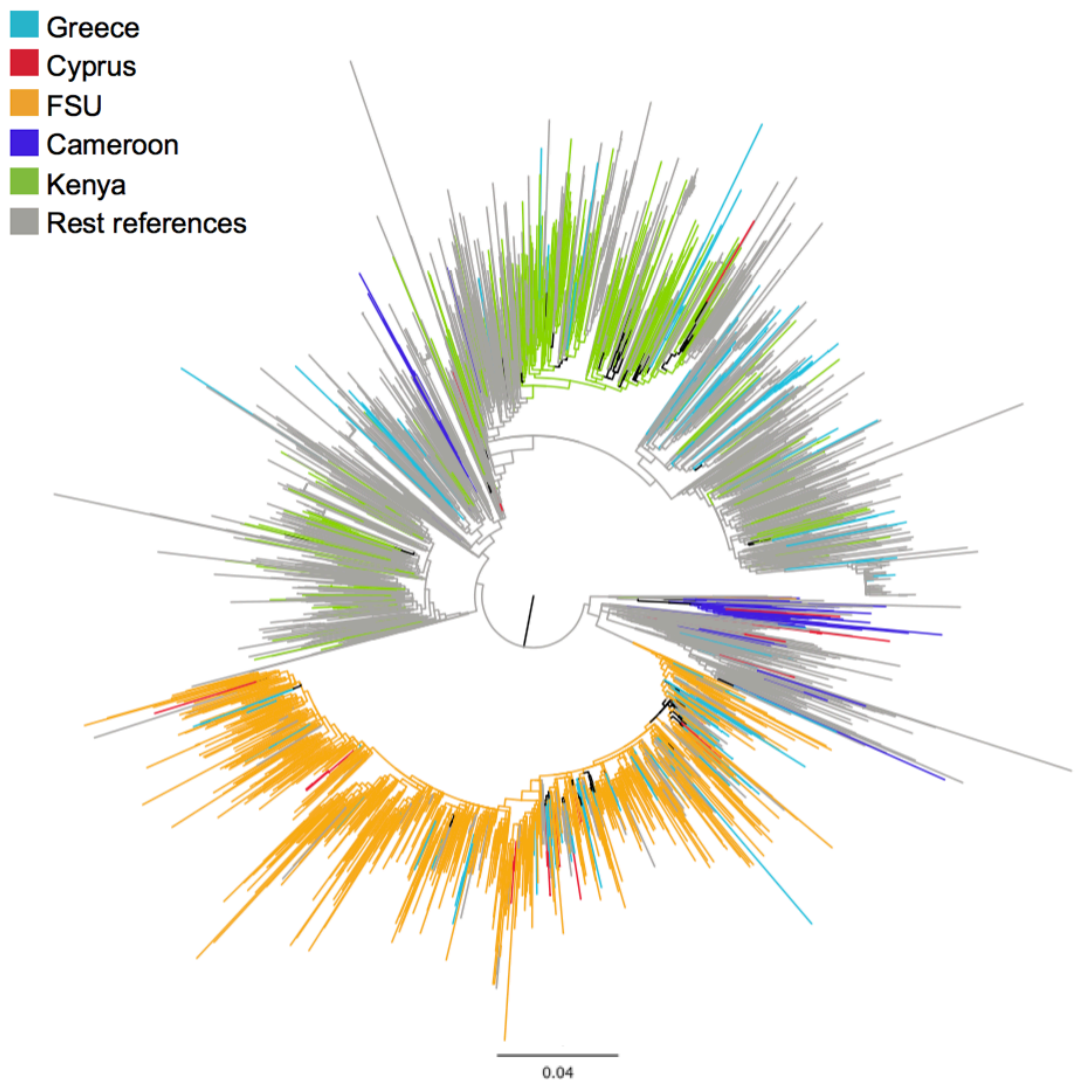
**Σχήμα 15:** Ελληνική επιδημία. Με γκρι έχουν επισημανθεί οι αλληλουχίες από Ελλάδα και Αλβανία ενώ με διαφορετικά χρώματα οι αλληλουχίες από Κύπρο σύμφωνα με τον τρόπο μετάδοσης του ιού. Συγκεκριμένα, με κόκκινο οι αλληλουχίες από Κύπρο που απομονώθηκαν από MSM, με πράσινο από HET και με πορτοκαλί από άλλους.

Κατόπιν, παρουσιάζεται το φυλογενετικό δένδρο εξαιρουμένης της ελληνικής επιδημίας (Σχήμα 16). Με γαλάζιο απεικονίζονται οι ελληνικές αλληλουχίες, με κόκκινο οι κυπριακές, με πορτοκαλί της πρώην Σοβιετικής Ένωσης, με μπλε του Καμερούν, με λαχανί της Κένυα και με γκρι οι εναπομείνουσες αλληλουχίες αναφοράς. Όπως αναφέραμε και προηγουμένως, τα στελέχη από Αλβανία εντοπίστηκαν όλα εντός της ελληνικής επιδημίας και για αυτό το λόγο στο παρακάτω σχήμα δεν απεικονίζεται κανένα στέλεχος από Αλβανία.

Ακολούθως, εκτιμήσαμε την πιθανή προέλευση της λοίμωξης των αλληλουχιών από Κύπρο που εντοπίστηκαν εκτός της ελληνικής επιδημίας. Με κριτήριο ως κάτω όριο το 70% των αλληλουχιών του τοπικού δικτύου να έχουν κοινή γεωγραφική περιοχή δειγματοληψίας, τα αποτελέσματα είχαν ως εξής: Εντοπίσαμε 29 από τα 66 (44%) κυπριακά στελέχη εκτός της ελληνικής επιδημίας. Στα 22 από τα 29 (76%) κυπριακά στελέχη η εύρεση της γεωγραφικής προέλευσης της λοίμωξης κατέστη δυνατό να βρεθεί. Συγκεκριμένα, για 20 (69%) στελέχη η γεωγραφική προέλευση της λοίμωξης ήταν από χώρες της πρώην Σοβιετικής Ένωσης ( $A_{FSU}$  ή A6), για 1 (3.4%) στέλεχος από το Καμερούν και για 1 (3.4%) στέλεχος από την Κένυα (με κριτήριο ως κάτω όριο το 60% των αλληλουχιών του τοπικού δικτύου να έχουν κοινή γεωγραφική περιοχή δειγματοληψίας) (Σχήμα 16).

Επίσης, τα 15 από τα 20 (75%) κυπριακά στελέχη όπου η γεωγραφική προέλευση της λοίμωξης ήταν από χώρες της πρώην Σοβιετικής Ένωσης εντοπίστηκαν σε 5 τοπικά δίκτυα με εύρος από 2 έως 4 αλληλουχίες, τα οποία σε συνδυασμό με τις γεωγραφικές προελεύσεις των στελεχών από Κύπρο, παρουσιάζουμε στον Πίνακα 3. Τέλος, για 13 από τα 20 (65%) από αυτά τα στελέχη ο τρόπος μετάδοσης σχετίζεται με ετεροφυλοφιλική σεξουαλική επαφή (Σχήμα 17) σε αντίθεση με τον τρόπο μετάδοσης των κυπριακών στελεχών που εντοπίστηκαν σε τοπικά δίκτυα εντός της ελληνικής επιδημίας, όπου το 65% των μεταδόσεων σχετιζόνταν με σεξουαλική επαφή μεταξύ ανδρών.

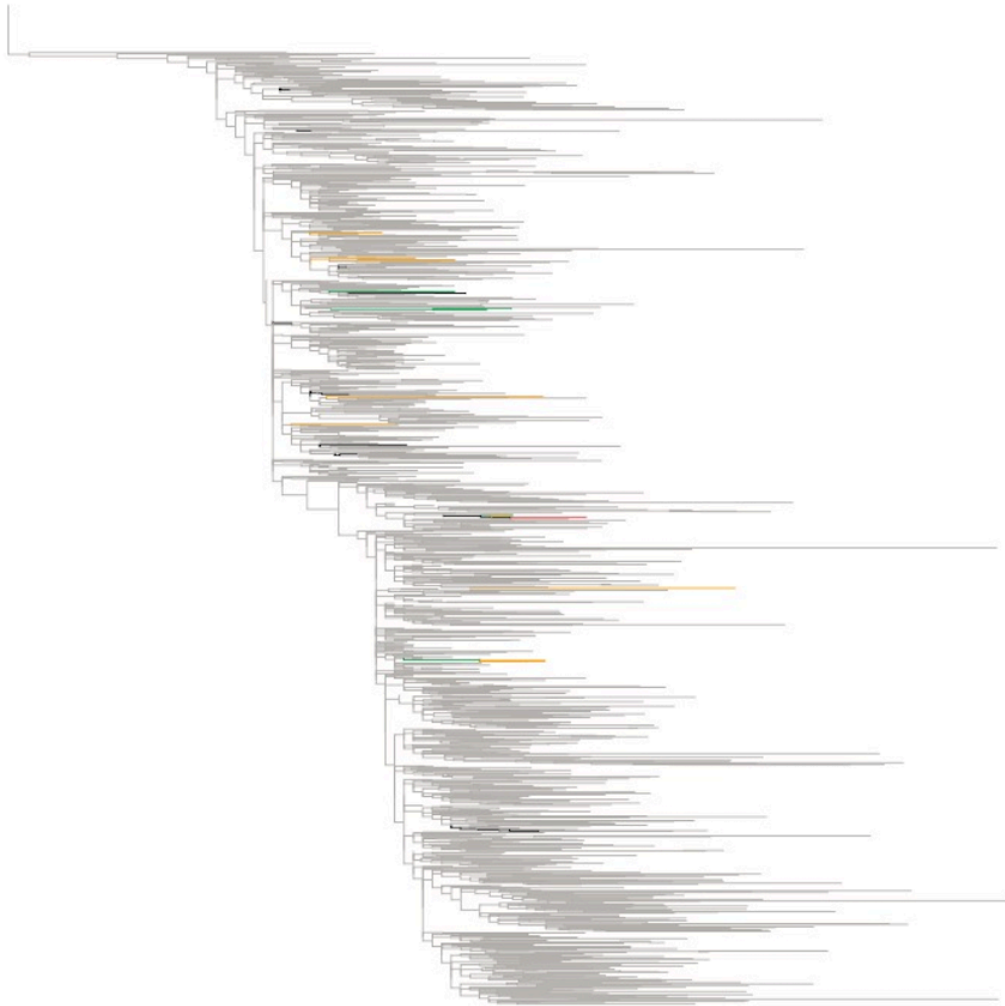




**Σχήμα 16:** Φυλογενετικό δένδρο από το σύνολο των αλληλουχιών HIV υπότυπου A, εξαιρουμένης της ελληνικής επιδημίας. Γαλάζιο: ελληνικές, κόκκινο: κυπριακές, πορτοκαλί: FSU, μπλε: Καμερούν, λαχανί: Κένυα, γκρι: αλληλουχίες αναφοράς.

Accession number	Clusters	Γεωγραφική προέλευση	Accession number	Clusters	Γεωγραφική προέλευση
CY_218	-	Κένυα	CY_57	4	FSU
CY_64	-	-	CY_58	4	FSU
CY_351	-	FSU	CY_264	-	FSU
CY_324	1	FSU	CY_171	5	FSU
CY_325	1	FSU	CY_169	5	FSU
CY_231	1	FSU	CY_108	5	FSU
CY_213	1	FSU	CY_255	-	FSU
CY_173	2	FSU	CY_154	-	-
CY_178	2	FSU	CY_99	-	-
CY_170	2	FSU	CY_98	-	-
CY_318	2	FSU	CY_111	-	-
CY_362	3	FSU	CY_112	-	-
CY_359	3	FSU	CY_185	-	-
CY_293	-	FSU	CY_320	-	Καμερούν
CY_21	-	FSU			

**Πίνακας 3:** Τοπικά δίκτυα μετάδοσης του ιού και γεωγραφική προέλευση της HIV λοίμωξης για τα κυπριακά στελέχη που εντοπίστηκαν εκτός της ελληνικής επιδημίας.



**Σχήμα 17:** Μεταδόσεις από χώρες της πρώην Σοβιετικής Ένωσης σε Κύπρο. Με κόκκινο έχουν επισημανθεί οι μεταδόσεις που σχετίζονται με σεξουαλική επαφή μεταξύ ανδρών (MSM), με πράσινο μεταξύ ετεροφυλόφιλων (HET) και με πορτοκαλί με άλλους τρόπους.



## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ.

Ο HIV χαρακτηρίζεται από εκτενή φυσική γενετική ετερογένεια, η οποία έχει συντελέσει σημαντικά στην παγκόσμια διασπορά της επιδημίας (Wain-Hobson 1993. Ο υπότυπος A ανιχνεύθηκε πρώτη φορά στην Αφρική (Tebit & Arts 2011) και με την πάροδο του χρόνου μεταδόθηκε σε όλη την υφήλιο. Τα τελευταία χρόνια κρούσματα μη-B υποτύπων έχουν εντοπιστεί και στην Ευρώπη, κυρίως ο υπότυπος A ο οποίος εντοπίζεται στην Ανατολική Ευρώπη. Συγκεκριμένα, ο A<sub>FSU</sub> (ή A6) είναι κυρίαρχο στέλεχος στις χώρες της πρώην Σοβιετικής Ένωσης με κύριο τρόπο μετάδοσης τη χρήση ενδοφλέβιων ναρκωτικών (NOVITSKY et al. 1998; Bobkova 2013; Bobkov, Kazennova, Selimova, et al. 2004). Επίσης, η Κύπρος αποτελεί μια από τις λίγες χώρες στη Κεντρική και Δυτική Ευρώπη όπου ο υπότυπος A εντοπίζεται με υψηλό επιπολασμό (Panayiotou et al. 2014). Τοπικές επιδημίες υπότυπου A παρατηρούνται και σε Αλβανία, Ελλάδα και Κύπρο (Panayiotou et al. 2014; Nikolopoulos et al. 2008; Paraskevis et al. 2007; Salemi et al. 2008).

Στην παρούσα μελέτη διαπιστώθηκε πως η επιδημία της Κύπρου αποτελείται από δυο επιμέρους επιδημίες. Περίπου τα μισά διαθέσιμα στελέχη της Κύπρου που μελετήθηκαν βρέθηκε να έχουν ελληνική προέλευση. Ως εκ τούτου η πρώτη επιμέρους επιδημία έχει προέλευση την Ελλάδα και σχετίζεται κυρίως με μετάδοση του ιού μέσω σεξουαλικής επαφής μεταξύ ανδρών (MSM). Για τα υπόλοιπα κυπριακά στελέχη (δεύτερη επιμέρους επιδημία) η γεωγραφική προέλευση της λοίμωξης αφορούσε διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές, γεγονός το οποίο υποδηλώνει ότι ο ιός εισήχθη στην Κύπρο από πολλές περιοχές με τις χώρες της πρώην Σοβιετικής Ένωσης να αποτελούν τις κύριες πηγές. Επίσης, αξίζει να σημειωθεί πως ο τρόπος μετάδοσης της λοίμωξης στους Κυπρίους από τις χώρες της πρώην Σοβιετικής Ένωσης σχετίζεται κυρίως με μεταδόσεις μέσω ετεροφυλικής σεξουαλικής επαφής. Επομένως, οι κύριες περιοχές προέλευσης

της HIV λοίμωξης στην Κύπρο είναι η Ελλάδα και οι χώρες της πρώην Σοβιετικής Ένωσης.

Τα πρότυπα αυτά μπορούν να εξηγηθούν από τις συχνές μετακινήσεις πληθυσμών μεταξύ Ελλάδας και Κύπρου, όπου οι λαοί των χωρών αυτών έχουν κοινή εθνικότητα (πρώτη επιμέρους επιδημία), καθώς επίσης και από το γεγονός ότι η γεωγραφική θέση της Κύπρου μεταξύ τριών ηπείρων την καθιστά δημοφιλή τουριστικό, πολιτιστικό και επαγγελματικό προορισμό για πολλούς διαφορετικούς πληθυσμούς (δεύτερη επιμέρους επιδημία).

Αναφορικά με τον τρόπο διασποράς του ιού στους Κυπρίους, τα αποτελέσματα της μελέτης μας συνάδουν με ευρήματα πρόσφατης μελέτης τα οποία υποδεικνύουν ότι η επιδημία του υπότυπου A στην Κύπρο σχετίζεται με μετάδοση του ιού μέσω σεξουαλικής επαφής μεταξύ ανδρών (MSM) από Ελλάδα και Κύπρο, ενώ σχετίζεται με ετεροφυλική σεξουαλική επαφή μεταξύ ατόμων από Ανατολική Ευρώπη (Pineda-Reña et al. 2018). Επιπρόσθετα, τα ευρήματα μας επιβεβαιώνουν τα ευρήματα προηγούμενων μελετών που υποδεικνύουν την Ελλάδα ως χώρα προέλευσης της λοίμωξης στην Αλβανία (Paraskevis et al. 2007). Τέλος, τα τοπικά δίκτυα μετάδοσης του ιού στην Κύπρο που είχαν βρεθεί και περιγραφεί σε πρόσφατη έρευνα, επαληθεύονται και από την παρούσα μελέτη (Kostrikis et al. 2018).

Ωστόσο, η εκτίμηση της γεωγραφικής προέλευσης της HIV λοίμωξης στους Κύπριους οροθετικούς που έχουν μολυνθεί με στελέχη υπότυπου A διερευνήθηκε για πρώτη φορά. Μέσω της ανάλυσης μας εντοπίστηκε η γεωγραφική προέλευση των κυπριακών επιδημιών που συνέβαλλαν στην παρατήρηση της αύξησης των νέων HIV κρουσμάτων στην Κύπρο την περίοδο 2011-2013. Οι εκτιμήσεις μας συμβάλλουν σημαντικά στην πληρέστερη περιγραφή της HIV επιδημίας στην Κύπρο.

Η παρούσα ανάλυση είναι η πρώτη η οποία πραγματοποιήθηκε στο μεγαλύτερο δυνατό δείγμα αλληλουχιών υπότυπου A από Αλβανία, Ελλάδα και Κύπρο. Ένα πιθανό μειονέκτημα της μελέτης μας είναι ότι για λόγους υπολογιστικής ισχύς δεν χρησιμοποιήθηκαν ως αλληλουχίες αναφοράς όλες οι

διαθέσιμες αλληλουχίες υπότυπου A με παγκόσμια δειγματοληψία. Το πρόβλημα αυτό αντιμετωπίστηκε χρησιμοποιώντας από το σύνολο των αλληλουχιών υπότυπου A που ήταν διαθέσιμες στην HIV Sequence database ένα σημαντικό αριθμό (3.000) τυχαία επιλεγμένων αλληλουχιών καθώς και όλες τις αλληλουχίες με την υψηλότερη γενετική ομοιότητα με τις αλληλουχίες του υπό μελέτη πληθυσμού μας. Τέλος, λόγω του μεγάλου αριθμού αλληλουχιών που αναλύθηκαν στα πλαίσια της μελέτης μας, δεν ήταν εφικτή η αξιολόγηση του φυλογενετικού δένδρου μέσω της μεθόδου bootstrap (Lemoine et al. 2018; Sanderson & Shaffer 2002).





## ΠΕΡΙΛΗΨΗ.

**Εισαγωγή και σκοπός:** Στη Βόρεια Αμερική και τη Δυτική Ευρώπη κυριαρχεί ο υπότυπος Β του ιού της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας τύπου 1 (HIV-1). Τα τελευταία χρόνια έχει παρατηρηθεί αύξηση του επιπολασμού των μη-B υποτύπων στην Ευρώπη. Συγκεκριμένα, η Αλβανία, η Ελλάδα και η Κύπρος αποτελούν λίγες από τις περιοχές στην Ευρώπη όπου ο υπότυπος Α αποτελεί τον κυρίαρχο μη-B υπότυπο και ο υψηλός επιπολασμός του δεν οφείλεται στην επιδημία των χρηστών ενδοφλέβιων ναρκωτικών-ΧΕΝ της Ανατολικής Ευρώπης ή σε μετανάστευση από Αφρική. Σκοπός της μελέτης είναι να διερευνηθεί ο τρόπος διασποράς των στελεχών υπότυπου Α της Κύπρου και να εκτιμηθεί η γεωγραφική προέλευση της HIV λοίμωξης για αυτά τα στελέχη.

**Υλικό και μέθοδοι:** Αναλύθηκαν 66 αλληλουχίες HIV-1 υπότυπου Α διαθέσιμες στο γονίδιο *pol* οι οποίες είχαν απομονωθεί στην Κύπρο το χρονικό διάστημα μεταξύ 2004-2012. Η υποτύπωση των αλληλουχιών πραγματοποιήθηκε με τα εργαλεία υποτύπωσης COMET και REGA. Οι αλληλουχίες από Κύπρο (N=66) αναλύθηκαν φυλογενετικά με αλληλουχίες αναφοράς. Ως αλληλουχίες αναφοράς χρησιμοποιήθηκαν όλες τις διαθέσιμες αλληλουχίες υπότυπου Α από Ελλάδα (N=1.226) και Αλβανία (N=36), ένα τυχαία επιλεγμένο δείγμα αλληλουχιών υπότυπου Α από τη βάση δεδομένων του HIV (N=3.000) και οι πιο όμοιες γενετικά αλληλουχίες με τις αλληλουχίες της Κύπρου οι οποίες εντοπίστηκαν μέσω του αλγόριθμου BLAST (N=92). Ως τοπικά δίκτυα μετάδοσης του ιού ορίστηκαν οι φυλογενετικές ομάδες που απαρτίζονταν τουλάχιστον κατά 70% από στελέχη με κοινή γεωγραφική περιοχή δειγματοληψίας. Ο τρόπος διασποράς του ιού εκτιμήθηκε μέσω φυλογενετικής ανάλυσης η οποία βασίστηκε στη μέθοδο μέγιστης πιθανοφάνειας και πραγματοποιήθηκε στο πρόγραμμα RAxML v8.0.20. Η εκτίμηση της γεωγραφικής προέλευσης της λοίμωξης πραγματοποιήθηκε μέσω φυλογεωγραφικής ανάλυσης η οποία βασίστηκε στη

μέθοδο μέγιστης φειδωλότητας και πραγματοποιήθηκε στο πρόγραμμα Mesquite v3.31.

**Αποτελέσματα:** Η φυλογενετική ανάλυση έδειξε πως εντός της ελληνικής επιδημίας εντοπίστηκαν τα 37 από τα 66 (56%) στελέχη του ιού από την Κύπρο. Το 65% (24/37) των μεταδόσεων σχετίζονταν με σεξουαλική επαφή μεταξύ ανδρών (MSM) και το 35% (13/37) με ετεροφυλοφιλική σεξουαλική επαφή. Επίσης, τα 30 από τα 37 (81%) στελέχη σχημάτισαν 7 επιμέρους τοπικά δίκτυα μετάδοσης του ιού με εύρος από 2 έως 11 αλληλουχίες. Εκτός της ελληνικής επιδημίας εντοπίστηκαν τα υπόλοιπα 29 (44%) στελέχη από Κύπρο. Η φυλογεωγραφική ανάλυση έδειξε ότι η γεωγραφική προέλευση της λοίμωξης για 20 (69%) στελέχη ήταν οι χώρες της πρώην Σοβιετικής Ένωσης (FSU), εκ των οποίων το 65% των μεταδόσεων σχετίζονταν με ετεροφυλοφιλική σεξουαλική επαφή, για 1 (3.5%) στέλεχος η Κένυα και για 1 (3.5%) το Καμερούν. Για τις υπόλοιπες 7 (24%) αλληλουχίες από Κύπρο δε μπόρεσε να εκτιμηθεί η γεωγραφική προέλευση της HIV λοίμωξης.

**Συμπεράσματα:** Η Κύπρος είναι μια από τις λίγες χώρες στη Κεντρική και Δυτική Ευρώπη όπου ο υπότυπος A εντοπίζεται με υψηλό επιπολασμό. Η μελέτη μας έδειξε ότι η επιδημία υπότυπου A στην Κύπρο αποτελείται από δύο επιμέρους επιδημίες. Η πρώτη έχει ελληνική προέλευση και σχετίζεται κυρίως με μετάδοση του ιού μέσω σεξουαλικής επαφής μεταξύ ανδρών (MSM). Η δεύτερη έχει εισαχθεί στην Κύπρο από πολλές διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές, με τις χώρες της πρώην Σοβιετικής Ένωσης να αποτελούν τις κύριες πηγές, και σχετίζεται κυρίως με ετεροφυλοφιλική σεξουαλική επαφή. Τα ευρήματά μας μπορούν να εξηγηθούν από τις συχνές μετακινήσεις πληθυσμών μεταξύ Ελλάδας και Κύπρου, όπου οι λαοί των χωρών αυτών έχουν κοινή εθνικότητα (πρώτη επιμέρους επιδημία), καθώς επίσης και από το γεγονός ότι η γεωγραφική θέση της Κύπρου μεταξύ τριών ηπείρων την καθιστά δημοφιλή τουριστικό, πολιτιστικό και επαγγελματικό προορισμό για πολλούς διαφορετικούς πληθυσμούς (δεύτερη επιμέρους επιδημία).

## SUMMARY.

**Introduction and purpose:** Subtype B of the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) dominates in North America and Western Europe. During the last years has been noticed an increased prevalence of the non-B HIV-1 subtypes in Europe. Specifically, Albania, Greece and Cyprus are among the few European countries that the subtype A is the predominant non-B clade and the high rates of prevalence are not caused by people who inject drugs (PWID) of the Eastern Europe or the African migration. Our aim was to investigate the patterns of dispersal and the origin of subtype-A transmissions in Cyprus by means of phylogeographic analysis.

**Material and methods:** We studied 66 subtype A sequences available in the *pol* gene, isolated from HIV-1 diagnosed patients from Cyprus during 2004-2012. The subtyping of the sequences was carried out by using COMET and REGA subtyping tools. The sequences from Cyprus (N=66) were analyzed phylogenetically with reference sequences. As reference sequences were used all the available sequences of subtype A from Greece (N=1.226) and Albania (N=36), a random set of globally sampled A sequences available on Los Alamos HIV database (N=3.000) and the most closely related sequences to our study population using the BLAST tool (N=92). As local transmission networks (LTNs) were defined the phylogenetic clusters that were composed by at least 70% strains with common geographical origin of sampling. Phylogenetic trees were estimated by the maximum likelihood (ML) method as implemented in RAxML v8.0.20, using the GTR+G mode. The estimation of the geographical origin of the virus was performed by means of phylogeographic analysis that was performed by reconstructing ancestral states using the criterion of parsimony as implemented in Mesquite v3.31.

**Results:** Phylogenetic analysis revealed that 37 of the 66 (56%) Cyprus' virus strains were detected within the Greek LTN. The 65% (24/37) of the transmissions were from individuals reported men having sex with men (MSM) as transmission risk group and the 35% (13/37) from heterosexuals. Additionally, 30 of the 37 (81%) of the strains formed 7 LTNs with a range of 2 to 11 sequences. For 29 (43.9%) sequences from Cyprus we found that they did not cluster within the Greek LTN. Phylogeographic analysis showed that the geographical origin of infections for 20 (69%) individuals from whom sequences didn't belong to the Greek LTN were the Former Soviet Union countries (FSU), for 1 (3.5%) was Kenya and for 1 (3.5%) was Cameroon. Regarding the remaining 7 (24%) sequences from Cyprus it was not possible to estimate the geographical origin of the HIV infection.

**Conclusion:** Cyprus is one of the few countries in central and western Europe where the subtype A is found at high prevalence. Our study showed that the subtype A epidemic in Cyprus is composed from two distinct sub-epidemics. The first one originates from Greece and is mainly associated with Cypriots and MSM risk group. The second has been introduced from different locations with the Former Soviet Union countries to be the dominant source. These patterns can be explained due to the high population mobility between Greece and Cyprus, where their populations share a common ethnicity (first epidemic), and also due to that Cyprus is located the cross-road between three continents, providing an attractive touristic, cultural and business destination for many diverse populations (second epidemic).

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.

- Abecasis, A. et al., 2013. HIV-1 subtype distribution and its demographic determinants in newly diagnosed patients in Europe suggest highly compartmentalized epidemics. *Retrovirology*, 10(7), p.<http://www.retrovirology.com/content/10/1/7>.
- Ansari, A.S. et al., 2011. Patterns of HIV infection among native and refugee Afghans.
- Ayoubā, A. et al., 2013. Evidence for continuing cross-species transmission of SIVsmm to humans: Characterization of a new HIV-2 lineage in rural Côte d'Ivoire. *Aids*, 27(15), pp.2488–2491.
- Ayoubā, A. et al., 2000. HIV-1 group N among HIV-1-seropositive individuals in Cameroon. *AIDS*, 14(16), pp.2623–2625.
- Barin, F. et al., 1985. Serological Evidence for Virus Related To Simian T-Lymphotropic Retrovirus Iii in Residents of West Africa. *The Lancet*, 326(8469–8470), pp.1387–1389.
- Baron S, editor. Medical Microbiology. 4th edition. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston; 1996.
- Barre-Sinoussi, F. et al., 1983. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science*, 220(4599), pp.868–871. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6189183>.
- Beloukas, A. et al., 2016. Molecular epidemiology of HIV-1 infection in Europe: An overview. *Infection, Genetics and Evolution*, 46, pp.180–189. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2016.06.033>.
- Berry, N. et al., 2002. Low level viremia and high CD4% predict normal survival in a cohort of HIV type-2-infected villagers. *Aids Research and Human Retroviruses*, 18(16), pp.1167–1173.
- Bobkov, A.F., Kazennova, E. V., Sukhanova, A.L., et al., 2004. An HIV Type 1

Subtype A Outbreak among Injecting Drug Users in Kazakhstan. *AIDS Research and Human Retroviruses*, 20(10), pp.1134–1136. Available at: <http://www.liebertonline.com/doi/abs/10.1089/aid.2004.20.1134>.

Bobkov, A.F., Kazennova, E. V., Selimova, L.M., et al., 2004. Temporal trends in the HIV-1 epidemic in Russia: Predominance of subtype A. *Journal of Medical Virology*, 74(2), pp.191–196.

Bobkova, M., 2013. Current status of HIV-1 diversity and drug resistance monitoring in the former USSR. *AIDS Reviews*, 15(4), pp.204–212.

Bozicevic, I. et al., 2014. HIV in Albania : An Epidemiological Review. , (September).

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

Ciccozzi, M. et al., 2005. Molecular Diversity of HIV in Albania. *The Journal of Infectious Diseases*, 192(3), pp.475–479. Available at: <https://academic.oup.com/jid/article-lookup/doi/10.1086/431599>.

Clavel, F. et al., 1987. Human immunodeficiency virus type 2 infection associated with AIDS in West Africa. *The New England Journal of Medicine*, 316(19), pp.1180–1185. Available at: <http://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJM198705073161903>.

Coffin JM, Hughes SH, Varmus HE, editors. *Retroviruses*. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1997.

Corbet, S. et al., 2000. env Sequences of Simian Immunodeficiency Viruses from Chimpanzees in Cameroon Are Strongly Related to Those of Human Immunodeficiency Virus Group N from the Same Geographic Area. *Journal of Virology*, 74(1), pp.529–534. Available at: <http://jvi.asm.org/content/74/1/529.long>.

D'arc, M. et al., 2015. Origin of the HIV-1 group O epidemic in western lowland gorillas. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(11), pp.E1343–E1352. Available at:

<http://www.pnas.org/lookup/doi/10.1073/pnas.1502022112>.

Dalgleish, A.G. et al., 1984. The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature*, 312(5996), pp.763–767.

Damond, F. et al., 2004. Identification of a highly divergent HIV type 2 and proposal for a change in HIV type 2 classification. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 20(6), pp.666–672. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15242544>.

Delaugerre, C. et al., 2011. HIV-1 group N: Travelling beyond Cameroon. *The Lancet*, 378(9806), p.1894. Available at: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)61457-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(11)61457-8).

Deng, X. et al., 2008. The epidemic origin and molecular properties of B?: A founder strain of the HIV-1 transmission in Asia. *AIDS*, 22(14), pp.1851–1858.

Edgar, R.C., 2004. MUSCLE: A multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. *BMC Bioinformatics*, 5, pp.1–19.

European Centre for Disease Prevention and Control, W.R.O. for E., [hiv-cyprus-2014.pdf](#).

European Centre for Disease Prevention and Control, W.R.O. for E., 2017. *HIV/AIDS surveillance in Europe 2017*, Available at: <https://ecdc.europa.eu/en/publications-data/hiv-aids-surveillance-europe-2017>.

Faria, N.R. et al., 2014. HIV epidemiology. The early spread and epidemic ignition of HIV-1 in human populations. *Science (New York, N.Y.)*, 346(6205), pp.56–61. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25278604> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4254776>.

Faria, N.R. et al., 2012. Phylogeographical footprint of colonial history in the global dispersal of human immunodeficiency virus type 2 group A. *Journal of General Virology*, 93(4), pp.889–899.

- Flint, S. et al., 2015. *Principles of virology*,
- Friedman-Kien, A.E., 1981. Disseminated Kaposi's sarcoma syndrome in young homosexual men. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 5(4), pp.468–471.
- Gao F, Yue L, W.A. et al., 1992. Human infection by genetically diverse SIVSM-related HIV-2 in west Africa. *Nature*, 356, pp.133–135.
- Gao, F. et al., 1999. Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes* troglodytes. *Nature*, 397(6718), pp.436–441.
- Gottlieb, G.S. et al., 2006. Lower levels of HIV RNA in semen in HIV-2 compared with HIV-1 infection: Implications for differences in transmission. *Aids*, 20(6), pp.895–900.
- Hahn, B.H. et al., 2000. AIDS as a Zoonosis: Scientific and Public Health Implications. *Science*, 287(5453), p.607 LP-614. Available at: <http://science.sciencemag.org/content/287/5453/607.abstract>.
- Hawes, S.E. et al., 2008. Lower levels of HIV-2 than HIV-1 in the female genital tract: correlates and longitudinal assessment of viral shedding. *Aids*, 22(18), pp.2517–2525.
- Hemelaar, J., 2013. Implications of HIV diversity for the HIV-1 pandemic. *Journal of Infection*, 66(5), pp.391–400. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.j.molmed.2011.12.001>.
- Van Heuverswyn, F. et al., 2006. Human immunodeficiency viruses: SIV infection in wild gorillas. *Nature*, 444(7116), p.164. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17093443>.
- Hirsch, V.M. et al., 1989. An African primate lentivirus (SIVsm) closely related to HIV-2. *Nature*, 339, p.389. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/339389a0>.
- Ho, D.D. et al., 1995. Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature*, 373(6510), pp.123–126.



<https://www.hiv.lanl.gov,2017>. HIV-1 gene map. Available at: <https://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/MAP/landmark.html>. [Accessed January 18, 2018].

<https://www.hiv.lanl.gov,2017>. HIV and SIV Nomenclature. Available at: <https://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HelpDocs/subtypes-more.html>.

[Accessed January 18, 2018].

<https://www.statista.com>. Available at:

<https://www.statista.com/statistics/645552/new-hiv-cases-diagnosed-cyprus/>

[Accessed January 18, 2018].

Ibe, S. et al., 2010. HIV-2 CRF01 \_ AB : First Circulating Recombinant Form of HIV-2. , 54(3), pp.241–247.

Keele, B.F. et al., 2006. Chimpanzee reservoirs of pandemic and nonpandemic HIV-1. *Science*, 313(5786), pp.523–526.

Khan, S. et al., 2006. HIV-1 subtype A infection in a community of intravenous drug users in Pakistan. *BMC Infectious Diseases*, 6, pp.1–6.

Klatzmann, D. et al., 1984. T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV. *Nature*, 312(5996), pp.767–768.

Korber, B. et al., 2000. Timing the Ancestor of the HIV-1 Pandemic Strains. *Science*, 288(5472), p.1789 LP-1796. Available at: <http://science.sciencemag.org/content/288/5472/1789.abstract>.

Kostrikis, L.G. et al., 2018. HIV-1 transmission networks across cyprus (2010-2012). *PLoS ONE*, 13(4).

Koulinska, I.N. et al., 2002. Common Genetic Arrangements among Human Immunodeficiency Virus Type 1 Subtype A and D Recombinant Genomes Vertically Transmitted in Tanzania. *AIDS Research and Human Retroviruses*, 18(13), pp.947–956. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12230937>.

- Kousiappa, I. et al., 2009. Genetic analysis of HIV type 1 strains from newly infected untreated patients in cyprus: high genetic diversity and low prevalence of drug resistance. *AIDS research and human retroviruses*, 25(1), pp.23–35.
- Kousiappa, I. et al., 2011. Molecular Characterization of HIV Type 1 Strains from Newly Diagnosed Patients in Cyprus (2007–2009) Recovers Multiple Clades Including Unique Recombinant Strains and Lack of Transmitted Drug Resistance. *AIDS Research and Human Retroviruses*, 27(11), pp.1183–1199. Available at:  
<http://www.liebertonline.com/doi/abs/10.1089/aid.2011.0060>.
- Kumar, S., 2005. Molecular clocks: four decades of evolution. *Nature Reviews Genetics*, 6, p.654. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nrg1659>.
- Lazouskaya, N. V et al., 2005. The HIV type 1 epidemic in Belarus: Predominance of eastern European subtype A strains and circulation of subtype B viruses. *AIDS Research and Human Retroviruses*, 21(9), pp.830–833. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-26444507995&partnerID=40&md5=409df981c1fe61f148742f6928fa6e0c>.
- Lemoine, F. et al., 2018. Renewing Felsenstein’s phylogenetic bootstrap in the era of big data. *Nature*, 556(7702), pp.452–456. Available at:  
<https://doi.org/10.1038/s41586-018-0043-0>.
- Lukashov, V. V. et al., 1999. Circulation of Subtype A and gagA/envB Recombinant HIV Type 1 Strains among Injecting Drug Users in St. Petersburg, Russia, Correlates with Geographical Origin of Infections. *AIDS Research and Human Retroviruses*, 15(17), pp.1577–1583. Available at:  
<http://www.liebertonline.com/doi/abs/10.1089/088922299309874>.
- Lukashov, V. V et al., 1995. Simultaneous introduction of distinct HIV-1 subtypes into different risk groups in Russia, Byelorussia and Lithuania. *Aids*, 9(5), pp.435–439.
- Maddison, W.P. and D.R. Maddison. 2017. Mesquite: a modular system for evo-

lutionary analysis. Version 3.31 <http://mesquiteproject.org>.

Mansky, L.M. & Temin, H.M., 1995. Lower in vivo mutation rate of human immunodeficiency virus type 1 than that predicted from the fidelity of purified reverse transcriptase. *Journal of virology*, 69(8), pp.5087–94. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=189326&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>.

Nabatov, A.A. et al., 2002. Simultaneous Introduction of HIV Type 1 Subtype A and B Viruses into Injecting Drug Users in Southern Ukraine at the Beginning of the Epidemic in the Former Soviet Union. *AIDS Research and Human Retroviruses*, 18(12), pp.891–895. Available at: <http://www.liebertonline.com/doi/abs/10.1089/08892220260190380>.

Nikolopoulos, G., Paraskevis, D. & Hatzakis, a, 2008. HIV epidemiology in Greece. *Future microbiology*, 3(NOVEMBER 2008), pp.507–516.

NOVITSKY, V.A., MONTANO, M.A. & ESSEX, M., 1998. Molecular Epidemiology of an HIV-1 Subtype A Subcluster among Injection Drug Users in the Southern Ukraine. *AIDS Research and Human Retroviruses*, 14(12), pp.1079–1085. Available at: <http://www.liebertonline.com/doi/abs/10.1089/aid.1998.14.1079>.

Panayiotou, C. et al., 2014. Molecular epidemiology of influenza A virus infection in Cyprus in four consecutive seasons (2009 pandemic-2013). *Epidemiology and Infection*, 142(5), pp.975–983.

Paraskevis, D. et al., 2007. Increasing Prevalence of HIV-1 Subtype A in Greece: Estimating Epidemic History and Origin. *The Journal of Infectious Diseases*, 196(8), pp.1167–1176. Available at: <https://academic.oup.com/jid/article-lookup/doi/10.1086/521677>.

Paraskevis, D. et al., 2009. Tracing the HIV-1 subtype B mobility in Europe: A phylogeographic approach. *Retrovirology*, 6, pp.1–11.

Paul M. Sharp and Beatrice H. Hahn, 2011. Origins of HIV and the AIDS Pandemic. *Cold Spring Harbor Perspectives In Medicine*, 1(a006841), pp.1–

23. Available at: <http://perspectivesinmedicine.cshlp.org>.
- Peeters, M. et al., 1997. Geographical distribution of HIV-1 group O viruses in Africa. *AIDS*, 11(4), pp.493–498.
- Pineda-Peña, A.C. et al., 2018. HIV-1 Infection in Cyprus, the Eastern Mediterranean European Frontier: A Densely Sampled Transmission Dynamics Analysis from 1986 to 2012. *Scientific Reports*, 8(1), pp.1–14.
- Plantier, J.-C. et al., 2009. A new human immunodeficiency virus derived from gorillas. *Nature Medicine*, 15(8), pp.871–872. Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nm.2016>.
- Popper, S.J. et al., 2000. Low plasma human immunodeficiency virus type 2 viral load is independent of proviral load: low virus production in vivo. *Journal of virology*, 74(3), pp.1554–7.
- Preston, B.D. & Dougherty, J.P., 1996. Mechanisms of retroviral mutation. *Trends in Microbiology*, 4(1), pp.16–21.
- Preston, B.D., Poiesz, B.J. & Loeb, L.A., 1988. Fidelity of HIV-1 reverse transcriptase. *Science*, 242(4882), pp.1168–1171. Available at: <http://www.sciencemag.org/content/242/4882/1168.abstract>.
- Rambaut, A. et al., 2004. The causes and consequences of HIV evolution. *Nature Reviews Genetics*, 5(1), pp.52–61.
- Ratner, L. et al., 1985. Complete nucleotide sequence of the AIDS virus, HTLV-III. *Nature*, 313(6000), pp.277–84. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2578615>.
- Roberts, J.D., Bebenek, K. & Kunkel, T.A., 1988. The accuracy of reverse transcriptase from HIV-1. *Science (New York, N.Y.)*, 242(4882), pp.1171–3. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2460925>.
- Robertson, D.L., 2000. HIV-1 Nomenclature Proposal. *Science*, 288(5463), p.55d–55. Available at: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.288.5463.55d>.

- Rousseau, C.M. et al., 2007. Extensive intrasubtype recombination in South African human immunodeficiency virus type 1 subtype C infections. *Journal of virology*, 81(9), pp.4492–4500.
- Saad, M.D. et al., 2006. Molecular epidemiology of HIV type 1 in Ukraine: Birthplace of an epidemic. *AIDS Research and Human Retroviruses*, 22(8), pp.709–714. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-33748743293&partnerID=40&md5=530d82b0587dfe92f41168513c758e24>.
- Salemi, M., 2000. Dating the common ancestor of SIVcpz and HIV-1 group M and the origin of HIV-1 subtypes by using a new method to uncover clock-like molecular evolution. *The FASEB Journal*, 15(2), pp.276–278. Available at: <http://www.fasebj.org/cgi/doi/10.1096/fj.00-0449fje>.
- Salemi, M. et al., 2008. High-resolution molecular epidemiology and evolutionary history of HIV-1 subtypes in Albania. *PLoS ONE*, 3(1).
- Sanderson, M.J. & Shaffer, H.B., 2002. Troubleshooting Molecular Phylogenetic Analyses. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 33(1), pp.49–72.
- Sauter, D. et al., 2011. HIV-1 Group P is unable to antagonize human tetherin by Vpu, Env or Nef. *Retrovirology*, 8(1), p.103. Available at: <http://www.retrovirology.com/content/8/1/103>.
- de Silva, T.I., Cotten, M. & Rowland-Jones, S.L., 2008. HIV-2: the forgotten AIDS virus. *Trends in Microbiology*, 16(12), pp.588–595.
- Simon, F. et al., 1998. Identification of a new human immunodeficiency virus type 1 distinct from group M and group O. *Nature medicine*, 4(9), pp.1032–7. Available at: [http://www.nature.com/nm/journal/v4/n9/abs/nm0998\\_1032.html%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9734396](http://www.nature.com/nm/journal/v4/n9/abs/nm0998_1032.html%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9734396).
- Stamatakis, A., 2006. RAxML-VI-HPC: Maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics*, 22(21), pp.2688–2690.

- Takehisa, J. et al., 2009. Origin and Biology of Simian Immunodeficiency Virus in Wild-Living Western Gorillas. *Journal of Virology*, 83(4), pp.1635–1648. Available at: <http://jvi.asm.org/cgi/doi/10.1128/JVI.02311-08>.
- Tamura, K. et al., 2011. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28(10), pp.2731–2739.
- Tebit, D.M. & Arts, E.J., 2011. Tracking a century of global expansion and evolution of HIV to drive understanding and to combat disease. *The Lancet Infectious Diseases*, 11(1), pp.45–56. Available at: [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(10\)70186-9](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(10)70186-9).
- Van Tienen, C. et al., 2010. Two distinct epidemics: The rise of HIV-1 and decline of HIV-2 infection between 1990 and 2007 in rural guinea-bissau. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*, 53(5), pp.640–647.
- UNAIDS, 2017. Fact sheet - Latest global and regional statistics on the status of the AIDS epidemic. 2016, (June), p.8. Available at: [http://www.unaids.org/sites/default/files/media\\_asset/UNAIDS\\_FactSheet\\_en.pdf](http://www.unaids.org/sites/default/files/media_asset/UNAIDS_FactSheet_en.pdf).
- Vallari, A. et al., 2011. Confirmation of Putative HIV-1 Group P in Cameroon. *Journal of Virology*, 85(3), pp.1403–1407. Available at: <http://jvi.asm.org/cgi/doi/10.1128/JVI.02005-10>.
- Wain-Hobson, S., 1993. The fastest genome evolution ever described: HIV variation in situ. *Current Opinion in Genetics and Development*, 3(6), pp.878–883.
- Wei, X. et al., 1995. Viral dynamics in human immunodeficiency virus type 1 infection. *Nature*, 373(6510), pp.117–22. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7529365>.
- Wertheim, J.O. & Worobey, M., 2009. Dating the age of the SIV lineages that gave rise to HIV-1 and HIV-2. *PLoS Computational Biology*, 5(5).
- Worobey, M. et al., 2008. Direct evidence of extensive diversity of HIV-1 in

Kinshasa by 1960. *Nature*, 455(7213), pp.661–664.

Yusim, K. et al., 2001. Using human immunodeficiency virus type 1 sequences to infer historical features of the acquired immune deficiency syndrome epidemic and human immunodeficiency virus evolution. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 356(1410), pp.855–866. Available at:  
<http://rstb.royalsocietypublishing.org/cgi/doi/10.1098/rstb.2001.0859>.

ΚΕ.ΕΛ.Π.ΝΟ., 2017. Επιδημιολογική Επιτήρηση Της Hiv/Aids Λοίμωξης Στην Ελλάδα Δηλωθέντα Στοιχεία Έως 31.12.2017. *Επιδημιολογική Επιτήρηση Της Hiv/Aids Λοίμωξης Στην Ελλάδα*, (32).