



UNIVERSITATEA “OVIDIUS” DIN CONSTANȚA

ȘCOALA DOCTORALĂ DE MEDICINĂ DOMENIUL DE DOCTORAT MEDICINĂ

PROFILE DE REZISTENȚĂ LA PACIENȚII MULTIEXPERIMENTAȚI ȘI NAIVI INFECTAȚI CU HIV – IMPLICAȚII CLINICE ȘI TERAPEUTICE

REZUMATUL TEZEI

Conducător de doctorat:

Prof.univ.Dr. Sorin Rugină

Student-doctorand:

Roxana-Carmen Pătrașcu (Cernat)

CONSTANȚA

2017

Cuprins

Cuprins	2
I. ASPECTE TEORETICE.....	5
Capitolul 1. Infecția HIV – Date epidemiologice	5
1.1 Date despre epidemiologia infecției HIV/SIDA la nivel mondial	5
1.2 Date despre epidemiologia infecției HIV/SIDA în România	10
1.3 Date epidemiologice depre epidemia HIV/SIDA în Constanța	15
1.4 Filogenia și variabilitatea genetică a virusului imunodeficienței umane.....	24
1.5 Bibliografia capitolului 1	30
Capitolul 2 Ciclul replicativ HIV	35
2.1 Organizarea genomului HIV	35
2.2 Ciclul replicativ HIV	36
2.3 Ținte terapeutice	41
2.4 Mecanismele variabilității HIV	42
2.4.1 Mutații primare și secundare	42
2.4.2 Recombinarea	43
2.4.3 Traficarea virală.....	43
2.4 Bibliografia Capitolului 2	44
Capitolul 3 Terapia antiretrovirală combinată cART.....	46
3.1 Medicamente antiretrovirale: clase și mecanisme de acțiune	46
3.1.1 Inhibitorii nucleozitici de reverstranscriptaz: INRT.....	46
3.1.2 Inhibitorii non-nucleozidici de reverstranscriptază: INNRT	48
3.1.3 Inhibitorii de protează: IP	49
3.1.4 Inhibitorii de integrază: INSTI	50
3.1.5 Inhibitorii de intrare: EI.....	51
3.2 Principii de terapie	55
3.3 Inițierea cART	56
3.4 Monitorizarea cART	58
3.5 Tratamentul și monitorizarea pacienților: date locale.....	59
3.6 Bibliografia Capitolului 3	64
Capitolul 4. Rezistența la terapia antiretrovirală.....	70
4.1 Dezvoltarea rezistenței la antiretrovirale	70
4.1.1 Rezistența primară sau rezistența transmisă (TDR)	71
4.1.2 Rezistența secundară sau rezistența dobândită (ADR).....	72

4.2 Mecanisme de apariție a rezistenței la antiretrovirale	74
4.2.1 Rezistența la inhibitorii nucleozidici de revers transcriptază (INRT)	74
4.2.2 Rezistența la inhibitorii non-nucleozidici de revers transcriptază (INNRT)..	75
4.2.3 Rezistența la inhibitorii de protează (IP)	76
4.2.4 Rezistența la inhibitorii de intrare (EI)	78
4.2.4.1 Rezistența la inhibitorii de fuziune	78
4.2.4.2 Rezistența la antagoniștii CCR5	78
4.2.5 Rezistența la inhibitorii de integrază (INSTI)	79
4.3 Subtipul viral și rezistența la ARV	81
4.4 Bibliografia capitolului 4	82
II Cercetări personale.....	86
Capitolul 5 Fundamentarea cercetării. Material și metode.	86
5.1 Motivația alegerii temei și obiectivele cercetării	86
5.2 Material și metode	90
5.2.1 Eșantionul populațional	90
5.2.2 Metode	91
5.3 Bibliografia capitolului 5	94
Capitolul 6. Rezistența transmisă la pacienți nou diagnosticați cu infecție HIV	95
6.1 Introducere	95
6.2 Lotul studiat	97
6.3 Rezultate	98
6.3.1 Caracteristici pacienți	98
6.3.2 Variantele HIV1	103
6.3.3. Caracterizarea lotului din comunitatea MSM.....	107
6.3.4. Prevalența rezistenței HIV1 transmise (TDR).....	115
6.3.5 Mutații accesorii	120
6.3.6 Terapie ART	123
6.3.7 Discuții	127
6.4 Concluzii	138
6.5 Bibliografia capitolului 6	140
Capitolul 7. Rezistența dobândită la pacienți HIV experimentați terapeutic	144
7.1 Introducere	144
7.2 Lotul studiat	146
7.3 Rezultate	147

7.3.1 Caracteristici pacienți	147
7.3.2 Istoricul terapeutic	151
7.3.3 Analiza rezultatelor genotipărilor	154
7.3.3.1 Subloturile pacienților: cu și fără rezistența dobândită	155
7.3.3.2 Subtipul viral	158
7.3.4 Rezistența dobândită la antiretrovirale	159
7.3.5 Mutații asociate cu rezistența la INRT	160
7.3.6 Mutații asociate cu rezistența la INNRT	165
7.3.7 Mutații asociate cu rezistența la IP	168
7.3.7.1 Mutațiile primare asociate cu rezistența la IP	168
7.3.7.2 Mutații accesorii la nivelul genei proteazei	177
7.3.8 Rezistența la inhibitorii de integrază	179
7.3.9 Determinarea tulpinilor CXCR4	180
7.3.10 Opțiuni terapeutice după efectuarea genotipării	181
7.3.10.1 Opțiuni terapeutice în clasa INRT	181
7.3.10.2 Opțiuni terapeutice în clasa INNRT	183
7.3.10.3 Opțiuni terapeutice în clasa IP	184
7.3.10.4 Opțiuni terapeutice în clasa INSTI	185
7.3.10.5 Opțiuni terapeutice în clasa antagoniștilor de co-receptori	186
7.3.11 Răspunsul viral după optimizarea terapiei	186
7.3.12 Analiza lotului la finalul studiului	191
7.4 Discuții	194
7.5 Concluzii	202
7.6 Bibliografia capitolului 7	204
Capitolul 8. Caracterizarea subtipurilor HIV în Constanța	206
Concluziile tezei	208
Glosar	210

Motivația alegerii temei o constituie pericolul de sănătate publică reprezentat de infecția HIV în forma sa cea mai dificil de combătut: infecția cu tulpină rezistentă la terapie, indiferent dacă aceasta rezistență este transmisă sau dobândită.

Pandemia HIV este una din cele mai mari provocări la care a fost supusă omenirea în ultimii 40 ani, dinamica acestui tip de infecție fiind direct legată de om, ca vector în transmiterea și diseminarea bolii. În România, situația epidemiologică este una specială. Un prim aspect îl reprezintă faptul că este o enclavă de subtip F1, înconjurată de subtipuri virale diferite, A și B. De asemenea, epidemia descrisă în populația pediatrică la începutul anilor '90 reprezintă o caracteristică aparte a României în contextul evoluției infecției HIV la nivel mondial. În Constanța, epidemia devansează restul țării cu cel puțin un an [1]. Copiii infectați în perioada 1986-1990 reprezintă o cohortă pediatrică locală, având în comun câteva particularități: infecție în primii ani de viață (fie pe cale orizontală, fie pe cale verticală prin transmitere de la mamă la făt între anii 1987-1990 [1]), subtip viral F1 în aproape toate cazurile [2], co-infecție cu virusuri hepatitice concomitent cu infecția HIV [3], distribuție pe sexe aproape egală [4]. Acești pacienți au fost luați în evidență, li s-a instituit terapie conform ghidurilor naționale și au beneficiat de o supraveghere activă a infecției, precum și a afecțiunilor asociate [5]. Ei au devenit supraviețuitori de lungă durată, care au experimentat multe scheme terapeutice și la care se descrie fenomenul de “oboseală terapeutică” [4].

În decursul anilor, dinamica epidemiei s-a schimbat, calea de transmitere heterosexuale devenind cea mai importantă. Cum o parte din acești pacienți provin din rândul celor care lucrează în afara țării, presupunem că populația de subtipuri ar fi trebuit să se îmbogățească cu noi variante, cu profiluri diferite de rezistență primară. De asemenea, în ultimii ani sunt depistate cazuri frecvente de infecție acută în comunitatea MSM, unde se conturează o epidemie care se suprapune pe profilul epidemiei mondiale descrise la începutul anilor '80.

La sfârșitul anului 2016, în cadrul clinicii noastre, exista un număr de 1037 de pacienți, din care aproape jumătate provin din supraviețuitorii de lungă durată ai cohortei pediatrice (463 de pacienți). Aceștia sunt multiexperimentați terapeutic, o parte din ei având probleme importante de aderență la tratament. Ajungând la vârste la care sunt activi sexual, ne așteptăm la generarea de cazuri secundare. În cazul multiexperimentaților cu puține opțiuni terapeutice, unde nu se poate obține nedetectabilitatea virală, există riscul apariției cazurilor secundare cu rezistență primară; în cazul pacienților cu aderență scăzută la tratament, transmiterea ar trebui să fie mai frecventă (viremii importante), dar cazurile secundare ar avea frecvent tulpină sălbatică sau, dacă genotiparea s-a efectuat târziu după

momentul infectant, cu sușe care și-au arhivat mutațiile de rezistență dobândite. Cei mai mulți pacienți constănțeni sunt în terapie antiretrovirală (891); 603 din cei 891 au experimentat mai mult de o schemă terapeutică, ponderea cea mai mare având-o pacienții cu mai mult de 3 scheme (287 din cei 891).

Două situații speciale s-au întâlnit în Constanța. În primul rând, cohorta pediatrică a avut oportunitatea accesului la LPV/r în cadrul unui studiu de acces lărgit [6] în condițiile în care acesta nu era disponibil în România. La sfârșitul anului 2010, 199 din aceștia (48.1%) continuau regimuri terapeutice care includeau LPV/r cu o rată de nedetectabilitate de 63.8% [7]. Cum expunerea la LPV/r s-a făcut după alte scheme terapeutice, este posibil să fi existat monoterapie funcțională. Ca urmare, ar fi interesant de aflat profilul de rezistență dezvoltat și ce opțiuni terapeutice au avut după epuizarea LPV/r. În al doilea rând, o parte din pacienții constănțeni au dezvoltat tuberculoză ca manifestare corelată HIV/SIDA (Constanța este o zonă cu endemicitate mare pentru TBC), necesitând terapie tuberculostatică. Mulți pacienți au avut o terapie bazată de EFV în timp ce terapia optimizată de bază nu a conținut INRT activi, drept urmare ar fi util de aflat, în termeni de rezistență antiretrovirală și de disponibilitate ulterioară la alte ARV, ce fel de prognostic au acești pacienți.

Datele despre rezistența HIV-1 în Constanța sunt puține. În acest context, cercetarea ar putea aduce date noi despre epidemia HIV în Constanța în ceea ce privește rezistența la antiretrovirale și tipurile virale circulante.

Teza de doctorat își propune determinarea rezistenței primare la cazurile nou diagnosticate în Constanța (și implicațiile clinice și terapeutice ale acesteia), determinarea profilelor de rezistență în cazul pacienților multiexperimentați (și implicațiile clinice și terapeutice în cazul acestor pacienți). În subsidiar, stabilirea subtipurilor circulante în Constanța și dinamica acestora de-a lungul timpului este un alt deziderat.

Studiul a fost efectuat pe un lot de subiecți diagnosticați și confirmați cu infecție HIV, aflați în supravegherea Centrului Regional Constanța. Au fost incluși în studiu pacienți naivi la tratamentul ARV, nou diagnosticați, cu viremie detectabilă la care s-a putut efectua genotiparea cât mai devreme în cursul infecției și pacienți în tratament antiretroviral de minim 6 luni, considerați a fi în eșec viral, având viremii >1000 copii/ml, care să poată permite efectuarea genotipării.

Genotipările au fost efectuate în Laboratorul de Genetică Moleculară al Institutului Național de Boli Infecțioase “Prof dr Matei Balș” București, la Institutul de Virusologie “Ștefan S. Nicolau” București și în laboratoarele Quest Diagnostics, Monogram Bioscience și Virco. Secvențele complete obținute, reprezentând întreaga genă PR și două treimi din

gena RT, au fost generate în format Fasta. Subtiparea HIV-1 s-a efectuat pe baza algoritmului REGA HIV-1&2. Pentru a putea determina opțiunile terapeutice după regimul terapeutic dovedit a fi în eșec, s-a utilizat algoritmul Stanford HIVdb Program version 8.4. Mutațiile în structura reverstranscriptazei, a proteazei și a integraziei au fost cele considerate, în funcție de pozițiile listate în articolul consensus al grupului de experți al International AIDS Society (IAS)-USA publicat în ianuarie 2017 (update la cel din 5015) [8]. În cazul rezistenței primare s-a utilizat consensul OMS pentru mutațiile de rezistență, dezvoltat pentru supravegherea epidemiologică, ultima actualizare în 2009 [9]. Pentru determinarea predicției tropismului s-a utilizat cut-off de 10% conform recomandărilor „European Consensus Group on clinical management of HIV-1 tropism testing” [10].

Datele au fost organizate și structurate matematic în baze de date MySQL. Programele BASH și "make" au fost folosite pentru administrarea proiectului, iar programul M.A.W.K. s-a folosit la recunoașterea tiparelor în baza de date. Pentru calcule statistice s-a utilizat programul R-Project. S-au folosit analize de tipul "single sample", "two sample" și "multi sample". Fiecărui lot și/sau sublot i-au fost calculate media, mediana, deviația standard, intervalul de încredere și valoarea p. În funcție de tipul variabilelor analizate, s-au folosit teste de tip T.student, χ^2 -test și Fisher.

Prima parte a studiului s-a concentrat pe determinarea rezistenței transmise, care poate fi unul din factorii predictivi pentru succesul sau eșecul primei scheme terapeutice. O terapie care determină eșecul viral va avea consecințe asupra următoarelor scheme terapeutice. Lotul studiat a cuprins 153 de pacienți nou diagnosticați cu infecție HIV la care s-au efectuat teste de genotipare în perioada 2007-2017. Toți pacienții au fost naivi la terapia antiretrovirală în momentul efectuării testării rezistenței genotipice. Genotiparea s-a efectuat, pentru toți, la nivelul genei pol pentru reverstranscriptază și protează și doar la 26 de pacienți la nivelul integraziei. Testul de tropism s-a efectuat la 22 de pacienți prin genotipare la nivelul buclei V2-V3 a genei env.

Cei mai mulți pacienți incluși în lot au fost bărbați (64.05%), iar un număr important (30.07% din totalul de 153) recunosc transmitere pe cale sexuală MSM. Au fost incluși puțini pacienți infectați pe cale parenterală provenind din cohortă (8.5%). Vârsta mediană a întregului lot a fost de 36.5 ani [3 și 76 ani]. Intervalul de vârstă care grupează cea mai mare parte a pacienților este între 18 și 40 ani (72.55%), vârsta cea mai activă sexual. În funcție de modul de achiziție a bolii, se constată o diferență statistic semnificativă între mediana vârstei la subiecții infectați pe cale sexuală față de cei provenind din cohortă (32 ani versus 21 ani, $p=0.0002$). Cea mai mare parte a pacienților naivi constanțeni provine din mediu urban, 111 (72.55%). Sursa de transmitere a fost

cunoscută la 35.92% din pacienți; 8.50% întrunesc caracteristicile cohorței pediatrice, iar cea mai mare parte din grup, 56.21%, nu cunosc sursa de transmitere, dar calea de transmitere este sexuală.

Valoarea mediană a numărului limfocitelor CD4 a întregului grup a fost de 333 cel/mm³, pacienții infectați pe cale sexuală prezentând o mediană CD4 semnificativ mai mare față de mediana celor infectați pe cale parenterală (343 versus 142 celule/mm³, p=0.01). Valorile încărcăturii virale plasmatice la ARN-HIV în momentul diagnosticului au fost cuprinse în intervalul 0.301-7.0 log₁₀ copii/ml, mediana de 4.75966 log₁₀ copii/ml. Nu se constată diferențe statistice semnificative între valoarea mediană în cadrul grupului infectat sexual și cel infectat parenteral (4.834 versus 4.929, p=0.59). Există corelație statistică între valoarea mediană ARN-HIV și imunodepresia severă (p=1.99e-10); cu cât statusul imun este mai deficitar, cu atât viremia atinge valori mai înalte.

Intervalul de timp scurs de la data diagnosticului la efectuarea genotipării este de sub un an la peste jumătate din pacienți (54.90%) și între 1-2 ani la alți 33.99 % din subiecți, ca urmare există o mare probabilitate ca datele prelucrate să reflecte un procent corect de TDR.

Prevalența rezistenței primare în lotul studiat a fost de 6.53% (10 din cei 153 de pacienți prezentând cel puțin o mutație de rezistență din consensul OMS dezvoltat pentru supraveghere epidemiologică, actualizat în 2009). Toți cei 10 pacienți au prezentat rezistență primară la o singură clasă de antiretrovirale, cel mai frecvent mutațiile fiind prezente la nivelul secvenței revers-transcriptazei. Prevalența rezistenței transmise la INRT a fost de 1.96%, la INNRT de 2.61% și la IP de 1.96%. Nu s-a constatat rezistență primară la INSTI în cazul pacienților a căror genotipare a fost efectuată la nivelul genei integraziei. La determinarea predicției tropismului, 5 tulpini din cele 26 au fost CXCR4 tropice, 4/5 au fost tulpini non-F: C și CRF14_BG.

Nu s-a evidențiat nici un caz cu TDR în comunitatea MSM, în rândul cărora se descrie o epidemie recentă cu subtipuri HIV-1 diverse (cel mai frecvent implicat este subtipul local F1, dar cu apariția subtipurilor B, C, A și G).

Mutațiile asociate cu rezistența la INRT au fost prezente la 3 tulpini izolate: M41L, M41L+L74V, A62V. Mutațiile asociate cu rezistența la INNRT (K103N și V108I) au fost depistate la 4 tulpini, fără a asocia alte mutații de rezistență pentru clasele INRT și IP. Alți trei pacienți au avut mutații primare de rezistență numai la inhibitorii de protează: Q58E, T74P și V812M. Cele mai multe tulpini izolate și genotipate cu TDR sunt de subtip F (6), din cele non-F izolându-se subtipurile A, B și recombinantele CRF02_AG și CRF14_BG.

Majoritatea tulpinilor izolate în cazul lotului studiat au prezentat mutații accesorii în gena PR, de multe ori acestea fiind polimorfisme. Mutațiile evidențiate cu o rată mare polimorfism au fost: M36I, L89M, K20R, L10I/V, I62V, I93L, L63P, G16E, T74S. Genotiparea la nivelul genei RT a identificat câteva mutații accesorii, cele mai frecvente fiind în poziția V179 și E138.

Calculul scorurilor de rezistență genotipică conform algoritmului Stanford la cei 10 pacienți indică faptul că, deși tulpinile nu aveau sensibilitate totală la cele trei antiretrovirale, combinația folosită întrunea cel puțin un scor de 2. Schemele de tratament conținând IP/r au determinat în aceste context succesul terapeutic. Combinația terapeutică cu EFV, în condițiile unui scor de rezistență genotipică de 2.5, nu a reușit controlul viral. Pentru ceilalți pacienți, orientarea schemei terapeutice în funcție de scorul de rezistență genotipică a fost salutară evitând eșecul viral.

Inițierea terapiei ARV în cazul a 135 de pacienți a determinat un procent de nedetectabilitate numai de 57.75% la săptămâna 24, până la încheierea studiului acesta crescând la 69.52%, rată considerabil mai mică decât în cazul pacienților din alte țări. Pentru 16/17 din genotipările efectuate a fost demonstrată existența virusului salbatic, tulpinile arătând aceleași mutații ca tulpinile inițiale, ceea ce susține faptul că există un procent important de nonaderenți la terapie, chiar în condițiile tratamentului corect instituit și bine supravegheat.

Am pornit în studiu de la ipoteza că cea mai mare parte a persoanelor seropozitive au acces la terapia antiretrovirală conform cerințelor ghidului național și majoritatea pacienților sunt mutiexperimentați. Ca urmare, numărul de potențiale surse cu rezistență dobândită ar fi trebuit să fie îndeajuns de mare încât să genereze cazuri secundare cu rezistență primară. Acest lucru însă nu este confirmat de valoarea prevalenței TDR determinată în studiu, în special pe cele trei clase de medicație clasic utilizate. Rata de prevalență (6.53%) este superioară valorii naționale a TDR (4,6%) [4], dar este mai mică decât cea europeană (8.4%)[11] și decât valorile regionale: București 14.75% [12], Iași 7.3% [13].

Explicația pentru rata mică de prevalență a rezistenței primare la izolatele prelevate între 2007-2017 reiese din analiza ratei de supresie virală în cazul pacienților care beneficiază de tratament ARV: ea variază de la 53% în 2013 la 66% în 2017 dar nu ajunge la nivelul recomandat de UNAIDS de 90%. Alte cauze sunt : numărul pacienților care renunță la terapie, pierderea unor subiecți testați care nu ajung să fie preluați și tratați în sistemului medical, testarea insuficientă.

Studierea lotului pacienților multiexperimentați s-a făcut știindu-se că expunerea succesivă la scheme suboptimale, în condițiile în care replicarea virală se produce sub terapie, generează tulpini mutante cu rezistență dobândită (ADR).

Au fost incluși în lotul de studiu un număr de 235 de pacienți. Aceștia au avut cel puțin un eșec terapeutic sub terapie antiretrovirală, ce a determinat efectuarea unei genotipări care să orienteze conduita terapeutică. Lotul a cuprins mare parte din cazuri provenite din cohorta pediatrică constănțeană (67.23%), existând o ușoară predominanță feminină (53.19%), restul cazurilor recunoscând ca mod de transmitere căile: sexuală (24.68%), verticală (7.66%), expunere ocupațională (0.43%). Un număr mai mare provine din mediu urban (61.70), puțin peste jumătate au un nivelul de școlarizare de până la 8 clase (53.19%). Pacienții din lotul studiat sunt tineri, mediana vârstei fiind 29 ani [5 și 71 ani], dar au un număr important de ani de expunere la terapie. Numărul de ani de la momentul diagnosticului la efectuarea ultimei genotipări, exprimat prin durata mediană a infecției HIV, este de 12 ani, cu limite între 6 luni și 26 ani.

TBC reprezintă cea mai frecventă coinfecție (54.47%) în lotul studiat.

Valoarea mediană CD4 a lotului la ultima genotipare efectuată a fost de 250 cel/mm³ (cu limite între 1-1533 cel/mm³), în timp ce mediana CD4 nadir a fost de 95 cel/mm³ (limitele fiind 1-1118 cel/mm³). Lotul cuprinde pacienți în stadiu avansat de infecție C (87.2%). Mediana viremiei HIV la ultima genotipare a fost de 4.383815 și mediana valorii HIV-ARN zenit în cursul evoluției bolii a fost de 5.041393. Un procent important (43.40%) a fost expus la biterapie. Mediana numărului de scheme terapeutice până la efectuarea ultimei genotipări a fost de 5, cu limite variind între 1 și 12 scheme. La aproximativ un sfert din pacienții lotului, care au avut multiple eșecuri terapeutice, s-au efectuat între 2 și 5 genotipări, restul pacienților au avut o singură genotipare în cursul evoluției bolii.

Rezultatele genotipărilor efectuate au condus la concluzia că numai 144 din pacienți (61.28%) pot fi considerați în real eșec terapeutic având prezentă cel puțin o mutație în structura reverstranscriptazei, proteazei sau integralei în pozițiile listate de grupului de experți al IAS-USA, publicat în ianuarie 2017 (actualizare la cel din 2015). Pentru restul lotului (91 de pacienți, 38.72%) testul de genotipare a indicat virus HIV sălbatic.

Prevalența rezistenței dobândite în lotul studiat este de 56.59% (pentru INRT), 40.85% (pentru INNRT) și 38.72% (pentru IP), dar dacă se exclud din calcul pacienții la care genotiparea a relevat numai virus sălbatic (noncomplanți la terapie), ratele de prevalență cresc: 92.36% (INRT), 66.67% (INNRT) și 63.19% (IP).

Cea mai frecventă mutație selecționată în clasa INRT a fost M184V, întâlnită la 131 de subiecți, alți doi selectând M184I. Utilizarea analogilor timidinei reprezentați de AZT și d4T s-a soldat cu apariția mutațiilor tip TAM. Cea mai întâlnită în acest caz a fost calea TAM2, respectiv D67N, K70R, T215F, K219Q/E. Aceste rate au fost de: 27.77% la D67N, 29.86% la K70R, 27.08% la T215F și 31.25% în cazul K219Q/E. Nu întotdeauna s-au selecționat mutații pe o singură cale TAM, au existat și combinații de mutații. Mutația K65R a fost prezentă la un număr redus de cazuri (4), la 3 pacienți în asociere cu TAMs. În schimb, mutația la nivelul codonului L74V/I a fost determinată la 22.22% din pacienții sublotul pacienților cu rezistență dobândită, mutația fiind secundară expunerii consistente la ABC sau ddI. Doi pacienți au prezentat mutații determinate de MDR: inserția la poziția 69 și complexul Q151M.

Interpretarea Stanford a indicat TDF ca primă opțiune terapeutică în clasa INRT pentru tratarea pacienților din grupul cu rezistență dobândită, numai 12 tulpini prezentând rezistență înaltă, 69 păstrându-și sensibilitatea integral, iar restul dezvoltând rezistență ușoară și intermediară.

Pentru clasa INNRT cea mai frecventă mutație întâlnită a fost K103N (56.16%) urmată de mutațiile Y181C/I/V (13.19%), Y188L/C/H (10.41%) și G190A/S/E (9.01%). Ca urmare, opțiunea terapeutică cea mai valoroasă pentru pacienții cu rezistență dobândită rămâne ETR, 60.41% din tulpini își menține întreaga susceptibilitate la acest medicament.

Dintre mutațiile primare asociate cu rezistența la IP, 3 sunt vizibile la pacienții cu ADR la această clasă: V82A (52.82%), I54V (59.31%) și M46L/I (41.66%). Aceste trei mutații sunt corelate, în special, cu administrarea de LPV/r. Celelalte, care le secondează, se regăsesc în combinații, dar mult mai rar decât primele trei anterior menționate (în ordinea frecvenței: G48A, L76V, I50V, V32I, I84V, L90M etc).

Comparând cele două subloturi (cei cu ADR vs cei cu tulpini sălbatice) se constată că în grupul celor cu tulpini rezistente există un număr mult mai mare a mutații accesorii decât în lotul celor cu tulpini sălbatice.

Interpretarea Stanford indică faptul că DRV/r rămâne o opțiune terapeutică viabilă pentru multiexperimentării aflați în eșec viral sub regimuri conținând alți IP. Numai 7 pacienți din lotul nostru au dezvoltat rezistență înaltă la DRV/r, în toate cazurile numărul de RAM-DRV fiind de 4 sau 5, iar una dintre acestea fiind I50V. În cazul acestei molecule 93/144, respectiv 64.58%, din tulpini sunt sensibile, dar pentru activitatea sa reziduală importantă poate fi folosit și în cazul tulpinilor cu rezistență intermediară, scăzută sau potențial scăzută.

Din 11 subiecți aflați într-un regim terapeutic în eșec conținând RAL, doar doi au prezentat mutații de rezistență, ambii co-infecțați TB. Mutațiile selectate au fost E138K+Q148R la un pacient, respectiv T79A+ Y143R la cel de al doilea, ambele determinând rezistență înaltă la RAL.

Un număr de 82 de tulpini provenind de la cei 235 de pacienți incluși în studiu au fost analizate pentru tropism viral folosind un test de genotipare la nivelul regiunii V2-V3 a genei *env*. Rezultatele au indicat faptul că un număr de 23 de pacienți, toți aflați în cART, au tulpini CXCR4 tropice. Ca urmare, la acești pacienți nu se poate utiliza MRV.

În ambele subloturi (cu ADR și cu tulpini sălbatice) s-a constatat o rată modestă de supresie virală: 59.09% în lotul celor cu rezistență dobândită și 45.05% în lotul pacienților cu virus sălbatic.

Rata de mortalitate a grupului de pacienți cu tulpini HIV sălbatice este 37.46%, îngrijorător de mare comparativ cu cea a grupului cu tulpini rezistente care este de 13%. Deși la începutul studiului acești pacienți întruneau condițiile unei evoluții mai bune, având mai puține luni de eșec imun (mediana luni în eșec imunologic 48) și viral (mediana luni în eșec viral 36), erau mai puțin expuși la terapie (mediană durată administrare ART este 8 ani și mediană număr de scheme terapeutice 4 ani), ei au evoluat prost în condițiile noncompliancei la tratament. Mortalitatea în acest grup a fost determinată în principal de TBC. În grupul pacienților cu tulpini rezistente se întâlnesc predominant cauze de mortalitate non-AIDS. Se concluzionează astfel că nonaderența la tratament este mult mai frecvent cauză de mortalitate decât multirezistența la ARV.

Cunoscând caracteristicile distincte ale lotului constănțean, care s-au confirmat prin analiza grupului, premisele ar fi fost ca rata rezistenței dobândite să fie cu mult mai mare. Numărul mare de pacienți noncomplanți face ca această supoziție să nu se confirme. Rata de prevalență ADR în Constanța diferă de cele din multe state europene. Într-un studiu european ce a inclus 15 state, aceasta a fost de 80.7% (INRT 73.5%, INNRT 48.5% și IP 35.8%)[14]. În Germania un studiu desfășurat pe o perioadă de 10 ani (2001-2010) această rată atinge 64% , cu predominanță în clasa INNRT (55%), urmată de cea la INRT (51%) și IP (30%).[15]. În Italia, pe cohorta de pacienți multiexperimentați, între 2007 și 2009, prevalența rezistenței dobândite la cel puțin o clasă scade de la 70% la 66% între acești ani; clasa cu cea mai ridicată ADR este cea a INRT (65% în 2007 și 56% în 2009), urmată de cea a IP (39% în 2007, dar scăzând la 27% în 2009) și a INNRT (36 % în 2007, dar scăzând la 31%)[16]. Și în România aceste date sunt discordante. Într-un lot de pacienți din Spitalul “Victor Babeș” București în care există probleme de aderență (6/38 pacienți), rezistența detectată la INRT a fost de 71.1% (prin M184V și mutații tip TAM), la INNRT

de 52.7% (prin K103N și Y181C) și la IP de 31.6% (mutațiile fiind V82A, I54V, G48V)[17]. În Centrul Regional Iași, pe un lot de 40 de pacienți, 92.5% au rezistență la INNRT (cel mai frecvent mutațiile fiind la nivelul codonilor 67, 70, 219 urmate de 41 și 215), 85% la nivelul INNRT (K103N prezintă la 70% subiecți) și 32.5% la nivelul IP (cele mai frecvent întâlnite mutații fiind V82A, I54V și M46L)[18].

Rezultatele studiului subliniază caracterul dual al lotului datorită procentului de pacienți nonaderenți, ceea ce explică ratele de prevalență ADR "poluate" (atunci când raportarea include subplotul de nonaderenți). În grupul de pacienți cu ADR, rata de prevalență este extrem de mare, evidențiind o situație îngrijorătoare care face necesară urmărirea foarte atentă a acestui grup cu opțiuni terapeutice limitate. Pacienții cu tulpini sălbatice, care au o mediană a viremiei mai mare decât cei aflați în supresie virală ineficientă sub ART (4.514547 versus 4.310460, $p=0.03$), sunt potențiale surse mai eficiente decât cei aflați în tratament. Genotiparea a fost un instrument de "măsurare a aderenței" la acești pacienți, dar determinarea nonaderenței prin acesta metodă nu a fost urmată de rezultatele scontate în termeni de supresie virală.

Însumând loturile studiate (lotul celor 144 de pacienți naivi și lotul celor 235 de pacienți multiexperimentați), s-a analizat dinamica subtipurilor virale de la primele cazuri și până în prezent. Au fost luate în considerație 388 de tulpini HIV și, conform așteptărilor, subtipul dominant este F1. Dacă înainte de 1999 apar sporadic tulpini subtip B, după acest an încep să apară sistematic, în număr mic, tulpini subtip C și B. În anul 2004 se izolează primele tulpini subtip A și este momentul în care pătrund formele recombinante circulante sub forma CRF02_AG. Anul 2007 este anul cu cea mai mare biodiversitate: pe lângă F1 apar subtipurile C, A, B, G, precum și formele recombinante circulante CRF02_02, CRF06_cpx și CRF01_AE. Din anul 2008, populația virală se menține polimorfă, dar cu predominanța subtipului F1 ceea ce previzionează în viitorii ani o dinamică mai activă, cu emergența subtipurilor minoritare în detrimentul tulpinii majoritare.

În concluzie, condițiile speciale care au conturat apariția epidemiei HIV în Constanța au determinat două profile de pacienți. Profilul pacientului noncompliant este cel care influențează cel mai mult evoluția în dinamică a epidemiei.

Referitor la TDR, dacă medicația este prescrisă conform ghidurilor actuale, se poate obține nedetectabilitatea, însă complianța la tratament este esențială.

Inexistența TDR în comunitatea MSM, unde se constată cea mai dinamică rată de infecție în acest moment, poate crea premisele pentru implementarea PrEP, pentru a limita epidemia.

Nivelul și particularitățile ADR în sublotul pacienților care au demonstrat aderență la terapie, limitează opțiunile terapeutice la câteva medicamente: TDF, ETR, DRV/r la care se adaugă reprezentanții noilor clase INSTI și, uneori, antagoniști de coreceptori.

În cazul pacienților nonaderenți trebuie regândită o noua strategie de management, întrucât cea actuală nu este cost-eficientă nici pentru ei, individual (rata de mortalitate este extrem de mare), nici pentru societate (ei sunt potențiale surse care determină extinderea epidemiei în condițiile în care se investesc resurse importante).

Epidemia HIV în Constanța a pornit ca o extindere monoclonală de subtip F1, dar în timp asistăm la o diversificare a subtipurilor, în acest moment circulând alături de F1, care se menține majoritar, atât subtipurile B, C, A, G, cât și forme recombinante diverse CRF01_AE, CRF 02_AG, CRF06_cpx, CRF14_BG.

CUVINTE CHEIE: infecție HIV, Constanța, rezistență transmisă, rezistență dobândită, terapie ARV.

Bibliografie

- [1] Popovici F, Zolotușca L, Apetrei RC, Beldescu N, Hersh B, Heymann D, The Epidemiology of AIDS in Romania, Seventh International Conference on AIDS, Florence, Italy, 16 – 21 June 1991
- [2] Op de Coul E, van den Burg R, Asjo B, et al. Genetic evidence of multiple transmissions of HIV type 1 subtype F within Romania from adult blood donors to children. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2000; 16:327–36
- [3] Ruța SM, Mătușa RF, Sultana C, Manolescu L, Kozinetz CA, Kline MW, Cernescu C, High Prevalence of Hepatitis B Virus Markers in Romanian Adolescents with Human Immunodeficiency Virus Infection, *Journal of the International AIDS Society* 2005, 7:68
- [4] Streinu-Cercel A, Specific Challenges of the HIV Epidemic in Romania, EACS Conference Brussels, 2013, http://www.cnlas.ro/images/doc/spec_chall_HIV.pdf
- [5] Surveillance Report: HIV/AIDS Surveillance in Europe 2013. ECDC Stockholm, <http://www.ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/hiv-aids-surveillance-report-2012-20131127.pdf>
- [6] Kline MW, Rugina S, Ilie M, Matusa RF, Schweitzer AM, Calles NR, Schwarzwald HL, Long-term Follow-up of 414 HIV-Infected Romanian Children and Adolescents Receiving Lopinavir/Ritonavir-Containing Highly Active Antiretroviral Therapy, *Pediatrics* May 2007, VOLUME 119 / ISSUE 5
- [7] Wanless RSB, Rugină R, Ruța SM, Dumitru IM, Cernat RC, Schwarzwald HL, Calles NR, Schutze GE, Schweitzer AM, Draper HR, Kline MW, Nine-year follow-up of HIV-infected Romanian children and adolescents receiving lopinavir/ritonavir-containing highly active antiretroviral therapy, *Germs* 2013 September 1, 3 (3): 90-5
- [8] Wensing AM, Calvez V, Günthard HF and al, 2017 Update of the Drug Resistance Mutations in HIV-1, *IAS–USA Topics in Antiviral Medicine*, 2017; 24(4):132-141
- [9] Bennett DE, Camacho R, Otelea D and al, Drug Resistance Mutations for Surveillance of Transmitted HIV-1 Drug-Resistance: 2009 Update, *PLoS ONE* 4(3): e4724.
- [10] Vandekerckhove LP, Wensing AM, Kaiser R et al, European guidelines on the clinical management of HIV-1 tropism testing, *Lancet Infect Dis*. 2011 May;11(5):394-407.
- [11] Hofstra LM, Sauvageot N, Albert J, Alexiev I et al for the SPREAD Program, Transmission of HIV Drug Resistance and the Predicted Effect on Current First-line Regimens in Europe

- [12] Temereanca A, Ene L, Mehta S, Manolescu L, Duiculescu D, Ruța S, HIV Drug Resistance in Treatment-Naive Romanian Patients, *J Med Virol.* 2013 Jul; 85(7): 1139–1147.
- [13] Florea D, Paraschiv S, Fratila M, Prisacaru L, Nicolau C, Teodorescu I et al, Late presentation and limited transmitted drug resistance in newly diagnosed HIV-1 patients from the North-eastern region of Romania, *Therapeutics Pharmacology and Clinical Toxicology* 2010; (14) 1:25-29
- [14] van de Vijver D.A.M.C., et al. HIV-1 drug-resistance patterns among patients on failing treatment in a large number of European countries, *Acta Dermatovenerologica Alpina, Panonica* [15] Schmidt D, Kollan C, Fätkenheuer G et al, Estimating Trends in the Proportion of Transmitted and Acquired HIV Drug Resistance in a Long Term Observational Cohort in Germany, *PLoS One.* 2014; 9(8): e104474.
- [16] Di Giambenedetto S, Prosperi M, Fanti I, et al. Update on emergence of HIV-1 resistance to antiretroviral drug classes in an Italian national database: 2007-2009. *Clin Microbiol Infect.* 2011; 17 No 9, 1343-1358 vol 19, 2010, No 4
- [17] Manolescu L, Temereanca A, Diaconu CC, Ruta S., Correlation between resistance profile and immunosuppression in heavily treated HIV-1 infected Romanian patients, *Rom Biotechnol Lett.* 2011 Aug;16(4):6439-6449
- [18] Florea D., Monitorizarea parametrilor virusologici și imunologici la pacienții cu Infecție HIV/SIDA din Centrele Regionale Iași și București, Rezumatul tezei de doctorat, <http://www.umfiasi.ro/ScoalaDoctorala/TezeDoctorat/Teze%20Doctorat/Rezumat%20FLOREA%20DRAGO%C5%9E.pdf>