

ივანე ჯავახიშვილის სახელობის თბილისის სახელმწიფო უნივერსიტეტი
მედიცინის ფაკულტეტი

ნათია დვალი

ადამიანის იმუნოდეფიციტის ვირუსის გენეტიკური ტიპების და რეზისტენტული
შტამების გავრცელება საქართველოში

მედიცინის დოქტორის აკადემიური ხარისხის მოსაპოვებლად
წარმოდგენილი დისერტაცია

სამეცნიერო ხელმძღვანელები: თენგიზ ცერცვაძე, ივანე ჯავახიშვილის სახელობის
თბილისის სახელმწიფო უნივერსიტეტის მედიცინის
ფაკულტეტის ინფექციური დაავადებების და
კლინიკური იმუნოლოგიის დეპარტამენტის
სრული პროფესორი

ლალი შარვაძე, ივანე ჯავახიშვილის სახელობის
თბილისის სახელმწიფო უნივერსიტეტის მედიცინის
ფაკულტეტის ინფექციური დაავადებების და
კლინიკური იმუნოლოგიის დეპარტამენტის
ასოცირებული პროფესორი



თბილისი, 2015

შინაარსი

შესავალი.....	4
თემის აქტუალობა	4
მიზანი	6
ძირითადი ამოცანები.....	6
სამეცნიერო სიახლე და პრაქტიკული ღირებულება.....	6
გამოქვეყნებული შრომები	8
ლიტერატურის მიმოხილვა	8
აივ-ის სტრუქტურა და სასიცოცხლო ციკლი.....	9
აივ-ის გენეტიკური მრავალფეროვნება ერთი მასპინძლის დონეზე	12
აივ-ის რეკომბინაცია და გენეტიკური მრავალფეროვნება პოპულაციურ დონეზე	14
აივ-ის სუბტიპების და რეკომბინანტული ფორმების გავრცელება მსოფლიოში.....	17
აივ/შიდსი მსოფლიოში	18
აივ/შიდსი საქართველოში	19
ანტირეტროვირუსული (არვ) მკურნალობა.....	21
აივ-ის რეზისტენტობა ანტირეტროვირუსული პრეპარატების მიმართ	24
მასალა და მეთოდები.....	27
საკვლევი პოპულაცია	27
აივ-1-ის გენოტიპირება	28
სინჯების მომზადება გენოტიპირებისათვის	28
ვირისული რნმ-ის ექსტრაქცია.....	28
აივ-1-ის გენოტიპირება TruGene HIV-1 Genotyping Kit - ის გამოყენებით OpenGene DNA Sequencing სისტემაზე	29
აივ-1-ის გენოტიპირება ViroSeq HIV-1 Genotyping System v2.0 - ის გამოყენებით კაპილარულ სექვენატორ ABI xL3500 -ზე	37
ხარისხის კონტროლი.....	47
აივ -1 -ის სუბტიპის პირველადი შეფასება.....	47
ფილოგენეტიკური ანალიზი	50
სტატისტიკური ანალიზი.....	52
ეთიკური კომისიის ნებართვა	53
კვლევის შედეგები.....	53
მასალის დახასიათება.....	53
აივ-1-ის მოლეკულური ეპიდემიოლოგია საქართველოში	55

აივ-1-ის "გადაცემის კლასტერების" დახასიათება (ფილოგენეტიკური ანალიზი)	59
პირველადი/გადაცემული რეზისტენტობის გავრცელება საქართველოში	65
აივ-1-ის რეზისტენტობის პროფილის დახასიათება	65
განხილვა	68
დასკვნები და პრაქტიკული რეკომენდაციები	73
დასკვნა 1.....	73
დასკვნა 2.....	73
დასკვნა 3.....	74
დასკვნა 4.....	74
გამოყენებული ლიტერატურა	76
დანართი 1. ინგლისური რეზიუმე	91
დანართი 2. გამოქვეყნებული შრომები	100

შესავალი

თემის აქტუალობა

აივ/შიდსი საზოგადოებრივი ჯანდაცვის გლობალური პრობლემაა. გაერთიანებული ერების აივ/შიდსის ერთობლივი პროგრამის (UNAIDS) მონაცემებით 2013 წელს მსოფლიოში ადამიანის იმუნოდეფიციტის ვირუსით (აივ) ინფიცირებული იყო 35 მილიონი ადამიანი. 2013 წელს მსოფლიოში სულ დაინფიცირდა 2.1 მილიონი ადამიანი. (UNAIDS, 2014) ჯანმრთელობის მსოფლიო ორგანიზაციის (WHO) მონაცემებით სიკვდილობის წამყვან მიზეზებს შორის აივ/შიდსი მე-6 ადგილზეა მსოფლიოში, ხოლო დაბალი შემოსავლების ქვეყნებში ის სიკვდილის მეორე წამყვანი მიზეზია. (World Health Organization, 2014.) 2014 წლის 31 დეკემბრის მდგომარეობით საქართველოში რეგისტრირებულია აივ/შიდსის 4 697 შემთხვევა.

ანტირეტროვირუსული (არვ) პრეპარატების გამოყენებამ მნიშვნელოვნად შეამცირა აივ/შიდსთან დაკავშირებული ავადობა და სიკვდილობა და გაზარდა სიცოცხლის ხანგრძლივობა. (Hammer et al., 1997; Mocroft et al., 2003; Palella et al., 1998; Sterne et al., 2005) მკურნალობის ეფექტურობაზე შეიძლება ნეგატიური გავლენა იქონიოს აივ-ის რეზისტენტობამ ანტირეტროვირუსული პრეპარატების მიმართ, რაც მკურნალობის უეფექტობის საკმაოდ ხშირი მიზეზია. (Bannister et al., 2011; Cozzi-Lepri et al., 2012; D'Aquila et al., 1995; Gupta, Hill, Sawyer, & Pillay, 2008; Japour et al., 1995; Kozal, Shafer, Winters, Katzenstein, & Merigan, 1993; Mtambo et al., 2012; von Wyl et al., 2009) წამლების მიმართ რეზისტენტობა შეიძლება განვითარდეს მკურნალობის დროს, ან პაციენტი შეიძლება დაინფიცირდეს რეზისტენტული ვირუსით. (Hogg et al., 2006; Palella et al., 2009; Tang & Shafer, 2012) მკურნალობის უეფექტობა ანტირეტროვირუსული პრეპარატების მიმართ აივ-ის რეზისტენტობის გამო პრობლემას წარმოადგენს საქართველოში, რომელმაც ისევე როგორც მთელს მსოფლიოში თავი იჩინა ანტირეტროვირუსული პრეპარატების ხელმისაწვდომობის ზრდასთან ერთად. (Pillay et al., 2005; Richman et al., 2004; Tamalet, Fantini, Tourres, & Yahi, 2003)

წამლების მიმართ რეზისტენტობის სურათი - რეზისტენტობის პროფილი - შეიძლება განსხვავებული იყოს აივ-ის სხვადასხვა სუბტიპისათვის, რაც

გათვალისწინებული უნდა იქნას არც მკურნალობის სწორი რეჟიმის შერჩევისათვის. (Brenner et al., 2003; Grossman et al., 2004; Palma et al., 2012; Tang & Shafer, 2012)

აივ-ის ანტირეტროვირუსული პრეპარატების მიმართ რეზისტენტობის კვლევების უმრავლესობა ეხება ვირუსის B სუბტიპს. განვითარებადი ქვეყნების უმრავლესობაში კი დომინირებს ვირუსის სხვა, ე.წ. არა-B სუბტიპები და ამ ქვეყნებში ანტირეტროვირუსული პრეპარატები ხდება ფართოდ ხელმისაწვდომი. აივ-ის სუბტიპების გავრცელება საქართველოში არ არის ფართოდ შესწავლილი. ამერიკელ კოლეგებთან ერთად ინფექციური პათოლოგიის, შიდსისა და კლინიკური იმუნოლოგიის სამეცნიერო - პრაქტიკული ცენტრის მიერ 1998 -2003 წლებში ჩატარებულმა მცირე მასშტაბიანმა კვლევამ აჩვენა, რომ საქართველოში ყველაზე გავრცელებულია აივ-1-ის სუბტიპი A (70%), რომლის გარდა ქვეყანაში ასევე ცირკულირებს სუბტიპები B, C, CRF18_cpx. (Zarandia et al., 2006) ამ კვლევამ ასევე აჩვენა პირველადი რეზისტენტობის 4%-იანი მაჩვენებელი. თუმცა აღსანიშნავია, რომ კვლევაში ჩართული იყო მხოლოდ 48 აივ/შიდსით ავადმყოფი, რაც რა თქმა უნდა ვერ იძლევა სიტუაციის სრულყოფილ სურათს. გარდა ამისა, კვლევის ჩატარების შემდგომ ქვეყანაში მნიშვნელოვანი ცვლილებები მოხდა, როგორც ეპიდემიის განვითარების, ისე საპასუხო ღონისძიებების გაძლიერების კუთხით. ასე მაგალითად, 2003 წელთან შედარებით მნიშვნელოვნად იმატა სქესობრივი გზით ინფიცირების შემთხვევებმა, ხოლო ნარკოტიკების ინიექციური მოხმარებით ინფიცირების შემთხვევების ხვედრითი წილი ყოველწლიურად კლებულობს. ამ ცვლილებას შესაძლოა ზეგავლენა მოეხდინა ქვეყანაში მოცირკულირე აივ სუბტიპების განაწილებაზე.

2004 წლიდან საქართველომ პირველმა და ჯერ-ჯერობით ერთადერთმა აღმოსავლეთ ევროპის რეგიონში უზრუნველყო არც მკურნალობაზე უნივერსალური ხელმისაწვდომობა. ამას უდიდეს მნიშვნელობა აქვს აივ რეზისტენტობის გავრცელების კუთხით, როგორც ნამკურნალებ, ისე არანამკურნალებ პოპულაციებში. დასაბუთებულია, რომ აივ რეზისტენტობის გავრცელების მთავარი მიზეზი სწორედ არც მკურნალობის დროს აღმოცენებული რეზისტენტობაა. (Blower, Aschenbach, Gershengorn, & Kahn, 2001)

ამ გარემოებების გათვალისწინებით გამოიკვეთა საქართველოში აივ-ის მოლეკულური ეპიდემიოლოგიის და რეზისტენტული შტამების გავრცელების შესწავლის საჭიროება.

მიზანი

ადამიანის იმუნოდეფიციტის ვირუსის (აივ-1) გენეტიკური ტიპების და რეზისტენტული შტამების გავრცელების შესწავლა საქართველოში.

ძირითადი ამოცანები

1. აივ-1-ის მოლეკულური ეპიდემიოლოგიის შესწავლა საქართველოში და ტენდენციების შეფასება 2006-2013 წწ. პერიოდში
2. აივ-1-ის "გადაცემის კლასტერების" ფილოგენეტიკური ანალიზი
3. აივ-1-ის პირველადი/გადაცემული რეზისტენტობის შესწავლა ანტირეტროვირუსული პრეპარატებით არანამკურნალებ პაციენტებში და ტენდენციების შეფასება 2006-2013 წწ. პერიოდში
4. საქართველოსთვის დამახასიათებელი აივ-1-ის რეზისტენტობის პროფილის აღწერა ანტირეტროვირუსული პრეპარატებით მკურნალობაზე მყოფ პაციენტებში (2005-2013 წწ)

სამეცნიერო სიახლე და პრაქტიკული ღირებულება

ჩვენს მიერ ჩატარებულ კვლევაში შესწავლილ იქნა საქართველოში მოცირკულირე აივ-1-ის შტამების გენეტიკური თავისებურებები, მათ შორის არც მედიკამენტებისადმი რეზისტენტობის განვითარებასა და გავრცელებასთან დაკავშირებული საკითხები. კვლევამ მოიცვა 2005-2013 წწ. პერიოდი და 411 აივ/შიდსით ავადმყოფი. წარმოდგენილი კვლევის ფარგლებში:

1. შეფასებულ იქნა აივ-1-ის გენეტიკური ტიპების გავრცელება საქართველოში და ტენდენცია დროთა განმავლობაში. განისაზღვრა ქვეყანაში მოცირკულირე დომინანტური შტამები, როგორც მთლიანი აივ-1 პოპულაციის დონეზე, ისე ცალკეული რისკის ჯგუფების მიხედვით.
2. პირველად აღმოსავლეთ ევროპის რეგიონში განხორციელდა ე.წ. „გადაცემის კლასტერების“ ფილოგენეტიკური ანალიზი, რომლის ფარგლებში შეფასებულ იქნა სხვადასხვა რისკის ჯგუფების პირებიდან მოპოვებულ ვირუსის შტამებს შორის არსებული გენეტიკური კავშირები. შესაბამისად, განისაზღვრა აივ-1-ის გადაცემის დინამიკა სხვადასხვა ჯგუფებში და შემუშავდა რეკომენდაციები საპასუხო ღონისძიებების გასატარებლად.
3. შეფასებულ იქნა არანაკურნალებ პაციენტებში პირველადი/გადაცემული რეზისტენტობის გავრცელება და განისაზღვრა აივ/შიდსის მკურნალობისა და მოვლის ეროვნული პროგრამის ეფექტურობა აივ-1 რეზისტენტობის აღმოცენებისა და შემდგომი გავრცელების პრევენციის კუთხით.
4. პირველად მსოფლიოში აღწერილ იქნა აღმოსავლეთ ევროპის რეგიონსა და საქართველოში მოცირკულირე აივ-1-ის A სუბტიპისათვის დამახასიათებელი სპეციფიური რეზისტენტობის პროფილი, რომელიც არსებული მონაცემებით მხოლოდ ამ სუბტიპისთვის არის დამახასიათებელი. ეს ძალიან მნიშვნელოვანია არც მკურნალობის ოპტიმალური მიდგომების განსაზღვრისათვის იმ გეორგაფიულ არეალებში, სადაც აღნიშნული სუბტიპია გავრცელებული.

მიღებული შედეგების საფუძველზე შემუშავდა კონკრეტული რეკომენდაციები, რომელთა განხორციელება მნიშვნელოვანია როგორც კლინიკური, ისე საზოგადოებრივი ჯანმრთელობის კუთხით.

წარმოდგენილი კვლევა მნიშვნელოვანია არა მხოლოდ ადგილობრივი, არამედ საერთაშორისო მასშტაბით. ჩვენი კვლევის შედეგები მნიშვნელოვანი დამატებაა

მსოფლიო გამოცდილებაზე და შეიძლება გათვალისწინებული იქნას ჯანმრთელობის მსოფლიო ორგანიზაციისა (WHO) და შიდსის საერთაშორისო ასოციაციის (IAS) მიერ აივ-ის მუტაციების ახალი სიების შედგენისა და რეზისტენტობის ტესტირების და აივ/შიდსის მკურნალობის ახალი გაიდლაინების შემუშავების დროს. კვლევაში გამოყენებული სინჯების დეზოქსირიბონუკლეინის მჟავის (დნმ) სექვენსები შეტანილია აშშ ჯანდაცვის ნაციონალური ინსტიტუტების (NIH) გენეტიკური მასალის მონაცემთა ბაზაში „GeneBank“-ში და ხელმისაწვდომია მეცნიერებისათვის მსფლიოს მასშტაბით გლობალური მოდგომარეობისა და ტენდენციების შეფასებისათვის.

გამოქვეყნებული შრომები

Characterization of HIV-1 subtypes and drug resistance mutations among individuals infected with HIV in Georgia. **Dvali N.**, Parker M.M., Chkhartishvili N., **Sharvadze L.**, Gochitashvili N., Abutidze A., Karchava M., DeHovitz J.A., **Tsertsvadze T.** J Med Virol. 2012 Jul;84(7):1002-8. doi: 10.1002/jmv.23269.

Distinct drug resistance profile of HIV-1 subtype A strain circulating in Georgia. **Dvali N.**, Chkhartishvili N., Karchava M., **Sharvadze L.**, **Tsertsvadze T.** Georgian Med News. 2015 Mar;(240):19-24.

Molecular tracing of heterosexual HIV-1 transmission in Georgia. **Dvali, N.**, Chkhartishvili, N., **Sharvadze, L.**, Karchava, M., **Tsertsvadze, T.** Georgian Med News. 2015 Sep; (246):54-59.

გამოსაქვეყნებლად წარდგენილი შრომები

Molecular epidemiology of HIV-1 in the country of Georgia: Identifying transmission clusters among newly diagnosed patients. **Dvali N.**, Chkhartishvili N., Karchava M., **Sharvadze L.**, Parker M.M., DeHovitz J.A., Nelson K., **Tsertsvadze T.**

ლიტერატურის მიმოხილვა

შემქნილი იმუნოდეფიციტის სინდრომის (შიდსი) გამომწვევი ადამიანის იმუნოდეფიციტის ვირუსი (აივ) არის ლენტოვირუსი რეტროვირუსების ოჯახიდან (ბალტიმორის კლასიფიკაცია VI) (Baltimore, 1971; Douek, Roederer, & Koup, 2009; Jetzt et al., 2000; Weiss, 1993). ლენტოვირუსულ ინფექციას ჩვეულებრივ ახასიათებს დაავადების

ქრონიკული მიმდინარეობა, ხანგრძლივი ლატენტური პერიოდი და ვირუსის პერსისტენტული რეპლიკაცია. ვირუსი ადამიანის ორგანიზმში შეჭრის შემდეგ აზიანებს ორგანიზმის იმუნურ სისტემას, რის შედეგადაც ინფიცირებულ პირს ადვილად უჩნდება სხვადასხვა ინფექციური და/ან სიმსივნური დაავადება (თ. ცერცვაძე, 1999).

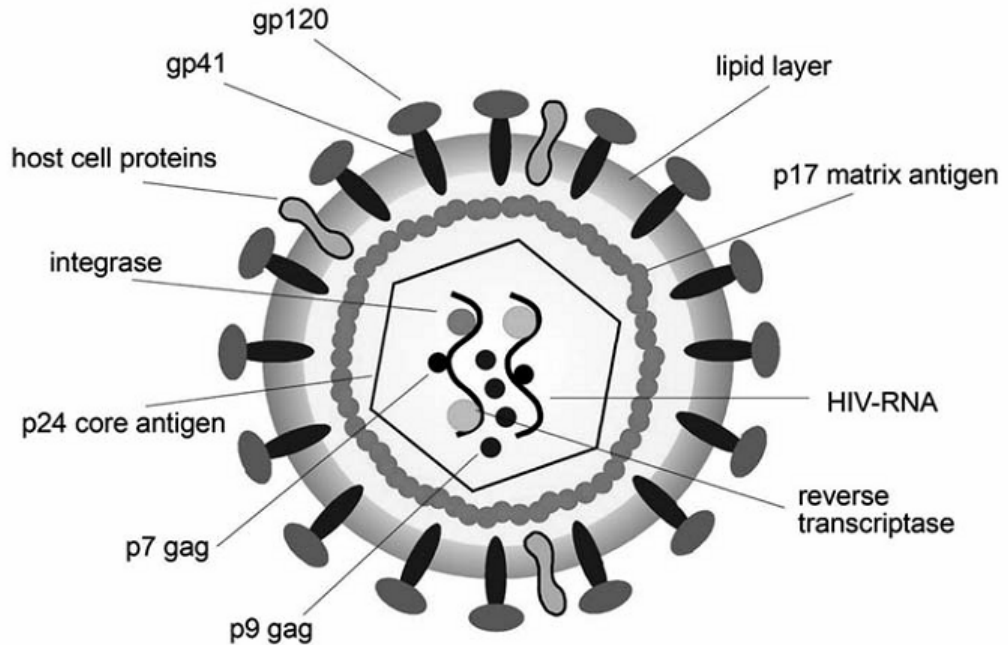
არსებობს აივ-ის ორი ტიპი: აივ-1 და აივ-2. აივ-1 უფრო გავრცელებულია გლობალურად ვიდრე აივ-2, რომელიც ძირითადად გვხვდება აღმოსავლეთ აფრიკაში და იწვევს ნაკლებად მძიმე დაავადებას. (Marlink et al., 1994)

აივ/შიდსი კლინიკურად პირველად აღწერეს ამერიკის შეერთებულ შტატებში 1981 წელს, როდესაც ზედიზედ იქნა დიაგნოსტირებული ისეთი იშვიათი დაავადებების რამდენიმე შემთხვევა, როგორცაა პნევმოციტური პნევმონიისა და კაპოშის სარკომა. (Center for Disease Control and Prevention (CDC), 1981a, 1981b) 1982 წელს შიდსი აშშ დაავადებათა კონტროლისა და პრევენციის ცენტრმა (CDC) ოფიციალურად დაარეგისტრირა როგორც ახალი დაავადება. 1983 წელს შიდსის გამომწვევი ვირუსი ერთდროულად იქნა აღმოჩენილი საფრანგეთსა და აშშ-ში. (Barre-Sinoussi et al., 1983; Gallo et al., 1983)

აივ-ის სტრუქტურა და სასიცოცხლო ციკლი

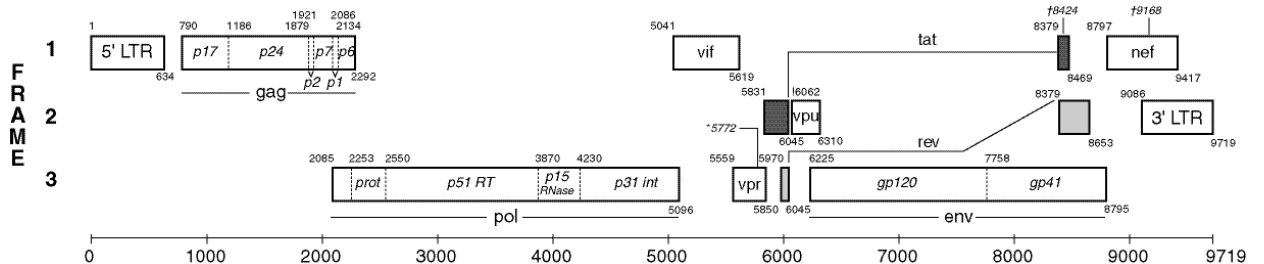
აივ სფეროსებური ფორმის ვირუსია, დიამეტრი დაახლოებით 80-100ნმ -ია და შეიცავს ორ, ჩვეულებრივ იდენტურ ერთ სპირალიან რიბონუკლეინის მჟავის (რნმ)-ის მოლეკულას. (Coffin, Hughes, & Varmus, 1997) (სურათი 1) აივ-ის რნმ გენომი შედგება 9749 ნუკლეოდიდისაგან და მოიცავს სამ სტრუქტურულ *-gag, pol* და *env* - და რამოდენიმე არასტრუქტურულ გენს, მათ შორის *tat, rev, nef, vpr vpu (vpx* აივ-2 -ში). (სურათი 2) *gag* - გენი აკოდირებს *gag* პოლიპროტეინს, რომელიც მონაწილეობს ვირუსის კაფსიდის შექმნაში, ვირუსის ნაწილაკების აწყობაში და ვირუსის ზედაპირზე გარსის პროტეინის ორგანიზებაში. (Hill, Worthylake, Bancroft, Christensen, & Sundquist, 1996) *pol*-გენი, ანუ პოლიმერაზა აკოდირებს ვირუსის ფერმენტებს: შებრუნებით ანუ უკუ ტრანსკრიპტაზას (RT), RNase H, ინტეგრაზას და პროტეაზას. *env* - გენი აკოდირებს gp160 პრეკურსორ პროტეინს, რომლის დაშლითაც მიიღება ვირუსის შეჭრაში მონაწილე 2 პროტეინი: gp120, რომელიც უკავშირდება CD4 რეცეპტორს და gp41, რომელიც არის შეღწევის ფაქტორი. (Allan et al., 1985; Frey et al., 2010)

სურათი 1. აივ-ის აგებულება



წყარო: (Hoffmann, 2012)

სურათი 2. აივ-ის გენომის სტრუქტურა

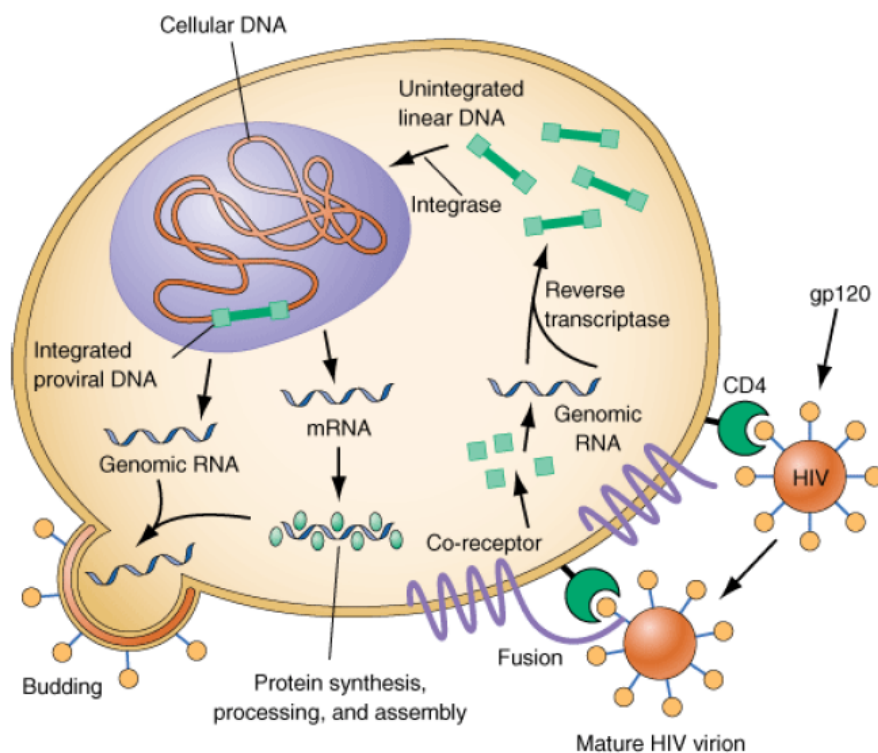


წყარო: (<http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/MAP/landmark.html>)

აივ-ით უჯრედის ინფიცირებისას ვირუსის გარსის გლიკოპროტეინი gp120 უერთდება სამიზნე უჯრედის CD4 რეცეპტორს და ქემიკინ კო-რეცეპტორ CCR5-ს M-ტროპულ უჯრედების შემთხვევაში და CXCR4 რეცეპტორს T-ტროპული უჯრედების შემთხვევაში. (Este & Telenti, 2007; თ. ცერცვაძე, 1999) gp120 - ის CD4 მოლეკულასთან

მიერთების შემდეგ ვირუსი ერწყმის მასპინძელი უჯრედის გარსს და იჭრება მასში gp41 პროტეინის საშუალებით. (Frey, et al., 2010; თ. ცერცვაძე, 1999) (სურათი 3) ვირიონის გარსის დაკარგვის და უჯრედის ციტოპლაზმაში მოხვედრის შემდეგ ვირუსის რნმ ასრულებს მატრიცის როლს და ფერმენტ შებრუნებითი (უკუ-) ტრანსკრიპტაზას (RT) მეშვეობით ხდება ორსპირალიანი პროვირუსული დნმ-ის სინთეზი. წარმოქმნილი დნმ შესაძლებელია პერსისტირებდეს არაინტეგრირებული ფორმით ან ფერმენტ ინტეგრაზას საშუალებით შეიძლება ინტეგრირდეს უჯრედის დნმ-ში. სწორედ დნმ-ის ინტეგრაცია მასპინძლის გენეტიკურ მასალაში წარმოადგენს ვირუსის პერსისტენციის ძირითად მექანიზმს. (Hinz et al., 2010; თ. ცერცვაძე, 1999)

სურათი 3. აივ-ის სასიცოცხლო ციკლი



წყარო: (Fauci, 2008)

ვირუსის სასიცოცხლო ციკლი ხასიათდება რეპლიკაციის განსაკუთრებით მაღალი უნარით (Wei et al., 1995; Wolinsky et al., 1996), მუტაციის (Malim & Emerman, 2001) და რეკომბინაციის (Jetzt, et al., 2000) მაღალი უნარით, რომელიც მასპინძლის

იმუნურ პასუხთან (Choisy, Woelk, Guegan, & Robertson, 2004; Wolinsky, et al., 1996; W. Yang, Bielawski, & Yang, 2003) ერთად იწვევს ვირუსის არაჩვეულებრივად დიდი მრავალფეროვნების წარმოქმნას (Robertson, Hahn, & Sharp, 1995) როგორც ერთი მასპინძლის (Taylor & Korber, 2005), ასევე მრავალი მასპინძლის დონეზე. (Archer & Robertson, 2007) სწორედ ვირუსის ასეთი მრავალფეროვნებითაა განპირობებული ვირუსის როგორც ხარგრძლივი და პერსისტენტული ინფექცია ცალკეულ მასპინძელში, ასევე სადღეისოდ პრევენციული და თერაპიული ვაქცინების არ არსებობა (თ. ცერცვაძე, 1999)

აივ-ის გენეტიკური მრავალფეროვნება ერთი მასპინძლის დონეზე

აივ-ისათვის დამახასიათებელი გენეტიკური მრავალფეროვნება მსგავსია სხვა ლენტვირუსებისა (Artenstein et al., 1995; Buonaguro, Tornesello, & Buonaguro, 2007; Geretti, 2006; Jetzt, et al., 2000; Robertson, Hahn, et al., 1995). გენეტიკური მრავალფეროვნება განპირობებულია შემდეგი ფაქტორებით: ა) აივ - ის RT ფერმენტის შეცდომებისადმი მიდრეკილი ბუნება; ბ) აივ-ის რეპლიკაციის მაღალი სიხშირე; დღეში დაახლოებით 10^{10} ვირუსის წარმოქმნა; გ) APOBEC3 და მასპინძლის სხვა მუტაგენური ფაქტორების ზემოქმედება; დ) RT ფერმენტის მიერ შებრუნებითი ტრანსკრიფციის დროს მატრიცის შეცვლის უნარის გამო გენეტიკური რეკომბინაციის მაღალი ტენდენცია; ე) იმუნური წნეხი; ვ) ალდგენის მექანიზმი (Allen et al., 2000; Archer et al., 2008; Huthoff, Autore, Gallois-Montbrun, Fraternali, & Malim, 2009; Jetzt, et al., 2000; Karlsson et al., 2007; Salazar-Gonzalez et al., 2009).

ა) RT ფერმენტის შეცდომებისადმი მიდრეკილი ბუნება

RT ფერმენტს არ გააჩნია შეცდომების გასწორების უნარი; ამას მივყავართ გენომში წერტილოვანი მუტაციების, ჩანართებისა და დელეციების წარმოქმნამდე რეპლიკაციის ციკლზე დაახლოებით 3×10^{-5} სიხშირით. ყველაზე ხშირია RT ფერმენტით (და არა APOBEC3 -ით) გამოწვეული G - A მუტაციები (Jern, Russell, Pathak, & Coffin, 2009).

ბ) აივ -ის რეპლიკაციის მაღალი სიხშირე

in vivo აივ-ს გააჩნია რეპლიკაციის ძალიან მაღალი უნარი; პლაზმის ვირიონების ნახევრის რეპლიკაცია ხდება ყოველ მეორე დღეს. რეპლიკაციის საშუალო სიხშირეა

0.68+/-0.13x10⁹ ვირიონი დღეში. პლაზმაში მოცირკულირე თითქმის ყველა ვირუსი გამოდის ახლად ინფიცირებული უჯრედებიდან (Ho et al., 1995)

გ) მასპინძლის ფაქტორების მუტაგენურიზემოქმედება

in vivo აივ-ის ევოლუციაზე შეიძლება გავლენას ახდენდეს მასპინძლის ფაქტორები. APOBEC პროტეინს შეუძლია გამოიწვიოს აივ-ის ლეტალური მუტაგენები შებრუნებითი ტრანსკრიფციის დროს აივ-ის გენომის დეამინაციის გზით. (Jern, et al., 2009; Lauring & Andino, 2010) APOBEC პროტეინის მიერ გამოწვეულ მუტაგენებს ასევე შეიძლება გავლენა ჰქონდეს არა მხოლოდ ერთი მასპინძლის, არამედ აივ-1-ის მასპინძელთა შორის ევოლუციაზე. (Jern, et al., 2009)

დ) გენეტიკური რეკომბინაცია RT ენზიმის მიერ რევერს ტრანსკრიფციის დროს მატრიცის შეცვლით

გენეტიკური რეკომბინაცია მრავალი რნმ ვირუსისათვის წარმოადგენს მრავალფეროვნების წყაროს. (Beemon, Duesberg, & Vogt, 1974; Coffin, et al., 1997; Hu & Temin, 1990) *in vivo* აივ-1-ის რეკომბინაციის სიხშირე არის 1.38 x 10⁻⁴ რეკომბინაცია გენერაციაზე, რაც 5.5-ჯერ აღემატება წერტილოვანი მუტაციების სიხშირეს გენერაციაზე. (Shriner, Rodrigo, Nickle, & Mullins, 2004) რეკომბინაციის შედეგად ხდება ჯანსაღი გენომის შიგნით სასარგებლო მუტაციების შერჩევა და ვირუსისათვის საზიანო მუტაციების მოშორება. (Galli et al., 2010; Simon-Loriere et al., 2009) აივ-1-ის რეკომბინაციას აივ ინფიცირებული პირის დონეზე ისეთივე ეფექტი აქვს როგორც წერტილოვან მუტაციებს და წარმოადგენს ევოლუციის მამოძრავებელ ძალას; (Shriner, et al., 2004) თუმცა, უნდა აღინიშნოს, რომ წერტილოვანი მუტაციებისგან განსხვავებით რეკომბინაცია ყოველთვის არ იწვევს ინფიცირებული პირის დონეზე გაზრდილ გენეტიკურ მრავალფეროვნებას.

ე) იმუნური წნეხი

ციტოტოქსიური T უჯრედების ადრეული პასუხი დაკავშირებულია ვირუსის მიერ თავის გადარჩენასთან, რაც გავლენას ახდენს აივ-1-ის მრავალფეროვნებაზე. (Allen, et al., 2000; Karlsson, et al., 2007; Salazar-Gonzalez, et al., 2009) ციტოტოქსიური T უჯრედების ადრეული პასუხი გავლენას ახდენს ეპიტოპებზე *gag* და *nef* გენებზე. აივ-1-ს ასევე შესწევს უნარი თავი დააღწიოს მანეიტრალიზებელი ანტისხეულების პასუხს *env*

გენის ჰიპერვარიაციულ უბანში ამინმჟავების მრავლობითი ცვლილებების დაგროვებით. (Lemey et al., 2007)

ვ) ალდგენის მექანიზმი

ნაჩვენებია, რომ *in vitro* მრავლობითი პასაჟის/გადატანის შემდეგ ვირუსის დასუსტებული კლონები განიცდის ალდგენას/გაჯანსაღებას. ეს არის მრავალსაფეხურიანი პროცესი, რომელშიც მუტაციები მიუთითებს სელექციურ წნევაზე და ზრდის ვირუსის მრავალფეროვნებას. (Lorenzo-Redondo, Borderia, & Lopez-Galindez, 2011) აივ-1 ასევე იყენებს მასპინძლის უჯრედული დნმ-ის ალდგენის მექანიზმს ინტეგრაციის დროს. (Smith & Daniel, 2006)

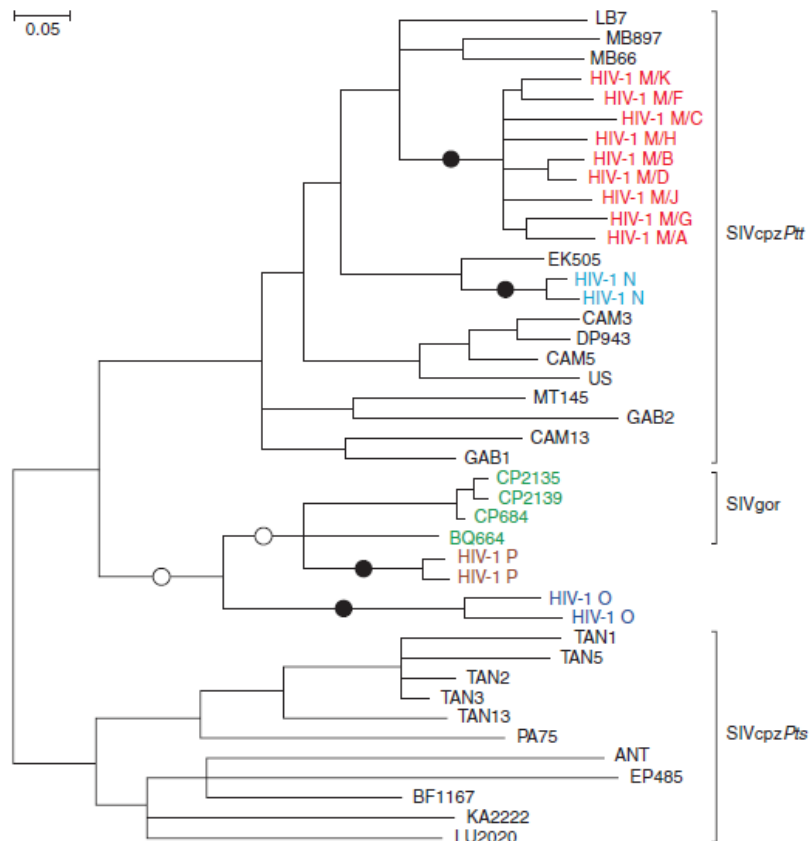
აივ-ის რეკომბინაცია და გენეტიკური მრავალფეროვნება პოპულაციურ დონეზე

რეკომბინაციის როგორც ევოლუციის მამოძრავებელი ძალის კრიტიკული ნიშანი არის ის, რომ რეკომბინაციის დროს ხდება გენეტიკური ინფორმაციის გაცვლა ერთმანეთისგან გენეტიკურად დაშორებულ ვირუსის შტამებს შორის. (Simon-Loriere, Martin, Weeks, & Negroni, 2010) აივ ინფექციის არსებობა არ იცავს აივ-ის სხვა შტამით სუპერ- ან კონფექციისაგან (Artenstein, et al., 1995) და შესაძლებელია, რომ უჯრედი დაინფიცირდეს ორი სხვადასხვა ვირუსით და და თითოეული ვირუსის რნმ-ის „პლუს ჯაჭვი“ გაერთიანდეს ერთ ახალ ვირიონში. (Harris et al., 2002; Jetzt, et al., 2000) მიუხედავად იმისა, რომ ორ ნაწილობრივ იდენტურ რნმ-ის მოლეკულას შორის რეკომბინაცია ნაკლები სიხშირით ხდება ვიდრე ორ იდენტურ მოლეკულას შორის, (Zhang & Temin, 1994) რეკომბინაცია ძლიერ განსხვავებულ შტამებს შორის მაინც შესაძლებელია. (Robertson, Sharp, McCutchan, & Hahn, 1995) რეკომბინაციის შედეგად შეიძლება წარმოიქმნას ვირუსის რეკომბინანტული ფორმები სუბტიპის შიგნით, სუბტიპებს შორის ან ჯგუფის შიგნით. (Harris, et al., 2002; Jetzt, et al., 2000; Simon-Loriere, et al., 2009)

დღეისათვის მიღებულია, რომ აივ-1 ინფექციას სათავე დაუდო სულ ცოტა ოთხი სხვადასხვა სახეობის მაიმუნის იმუნოდეფიციტის ვირუსის (SIV) გადაცემამ პრიმატებიდან ადამიანებზე (სურათი 4) : ორი მოიცავს SIV_{cpz}Ptt გადაცემას მეოცე საუკუნის დასაწყისში, რამაც წარმოქმნა აივ-ის M და N ჯგუფები, (Keele et al., 2006; Sharp, Shaw, & Hahn, 2005; Vidal et al., 2000) ერთი მოიცავს SIV_{gor} გადაცემას და აივ-ის P

ჯგუფის წარმოქმნას; (Plantier et al., 2009) ბოლო მონაცემების მიხედვით აივ-ის O ჯგუფიც უფრო ახლოსაა SIV_{gor}-თან.

სურათი 4. აივ-ის წარმოშობის ფილოგენეტიკური ხე



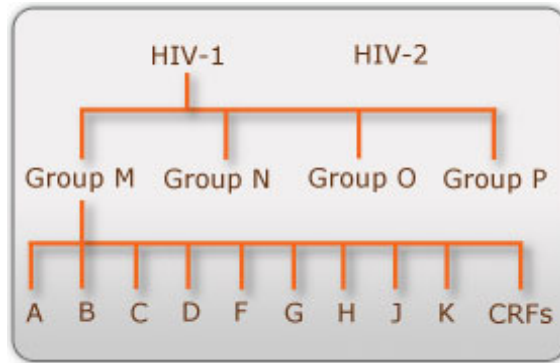
Maximum likelihood ფილოგენეტიკურ ხეზე გამოსახულია კავშირი SIVcpz, HIV-1 და SIVgor შტამებს შორის *pol* გენის ანალიზით. SIVcpz სექვენსები ნაჩვენებია შავი ფერით, SIVgor სექვენსები მწვანედ, აივ-1 M ჯგუფი წითლად, აივ-1 N ჯგუფი - ცისფრად, აივ-1 O ჯგუფი - ლურჯად და P ჯგუფი - ყავისფრად. შავი წრეები აჩვენებს ოთხ ტოტს, სადაც მოხდა სახეობებს შორის გადაცემა და ვირუსი გადავიდა დამიანზე; თეთრი წრეები აჩვენებს ტოტებს, სადაც მოხდა ვირუსის გადაცემა შიმპანზედან გორილაზე.

წყარო: (Sharp & Hahn, 2011)

აივ-1-ის M ჯგუფი პასუხისმგებელია აივ-ის გლობალურ პანდემიაზე. კამერუნიდან აივ-1 M ჯგუფის ვირუსი გავრცელდა სამხრეთით კონგოს დემოკრატიულ რესპუბლიკაში და საფუძველი დაედო აივ-1-ის თანამედროვე პანდემიას. (Keele, et al., 2006; Worobey et al., 2008) აივ-1-ის M ჯგუფი იყოფა ფილოგენეტიკურად განსხვავებულ 9 გენეტიკურ სუბტიპად. (Artenstein, et al., 1995; Buonaguro, et al., 2007; Geretti, 2006)

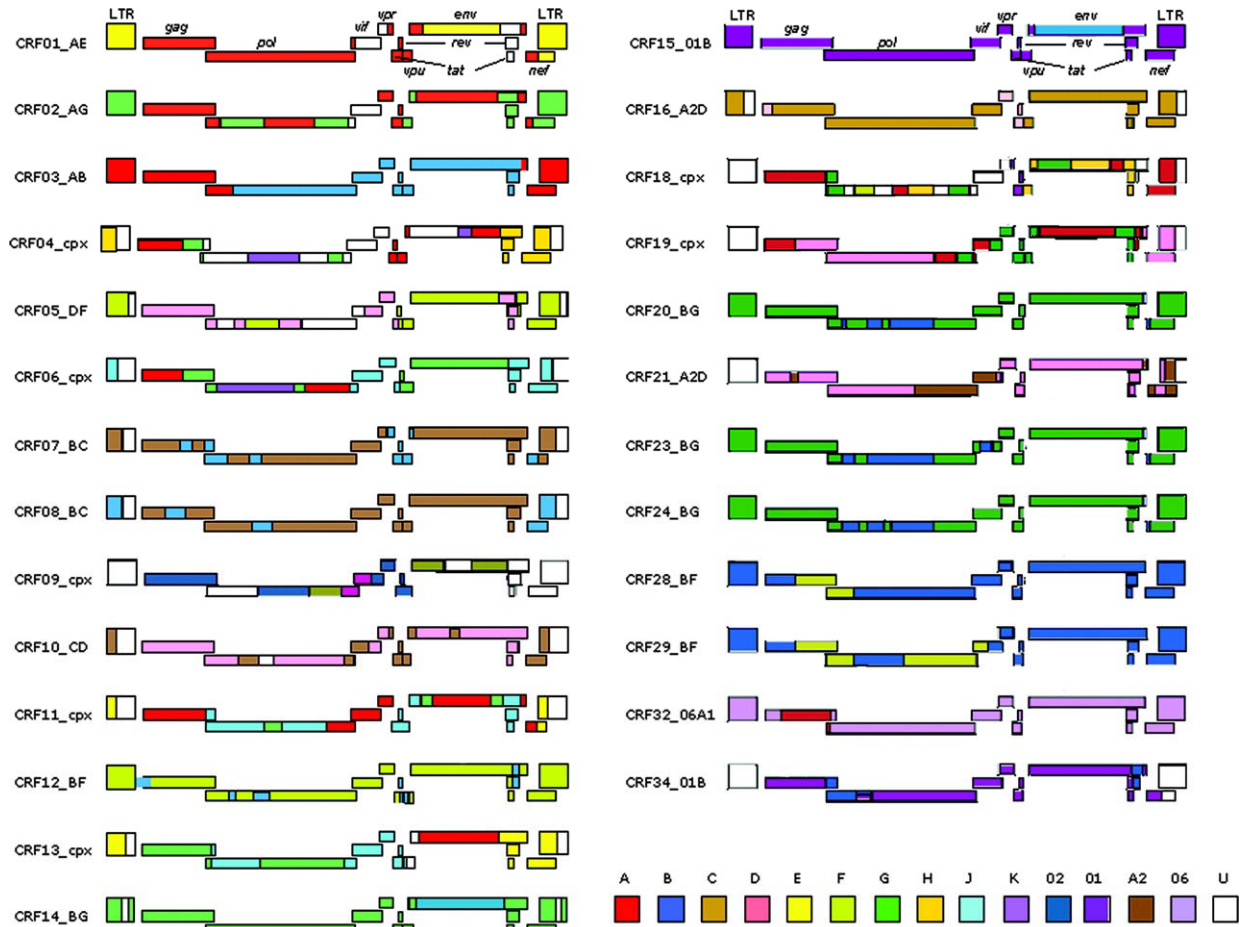
(Jetzt, et al., 2000; Keele & Derdeyn, 2009; Robertson et al., 2000; Vessiere et al., 2010)
(სურათი 5)

სურათი 5. აივ-1-ის სუბტიპები



ზემოთ აღწერილი რეკომბინაციის მექანიზმის შედეგია ის, რომ 9 „სუფთა“ სუბტიპის გარდა არსებობს აივ-1-ის სულ ცოტა 54 მოციკულირე რეკომბინანტული ფორმა (CRF) (სურათი 6), აივ-2 და რამოდენიმე უნიკალური რეკომბინანტული ფორმა (URF) (<http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/CRFs/CRFs.html>). როდესაც ვირუსის სუბტიპებს შორის რეკომბინანტული ვარიანტის გადაცემა ხდება მრავალ ინდივიდში და (ჩვეულებრივ სამ ან მეტ ეპიდემიოლოგიურად არა აუცილებლად დაკავშირებულში) აქვს ეპიდემიოლოგიური მნიშვნელობის პოტენციალი, ეს არის მოციკულირე რეკომბინანტული ფორმა (CRF). უნიკალურ რეკომბინანტულ ფორმებს (URF) გააჩნიათ უფრო შეზღუდული გავრცელება; ისინი გვხვდება ეპიდემიოლოგიურად მჭიდროდ დაკავშირებულ შემთხვევებში. (Easterbrook et al., 2010; Robertson, et al., 2000; Simon-Loriere, et al., 2009; Vidal, Bazepeo, Mulanga, Delaporte, & Peeters, 2009; Ward, Lycett, Kalish, Rambaut, & Leigh Brown, 2013)

სურათი 6. აივ-ის მოციკულირე რეკომბინანტული ფორმების მოზაიკური სტრუქტურა



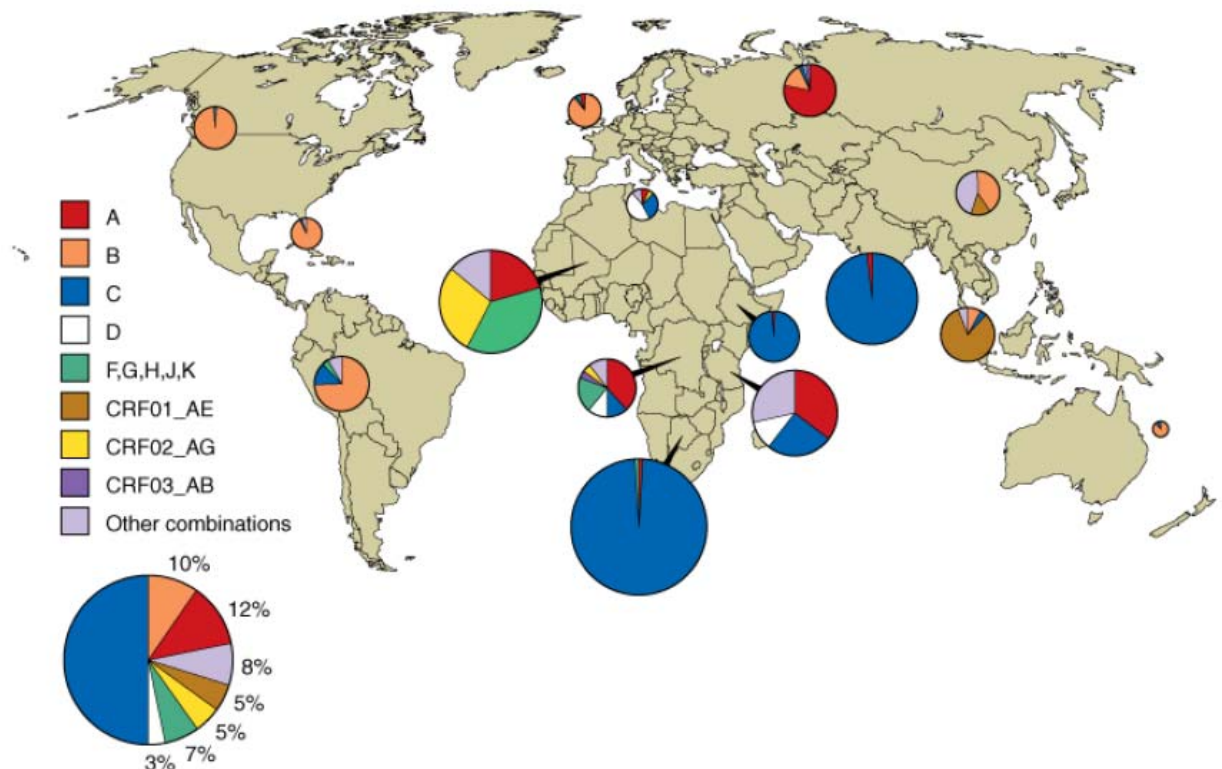
წყარო: (Buonaguro, et al., 2007)

აივ-ის სუბტიპების და რეკომბინანტული ფორმების გავრცელება მსოფლიოში

უახლეს კვლევებზე დაყრდნობით, გლობალურად ყველაზე გავრცელებულია აივ-1-ის სუბტიპი C, რომელიც ყველაზე მეტად გვხვდება სამხრეთ და აღმოსავლეთ აფრიკაში. მსოფლიოში აივ-1-ის ინფექციის 50% სწორედ მასზე მოდის (სურათი 7). სუბტიპ C-ს მოსდევს დასავლეთ და ცენტრალურ აფრიკაში გავრცელებული სუბტიპი A და რეკომბინანტული ფორმა CRF02_AG. (Easterbrook, et al., 2010) სუბტიპი A ასევე გავრცელებულია ცენტრალურ და აღმოსავლეთ აფრიკაში და აღმოსავლეთ ევროპის ქვეყნებში. (Buonaguro, et al., 2007) აივ-1-ის B სუბტიპი დომინირებს დასავლეთ ევროპის და ჩრდილოეთ ამერიკის ქვეყნებში. (Balotta et al., 2001; Geretti, 2006) მოციკულირე

რეკომბინანტული ფორმების გავრცელება მსოფლიოში დაახლოებით 20%-ს შეადგენს (Galli, et al., 2010) და CRF01_A წარმოადგენს ლოკალურ ფორმას სამხრეთ აღმოსავლეთ აზიაში (Menu et al., 1996; Motomura et al., 2000; Piyasirisilp et al., 2000) და CRF02_AG დასავლეთ და დასავლეთ-ცენტრალურ აფრიკაში (McCutchan et al., 1999; Montavon et al., 2000).

სურათი 7. აივ-ის სუბტიპების და მოციკულირე რეკომბინანტული ფორმების გავრცელება მსოფლიოში



წყარო: (Hemelaar, Gouws, Ghys, & Osmanov, 2006)

აივ/შიდსი მსოფლიოში

გაერთიანებული ერების აივ/შიდსის ერთობლივი პროგრამის (UNAIDS) მონაცემებით 2013 წელს მსოფლიოში 35 მილიონი აივ ინფიცირებული ადამიანი იყო. (UNAIDS, 2014) მათი უმრავლესობა – 24.7 მილიონი ადამიანი – სუბ-საჰარული აფრიკის რეგიონში ცხოვრობდა (სურათი 8). UNAIDS-ის მონაცემებით აღმოსავლეთ ევროპისა და ცენტრალური აზიის რეგიონში, რომელიც მოიცავს ყოფილი საბჭოთა კავშირის ქვეყნებს, ინფიცირებულია 1.1 მილიონი ადამიანი, მათგან 85% ორ ქვეყანაზე - რუსეთსა და უკრაინაზე მოდის.

2013 წელს მსოფლიოში სულ დაინფიცირდა 2.1 მილიონი ადამიანი. ახალი შემთხვევების დაახლოებით 95% დაბალი და საშუალო შემოსავლების ქვეყნებზე მოდის. (UNAIDS, 2014) ჯანმრთელობის მსოფლიო ორგანიზაციის (WHO) მონაცემებით სიკვდილობის წამყვან მიზეზებს შორის აივ/შიდსი მე-6 ადგილზეა მსოფლიოში, ხოლო დაბალი შემოსავლების ქვეყნებში ის სიკვდილის მეორე წამყვანი მიზეზია. (World Health Organization, 2014.)

სურათი 8. აივ/შიდსის გავრცელება მსოფლიოში



სულ: 35.0 მილიონი [33.2 მილიონი – 37.2 მილიონი]

წყარო: (World Health Organization, 2014.)

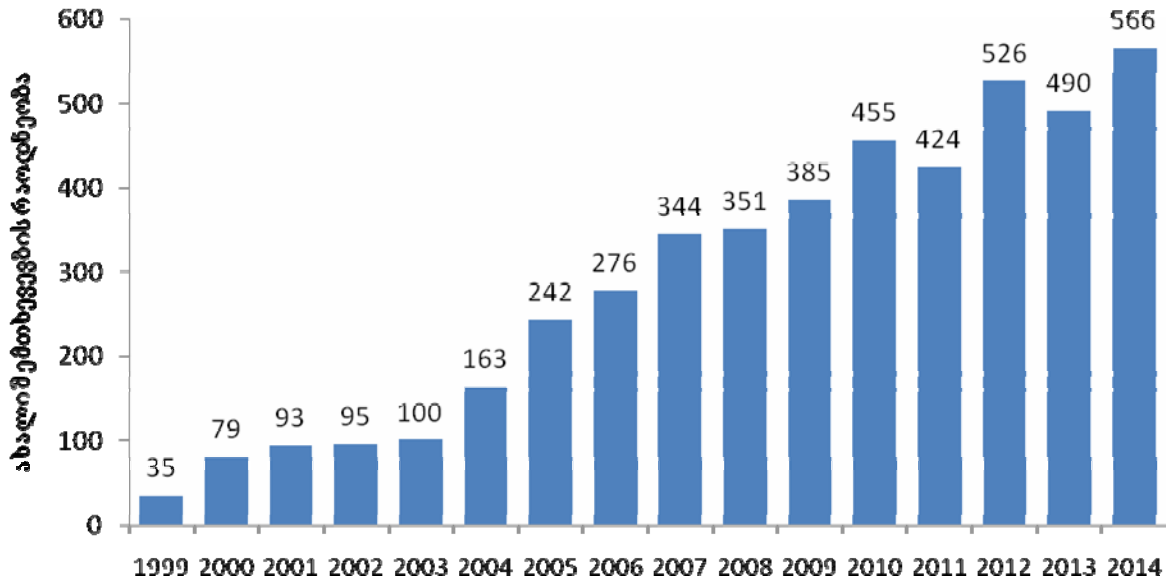
აივ/შიდსი საქართველოში

საქართველოში აივ/შიდსის პირველი შემთხვევა 1989 წელს გამოვლინდა. 2014 წლის 31 დეკემბრის მონაცემებით საქართველოში რეგისტრირებულია აივ/შიდსის 4 697 შემთხვევა, მათგან 3 449 კაცი და 1 248 ქალია. აივ/შიდსის შემთხვევების სავარაუდო რიცხვია 6 400.

უკანასკნელი წლების დინამიკა მიუთითებს, რომ ქვეყანაში აღინიშნება აივ/შიდსის ახალი შემთხვევების ნელი, მაგრამ სტაბილური ზრდა (დიაგრამა 1). ეპიდემიის ზრდის ტენდენციის მიუხედავად, საქართველოში აივ/შიდსის ახალი

შემთხვევების მაჩვენებელი მნიშვნელოვნად ნაკლებია ყოფილი საბჭოთა ქვეყნების ანალოგიურ საშუალო მაჩვენებელთან შედარებით.

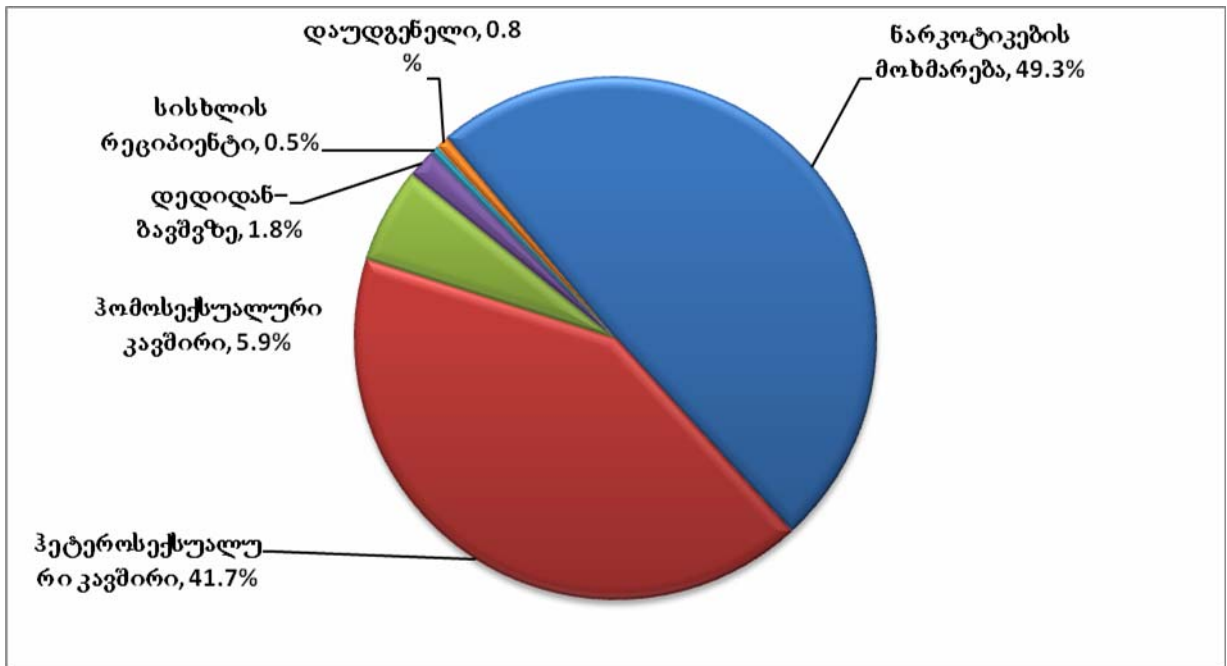
დიაგრამა 1. აივ-1-ის ახალი შემთხვევების რაოდენობა საქართველოში



წყარო: შიდსის ცენტრი, WHO/Europe

საქართველოში აივ ინფექციის გადაცემის გზების მიხედვით პირველ ადგილზეა ნარკოტიკების ინიექციური მოხმარება - 49.3%, შემდეგ მოდის ჰეტეროსექსუალური კონტაქტი - 41.7%, ჰომოსექსუალური კონტაქტი - 5.9%, ვერტიკალური გზით (დედიდან ბავშვზე) ინფიცირება - 1.8%, აივ ინფიცირებული სისხლის გადასხმა 0.5%, ხოლო 0.8%-ში დაინფიცირების გზა დაუდგენელია (დიაგრამა 2).

დიაგრამა 2. აივ/შიდსის შემთხვევების განაწილება გადაცემის გზების მიხედვით



წყარო: შიდსის ცენტრი

ანტირეტროვირუსული (არვ) მკურნალობა

ანტირეტროვირუსული (არვ) პრეპარატების გამოყენებამ მნიშვნელოვნად შეამცირა აივ/შიდსთან დაკავშირებული ავადობა და სიკვდილობა და გაზარდა სიცოცხლის ხანგრძლივობა. (Hammer, et al., 1997; Mocroft, et al., 2003; Palella, et al., 1998; Sterne, et al., 2005) 1980-იან წლებში დაიწყო მონოთერაპიის სახით პირველი არვ მედიკამენტის – ზიდოვუდინის გამოყენება (Fischl et al., 1987) მალევე ნაჩვენები იქნა, რომ გრძელვადიან პერსპექტივაში ზიდოვუდინით მონოთერაპია არ არის ეფექტური. (Fischl et al., 1990; P. A. Volberding et al., 1990) 1990 წლებში გამოიყენებოდა ორმაგი თერაპია, რაც ასევე უშედეგო აღმოჩნდა. (Hammer et al., 1996)

1996 წლიდან დაიწყო თანამედროვე ეფექტური 3-კომპონენტური მკურნალობის გამოყენება (Gulick et al., 1997; Hammer, et al., 1997) ამ დროისათვის არვ მკურნალობის ღირებულება წელიწადში დაახლოებით 20 000 აშშ დოლარს შეადგენდა (Vella, Schwartländer, Sow, Eholie, & Murphy, 2012) და შესაბამისად მისი ხელმისაწვდომობა განვითარებად ქვეყნებში შეზღუდული იყო. უკანაკსნელ ათწლეულში საერთაშორისო ინციატივების, როგორცაა შიდსთან, ტუბერკულოზთან და მალარიასთან ბრძოლის გლობალური ფონდი, აშშ-ს პრეზიდენტის შიდსთან ბრძოლის პროგრამა, და სხვ.,

ძალისხმევით არც მკურნალობაზე ხელმისაწვდომობა მნიშვნელოვნად გაიზარდა დაბალი და საშუალო შემოსავლების მქონე ქვეყნებში. WHO-ს მონაცემებით 2013 წლის ბოლოს მსოფლიოში სულ მკურნალობაზე იყო 12.9 მილიონი აივ/შიდსით ავადმყოფი, მათ შორის 11.7 მილიონი ადამიანი დაბალი და საშუალო შემოსავლების ქვეყნებში. (World Health Organization, 2014) მკურნალობის გაფართოების შედეგად მსოფლიომ თავიდან აიცილია 7.6 მილიონი ადამიანის სიკვდილი. (UNAIDS, 2014)

დღეისათვის შიდსის სამკურნალოდ შემუშავებული და ამერიკის საკვებისა და წამლის ადმინისტრაციის (US FDA) მიერ ლიცენზირებულია 24 არც პრეპარატი (სურათი 9), რომლებიც წარმოადგენენ 6 კლასს: ნუკლეოზიდური რევერსტრანსკრიპტაზას ინჰიბიტორები (NRTI), არა-ნუკლეოზიდური რევერსტრანსკრიპტაზას ინჰიბიტორები (NNRTI), პროტეაზას ინჰიბიტორები (PI), ინტეგრაზას ინჰიბიტორები, შეღწევის ინჰიბიტორი და CCR5 ანტაგონისტი. (Tang & Shafer, 2012; P. Volberding, Greene, Lange, Gallant, & Sewankambo, 2012)

სურათი 9. თანამედროვე ანტირეტროვიუსული პრეპარატები

Generic name	Abbreviation	Brand name (US) ^a
Nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NRTIs)		
Abacavir	ABC	Ziagen [®]
Didanosine	ddI	Videx [®]
Emtricitabine	FTC	Emtriva [®]
Lamivudine	3TC	Epivir [®]
Stavudine	d4T	Zerit [®]
Tenofovir	TDF	Viread [®]
Zidovudine	AZT, ZDV	Retrovir [®]
Non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTIs)		
Delavirdine	DLV	Rescriptor [®]
Efavirenz	EFV	Sustiva [®]
Etravirine	ETR	Intelence [®]
Nevirapine	NVP	Viramune [®]
Nevirapine extended release	NVP XR	Viramune [®] XR™
Rilpivirine	RPV	Edurant [®]
Protease inhibitors (PIs)		
Atazanavir	ATV	Reyataz [®]
Darunavir	DRV	Prezista [®]
Fosamprenavir	FPV	Lexiva [®]
Indinavir	IDV	Crixivan [®]
Lopinavir/ritonavir	LPV/r	Kaletra [®]
Nelfinavir	NFV	Viracept [®]
Ritonavir	RTV, /r	Norvir [®]
Saquinavir hard gel caps	SQV	Invirase [®]
Tipranavir	TPV	Aptivus [®]
Integrase inhibitors (INIs)		
Raltegravir	RAL	Isentress [®]
CCR5 antagonist		
Maraviroc	MVC	Selzentry [®]
Fusion inhibitor		
Enfuvirtide (T20)	ENF	Fuzeon [®]

წყარო: (Tang & Shafer, 2012)

საქართველომ ჯერ კიდევ 1995 წლიდან დაიწყო შიდსის მკურნალობის სახელმწიფო პროგრამის განხორციელება, რომლის ფარგლებში 1997 წლიდან დაინერგა იმ დროისთვის უახლესი სამკომპონენტო არე მკურნალობა. 2004 წლიდან შიდსთან, ტუბერკულოზთან და მალარიასთან ბრძოლის გლობალური ფონდის ხელშეწყობით

საქართველომ პირველმა და ჯერ-ჯერობით ერთადერთმა აღმოსავლეთ ევროპის რეგიონში უზრუნველყო და შეინარჩუნა არც მკურნალობაზე უნივერსალური ხელმისაწვდომობა. (Tsertsvadze et al., 2011)

პირველი რიგის მკურნალობის რეკომენდებული რეჟიმი საქართველოში შედგება 2 NRTI და 1 NNRTI კომბინაციისგან. რიტონავირით გაძლიერებული (ბუსტირებული) პროტეაზას ინჰიბიტორი ინიშნება იმ შემთხვევაში, თუკი NNRTI-ს გამოყენება უკუნაჩვენებია. NRTI კომპონენტის სახით გამოიყენება ტენფოვირი + ემტრიციტაინი, ან ზიდოვუდინი + ლამივუდინი ან აბაკავირი + ლამივუდინი. ეფავირენზი გახლდათ უპირატესი NNRTI მედიკამენტი, ხოლო ნევირაპინი კი მისი ალტერნატივა.

აივ რეზისტენტობის შემთხვევაში არც მკურნალობის რეჟიმი იცვლება ვირუსის რეზისტენტობის პროფილის მიხედვით. მე-2 და შემდგომი რიგების არც მკურნალობისთვის საჭირო მედიკამენტების არსენალი მოიცავს როგორც პროტეაზას ინჰიბიტორებს (ლოპინავირ/რიტონავირი, ატაზანავირ/რიტონავირი, დარუნავირ/რიტონავირი), ისე უახლესი თაობის მედიკამენტებს, როგორცაა რალტეგრავირი (ინტეგრეზას ინჰიბიტორი), მარავიროკი (შერწყმის ინჰიბიტორი) და ეტრავირინი (ახალი თაობის ანრტი).

აივ-ის რეზისტენტობა ანტირეტროვირუსული პრეპარატების მიმართ

არც მკურნალობის ეფექტურობაზე შეიძლება ნეგატიური გავლენა იქონიოს აივ-ის რეზისტენტობამ ანტირეტროვირუსული პრეპარატების მიმართ, რაც მკურნალობის უეფექტობის საკმაოდ ხშირი მიზეზია. (Bannister, et al., 2011; Cozzi-Lepri, et al., 2012; D'Aquila, et al., 1995; Gupta, et al., 2008; Japour, et al., 1995; Kozal, et al., 1993; Mtambo, et al., 2012; von Wyl, et al., 2009) აივ-1 გამოირჩევა მუტაციის მაღალი სიხშირით: დაახლოებით ერთი ნუკლეოტიდის მუტაცია რეპლიკაციის ციკლზე. (Abram, Ferris, Shao, Alvord, & Hughes, 2010; Mansky, 2002) მუტაციის მაღალი სიხშირე და ვირუსის უნარი დღეში წარმოქმნას დაახლოებით 10^{10} ვირიონი, საშუალებას აძლევს აივ-1-ს გვერდი აუაროს იმუნურ სისტემას და ხელს უწყობს არც რეზისტენტობის განვითარებას. (Tang & Shafer, 2012) არც პრეპარატების მიმართ რეზისტენტობა შეიძლება განვითარდეს მკურნალობის

დროს (შეძენილი რეზისტენტობა), ან პაციენტი შეიძლება დაინფიცირდეს რეზისტენტული ვირუსით (გადაცემული რეზისტენტობა). (Hogg, et al., 2006; Palella, et al., 2009; Tang & Shafer, 2012) რეზისტენტული ვირუსის გადაცემა დაკავშირებულია ვირუსული უშედეგობის მაღალ რისკთან. (Borroto-Esoda et al., 2007; Kuritzkes et al., 2008) მკურნალობის უეფექტობა აივ-ის ანტირეტროვირუსული პრეპარატების მიმართ რეზისტენტობის გამო პრობლემას წარმოადგენს საქართველოში, რომელმაც ისევე როგორც მთელს მსოფლიოში თავი იჩინა ანტირეტროვირუსული პრეპარატების ხელმისაწვდომობის ზრდასთან ერთად. (Pillay, et al., 2005; Richman, et al., 2004; Tamalet, et al., 2003)

სტენფორდის უნივერსიტეტის აივ წამლებისადმი რეზისტენტობის მონაცემთა ბაზაში მოცემულია დღეისათვის გამოყენებული წამლებისადმი აივ-1-ის ცნობილი რეზისტენტული მუტაციები (სურათი 10). (HIVDB, 2013)

სურათი 10. აივ-1-ის რეზისტენტული მუტაციები პრეპარატების კლასის მიხედვით

Major Nucleoside RT Inhibitor (NRTI)-Resistance Mutations													
	Non-TAMs					TAMs					MDR		
	184	65	70	74	115	41	67	70	210	215	219	69	151
Cons	M	K	K	L	Y	M	D	K	L	T	K	T	Q
3TC	<u>VI</u>	R	E									Ins	M
FTC	<u>VI</u>	R	E									Ins	M
ABC	VI	<u>R</u>	E	<u>VI</u>	E	L			W	YF		<u>Ins</u>	<u>M</u>
ddl	VI	<u>R</u>	E	<u>VI</u>		L			W	YF		<u>Ins</u>	<u>M</u>
TDF	***	<u>R</u>	E		F	L		R	W	YF		<u>Ins</u>	M
d4T	***	R	E			L	N	R	W	<u>YF</u>	QE	<u>Ins</u>	<u>M</u>
ZDV	***	***	*	*		L	N	R	W	<u>YF</u>	QE	<u>Ins</u>	<u>M</u>

Major Non-Nucleoside RT Inhibitor (NNRTI)-Resistance Mutations											
	100	101	103	106	138	179	181	188	190	227	230
Cons	L	K	K	V	E	V	Y	Y	G	F	M
NVP	I	<u>PEH</u>	<u>NS</u>	<u>AM</u>		DEF	<u>CIV</u>	<u>LCH</u>	<u>ASEQ</u>	LC	<u>L</u>
EFV	I	<u>PEH</u>	<u>NS</u>	<u>AM</u>		DEF	C	<u>LCH</u>	<u>ASEQ</u>	LC	<u>L</u>
ETR	I	<u>PEH</u>			KAGQ	DEF	<u>CIV</u>		ASEQ	C	L
RPV	I	<u>PEH</u>			<u>KAGQ</u>	DEF	<u>CIV</u>	<u>L</u>	ASEQ	C	L

Major Protease Inhibitor (PI) Resistance Mutations														
	24	30	32	33	46	47	48	50	54	76	82	84	88	90
Cons	L	D	V	L	M	I	G	I	I	L	V	I	N	L
ATV/r			I	F	IL	V	VM	<u>L</u>	VTAM		ATSF	<u>V</u>	<u>S</u>	M
DRV/r			I	F		VA		V	LM	V	F	V		
FPV/r			<u>I</u>	F	IL	<u>VA</u>		<u>V</u>	<u>VTALM</u>	<u>V</u>	ATSE	<u>V</u>		M
IDV/r	I		I		IL	VA			VTALM	V	ATSF	<u>V</u>	S	M
LPV/r	I		I	F	IL	<u>VA</u>	VM	V	VTALM	V	ATSF	V		M
NFV		<u>N</u>		F	IL	VA	<u>VM</u>		VTALM		ATSF	<u>V</u>	<u>DS</u>	<u>M</u>
SQV/r							<u>VM</u>		VTAM		ATS	<u>V</u>	S	M
TPV/r			I	F	IL	VA			VTAM		<u>ISL</u>	V		

HIV-1 RT and Protease Mutations for Drug-Resistance Surveillance*									
NRTIs			NNRTIs			PIs			
M41	L	Q151	M	L100	I	L23	I	G73 S,T,C,A	
K65	R	M184	V,I	K101	E,P	L24	I	L76 V	
D67	N,G,E	L210	W	K103	N,S	D30	N	V82 A,T,S,F,L,C,M	
T69	D,Ins	T215	Y,F,S,C,D,E,I,V	V106	A,M	V32	I	N83 D	
K70	R,E	K219	Q,E,N,R	V179	F	M46	I,L	I84 V,A,C	
L74	V,I			Y181	C,I,V	I47	V,A	I85 V	
V75	M,T,A,S			Y188	L,C,H	G48	V,M	N88 D,S	
F77	L			G190	A,S,E	I50	V,L	L90 M	
Y115	F			P225	H	F53	F,Y		
F116	Y			M230	L	I54	V,L,M,T,A,S		

წამლების მიმართ რეზისტენტობის სურათი - რეზისტენტობის პროფილი - შეიძლება განსხვავებული იყოს აივ-ის სხვადასხვა სუბტიპისათვის, რაც გათვალისწინებული უნდა იქნას მკურნალობის სწორი რეჟიმის შერჩევასათვის. (Brenner, et al., 2003; Grossman, et al., 2004; Palma, et al., 2012; Tang & Shafer, 2012) აივ-ის ანტირეტროვირუსული პრეპარატების მიმართ რეზისტენტობის კვლევების უმრავლესობა ეხება ვირუსის B სუბტიპს. განვითარებადი ქვეყნების უმრავლესობაში კი დომინირებს ვირუსის სხვა, ე.წ. არა-B სუბტიპები და ამ ქვეყნებში ანტირეტროვირუსული პრეპარატები ხდება ფართოდ ხელმისაწვდომი. არც პრეპარატები ისეთივე ეფექტურია ვირუსის არა-B სუბტიპების წინააღმდეგ, როგორც სუბტიპ B-ს წინააღმდეგ. (Bannister, et al., 2011; Geretti et al., 2009; Scherrer et al., 2011) მუტაციები, რომლებიც იწვევენ რეზისტენტობას სუბტიპ B-ში, ასევე იწვევენ რეზისტენტობას სხვა სუბტიპებში. თუმცა, სუბტიპები განსხვავდება ერთმანეთისგან სპეციფიური მუტაციების განვითარებისაკენ მიდრეკილებით (Tang & Shafer, 2012)

მასალა და მეთოდები

საკვლევი პოპულაცია

კვლევა მოიცავდა ინფექციური პათოლოგიის, შიდსისა და კლინიკური იმუნოლოგიის სამეცნიერო პრაქტიკულ ცენტრში რეგისტრირებულ აივ-1 დადებით პაციენტებს. კვლევის პერიოდში შესწავლილი იქნა 18 წელზე უფროსი 411 პაციენტი. შესწავლილი იქნა აივ დადებითი პაციენტების 2 ჯგუფი:

ჯგუფი 1: აივ დადებითი პაციენტები, რომელთაც აივ-1 ინფექციის დიაგნოზი დაესვათ კვლევაში ჩართვამდე არაუგვიანეს 6 თვისა და არ იმყოფებოდნენ ანტირეტროვირუსულ მკურნალობაზე. ჯგუფში შედიოდა 218 პაციენტი, რომელთაც აივ ინფექციის დიაგნოზი დაესვათ 2006 - 2008 (126 პაციენტი) და 2011 -2013 (92 პაციენტი) წლებში. ამ ჯგუფში შევისწავლეთ აივ-1-ის მოლეკულური ეპიდემიოლოგია, პირველადი ანუ გადაცემული რეზისტენტობა და ჩავატარეთ აივ-ის "გადაცემის კლასტერების" ფილოგენეტიკური ანალიზი.

ჯგუფ 1-ში ჩართვის კრიტერიუმები იყო:

- ასაკი >18 წელი
- პაციენტს არ უნდა ჰქონოდა ანტირეტროვირუსული მკურნალობის ისტორია
- აივ ვირუსული დატვირთვა (VL) >1 000 cop/mL

ჯგუფი 2: ანტირეტროვირუსულ მკურნალობაზე მყოფი პაციენტები, რომელთაც აღენიშნებოდათ ვირუსული უშედეგობა. ვირუსული უშედეგობა განისაზღვრა როგორც ვირუსული დატვირთვის მაჩვენებელი >400 ასლი/მლ-ზე მკურნალობის 24 კვირაზე ან ვირუსული დატვირთვის განსაზღვრადი მაჩვენებელი თუკი ის მანამდე იყო განუსაზღვრელი. ჯგუფში შედიოდა 2005 - 2013 წლებში ანტირეტროვირუსულ მკურნალობაზე მყოფი და ვირუსული უშედეგობის ნიშნების მქონე 193 პაციენტი. ამ ჯგუფში შევისწავლეთ აივ-ის ანტირეტროვირუსული პრეპარატებისადმი რეზისტენტობის პროფილი/სურათი.

ჯგუფ 2-ში ჩართვის კრიტერიუმები იყო:

- ასაკი >18 წელი

- ანტირეტროვირუსულ მკურნალობაზე ყოფნა
- აივ ვირუსული დატვირთვა (VL) >1 000 cop/mL

აივ-1-ის გენოტიპირება

სინჯების მომზადება გენოტიპირებისათვის

კვლევის თითოეული მონაწილისაგან ერთჯერადად ხდებოდა 5 მლ ვენური სისხლის აღება. სისხლი გროვდებოდა ანტიკოაგულანტ EDTA-ს შემცველ სინჯარებში. სისხლის აღებიდან 4 საათის განმავლობაში ხდებოდა პლაზმის გამოყოფა ოთახის ტემპერატურაზე 1,500xg-ზე 20 წთ-ის განმავლობაში ცენტრიფუგირებით. ხდებოდა 500 μ L პლაზმის სინჯების გადანაწილება 3 ცალ 1.5 მლ-იან კრიოსინჯარაში. პლაზმიანი სინჯები ინახებოდა -80°C-ზე შემდეგი მოხმარებისათვის.

ვირუსული რნმ-ის ექსტრაქცია

შენახული პლაზმის სინჯებიდან ვირუსული რნმ-ის გამოსაყოფად გამოყენებული იყო ვირუსული რნმ-ის ექსტრაქციის რამოდენიმე მეთოდი.

ვირუსული რნმ - ის ექსტრაქცია მანუალურად QIAamp Viral RNA Mini Kit -ის გამოყენებით

პროცესი მიმდინარეობდა მწარმოებლის ინსტრუქციის მიხედვით და მოკლედ ასე გამოიყურებოდა: 140 μ L პლაზმის სინჯს ემატებოდა 560 μ L ბუფერი AVL და ხდებოდა ინკუბაცია ოთახის ტემპერატურაზე 10 წთ. ნარევს ემატებოდა 560 μ L აბსოლუტური ეთანოლი და მთლიანი ხსნარი 2 ეტაპად გადაიტანებოდა ცენტრიფუგის ფილტრიან სინჯარებში. სინჯარები ცენტრიფუგდებოდა 1 წთ 14, 000xg-ზე, ემატებოდა 500 μ L გამრეცხი ბუფერი AW1 და ცენტრიფუგდებოდა 1 წთ. შემდეგ ემატებოდა მეორე ბუფერი AW2 და ცენტრიფუგდებოდა 3 წთ. გამრეცხი ბუფერის მთლიანად მოსაშორებლად ხდებოდა დამატებითი ცენტრიფუგირება 1 წთ-ის განმავლობაში. ფილტრიდან რნმ-ის ხსნარში გადასყვანად სინჯარას ემატებოდა 60 μ L გამხსელი ბუფერი და ცენტრიფუგდებოდა 1წთ 6,000xg-ზე.

ვირუსული რნმ - ის ექსტრაქცია მანუალურად ViroSeq Kit -ის გამოყენებით

პროცესი მიმდინარეობდა მწარმოებლის ინსტრუქციის მიხედვით და მოკლედ ასე გამოიყურებოდა: ვირუსის კონცენტრირების მიზნით 500 μ L პლაზმა ცენტრიფუგდებოდა 22, 000 x g-ზე 4°C-ზე 1 საათის განმავლობაში. სუპერნატანტის მოცილების შემდეგ ნალექი იხსნებოდა 600 μ L ლიზის ბუფერში და ყოვნდებოდა ოთახის ტემპერატურაზე 10 წთ-ის განმავლობაში. შემდეგ ემატებოდა 600 μ L იზოპროპილი და ნარევი ცენტრიფუგდებოდა 13, 000xg-ზე 5წთ-ის განმავლობაში. სუპერნატანტის მოცილების შემდეგ ნალექს ემატებოდა 1მლ 70%-იანი ეთანოლი და ცენტრიფუგდებოდა 13, 000xg-ზე 5 წთ-ის განმავლობაში. კიდევ ერთხელ სუპერნატანტის მოცილების შემდეგ ხდებოდა ნალექის გამოშრობა ოთახის ტემპერატურაზე. გამოყოფილი რნმ-ის ხსნარში გადასაყვანად მშრალ ნალექს ემატებოდა 50 μ L რნმ-ის გამხსელი.

ვირუსული რნმ-ის ექსტრაქცია ავტომატური ექსტრაქტორის EasyMag - ის საშუალებით

პროცესი მიმდინარეობდა მწარმოებლის მიერ წარმოდგენილი ერთ-ერთი პროტოკოლის მიხედვით და მოკლედ ასე გამოიყურებოდა: 500 μ L პლაზმა გამოიყენებოდა ექსტრაქციის "პლატფორმაზე ლიზისის" პროტოკოლში. ავტომატურად 2 მლ ლიზის რეაგენტის დამატების შემდეგ ხდებოდა ინკუბაცია ოთახის ტემპერატურაზე 10 წთ-ის განმავლობაში. ინკუბაციის შემდეგ სინჯებს მანუალურად ემატებოდა 100 μ L მაგნიტური სილიკას ხსნარი და გრძელდებოდა ავტომატური ექსტრაქცია. გამოყოფილი რნმ-ის გახსნა ხდებოდა 110 μ L გამხსნელ ბუფერში (EB).

აივ-1-ის გენოტიპირება TruGene HIV-1 Genotyping Kit - ის გამოყენებით

OpenGene DNA Sequencing სისტემაზე

ანალიზი მოიცავდა შემდეგ ეტაპებს:

1. სამიზნე რნმ - ის (RNA) რევერს ტრანსკრიპცია (RT) კომპლემენტარული დნმ-ის (cDNA) მისაღებად

TruGene HIV-1 Genotyping Kit-ის (Siemens Healthcare Diagnostics Inc. Tarrytown, NY, USA) საშუალებით ხდებოდა აივ-1-ის pol გენში რევერს ტრანსკრიპტაზას (RT) და

პროტეაზას (PR) გენების ამპლიფიკაცია. PR -ს ზომას 297 ნუკლეოტიდი, ხოლო RT- ს ზომას 1,680 ნუკლეოტიდი. გენები მოთავსებულია HIV-1 LAV-1 -ის (GeneBank N K02013) გენომის 1835-4678 პოზიციაზე. აივ-1-ის განსაკუთრებით მაღალი პოლიმორფული ბუნების გამო, ტესტ-სისტემაში გამოიყენებოდა სხვადასხვა პრაიმერების ნარევი, რომელიც მიესადაგება აივ-1-ის ძირითად სუბტიპებს.

გამოყოფილი რნმ ემატებოდა სპეციალური მასტერ მიქსის (MMX) შემცველ სინჯარებს, რომელშიც ერთდროულად მიმდინარეობდა როგორც რევერს ტრანსკრიპცია (RT) , ასევე პოლიმერაზული ჯაჭვური რეაქცია (PCR).

სარეაქციო ნარევი ცხელდებოდა და ცივდებოდა სპეციფიურ ტემპერატურებზე, რაც ოლიგონუკლეოტიდურ პრაიმერებს აძლევდა აივ-1-ის სამიზნე რნმ-თან მიმაგრების საშუალებას. დეოქსინუკლეოტიდ ტრიფოსფატების (dNTP) სიჭარბის პირობებში RT ფერმენტი ახდენდა მიმაგრებული პრაიმერების დაგრძელებას სამიზნე რნმ-ის გაყოლებაზე და მიიღებოდა კომპლემენტარული დნმ (cDNA), რომელიც წარმოადგენდა cDNA:RNA ჰიბრიდს.

სამიზნე რნმ-ის რევერს ტრანსკრიპციის შემდეგ სარეაქციო ნარევი ცხელდებოდა და ხდებოდა cDNA:RNA ჰიბრიდის დაშლა. ნარევი გრილდებოდა, პრაიმერები ემაგრებოდა cDNA -ს და პოლიმერაზა აკატალიზებდა დაგრძელების რეაქციას; ხდებოდა დნმ-ის მეორე მოლეკულის წარმოქმნა. ამით სრულდებოდა PCR-ის პირველი ციკლი, რის შედეგადაც მიიღებოდა აივ-1-ის სამიზნე რეგიონის ასლი ორსპირალიანი დნმ მოლეკულა. ნარევი ისევ ცხელდებოდა და ორსპირალიანი დნმ იშლებოდა. როდესაც ნარევი გრილდებოდა, პრაიმერები ემაგრებოდა სამიზნე დნმ-ს და ფერმენტ პოლიმერაზას საშუალებით ჭარბი რაოდენობის დეოქსინუკლეოტიდ ტრიფოსფატების (dNTP) არსებობის პირობებში ხდებოდა პრაიმერების დაგრძელება სამიზნე დნმ-ის გაყოლებაზე და მიიღებოდა ამპლიკონი. აღწერილი პროცესი გრძელდებოდა 36 ციკლის განმავლობაში. თითოეული ციკლის შედეგად ხდებოდა ამპლიკონების რაოდენობის გაორმაგება. ამპლიფიკაცია მიმდინარეობდა აივ-1-ის გენომის მხოლოდ RT-PCR პრაიმერებს შორის. აივ-1-ის მთლიანი გენომის ამპლიფიკაცია არ ხდებოდა.

RT-PCR რეაქციის პირობები:

Master Mix I

RT-PCR PRIM	7.00
dNTP	1.75
DTT	1.17
RNaseIN	0.58

Master Mix II

RT-PCR BUF	11.70
RNaseIN	0.58
RT ENZ	1.17
DNA POL	2.90

1 ციკლი	20 ციკლი	17 ციკლი	1ციკლი
90°C - 2 წთ	94°C - 30 წმ	94°C - 30 წმ	68°C - 7 წთ
50°C - 60 წთ	57°C - 30 წმ	60°C - 30 წმ	4°C - ∞
94°C - 2 წთ	68°C - 2 წთ	68°C - 2.5 წთ	

2. PCR ამპლიკონების CLIP სექვენირება აივ - 1 სპეციფიური პრაიმერების გამოყენებით

CLIP სექვენირების რეაქციაში ხდებოდა ორ სპირალიანი დნმ-ის ორივე სპირალის სექვენირება ერთდროულად. "წაღმა" და "უკუღმა" პრაიმერები მონიშნული იყო სხვადასხვა ფლუორესცენტული საღებავებით: cy5 და cy5.5. როცა პრაიმერი ჰიბრიდიზდებოდა/ემაგრებოდა დნმ-ს, ხდებოდა მათი სწორი ორიენტაცია: ერთი პრაიმერი ემაგრებოდა "წაღმა" სპირალს, ხოლო მეორე - "უკუღმა" სპირალს. პრაიმერების გარდა სინჯარები შეიცავდა ჯაჭვის დაგრძელებისათვის საჭირო რეაგენტებს და ტერმინატორ დიდუოქსინუკლეოტიდ ტრიფოსფატებს (ddNTP): ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP. რეაქციის ინიციაცია ხდებოდა სინჯის და თერმოსტაბილური დნმ პოლიმერაზას დამატებით, რომელსაც გაჩნია მაღალი აფინურობა ddNTP-ის მიმართ. როცა იწყებოდა

ციკლური რეაქცია, პრაიმერები ემაგრებოდა სამიზნე დნმ-ს და ხდებოდა მათი დაგრძელება. შემდეგ ხდებოდა ტერმინაცია ddNTP-ის მიმაგრებით. აღწერილი პროცესი გრძელდებოდა 30 ციკლის განმავლობაში. თითოეული პრაიმერიდან მიიღებოდა ძალიან დიდი რაოდენობით ე.წ. "ტერმინირებული" პროდუქტი. 30 ციკლის შემდეგ რეაქცია ჩერდებოდა შემაჩერებელი "STOP" ხსნარის დამატებით.

CLIP სექვენირების რეაქციის პირობები:

CLIP Master Mix

DNase-free water	79.00
CLIP BUF	20.00
CLIP ENZ	3.75

1 ციკლი	30 ციკლი	1 ციკლი
94°C - 5 წთ	94°C - 20 წმ	70°C - 5 წთ
	56°C - 20 წმ	4°C - ∞
	70°C - 1.5 წთ	

3. CLIP სექვენირების პროდუქტის ელექტროფორეზი პოლიაკრილამიდის გელზე და დეტექცია ლაზერით ინდუცირებული ფლუორესცენციით

CLIP სექვენირების რეაქციის დასრულების და რეაქციის შემაჩერებელი ხსნარის დამატების შემდეგ სარეაქციო ნარევი კიდევ ერთხელ ხურდებოდა იმისათვის, რომ მომხდარიყო ორმაგი დნმ-ის ფრაგმენტების განცალკევება. ამის შემდეგ ხდებოდა ფრაგმენტების გადატანა MicroCell 500 შუშის კასეტაზე, რომელიც შეიცავდა ულტრა თხელ პოლიმერიზებულ პოლიაკრილამიდის გელს. პოლიაკრილამიდის გელი წარმოქმნიდა მატრიცას ფორების სპეციფიური ზომით. გელის შემადგენლობაში შედიოდა შარდოვანა, რომელიც უზრუნველყოფდა დნმ-ის განცალკევებულ, ერთმაგ მდგომარეობაში ყოფნას. ბუფერის ხსნარის საშუალებით ხდებოდა გელის ზედა და ქვედა ნაწილებს შორის კონტაქტის შენარჩუნება. მაღალი ძაბვის საშუალებით უარყოფითად დამუხტული დნმ-ის ფრაგმენტები გადაადგილდებოდა გელში ანოდის

მიმართულებით. დნმ-ის ფრაგმენტების მიგრაციის სიჩქარე პირდაპირ პროპორციულია აკრილამიდის გელში ფორების ზომისა; რაც უფრო მცირე ფრაგმენტი, მით უფრო ჩქარა გადაადგილდება ის ანოდისაკენ. პოლიაკრილამიდის გელის ბოლოსაკენ ლაზერის სხივი ანათებდა დნმ-თან შეკავშირებულ ფლუორესცენტულ საღებავს. დეტექტორის საშუალებით ხდებოდა ფლუორესცენტული საღებავის მიერ წარმოქმნილი სხივის სიგრძის გაზომვა. ამ გამოსხივების მაჩვენებელი გადაეცემოდა სამუშაო პლატფორმას, რომელიც ინახავდა მონაცემებს. სექვენირების თითოეულ რეაქციას სჭირდებოდა ოთხი ზოლი თითოეული ტერმინატორი დიდუოქსინუკლეოტიდისათვის (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP).

თითოეული სამიზნისათვის ხდებოდა ამპლიკონის ორი უბნის (პროტეაზა და რევერს ტრანსკრიპტაზა) ორმხრივი სექვენირება CLIP პრაიმერების გამოყენებით:

პროტეაზა (Protease) : პროტეაზას გენის ორმხრივი სექვენსი (კოდონები 10-99) და 1-9 კოდონების სექვენსი ერთი მიმართულებით მაინც.

პროტეაზა 2 (P2) : პროტეაზას გენის ორმხრივი სექვენსი (კოდონები 21-99) და 7-20 კოდონების სექვენსი ერთი მიმართულებით მაინც.

რევერს ტრანსკრიპტაზას დასაწყისი (RT Beginnig): რევერს ტრანსკრიპტაზას დასაწყისის ორმხრივი სექვენსი (კოდონები 41-139) და 140-142 და 40 კოდონების სექვენსი ერთი მიმართულებით მაინც.

რევერს ტრანსკრიპტაზას შუა (RT Middle): რევერს ტრანსკრიპტაზას შუა ნაწილის ორმხრივი სექვენსი (კოდონები 148-237) და 138-147 და 238-247 კოდონების სექვენსი ერთი მიმართულებით მაინც.

კომპიუტერული პროგრამის საშუალებით ხდებოდა მიღებული მონაცემების დამუშავება, შეერთება და დნმ სექვენსის გაშიფვრა: ნუკლეოტიდური თანმიმდევრობის წაკითხვა.

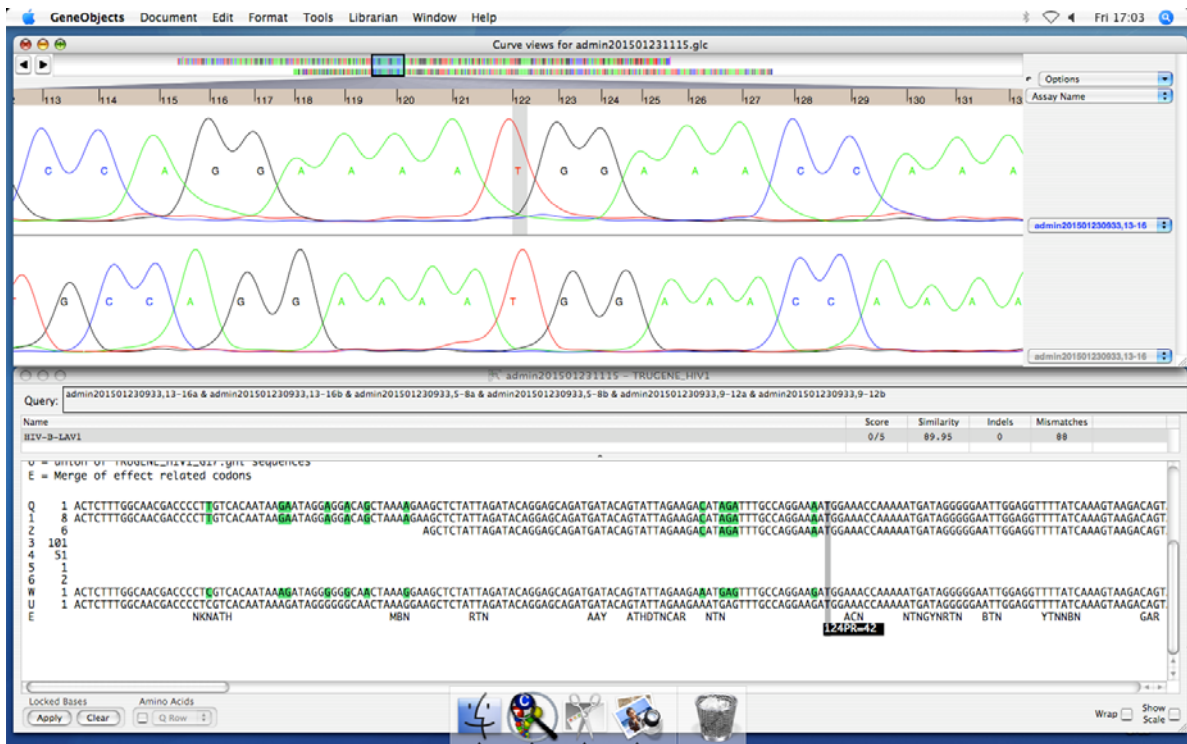
ელექტროფორეზის პირობები:

გელის ტემპერატურა (°C)	60 °C
ძაბვა (V)	2000 V
ლაზერის სიმძლავრე (%)	50 %
წაკითხვის ინტერვალი (წმ)	0.5 წმ

4. CLIP სექვენსების ორმხრივი (წაღმა და უკუღმა) ანალიზი OpenGene DNA System -ის კომპიუტერული პროგრამის საშუალებით

OpenGene DNA Sequencing System -ის კომპიუტერული პროგრამის საშუალებით ორივე მიმართულების სექვენსები ერთიანდებოდა და ხდებოდა მათი შედარება აივ-1-ის ველური ტიპის HIV-1 LAV-1. (სურათი 11) პროგრამა აღმოაჩენს საკვლევ ვირუსში HIV-1 LAV-1 -გან ყველა განსხვავებას - მუტაციას. მკვლევარი/ოპერატორი ამოწმებდა სექვენსს მთელ სიგრძეზე და შეჰქონდა საჭირო შესწორებები, რადგანაც პროგრამა ავტომატურად ვერ ახდენს ყველა შესაძლო ცვლილების დაფიქსირებას (მაგ. დელეციები და ჩანართები). როდესაც მკვლევარი/ოპერატორი ასრულებდა შესწორებების შეტანას, პროგრამის საშუალებით ხდებოდა რეზისტენტობის დასკვნის - TRUGENE HIV-1 Resistanc Report - შექმნა. (სურათი 12) დასკვნა ეფუძნებოდა კრიტერიუმების მთელ რიგს, რომელიც შემუშავებულია აივ-1-ის კლინიკური და სამეცნიერო საერთაშორისო ექსპერტების მიერ. სწორედ ეს კრიტერიუმები იყო გამოყენებული სისტემის პროგრამაში - GuideLines™ Rules.

სურათი 11. დნმ სექვენსის ანალიზი OpenGene DNA Sequencing System -ის კომპიუტერული პროგრამის საშუალებით



სურათი 12. TRUGENE HIV-1 რეზისტენტობის დასკვნა

TRUGENE® HIV-1
Genotyping Test
GuideLines™ Rules 17.0
RESISTANCE REPORT

Sample ID: 2148-N415
 Patient ID: 2148-N415
 Patient Name: Name
 Date Drawn: 071014
 Physician:
 Institution:
 Report Date: 2014/12/19

Tel:
 Fax:

Resistance associated RT Mutations: L74V, V90I, K103N, Y181C*, M184V*, G190A

Nucleoside and Nucleotide RT Inhibitors	Resistance Interpretation
abacavir (ABC)	Resistance
didanosine (ddI)	Resistance
lamivudine (3TC)/emtricitabine (FTC)	Resistance
stavudine (d4T)	No Evidence of Resistance
tenofovir (TDF)	No Evidence of Resistance
zidovudine (AZT)	No Evidence of Resistance

NonNucleoside RT Inhibitors	Resistance Interpretation
efavirenz (EFV)	Resistance
etravirine (ETR)	Possible Resistance
nevirapine (NVP)	Resistance
rilpivirine (RPV)	No Evidence of Resistance

Resistance associated PR Mutations: K20M, M36I, V82A*

Protease Inhibitors	Resistance Interpretation
atazanavir (ATV)	No Evidence of Resistance
ATV/r **	No Evidence of Resistance
darunavir + ritonavir (DRV/r)	No Evidence of Resistance
fosamprenavir (FPV)	No Evidence of Resistance
FPV/r **	No Evidence of Resistance
indinavir (IDV)	Resistance
IDV/r **	Possible Resistance
lopinavir + ritonavir (LPV/r)	No Evidence of Resistance
nelfinavir (NFV)	Resistance
saquinavir + ritonavir (SQV/r)	Possible Resistance
tipranavir + ritonavir (TPV/r)	No Evidence of Resistance

** Protease Inhibitors administered with low-dose ritonavir for pharmacological boosting.

Resistance interpretation is based upon interpretation by an international expert panel (The Consensus Panel) of *in vitro* and *in vivo* data including phenotypic and virologic response data available as of June 2011 for correlation of Protease and RT sequences to antiretroviral drug resistance. These include primary and secondary mutations.

* Codons marked with an asterisk pertain to Comment(s) in italics in the Mutation Details sections.

Signature: _____ Date: _____
 Name (Print): _____ Title: _____

Treatment decisions should be made in consideration of all relevant clinical and laboratory findings and the prescribing information of the drugs in question. The TRUGENE® HIV-1 Genotyping Test Resistance Report uses GuideLines™ Rules developed by an international expert panel. Results obtained with different assay methods or interpretation tools should not be used interchangeably.

For in vitro Diagnostic Use. HIV-1 Genotype analysis by DNA sequencing.

DR 4.5 (2011/11/16) GuideLines™ 17.0 (2011/06/11) © 2012 Siemens Healthcare Diagnostics. All Rights Reserved. GeneObjects™ 4.1 (2008/05/26) / TRUGENE_HIV1_G17.gnl (2011/07/15)

TRUGENE® HIV-1
 Genotyping Test
GuideLines™ Rules 17.0
RESISTANCE REPORT

Sample ID: 2148-N415
 Patient ID: 2148-N415
 Patient Name: Name
 Date Drawn: 071014
 Physician:
 Institution:
 Report Date: 2014/12/19

Tel:
 Fax:

Mutation Profile

Resistance Associated Mutations

PR	RT
58 (AAG) K20K/M (AwG)	220 (TTA) L74V (GTA)
106 (ATG) M36I/M (ATr)	268 (GTT) V90I/V (RTT)
244 (GTC) V82AV (GYC)	307 (AAA) K103N (AAY)
	541 (TAT) Y181Y/C (TrT)
	550 (ATG) M184V (GTG)
	568 (GGA) G190A/G (GSA)

The following codons that differ from the reference sequence were identified and may be useful as a baseline determination of virus genotype. These codon differences result in amino acid changes.

PR	RT
37 (ATA) I13V (GTA)	178 (GTA) V60I (ATA)
43 (ATA) I15V (GTA)	247 (AGA) R83K (AAA)
103 (GAA) E35D (GAC)	364 (GAA) E122K/E (RAA)
109 (AGT) S37N/T (AmT)	403 (ATA) I135T (ACA)
169 (AGA) R57K/R (ARA)	484 (AGT) S162Y (TAT)
187 (CTC) L63P/L (CyT)	598 (ACA) T200A (GCA)
190 (ATA) I64V (GTA)	619 (CAA) Q207K (AAA)
	631 (AGG) R211K (AAG)
	640 (CTT) L214F (TTT)

The following codons that differ from the reference sequence were identified and may be useful as a baseline determination of virus genotype. These codon differences do not result in amino acid changes.

PR	RT
40 (AAG) K14K (AAA)	157 (GAA) E53E (GAG)
64 (GCT) A22A (GCy)	199 (GAC) D67D (GAT) ***
94 (GTA) V32V (GTG) ***	316 (GTA) V106V (GTM) ***
127 (AAA) K43K (AAG) ***	325 (CTG) L109L (CTR)
160 (ATC) I54I (ATT) ***	349 (TCA) S117S (TCM)
	370 (TTC) F124F (TTT)
	442 (GTG) V148V (GtA)
	499 (ATC) I167I (ATY)
	505 (GAG) E169E (GAR)
	574 (GAC) D192D (GAY)
	607 (GAG) E203E (GAA)
	610 (GAG) E204E (GAA)
	613 (CTG) L205L (TTR)
	679 (TTC) F227F (TTY) ***
	709 (GAT) D237D (GAC)
	721 (GTA) V241V (GTC)

*** Difference is located at a resistance site.

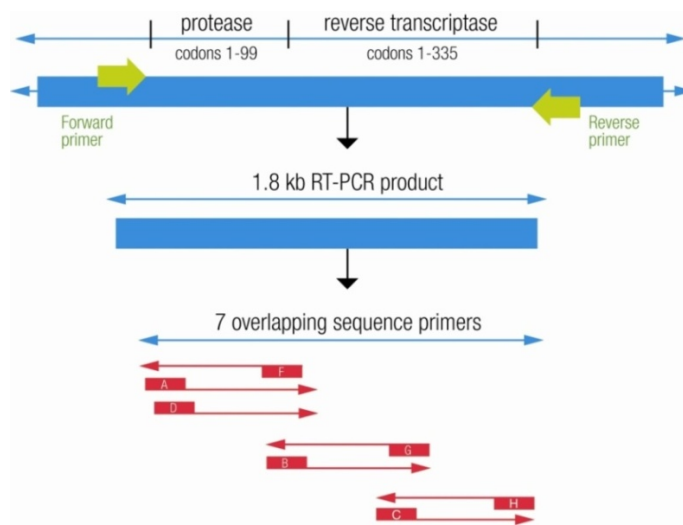
COMMENTS:

Treatment decisions should be made in consideration of all relevant clinical and laboratory findings and the prescribing information of the drugs in question.
 The TRUGENE® HIV-1 Genotyping Test Resistance Report uses GuideLines™ Rules developed by an international expert panel.
 Results obtained with different assay methods or interpretation tools should not be used interchangeably.
For in vitro Diagnostic Use. HIV-1 Genotype analysis by DNA sequencing.
 DR 4.5 (2011/11/16) GuideLines™ 17.0 (2011/06/11) © 2012 Siemens Healthcare Diagnostics. All Rights Reserved.
 GeneObjects™ 4.1 (2008/05/26) / TRUGENE_HIV1_G17.gnl (2011/07/15)

აივ-1-ის გენოტიპირება ViroSeq HIV-1 Genotyping System v2.0 - ის გამოყენებით კაპილარულ სექვენატორ ABI xL3500 -ზე

ViroSeq HIV-1 Genotyping System v2.0 - ის (Abbott Molecular, Wiesbaden, Germany) გამოყენებით კაპილარულ სექვენატორ ABI xL3500 (Applied Biosystems®, USA) -ზე ხდება აივ-1-ის pol გენში რევერს ტრანსკრიპტაზას (RT) და პროტეაზას (PR) გენების სურათზე (სურათი 13) გამოსახული უბნების ანალიზი.

სურათი 13. ViroSeq HIV-1 Genotyping System v2.0-ში გაანალიზებული pol გენის უბანი



წყარო: (www.abbottmolecular.com)

ანალიზი მოიცავდა შემდეგ ეტაპებს:

1. სამიზნე რნმ-ის (RNA) რევერს ტრანსკრიპცია (RT)

გამოყოფილი რნმ ხურდებოდა 65 °C -ზე, რაც არღვევდა რნმ-ის მეორეულ სტრუქტურებს. სინჯები გრილდებოდა და იქმნებოდა იდეალური პირობები ფერმენტების მოქმედებისათვის. რნმ-ს ემატებოდა გამზადებული სარეაქციო ხსნარი:

RT Master Mix

RT Master Mix	8.0 µL
RNaseIN	1.0 µL
MuLV Reverse Transcriptase	1.0 µL
DTT	0.4 µL

იწყებოდა რევერს ტრანსკრიპცია. ხსნარის გზურებით 99 °C-მდე ინაქტივირდებოდა ფერმენტი MuLV Reverse Transcriptase და რეაქცია წყდებოდა. სარეაქციო ხსნარი მზად იყო პოლიმერაზული ჯაჭვური რეაქციისათვის (PCR).

RT რეაქციის პირობები:

65°C	30 წმ
42°C	5 წმ
მანუალურად ემატება RT Master Mix	
42°C	60 წმ
99°C	5 წმ
99°C	4°C - ∞

2. პოლიმერაზული ჯაჭვური რეაქცია (PCR)

PCR რეაქცია დეტალურად აღწერილია ზემოთ.

RT რეაქციის პროდუქტი ემატებოდა PCR მასტერ მიქსს.

PCR რეაქციის პირობები:

PCR Master Mix

PCR Master Mix	29.5 µL
AmpliTaq Gold DNA Polymerase	0.5 µL
AmpErase UNG	1.0 µL

1 ციკლი	40 ციკლი	1 ციკლი
50°C - 10 წმ	93°C - 20 წმ	72°C - 10 წმ
93°C - 12 წმ	64°C - 45 წმ	4°C - ∞
	66°C - 3 წმ	

3. სექვენირების რეაქცია

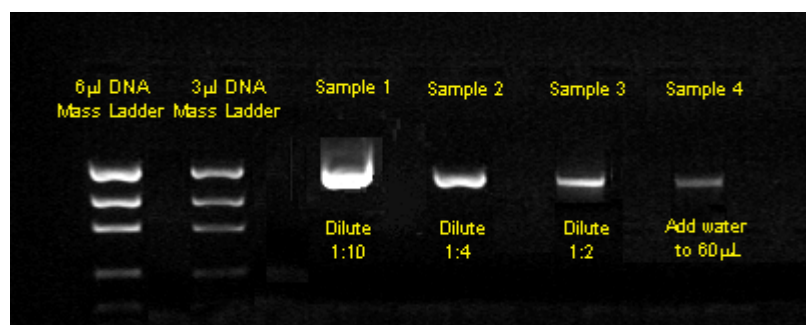
ვახდენდით PCR რეაქციის შედეგად მიღებული პროდუქტის ელექტროფორეზს 1%-იანი აგაროზის გელზე. გელის შეფასება ხდებოდა ფოტოდოკუმენტაციის ხელსაწყოების საშუალებით.

სექვენირების რეაქციამდე საჭირო იყო PCR რეაქციის შედეგად მიღებული პროდუქტის გასუფთავება ფერმენტით. PCR პროდუქტს ემატებოდა გამწმენდი ფერმენტი და მუშავდებოდა შემდეგ პირობებში:

37 °C	15 წთ
80 °C	15 წთ
4 °C	∞

შემდეგ ეტაპზე ხდებოდა ენზიმით გასუფთავებული PCR პროდუქტის დამოხდილი და დეიონიზებული (ddH₂O) წყლით განზავება შემდეგი ცხრილის მიხედვით:

აგაროზის გელზე პროდუქტის ინტენსივობა	ddH ₂ O-ით განზავება
20 - 40 ng	მოცულობა ივსება 60 µL -მდე
40 - 60 ng	1 : 2
60 - 100 ng	1 : 4
> 100 ng	1 : 10



მიღებული გასუფთავებული და შესაბამისად განზავებული პროდუქტი გამოიყენებოდა სექვენირების რეაქციაში. სექვენირების რეაქცია მიმდინარეობდა შემდეგ პირობებში:

თითო HIV-1 SEQ Mix თითო სინჯარაში

HIV-1 SEQ Mix A

HIV-1 SEQ Mix B

HIV-1 SEQ Mix C

HIV-1 SEQ Mix D 12 µL

HIV-1 SEQ Mix F

HIV-1 SEQ Mix G

HIV-1 SEQ Mix H

გასუფთავებული და

განზავებული PCR პროდუქტი 8 µL

25 ციკლი	1 ციკლი
96°C - 10 წმ	4°C - ∞
50°C - 5 წმ	
60°C - 4 წმ	

4. სექვენირების რეაქციის პროდუქტის გასუფთავება

სექვენსების გასუფთავება ხდებოდა ნატრიუმის აცეტატის (3M, Ph 5.2) და აბსოლუტური ეთანოლის ხსნარით.

5. სექვენსების ანალიზი

სექვენირების შედეგების აღქმა და შეგროვება ხორციელდებოდა კაპილარული სექვენატორის ABI xL3500 (Applied Biosystems®, USA) -ის კომპიუტერული პროგრამის საშუალებით, რომელსაც ეწოდება "Data Collection Software".

აქედან შედეგები გადაგვქონდა მეორე კომპიუტერულ პროგრამაში, ViroSeq 2.8 (Celera Diagnostics, Alameda, CA, USA), რომლის საშუალებითაც ხდებოდა შედეგების საბოლოო ანალიზი. როდესაც მკვლევარი/ოპერატორი ასრულებდა შესწორებების შეტანას, პროგრამის საშუალებით ხდებოდა რეზისტენტობის დასკვნის - ViroSeq HIV-1 Antiretroviral Resistance Report - შექმნა (სურათი 14) . დასკვნა ეფუძნებოდა კრიტერიუმების მთელ რიგს, რომელიც შემუშავებულია აივ-1-ის კლინიკური და სამეცნიერო საერთაშორისო ექსპერტების მიერ.

სურათი 14. ViroSeq HIV-1 რეზისტენტობის დასკვნა



ViroSeq™ HIV-1 Antiretroviral Drug Resistance Report

Patient ID	2757-N742	Testing Laboratory	Infectious Diseases AIDS Center
Patient Name Last	██████████	Lab Director	
Patient Name First MI	-----	Department ID	Virology Laboratory
Accession Number	-----	Mailstop	
Patient Gender	Not Available	Street Address1	16 Kazbegi Ave
Patient Birthdate & Age		Street Address2	
Report Generated By	admin	City	Tbilisi
Report Date & Time	16 Mar 2014, 11:34:57 PM, GMT+04:00	State/Province	
Ordering Physician		Postal Code	0160
Institution		Country	Georgia
Date Drawn		Telephone/Fax	
Assay Operator		E-mail	
Field1		Web Site	
Field2			

Drug Class	Drug	Evidence of Resistance
NRTI	EPIVIR® (lamivudine, 3TC)	None
	EMTRIVA® (emtricitabine, FTC)	None
	RETROVIR® (zidovudine, AZT)	None
	VIDEX® (didanosine, ddI)	None
	ZERIT® (stavudine, d4T)	None
	ZIAGEN® (abacavir, ABC)	None
VIREAD® (tenofovir, TDF)	None	
NNRTI	RESCRIPTOR® (delavirdine, DLV)	Resistance***
	SUSTIVA® (efavirenz, EFV)	Resistance***
	VIRAMUNE® (nevirapine, NVP)	Resistance***
PI ⁺	INTELENCE™ (etravirine, ETR)	None
	AGENERASE® (amprenavir, APV)	None
	LEXIVA® (fosamprenavir, FOS)	None
	CRIVAN® (indinavir, IDV)	None
	FORTOVASE® / INVIRASE® (saquinavir, SQV)	None
	KALETRA® (lopinavir + ritonavir, LPV)	None
	PREZISTA® (darunavir, DRV)	None
	VIRACEPT® (nelfinavir, NFV)	None
REYATAZ® (atazanavir, ATV)	None	
APTIVUS® (tipranavir, TPV)	None	

Drug Class	Drug Resistance Mutations Identified
NRTI	
NNRTI	Y188H, Y188L
PI	

* NOTE: At least one mutation used to determine Evidence of Resistance for this drug has not been fully validated.
 ** NOTE: At least one mutation used to determine Evidence of Resistance for this drug has not been clinically verified.
 *** NOTE: For at least one mutation used to evaluate Evidence of Resistance for this drug, both notes above apply.
 + Evidence of Resistance for Protease Inhibitors estimates response to ritonavir-boosted regimens. Refer to section titled "Notes on Evidence of Resistance".

Review & Release of Results

Signature / Date: _____ Name(Print) / Title: _____
 Notes: _____



ViroSeq™ HIV-1 Antiretroviral Drug Resistance Report

HIV-1 Resistance Mutation List:

Mutation Notation Key:

{Red Bold Curly Bracket}

[Blue Bold-Italics Square Bracket]

(Black Parenthesis)

<Green Angle Bracket>

*

**

Presence of this mutation alone confers viral resistance

Presence of this mutation alone confers the possibility of viral resistance

This mutation must appear with at least one other mutation to confer the possibility of viral resistance

This mutation counters resistance

NOTE: This mutation has not been fully validated

NOTE: This mutation has not been clinically verified

NOTE: For this mutation, both notes above apply

Drug Class	Drug(s)	Mutations Included within the Algorithm
NRTI	EPIVIR® (lamivudine, 3TC) & EMTRIVA® (emtricitabine, FTC)	{M184I**,M184V} [K65R,69ins**] (M41L,E44D*,A62V,K65N***,D67E/G***,D67N*,K70E***,K70R,V75I*,F77L,F116Y,V118I,Q151L***,Q151M,L210W,T215F/Y,K219E/Q,K219N/R***)
	RETROVIR® (zidovudine, AZT)	{69ins**,Q151M} [Q151L***,T215F/Y,T215C/D/E/I/S/V***] (M41L,E44D*,A62V,D67E/G***,D67N*,K70R,V75I*,F77L,F116Y,V118I,L210W,K219E/Q,K219N/R***)
	VIDEX® (didanosine, ddl)	{69ins**,L74I***,L74V,Q151M} [K65R,Q151L***] (M41L,E44D*,A62V,K65N***,D67E/G***,D67N*,T69D,T69N***,K70E***,V75A/S/M/T***,V75I*,F77L,F116Y,V118I,L210W,T215F/Y,T215C/D/E/I/S/V***,K219E/Q,K219N/R***)
	ZERIT® (stavudine, d4T)	{69ins**,V75A/M/S/T***,Q151M} [Q151L***,T215F/Y,T215C/D/E/I/S/V***] (M41L,E44D*,A62V,K65R,D67E/G***,D67N*,K70R,V75I*,F77L,F116Y,V118I,L210W,K219E/Q,K219N/R***)
	ZIAGEN® (abacavir, ABC)	{69ins**,Q151M} [K65R,L74I***,L74V, Q151L***,Y115F*] (M41L,E44D*,A62V,K65N***,D67E/G***,D67N*,K70E***,V75I*,F77L,F116Y,V118I,M184I**,M184V,L210W,T215C/D/E/I/S/V***,T215F/Y)
	VIREAD® (tenofovir, TDF)	{K65R,69ins**} (M41L,E44D*,A62V,K65N***,D67N*,D67E/G***,K70E***,K70R,V75I*,F77L,Y115F*,F116Y,V118I,Q151L***,Q151M,L210W,T215F/Y,T215C/D/E/I/S/V***,K219E/Q,K219N/R***)
NNRTI	RESCRIPTOR® (delavirdine, DLV)	{K103N,K103H/S/T***,V106M***,Y181C,Y181I*,Y181V***,Y188L**,P236L***,Y318F***} [A98G***,L100I*,K101E*,K101P***,V106A**,V108I*,E138K***,V179D/E/F***,Y188C**,Y188H***,G190E/Q***,P225H***,F227C***,M230L***,K238T***] (K101Q***,K103R***)
	SUSTIVA® (efavirenz, EFV)	{K103N,K103H/S/T***,V106M***,Y188L**,G190C/E/Q/T/V***,G190S*} [L100I*,K101E*,K101P***,V106A**,Y181C,Y181I*,Y181V***,Y188C**,Y188H***,G190A*,P225H***,M230L***] (A98G***,K101Q***,K103R***,V108I*,E138K***,V179D/E/F***,F227C***,K238T***,Y318F***)
	VIRAMUNE® (nevirapine, NVP)	{K103N,K103H/S/T***,V106A**,V106M***,Y181C,Y181I*,Y181V***,Y188C/L**,Y188H***,G190A/S*,G190C/E/Q/T/V***} [A98G***,L100I*,K101E*,K101P***,V108I*,E138K***,V179D/E/F***,P225H***,F227C/L***,M230L***,K238T***,Y318F***] (K101Q***,K103R***)
	INTELENCE™ (etravirine, ETR)	[V179F***,Y181C,Y181I*,Y181V***] (A98G***,L100I*,K101E*,K101P***,K103N,K103H/S/T***,V106A**,V106M***,E138K***,V179D/E***,Y188C/L**,Y188H***,G190A/S*,G190C/E/Q/T/V***,P225H***,F227C/L***,M230L***)



ViroSeq™ HIV-1 Antiretroviral Drug Resistance Report

HIV-1 Resistance Mutation List:

Mutation Notation Key:

{Red Bold Curly Bracket}	Presence of this mutation alone confers viral resistance
[Blue Bold-Italics Square Bracket]	Presence of this mutation alone confers the possibility of viral resistance
(Black Parenthesis)	This mutation must appear with at least one other mutation to confer the possibility of viral resistance
<Green Angle Bracket>	This mutation counters resistance
*	NOTE: This mutation has not been fully validated
**	NOTE: This mutation has not been clinically verified
***	NOTE: For this mutation, both notes above apply

Drug Class	Drug(s)	Mutations Included within the Algorithm
PI	AGENERASE® (amprenavir, APV) & LEXIVA® (fosamprenavir, FOS)	{150V**} [I47A***,I54L/M***,I84A/C***,I84V] (L10F/V*,L10I,L10R**,V32I*,L33F*,M46I,M46L*,M46V***,I47V*,I54A/S***,I54T*,I54V,A71I***,A71T*,A71V,G73A/C/T***,G73S*,L76V***,V82A/T,V82F/S**,L90M) <I50L***,N88S***>
	CRIVAN® (indinavir, IDV)	[V82A/T,V82F/M/S**,I84A/C***,I84V,L90M] (L10F/V*,L10I,L10R**,L24I***,V32I*,M46I,M46L*,M46V***,I47A***,I47V*,G48V,F53L*,I54A/L/M/S***,I54T*,I54V,A71I***,A71T*,A71V,G73A/C/T***,G73S*,L76V***,N88D*,N88S/T***) <I50L***>
	FORTOVA® / INVIRASE® (saquinavir, SQV)	{G48V} [I84A/C***,I84V,L90M] (L10F/V*,L10I,L10R**,L24I***,M46I,M46L*,M46V***,F53L*,I54A/L/M/S***,I54T*,I54V,A71I***,A71T*,A71V,G73A/C/T***,G73S*,V82A/T,V82F/S**) <I50L***,L76V***>
	KALETRA® (lopinavir + ritonavir, LPV)	{I47A***} [I50V**] (L10F/V*,L10I,L10R**,L24I***,V32I*,L33F*,M46I,M46L*,M46V***,I47V*,G48V,F53L*,I54A/L/M/S***,I54T*,I54V,A71I***,A71T*,A71V,G73A/C/T***,G73S*,L76V***,V82A/T,V82F/S**,I84A/C***,I84V,L90M) <I50L***>
	PREZISTA® (darunavir, DRV)	(V11I***,V32I*,L33F*,M46I,M46L*,M46V***,I47A***,I47V*,I50V**,I54A/S/L/M***,I54T*,I54V,G73A/C/T***,G73S*,L76V***,V82A/T,V82F/M/S**,V82L***,I84A/C***,I84V,L89V***,L90M) <I50L***>
	VIRACEPT® (nelfinavir, NFV)	{D30N,N88D*,N88S/T***,L90M} [L23I***,M46I,M46L*,M46V***,G48V,I54A/L/M/S***,I54T*,I54V,V82A/T,V82F/S**,I84A/C***,I84V] (L10F/V*,L10I,L10R**,L24I***,I47A***,A71I***,A71T*,A71V,G73A/C/T***,G73S*) <I50L***>
	REYATAZ® (atazanavir, ATV)	{I50L***,N88S***} [I84A/C***,I84V] (L10F/V*,L10I,L10R**,L24I***,V32I*,L33F*,M46I,M46L*,M46V***,I47A***,G48V,F53L*,I54A/S/L/M***,I54T*,I54V,A71I***,A71T*,A71V,G73A/C/T***,G73S*,V82A/T,V82F/S**,N88D*,N88T***,L90M) <L76V***>
	APTIVUS® (tipranavir, TPV)	[V82L**] (L10F/V*,L10I,L10R**,V32I*,L33F*,E35G***,K43T***,M46V***,M46I,M46L*,I47A***,I47V*,I54A/L/M/S***,I54T*,I54V,Q58E***,A71I***,A71T*,A71V,G73A/C/T***,G73S*,T74P***,V82A,V82F/S**,V82T,N83D***,I84A/C***,I84V,L90M) <I50L***,I50V***>

Notes on Evidence of Resistance:

Resistance	Mutations present constitute a high level of genetic evidence for viral resistance
Possible Resistance	Mutations present suggest the possibility of viral resistance
None	There is insufficient evidence for viral resistance

The protease inhibitor (PI) evidence of resistance interpretations were developed to estimate the expected virological response to standard doses of protease inhibitors with pharmacokinetic boosting by ritonavir. This has become the most common method of administering each of the protease inhibitors, except nelfinavir (ref. 1), to ensure adequate drug levels in all patients. Boosted PIs are more active in the presence of resistance than non-boosted PIs. (ref. 2,3)

ზემოთ აღწერილი ორივე მეთოდის-TruGene HIV-1 Genotyping System და ViroSeq HIV-1 Genotyping System- გამოყენების შემთხვევაში აივ-1 -ის რეზისტენტობის შეფასების ალტერნატიულ საშუალებად გამოიყენებოდა სტენფორდის უნივერსიტეტის ვებ გვერდზე <http://hivdb.stanford.edu/> არსებული აივ -ის წამლების მიმართ რეზისტენტობის მონაცემთა ბაზა (HIV Drug Resistance Database) და თავისუფლად ხელმისაწვდომი კომპიუტერული პროგრამა HIV DB. (HIVDB, 2013) ხდებოდა ორივე მეთოდის საშუალებით გენერირებული აივ-1-ის pol გენის ნუკლეოტიდური თანმიმდევრობის გადატანა HIV DB პროგრამაში, კომპიუტერული პროგრამაში ანალიზი და რეზისტენტობის დასკვნის შექმნა (სურათი 15).

სურათი 15. რეზისტენტობის დასკვნის შექმნა HIV DB პროგრამაში

HIVdb: Genotypic Resistance Interpretation Algorithm

<http://sierra2.stanford.edu/sierra/serve/JSierra>



HOME GENOTYPE-RX GENOTYPE-PHENO GENOTYPE-CLINICAL HIVdb PROGRAM

HIVdb: Genotypic Resistance Interpretation Algorithm

Report: 2148-N415 Date: 071014

Seq ID: 2148-N415

Summary Data

Sequence includes PR: codons: 4 - 99

Sequence includes RT: codons: 30 - 247

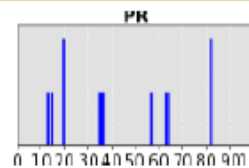
There are no insertions or deletions

Subtype and % similarity to closest reference isolate:

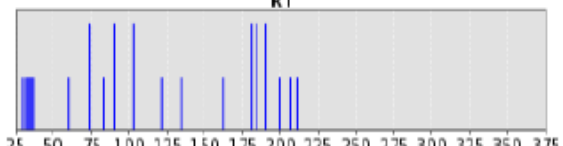
1. PR: B (94.4%)
2. RT: B (92.4%)

Sequence Quality Assessment

Gene	QA Problem	Codons
PR	Stop Codons, Frame Shifts:	None
PR	Ambiguous Positions:	None
PR	Unusual Residues:	None



Gene	QA Problem	Codons
RT	Stop Codons, Frame Shifts:	None
RT	Ambiguous Positions:	None
RT	Unusual Residues:	None



Blue lines indicate differences from consensus B; tall blue lines indicate sites associated with drug resistance. Red lines indicate QA problems.

Drug Resistance Interpretation: PR

PI Major Resistance Mutations: V82AV

PI Minor Resistance Mutations: K20KM

Other Mutations: I13V, I15V, E35D, M36IM, N37NT, R57KR, L63LP, I64V

Protease Inhibitors

atazanavir/r (ATV/r)	Low-level resistance
darunavir/r (DRV/r)	Susceptible
fosamprenavir/r (FPV/r)	Low-level resistance
indinavir/r (IDV/r)	Intermediate resistance
lopinavir/r (LPV/r)	Intermediate resistance

nelfinavir (NFV)	Intermediate resistance
saquinavir/r (SQV/r)	Low-level resistance
tipranavir/r (TPV/r)	Susceptible

PR Comments

PIMajor

- V82A is a nonpolymorphic substrate-cleft mutation selected primarily by IDV and LPV. It reduces susceptibility to these PIs and causes cross-resistance to ATV and NFV. When it occurs in combination with additional PI-resistance mutations it is also associated with reduced susceptibility to SQV and FPV.

PIMinor

- K20M/V are rare, relatively nonpolymorphic PI-selected mutations that have not been well studied.

Drug Resistance Interpretation: RT

NRTI Resistance Mutations:	L74V, M184V		
NNRTI Resistance Mutations:	V90I, K103N, Y181C, G190A		
Other Mutations:	K30Q, K32G, A33C, L34T, V35L, E36N, I37F, V60I, R83K, K122EK, I135T, S162Y, T200A, Q207K, R211K		
	Nucleoside RTI		Non-Nucleoside RTI
lamivudine (3TC)	High-level resistance	efavirenz (EFV)	High-level resistance
abacavir (ABC)	High-level resistance	etravirine (ETR)	Intermediate resistance
zidovudine (AZT)	Susceptible	nevirapine (NVP)	High-level resistance
stavudine (D4T)	Susceptible	rilpivirine (RPV)	Intermediate resistance
didanosine (DDI)	High-level resistance		
emtricitabine (FTC)	High-level resistance		
tenofovir (TDF)	Susceptible		

RT Comments

NRTI

- L74V/I cause high-level resistance to ddl and intermediate-level resistance to ABC. L74V increases susceptibility to AZT and TDF, but this increase is of uncertain clinical significance.
- M184V/I cause high-level resistance to 3TC and FTC and low-level resistance to ddl and ABC. However, M184V/I are not contraindications to continued treatment with 3TC or FTC because they increase susceptibility to AZT, TDF and d4T and are associated with clinically significant reductions in HIV-1 replication. In combination with K101E or E138K, M184I synergistically reduces RPV susceptibility.

NNRTI

- V90I is a polymorphic accessory mutation that is weakly selected in patients by each of the NNRTIs. It has a weight of 1.0 in the Tibotec ETR genotypic susceptibility score but is associated with minimal, if any, detectable reduction in NNRTI susceptibility.
- K103N is a nonpolymorphic mutation that causes high-level resistance to NVP (~50-fold reduced susceptibility) and EFV (~20-fold reduced susceptibility).
- Y181C is a nonpolymorphic mutation selected in patients receiving NVP, ETR and RPV. It reduces susceptibility to NVP, ETR, RPV, and EFV by >50-fold, 5-fold, 3-fold, and 2-fold, respectively. Although Y181C itself reduces EFV susceptibility by only 2-fold, it is associated with a reduced response to an EFV-containing regimen because viruses with this mutation often harbor additional minority variant NNRTI-resistance mutations. Y181C has a weight of 2.5 in the Tibotec ETR GSS.
- G190A is a nonpolymorphic mutation that causes high-level resistance to NVP (>50-fold reduced

ხარისხის კონტროლი

ხარისხის კონტროლის მიზნით გენოტიპირების ყველა ანალიზში გამოიყენებოდა უარყოფითი და დადებითი კონტროლები. უარყოფითი კონტროლი წარმოადგენდა აივ-1 უარყოფით პლაზმას. დადებითი კონტროლი წარმოადგენდა აივ-1 დადებით სინთეზურ სინჯს წინასწარ ცნობილი მუტაციებით.

აივ -1 -ის სუბტიპის პირველადი შეფასება

აივ-1-ის სუბტიპის პირველადი შეფასებისათვის გამოიყენებოდა სტენფორდის უნივერსიტეტის ვებ გვერდზე <http://hivdb.stanford.edu/> არსებული აივ -ის წამლების მიმართ რეზისტენტობისმონაცემთა ბაზა (HIV Drug Resistance Database) და თავისუფლად ხელმისაწვდომი კომპიუტერული პროგრამა HIV DB. (HIVDB, 2013) (სურათი 16)

სურათი 16. აივ-1-ის სუბტიპის პირველადი შეფასების HIV DB პროგრამის საშუალებით

HIVdb: Genotypic Resistance Interpretation Algorithm

<http://sierra2.stanford.edu/sierra/serve/JSierra?action=sequenceInput>



[HOME](#) [GENOTYPE-RX](#) [GENOTYPE-PHENO](#) [GENOTYPE-CLINICAL](#) [HIVdb PROGRAM](#)

HIVdb Program: Sequence Analysis

Sequence information can be entered in FASTA, plain text, or GRF (Bayer Diagnostics) format. Sequences in FASTA format or plain text can be pasted in the text box (option A) or uploaded (option B). GRF files can only be uploaded (option C). Using options A or B, it is possible to analyze up to 500 sequences at a time (character limit for A: 600,000). Example data set: [a small set \(n=10\)](#)

Different types of format can be chosen for the output: HTML, XML, Spreadsheet, or Spreadsheet Fixed Width. The output can be customized to display an analysis of sequence quality, mutation comments, mutation scores, and an optional identifier and date. For further explanations and sample datasets please see the [Release Notes](#).

Sequences

A Text Input Paste sequence text in the text box below. <input type="text"/>	
B Text File Upload Choose a file to upload from your computer using the file selection box below. <input type="button" value="Browse..."/> No file selected.	
C GRF File Upload Choose a GRF (Bayer Diagnostics) file to upload from your computer using the file selection box below. <input type="button" value="Browse..."/> No file selected.	
Identifier (Optional) <input type="text"/>	Output Analysis: <input checked="" type="checkbox"/> QA Analysis
Date (Optional) <input type="text"/>	<input checked="" type="checkbox"/> Mutation Scores <input checked="" type="checkbox"/> Mutation Comments
	Output Options: <input type="text" value="HTML output"/>
<input type="button" value="RESET"/>	<input type="button" value="ANALYZE"/>



HOME GENOTYPE-RX GENOTYPE-PHENO GENOTYPE-CLINICAL HIVdb PROGRAM

HIVdb: Genotypic Resistance Interpretation Algorithm

Report: 2148-N415 Date: 071014

Seq ID: 2148-N415

Summary Data

Sequence includes PR: codons: 4 - 99

Sequence includes RT: codons: 30 - 247

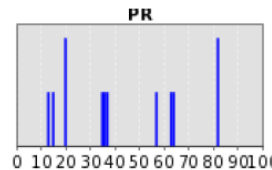
There are no insertions or deletions

Subtype and % similarity to closest reference isolate:

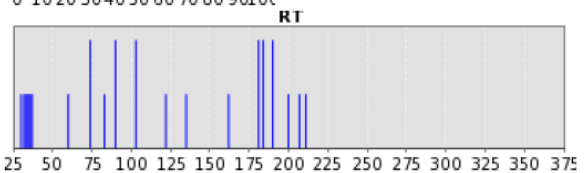
- 1. PR: B (94.4%)
- 2. RT: B (92.4%)

Sequence Quality Assessment

Gene	QA Problem	Codons
PR	Stop Codons, Frame Shifts:	None
PR	Ambiguous Positions:	None
PR	Unusual Residues:	None



Gene	QA Problem	Codons
RT	Stop Codons, Frame Shifts:	None
RT	Ambiguous Positions:	None
RT	Unusual Residues:	None



Blue lines indicate differences from consensus B; tall blue lines indicate sites associated with drug resistance. Red lines indicate QA problems.

Drug Resistance Interpretation: PR

PI Major Resistance Mutations: V82AV
 PI Minor Resistance Mutations: K20KM
 Other Mutations: I13V, I15V, E35D, M36IM, N37NT, R57KR, L63LP, I64V

Protease Inhibitors

atazanavir/r (ATV/r) Low-level resistance
 darunavir/r (DRV/r) Susceptible
 fosamprenavir/r (FPV/r) Low-level resistance
 indinavir/r (IDV/r) Intermediate resistance
 lopinavir/r (LPV/r) Intermediate resistance

ფილოგენეტიკური ანალიზი

HIV DB პროგრამის საშუალებით განსაზღვრული სუბტიპი გამოიყენებოდა როგორც სუბტიპის პირველადი შეფასება და მისი მიხედვით ხდებოდა რელევანტური რეფერენს სექვენსების შერჩევა ფილოგენეტიკური ანალიზისათვის ლოს ალამოსის ეროვნული ლაბორატორიის აივ სექვენსების ბაზაში (Los Alamos National Laboratory HIV Sequence Database) (<http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/MAP/landmark.html>) (სურათი 17)

სურათი 17. რეფერენს სექვენსების შერჩევა ლოს ალამოსის ეროვნული ლაბორატორიის აივ სექვენსების ბაზაში

Main Search Interface of HIV Sequence Database

<http://www.hiv.lanl.gov/components/sequence/HIV/search/search.htm>

HIV sequence database

DATABASES SEARCH ALIGNMENTS TOOLS PUBLICATIONS GUIDES Search Site

Sequence Search Interface

Tips
- Click or mouse over the field name for specific tips
- The *italicized fields* are listed in output by default
- To list fields that are not listed by default or included in the search, put an asterisk (*) in the input box
- Use the + and - to see more or fewer search fields
- For other details about each field, see [Help](#) or [Data Dictionary](#)

Last [GenBank](#) update: 2014-12-09
[Advanced Search](#)

Sequence Information
[Upload accession file](#) No file selected.

Accession number
Sequence name
Sequence length
exact *Sampling year*
Sampling country

virus HIV-1
Subtype Any subtype
No subtype
A
A1
A2
B
 Include [recombinants](#)

More sequence information

Find all sequences for a specific gene or region (HIV-1 and SIVcpz)
Genomic region Any complete genome
5' LTR
5' LTR R
5' LTR U3
5' LTR U5
TAR
Or define *start* and *end*
 Include [fragments](#) of minimum length

Combine database sequences with your own sequence alignment (HIV-1 and SIVcpz)

Publication Information

Patient Information

Geographical Information

Amino Acid Motif Search

Output
 Include [problematic](#) sequences
 % of non-ACGT
List records per page
show results selected show SQL

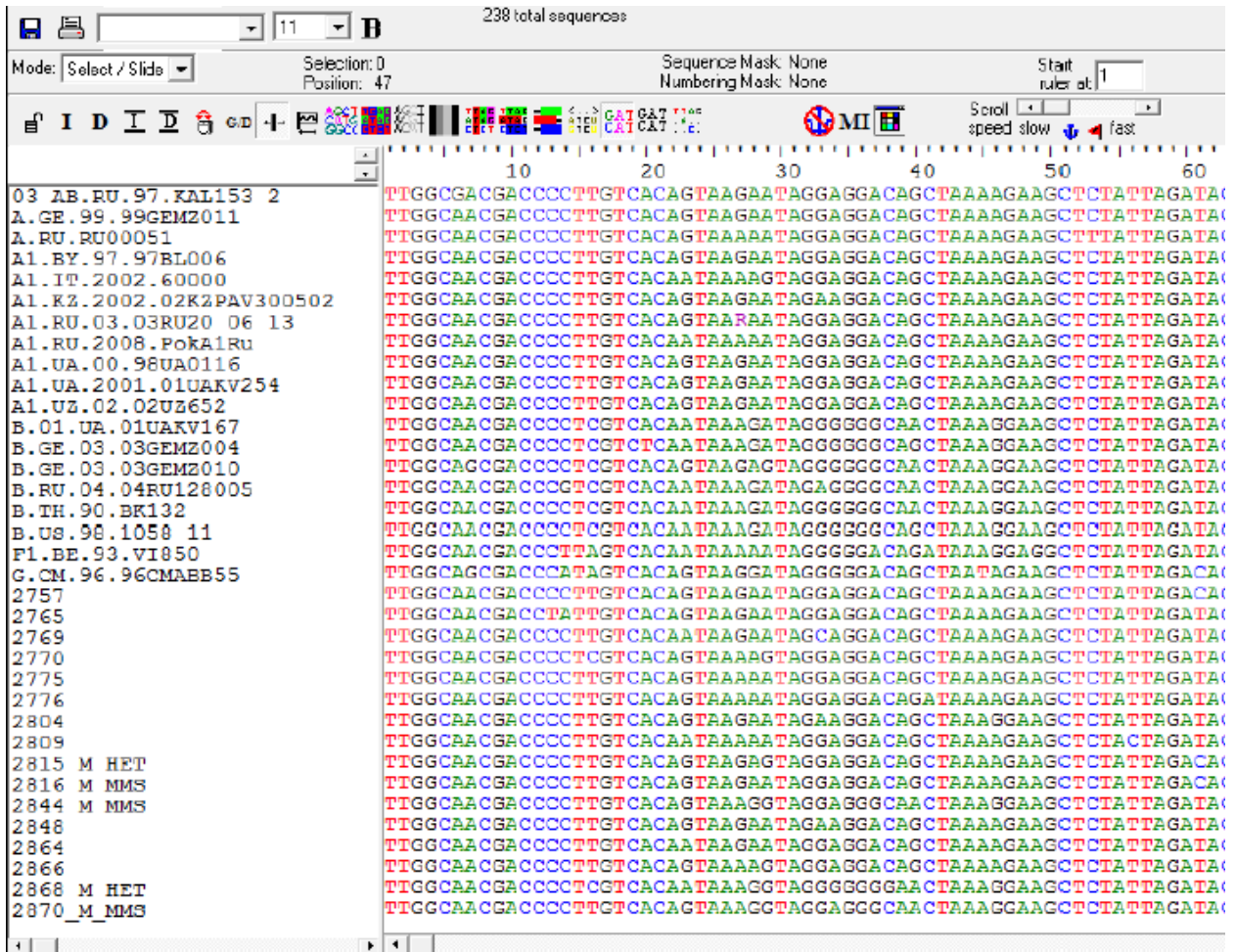
[Advanced Search](#)

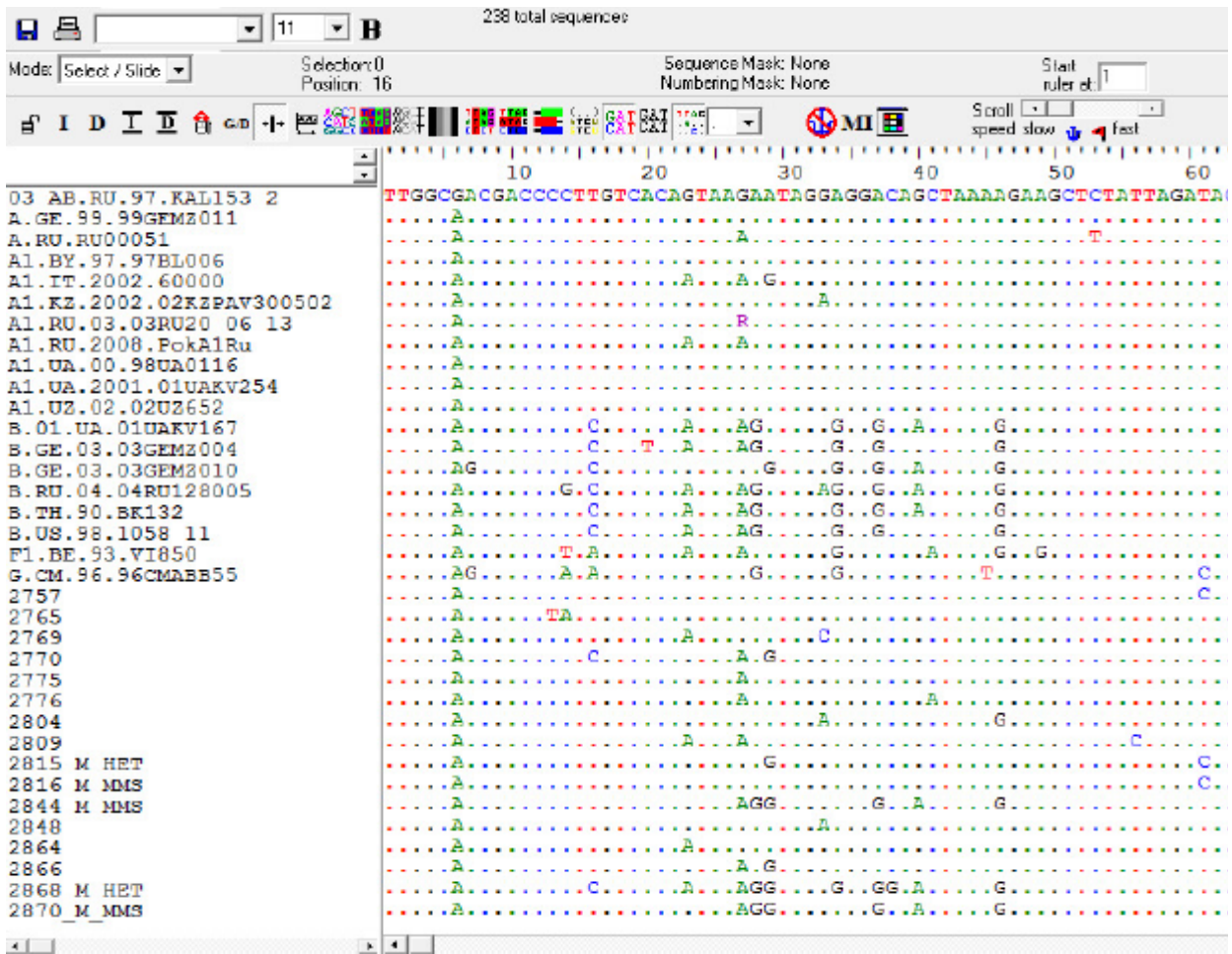
last modified: Thu Jun 12 11:51 2014

Questions or comments? Contact us at seq-info@lanl.gov.

საკვლევი სინჯების და რეფერენს სექვენსების სუკლეოტიდური თანმიმდევრების დალაგება ხდებოდა კომპიუტერულ პროგრამა CLUSTAL W - ს გამოყენებით. (Thompson, Higgins, & Gibson, 1994) საჭირო შესწორებების შეტანა ხდებოდა მანუალურად პროგრამა BioEdit -ის ვერსია 7.2.5-ში. (Hall, 2013) (სურათი 18)

სურათი 17. სექვენსების დამუშავება CLUSTAL W პროგრამაში





ვირუსის სექვენსებს შორის ფილოგენეტიკური კავშირების შეფასების მიზნით გამოიყენებოდა Neighbor Joining (NJ) მეთოდი. NJ ფილოგენეტიკურ ხეს ვაგებდით Kimura two-parameter model -ით საიმედობისათვის 1000 bootstrap რეპლიკატის გამოყენებით. ფილოგენეტიკური ანალიზი ჩატარდა კომპიუტერული პროგრამა MEGA 6.0 -ის გამოყენებით. (Tamura, Stecher, Peterson, Filipski, & Kumar, 2013)

სტატისტიკური ანალიზი

სტატისტიკური ანალიზი განხორციელდა პროგრამა SAS 9.2 მეშვეობით. პაციენტთა მახასიათებლების აღწერისათვის გამოყენებულ იქნა სტანდარტული დესკრიპციული ანალიზი. ბივარიაციული შედარებებისთვის გამოყენებულ იქნა პირსონის (Pearson) χ^2 ან ფიშერის (Fisher) ზუსტი ტესტი საჭიროებისამებრ. (Agresti, 1996) გადაცემის კლასტერის წევრობასთან დაკავშირებული ფაქტორები შესწავლილ იქნა მულტივარიაციულ ანალიზში, რისთვისაც გამოყენებულ იქნა პუასონის (Poisson) მოდიფიცირებული

რეგრესიული მოდელი. (McNutt, Wu, Xue, & Hafner, 2003; Spiegelman & Hertzmark, 2005) სტატისტიკური სარწმუნოება განისაზღვრა როგორც p სიდიდე <0.05.

ეთიკური კომისიის ნებართვა

კვლევა ნებადართული და დამტკიცებული იყო ინფექციური პათოლოგიის, შიდსის და კლინიკური იმუნოლოგიის სამეცნიერო პრაქტიკული ცენტრის, ნიუ-იორკის შტატის ჯანდაცვის დეპარტამენტის და ნიუ-იორკის სახელმწიფო უნივერსიტეტის სამედიცინო ცენტრის ეთიკური კომისიების მიერ.

კვლევის შედეგები

მასალის დახასიათება

ჯგუფი 1: ახლად დიაგნოსტირებული, არც პრეპარატებით არა ნამკურნალები 218 პაციენტი. აივ ინფექციის დიაგნოზი პაციენტებს დაესვათ 2006 - 2008 (126 პაციენტი) და 2011 -2013 (92 პაციენტი) წლებში. ორივე კვლევაში მონაწილეების უმრავლესობა იყო კაცი და ნახევარზე მეტი ინფიცირებული იყო ჰეტეროსექსუალური გზით. (ცხრილი 1)
ცხრილი 1. ჯგუფ 1 - ში პაციენტების განაწილება სქესის და აივ ინფექციის გადაცემის გზის მიხედვით

	2006-2008 წწ კვლევა (n = 126)	2011-2013 წწ კვლევა (n = 92)
საშუალო ასაკი, წლები (IQR)	33 (28-38)	39 (32-45)
სქესი, n (%)		
ქალები	52 (41.3)	28 (30.4)
კაცები	74 (58.7)	64 (69.6)
აივ -1 -ის გადაცემის გზა, n (%)		
ნარკოტიკების ინიექციური მოხმარება	52 (41.3)	30 (32.6)
ჰეტეროსექსუალური კონტაქტი	65 (51.6)	51 (55.4)
ჰომოსექსუალური კონტაქტი	5 (4.0)	10 (10.9)
უცნობი/გაურკვეველი	4 (3.2)	1 (1.1)

ჯგუფი 2: ანტირეტროვირუსულ მკურნალობაზე მყოფი პაციენტები, რომელთაც აღენიშნებოდათ ვირუსული უშედეგება. ვირუსული უშედეგობა განისაზღვრა როგორც ვირუსული დატვირთვის მაჩვენებელი >400 ასლი/მლ-ზე მკურნალობის 24 კვირაზე ან ვირუსული დატვირთვის განსაზღვრადი მაჩვენებელი თუკი ის მანამდე იყო განუსაზღვრელი. ჯგუფში შემავალი 193 პაციენტის საშუალო ასაკი იყო 39 წელი. უმრავლესობა (74%) იყო კაცი. პაციენტების ნახევარზე მეტი (53.4%) ინფიცირებული იყო ნარკოტიკების ინექციური მოხმარების გზით. (ცხრილი 2) 86.5% ინფიცირებული იყო აივ-1-ის A სუბტიპით. (ცხრილი 3) პაციენტების დაახლოებით 80% იმყოფებოდა ეფავირენცზის შემცველ ართ რეჟიმზე, დაახლოებით 20% იღებდა ნევირაპინის შემცველ ართ რეჟიმს და მხოლოდ ერთი პაციენტი იღებდა ლოპინავირის შემცველ ართ-ს. (ცხრილი 4)

ყველაზე ფართოდ გამოყენებული NRTI რეჟიმი იყო ზიდოვუდინი + ლამივუდინი (45.1%); შემდეგ აბაკავირი + ლამივუდინი (22.3%), ტენოფოვირი + ემტრიციტაბინი (21.7%) და სტავუდინი + ლამივუდინი (10.9%).

ცხრილი 2. ჯგუფ 2 - ში პაციენტების განაწილება სქესის და აივ ინფექციის გადაცემის გზის მიხედვით

	n = 193
საშუალო ასაკი, წლები (IQR)	39 (35 - 44)
სქესი, n (%)	
კაცები	143 (74.0)
ქალები	60 (25.9)
აივ -1 -ის გადაცემის გზა, n (%)	
ნარკოტიკების ინექციური მოხმარება	103 (53.4)
ჰეტეროსექსუალური კონტაქტი	77 (39.9)
ჰომოსექსუალური კონტაქტი	6 (3.1)
სისხლის გადასხმა	2 (1.0)
უცნობი	5 (2.6)

ცხრილი 3. ჯგუფ 2 - ში პაციენტების განაწილება აივ-1-ის სუბტიპის მიხედვით

	n = 193
აივ -1 -ის სუბტიპი, n (%)	
A	167 (86.5)
B	21 (10.9)
სხვა	5 (2.6)

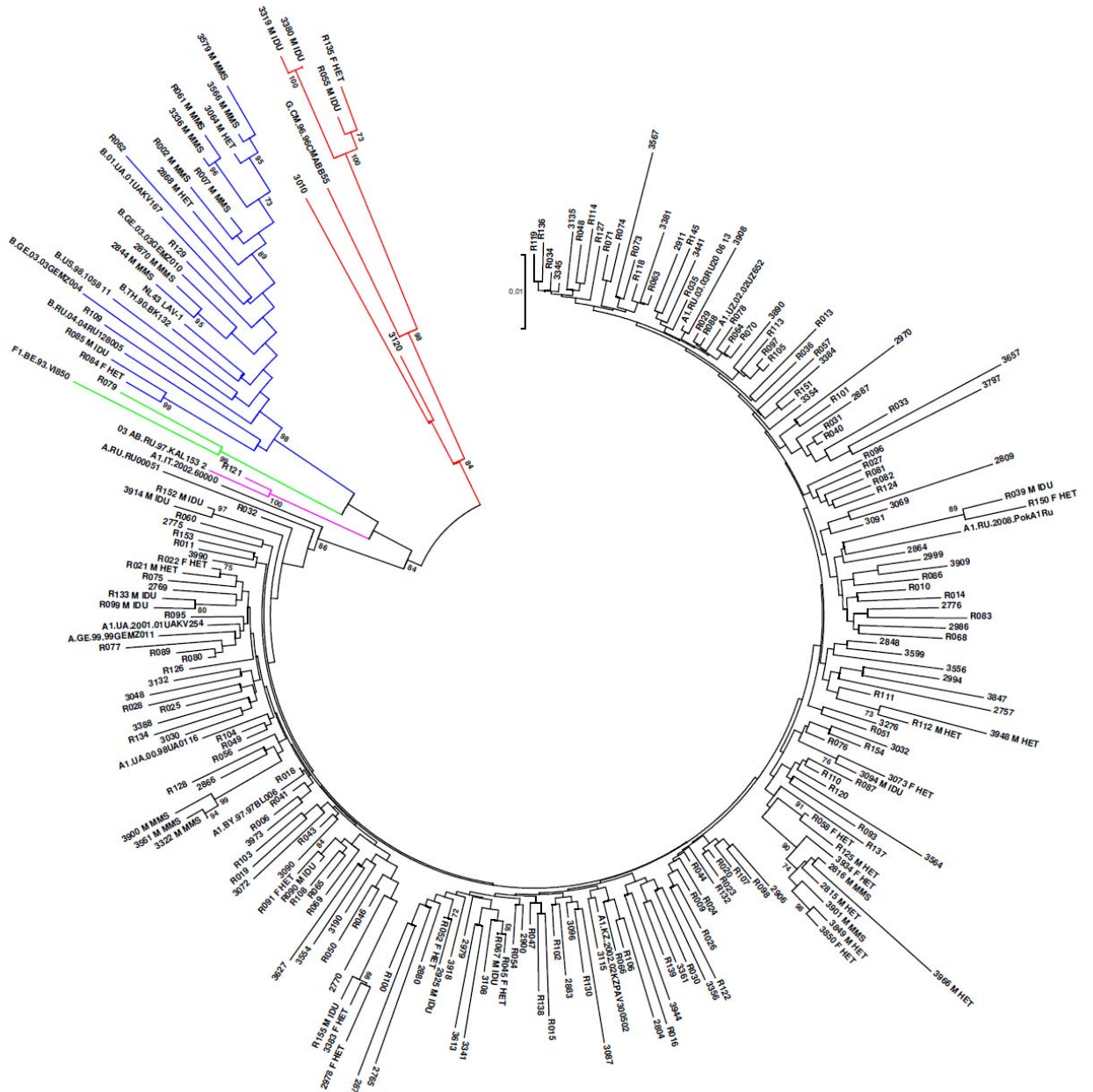
ცხრილი 4. ჯგუფ 2 - ში პაციენტების განაწილება ართ რეჟიმის მიხედვით

	n = 193
ართ რეჟიმი, n (%)	
ეფავირენცზის შემცველი	154 (79.8)
ნევირაპინის შემცველი	38 (19.7)
ლოპინავირის შემცველი	1 (0.5)

აივ-1-ის მოლეკულური ეპიდემიოლოგია საქართველოში

გამოკვლეული (n=218) ახლად დიაგნოსტირებული და ანტირეტროვირუსული პრეპარატებით არანამკურნალები პაციენტების დიდი უმრავლესობა (n=195, 89.4%) ინფიცირებული იყო აივ-1-ის A სუბტიპით; 15 (6.9%) სინჯში აღმოჩენილი იქნა ვირუსის სუბტიპი B, 6 (2.7%) სინჯში -აივ-ის სუბტიპი G. აღწერილი იქნა სუბტიპ F-ის (n=1, 0.5%) და AB_03 რეკომბინანტის ერთეული შემთხვევები (n=1, 0.5%). (სურათი 19)

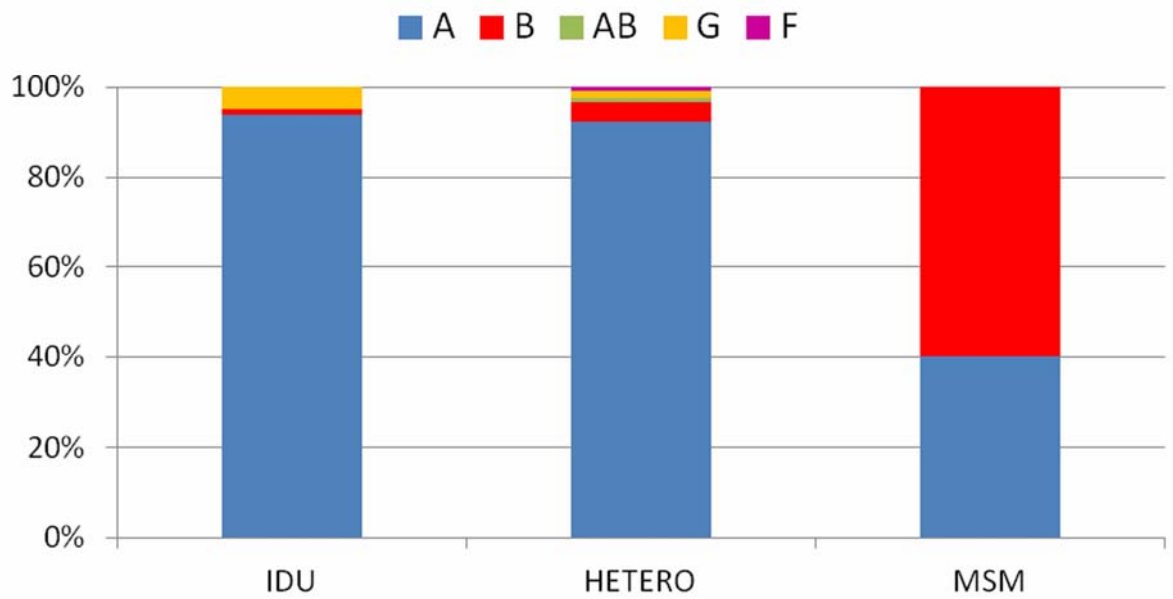
სურათი 19. აივ-1-ის *pol* უზნის ნაწილობრივი სექვენსების ფილოგენეტიკური ანალიზი



NJ ფილოგენეტიკური ხე აგებულია Kimura two-parameter model -ით საიმედოობისათვის 1000 bootstrap რეპლიკატის გამოყენებით. ფილოგენეტიკური ანალიზი ჩატარდა კომპიუტერული პროგრამა MEGA 6.0 -ის გამოყენებით. ფილოგენეტიკურ ხეზე აივ-1-ის სუბტიპი A აღნიშნულია შავად, სუბტიპი B - ლურჯად, სუბტიპი G-წითლად, სუბტიპი F-მწვანედ და AE რეკომბინატული ფორმა - იასამნისფრად.

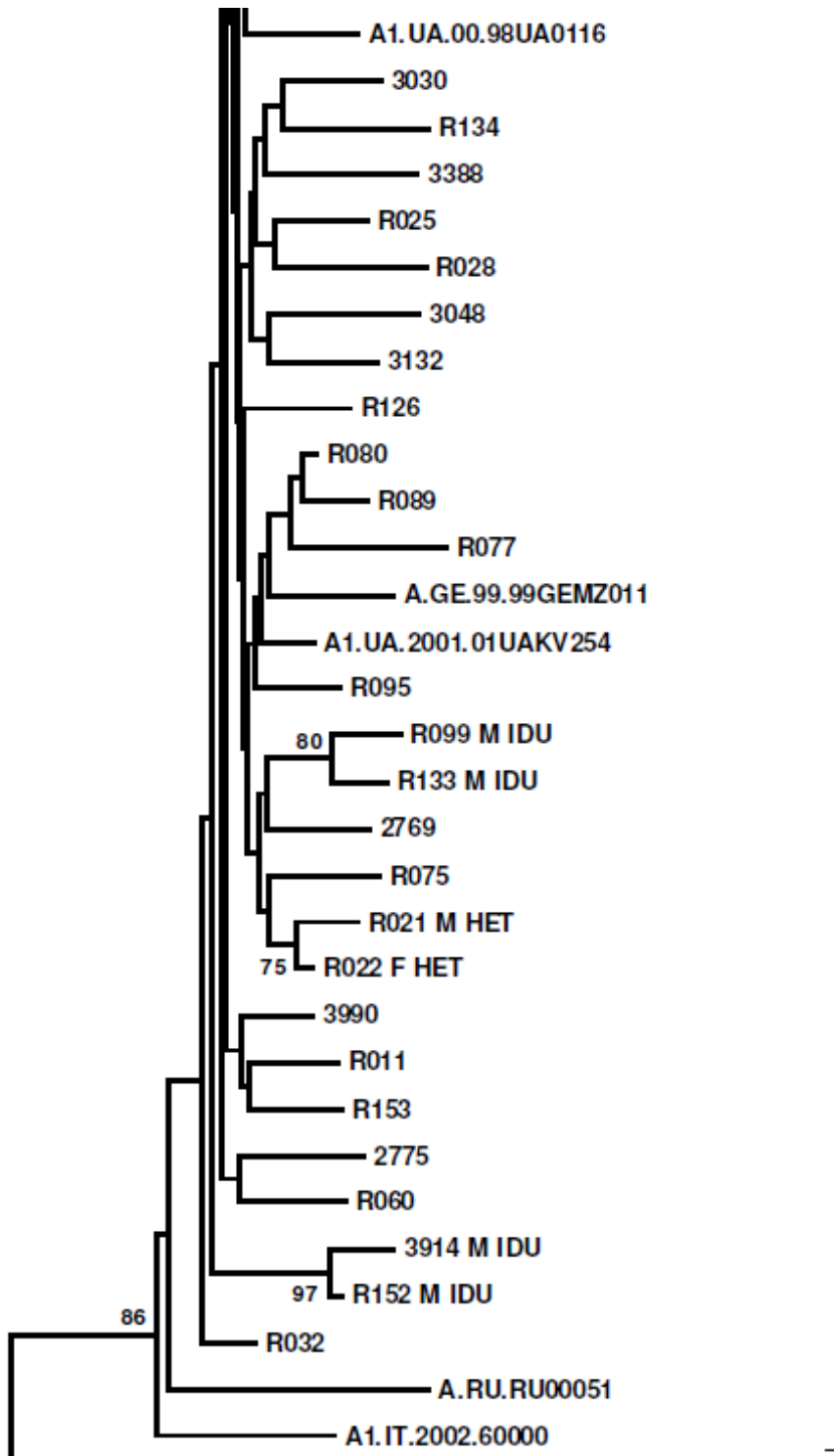
აივ-1-ის სუბტიპი A ყველაზე გავრცელებული იყო ნარკოტიკების ინიექციურ მომხმარებლებში (94%) და ჰეტეროსექსუალური გზით ინფიცირებულ პირებში (92%). ჰომოსექსუალური კონტაქტით (MSM) დაინფიცირებულ პირებში ყველაზე გავრცელებული იყო აივ-ის B სუბტიპი. (სურათი 20)

სურათი 20. აივ-1-ის სუბტიპების განაწილება ვირუსის გადაცემის გზების მიხედვით

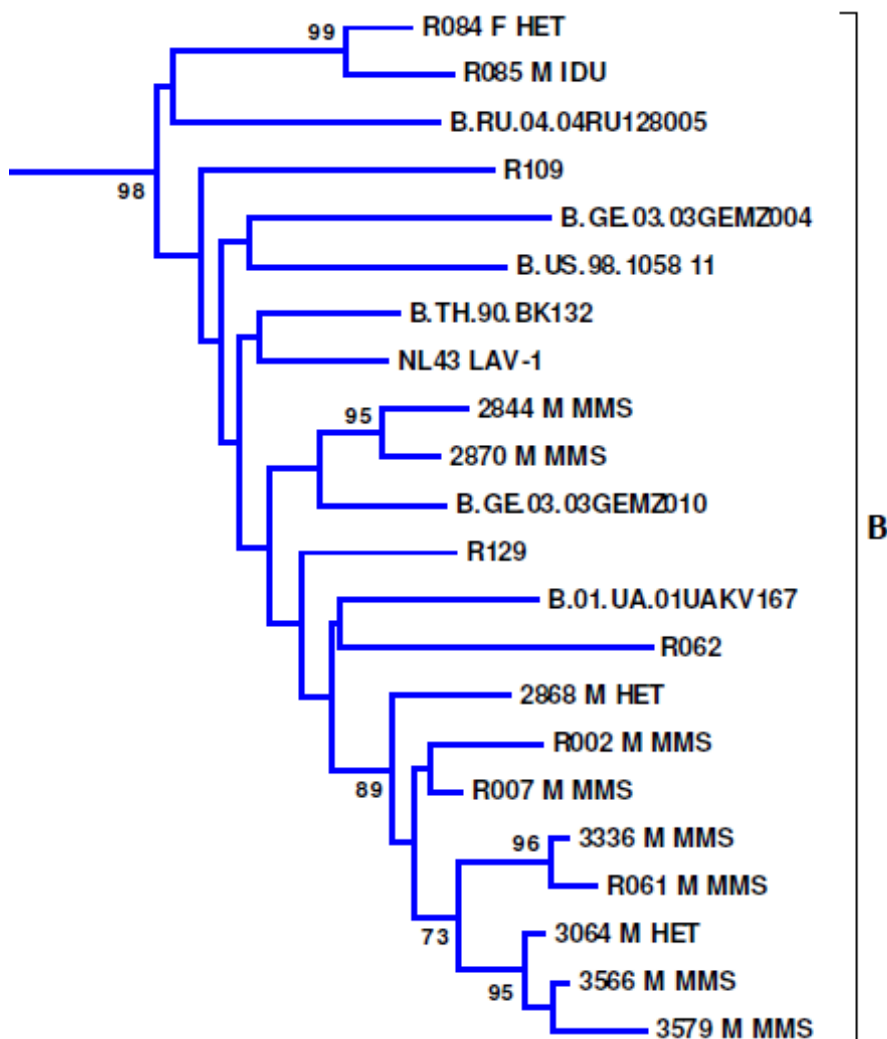


A, B და G სუბტიპის ვირუსები გაერთიანდა 3 დიდ კლასტერში (სურათი 21-23):

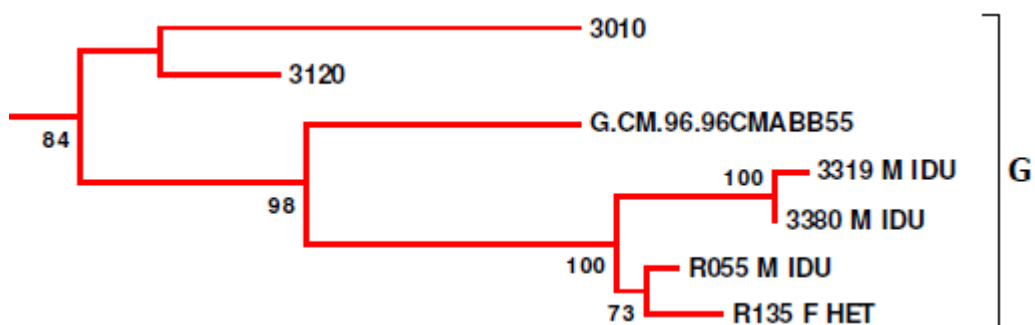
სურათი 21. სუბტიპი A-ს კლასტერი 86% სარწმუნოებით (bootstrap value) (დიდი ზომის გამო სურათზე ნაჩვენებია კლასტერის მხოლოდ ფრაგმენტი)



სურათი 22. სუბტიპი B -ს კლასტერი 98 % სარწმუნოებით (bootstrap value)



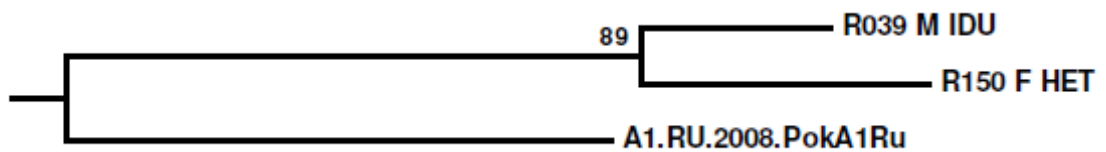
სურათი 23. სუბტიპი G-ს კლასტერი 84 % სარწმუნოებით (bootstrap value)



აივ-1-ის "გადაცემის კლასტერების" დახასიათბა (ფილოგენეტიკური ანალიზი)
 თითოეული სუბტიპი დეტალურად განვიხილეთ აივ-ის ე.წ. „გადაცემის კლასტერების“ დახასიათების მიზნით. გამოკვლეული სინჯებიდან 49 (22.5%) სექვენსი

გაერთიანდა 17 "გადაცემის კლასტერად" (სურათი 24-40); 12 კლასტერი აერთიანებდა მხოლოდ 2 სექვენსს, ხოლო ყველაზე დიდი კლასტერი აერთიანებდა 8 სექვენსს. კლასტერებში გაერთიანებული 49 სინჯიდან 14 (28.6%) ეკუთვნოდა ნარკოტიკების ინიექციური მოხმარების გზით ინფიცირებულ კაცს, 13 (26.5%) - ჰეტეროსექსუალური კონტაქტით ინფიცირებულ ქალს, 9 (18.4%) ჰეტეროსექსუალური კონტაქტით ინფიცირებულ კაცს და 13 (26.5%) - ჰომოსექსუალური კონტაქტით ინფიცირებულ კაცს.

სურათი 24. კლასტერი 1



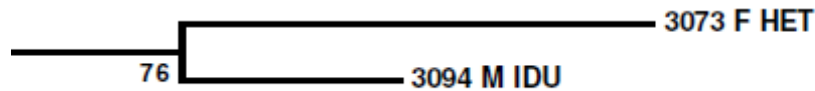
კლასტერი 1 აერთიანებს ერთ ინიექციური ნარკოტიკების მოხმარების გზით ინფიცირებულ კაცს და ჰეტეროსექსუალური გზით ინფიცირებულ ქალს (bootstrap value=89%).

სურათი 25. კლასტერი 2



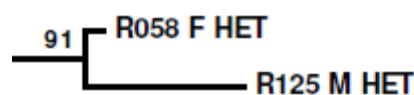
კლასტერი 2 აერთიანებს ორ მამრობითი სქესის ჰეტეროსექსუალური გზით ინფიცირებულ პაციენტს (bootstrap value=73%).

სურათი 26. კლასტერი 3



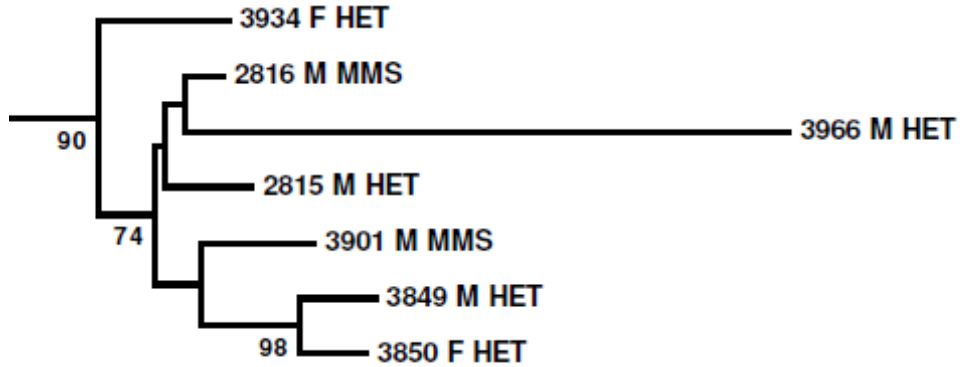
კლასტერი 3 აერთიანებს ერთ ინიექციური ნარკოტიკების მოხმარების გზით ინფიცირებულ კაცს და ჰეტეროსექსუალური გზით ინფიცირებულ ქალს (bootstrap value=76%).

სურათი 27. კლასტერი 4



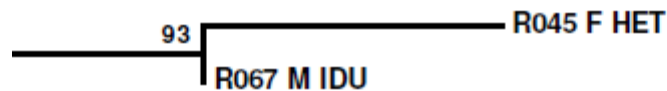
კლასტერი 4 აერთიანებს ჰეტეროსექსუალური გზით ინფიცირებულ ერთ კაცს და ერთ ქალს (bootstrap value=91%).

სურათი 28. კლასტერი 5



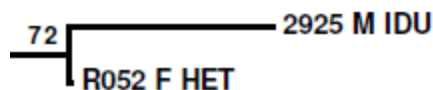
კლასტერი 5 აერთიანებს ჰეტეროსექსუალური გზით ინფიცირებულ სამ კაცს და ორ ქალს და ორ ჰომოსექსუალური კონტაქტით ინფიცირებულ ორ კაცს (bootstrap value=90%).

სურათი 29. კლასტერი 6



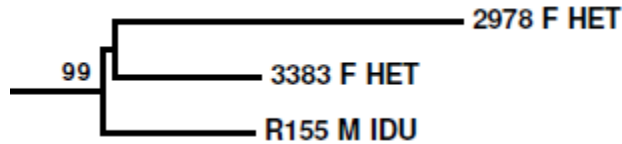
კლასტერი 6 აერთიანებს ჰეტეროსექსუალური გზით ინფიცირებულ ერთ ქალს და ნარკოტიკების ინიექციური მოხმარების გზით ინფიცირებულ ერთ კაცს (bootstrap value=93%).

სურათი 30. კლასტერი 7



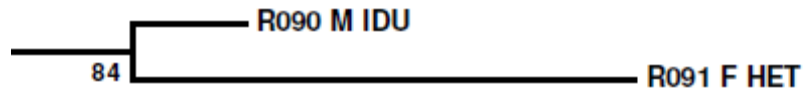
კლასტერი 7 აერთიანებს ჰეტეროსექსუალური გზით ინფიცირებულ ერთ ქალს და ნარკოტიკების ინიექციური მოხმარების გზით ინფიცირებულ ერთ კაცს (bootstrap value=72%).

სურათი 31. კლასტერი 8



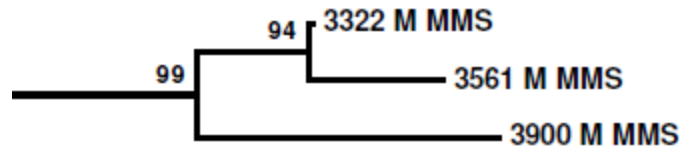
კლასტერი 8 აერთიანებს ჰეტეროსექსუალური გზით ინფიცირებულ ორ ქალს და ნარკოტიკების ინიექციური მოხმარების გზით ინფიცირებულ ერთ კაცს (bootstrap value=99%).

სურათი 32. კლასტერი 9



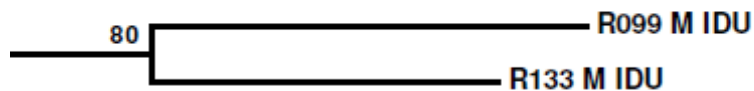
კლასტერი 9 აერთიანებს ჰეტეროსექსუალური გზით ინფიცირებულ ერთ ქალს და ნარკოტიკების ინიექციური მოხმარების გზით ინფიცირებულ ერთ კაცს (bootstrap value=84%).

სურათი 33. კლასტერი 10



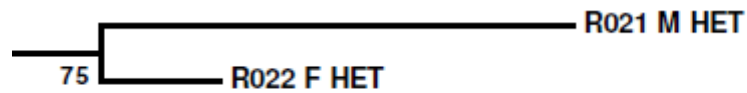
კლასტერი 10 აერთიანებს სამ ჰომოსექსუალ მამაკაცს (bootstrap value=99%).

სურათი 34. კლასტერი 11



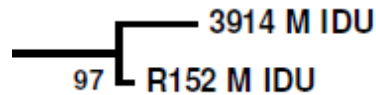
კლასტერი 11 აერთიანებს ნარკოტიკების ინიექციური მოხმარების გზით ინფიცირებულ ორ მამაკაცს (bootstrap value=80%).

სურათი 35. კლასტერი 12



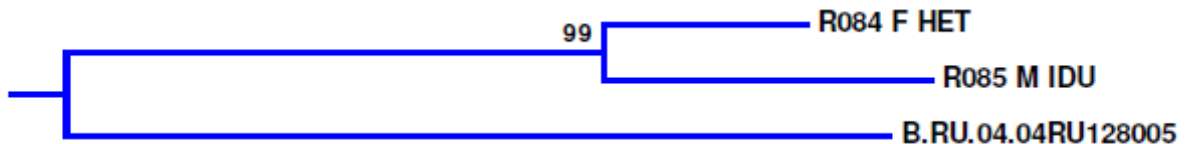
კლასტერი 12 აერთიანებს ჰეტეროსექსუალური გზით ინფიცირებულ ერთ ქალს და ერთ კაცს (bootstrap value=75%).

სურათი 36. კლასტერი 13



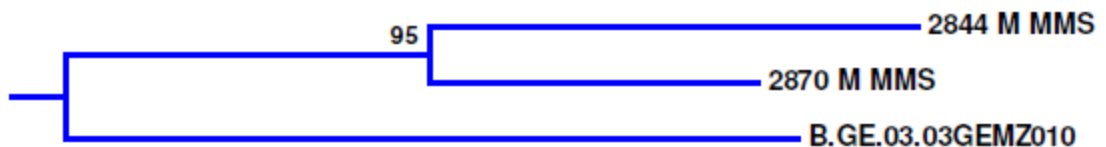
კლასტერი 13 აერთიანებს ნარკოტიკების ინიექციური მოხმარების გზით ინფიცირებულ ორ კაცს (bootstrap value=97%).

სურათი 37. კლასტერი 14



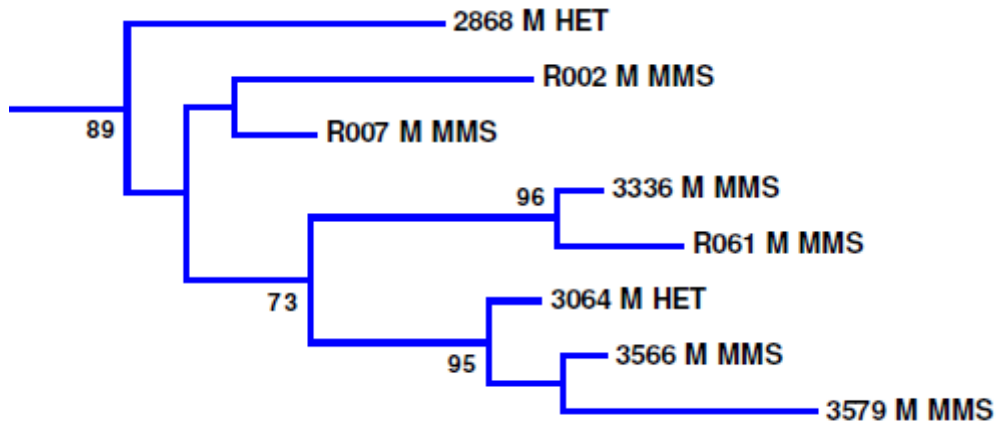
კლასტერი 14 აერთიანებს ჰეტეროსექსუალური გზით ინფიცირებულ ერთ ქალს და ნარკოტიკების ინიექციური მოხმარების გზით ინფიცირებულ ერთ კაცს (bootstrap value=99%).

სურათი 38. კლასტერი 15



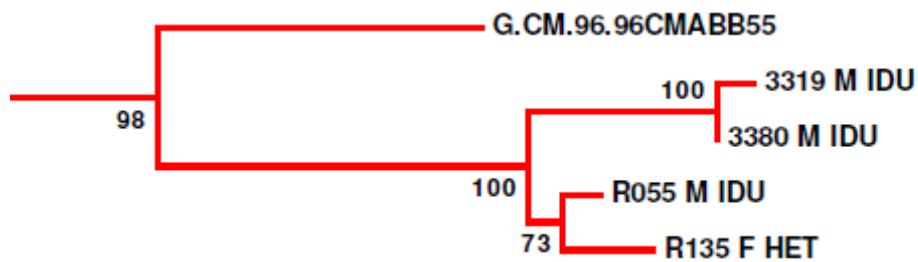
კლასტერი 15 აერთიანებს ორ ჰომოსექსუალ კაცს (bootstrap value=95%).

სურათი 39. კლასტერი 16



კლასტერი 16 აერთიანებს ჰეტეროსექსუალური გზით ინფიცირებულ ორ და ჰომოსექსუალური კონტაქტით ინფიცირებულ ექვს კაცს (bootstrap value=89%).

სურათი 40. კლასტერი 17



კლასტერი 17 აერთიანებს ჰეტეროსექსუალური გზით ინფიცირებულ ერთ ქალს და ნარკოტიკების ინიექციური მოხმარების გზით ინფიცირებულ სამ კაცს (bootstrap value=98%).

მულტივარიაციულმა ანალიზმა აჩვენა, რომ „გადაცემის კლასტერის“ წევრობა დაკავშირებული იყო შემდეგი ფაქტორები: ასაკობრივი ჯგუფი 18 – 25 წლის ფარგლებში – ფარდობითი რისკი 2.44 (95% სარწმუნოების ინტერვალი [CI]: 1.20-4.96, $p=0.014$); ასაკობრივი ჯგუფი 25–35 წლის ფარგლებში – ფარდობითი რისკი 1.83 (1.03-3.27, $p=0.040$); აივ ჰომოსექსუალური გადაცემის გზა – ფარდობითი რისკი 2.16 (95% CI: 1.16-4.03, $p=0.015$); აივ B სუბტიპი – ფარდობითი რისკი 2.56 (95% CI: 1.42-4.61, $p=0.002$) და აივ სუბტიპი გარდა A და B– ფარდობითი რისკი 2.68 (95% CI: 1.29-5.57, $p=0.008$). პაციენტის სქესი არ იყო დაკავშირებული გამოსავალთან უნივარიაციულ ანალიზში და გარდა ამისა, ის მნიშვნელოვნად კორელირებდა აივ გადაცემის გზასთან და შესაბამისად

სქესი, როგორც დამოუკიდებელი ფაქტორი, ამოღებულ იქნა მულტიავრიაციული მოდელიდან.

პირველადი/გადაცემული რეზისტენტობის გავრცელება საქართველოში

2006-2008 წლის არანამკურნელებ პაციენტებში პირველადი რეზისტენტობის კვლევაში ჩართული 126 პაციენტიდან რეზისტენტული მუტაციები აღმოაჩნდა სამი პაციენტისაგან (2.38%) გამოყოფილ ვირუსის სინჯებში. ორი პაციენტი ინფიცირებული იყო ვირუსით, რომელსაც ჰქონდა რეზისტენტობა NNRTI-ს მიმართ; კერძოდ ერთ შემთხვევაში აღმოჩენილი იქნა K103N მუტაცია და მეორე შემთხვევაში - K101E. ერთი პაციენტი (0.79%) რეზისტენტული იყო NRTI ლამივუდინის მიმართ M184I მუტაციის გამო. პოპულაციაში ასევე მოხდა ყოფილი საბჭოთა კავშირის ქვეყნებისათვის დამახასიათებელი ვირუსის სუბტიპი A -სათვის სპეციფიური PI მუტაცია V77I-ს შესწავლა. V77I მუტაცია ორ სხვა მუტაციასთან ერთად: კოდონები Thr-31 და Gly-78 ქმნის ე.წ. V77I ჰაპლოტიპს, რომელიც დამახასიათებელია რეგიონში აივ-1 ეპიდემიისათვის. (Roudinskii et al., 2004) V77I მუტაცია აღმოჩნდა 126-დან 40 (31.7%) სინჯში. აქედან 37 სინჯი (92.5%) იყო ვირუსის სუბტიპი A და მათგან 23-ს (62.2%) ასევე ჰქონდა V77I ჰაპლოტიპისათვის დამახასიათებელი მუტაციები კოდონებში Thr-31 და Gly-78. V77I მუტაცია ნანახი იქნა 3 შემთხვევაში ვირუსის B სუბტიპში, მაგრამ არც ერთს თან არ სდევდა V77I ჰაპლოტიპისათვის დამახასიათებელი Thr-31 და Gly-78 ჩანაცვლებები.

2011-2013 წლის არანამკურნელებ პაციენტებში პირველადი რეზისტენტობის კვლევაში ჩართული 92 პაციენტიდან რეზისტენტული მუტაციები აღმოაჩნდა ორი პაციენტისაგან (2.17%) გამოყოფილ ვირუსის სინჯებში. ერთ შემთხვევაში აღმოჩენილი იქნა NNRTI მუტაცია Y188H/L და მეორე შემთხვევაში - PI მუტაცია N88S.

აივ-1-ის რეზისტენტობის პროფილის დახასიათება

ჯგუფი 2-ის 193 პაციენტიდან 170-ს (88.1%) ჰქონდა ანტირეტროვირუსული წამლების 2 ჯგუფის - NRTI + NNRTI - მიმართ რეზისტენტობა, ორი სხვა ჯგუფის - NRTI + PI - მიმართ რეზისტენტობა აღენიშნებოდა ერთ (0.5%) პაციენტს; წამლების ერთი ჯგუფის მიმართ რეზისტენტობა ნანახი იქნა 21 შემთხვევაში (10.9%), აქედან მხოლოდ

NRTI -ს ჯგუფის მიმართ რეზისტენტობა იყო 10 პაციენტში (5.2%) და მხოლოდ NNRTI -ს ჯგუფის მიმართ რეზისტენტობა 11 (5.7%) პაციენტში. ერთი პაციენტი (0.5%) იყო ვირუსის მატარებელი, რომელსაც აღენიშნებოდა რეზისტენტობა ანტირეტროვირუსული პრეპარატების სამი ჯგუფის - NRTI + NNRTI+PI - მიმართ რეზისტენტობა.

ყველაზე გავრცელებული NRTI მუტაცია იყო M184V. ის ნანახი იქნა 193-დან 166 (86.0%) ვირუსში. შემდეგ მოდიოდა NRTI მუტაციები L74V (22.3%, n=43) და K65R (13.5, n=26). (ცხრილი 5) ნებისმიერი ერთი თიმიდინის ანალოგი მუტაცია (TAM) შეგვხვდა სინჯების 23.3%-ში და ვირუსების 7.8%-ს ფქონდა ≥ 3 TAM. ყველაზე გავრცელებული TAM იყო D67N -12.9%. NRTI მუტაციების სურათი/პროფილი სტატისკურად მნიშვნელოვნად არ განსხვავდებოდა აივ-ის სხვადასხვა სუბტიპში.

NNRTI მუტაციებს შორის ყველაზე გავრცელებული იყო G190S, რომელიც შეგვხვდა 105 სინჯში (54.4%). G190S-ს მოყვებოდა შენგეგი მნიშვნელოვანი მუტაციები: K101E (31.6%, n=61), K103N (30.1%, n=58) და Y181C (26.9%, n=52). NNRTI მუტაციების სურათის/პროფილის შედარების შედეგად გამოვლინდა მნიშვნელოვანი განსხვავება აივ-1-ის სუბტიპ A-ს და ვირუსის სხვა, არა -A, სუბტიპებს შორის. მუტაციები G190S და K101E მნიშვნელოვნად უფრო ხშირად გვხვდება აივ-1-ის სუბტიპ A-ში, ვიდრე სხვა სუბტიპებში ($p < 0.0001$), მუტაცია K103N კი უფრო ხშირია ვირუსის არა -A სუბტიპში ($p < 0.0001$). 69 სინჯში NNRTI მუტაცია G190S შეგვხვდა ან K101E-თან, ან Y181C-თან, ან ორივესთან ერთად: 39 შემთხვევაში შეგვხვდა G190S/ K101E გენოტიპი ; 10 შემთხვევაში - G190S/ Y181C გენოტიპი და 20 შემთხვევაში G190S/ K101E/ Y181C გენოტიპი.

პროტეაზას ინჰიბიტორების (PI) მიმართ რეზისტენტული ვირუსი აღმოაჩნდა 2 პაციენტს. ერთ შემთხვევაში ნანახი იქნა PI მუტაცია D30N, მეორე შემთხვევაში პაციენტს ფქონდა 3 PI მუტაციის კომბინაცია : M46I, I47V და L76V.

ცხრილი 5. რევერს ტრანსკრიპტაზას რეზისტენტული მუტაციები

	რაოდენობა (n=193)	სუბტიპი A (n=167)	არა A სუბტიპი (n=26)	<i>p</i> value
NRTI მუტაციები, n (%)				
M41L	12 (6.2)	11 (6.6)	1 (3.8)	0.99
D67N	25 (12.9)	24 (14.4)	1 (3.8)	0.21
K70R	13 (6.7)	12 (7.2)	1 (3.8)	0.99
L210W	9 (4.7)	9 (5.4)	0 (0.0)	0.61
T215YF	22 (11.4)	18 (10.8)	4 (15.4)	0.51
K219QE	15 (7.8)	13 (7.8)	2 (7.7)	0.99
K65R	26 (13.5)	24 (14.4)	2 (7.7)	0.54
L74V	43 (22.3)	36 (21.6)	7 (26.9)	0.61
Y115F	23 (11.9)	22 (13.2)	1 (3.8)	0.32
M184V	166 (86.0)	146 (87.4)	20 (76.9)	0.22
NNRTI მუტაციები, n (%)				
K101E	61 (31.6)	61 (36.5)	0 (0.0)	<0.0001
K103N	58 (30.1)	40 (24.0)	18 (69.2)	<0.0001
V106M	8 (4.1)	7 (4.2)	1 (3.8)	0.99
V108I	13 (6.7)	11 (6.6)	2 (7.7)	0.69
Y181CI	52 (26.9)	43 (25.7)	9 (34.6)	0.34
G190S	105 (54.4)	104 (62.3)	1 (3.8)	<0.0001
G190A	8 (4.1)	5 (3.0)	3 (11.5)	0.08

განხილვა

ჩვენმა კვლევამ აჩვენა, რომ აივ-1-ის სუბტიპი A, რომელიც გავრცელებულია აღმოსავლეთ ევროპის რეგიონში (Bobkova, 2013), ასევე წარმოადგენს საქართველოში მოცირკულირე ყველაზე მეტად გავრცელებულ სუბტიპს (Dvali et al., 2012; Zarandia, et al., 2006). ჩვენი კვლევა წარმოადგენს პირველ შრომას აღმოსავლეთ ევროპის რეგიონის ქვეყნებში, რომელშიც შეესწავლილია აივ-1-ის ე.წ. "გადაცემის კლასტერები". ჩვენს ანალიზში აივ-1-ის *pol* სექვენსების 22.5 %-მა ჩამოაყალიბა 17 გადაცემის კლასტერი, რომლებიც განსხვავდება გადაცემის კატეგორიის და სქესის მიხედვით.

გადაცემის 8 კლასტერი შედგებოდა ნარკოტიკების ინიექციური მომხმარებელი მამაკაცების და და ჰეტეროსექსუალური გზით ინფიცირებული ქალებისაგან. აღსანიშნავია, რომ ამ პოპულაციაში დომინანტური იყო აივ-ის A სუბტიპი. ეს აღმოჩენა მიუთითებს საქართველოში აივ-ის ორ ეპიდემიას - ნარკოტიკების ინიექციური მოხმარების და ჰეტეროსექსუალური კონტაქტის გზით გავრცელებულ ეპიდემიას - შორის მჭიდრო კავშირზე. ინფექციური პათოლოგიის, შიდსისა და კლინიკური იმუნოლოგიის სამეცნიერო პრაქტიკულ ცენტრში ჩატარებულმა კვლევამ აჩვენა, რომ ქალებში აივ ინფექციის ძირითად რისკ ფაქტორს წარმოადგენს სექსუალური პარტნიორის დადებითი აივ სტატუსი ან პარტნიორის მიერ ნარკოტიკების ინიექციური მოხმარება. (Chkhartishvili, McNutt, Smith, & Tsertsvadze, 2011) აქედან გამომდინარე, აივ-ის ჰეტეროსექსუალური ეპიდემია დაკავშირებულია ნარკოტიკების ინიექციური მომხმარებლების თემთან და არ წარმოადგენს ეპიდემიის გენერალიზაციის შედეგს. აივ-ის დედიდან ბავშვზე გადაცემის ეროვნული პროგრამა (PMTCT), რომელიც გულისხმობს ორსული ქალების უნივერსალურ სკრინინგს აივ ინფექციაზე, ასევე წარმოადგენს იმის დადასტურებას, რომ აივ-ის ეპიდემია არ არის ფართოდ გავრცელებული ზოგად პოპულაციაში. ამ კვლევის მონაცემების თანახმად, აივ ინფექციის პრევალენტობა ორსულ ქალებში 2006-2013 წლებში იყო ძალიან დაბალი და მერყეობდა 0.02% - 0.04% (დაავადებათა კონტროლისა და საზოგადოებრივი ჯანმრთელობის ეროვნული ცენტრის გამოუქვეყნებელი მონაცემები).

მიუხედავად იმისა, რომ საქართველოში ჰეტეროსექსუალური კონტაქტის გზით ინფიცირებული პირების ურავლესობას ქალები წარმოადგენენ, ბოლო მონაცემების

თანახმად შეინიშნება ჰეტეროსექსუალური გზით ინფიცირების შემთხვევების ზრდა კაცებში. ჩვენს კვლევაში ჰეტეროსექსუალური გზით ინფიცირებული 9 კაციდან აღებული სინჯებიდან მიღებულმა აივ-ის ორმა სექვენსმა წარმოქმნა მხოლოდ კაცებისგან შემდგარი კლასტერი, ხოლო 2 სექვენსი გაერთიანდა ჰომოსექსუალური კონტაქტის გზით ინფიცირებულ კაცთან. შეგვიძლია ვივარაუდოთ, რომ ეს მიუთითებს კვლევაში ჩართული პაციენტების მიერ ჰომოსექსუალური ქცევის დაფარვას სტიგმის გამო. ამერიკის შეერთებულ შტატებში და დიდ ბრიტანეთს ჩატრებულმა კვლევებმაც ასევე აჩვენა ჰეტეროსექსუალი და ჰომოსექსუალი კაცებისგან შემდგარი შერეული კლასტერები. (Dennis et al., 2012; Hue et al., 2014). ჰომოსექსუალური ქცევის დაფარვა გავრცელებული პრობლემაა მთელს მსოფლიოში, (Fay et al., 2011; Pathela et al., 2006) რაც იწვევს ასეთ პაციენტებში არასრულფასოვანი პრევენციული ზომების ჩატარებას.

ჩვენს კვლევაში 15 ჰომოსექსუალი კაციდან 13 გაერთიანდა კლასტერებში, რაც მიუთითებს ამ ჯგუფში გადაცემის უფრო მჭიდრო ქსელის არსებობაზე. მულტივარიაციულმა ანალიზმა დაადასტურა MSM-ში კლასტერების წარმოქმნის უფრო მაღალი ალბათობა. კლასტერში გაერთიანებასთან დაკავშირებული ფაქტორები იყო: აივ-ის ჰომოსექსუალური გადაცემის გზა (RR 2.16, p=0.015), აივ-ის B სუბტიპი, რომელიც უფრო ხშირი იყო MSM-ებში (RR2.56, p=0.002) და ახალგაზრდა ასაკი: ჰომოსექსუალური გზით ინფიცირებული პაციენტების 26% იყო 25 წელზე ახალგაზრდა (RR 2.44, p=0.014). ეპიდემიოლოგიურ მონაცემებთან ერთად, რომელიც აჩვენებს აივ ინფექციის პრევალენტობის ზრდას MSM-ებში და ახალი ინფექციის უფრო მარალ მაჩვენებელს, (*Georgia Country report for the Global AIDS Response Progress Reporting*, 2014; Tsertsvadze et al., 2014) ჩვენი კვლევის შედეგები კიდევ ერთხელ მიუთითებს ამ პოპულაციაში ფართო მასშტაბიანი ეპიდემიის განვითარების რისკზე. MSM ეპიდემიის ზრდა შეინიშნება გლობალურად, ისეთი რეგიონების ჩათვლით, რომლებიც ტრადიციულად განიხილებოდა როგორც არა- MSM ეპიდემიის ადგილები, როგორცაა მაგალითად სუბსაჰარული აფრიკა და აზია. (Beyrer et al., 2013; Mayer, 2014; H. T. Yang et al., 2014).

ჩვენი კვლევის შედეგები ასევე მიუთითებს MSM ეპიდემიის დამოუკიდებელ გავითარებაზე. MSM სექვენსები არ გაერთიანდა კლასტერში IDU სექვენსებთან; ასევე უმნიშველო იყო ქალებთან კავშირი კლასტერში, რომელშიც ასევე შედიოდა

ჰეტეროსექსუალური გზით ინფიცირებული 3 კაცი. ქალებისგან და ინიექციური ნარკოტიკების მომხმრებელი მამაკაცებისგან განსხვავებით, MSM-ების უმრავლესობა ინფიცირებული იყო აივ-ის B სუბტიპით. ეპიდემიის ასეთი სეგრეგაცია ბევრგანაა აღწერილი, განსაკუთრებით ეპიდემიის განვითარების ადრეულ სტადიებზე. (Herring et al., 2003; Mastro, Kumanusont, Dondero, & Wasi, 1997; van Harmelen et al., 1997)

ჩვენს კვლევაში ჩანს, რომ გაიზარდა აივ-ის სუბტიპი G-თ ინფიცირების შემთხვევები. სუბტიპი G-თ ინფიცირების პირველი შემთხვევა აღვწერეთ 2006 წელს შრომით მიგრანტში, რომელიც საქართველოში დაბრუნდა ევროპიდან. ამ შემთხვევის შემდეგ სუბტიპი G-თ ინფიცირების კიდევ 5 შემთხვევა გამოვავლინეთ და ყველა სექვენსი გაერთიანდა ერთ კლასტერში 84% -იანი სარწმუნოებით. სუბტიპი G გავრცელებულია პორტუგალიაში და ევროპის ქვეყნებში გვხვდება ახალდიაგნოზირებული პაციენტების 3%-ში.(Abecasis et al., 2013; Esteves et al., 2003)

ჩვენი კვლევა პირველი კვლევაა აღმოსავლეთ ევროპის რეგიონში, რომლის ფარგლებში მოხდა ე.წ. „გადაცემის კლასტერების“ ფილოგენეტიკური ანალიზი. კვლევის შედეგები ადასტურებს კავშირს აივ-ის IDU და ჰეტეროსექსუალურ ეპიდემიებს შორის. არ იქნა ნანახი კავშირი აივ-ის IDU და MSM გადაცემის შემთხვევებს შორის, რაც მიანიშნებს ორი ეპიდემიის დამოუკიდებელ ევოლუციაზე.

ჩვენს მიერ "გადაცემის კლასტერების" კვლევას გააჩნია გარკვეული შეზღუდვები. კერძოდ: 1) MSM -ების შედარებით მცირე რიცხვი ზღუდავს გადაცემის უფრო ფართე ქსელის აღმოჩენის სტატისტიკურ სიმძლავრეს. უნდა აღინიშნოს, რომ MSM -ებში განვითარებადი ეპიდემიის მიუხედავად, ამ ჯგუფში შემთხვევების რიცხვი მაინც მცირე რჩება და შეადგენს საერთო შემთხვევების მხოლოდ 6 %-ს; 2) ჩვენ შემოვიფარგლეთ აივ-ის მხოლოდ *pol* რეგიონის გაანალიზებით, მაგრამ დადასტურებულია, რომ ეს რეგიონი მოიცავს საკმარის ინფორმაციას აივ-ის გადაცემის ქსელის ანალიზისათვის. (Hue, Clewley, Cane, & Pillay, 2004)

ჩვენმა კვლევამ აჩვენა, რომ აივ-1-ის A სუბტიპს აქვს მისთვის დამახასიათებელი განსხვავებული NNRTI რეზისტენტობის პროფილი. ეს განსხვავება პირველად აღვწერეთ ჩვენ და ცოტა ხნის წინ დადასტურდა რუსეთში ჩატარებულ უფრო დიდ

კვლევაში (Dvali, et al., 2012; Kolomeets, Varghese, Lemey, Bobkova, & Shafer, 2014; Tsertsvadze, et al., 2011). G190S იყო ყველაზე გავრცელებული NNRTI მუტაცია და ის მნიშვნელოვნად უფრო ხშირად გვხვდებოდა აივ-1-ის A სუბტიპის სინჯებში. ეს მნიშვნელოვანი განსხვავებაა აივ-1-ის სხვა სუბტიპებისგან, რომლებშიც უფრო ხშირად ვხვდებით NNRTI მუტაციებს K103N და Y181CI (Reuman, Rhee, Holmes, & Shafer, 2010; Wallis et al., 2014).

კიდევ ერთი მნიშვნელოვანი მახასიათებელი, რომელიც აღწერეთ და ახასიათებს მხოლოდ აივ-1-ის A სუბტიპს, არის NNRTI მუტაცია K101E-ს მაღალი სიხშირე. მნიშვნელოვანია, რომ ჩვენს მიერ პირველად აღწერილი იქნა, რომ მუტაცია K101E თითქმის ექსკლუზიურად გვხვდებოდა მხოლოდ მუტაცია G190S-თან ერთად. ასევე მნიშვნელოვანი იყო NNRTI მუტაცია Y181CI -თან ერთად აღნიშნული მუტაციების გამოჩენა. გაურკვეველია, აღნიშნული მუტაციები ჩნდებოდა ერთდოულად თუ ხდებოდა მათი აკუმულაცია. ნებისმიერ შემთხვევაში, აღნიშნული მუტაციების ერთდოული არსებობა ზღუდავს ახალი თაობის NNRTI კლასის არც პრეპარატების გამოყენების შესაძლებლობას ამ პრეპარატებით ადრე ნამკურნალებ აივ-1-ის A სუბტიპით ინფიცირებულ პაციენტებში.

სუბტიპების მიხედვით შედარების გარდა G190S და K101E მუტაციების სიხშირე ასევე შეფასდა პაციენტის სქესის, აივ ინფექციის გადაცემის გზის და ართ რეჟიმის მიხედვით. არც ერთმა ანალიზმა არ აჩვენა სტატისტიკურად მნიშვნელოვანი განსხვავება, რაც კიდევ ერთხელ უსვამს ხაზს, რომ რეზისტენტობის განსაკუთრებული/განსხვავებული პროფილი/სურათი განპირობებულია მხოლოდ აივ-1-ის A სუბტიპით და არა რაიმე სხვა ფაქტორით.

რაც შეეხება სხვა რეზისტენტულ მუტაციებს, ისევე როგორც მთელს მსოფლიოში, საქართველოშიც ყველაზე გავრცელებული მუტაციაა M184V (Assoumou et al., 2013; Hosseinipour, Gupta, Van Zyl, Eron, & Nachega, 2013). მუტაციების სიხშირის წლების მიხედვით შედარებისას აღმოვაჩინეთ, რომ გაიზარდა L74V- ის (22.3% 2014 წელს და 14.6% 2011 წელს) და K65R-ის (13.5 % 2014 წელს და 4.9% 2011 წელს) სიხშირე, რაც შესაბამისობაშია აბაკავირის და ტენოფოვირის გაზრდილ მოხმარებასთან. ჩვენს კვლევაში აწერილი TAM-ების სიხშირე უფრო დაბალია ვიდრე მარკონის და კოლეგების

კვლევაში (Marconi et al., 2008), მაგრამ მსგავსია იმ ქვეყნებში ჩატარებული კვლევების შედეგებისა, სადაც აივ ვირუსული დატვირთვის განსაზღვრა წარმოადგენს რუტინულ გამოკვლევას (Barth, van der Loeff, Schuurman, Hoepelman, & Wensing, 2010). ეს ფაქტი ხაზს უსვამს, რომ ვირუსული დატვირთვის რუტინულად განსაზღვრა მნიშველოვანი ფაქტორია რეზისტენტული მუტაციების აკუმულაციის თავიდან ასაცილებლად. რადგანაც საქართველოში ზიდოვუდინი კვლავაც რჩება ერთ-ერთ ყველაზე ფართოდ გამოყენებულ ანტირეტროვირუსულ პრეპარატად, აუცილებელია მუდმივად მოხდეს TAM-ების წარმოქმნის კონტროლი.

PI რეზისტენტული მუტაციების სიხშირე იყო დაბალი. ჩვენს კვლევაში მხოლოდ 2 პაციენტს აღმოაჩნდა PI მუტაციები. ამათგან, ერთ-ერთი პაციენტი ნელფინავირის შემცველ მკურნალობას იღებდა 2000 წელს. ამ დროისათვის აივ-ის გენოტიპური რეზისტენტობის ტესტი არ იყო ხელმისაწვდომი და რეზისტენტობის აღმოჩენა მოხერხდა მკურნალობიდან მხოლოდ რამოდენიმე წლის შემდეგ. მეორე პაციენტი იმყოფებოდა ლოპინავირის შემცველ ართ რეჟიმზე, როგორც მკურნალობის პირველი რიგის რეჟიმზე. 2013 წლის ბოლოსათვის ანტირეტროვირუსულ მკურნალობაზე მყოფი პაციენტების 13% იღებდა PI პრეპარატებს და რეზისტენტობის განვითარების მხოლოდ ერთი შემთხვევა მიუთითებს, რომ შეზღუდული რესურსების ქვეყნებში PI პრეპარატები შეიძლება განხილულ იქნას მკურნალობის პირველ ვარიანტად.

ჩვენს მიერ რეზისტენტობის პროფილის/სურათის შეფასებას გააჩნია გარკვეული შეზღუდვები. კერძოდ, კვლევაში ჩართული იყო არა სუბტიპ A-ს მხოლოდ 26 სინჯი. ამან შეასუსტა სტატისტიკური სიმძლავრე შედარებისა და განზოგადებისათვის. მეორეს მხრივ, აღსანიშნავია, რომ კვლევაში ჩართული იყო აივ რეზისტენტობის ყველა შემთხვევა და ზემოთ აღნიშნული არ იყო განპირობებული შერჩევის ცდომილებით. ამ შეზღუდვის მიუხედავად კვლევის შედეგებს დიდი მნიშვნელობა აქვს კლინიცისტებისა და პროგრამის მენეჯერებისათვის.

2006-2008 და 2011-2013 წლების არანამკურნალები პაციენტების სინჯების ანალიზმა აჩვენა, რომ გადაცემული რეზისტენტობის მაჩვენებელი საქართველოში რჩება დაბალი. 2006-2008 წლის არანამკურნალებ პაციენტებში პირველადი რეზისტენტობის კვლევაში რეზისტენტული მუტაციები აღმოაჩნდა 2.38%-ში, 2011-2013

წლის არანამკურნელებ პაციენტებში პირველადი რეზისტენტობის კვლევაში კი - 2.17%. ეს შედეგი მიუთითებს ქვეყანაში არც მკურნალობის მიწოდების მოდელის ეფექტურობაზე, რომელიც უზრუნველყოფს მკურნალობაზე მყოფ პაციენტებში რეზისტენტობის განვითარების და აივ-ის რეზისტენტული შტამების შემდგომი გადაცემის პრევენციას.

ჩვენი კვლევა კიდევ ერთხელ ადასტურებს, რომ საქართველოში ყველაზე გავრცელებულ აივ-ის A სუბტიპს გააჩნია რეზისტენტობის მისთვის გამახასიათებელი განსაკუთრებული პროფილი/სურათი. სუბტიპ A-ში მწირია ინფორმაცია PI რეზისტენტობის შესახებ.

დასკვნები და პრაქტიკული რეკომენდაციები

დასკვნა 1

2006-2013 წწ. პერიოდში საქართველოში აივ-1-ის მოლეკულური ეპიდემიოლოგიის შესწავლამ აჩვენა, რომ აივ-1-ის A სუბტიპი რჩება ვირუსის ყველაზე გავრცელებულ სუბტიპად (89.4%). მართალია ერთეულ შემთხვევებში, მაგრამ გამოჩნდა აივ-1-ის ისეთი სუბტიპები, რომლებიც საქართველოში ადრე არ ყოფილა აღწერილი.

რეკომენდაცია 1.1

აუცილებელია გაგრძელდეს აივ-1-ის მოლეკულური ეპიდემიოლოგიის კვლევა საქართველოში, რათა მუდმივად მოხდეს ქვეყანაში აივ-1-ის სუბტიპების გავრცელების ტენდენციის კონტროლი.

რეკომენდაცია 1.2

განალიზებული აივ-ის დნმ-ის ყოველი სექვენსი უნდა დაემატოს „GeneBank“-ს რათა ხელმისაწვდომი იყოს მეცნიერებისათვის მსოფლიოს მასშტაბით გლობალური მდგომარეობისა და ტენდენციების შეფასებისათვის.

დასკვნა 2

ნარკოტიკების ინიექციური მოხმარების და ჰეტეროსექსუალური კონტაქტის გზით გავრცელებულ ეპიდემიას შორის არსებობს მჭიდრო კავშირი, ხოლო MSM ეპიდემია

დამოუკიდებლად ვითარდება. ნარკოტიკების ინიექციურ მომხმარებლებში და ჰეტეროსექსუალური კონტაქტის გზით ინფიცირებულ პირებში გავრცელებულია აივ-1-ის სუბტიპი A, ხოლო MSM-ებში - გავრცელებულია სუბტიპი B.

რეკომენდაცია 2.1

რისკ ჯგუფებში სწორი მიზანმიმართული პრევენციული ჩარევის ზომების დანერგვისათვის აუცილებელია გაგრძელდეს აივ-1-ის ახალი შემთხვევების ფილოგენეტიკური ანალიზი და "გადაცემის კლასტერების" შესწავლა.

დასკვნა 3

საქართველოში ანტირეტროვირუსული პრეპარატებით არანამკურნალებ პაციენტებში პირველადი/გადაცემული რეზისტენტობის გავრცელების მაჩვენებელი სტაბილურად დაბალია (< 5 %): 2006-2008 წწ. იყო 2.38%, 2011-2013 წწ. - 2.17%; რაც მიუთითებს ქვეყანაში არც მკურნალობის მიწოდების მოდელის ეფექტურობაზე, რომელიც უზრუნველყოფს მკურნალობაზე მყოფ პაციენტებში რეზისტენტობის განვითარების და აივ-ის რეზისტენტული შტამების შემდგომი გადაცემის პრევენციას.

რეკომენდაცია 3.1

საქართველოში არც პრეპარატებით არანამკურნალებ პაციენტებში პირველადი რეზისტენტობის გავრცელების დაბალი მაჩვენებლის (< 5 %) გამო სადღეისოდ აუცილებლობას არ წარმოადგენს ასეთ პაციენტებში მკურნალობის დაწყებამდე ძვირად ღირებული გენოტიპური რეზისტენტობის ტესტის ჩატარება.

რეკომენდაცია 3.2

აივ-1 რეზისტენტობის აღმოცენებისა და შემდგომი გავრცელების პრევენციის მიზნით აუცილებელია გაგრძელდეს აივ-1 რეზისტენტობის ზედამხედველობის კვლევები.

დასკვნა 4.

საქართველოში ყველაზე მეტად გავრცელებული აივ-1-ის A სუბტიპისათვის დამახასიათებელია არც პრეპარატებისადმი რეზისტენტობის ორიგინალური პროფილი. NNRTI მუტაციები G190S და K101E მნიშვნელოვნად უფრო ხშირად გვხვდება აივ-1-ის სუბტიპ A-ში, ვიდრე სხვა სუბტიპებში. სუბტიპ A-ში მუტაცია K101E თითქმის

ექსკუზიურად გვხვდება მხოლოდ მუტაცია G190S-თან ერთად. ასევე მნიშვნელოვანი და სუბტიპ A -სათვის სპეციფიურია ამ ორ მუტაციასთან ერთად მუტაცია Y181C -ის გამოჩენა. აღნიშნული მუტაციების ერთდოული არსებობა მნიშვნელოვნად ზღუდავს NNRTI პრეპარატების გამოყენების შესაძლებლობას NNRTI კლასის არც პრეპარატებით ადრე ნამკურნალებ აივ-1-ის A სუბტიპით ინფიცირებულ პაციენტებში.

რეკომენდაცია 4.1

საქართველოში ყველაზე მეტად გავრცელებული აივ-1-ის A სუბტიპისათვის დამახასიათებელი არც პრეპარატებისადმი რეზისტენტობის ორიგინალური პროფილი გათვალისწინებული უნდა იქნას არც მკურნალობის ოპტიმალური რეჟიმის შერჩევისათვის.

რეკომენდაცია 4.2

იმის გათვალისწინებით, რომ არც პრეპარატებისადმი რეზისტენტობის პროფილი განსხვავებულია აივ-ის სხვადასხვა სუბტიპში და მსოფლიოში ჩატარებული რეზისტენტობის კვლევების უმრავლესობა ეხება აივ-ის B სუბტიპს, განსაკუთრებით მნიშვნელოვანია არა B სუბტიპის ვირუსის ყოველი გაანალიზებული დნმ-ის სექვენსი დაემატოს „GeneBank“-ს და გახდეს ხელმისაწვდომი მეცნიერებისათვის მსოფლიოს მასშტაბით. აღნიშნულის საშუალებით შესაძლებელი იქნება ჩვენი შედეგები გათვალისწინებული იქნას ჯანმრთელობის მსოფლიო ორგანიზაციისა (WHO) და შიდსის საერთაშორისო ასოციაციის (IAS) მიერ აივ-ის მუტაციების ახალი სიების შედგენისა, რეზისტენტობის ტესტირების და აივ/შიდსის მკურნალობის ახალი გაიდლაინების შემუშავების დროს.

გამოყენებული ლიტერატურა

- Abecasis, A. B., Wensing, A. M., Paraskevis, D., Vercauteren, J., Theys, K., Van de Vijver, D. A., . . . Vandamme, A. M. (2013). HIV-1 subtype distribution and its demographic determinants in newly diagnosed patients in Europe suggest highly compartmentalized epidemics. *Retrovirology*, *10*, 7.
- Abram, M. E., Ferris, A. L., Shao, W., Alvord, W. G., & Hughes, S. H. (2010). Nature, position, and frequency of mutations made in a single cycle of HIV-1 replication. *J Virol*, *84*(19), 9864-9878.
- Agresti, A. (1996). *An introduction to categorical data analysis*. New York: Wiley.
- Allan, J. S., Coligan, J. E., Barin, F., McLane, M. F., Sodroski, J. G., Rosen, C. A., . . . Essex, M. (1985). Major glycoprotein antigens that induce antibodies in AIDS patients are encoded by HTLV-III. *Science*, *228*(4703), 1091-1094.
- Allen, T. M., O'Connor, D. H., Jing, P., Dzuris, J. L., Mothe, B. R., Vogel, T. U., . . . Watkins, D. I. (2000). Tat-specific cytotoxic T lymphocytes select for SIV escape variants during resolution of primary viraemia. *Nature*, *407*(6802), 386-390.
- Archer, J., Pinney, J. W., Fan, J., Simon-Loriere, E., Arts, E. J., Negroni, M., & Robertson, D. L. (2008). Identifying the important HIV-1 recombination breakpoints. *PLoS Comput Biol*, *4*(9), e1000178.
- Archer, J., & Robertson, D. L. (2007). Understanding the diversification of HIV-1 groups M and O. *AIDS*, *21*(13), 1693-1700. doi: 10.1097/QAD.0b013e32825eabd0
- Artenstein, A. W., VanCott, T. C., Mascola, J. R., Carr, J. K., Hegerich, P. A., Gaywee, J., . . . et al. (1995). Dual infection with human immunodeficiency virus type 1 of distinct envelope subtypes in humans. *J Infect Dis*, *171*(4), 805-810.
- Assoumou, L., Descamps, D., Yerly, S., Dos Santos, G., Marcelin, A. G., Delaugerre, C., . . . Masquelier, B. (2013). Prevalence of HIV-1 drug resistance in treated patients with viral load >50 copies/mL in 2009: a French nationwide study. *J Antimicrob Chemother*, *68*(6), 1400-1405.

- Balotta, C., Facchi, G., Violin, M., Van Dooren, S., Cozzi-Lepri, A., Forbici, F., . . . Moroni, M. (2001). Increasing prevalence of non-clade B HIV-1 strains in heterosexual men and women, as monitored by analysis of reverse transcriptase and protease sequences. *J Acquir Immune Defic Syndr*, *27*(5), 499-505.
- Baltimore, D. (1971). Expression of animal virus genomes. *Bacteriol Rev*, *35*(3), 235-241.
- Bannister, W. P., Cozzi-Lepri, A., Kjaer, J., Clotet, B., Lazzarin, A., Viard, J. P., . . . Phillips, A. (2011). Estimating prevalence of accumulated HIV-1 drug resistance in a cohort of patients on antiretroviral therapy. *J Antimicrob Chemother*, *66*(4), 901-911.
- Barre-Sinoussi, F., Chermann, J. C., Rey, F., Nugeyre, M. T., Chamaret, S., Gruest, J., . . . Montagnier, L. (1983). Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science*, *220*(4599), 868-871.
- Barth, R. E., van der Loeff, M. F., Schuurman, R., Hoepelman, A. I., & Wensing, A. M. (2010). Virological follow-up of adult patients in antiretroviral treatment programmes in sub-Saharan Africa: a systematic review. *Lancet Infect Dis*, *10*(3), 155-166.
- Beemon, K., Duesberg, P., & Vogt, P. (1974). Evidence for crossing-over between avian tumor viruses based on analysis of viral RNAs. *Proc Natl Acad Sci US A*, *71*(10), 4254-4258.
- Beyrer, C., Sullivan, P., Sanchez, J., Baral, S. D., Collins, C., Wirtz, A. L., . . . Mayer, K. (2013). The increase in global HIV epidemics in MSM. *AIDS*, *27*(17), 2665-2678.
- Blower, S. M., Aschenbach, A. N., Gershengorn, H. B., & Kahn, J. O. (2001). Predicting the unpredictable: transmission of drug-resistant HIV. *Nat Med*, *7*(9), 1016-1020.
- Bobkova, M. (2013). Current status of HIV-1 diversity and drug resistance monitoring in the former USSR. *AIDS Rev*, *15*(4), 204-212.
- Borroto-Esoda, K., Waters, J. M., Bae, A. S., Harris, J. L., Hinkle, J. E., Quinn, J. B., & Rousseau, F. S. (2007). Baseline genotype as a predictor of virological failure to emtricitabine or stavudine in combination with didanosine and efavirenz. *AIDS Res Hum Retroviruses*, *23*(8), 988-995.
- Brenner, B., Turner, D., Oliveira, M., Moisi, D., Detorio, M., Carobene, M., . . . Wainberg, M. A. (2003). A V106M mutation in HIV-1 clade C viruses exposed to efavirenz confers cross-resistance to non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors. *AIDS*, *17*(1), F1-5.

- Buonaguro, L., Tornesello, M. L., & Buonaguro, F. M. (2007). Human immunodeficiency virus type 1 subtype distribution in the worldwide epidemic: pathogenetic and therapeutic implications. *J Virol*, *81*(19), 10209-10219.
- Center for Disease Control and Prevention (CDC). (1981a). Kaposi's sarcoma and Pneumocystis pneumonia among homosexual men--New York City and California. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, *30*(25), 305-308.
- Center for Disease Control and Prevention (CDC). (1981b). Pneumocystis pneumonia--Los Angeles. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, *30*(21), 250-252.
- Chkhartishvili, N., McNutt, L. A., Smith, P. F., & Tsertsvadze, T. (2011). Characteristics of HIV-infected women and factors associated with HCV seropositivity in the Republic of Georgia. *AIDS Res Ther*, *8*(1), 25.
- Choisy, M., Woelk, C. H., Guegan, J. F., & Robertson, D. L. (2004). Comparative study of adaptive molecular evolution in different human immunodeficiency virus groups and subtypes. *J Virol*, *78*(4), 1962-1970.
- Coffin, J. M., Hughes, S. H., & Varmus, H. E. (1997). The Interactions of Retroviruses and their Hosts.
- Cozzi-Lepri, A., Paredes, Phillips, A. N., Clotet, B., Kjaer, J., Von Wyl, V., . . . Lundgren, J. D. (2012). The rate of accumulation of nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor (NNRTI) resistance in patients kept on a virologically failing regimen containing an NNRTI*. *HIV Med*, *13*(1), 62-72. doi: 10.1111/j.1468-1293.2011.00943.x
- D'Aquila, R. T., Johnson, V. A., Welles, S. L., Japour, A. J., Kuritzkes, D. R., DeGruttola, V., . . . Richman, D. D. (1995). Zidovudine resistance and HIV-1 disease progression during antiretroviral therapy. AIDS Clinical Trials Group Protocol 116B/117 Team and the Virology Committee Resistance Working Group. *Ann Intern Med*, *122*(6), 401-408.
- Dennis, A. M., Hue, S., Hurt, C. B., Napravnik, S., Sebastian, J., Pillay, D., & Eron, J. J. (2012). Phylogenetic insights into regional HIV transmission. *AIDS*, *26*(14), 1813-1822.
- Douek, D. C., Roederer, M., & Koup, R. A. (2009). Emerging concepts in the immunopathogenesis of AIDS. *Annu Rev Med*, *60*, 471-484.

- Dvali, N., Parker, M. M., Chkhartishvili, N., Sharvadze, L., Gochitashvili, N., Abutidze, A., . . . Tsertsvadze, T. (2012). Characterization of HIV-1 subtypes and drug resistance mutations among individuals infected with HIV in Georgia. *J Med Virol*, *84*(7), 1002-1008. doi: 10.1002/jmv.23269
- Easterbrook, P. J., Smith, M., Mullen, J., O'Shea, S., Chrystie, I., de Ruiter, A., . . . Zuckerman, M. (2010). Impact of HIV-1 viral subtype on disease progression and response to antiretroviral therapy. *J Int AIDS Soc*, *13*, 4.
- Este, J. A., & Telenti, A. (2007). HIV entry inhibitors. *Lancet*, *370*(9581), 81-88.
- Esteves, A., Parreira, R., Piedade, J., Venenno, T., Franco, M., Germano de Sousa, J., . . . Canas-Ferreira, W. F. (2003). Spreading of HIV-1 subtype G and envB/gagG recombinant strains among injecting drug users in Lisbon, Portugal. *AIDS Res Hum Retroviruses*, *19*(6), 511-517.
- Fauci, A. S., Kasper, D.L., Braunwald, E., Hauser, S.L., Longo, D.L., Jameson, J.L., Loscalzo, J. (2008). *Harrison's Principles of Internal Medicine, 17th Edition*.
- Fay, H., Baral, S. D., Trapence, G., Motimedi, F., Umar, E., Iipinge, S., . . . Beyrer, C. (2011). Stigma, health care access, and HIV knowledge among men who have sex with men in Malawi, Namibia, and Botswana. *AIDS Behav*, *15*(6), 1088-1097.
- Fischl, M. A., Richman, D. D., Grieco, M. H., Gottlieb, M. S., Volberding, P. A., Laskin, O. L., . . . et al. (1987). The efficacy of azidothymidine (AZT) in the treatment of patients with AIDS and AIDS-related complex. A double-blind, placebo-controlled trial. *N Engl J Med*, *317*(4), 185-191.
- Fischl, M. A., Richman, D. D., Hansen, N., Collier, A. C., Carey, J. T., Para, M. F., . . . et al. (1990). The safety and efficacy of zidovudine (AZT) in the treatment of subjects with mildly symptomatic human immunodeficiency virus type 1 (HIV) infection. A double-blind, placebo-controlled trial. The AIDS Clinical Trials Group. *Ann Intern Med*, *112*(10), 727-737.
- Frey, G., Chen, J., Rits-Volloch, S., Freeman, M. M., Zolla-Pazner, S., & Chen, B. (2010). Distinct conformational states of HIV-1 gp41 are recognized by neutralizing and non-neutralizing antibodies. *Nat Struct Mol Biol*, *17*(12), 1486-1491.

- Galli, A., Kearney, M., Nikolaitchik, O. A., Yu, S., Chin, M. P., Maldarelli, F., . . . Hu, W. S. (2010). Patterns of Human Immunodeficiency Virus type 1 recombination *ex vivo* provide evidence for coadaptation of distant sites, resulting in purifying selection for intersubtype recombinants during replication. *J Virol*, *84*(15), 7651-7661.
- Gallo, R. C., Sarin, P. S., Gelmann, E. P., Robert-Guroff, M., Richardson, E., Kalyanaraman, V. S., . . . Popovic, M. (1983). Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science*, *220*(4599), 865-867.
- Georgia Country report for the Global AIDS Response Progress Reporting.* (2014). Tbilisi.
- Geretti, A. M. (2006). HIV-1 subtypes: epidemiology and significance for HIV management. *Curr Opin Infect Dis*, *19*(1), 1-7.
- Geretti, A. M., Harrison, L., Green, H., Sabin, C., Hill, T., Fearnhill, E., . . . Dunn, D. (2009). Effect of HIV-1 subtype on virologic and immunologic response to starting highly active antiretroviral therapy. *Clin Infect Dis*, *48*(9), 1296-1305.
- Grossman, Z., Istomin, V., Averbuch, D., Lorber, M., Risenberg, K., Levi, I., . . . Schapiro, J. M. (2004). Genetic variation at NNRTI resistance-associated positions in patients infected with HIV-1 subtype C. *AIDS*, *18*(6), 909-915.
- Gulick, R. M., Mellors, J. W., Havlir, D., Eron, J. J., Gonzalez, C., McMahon, D., . . . Chodakewitz, J. A. (1997). Treatment with indinavir, zidovudine, and lamivudine in adults with human immunodeficiency virus infection and prior antiretroviral therapy. *N Engl J Med*, *337*(11), 734-739.
- Gupta, R., Hill, A., Sawyer, A. W., & Pillay, D. (2008). Emergence of drug resistance in HIV type 1-infected patients after receipt of first-line highly active antiretroviral therapy: a systematic review of clinical trials. *Clin Infect Dis*, *47*(5), 712-722.
- Hall, T. (2013). BioEdit version 7.2.5
- Hammer, S. M., Katzenstein, D. A., Hughes, M. D., Gundacker, H., Schooley, R. T., Haubrich, R. H., . . . Merigan, T. C. (1996). A trial comparing nucleoside monotherapy with combination therapy in HIV-infected adults with CD4 cell counts from 200 to 500 per cubic millimeter. AIDS Clinical Trials Group Study 175 Study Team. *N Engl J Med*, *335*(15), 1081-1090.

- Hammer, S. M., Squires, K. E., Hughes, M. D., Grimes, J. M., Demeter, L. M., Currier, J. S., . . . Fischl, M. A. (1997). A controlled trial of two nucleoside analogues plus indinavir in persons with human immunodeficiency virus infection and CD4 cell counts of 200 per cubic millimeter or less. AIDS Clinical Trials Group 320 Study Team. *N Engl J Med*, *337*(11), 725-733.
- Harris, M. E., Serwadda, D., Sewankambo, N., Kim, B., Kigozi, G., Kiwanuka, N., . . . McCutchan, F. E. (2002). Among 46 near full length HIV type 1 genome sequences from Rakai District, Uganda, subtype D and AD recombinants predominate. *AIDS Res Hum Retroviruses*, *18*(17), 1281-1290.
- Hemelaar, J., Gouws, E., Ghys, P. D., & Osmanov, S. (2006). Global and regional distribution of HIV-1 genetic subtypes and recombinants in 2004. *AIDS*, *20*(16), W13-23.
- Herring, B. L., Ge, Y. C., Wang, B., Ratnamohan, M., Zheng, F., Cunningham, A. L., . . . Dwyer, D. E. (2003). Segregation of human immunodeficiency virus type 1 subtypes by risk factor in Australia. *J Clin Microbiol*, *41*(10), 4600-4604.
- Hill, C. P., Worthylake, D., Bancroft, D. P., Christensen, A. M., & Sundquist, W. I. (1996). Crystal structures of the trimeric human immunodeficiency virus type 1 matrix protein: implications for membrane association and assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *93*(7), 3099-3104.
- Hinz, A., Miguet, N., Natrajan, G., Usami, Y., Yamanaka, H., Renesto, P., . . . Weissenhorn, W. (2010). Structural basis of HIV-1 tethering to membranes by the BST-2/tetherin ectodomain. *Cell Host Microbe*, *7*(4), 314-323.
- HIVDB. (2013). <http://hivdb.stanford.edu/>
- Ho, D. D., Neumann, A. U., Perelson, A. S., Chen, W., Leonard, J. M., & Markowitz, M. (1995). Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature*, *373*(6510), 123-126.
- Hoffmann, C., Rockstroh, J.K (2012). *HIV 2012/2013*.
- Hogg, R. S., Bangsberg, D. R., Lima, V. D., Alexander, C., Bonner, S., Yip, B., . . . Harrigan, P. R. (2006). Emergence of drug resistance is associated with an increased risk of death among patients first starting HAART. *PLoS Med*, *3*(9), e356.

- Hosseinipour, M. C., Gupta, R. K., Van Zyl, G., Eron, J. J., & Nachega, J. B. (2013). Emergence of HIV drug resistance during first- and second-line antiretroviral therapy in resource-limited settings. *J Infect Dis*, *207 Suppl 2*, S49-56.
<http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/MAP/landmark.html>
<http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/MAP/landmark.html>
- Hu, W. S., & Temin, H. M. (1990). Genetic consequences of packaging two RNA genomes in one retroviral particle: pseudodiploidy and high rate of genetic recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *87*(4), 1556-1560.
- Hue, S., Brown, A. E., Ragonnet-Cronin, M., Lycett, S. J., Dunn, D. T., Fearnhill, E., . . . Leigh Brown, A. J. (2014). Phylogenetic analyses reveal HIV-1 infections between men misclassified as heterosexual transmissions. *AIDS*, *28*(13), 1967-1975.
- Hue, S., Clewley, J. P., Cane, P. A., & Pillay, D. (2004). HIV-1 pol gene variation is sufficient for reconstruction of transmissions in the era of antiretroviral therapy. *Aids*, *18*(5), 719-728.
- Huthoff, H., Autore, F., Gallois-Montbrun, S., Fraternali, F., & Malim, M. H. (2009). RNA-dependent oligomerization of APOBEC3G is required for restriction of HIV-1. *PLoS Pathog*, *5*(3), e1000330.
- Japour, A. J., Welles, S., D'Aquila, R. T., Johnson, V. A., Richman, D. D., Coombs, R. W., . . . Kuritzkes, D. R. (1995). Prevalence and clinical significance of zidovudine resistance mutations in human immunodeficiency virus isolated from patients after long-term zidovudine treatment. AIDS Clinical Trials Group 116B/117 Study Team and the Virology Committee Resistance Working Group. *J Infect Dis*, *171*(5), 1172-1179.
- Jern, P., Russell, R. A., Pathak, V. K., & Coffin, J. M. (2009). Likely role of APOBEC3G-mediated G-to-A mutations in HIV-1 evolution and drug resistance. *PLoS Pathog*, *5*(4), e1000367.
- Jetzt, A. E., Yu, H., Klarmann, G. J., Ron, Y., Preston, B. D., & Dougherty, J. P. (2000). High rate of recombination throughout the human immunodeficiency virus type 1 genome. *J Virol*, *74*(3), 1234-1240.

- Karlsson, A. C., Iversen, A. K., Chapman, J. M., de Oliveira, T., Spotts, G., McMichael, A. J., . . . Nixon, D. F. (2007). Sequential broadening of CTL responses in early HIV-1 infection is associated with viral escape. *PLoS One*, *2*(2), e225.
- Keele, B. F., & Derdeyn, C. A. (2009). Genetic and antigenic features of the transmitted virus. *Curr Opin HIV AIDS*, *4*(5), 352-357.
- Keele, B. F., Van Heuverswyn, F., Li, Y., Bailes, E., Takehisa, J., Santiago, M. L., . . . Hahn, B. H. (2006). Chimpanzee reservoirs of pandemic and nonpandemic HIV-1. *Science*, *313*(5786), 523-526.
- Kolomeets, A. N., Varghese, V., Lemey, P., Bobkova, M. R., & Shafer, R. W. (2014). A uniquely prevalent nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor resistance mutation in Russian subtype A HIV-1 viruses. *AIDS*.
- Kozal, M. J., Shafer, R. W., Winters, M. A., Katzenstein, D. A., & Merigan, T. C. (1993). A mutation in human immunodeficiency virus reverse transcriptase and decline in CD4 lymphocyte numbers in long-term zidovudine recipients. *J Infect Dis*, *167*(3), 526-532.
- Kuritzkes, D. R., Lalama, C. M., Ribaud, H. J., Marcial, M., Meyer, W. A., 3rd, Shikuma, C., . . . Gulick, R. M. (2008). Preexisting resistance to nonnucleoside reverse-transcriptase inhibitors predicts virologic failure of an efavirenz-based regimen in treatment-naive HIV-1-infected subjects. *J Infect Dis*, *197*(6), 867-870.
- Lauring, A. S., & Andino, R. (2010). Quasispecies theory and the behavior of RNA viruses. *PLoS Pathog*, *6*(7), e1001005.
- Lemey, P., Kosakovsky Pond, S. L., Drummond, A. J., Pybus, O. G., Shapiro, B., Barroso, H., . . . Rambaut, A. (2007). Synonymous substitution rates predict HIV disease progression as a result of underlying replication dynamics. *PLoS Comput Biol*, *3*(2), e29.
- Lorenzo-Redondo, R., Borderia, A. V., & Lopez-Galindez, C. (2011). Dynamics of in vitro fitness recovery of HIV-1. *J Virol*, *85*(4), 1861-1870.
- Malim, M. H., & Emerman, M. (2001). HIV-1 sequence variation: drift, shift, and attenuation. *Cell*, *104*(4), 469-472.
- Mansky, L. M. (2002). HIV mutagenesis and the evolution of antiretroviral drug resistance. *Drug Resist Updat*, *5*(6), 219-223.

- Marconi, V. C., Sunpath, H., Lu, Z., Gordon, M., Koranteng-Apeagyei, K., Hampton, J., . . . Kuritzkes, D. R. (2008). Prevalence of HIV-1 drug resistance after failure of a first highly active antiretroviral therapy regimen in KwaZulu Natal, South Africa. *Clin Infect Dis*, *46*(10), 1589-1597.
- Marlink, R., Kanki, P., Thior, I., Travers, K., Eisen, G., Siby, T., . . . et al. (1994). Reduced rate of disease development after HIV-2 infection as compared to HIV-1. *Science*, *265*(5178), 1587-1590.
- Mastro, T. D., Kumanusont, C., Dondero, T. J., & Wasi, C. (1997). Why do HIV-1 subtypes segregate among persons with different risk behaviors in South Africa and Thailand? *AIDS*, *11*(1), 113-116.
- Mayer, K. H. (2014). Editorial commentary: The next tsunami? HIV spread in Asian men who have sex with men. *Clin Infect Dis*, *58*(12), 1760-1762.
- McCutchan, F. E., Carr, J. K., Bajani, M., Sanders-Buell, E., Harry, T. O., Stoeckli, T. C., . . . Kalish, M. L. (1999). Subtype G and multiple forms of A/G intersubtype recombinant human immunodeficiency virus type 1 in Nigeria. *Virology*, *254*(2), 226-234.
- McNutt, L. A., Wu, C., Xue, X., & Hafner, J. P. (2003). Estimating the relative risk in cohort studies and clinical trials of common outcomes. *Am J Epidemiol*, *157*(10), 940-943.
- Menu, E., Truong, T. X., Lafon, M. E., Nguyen, T. H., Muller-Trutwin, M. C., Nguyen, T. T., . . . Barre-Sinoussi, F. (1996). HIV type 1 Thai subtype E is predominant in South Vietnam. *AIDS Res Hum Retroviruses*, *12*(7), 629-633.
- Mocroft, A., Ledergerber, B., Katlama, C., Kirk, O., Reiss, P., d'Arminio Monforte, A., . . . Lundgren, J. D. (2003). Decline in the AIDS and death rates in the EuroSIDA study: an observational study. *Lancet*, *362*(9377), 22-29.
- Montavon, C., Toure-Kane, C., Liegeois, F., Mpoudi, E., Bourgeois, A., Vergne, L., . . . Peeters, M. (2000). Most env and gag subtype A HIV-1 viruses circulating in West and West Central Africa are similar to the prototype AG recombinant virus IBNG. *J Acquir Immune Defic Syndr*, *23*(5), 363-374.

- Motomura, K., Kusagawa, S., Kato, K., Nohtomi, K., Lwin, H. H., Tun, K. M., . . . Takebe, Y. (2000). Emergence of new forms of human immunodeficiency virus type 1 intersubtype recombinants in central Myanmar. *AIDS Res Hum Retroviruses*, *16*(17), 1831-1843.
- Mtambo, A., Chan, K., Shen, A., Lima, V., Hogg, R., Montaner, J., & Moore, D. (2012). Treatment limitations imposed by antiretroviral drug resistance mutations: implication for choices of first line regimens in resource-limited settings. *HIV Med*, *13*(3), 141-147.
- Palella, F. J., Jr., Armon, C., Buchacz, K., Cole, S. R., Chmiel, J. S., Novak, R. M., . . . Brooks, J. T. (2009). The association of HIV susceptibility testing with survival among HIV-infected patients receiving antiretroviral therapy: a cohort study. *Ann Intern Med*, *151*(2), 73-84.
- Palella, F. J., Jr., Delaney, K. M., Moorman, A. C., Loveless, M. O., Fuhrer, J., Satten, G. A., . . . Holmberg, S. D. (1998). Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. HIV Outpatient Study Investigators. *N Engl J Med*, *338*(13), 853-860.
- Palma, A. C., Covens, K., Snoeck, J., Vandamme, A. M., Camacho, R. J., & Van Laethem, K. (2012). HIV-1 protease mutation 82M contributes to phenotypic resistance to protease inhibitors in subtype G. *J Antimicrob Chemother*, *67*(5), 1075-1079.
- Pathela, P., Hajat, A., Schillinger, J., Blank, S., Sell, R., & Mostashari, F. (2006). Discordance between sexual behavior and self-reported sexual identity: a population-based survey of New York City men. *Ann Intern Med*, *145*(6), 416-425.
- Pillay, D., Green, H., Matthias, R., Dunn, D., Phillips, A., Sabin, C., & Evans, B. (2005). Estimating HIV-1 drug resistance in antiretroviral-treated individuals in the United Kingdom. *J Infect Dis*, *192*(6), 967-973.
- Piyasirisilp, S., McCutchan, F. E., Carr, J. K., Sanders-Buell, E., Liu, W., Chen, J., . . . Yu, X. F. (2000). A recent outbreak of human immunodeficiency virus type 1 infection in southern China was initiated by two highly homogeneous, geographically separated strains, circulating recombinant form AE and a novel BC recombinant. *J Virol*, *74*(23), 11286-11295.

- Plantier, J. C., Leoz, M., Dickerson, J. E., De Oliveira, F., Cordonnier, F., Lemee, V., . . . Simon, F. (2009). A new human immunodeficiency virus derived from gorillas. *Nat Med*, *15*(8), 871-872.
- Reuman, E. C., Rhee, S. Y., Holmes, S. P., & Shafer, R. W. (2010). Constrained patterns of covariation and clustering of HIV-1 non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor resistance mutations. *J Antimicrob Chemother*, *65*(7), 1477-1485.
- Richman, D. D., Morton, S. C., Wrin, T., Hellmann, N., Berry, S., Shapiro, M. F., & Bozzette, S. A. (2004). The prevalence of antiretroviral drug resistance in the United States. *AIDS*, *18*(10), 1393-1401.
- Robertson, D. L., Anderson, J. P., Bradac, J. A., Carr, J. K., Foley, B., Funkhouser, R. K., . . . Korber, B. (2000). HIV-1 nomenclature proposal. *Science*, *288*(5463), 55-56.
- Robertson, D. L., Hahn, B. H., & Sharp, P. M. (1995). Recombination in AIDS viruses. *J Mol Evol*, *40*(3), 249-259.
- Robertson, D. L., Sharp, P. M., McCutchan, F. E., & Hahn, B. H. (1995). Recombination in HIV-1. *Nature*, *374*(6518), 124-126.
- Roudinskii, N. I., Sukhanova, A. L., Kazennova, E. V., Weber, J. N., Pokrovsky, V. V., Mikhailovich, V. M., & Bobkov, A. F. (2004). Diversity of human immunodeficiency virus type 1 subtype A and CRF03_AB protease in Eastern Europe: selection of the V77I variant and its rapid spread in injecting drug user populations. *J Virol*, *78*(20), 11276-11287.
- Salazar-Gonzalez, J. F., Salazar, M. G., Keele, B. F., Learn, G. H., Giorgi, E. E., Li, H., . . . Shaw, G. M. (2009). Genetic identity, biological phenotype, and evolutionary pathways of transmitted/founder viruses in acute and early HIV-1 infection. *J Exp Med*, *206*(6), 1273-1289.
- Scherrer, A. U., Ledergerber, B., von Wyl, V., Boni, J., Yerly, S., Klimkait, T., . . . Gunthard, H. F. (2011). Improved virological outcome in White patients infected with HIV-1 non-B subtypes compared to subtype B. *Clin Infect Dis*, *53*(11), 1143-1152.
- Sharp, P. M., & Hahn, B. H. (2011). Origins of HIV and the AIDS pandemic. *Cold Spring Harb Perspect Med*, *1*(1), a006841.

- Sharp, P. M., Shaw, G. M., & Hahn, B. H. (2005). Simian immunodeficiency virus infection of chimpanzees. *J Virol*, *79*(7), 3891-3902.
- Shriner, D., Rodrigo, A. G., Nickle, D. C., & Mullins, J. I. (2004). Pervasive genomic recombination of HIV-1 in vivo. *Genetics*, *167*(4), 1573-1583.
- Simon-Loriere, E., Galetto, R., Hamoudi, M., Archer, J., Lefeuvre, P., Martin, D. P., . . . Negroni, M. (2009). Molecular mechanisms of recombination restriction in the envelope gene of the human immunodeficiency virus. *PLoS Pathog*, *5*(5), e1000418.
- Simon-Loriere, E., Martin, D. P., Weeks, K. M., & Negroni, M. (2010). RNA structures facilitate recombination-mediated gene swapping in HIV-1. *J Virol*, *84*(24), 12675-12682.
- Smith, J. A., & Daniel, R. (2006). Following the path of the virus: the exploitation of host DNA repair mechanisms by retroviruses. *ACS Chem Biol*, *1*(4), 217-226.
- Spiegelman, D., & Hertzmark, E. (2005). Easy SAS calculations for risk or prevalence ratios and differences. *Am J Epidemiol*, *162*(3), 199-200.
- Sterne, J. A., Hernan, M. A., Ledergerber, B., Tilling, K., Weber, R., Sendi, P., . . . Egger, M. (2005). Long-term effectiveness of potent antiretroviral therapy in preventing AIDS and death: a prospective cohort study. *Lancet*, *366*(9483), 378-384.
- Tamalet, C., Fantini, J., Tourres, C., & Yahi, N. (2003). Resistance of HIV-1 to multiple antiretroviral drugs in France: a 6-year survey (1997-2002) based on an analysis of over 7000 genotypes. *AIDS*, *17*(16), 2383-2388.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., & Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol Biol Evol*, *30*(12), 2725-2729.
- Tang, M. W., & Shafer, R. W. (2012). HIV-1 antiretroviral resistance: scientific principles and clinical applications. *Drugs*, *72*(9), e1-25.
- Taylor, J. E., & Korber, B. T. (2005). HIV-1 intra-subtype superinfection rates: estimates using a structured coalescent with recombination. *Infect Genet Evol*, *5*(1), 85-95.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., & Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res*, *22*(22), 4673-4680.

- Tsertsvadze, T., Chkhartishvili, N., Dvali, N., Karchava, M., Chokoshvili, O., Tavadze, L., . . . Zohrabyan, L. (2014). Estimating HIV incidence in eastern European country of Georgia: 2010-2012. *Int J STD AIDS*, *25*(13), 913-920.
- Tsertsvadze, T., Chkhartishvili, N., Sharvadze, L., Dvali, N., Chokoshvili, O., Gabunia, P., . . . Del Rio, C. (2011). Outcomes of Universal Access to Antiretroviral Therapy (ART) in Georgia. *AIDS Res Treat*, *2011*, 621078.
- UNAIDS. (2014). *The Gap Report*. Geneva: UNAIDS.
- van Harmelen, J., Wood, R., Lambrick, M., Rybicki, E. P., Williamson, A. L., & Williamson, C. (1997). An association between HIV-1 subtypes and mode of transmission in Cape Town, South Africa. *AIDS*, *11*(1), 81-87.
- Vella, S., Schwartländer, B., Sow, S. P., Eholie, S. P., & Murphy, R. L. (2012). The history of antiretroviral therapy and of its implementation in resource-limited areas of the world. *AIDS*, *26*(10), 1231-1241.
- Vessiere, A., Leoz, M., Brodard, V., Strady, C., Lemee, V., Depatureaux, A., . . . Plantier, J. C. (2010). First evidence of a HIV-1 M/O recombinant form circulating outside Cameroon. *AIDS*, *24*(7), 1079-1082.
- Vidal, N., Bazepeo, S. E., Mulanga, C., Delaporte, E., & Peeters, M. (2009). Genetic characterization of eight full-length HIV type 1 genomes from the Democratic Republic of Congo (DRC) reveal a new subsubtype, A5, in the A radiation that predominates in the recombinant structure of CRF26_A5U. *AIDS Res Hum Retroviruses*, *25*(8), 823-832.
- Vidal, N., Peeters, M., Mulanga-Kabeya, C., Nzilambi, N., Robertson, D., Ilunga, W., . . . Delaporte, E. (2000). Unprecedented degree of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) group M genetic diversity in the Democratic Republic of Congo suggests that the HIV-1 pandemic originated in Central Africa. *J Virol*, *74*(22), 10498-10507.
- Volberding, P., Greene, W., Lange, J. M. A., Gallant, J. E., & Sewankambo, N. (2012). *Sande's HIV/AIDS Medicine: Medical Management of AIDS 2013*. Saunders.
- Volberding, P. A., Lagakos, S. W., Koch, M. A., Pettinelli, C., Myers, M. W., Booth, D. K., . . . et al. (1990). Zidovudine in asymptomatic human immunodeficiency virus infection. A controlled trial in persons with fewer than 500 CD4-positive cells per cubic millimeter.

- The AIDS Clinical Trials Group of the National Institute of Allergy and Infectious Diseases. *N Engl J Med*, 322(14), 941-949.
- von Wyl, V., Yerly, S., Burgisser, P., Klimkait, T., Battegay, M., Bernasconi, E., . . . Gunthard, H. F. (2009). Long-term trends of HIV type 1 drug resistance prevalence among antiretroviral treatment-experienced patients in Switzerland. *Clin Infect Dis*, 48(7), 979-987.
- Wallis, C. L., Aga, E., Ribaud, H., Saravanan, S., Norton, M., Stevens, W., . . . Katzenstein, D. (2014). Drug susceptibility and resistance mutations after first-line failure in resource limited settings. *Clin Infect Dis*, 59(5), 706-715.
- Ward, M. J., Lycett, S. J., Kalish, M. L., Rambaut, A., & Leigh Brown, A. J. (2013). Estimating the rate of intersubtype recombination in early HIV-1 group M strains. *J Virol*, 87(4), 1967-1973.
- Wei, X., Ghosh, S. K., Taylor, M. E., Johnson, V. A., Emini, E. A., Deutsch, P., . . . et al. (1995). Viral dynamics in human immunodeficiency virus type 1 infection. *Nature*, 373(6510), 117-122.
- Weiss, R. A. (1993). How does HIV cause AIDS? *Science*, 260(5112), 1273-1279.
- Wolinsky, S. M., Korber, B. T., Neumann, A. U., Daniels, M., Kunstman, K. J., Whetsell, A. J., . . . Safrit, J. T. (1996). Adaptive evolution of human immunodeficiency virus-type 1 during the natural course of infection. *Science*, 272(5261), 537-542.
- World Health Organization. (2014). *Global update on the health sector response to HIV, 2014*. Geneva: World Health Organization.
- World Health Organization. (2014.). The top 10 causes of death Retrieved October 25, 2014, from <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/>
- Worobey, M., Gemmel, M., Teuwen, D. E., Haselkorn, T., Kunstman, K., Bunce, M., . . . Wolinsky, S. M. (2008). Direct evidence of extensive diversity of HIV-1 in Kinshasa by 1960. *Nature*, 455(7213), 661-664.
- www.abbottmolecular.com. www.abbottmolecular.com

- Yang, H. T., Tang, W., Xiao, Z. P., Jiang, N., Mahapatra, T., Huan, X. P., . . . Fu, G. F. (2014). Worsening epidemic of HIV and syphilis among men who have sex with men in Jiangsu Province, China. *Clin Infect Dis*, *58*(12), 1753-1759.
- Yang, W., Bielawski, J. P., & Yang, Z. (2003). Widespread adaptive evolution in the human immunodeficiency virus type 1 genome. *J Mol Evol*, *57*(2), 212-221.
- Zarandia, M., Tsertsvadze, T., Carr, J. K., Nadai, Y., Sanchez, J. L., & Nelson, A. K. (2006). HIV-1 genetic diversity and genotypic drug susceptibility in the Republic of Georgia. *AIDS Res Hum Retroviruses*, *22*(5), 470-476.
- Zhang, J., & Temin, H. M. (1994). Retrovirus recombination depends on the length of sequence identity and is not error prone. *J Virol*, *68*(4), 2409-2414.
- თ. ცერცვაძე, კ. ნ., მ. ბუნაშვილი, ნ. გოჩიტაშვილი. (1999). *შიდსი*. თბილისი.

დანართი 1. ინგლისური რეზიუმე

**Characterization of HIV-1 Subtypes and Drug Resistant Strains in
Georgia**

PhD Thesis

Natia Dvali

Tbilisi, 2015

Introduction

HIV/AIDS remains the major global public health challenge of modern times, with around 35 million people living with HIV by the end of 2013. 2.1 [1.9–2.4] million people became infected with HIV in 2013 globally. HIV/AIDS is 6th leading cause of death worldwide and 2nd leading cause of death in resource limited countries. By December 31, 2014 there were reported 4 697 HIV/AIDS cases in Georgia.

Introduction of antiretroviral treatment (ART) has significantly reduced HIV/AIDS related morbidity and mortality and prolonged life expectancy of people living with HIV/AIDS. However, ART efficacy can be impaired by antiretroviral resistance, which is a frequent reason of ART failure. ART resistance may develop during treatment (acquired resistance), or a person may become infected with drug resistant HIV (transmitted resistance).

As in the rest of the world, ART failure due to resistance is a problem in Georgia, which has increased along with the availability of antiretroviral treatment. Since 2004, through the Global Fund support Georgia ensured universal access to ART for all patients in need. Provision of ART is governed by the national guidelines and is coordinated by the Infectious Diseases, AIDS and Clinical Immunology Research Center (National AIDS Center). Currently ART is recommended in all patients with CD4 count <500 cells/mm³. The recommended initial regimen consists of two nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NRTI) and one non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor (NNRTI). A ritonavir (r) boosted protease inhibitor (PI) is recommended in cases when an NNRTI cannot be prescribed. Currently tenofovir + emtricitabine and zidovudine + lamivudine are used for the NRTI component of initial regimen. Efavirenz is the preferred NNRTI with nevirapine being recommended as an alternative to EFV. Increased access to ART plays an important role in transmission of resistant HIV in treated and also treatment naive population. HIV resistance developed during ARV treatment is the main reason of resistance transmission.

The global HIV epidemic is primarily caused by HIV type 1 (HIV-1), which is characterized by divergent evolution leading to development of multiple subtypes and inter-subtype recombinant forms. This genetic diversity can affect disease progression, response to antiretroviral therapy (ART) and emergence of drug resistance. The knowledge about subtype-specific responses to currently available antiretroviral drugs is especially important for resource poor countries, where treatment options are limited because of economic constraints. Resistance pathways in different subtypes may affect

drug cross-resistance and the potential use of specific second-line regimens, which further narrows limited treatment options in developing countries.

The majority of HIV drug resistance studies worldwide have been carried in HIV-1 subtype B strains. It is important, that in most of developing countries, where the ART is becoming increasingly available, so called "non-B" subtypes of HIV are more prevalent. Molecular epidemiology of HIV in Georgia has not been widely studied. A small study conducted by Infectious Diseases, AIDS Clinical Immunology Research Center with US collaborators in 1998-2003 revealed that subtype A is the most prevalent (70%) HIV subtype in Georgia. Subtypes B, C and CRF18_cpx were also identified. The study also showed transmitted resistance in 4% of treatment naive patients.

The study included only 48 HIV/AIDS patients and does not give the full picture of the situation. It is also important to note, that after 2003 important changes happened in Georgia in terms of epidemic development itself and also in strengthening intervention activities. For many years men with injection drug use (IDU) represented majority of HIV/AIDS patients. In last few years annual trends of newly reported cases show increase in the proportion of sexually acquired infections, including heterosexual and male-to-male sexual contacts. This change might have affected HIV subtype distribution in the country.

Objective

Objective of the study was Characterization of HIV-1 Subtypes and Drug Resistant Strains in Georgia

Specific aims:

1. Study of HIV-1 molecular epidemiology and assessing tendency in 2006-2013yy
2. Phylogenetic analyses of HIV-1 transmission clusters in Georgia
3. Study of transmitted drug resistance in treatment naive patients and assessing tendency in 2006-2013yy
4. Characterization of drug resistance profile of HIV-1 subtypes circulating in Georgia (2005-2013yy)

Materials and Methods

Study population: 411 HIV/AIDS patients registered at the Infectious Diseases, AIDS and Clinical Immunology Research Center divided in two groups:

Group 1: 218 antiretroviral naïve, newly diagnosed adult (age ≥ 18) HIV patients, with HIV VL >1000 cop/mL were enrolled during the periods of 2006-2008 (n=126) and 2011-2013 (n=92). Plasma samples were collected at the patients' first clinical visit after their HIV diagnosis. Molecular epidemiology of HIV-1, phylogenetics of HIV "transmission clusters" and transmitted drug resistance was studied in this group.

Group 2: 193 adult (age ≥ 18 years) HIV patients who experienced virological failure and were found to carry drug resistant strains of HIV-1 based on HIV genotypic resistance testing. Study period was 2005-2013. Subjects were identified through laboratory and medical records. Data on demographic and clinical characteristics were abstracted through chart review. The virologic failure was defined as plasma HIV-1 RNA level >400 copies/mL 6 months or >50 copies/mL 12 months after commencing treatment in patients that remain on ART, or if patient had viral rebound confirmed by two consecutive measurements following the undetectable plasma HIV-1 RNA levels while on therapy.

Methods

Genotyping: Partial HIV-1 *pol* sequences, containing protease and partial reverse transcriptase genes, were generated through population-based sequencing using the TruGene HIV-1 genotyping kit (Siemens Healthcare Diagnostics, Tarrytown, NY, USA) and the ViroSeq HIV-1 genotyping System (Abbott Diagnostics, Foster City, CA, USA) in accordance with the manufacturers' instructions. HIV *pol* gene sequences were examined for the presence of resistance-associated mutations. Stanford HIV Sequence Database (<http://hivdb.stanford.edu/>) was used for interpretation of resistance data. Mutations listed by the International Antiviral Society-USA were considered.

Phylogenetic analyses: Multiple alignments were created with the CLUSTAL W program. Phylogenetic analyses were conducted using MEGA software version 6.0. The Neighbor Joining (NJ) method and Kimura two-parameter model with reliability estimated from 1000 bootstrap replicates were used for tree construction. HIV-1 subtypes were assigned by inferring relatedness of participant sequences to reference HIV-1 sequences obtained from the Los Alamos National Laboratory HIV Sequence Database (<http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/mainpage.html>). A transmission cluster was defined as a phylogenetic clade with ≥ 2 sequences showing a bootstrap value of $\geq 70\%$ and ≤ 0.015 mean intra-cluster genetic distance.

Statistical analysis: Statistical analyses were carried out using SAS 9.2 (SAS Institute, Cary, NC, USA). Standard descriptive statistics were performed to describe patient characteristics. Comparisons were tested using Pearson's chi-square test or Fisher's exact test as appropriate. Significance was defined as p value <0.05. Modified multivariate Poisson regression analysis was used to identify factors associated with the membership in a transmission cluster.

Results

Among 218 ART naïve patients included in the study the median age was 35 years (interquartile range: 29-42) and 11% were within the age group of 18-25 years. The majority (63%) were men. Fifty-three percent were infected via heterosexual contact, IDU accounted for 37.6% and male-to-male sex for 6.9% of cases.

Our study shows that subtype A continues to be the predominant strain (n=195, 89.4%) of HIV circulating in Georgia, followed by 15 (6.9%) samples of subtype B and 6 (2.7%) samples of subtype G. Also there were single cases of subtype F (n=1, 0.5%) and a recombinant form AB_03 (n=1, 0.5%). Subtype A was predominant among IDUs and heterosexually infected persons accounting for 94% and 92% of samples respectively, while 60% of MSM had subtype B virus. All viruses within subtypes A, B and G formed major clusters, with bootstrap values of 86% for subtype A, 98% for subtype B and 84% for subtype G. The number of cases attributable to subtype G appears to be increasing. The first case of infection with this subtype in Georgia was registered in 2006 in a labor migrant returning to Georgia from Europe. Since then 5 more cases were identified all of which formed a major cluster with bootstrap support of 84%. Subtype G is well established in Portugal and has also been identified in other European countries in around 3% of newly diagnosed patients.

To the best of our knowledge our study was the first to evaluate transmission clusters on sequences obtained from a country of the former Soviet Union. We found that a total of 49 (22.5%) of *pol* sequences in our analysis formed 17 transmission clusters delineated by transmission categories and gender; 12 consisted of two sequences and the largest cluster consisted of 8 sequences. Of these 49 sequences 14 (28.6%) were from IDUs, 13 (26.5%) from heterosexually infected women, 9 (18.4%) from heterosexually infected men and 13 (26.5%) from MSM.

Male IDUs and heterosexually infected women created 8 transmission clusters, including 6 male-female pairs, one cluster of 1 IDU man and 2 heterosexually infected females and one cluster with 3 IDU men and one heterosexually infected female. There were 3 transmission pairs formed by sequences from heterosexually infected persons, including 2 male-female pairs and one male pair. Two pairs were formed by sequences from male IDUs. The dominant HIV-1 subtype in IDU and heterosexually infected females was subtype A. This finding supports surveillance data indicating a close linkage between the IDU associated and heterosexual-sex associated HIV epidemics in Georgia. A recent study showed that the major risk associated with HIV infection among women in Georgia is related to the sexual partner being either IDU or HIV positive. Thus, the heterosexual epidemic in Georgia is primarily propagated by the IDU community and is not a result of the generalization of the epidemic. The national program on prevention of mother-to-child transmission (PMTCT) of HIV, which ensures universal HIV screening of pregnant women, provides further evidence that the virus has not spread widely to the general population. Data from this program shows that the prevalence of HIV infection in pregnant women remains very low, ranging from 0.02% to 0.04% during 2006-2013 period (unpublished data of the Georgian National Center for Disease Control and Public Health).

Although women constitute the majority of persons infected through heterosexual contact in Georgia, recent data indicate an increase in the number of heterosexually acquired infections among men. In our study, of 9 sequences from heterosexually infected men, 2 sequences formed a pair consisting of men only and 5 sequences clustered with samples from MSM. This finding is suggestive of possible non-disclosure of homosexual behavior, which is not criminalized in Georgia, but is highly stigmatized. Recent studies from the U.S. and UK also showed significant mixing between MSM and heterosexuals, as well as identified misclassification of male-to-male sex as heterosexual transmission. Underreporting of homosexual behavior is a common problem worldwide, and MSM who are incorrectly thought to be heterosexuals by health workers are likely to receive inadequate prevention interventions.

Thirteen sequences from MSM contributed to creation of 4 clusters, including one pair and one cluster of three sequences consisting of MSM only, and two mixed clusters, including the largest cluster of 8 sequences. One mixed cluster of 7 sequences consisted of samples from 2 MSM, 3 heterosexually infected men and 2 heterosexually infected women. One cluster of 8 sequences consisted of samples from 6 MSM and 2

heterosexually infected men. There was no evidence of clustering between sequences obtained from MSM and IDUs.

Our study shows substantial clustering of MSM sequences (13 of 15 sequences clustered) suggesting more dense networks of spread. Multivariate analysis confirmed higher likelihood of clustering among MSM: factors associated with cluster membership were younger age with relative risk (RR) of 2.44 (95% CI: 1.20-4.96, $p=0.014$) for age groups of 18- \leq 25 years and RR of 1.83 (1.03-3.27, $p=0.040$) for age group of >25 - \leq 35 years; male-to-male sex with RR of 2.16 (95% CI: 1.16-4.03, $p=0.015$); having subtype B virus - RR 2.56 (95% CI: 1.42-4.61, $p=0.002$) and having HIV-1 subtype other than A or B - 2.68 (95% CI: 1.29-5.57, $p=0.008$) Gender was not associated with the outcome measure in univariate analysis and showed significant collinearity with the mode of transmission and subsequently was removed from multivariate model. Together with epidemiological data, demonstrating an increase in the prevalence of HIV in MSM and higher rates of recent infections, findings of this study once again point to an emerging epidemic in this population. An increase in epidemics among MSM has been noted globally, including in areas traditionally viewed as non-MSM epidemic settings such as sub-Saharan Africa and Asia.

Our data also suggests an independent evolution of an MSM epidemic in Georgia. MSM sequences did not cluster with IDU sequences, and there was a non-significant connection with female sequences in a cluster which also contained 3 sequences from heterosexually infected men. In addition, unlike IDUs and heterosexually infected women, the majority of MSM had subtype B virus. Segregation of epidemics have been reported from several other countries, especially during the early stages of an epidemic.

Mutations associated with HIV drug resistance were detected in viruses from 3 (2.38%) of the 126 ART naive patients enrolled in 2006-2008 survey, including two cases of NNRTI resistance due to K103N and K101E mutations, and one case of NRTI resistance due to M184I mutation. In 2011-2013 survey, drug resistance mutations were detected in viruses from 2 (2.17%) of the 92 ART naive patients enrolled in the survey, including one case of NNRTI resistance due to Y188HL mutation, and one case of PI resistance due to N88S mutation

Among 193 patients failing ART HIV included in the analysis the median age was 39 years and majority (74%) were men (table 1). More than half (53.4%) of patients were infected through injection drug use and 86.5% had HIV subtype A. Nearly 80% of patients received Efavirenz-based ART regimen, up to 20% of patients were on Nevirapine-based

regimen and only one patient was on Lopinavir-based ART at the time of virologic failure. The most common NRTI backbone was Zidovudine + Lamivudine (45.1%) followed by Abacavir + Lamivudine (22.3%), Tenofovir + Emtricitabine (21.7%) and Stavudine + Lamivudine (10.9%).

A total of 170 (88.1%) patients had virus with dual-class NRTI + NNRTI resistance, virus from one (0.5%) patient had dual-class NRTI + PI resistance, single-class resistance was identified 21 (10.9%) viruses, including 10 (5.2%) cases of NRTI resistance only and 11 (5.7%) cases of NNRTI resistance only. One (0.5%) patient carried the virus with triple-class NRTI + NNRTI + PI resistance.

The most common NRTI mutation was M184V found in 166 (86.0%) viruses, followed by L74V (22.3%, n=43) and K65R (13.5%, n=26). Any thymidine analogue mutation (TAM) was found in 23.3% of samples and 7.8% of viruses carried ≥ 3 TAMs. The most common TAM was D67N – 12.9%. Comparison of occurrence of NRTI mutations by subtype did not show any statistically significant difference.

Our study shows that HIV-1 Subtype A has distinct NNRTI drug resistance profile. This has been first described by our group and recently has been confirmed in larger study from Russia. Similar to our previous reports G190S was the most common NNRTI mutation and the frequency was significantly higher in subtype A samples. NNRTI mutation was G190S, found in 105 (54.4%) of samples. This is the main distinction from other subtypes, which tend to select for K103N and Y181CI mutations more frequently.

Another important characteristic observed in our study was high frequency of K101E mutation (31.6%, n=61), which was identified only in subtype A samples and which almost exclusively was co-occurring with G190S. This has not been described previously. Also there was significant co-occurrence with Y181CI. It is unclear whether these NNRTI mutations were selected simultaneously or were accumulated. In all cases co-occurrence limits the use of novel generation NNRTIs in subtype A infected patients with previous exposure to this drug class. In addition to subtype-based comparisons, differences in frequency of G190S and K101E were also explored by gender, mode of HIV transmission and ART regimen. None of these analyses yielded statistical significance, underscoring that HIV-1 subtype is the only source of difference. The most common NNRTI mutation in subtype B K103N was found in 30.1% (n=58) of Georgian samples.

The level of PI resistance was low. Only two patients in our study carried the virus with PI mutations. In one case it was D30N mutation, the other case was combination of three mutations – M46I, I47V and L76V. One of these patients had been on Nelfinavir

based treatment in early 2000s, when laboratory monitoring capacities were very limited, and the PI resistance was only identified several years after the exposure to the drug. The other patient was on Lopinavir-based ART as part of first line regimen. By the end of 2013 nearly 13% of those on first-line ART were receiving PIs and only one case of drug resistance indicates that PI can be considered for initial treatment in resource-limited settings.

CONCLUSIONS

In conclusion, we report results of the first phylogenetic study from a country in the Eastern European region that investigated transmission clusters. The HIV-1 epidemic in Georgia continues to be dominated by subtype A. Our results reinforce the linkage between the IDU and heterosexual epidemics, while linkage of the IDU epidemic with cases among MSM could not be identified, suggesting independent evolution of epidemics. Tailored prevention interventions are needed to stop emerging epidemic among MSM and to reduce the number of new infections due to IDU and their heterosexual contacts.

Effective ART program in Georgia limits emergence and further spread of drug resistant strains of HIV, which is confirmed by low level of transmitted drugs resistance over time (<5%)

Our study further confirms that HIV-1 subtype A has distinct drug resistance profile and G190S appears to be its favored NNRTI mutation. Frequent co-occurrence of G190S with Y181C and K101E may limit the use of novel generation NNRTIs in subtype A infected patients. There is little information about the PI drug resistance patterns in subtype A stains. Continued monitoring of HIV-1 drug resistance is warranted to inform HIV treatment programs.

დანართი 2. გამოქვეყნებული შრომები