

**POMORSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY
W SZCZECINIE**



mgr Kaja Mielczak

*Użycie modeli molekularnych dla nadzoru nad lekoopornością
i przewidywania rozwoju sieci transmisji
HIV i HCV*

*Implementing molecular models for the HIV and HCV transmission
networks surveillance to inform clinical interventions*

Rozprawa doktorska w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu
Dyscyplina nauki medyczne

Promotor: *prof. dr hab. n. med. Miłosz Parczewski*

Promotor pomocniczy: *dr n. med. Anna Urbańska*

Szczecin 2024 r.

*Pragnę złożyć serdeczne podziękowania Panu
prof. dr hab. n. med. Miłoszowi Parczewskiemu oraz
Pani dr n. med. Annie Urbańskiej za okazane wsparcie
i cenne uwagi, dzięki którym powstała niniejsza praca*

SPIS TREŚCI

1. WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW.....	5
2. NOTA INFORMACYJNA	7
2.1. Źródło finansowania	8
3. WSTĘP.....	9
3.1. Epidemiologia HIV.....	9
3.2. Rozwój lekooporności	9
3.3. Oporność na kluczowe leki stosowane w leczeniu antyretrowirusowym włączając leki długodziałające	12
4. CELE PRACY.....	15
5. MATERIAŁ I METODYKA	16
5.1. Materiał badawczy.....	16
5.1.1. Pobrania z lat 1997-2020	16
5.1.2. Nowe pobrania od 2020 roku.....	16
5.1.3. Grupy badane	16
5.2. Metodologia.....	17
5.2.1. Izolacja HIV-RNA	17
5.2.2. Sekwencjonowanie regionu PR/RT i INT	17
5.2.3. Ocena subtypu.....	18
5.2.4. Ocena lekooporności i klastrowania mutacji.....	18
5.2.5. Analiza statystyczna	19
6. OMÓWIENIE I DYSKUSJA PRAC WCHODZĄCYCH W SKŁAD ROZPRAWY DOKTORSKIEJ	21
6.1. Publikacja nr 1.....	21
6.2. Publikacja nr 2.....	24
6.3. Publikacja nr 3.....	29
7. PODSUMOWANIE I WNIOSKI	35

7.1. Podsumowanie.....	35
7.2. Wnioski.....	36
8. STRESZCZENIE	37
8.1. Wstęp.....	37
8.2. Materiały i metody.....	37
8.3. Wyniki	37
8.4. Wnioski.....	38
9. SUMMARY	39
9.1. Introduction	39
9.2. Materials and methods.....	39
9.3. Results	39
9.4. Conclusions	40
10. BIBLIOGRAFIA.....	41
11. PUBLIKACJE STANOWIĄCE PODSTAWĘ ROZPRAWY DOKTORSKIEJ	51
12. ZGODA KOMISJI BIOETYCZNEJ	84
13. OŚWIADCZENIA WSPÓLAUTORÓW	85

1. WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

Skrót	Rozwinięcie w języku polskim	Rozwinięcie w języku angielskim
ART	terapia antyretrowirusowa	antiretroviral treatment
BMI	wskaźnik masy ciała	body mass index
CAB	kabotegrawir	cabotegravir
cART	skojarzona terapia antyretrowirusowa	combined antiretroviral therapy
CD4	limfocyty CD4	cluster of differentiation 4
CI	przedział ufności	confidence interval
CRF	krążąca forma rekombinowana	circulating recombinant form
CVF	potwierdzone niepowodzenie wirusologiczne	confirmed virologic failure
DOR	dorawiryna	doravirine
DRM	mutacja związana z opornością na lek	drug resistance mutation
EFV	efawirenz	efavirenz
ETR	etrawiryna	etravirine
FTC	emtrycytabina	emtricitabine
HET	heteroseksualny	heterosexual
HIV	ludzki wirus niedoboru odporności	human immunodeficiency virus
IDU	użytkownik narkotyków dożylnych	injection drug user
INSTI	inhibitor integrazy	integrase strand transfer inhibitor
INT	integraza	integrase
IQR	rozstęp międzykwartyłowy	interquartile range

LAI	lek długodziałający w iniekcji	long-acting injectable
LMIC	kraj o niskim i średnim dochodzie	low- and middle-income country
MSM	mężczyźni uprawiający seks z mężczyznami	men who have sex with men
MTCT	transmisja z matki na dziecko	mother-to-child transmission
NNRTI	nienukleozydowy inhibitor odwrotnej transkryptazy	non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor
NRTI	nukleozydowy inhibitor odwrotnej transkryptazy	nucleoside reverse transcriptase inhibitor
NVP	newirapina	nevirapine
OR	iloraz szans	odds ratio
p	prawdopodobieństwo testowe	p-value
PCR	reakcja łańcuchowa polimerazy	polymerase chain reaction
PI	inhibitor proteazy	protease inhibitor
PR	proteaza	protease
PrEP	profilaktyka przedekspozycyjna	pre-exposure prophylaxis
RAM	mutacja związana z opornością	resistance-associated mutation
RNA	kwasy rybonukleinowe	ribonucleic acid
RPV	rylpiwiryna	rilpivirine
RT	odwrotna transkryptaza	reverse transcriptase
TDF	tenofowir dizoproksylu w postaci fumaranu	tenofovir disoproxil fumarate
TDR	przenoszona lekooporność	transmitted drug resistance
URF	unikalne formy rekombinowane	unique recombinant form

2. NOTA INFORMACYJNA

Rozprawę doktorską stanowi zbiór powiązanych tematycznie artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych zgodnie z Art. 13.2 Ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki, Dz. U. z dnia 27 września 2017 r. Poz. 1789:

- Scheibe Kaja, Urbańska Anna, Jakubowski Paweł, Hlebowicz Maria, Bociąga-Jasik Monika, Raczyńska Aleksandra, Szymczak Aleksandra, Szetela Bartosz, Łojewski Władysław, Parczewski Miłosz **„Low prevalence of doravirine-associated resistance mutations among Polish human immunodeficiency-1 (HIV-1) - infected patients.”** Antiviral therapy. 2021; 26(3-5): 69–78. doi: <https://doi.org/10.1177/13596535211043044>
Impact Factor: 1.679
Punktacja MNiSW: 140.000
- Scheibe Kaja, Urbańska Anna, Serwin Karol, Parczewski Miłosz **„Frequency of genotypic factors possibly associated with cabotegravir/ rilpivirine failure in antiretroviral treatment-naive and -experienced HIV-1- infected population.”** Infection, Genetics and Evolution. 2022; 104:105358. doi: <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2022.105358>
Impact Factor: 3.200
Punktacja MNiSW: 100.000
- Mielczak Kaja, Serwin Karol, Urbańska Anna, Aksak-Wąs Bogusz, Karasińska-Cieślak Malwina, Mularska Elżbieta, Witor Adam, Jakubowski Paweł, Hlebowicz Maria, Bociąga-Jasik Monika, Jabłonowska Elżbieta, Szymczak Aleksandra, Szetela Bartosz, Łojewski Władysław, Parczewski Miłosz **„Frequency of major transmitted integrase resistance in Poland remains low despite change in subtype variability.”** Viruses. 2024; 16(10):1597. doi: <https://doi.org/10.3390/v16101597>
Impact Factor: 3.800
Punktacja MNiSW: 100.000

2.1. Źródło finansowania

Pracę wykonano dzięki dofinansowaniu z Narodowego Centrum Nauki; numer projektu: 2018/30/E/NZ6/00696.

Niniejsza praca realizowana jest w ramach uzyskanego grantu, który obejmuje bardzo szeroki zakres działań prowadzonych przez zespół naukowców. Z tego względu w przedstawianej pracy skupiono się na ocenie lekooporności w zakażeniu wirusem HIV-1. Prognozy dotyczące rozwoju sieci transmisji wirusa HIV-1 i HCV omawiane są w pozostałych publikacjach, których jestem współautorką.

Zestawienie publikacji

Rodzaj publikacji	Liczba	Impact factor	Punktacja MNiSW
Prace włączone do rozprawy doktorskiej	3	8,679	340
Prace, które nie zostały włączone do rozprawy doktorskiej	9	52,678	1190
Razem	12	61,357	1530

3. WSTĘP

3.1. Epidemiologia HIV

W dobie pandemii koronawirusa SARS-CoV-2 nie można zapominać o innej epidemii, która w Polsce trwa nieprzerwanie od prawie 40 lat- epidemii wirusa HIV-1 (ludzkiego wirusa niedoboru odporności). Obie epidemie różnią się głównie drogą przenoszenia oraz skalą problemu, ale także tempem, w jakim wirusy mutują oraz samymi grupami osób szczególnie narażonych na zakażenie. Od początku epidemii HIV-1 w 1985 roku w Polsce odnotowano 32 935 zakażeń, a każdego roku wykrywa się około 2000 nowych przypadków. Najnowsze dane wskazują, że leczeniem antyretrowirusowym objętych jest 20 281 osób [1]. Epidemia wirusa HIV-1 w Polsce była historycznie związana z przyjmowaniem narkotyków drogą dożylną (IDU), które do 2005 roku było dominującą drogą zakażenia [2]. Ostatnie lata pokazują, że nowe zakażenia najczęściej są obserwowane wśród mężczyzn, a główną drogę transmisji stanowią kontakty mężczyzn uprawiających seks z mężczyznami (MSM) [3].

Wirus HIV-1 odpowiada za 95% zakażeń wirusem HIV na świecie i dzieli się na cztery główne grupy: M, N, O oraz P, które różnią się od siebie pod względem genetycznym i epidemiologicznym. Większość zakażeń spowodowana jest wirusami należącymi do typu M, który obejmuje dziesięć podstawowych subtypów (A-D, F-H, J-L) [4,5]. Dodatkowo, subtypy A oraz F posiadają swoje sub-subtypy (A1-A8 oraz F1-F2), które wykazują różnice genetyczne wahające się od 15 do 20% [6]. Ponadto, ze względu na rekombinacje genetyczne między subtypami, wyodrębnia się ponad 100 krążących form rekombinowanych (CRF) oraz liczne unikalne formy rekombinowane (URF) [7]. Najczęściej wykrywanymi „głównymi” subtypami pozostają subtypy C (23,0%), A (16,7%) oraz B (8,5%). Globalny rozkład geograficzny subtypów ewoluuje, co skutkuje wzrostem liczby nowych rekombinantów. Formy rekombinowane odpowiadają aktualnie za 29,0% wszystkich zakażeń na świecie, a sam wariant CRF01_AE za około 9,5% z nich [8]. W Polsce dotychczas najczęściej wykrywanym subtypem był wariant B, który dotyczył 85,9% zakażeń, ale coraz częściej obserwuje się zakażenia wariantami nie-B [9]. Należy podkreślić, że migracja ze Wschodu, trwająca już od kilku lat, ale w dużej mierze spowodowana rosyjską inwazją na Ukrainie, wpłynęła na zmianę rozkładu subtypów wirusa HIV-1 w Polsce [10]. Sub-subtyp A6, najczęściej obserwowany we Wschodniej Europie [11], w latach 2015-2019 był wykrywany w naszym kraju u 8,7% pacjentów [9], jednak odsetek ten stale rośnie.

3.2. Rozwój lekooporności

W leczeniu zakażenia wirusem HIV-1 dąży się do zahamowania replikacji wirusa, który

namnaża się niezwykle szybko i efektywnie, tworząc nawet 10 miliardów kopii dziennie [12]. Skuteczna terapia antyretrowirusowa (ART) pozwala na obniżenie wirerii do poziomu niewykrywalnego, co hamuje postęp choroby, ogranicza zakaźność oraz zmniejsza ryzyko powikłań związanych z infekcją HIV [13]. Wyróżnia się kilka grup leków, które blokują enzymy kluczowe dla replikacji wirusa. Najczęściej stosowane leki należą do grup: nukleozydowych inhibitorów odwrotnej transkryptazy (NRTI), nienukleozydowych inhibitorów odwrotnej transkryptazy (NNRTI), inhibitorów proteazy (PI) oraz inhibitorów integrazy (INSTI). Skuteczność terapii antyretrowirusowej wynika z zastosowania kombinacji leków z powyższych grup, dzięki czemu wirus jest hamowany na wielu poziomach, a ryzyko rozwoju oporności jest niższe [14]. Należy jednak pamiętać, że wraz z replikacją wirusa dochodzi do powstawania wielu mutacji, które mogą prowadzić do rozwinięcia lekooporności. Rozwój oporności na leki antyretrowirusowe wynika z wielu czynników, które wzajemnie na siebie oddziałują. Wśród nich znajdują się czynniki związane z samym wirusem, takie jak jego aktywność replikacyjna czy szybkość wytwarzania mutacji, ale także czynniki dotyczące pacjenta- zmienność genetyczna gospodarza oraz adherencja do leczenia. Istotne są również czynniki związane z lekami- ich skuteczność i bariera genetyczna [15]. Pierwsze mutacje, które pojawiają się zazwyczaj wskutek błędów odwrotnej transkryptazy, pozwalają na niską replikację wirusa, jednak kolejne mutacje (wtórne) poprawiają efektywność jego namnażania i prowadzą do pełnego przełomu wirusowego leczenia [16]. Pod wpływem presji selekcyjnej leku dochodzi do ewolucji wirusa na poziomie molekularnym, co prowadzi do rozwoju lekooporności. Oporność na leki antyretrowirusowe zwiększa ryzyko kumulacji kolejnych mutacji i transmisję opornych wariantów wirusa, ale także wymusza modyfikację leczenia, konieczne jest zastosowanie terapii złożonej z kilku farmaceutyków [17]. Sekwencjonowanie HIV pozwala wykryć mutacje związane z opornością na konkretne leki, które definiowane są przez internetowe algorytmy interpretacyjne. Zdefiniowanie tych mutacji polega na określeniu związku między danymi fenotypowymi (zdolnością wirusa do replikacji w środowisku leku) a genotypowymi (wynikami sekwencjonowania wirusa HIV) [18]. Genotypowanie wirusa HIV jest kluczowym badaniem, które powinno być wykonywane przed rozpoczęciem leczenia antyretrowirusowego u pacjentów dotychczas nieleczonych oraz u pacjentów leczonych, u których wystąpiło niepowodzenie leczenia, u kobiet w ciąży czy u osób wznawiających leczenie po przerwie [19]. Należy także zaznaczyć, że leki antyretrowirusowe wykazują różną barierę genetyczną lekooporności, która zależy od ilości mutacji pozwalających wirusowi na efektywną replikację, pomimo obecności leku. Farmaceutyki pierwszej generacji NNRTI i INSTI charakteryzują się niską barierą genetyczną, przez co ryzyko rozwoju oporności jest

wysokie nawet przy niewielu mutacjach [20,21].

Mutacje związane z lekoopornością dzieli się na mutacje kluczowe (główne, major) i wtórne (mniejszościowe, minor). Mutacje kluczowe w większym stopniu obniżają wrażliwość na lek, ich obecność często wyklucza użycie konkretnego leku lub nawet wszystkich leków z danej klasy, przykładowo mutacja Y188L powoduje wysoką oporność na prawie wszystkie leki NNRTI [22,23]. Natomiast mutacje mniejszościowe to zmiany, które samodzielnie nie wpływają na ograniczenie skuteczności leku, ale mogą prowadzić do podwyższenia oporności, gdy występują w towarzystwie mutacji kluczowych. Jak już wspomniano, mutacje mniejszościowe często zwiększają zdolność wirusa do replikacji i pozwalają wirusowi namnażać się mimo obecności leku [16]. Do wtórnych mutacji zalicza się między innymi zmiany w pozycji G140, które samodzielnie redukują wrażliwość na EVG około 5-krotnie, jednak często występują w kombinacji z głównymi mutacjami w pozycji Q148, zmniejszając wrażliwość na wszystkie leki z grupy INSTI o 2-100 razy [24]. Warto wspomnieć, że charakterystyka selekcji mutacji może się różnić w zależności od subtypu. Dla przykładu, mutacja L74I jest powszechnie wykrywana u pacjentów z sub-subtypem A6, co najprawdopodobniej wynika z efektu założyciela, który spowodował jej rozprzestrzenienie wśród osób stosujących narkotyki dożylnie w krajach byłego ZSRR [25].

Mutacje związane z lekoopornością mogą powstawać *de novo*, po przyjęciu leku antyretrowirusowego (lekooporność wtórna) lub mogą być wynikiem oporności przeniesionej podczas pierwotnego zakażenia między pacjentami (lekooporność pierwotna). Możliwe jest również nadkażenie wariantem lekoopornym. W wyniku transmisji lekooporności, osoby rozpoczynające leczenie antyretrowirusowe mają podwyższone ryzyko wystąpienia niepowodzenia wirusologicznego w porównaniu do osób bez mutacji związanych z opornością [26]. Oporność przenoszona występuje u około 8,3-12,2% polskich pacjentów. W przypadku konkretnych grup leków, oporność na NRTI wykrywa się u 5,8-11,1% osób, oporność na NNRTI u 1,2% pacjentów, natomiast oporność na PI u 2,0% badanych [27-29]. Kluczowe mutacje związane z opornością na INSTI nie są obserwowane, a we wszystkich grupach leków zauważalna jest tendencja spadkowa w częstości występowania przenoszonych mutacji. Należy jednak zaznaczyć, że przytoczone dane obejmują sekwencje z lat 2008-2015, zatem brakuje bardziej aktualnych informacji, szczególnie dotyczących oporności na leki wprowadzone po 2015 roku.

3.3. Oporność na kluczowe leki stosowane w leczeniu antyretrowirusowym włączając leki długodziałające

Dorawiryna (DOR) należy do nienukleozydowych inhibitorów odwrotnej transkryptazy, do których zaliczamy również newirapinę (NVP), efawirenz (EFV), etrawirynę (ETR) i ryłpiwirynę (RPV). Leki pierwszej generacji, NVP i EFV, zostały zatwierdzone przez Amerykańską Agencję ds. Żywności i Leków (FDA) w latach 1996-1998, jednak mimo swojej skuteczności wykazują one niską barierę genetyczną dla rozwoju oporności oraz posiadają szereg działań niepożądanych [20]. Z tego względu leki drugiej generacji, ETR oraz RPV, są częściej stosowane w leczeniu pacjentów żyjących z wirusem HIV, dodatkowo ryłpiwiryna znalazła zastosowanie w kombinacji z kabotegrawirem jako długodziałająca terapia iniekcyjna [30]. Najnowszy lek NNRTI, dorawiryna, została zatwierdzona przez FDA w 2018 roku. Charakteryzuje się ona wyższą barierą genetyczną w porównaniu do poprzednich NNRTI, dzięki czemu może być stosowana także u pacjentów uprzednio leczonych [31]. Wykazuje ona korzystny profil lipidowy i neuropsychiatryczny, może być przyjmowana niezależnie od posiłku, a liczba interakcji z innymi lekami jest niska [32,33]. Dorawiryna jest dostępna w postaci TDF/3TC/DOR do przyjmowania raz na dobę lub jako samodzielna tabletką dołączenia z innymi lekami antyretrowirusowymi. Badania DRIVE-AHEAD i DRIVE-FORWARD pokazały, że skuteczność DOR jest porównywalna do efawirenu [23] i darunawiru wzmocnianego rytonawirem [34]. Ponadto, w porównaniu do pozostałych NNRTI, zachowuje ona aktywność wobec powszechnych mutacji związanych z obniżoną wrażliwością na tę grupę leków, w tym wariantów K103N, E138K, Y181C i G190A [35-37]. Opublikowane do tej pory badania dotyczące oporności na dorawirynę wskazują, że waha się ona od 0,52% do 4,70% u pacjentów dotychczas nieleczonych [23,38-40] oraz od 5,60% (na podstawie francuskiego algorytmu ANRS) do 16,0% (na podstawie algorytmu Stanford) u pacjentów leczonych antyretrowirusowo [41]. Ze względu na brak danych odnośnie oporności na DOR wśród polskich pacjentów, w niniejszej pracy przeprowadzono analizę częstości mutacji związanych z opornością na ten lek.

W erze doustnej terapii ART, pomimo skuteczności schematów dwu- i trójlekowych, przymus konieczności codziennego przyjmowania leków może zmniejszyć poziom adherencji do terapii prowadząc do niepowodzenia wirusologicznego [42]. Rozwiązaniem tego problemu mogą być długodziałające leki antyretrowirusowe podawane w iniekcjach w określonym odstępie czasu. Wykazują one wiele zalet w porównaniu ze standardową terapią doustną- przy rzadszym stosowaniu, dobrze zdefiniowanych interakcjach lek-lek i co ważne, większej prywatności i zmniejszeniu stygmatyzacji, wydają się być atrakcyjną opcją, która może przynieść korzyści

pacjentom żyjącym z wirusem HIV [43]. Długodziałający kabotegrawir (INSTI) i ryłpiwiryna (NNRTI) w iniekcjach to pierwsza dostępna opcja leczenia LAI, przyjęta przez FDA w 2021 roku. Może być podawana co 4 lub 8 tygodni, a jej skuteczność i bezpieczeństwo potwierdzono w badaniach ATLAS i FLAIR [44-46]. Należy jednak podkreślić, że schemat ten jest obecnie zatwierdzony wyłącznie do stosowania w leczeniu podtrzymującym, u osób z wiramią HIV RNA <50 kopii/ml. Dodatkowo, długodziałający kabotegrawir w formie iniekcji może być stosowany w profilaktyce przedekspozycyjnej (PrEP), wykazując lepszą skuteczność w porównaniu do stosowanego doustnie FTC/TDF [47]. Nowe dane wskazują na obecność czynników mogących przyczynić się do niepowodzenia wirusologicznego w leczeniu CAB/RPV. Analiza wieloczynnikowa potwierdziła, że należą do nich sub-subtyp A1/A6, mutacje oporności na RPV oraz wskaźnik masy ciała (BMI) powyżej 30 kg/m² [48]. W przypadku wystąpienia kombinacji co najmniej dwóch z tych czynników (stwierdzona u 3,4% badanych), ryzyko niepowodzenia wirusologicznego znacząco wzrastało (25,7% pacjentów) [48]. Jak już wcześniej wspomniano, subtyp A (zwłaszcza sub-subtyp A6) jest coraz częściej obserwowany w Polsce, ale także w Europie [49,50]. Oporność na RPV jest wykrywana wśród 5-7% europejskich pacjentów, a najczęstszą mutacją pozostaje polimorfizm w pozycji E138 [51-53]. Ponadto, brak jest danych dotyczących oporności na kabotegrawir w populacji polskich pacjentów, co również wydaje się być istotnym czynnikiem, potencjalnie mogącym wpływać na skuteczność opisywanej terapii. Ponieważ długodziałająca terapia iniekcyjna CAB/RPV jest obecnie wdrażana w praktyce klinicznej w całej Europie, w tym w Polsce, ocena częstości czynników związanych z jej potencjalnym niepowodzeniem stanowiła istotne zagadnienie, które zostało omówione w niniejszej pracy.

Inhibitory integrazy, do których należy wspomniany kabotegrawir, to kolejna ważna grupa leków, która znacząco poprawiła możliwości terapeutyczne w leczeniu zakażenia HIV-1. Cechuje je wysoka skuteczność, zmniejszona liczba interakcji między lekami oraz szybsze hamowanie replikacji wirusa w porównaniu do innych grup leków antyretrowirusowych [54-57]. Pierwsze zatwierdzone INSTI (raltegrawir i elwitegrawir) charakteryzowały się niższą barierą genetyczną wobec selekcji oporności [58-60]. Obecnie najczęściej stosowane schematy terapii antyretrowirusowej obejmują inhibitory integrazy drugiej generacji, takie jak dolutegrawir i biktegrawir, które posiadają wyższą barierę genetyczną i rzadziej prowadzą do lekooporności, co zostało udowodnione zarówno w badaniach *in vitro*, jak i w kohortach rzeczywistych [24,61-63]. Dolutegrawir jest zalecany przez WHO jako schemat pierwszego rzutu [13], według najnowszego raportu Światowej Organizacji Zdrowia osoby otrzymujące terapię zawierającą DTG utrzymują wysoki poziom supresji (powyżej 90%) [64].

Jednakże w ostatnim czasie, wraz z wprowadzeniem i rozszerzeniem stosowania długodziałającego kabotegrawiru zarówno w profilaktyce przedekspozycyjnej HIV, jak i w leczeniu antyretrowirusowym, który pomimo wysokiej skuteczności wiąże się z ryzykiem selekcji oporności w przypadku niepowodzenia wirusologicznego, zainteresowanie naukowe opornością na INSTI ponownie wzrosło [45,46,65,66]. Ocenia się, że przenoszona oporność na inhibitory integrazy wykrywana jest u 0,1-3% dotychczas nieleczonych pacjentów [67-69]. Ostatnie polskie badania wskazują, że kluczowe mutacje nie są obserwowane wśród pacjentów, natomiast mutacje mniejszościowe, głównie polimorfizm E157Q, są wykrywane w około 21,5% sekwencji [29]. Badanie oporności na inhibitory integrazy nie jest rutynowo wykonywane przed rozpoczęciem leczenia antyretrowirusowego, co ogranicza dostępność danych na ten temat. Istotny pozostaje również fakt, że od czasu ostatnich publikacji, zastosowanie inhibitorów integrazy znacząco wzrosło oraz nastąpiła wyraźna zmiana w rozkładzie subtypów, co uzasadnia przeprowadzenie analizy częstości mutacji związanych z redukcją wrażliwości na INSTI wśród polskich pacjentów, przedstawionej w niniejszej pracy.

4. CELE PRACY

Celem niniejszej pracy była ocena częstości mutacji związanych z lekoopornością oraz innych czynników mogących potencjalnie przyczyniać się do niepowodzenia wirusologicznego najnowszych leków stosowanych w leczeniu zakażenia wirusem HIV-1: dorawiryny, długodziałającego kabotegrawiru i ryłpiwiryny oraz inhibitorów integrazy.

- Analiza częstości występowania mutacji związanych z opornością na dorawirynę oraz porównanie jej z mutacjami obniżającymi wrażliwość na inne leki z grupy NNRTI wśród pacjentów dotychczas nieleczonych i leczonych.
- Oszacowanie częstości występowania czynników wirusologicznych, które mogą ograniczać rzeczywistą skuteczność długodziałającej terapii kabotegrawirem i ryłpiwiryną- mutacji związanych z opornością na CAB i RPV oraz sub-subtypu A1/A6 u pacjentów nieleczonych i leczonych.
- Ocena częstości i trendów czasowych mutacji związanych z opornością na inhibitory integrazy wśród pacjentów, którzy nie rozpoczęli leczenia antyretrowirusowego. Dodatkowo poddano analizie klastrowanie mutacji oraz trendy czasowe w rozkładzie subtypów.

5. MATERIAŁ I METODYKA

5.1. Materiał badawczy

5.1.1. Pobrania z lat 1997-2020

Klinika Chorób Zakaźnych, Tropikalnych i Nabytych Niedoborów Immunologicznych dysponuje sekwencjami wirusa HIV-1 uzyskanymi od pacjentów włączonych do leczenia od 1997 roku. Dane pochodzą ze Szczecina, Białegostoku, Bydgoszczy, Chorzowa, Gdańska, Krakowa, Łodzi, Opola, Poznania, Wrocławia oraz Zielonej Góry. Sekwencje proteazy, odwrotnej transkryptazy oraz integrazy wraz z danymi klinicznymi zostały wykorzystane do stworzenia grupy badanej, co pozwoliło na lepsze określenie trendów lekooporności wirusa HIV-1 w populacji polskiej, wśród pacjentów dotychczas nieleczonych i leczonych. Od kwietnia 1997 roku do września 2020 roku pozyskano 4102 sekwencje proteazy i odwrotnej transkryptazy (PR/RT) oraz 1341 sekwencji integrazy (INT).

5.1.2. Nowe pobrania od 2020 roku

Ze względu na brak narodowego programu nadzorowania lekooporności wirusa HIV-1, materiał do badania pozyskiwano na zlecenie lekarzy z ośrodka szczecińskiego oraz innych wspomnianych polskich placówek. Krew pobierano podczas pierwszej wizyty w poradni lub w trakcie hospitalizacji, przed włączeniem terapii ART. U pacjentów będących już w trakcie leczenia, próbki pobierano podczas rutynowej wizyty w poradni. Badany materiał stanowiła krew pobrana na EDTA, z której po odwirowaniu uzyskiwano osocze. Dodatkowo ośrodki udostępniały dane kliniczne dotyczące wysłanych próbek. Od października 2020 roku do czerwca 2024 roku wyizolowano 2304 sekwencje PR/RT oraz 870 sekwencji INT.

5.1.3. Grupy badane

W przypadku każdej publikacji grupy badane zostały dobrane w sposób umożliwiający analizę danych na jak najliczniejszym zbiorze pacjentów, z jednoczesnym zachowaniem wymaganych kryteriów (podział na osoby dotychczas nieleczone i leczone, dostępna sekwencja PR/RT i/lub INT oraz dane kliniczne).

- a) Publikacja nr 1. Niska częstość mutacji związanych z opornością na dorawirynę wśród polskich pacjentów żyjących z wirusem HIV-1.

Ze względu na fakt, że dorawiryna jest lekiem zatwierdzonym w 2018 roku, do badania włączono pacjentów przyjętych do opieki w okresie pięciu lat, od 2015 do 2019 roku. Analiza obejmowała sekwencje PR/RT pochodzące od 1760 osób dotychczas nieleczonych oraz 200 pacjentów leczonych antyretrowirusowo.

- b) Publikacja nr 2. Częstość czynników genotypowych potencjalnie związanych z niepowodzeniem wirusologicznym leczenia kabotegrawirem i rylpiwiryną wśród pacjentów nieleczonych oraz leczonych antyretrowirusowo żyjących z wirusem HIV-1.

Biorąc pod uwagę, że badanie lekooporności było zlecane na wniosek lekarzy, co mogło prowadzić do niewielkiej preselekcji w doborze pacjentów, do badania włączono sekwencje uzyskane w latach 1997-2021. Analizowana grupa obejmowała 4649 pacjentów, od których pozyskano 4809 sekwencji PR/RT, 4122 dotychczas nieleczonych oraz 697 leczonych. Ponadto dla 1217 osób z sekwencjami PR/RT uzyskano również sekwencje INT, 942 pochodzące od pacjentów dotychczas nieleczonych i 275 pochodzące od pacjentów leczonych antyretrowirusowo.

- c) Publikacja nr 3. Częstość głównych mutacji związanych z przenoszoną opornością na inhibitory integrazy w Polsce pozostaje niska pomimo zmienności subtypu.

W ostatnich latach obserwuje się coraz szersze stosowanie inhibitorów integrazy oraz znaczącą zmianę w rozkładzie subtypów w Polsce. Ponadto, ostatnia polska publikacja dotycząca oporności na inhibitory integrazy obejmowała sekwencje z lat 2010-2015. Z tego względu do niniejszej analizy włączono 882 osoby dotychczas nielezione, przyjęte do opieki w latach 2016-2023, od których uzyskano sekwencje INT.

5.2. Metodologia

5.2.1. Izolacja HIV-RNA

Materiał do izolacji RNA wirusa HIV-1 stanowiło 600 µl osocza, które zostało odwirowane w temperaturze 4°C przy prędkości 21 000-25 000 x g przez 1 godzinę celem zebrania osadu oddzielonego od nadmiaru osocza. Do dalszego etapu izolacji próbek pobranych do roku 2022 użyto komercyjnego zestawu Viroseq kit (wersje 2.8 i 2.9, Abbott Molecular, Abbott Park, Illinois, USA), natomiast materiał pobrany od 2023 roku wyizolowano przy użyciu zestawu QIAamp® Viral RNA Mini Kit.

5.2.2. Sekwencjonowanie regionu PR/RT i INT

Do przeprowadzenia sekwencjonowania regionu proteazy i odwrotnej transkryptazy, obejmującego 1302 pary zasad, w próbkach pobranych do 2022 roku, użyto zestawu Viroseq (wersje 2.8 i 2.9, Abbott Molecular, Abbott Park, Illinois, USA), natomiast od roku 2023 używano zestawu DeepChek® Assay PROTEASE/REVERSE TRANSCRIPTASE Genotyping and Drug Resistance. Reakcje sekwencjonowania Sangera przeprowadzono na analizatorze genetycznym ABI 3500 (Applied Biosystems, Foster City, CA). Uzyskane sekwencje

analizowano za pomocą oprogramowania ViroSeq[®] HIV-1 Genotyping Software v3.0, dołączonego do zestawu Viroseq.

Do sekwencjonowania regionu integrazy obejmującego 866 par zasad, w przypadku materiału pobranego do 2022 roku, stosowano metodę opisaną przez profesor Kristel Van Laethem i wsp. [70]. Próbki pobrane od 2023 roku były sekwencjonowane z użyciem zestawu DeepChek[®] Assay INTEGRASE Genotyping and Drug Resistance. Sekwencjonowanie metodą Sangera przeprowadzono na analizatorze genetycznym ABI 3500. Do analizy uzyskanych sekwencji (ze wszystkich lat) użyto narzędzia internetowego Recall (<https://recall.bccfe.ca>).

5.2.3. Ocena subtypu

Do wstępnej oceny subtypów wirusa HIV skorzystano z gotowych algorytmów internetowych: REGA HIV-1 Subtyping Tool, COMET- COntext-based Modeling for Expeditious Typing, Stanford HIVdb Subtyping Tool oraz BLAST- The Basic Local Alignment Search Tool. W celu potwierdzenia sub-subtypów oraz form rekombinowanych zastosowano analizę filogenetyczną.

W przypadku publikacji nr 2, „Częstość czynników genotypowych potencjalnie związanych z niepowodzeniem wirusologicznym leczenia kabotegrawirem i rylpiwiryną wśród pacjentów nieleczonych oraz leczonych antyretrowirusowo żyjących z wirusem HIV-1” wszystkie sekwencje wyrównano do kodonów przy użyciu narzędzia Clustal Omega, a następnie ręcznie edytowano przy pomocy programu MEGA11. Ostateczne wyrównanie składało się z 4809 sekwencji, które odpowiadają pozycjom nukleotydów 2253-3554 i 4230-5096 genomu referencyjnego HXB2. Początkowej analizie subtypów dokonano przy użyciu internetowych algorytmów REGAv3, COMETv2 oraz narzędzia do subtypowania Stanford. Sub-subtypy A potwierdzono przez rekonstrukcję drzewa filogenetycznego. Model GTR + I + G z czterema kategoriami gamma został wybrany jako optymalny dla analizowanego zestawu danych przy użyciu aplikacji ModelFinder zaimplementowanej w oprogramowaniu IQ-Tree. Zestaw danych referencyjnych (subtypy A-K grupy M i rekombinanty) pobrany z bazy Los Alamos HIV Database został połączony z wyrównaniem, a rekonstrukcja filogenetyczna została przeprowadzona w programie IQ-Tree. Wsparcie dla gałęzi zostało oszacowane przy użyciu metody Bootstrap ultrafast dla 1000 replikacji drzew.

5.2.4. Ocena lekooporności i klastrowania mutacji

W celu oceny lekooporności skorzystano z internetowego narzędzia Stanford HIV Drug Resistance Database, które analizuje sekwencje genomowe wirusa HIV-1 i identyfikuje mutacje związane z opornością wirusa na leki. Badania *in vitro* i *in vivo* pomagają określić,

w jakim stopniu każda mutacja wpływa na oporność. Mutacjom przydzielane są punkty istotności- im wyższa punktacja, tym większy wpływ mutacji na obniżenie wrażliwości na lek.

Baza Stanford wyraża oporność na leki w dwóch formach: poziomie oporności (resistance level) i sumarycznej liczbie punktów przypisanych do wszystkich mutacji w analizowanej sekwencji (resistance score). Istnieje pięć poziomów oporności: 1- wrażliwy, 2- potencjalnie niski, 3- niski, 4- średni, 5- wysoki. Jeśli całkowita punktacja mutacji wynosi poniżej 10 to sekwencja uznawana jest za wrażliwą, przy 10-14 punktach mówimy o potencjalnie niskiej oporności, przy 15-29 o niskiej, przy 30-59 o średniej i ≥ 60 o oporności wysokiej.

Dodatkowo posłużono się listą mutacji stworzoną przez International Antiviral Society-USA (IAS-USA), która jest cyklicznie aktualizowana i wskazuje mutacje kluczowe i mniejszościowe dla każdego leku.

W ramach niniejszej pracy analizowano również częstość mutacji, które według wymienionych algorytmów, występując samodzielnie, nie są związane z lekoopornością, jednak liczne badania wykazały, że w połączeniu z mutacjami kluczowymi obniżały wrażliwość na wybrane leki.

Ponadto, w publikacji nr 3, „Częstość głównych mutacji związanych z przenoszoną opornością na inhibitory integrazy w Polsce pozostaje niska pomimo zmienności subtypu”, oceniono klastrowanie mutacji przy pomocy analizy filogenetycznej. Zbadane zostały sekwencje z subtypem B i A6, pozostałe subtypy zostały odrzucone ze względu na małą liczebność. Badany fragment genu pol wirusa HIV-1 obejmował region integrazy (nukleotydy 4230-5096 według genomu referencyjnego HXB2). Sekwencje zawierające więcej niż 5% niejednoznacznych zasad zostały wykluczone, co dało ostatecznie 605 sekwencji subtypu B i 205 sub-subtypu A6. Do wyrównania badanych sekwencji względem sekwencji referencyjnej K03455.1 (HXB2) zastosowano program Clustal Omega. Następnie drzewa maksymalnej wiarygodności zostały skonstruowane w programie IQ-TREE, wykorzystując model ewolucyjny GTR. Klastry transmisji mutacji zidentyfikowano w programie ClusterPicker v1.332 z progiem odległości genetycznej 0,015 i wsparciem gałęzi $\geq 0,90$, zgodnie z przybliżonym testem stosunku prawdopodobieństwa Shimodairy-Hasegawy (SH-aLRT). Drzewa zostały przedstawione w programie iTOL.

5.2.5. Analiza statystyczna

Do analizy statystycznej wykorzystano oprogramowanie Statistica™ 13.1 (Statsoft, Warszawa, Polska) oraz program R w wersji 4.4.0. Do porównania zmiennych nominalnych użyto testu chi-kwadrat, a do analizy danych ciągłych zastosowano test Manna-Whitney'a. Aby porównać oporność na leki między pacjentami leczonymi i nieleczonymi wykorzystano test Fisher'a,

natomiast do przedstawienia rozkładu mutacji i subtypów na przestrzeni lat użyto regresji logistycznej.

6. OMÓWIENIE I Dyskusja prac wchodzących w skład rozprawy doktorskiej

6.1. Publikacja nr 1.

Niska częstość mutacji związanych z opornością na dorawirynę wśród polskich pacjentów żyjących z wirusem HIV-1.

Głównym celem niniejszej pracy było określenie częstości mutacji związanych z opornością na dorawirynę wśród pacjentów dotychczas nieleczonych i leczonych. Dodatkowo oszacowano częstość wariantów zmniejszających wrażliwość na inne leki z grupy nienukleozydowych inhibitorów odwrotnej transkryptazy oraz porównano je z mutacjami zwiększającymi oporność na dorawirynę.

Badanie obejmowało dwie grupy badane- pacjentów nieleczonych (1760 osób) oraz pacjentów poddanych leczeniu (200 osób), od których uzyskano materiał w latach 2015-2019 w ośmiu polskich ośrodkach. Analizowane dane obejmowały płeć, wiek w momencie pozytywnego testu HIV-1, wiramię oraz liczbę komórek CD4 przy rozpoznaniu. Izolację RNA wirusa HIV-1, sekwencjonowanie regionu proteazy i odwrotnej transkryptazy oraz analizę uzyskanych sekwencji wykonano przy użyciu metod przedstawionych w punkcie 5.2 Metodologia.

W grupie pacjentów nieleczonych 87,6% badanych stanowili mężczyźni z medianą wieku 34 lata (IQR 28-40). Większość osób posiadało subtyp B (86,6%), a drugim najczęstszym był subtyp A (9,5%). Biorąc pod uwagę mutacje związane z opornością na wszystkie leki z grupy NNRTI, pacjenci wykazujący oporność średnią i wysoką byli starsi w porównaniu do osób z kompletną wrażliwością na te leki. Ponadto warianty obniżające wrażliwość na efawirenz, newirapinę i rylpiwirynę były częstsze wśród kobiet niż mężczyzn (odpowiednio 4,1% vs 1,1%, $p = 0,0005$; 4,6% vs 1,6%, $p = 0,005$ oraz 8,2% vs 5,0%, $p = 0,050$). Mediana liczby komórek CD4 była niższa wśród pacjentów z opornością na RPV w odniesieniu do osób bez mutacji powiązanych z tym lekiem (344 vs 420,5 komórek/ μ L).

Wśród pacjentów leczonych mediana wieku wynosiła 37 lat (IQR 33-45), a 61,5% badanych stanowili mężczyźni. Najczęstszy był subtyp B (75,5%), natomiast drugim pod względem częstości był subtyp D (15,5%). Osoby wykazujące średnią i wysoką oporność na etrawirynę były starsze w porównaniu z osobami o pełnej wrażliwości na ten lek. Dodatkowo pacjenci z wiramię powyżej 5-log kopii/mL wykazywali większą oporność na ETR w porównaniu do osób z wiramię poniżej 5-log kopii/mL ($p = 0,020$). Mediana liczby komórek CD4 była niższa wśród pacjentów posiadających mutacje związane z opornością na DOR, EFV, NVP i ETR

w odniesieniu do osób bez mutacji na te leki.

Pod względem częstości mutacji, oporność na jakikolwiek lek NNRTI wykryto u 165 pacjentów (8,42%), wśród których 105 (5,97%) było dotychczas nieleczonych, a 60 (30,00%) leczonych. Oporność na dorawirynę (przynajmniej jedna mutacja obniżająca wrażliwość na DOR) rozpoznano u 32 (1,62%) osób- 13 (0,74%) nieleczonych i 19 (9,50%) leczonych. Liczba sekwencji pochodzących od pacjentów dotychczas nieleczonych z jedną, dwoma, trzema lub czterema mutacjami wynosiła odpowiednio 4 (0,23%), 6 (0,34%), 2 (0,11%) i 1 (0,06%). Wśród pacjentów leczonych były to 1 (0,50%), 5 (2,50%), 9 (4,50%) i 3 (1,50%) sekwencje. Ponadto 1 (0,50%) osoba leczona posiadała 5 mutacji. Biorąc pod uwagę wszystkie mutacje związane z obniżeniem wrażliwości na DOR, u pacjentów nieleczonych najczęstsze były warianty A98G oraz K101E (po 3; 0,2% każdy), natomiast wśród osób poddanych leczeniu były to mutacje L100I (4; 2,0%), K101E, V108I, H221Y oraz P225H (po 3; 1,5% każda). W przypadku innych leków z grupy NNRTI, najczęstszymi mutacjami powodującymi oporność wśród pacjentów dotychczas nieleczonych i leczonych były odpowiednio E138A/G/K/Q (83; 4,7% i 15; 7,5%), K103N (10; 0,6% i 36; 18,0%) oraz Y181C/I (5; 0,3% i 13; 6,5%).

W pracy porównano także liczbę pacjentów ze średnią i wysoką opornością na dorawirynę do liczby osób z opornością na inne leki NNRTI. Wśród pacjentów nieleczonych mutacje determinujące oporność na DOR (13; 0,7%) były rzadsze w porównaniu z mutacjami związanymi z NVP (36; 2,1%; $p = 0,0013$), RPV (95; 5,4%; $p < 0,0001$) oraz EFV (26; 1,5%; $p = 0,052$). Ponadto, częstość wariantów związanych z opornością na RPV była wyższa w porównaniu do mutacji obniżających wrażliwość na EFV ($p < 0,0001$), ETR (23; 1,3%; $p < 0,0001$) i NVP ($p < 0,0001$). U pacjentów leczonych mutacje powodujące oporność na DOR (19; 9,5%) występowały rzadziej niż mutacje związane z obniżeniem wrażliwości na EFV (51; 25,5%; $p < 0,0001$) i NVP (52; 26,0%; $p < 0,0001$). Dodatkowo, mutacje wpływające na skuteczność ETR (24; 12,0%) były rzadziej obserwowane w porównaniu do wariantów związanych z opornością na EFV ($p = 0,0001$) i NVP ($p < 0,0001$). Znotowano również wyższą liczbę mutacji dla NVP w porównaniu do mutacji dla RPV (38; 19,0%; $p < 0,0001$).

Omawiana praca jest pierwszym polskim badaniem oceniającym oporność na dorawirynę w dużej grupie pacjentów, zarówno dotychczas nieleczonych i leczonych. Częstość mutacji związanych z obniżeniem wrażliwości na DOR jest niska (<2%), zwłaszcza wśród osób nieleczonych (0,74%). Korzystny profil oporności pozwala stwierdzić, że zastosowanie dorawiryny w pierwszorazowym schemacie terapii „rapid” nie wymaga wykonywania genotypowania przed wprowadzeniem leczenia antyretrowirusowego.

W badaniu klinicznym DRIVE-FORWARD obejmującym 382 pacjentów bez wprowadzonego leczenia, niepowodzenia terapii wystąpiło jedynie u dwóch osób (0,52%) na skutek pojawienia się mutacji oporności na NNRTI, z selekcją wariantów V106I/H221Y/F227C oraz V106A/P225Y/H [39]. W badaniu DRIVE-AHEAD 7 z 364 pacjentów (1,92%) z niepowodzeniem wirusologicznym (zgodnie z protokołem) wykazywało mutacje związane z opornością na dorawirynę (Y188L, Y318F, V106I+F227C, V106I+H221Y+F227C, F227C, V106A+P225H+Y318F oraz V106M/T+F227C/R) [23]. Podobnie do danych przedstawionych w niniejszej pracy, mutacje oporności na DOR w badaniach DRIVE występowały rzadko, a najczęstszą z nich była V106A, obecna u jednego (0,06%) pacjenta poddanego leczeniu. Mutacja V106I była obserwowana u 71 (4,03%) dotychczas nieleczonych i 5 (2,50%) leczonych osób, ale ze względu na niską punktację przypisaną przez algorytm Stanford nie była ona analizowana w naszym badaniu. Soulie i wsp., opierając się na algorytmie ANRS z 2017 roku, wykryli oporność na DOR u 142 z 9764 (1,4%) pacjentów bez włączonego leczenia antyretrowirusowego, co stanowi wyższy odsetek w porównaniu do naszego badania (0,7%) [40]. Najczęściej wykryte mutacje w przytaczanym badaniu Soulie i wsp. obejmowały V108I (0,6% vs 0,1% w niniejszej pracy), Y188L i Y318F po 0,2% każda (vs brak w naszym badaniu), H221Y (0,2% vs 0,1%).

W przypadku oporności na inne leki NNRTI, pacjenci dotychczas nieleczeni, w naszej pracy częściej wykazywali oporność na RPV (5,4%) niż na inne leki z tej grupy, co wynikało z obecności mutacji E138A, która zmniejsza wrażliwość na RPV dwukrotnie. W badaniu przeprowadzonym przez Soulie i wsp. oporność na RPV wykryto w 9,9% analizowanych sekwencji. W innej analizie tej samej autorki, obejmującej 9199 pacjentów, oporność na DOR u osób leczonych cART wykryto u 1468 (16,0%) badanych (według algorytmu Stanford), co również jest wyższą wartością w porównaniu z wynikami niniejszego badania (9,5%) [41]. Najczęstszą mutacją wśród leczonych osób w naszej pracy była K103N, która powoduje wysoką oporność na NVP (26,0%) i EFV (25,5%), ale nie wpływa na wrażliwość na pozostałe leki NNRTI [71,72]. Jednakże, inne analizy pokazują, że aż 80% pacjentów, u których doszło do niepowodzenia terapii NVP lub EFV, rozwija mutacje NNRTI, co może wpływać na skuteczność leków drugiej generacji [73]. Ponadto, u osób wznawiających leczenie NVP lub EFV po przerwie, oporność obserwowano u 21% pacjentów w porównaniu do 8% wśród osób stosujących je po raz pierwszy [74].

Podsumowując, mutacje związane z niepowodzeniem wirusologicznym w przypadku terapii zawierających dorawirynę występowały rzadko zarówno w grupie pacjentów nieleczonych, jak i poddanych leczeniu (99,3% vs 90,5% osób z pełną wrażliwością na DOR). W obu grupach

zanotowano niższą częstość oporności na dorawiryneę w porównaniu z innymi lekami NNRTI, co uzasadnia jej zastosowanie u pacjentów nieleczonych oraz stanowi atrakcyjną opcję ze względu na wyższą barierę genetyczną oporności u pacjentów wcześniej poddanych leczeniu cART.

6.2. Publikacja nr 2.

Częstość czynników genotypowych potencjalnie związanych z niepowodzeniem wirusologicznym leczenia kabotegrawirem i ryłpiwiryną wśród pacjentów nieleczonych oraz leczonych antyretrowirusowo żyjących z wirusem HIV-1.

W związku z identyfikacją czynników, które mogą potencjalnie przyczyniać się do niepowodzenia leczenia długodziałającą iniekcyjną terapią kabotegrawirem i ryłpiwiryną, w niniejszej pracy postanowiono ocenić częstość występowania tych czynników (mutacji oporności na RPV i CAB oraz sub-subtypów A1/A6) wśród polskich pacjentów przed podjęciem leczenia ART oraz pacjentów leczonych.

Do badania włączono 4649 pacjentów objętych opieką w 11 polskich ośrodkach w latach 1997-2021, od których uzyskano 4809 sekwencji PR/RT- 4122 od pacjentów nieleczonych oraz 697 od pacjentów przyjmujących ART. Od niektórych badanych materiałów był pobierany kilkakrotnie, z tego względu 252 sekwencje od 92 pacjentów były włączone do obu grup (64 dotychczas nieleczonych i 188 leczonych).

W obu grupach większość stanowili mężczyźni (85,08% wśród pacjentów bez leczenia vs 68,41% wśród osób leczonych) z medianą wieku odpowiednio 34 (IQR 28-41) oraz 39 (IQR 34-46) lat. Dodatkowo, dla 1217 sekwencji PR/RT uzyskano sekwencje integrazy- 942 pochodzące od pacjentów nieleczonych (81,95% mężczyzn, mediana wieku 35, IQR 29-42) i 275 leczonych (61,45% mężczyzn, mediana wieku 40, IQR 35-47).

Wśród sekwencji PR/RT dominujący był subtyp B (83,02% u pacjentów bez leczenia vs 81,80% u pacjentów leczonych). Wśród osób nieleczonych drugim najczęstszym był subtyp A (11,89% vs 6,11% leczeni, $p < 0,001$), natomiast wśród pacjentów leczonych subtyp D (7,28% vs 1,33% u osób bez leczenia, $p < 0,001$). Dla subtypu A częstość sub-subtypów A3, A1 i A6 wśród osób przed włączeniem ART wynosiła odpowiednio 0,07%; 0,58%; 11,24%; natomiast wśród pacjentów leczonych było to 0,00%; 1,02% oraz 5,09%. Z pozostałych subtypów, subtyp C stwierdzono u 1,14% pacjentów dotychczas nieleczonych i 2,33% pacjentów leczonych ($p = 0,011$), subtyp G u 0,17% vs 0,73% ($p = 0,007$) oraz subtyp F u 0,19% vs 0,15% ($p = 0,785$). Rekombinowane formy stwierdzono u 2,26% pacjentów bez ART i 1,60% pacjentów wcześniej leczonych ($p = 0,274$), z czego najczęściej występowały

CRF02_AG (0,61% vs 0,58%, $p = 0,940$) oraz CRF01_AE (0,44% vs 0,29%, $p = 0,583$).

Dodatkowo oceniono rozkład subtypów w czasie. W latach 1997-2009 liczba sekwencji była niska, zatem niemożliwe było porównanie częstości subtypów. Jednakże, wśród pacjentów nieleczonych częstość subtypu B spadła z 89,64% w latach 2010/2011 do 67,75% w latach 2020/2021 ($p < 0,001$). Jednocześnie, w latach 2010/2011 częstość sub-subtypów A1/A6 wzrosła z 55,17% subtypów non-B do 87,45% w 2020/2021 ($p < 0,001$). Wśród pacjentów przyjmujących ART częstość subtypu B w latach 2010/2011 i 2020/2021 była podobna (78,87% vs 77,14%; $p = 0,786$), jednakże sub-subtypy A1/A6 występowały częściej w latach 2020/2021 (33,33% subtypów non-B vs 62,50%; $p = 0,076$).

Dla sekwencji PR/RT/INT subtyp B był również najczęstszy (73,67% wśród osób dotychczas nieleczonych vs 72,36% u osób leczonych; $p = 0,666$). Sub-subtyp A6 wśród pacjentów bez leczenia i leczonych był obserwowany u odpowiednio 16,03% i 8,00% osób ($p < 0,001$), spośród których częstość sub-subtypów A3, A1 i A6 wśród pacjentów dotychczas nieleczonych wynosiła 0,11%; 0,74% oraz 15,18%, natomiast wśród osób leczonych było to odpowiednio 0,00%; 1,81% i 6,19%. Częstość występowania pozostałych subtypów była następująca: D (3,93% u pacjentów przed leczeniem vs 13,09% u leczonych; $p < 0,001$), C (1,70% vs 2,18%; $p = 0,597$), G (0,53% vs 1,45%; $p = 0,116$) oraz F (0,11% vs 0,36%; $p = 0,354$). Rekombinowane formy stwierdzono u 4,03% pacjentów nieleczonych i 2,55% pacjentów leczonych ($p = 0,250$), z czego najczęściej występowały CRF_02AG (0,96% u nieleczonych vs 0,73% u leczonych; $p = 0,725$) oraz CRF01_AE (0,21% vs 0,36%; $p = 0,656$). Ze względu na małą liczbę sekwencji PR/RT/INT w latach 2010/2011, porównanie częstości subtypów z latami 2020/2021 nie zostało przedstawione.

Ogólnie, w 4809 sekwencjach PR/RT, oporność na RPV (przynajmniej jedna mutacja oporności na RPV, kluczowa i/lub mniejszościowa) odnotowano u 243 (5,89%) pacjentów dotychczas nieleczonych i 100 (14,56%) leczonych ($p < 0,001$). Wśród nich odpowiednio 22 (0,53%) i 3 (0,44%) sekwencje należały do sub-subtypu A6. Uwzględniając wszystkie mutacje (kluczowe i mniejszościowe), najczęstszymi mutacjami oporności na RPV wśród pacjentów nieleczonych były E138A/G/K/Q (5,12%), Y181C/I (0,44%), K101E/P (0,32%) oraz H221Y (0,17%), natomiast wśród pacjentów poddanych leczeniu były to E138A/G/K/Q (6,84%), Y181C/I (4,66%), K101E/P (2,47%) oraz L100I (1,60%). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w częstości występowania mutacji RPV wśród subtypów A i B zarówno w grupie pacjentów nieleczonych (4,90% vs 6,69%; $p = 0,131$), jak i leczonych (19,05% vs 19,61%; $p = 0,934$), jednakże u pacjentów leczonych ART polimorfizm G190S częściej

obserwowano w subtypie A (konkretnie A6) niż w subtypie B (12,50% vs 0,71%; $p < 0,001$). Z uwagi na rzadkość występowania pozostałych subtypów, nie przedstawiono dla nich wzorców mutacji. Dodatkowo oceniono rozkład mutacji w czasie dla pacjentów bez włączonego leczenia i leczonych. Nie odnotowano statystycznie istotnych różnic w częstości oporności na RPV ani w najczęstszych mutacjach pomiędzy latami 2010/2011 a 2020/2021 zarówno w grupie pacjentów nieleczonych, jak i leczonych.

W zestawie danych zawierającym 1217 sekwencji PR/RT/INT, oporność na RPV obserwowano u 62 (6,58%) pacjentów nieleczonych i 42 (15,27%) pacjentów leczonych ($p < 0,001$); odpowiednio 9 (0,95%) i 1 (0,36%) z nich posiadało sub-subtyp A6. Najczęstszymi RPV RAMs wśród pacjentów nieleczonych antyretrowirusowo były E138A/G/K/Q (5,73%), Y181C/I (0,42%), K101E/P (0,21%) oraz L100I (0,11%), natomiast wśród pacjentów leczonych były to Y181C/I (6,91%), E138A/G/K/Q (6,55%), K101E/P (2,94%) oraz L100I (1,82%). Oporność na CAB wykryto u 12 (1,27%) pacjentów przed leczeniem i 40 (14,54%) poddanych leczeniu ($p < 0,001$); odpowiednio 1 (0,11%) i 2 (0,73%) z nich posiadało sub-subtypy A1/A6. Najczęstszymi mutacjami związanymi z opornością na CAB wśród pacjentów dotychczas nieleczonych były R263K (0,64%), E138A/K/T (0,42%), G140C/R/S oraz Q148H/R (po 0,21% każda), natomiast wśród pacjentów leczonych były to N155H (7,27%), Q148H/R (4,73%), G140C/R/S (4,36%) oraz E138A/K/T (2,18%). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w częstości występowania CAB RAMs w subtypach A i B zarówno w sekwencjach bez włączonego leczenia (0,66% vs 1,15%; $p = 0,595$), jak i u pacjentów leczonych (13,64% vs 16,08%; $p = 0,766$). Ponadto oceniono rozkład mutacji w czasie dla RPV–oraz dla CAB. W przypadku pacjentów dotychczas nieleczonych nie odnotowano statystycznie istotnych różnic w częstości oporności na RPV ani najczęstszych mutacji pomiędzy latami 2010/2011 a 2020/2021. Wśród pacjentów leczonych w latach 2010/2011 22,22% sekwencji było opornych na RPV, a najczęstszą mutacją była Y181C (37,50%) w porównaniu do 13,58% ($p = 0,355$) sekwencji opornych na RPV, z najczęstszą mutacją E138A/G/K/Q (również 37,50%) w latach 2020/2021. W latach 2010/2011 nie odnotowano oporności na CAB wśród pacjentów bez leczenia, w porównaniu do 0,57% pacjentów opornych na CAB, z G140S i Q148H jako jedynymi dwoma mutacjami oporności w latach 2020/2021. Wśród pacjentów leczonych 22,22% sekwencji z lat 2010/2011 było opornych na CAB, z N155H jako najczęstszą mutacją (40,00%) w porównaniu do 9,88% ($p = 0,147$) pacjentów opornych na CAB, z G140S i Q148H/R (po 26,67% każda) w latach 2020/2021.

Biorąc pod uwagę wszystkie mutacje RPV (kluczowe i mniejszościowe) w zbiorze sekwencji PR/RT, 17,18% pacjentów dotychczas nieleczonych i 20,23% leczonych ($p = 0,052$) miało

jakikolwiek z dwóch czynników związanych z niepowodzeniem terapii (RPV RAMs i/lub sub-subtyp A1/A6), ale tylko 0,53% i 0,44% sekwencji miało oba czynniki ($p = 0,743$).

Wśród sekwencji PR/RT/INT przynajmniej jeden czynnik z trzech czynników potencjalnie predysponujących do niepowodzenia leczenia (RPV RAMs i/lub CAB RAMs i/lub sub-subtyp A1/A6) obserwowano u 22,61% osób bez leczenia i 33,09% leczonych pacjentów ($p < 0,001$). Jakiegokolwiek dwa z trzech czynników występowały u 1,17% i 4,36% osób ($p < 0,001$), podczas gdy wszystkie trzy czynniki wykryto u jednego (0,36%) pacjenta leczonego.

Omawiana praca przedstawia dane na temat częstości czynników potencjalnie związanych z niepowodzeniem leczeniem CAB/RPV LAI w dużej grupie pacjentów nieleczonych i poddanych ART w latach 1997-2021 w Polsce. Jest to pierwsze badanie oceniające częstość mutacji związanych z opornością na ryłpiwirynę i kabotegrawir w Europie Centralnej. Analiza skupia się również na sub-subtypach A1/A6, których częstość systematycznie wzrasta, głównie ze względu na migrację z Europy Wschodniej. Obecnie można oczekiwać dalszych wzrostów częstości sub-subtypu A6 spowodowanych rosyjską inwazją na Ukrainie i migracją z tego regionu, gdzie wariant A6 jest powszechny. W grupie 4809 badanych stwierdzono, że 17,2% pacjentów bez włączonego leczenia i 20,2% leczonych (17,6% wszystkich) miało subtyp non-B. W porównaniu do innych polskich prac z poprzednich lat, w 2010 roku subtyp non-B wykryty był u 21,0% pacjentów, gdzie najczęstszy był wariant D, z kolei w 2016 roku zanotowano spadek częstości subtypów non-B (13,1%), razem ze wzrostem wariantu A (A1-5,2%) [75,76]. Według najnowszego polskiego badania, częstość subtypu B znacząco spadła, z 89,3% w 2015 roku do 80,3% w 2019 roku, co jest związane z rosnącą liczbą wariantów A1/A6. W 2015 roku częstość występowania subtypu A oszacowano na 5,6% zarówno u pacjentów nieleczonych, jak i leczonych, a do 2019 roku wzrosła ona do 13,4% [9]. W niniejszym badaniu, oporność na ryłpiwirynę wśród pacjentów nieleczonych wykryta została u 5,9% osób. Wynik ten jest porównywalny z wynikami ostatniego francuskiego badania, które wykazało 6,2% i poprzedniego polskiego badania (5,3%) [51,77]. Zgodnie z oczekiwaniami, najczęstszym (5,1%) polimorfizmem związanym z opornością na RPV wśród pacjentów dotychczas nieleczonych był E138A/G/K/Q. Dokładniej, E138A (który związany jest z dwukrotną redukcją wrażliwości na RPV) był najczęstszy (4,5%), co potwierdzają wcześniejsze polskie (3,7%) i francuskie (3,2%) wyniki. Mutacje E138K i E138G obserwowano w 0,6% sekwencji. Wśród osób poddanych leczeniu, mutacje E138A/G/K/Q również były najczęstsze (6,8%), a kolejną najczęstszą mutacją była Y181C/I (4,7%), co jest zgodne z moją poprzednią pracą na temat oporności na leki NNRTI (odpowiednio 7,5% vs 6,5%).

W sekwencjach integrazy, oporność na kabotegrawir stwierdzono u 1,3% pacjentów przed włączeniem leczenia (vs 0,7% w badaniu francuskim). Najczęstszą mutacją związaną z opornością na CAB w grupie pacjentów nieleczonych była R263K (0,6%), która obniża wrażliwość na CAB na średnim poziomie. Jednakże, polimorfizm L74I, który był najczęstszy w badaniu Charpentier's i wsp. (12,9%) i wykryty u 88,3% badanych z sub-subtypem A1/A6 (6,6% z nich miało potwierdzone niepowodzenie wirusologiczne), w pracy Cutrell i wsp. odnotowany był wśród 18,5% pacjentów dotychczas nieleczonych i 10,5% pacjentów leczonych, z czego odpowiednio 71,3% i 58,6% miało sub-subtyp A1/A6 [48,77].

Niniejsze badanie wskazuje, że 17,2% dotychczas nieleczonych i 20,2% leczonych pacjentów miało jeden z dwóch czynników wyjściowych, które mogą wpływać na leczenie LAI CAB/RPV (RPV RAMs i/lub sub-subtyp A1/A6), jednak obecność dwóch czynników jednocześnie odnotowano jedynie w ~0,5% sekwencji (w obu grupach), co jest zbliżone do wyników z badania francuskiego (0,4%) [77]. Gdyby również uwzględnić mutacje związane z opornością na kabotegrawir, częstość czynników CAB/RPV potencjalnie związanych z niepowodzeniem wirusologicznym byłaby nieco wyższa, ale wciąż rzadka (1,2% w sekwencjach bez włączonego leczenia i 4,4% w leczonych). Warto zaznaczyć, że w badaniu Cutrell i wsp. kombinacja przynajmniej dwóch z czterech czynników była obserwowana u 3,4% pacjentów i była związana ze zwiększonym ryzykiem niepowodzenia wirusologicznego (25,7%), ale BMI ≥ 30 kg/m² było jednym z czynników wyjściowych, który nie był dostępny w naszym zbiorze danych [48]. Należy zauważyć, że identyfikacja czynników potencjalnie związanych z niepowodzeniem terapii LAI CAB/RPV może być trudna w warunkach zwiększonej częstości występowania sub-subtypów A1/A6 (kraje afrykańskie, Rosja, Ukraina, Białoruś), ponieważ dane wyjściowe dotyczące sekwencji nie są często zbierane. Dlatego wysiłki na rzecz walidacji, które czynniki będą klinicznie istotne dla niepowodzenia leczeniem CAB/RPV oraz zwiększenie możliwości sekwencjonowania wirusa HIV-1, są niezwykle ważne z perspektywy wdrożenia LAI. Ostatnie badania wykazały, że długodziałający CAB używany jako PrEP jest skuteczniejszy w porównaniu do codziennego stosowania FTC/TDF i będzie skuteczną strategią zapobiegawczą zarówno dla mężczyzn i kobiet. Jednakże nie jest pewne czy taka profilaktyka przedeksperymentalna będzie skuteczna w warunkach, w których powszechnie występuje sub-subtyp A1/A6. Dalsze badania, w tym informacje dotyczące podstawowych subtypów wśród niedawno zakażonych pacjentów oraz osób z niepowodzeniem stosowania PrEP, są konieczne.

Omawiana praca ma kilka ograniczeń. Materiał z polskich ośrodków był pobierany i przesyłany na wniosek lekarzy, co mogło prowadzić do niewielkiej preselekcji w doborze pacjentów,

z tego względu do badania włączono dużą grupę sekwencji. Ponadto, badanie ogranicza się jedynie do czynników wirusologicznych, nie udało się zebrać informacji o początkowej wartości wskaźnika BMI, co mogłoby dostarczyć cennych informacji. W grupie pacjentów leczonych nie była dostępna pełna historia leczenia, zatem niemożliwe było zbadanie wzorców ewolucji oporności w regionach PR/RT/INT, jednakże te dane są obecnie zbierane i będą opublikowane w przyszłości.

Podsumowując, pomimo powszechnej obecności pojedynczego czynnika potencjalnie związanego z niepowodzeniem leczenia długodziałającą terapią kabotegrawirem/rylpiwiryną, biorąc pod uwagę rzadkie występowanie czynników w połączeniu, oczekiwany wpływ kliniczny jest niski. W warunkach rzeczywistych, możliwość niepowodzenia wirusologicznego (w tym oporności na leki) szczególnie w obszarach o wysokiej częstości występowania wariantów A1/A6, może być zwiększona, a monitorowanie lekooporności powinno być kontynuowane. Określenie subtypu i wzorców transmitowanej (przenoszonej) oporności pozostaje przydatne przed wdrożeniem leczenia LAI, co obniża możliwość niepowodzenia terapii w kontekście długotrwałej ekspozycji na leki.

6.3. Publikacja nr 3.

Częstość głównych mutacji związanych z przenoszoną opornością na inhibitory integrazy w Polsce pozostaje niska pomimo zmienności subtypu.

Celem pracy była ocena częstości i wzorców oporności na inhibitory integrazy wśród pacjentów dotychczas nieleczonych żyjących z wirusem HIV-1 w Polsce.

Grupa badana obejmowała 882 osoby bez uprzedniego leczenia antyretrowirusowego, które zostały przyjęte do opieki w siedmiu polskich ośrodkach w latach 2016-2023. Analizowane dane dotyczyły płci, wieku w czasie pozytywnego wyniku testu potwierdzenia zakażenia wirusem HIV, liczbę komórek CD4 i poziom wirerii przy rozpoznaniu, stopień zaawansowania zakażenia oraz drogę transmisji (podaną przez pacjenta).

Zgodnie z metodami opisanymi w punkcie 5.2 Metodologia wyizolowano wirusowe RNA, przeprowadzono sekwencjonowanie regionu integrazy oraz analizę uzyskanych wyników.

Większość badanych stanowili mężczyźni (84,81%) pochodzenia polskiego (86,39%) z medianą wieku 35 lat (IQR 16-75). Za główną drogę transmisji odpowiadały kontakty MSM (55,22%). Mediana komórek CD4 wynosiła 349 komórek/ μ L, a mediana wirerii 4,80 log₁₀ RNA kopii/mL. U ponad połowy (50,18%) pacjentów zakażenie zdiagnozowano na późnym etapie. Najczęstszymi subtypami były warianty B (69,84%) i A6 (24,38%). Subtyp B

w porównaniu do subtypów non-B częściej występował wśród mężczyzn ($p < 0,001$) oraz w kontaktach MSM (vs A6 $p < 0,001$; vs non-B $p < 0,016$). Ponadto mediana wirerii HIV-1 była niższa w subtypie B w porównaniu do sub-subtypu A6 ($p = 0,001$). Subtyp B częściej obserwowany był wśród Polaków ($p < 0,001$), natomiast sub-subtyp A6 częściej wśród migrantów ($p < 0,001$).

Mutacje związane z lekoopornością wykryto w 135 sekwencjach (15,31%; 0,45% stanowiły mutacje kluczowe i 14,85% mniejszościowe). Jednakże, ponieważ najczęstsze były mutacje o mniejszym znaczeniu klinicznym, większość badanych była wrażliwa na wszystkie inhibitory integrazy lub wykazywała potencjalnie niską oporność tylko na leki pierwszej generacji (EVG i RAL). Biorąc pod uwagę, że za odporne uznano tylko sekwencje z poziomem oporności ≥ 3 , 99,55% sekwencji było wrażliwych na wszystkie INSTI. Spośród czterech sekwencji wykazujących oporność, dwie osoby wykazały niską oporność na EVG i RAL, a kolejne dwie wykazały średnią oporność na EVC, BIC, CAB, DTG oraz niską na RAL.

Mutacje kluczowe, 2 E138K (0,23%) i 2 R263K (0,23%), wykryto u mężczyzn polskiej narodowości z subtypem B. W przypadku mniejszościowych mutacji, wykryto 132 mutacje w 131 sekwencjach (14,85%), mutacje E157Q+L74M zostały wykryte u jednego pacjenta z sub-subtypem A6. Wykryte mutacje obejmowały warianty E157Q (123; 13,95%)- 121 (93,18%) z subtypem B, 1 (0,81%) z A6, 1 (0,81%) z CRF03_AB, L74M (5; 0,57%, mężczyźni z sub-subtypem A6), T97A (3; 0,34%, mężczyźni z subtypem B), D232N (1; 0,11%, mężczyzna z subtypem B). Polimorfizm E157Q był częściej obserwowany wśród osób z subtypem B (93,18%, $p < 0,001$), kobiet (32,84%; $p < 0,001$) i osób przyjmujących narkotyki drogą dożylną (68,52%; $p < 0,001$).

Mutacja L74M była częstsza wśród pacjentów z sub-subtypem A6 w porównaniu do innych subtypów ($p < 0,001$), jednak nie zanotowano różnic w częstości dla płci czy drogi transmisji. Dodatkowo oceniono częstość mutacji L74I, której punktacja wynosi 0, ale jak już wcześniej wspomniano, może stanowić czynnik wpływający na lekooporność. Wykryto ją w 226 (25,62%) sekwencjach, była częstsza wśród kobiet ($p < 0,001$), osób z sub-subtypem A6 (vs non-A6 $p < 0,001$) i zakażeniach drogą heteroseksualną (vs MSM $p = 0,002$). Oceniono także częstość mniejszościowych mutacji według narodowości. Mutacje mniejszościowe wykryto częściej wśród Polaków (125; 117 E157Q, 4 L74M, 3 T97A i 1 D232N) niż wśród migrantów (7; 5 E157Q i 1 E157Q + L74M; $p = 0,001$).

Ponadto przeprowadzono analizę rozkładu mutacji na przestrzeni lat. Ze względu na wykrycie 4 mutacji kluczowych, nie zanotowano żadnej tendencji w ich występowaniu ($p = 0,291$).

W przypadku mniejszościowych mutacji zaobserwowano istotny spadek z 20,45% w 2016 roku do 7,69% w 2023 roku (OR 0,83; 95% CI 0,74–0,92; $p = 0,001$). Analizując rozkład mniejszościowych mutacji w zależności od subtypu, u pacjentów z subtypem B nie odnotowano znaczącego trendu ($p = 0,298$), jednakże wśród osób z sub-subtypem A6 zanotowano tendencję spadkową ($p = 0,051$). Następnie sprawdzono, czy występują zmiany w rozkładzie samych subtypów. Widoczny był znaczący spadek w częstości subtypu B ($p < 0,001$) z jednoczesnym wzrostem częstości sub-subtypu A6 ($p < 0,001$). Dodatkowo przeanalizowano rozkład mutacji według drogi transmisji- jedynie w przypadku zakażeń drogą heteroseksualną zaobserwowano istotną statystycznie tendencję spadkową ($p < 0,001$).

W dalszych analizach oceniono klastrowanie się mutacji związanych z opornością na INSTI. Łącznie wykryto 98 klastrow: 72 dla subtypu B i 26 dla sub-subtypu A6. Dla sekwencji subtypu B zidentyfikowano 51 par, spośród których 6 miało jedną mutację (1 z mutacją R263K, 1 z mutacją E138K oraz 4 z polimorfizmem E157Q). Pozostałe klastry bez mutacji obejmowały 15 klastrow z 3 sekwencjami, 3 klastry z 4 sekwencjami, 1 klaster z 5 sekwencjami oraz 2 klastry z 8 sekwencjami. W przypadku sub-subtypu A6 wykryto 19 par sekwencji, z których 1 posiadała mutację L74M. Dodatkowo zidentyfikowano 6 klastrow z 3 sekwencjami i 1 klaster z 6 sekwencjami. Podsumowując, nie zanotowano znaczących klastrow związanych z przenoszoną opornością.

Przedstawione wyniki prezentują nowe dane zebrane w latach 2016-2023 na temat oporności na inhibitory integrazy wśród pacjentów dotychczas nieleczonych żyjących w Polsce. Ostatnie dane na temat przenoszonej oporności na INSTI obejmowały sekwencje z lat 2010-2015, zatem niniejsze badanie jest niezwykle istotne z punktu widzenia częstszego stosowania inhibitorów integrazy wśród polskich pacjentów. Jakakolwiek oporność została wykryta u 15,31% osób, jednakże mutacje kluczowe zidentyfikowano jedynie w 0,45% sekwencji. Wyniki te są zgodne z poprzednimi polskimi badaniami, w których częstość mutacji głównych również była niska [29,78].

W badaniach z zagranicznych ośrodków kluczowe mutacje obserwowane są u 0,3-1,5% nowo zdiagnozowanych pacjentów [69,79,80]. W niniejszym badaniu dwie wykryte mutacje kluczowe stanowiły warianty E138K i R263K. Mutacja E138K identyfikowana jest u ~0,15% pacjentów i jest związana z potencjalnie niską lub niską opornością na wszystkie leki z grupy INSTI, jednak w większym stopniu wpływa na wrażliwość w połączeniu z innymi mutacjami [79,81]. W omawianiu badaniu występowała samodzielnie i pojawiła się u 2 (0,23%) badanych. Niepolimorficzna mutacja R263K jest wykrywana u ~10% nieleczonych pacjentów [79,81]

i obniża wrażliwość na DTG, BIC i CAB około dwukrotnie [24,82], w niniejszym badaniu zidentyfikowano ją u 2 (0,23%) pacjentów. Obie mutacje mogą pojawić się w kombinacji z hipermutacją G-A APOBEC, jednak w analizowanych sekwencjach nie została ona wykryta. Od 2020 roku nie zaobserwowano żadnej kluczowej mutacji, a w poprzednich latach nie odnotowano żadnej tendencji w częstości tych wariantów ze względu na ich niską liczbę.

Mniejszościowe mutacje wykryto w 14,85% sekwencji, z czego główną mutację stanowił polimorfizm E157Q (13,95%). Innymi rozpoznanymi mniejszościowymi mutacjami były L74M (0,57%), T97A (0,34%) oraz D232N (0,11%). Polimorficzna mutacja L74M obserwowana jest u 1-5% pacjentów w zależności od subtypu i jest częstsza wśród osób z subtypami non-B [83,84]. Obniża ona wrażliwość na INSTI jedynie w kombinacji z innymi mutacjami [24,85], ale w opisywanym badaniu występowała samodzielnie, a wszystkie osoby miały sub-subtyp A6.

Zagraniczne prace naukowe udowodniły, że polimorfizm E157Q wykrywany jest u około 2,5% dotychczas nieleczonych pacjentów [69,79,86], a w zależności od subtypu jego częstość może wahać od 1,7% do 5,6% [86,87]. W polskiej populacji mutacja ta jest znacznie częstsza- w 2012 roku była obserwowana u 28,8% badanych, a w 2017 roku u 19,19% [78,29]. Związek między mutacją E157Q a obniżoną wrażliwością na inhibitory integrazy jest słaby i w badaniach *in vitro* samodzielnie nie wpływa ona na rozwój oporności [88]. W omawianej pracy wykryto tylko jedną kombinację z mutacją E157Q, E157Q+L74M, jednak również nie wykazywała ona wpływu na oporność. Warto wspomnieć, że według algorytmu Stanford, polimorfizm ten może w niskim stopniu wpływać na wrażliwość na RAL i EVG, natomiast według francuskiego algorytmu ANRS mutacja ta wiąże się z całkowitą opornością na INSTI pierwszej generacji. Badania w warunkach rzeczywistych pokazują, że niewielki odsetek pacjentów posiadających ten wariant doświadcza niepowodzenia wirusologicznego podczas stosowania RAL lub EVG [86,89]. Dodatkowo, w przedstawianym badaniu polimorfizm ten częściej był obserwowany wśród pacjentów z subtypem B, kobiet oraz osób przyjmujących narkotyki drogą dożylną, co również zostało potwierdzone w poprzedniej polskiej analizie [29]. Znacząca częstość występowania mutacji E157Q w populacji subtypu B w Polsce może wskazywać na słaby efekt założycielski, który potencjalnie wynika z wirusa, który wcześniej był szeroko przenoszony wśród IDU. Wyższa częstość występowania tej substytucji wśród IDU może być również związana z ich słabszą adherencją i częstszym niepowodzeniem wirusologicznym, co predysponuje do rozwoju lekooporności [90].

W naszym kraju notowany jest ciągły spadek częstości mutacji (głównie E157Q), w 2012 roku

mutacje mniejszościowe wykrywane były w 38,5% sekwencji, w 2017 roku u 21,5% osób, a w obecnym badaniu u 14,85% badanych [78,29]. Nie zanotowano znaczących różnic w rozkładzie mutacji na przestrzeni lat pod względem płci czy subtypu. Pod względem drogi transmisji spadkowy trend obserwowano w zakażeniach drogą heteroseksualną, co może być związane z faktem, że wariant E157Q pojawia się głównie w subtypie B związanym z zakażeniami MSM. Ponieważ odnotowano systematyczny spadek częstości subtypu B, częstość mutacji E157Q, która jest polimorficznym wariantem dla tego subtypu, również spada. Dla sub-subtypu A6, który jest coraz częstszy, mutacja E157Q nie jest polimorficzna i została wykryta tylko u 1 osoby (0,81%). Co więcej, polimorfizm E157Q klastrował się w subtypie B, wykryto 4 pary sekwencji z tą mutacją. Inne badania również wskazują na klastrowanie się tego wariantu [78,91]. W poprzedniej polskiej analizie mutacja E157Q obecna była w dużym klastrze 33 sekwencji, które przenosiły się u kobiet zakażonych drogą kontaktów heteroseksualnych i związane były z historią dożywłnego stosowania narkotyków [29]. W obecnym badaniu nie zaobserwowano takiej tendencji w utworzonych klastrach, droga transmisji była nieznana u 4 pacjentów, natomiast pozostałe dotyczyły 2 zakażeń MSM, 1 IDU i 1 HET.

Warto zaznaczyć, że w ostatnich latach nastąpiła zmiana w rozkładzie subtypów. Notowany jest znaczący trend spadkowy w częstości subtypu B i wzrost częstości sub-subtypu A6. W badaniu przeprowadzonym przez Serwina i wsp. oceniono, że w latach 2015-2019 wariant A6 odpowiadał za 8,66% zakażeń, podczas gdy w obecnym badaniu było to 24,38% przypadków [9]. Zmiana ta jest w głównym stopniu spowodowana rosyjską inwazją na Ukrainie, która w 2022 roku doprowadziła do migracji, głównie do Polski. Wśród Polaków sub-subtyp A6 był wykryty u 16,4% pacjentów, natomiast wśród migrantów u 75,0% osób. Mimo, że u migrantów nie wykryto żadnej kluczowej mutacji i wariant E157Q występował rzadko, sub-subtyp A6 związany jest z mutacjami w pozycji L74, które mogą wpływać na rozwój oporności na kabotegrawir. Polimorfizm L74I wykryto w 25,62% sekwencji (83,63% z sub-subtypem A6).

Badanie ma kilka ograniczeń. W Polsce nie ma krajowego programu, który systematycznie monitoruje oporność na leki, z tego względu materiał do sekwencjonowania regionu integrazy był zbierany na podstawie wniosków lekarzy. Dodatkowo, badanie obejmowało ośrodki monitorujące pacjentów z około połowy terytorium kraju, zatem analiza nie odzwierciedla w pełni występowania mutacji związanych z opornością na INSTI w populacji ogólnej, jednak do tej pory pozostaje największą polską kohortą. Niemożliwe było także potwierdzenie, czy wszyscy pacjenci faktycznie nie przyjmowali nigdy leków cART, ponieważ informacje te były

przekazywane przez pacjentów.

Podsumowując, częstość pierwotnej oporności na inhibitory integrazy pozostaje niska, z wysokim odsetkiem polimorfizmu E157Q, który częściej występuje w polskiej populacji w porównaniu do innych krajów i jest pierwotnie częściej obserwowany wśród kobiet i osób przyjmujących narkotyki drogą dożylną. Na przestrzeni lat częstość mniejszościowych mutacji systematycznie spada, a ich klastrowanie jest rzadsze w porównaniu do poprzednich polskich badań. Należy podkreślić istotną zmianę w rozkładzie subtypów w Polsce, sub-subtyp A6 jest coraz częstszy, a ponieważ jest związany z mutacjami w pozycji L74, może mieć potencjalny związek z obniżoną wrażliwością na kabotegrawir. Mimo zmienności rozkładu subtypów, mutacje kluczowe, które w znaczący sposób wpływają na przenoszoną oporność na INSTI, w dalszym ciągu występują sporadycznie.

7. PODSUMOWANIE I WNIOSKI

7.1. Podsumowanie

- Mutacje związane z opornością na dorawirynę były rzadko obserwowane u polskich pacjentów (1,6%). Wśród osób, które nie rozpoczęły leczenia antyretrowirusowego, 99,3% wykazywało pełną wrażliwość na DOR, podczas gdy u pacjentów leczonych było to 90,5%. Mutacje determinujące oporność na dorawirynę wśród osób dotychczas nieleczonych były mniej powszechne w porównaniu z wariantami związanymi z opornością na newirapinę, ryłpiwirynę oraz efawirenz. U osób poddanych terapii ART mutacje obniżające wrażliwość na DOR były rzadsze w porównaniu do wariantów związanych z opornością na leki pierwszej generacji, EFV i NVP. Ponieważ w obu grupach badanych zanotowano niższą częstość oporności na dorawirynę w odniesieniu do innych leków NNRTI, stosowanie dorawiryny u pacjentów nieleczonych jest uzasadnione biorąc pod uwagę bardzo niski odsetek lekooporności (0,7%). W przypadku osób leczonych DOR stanowi atrakcyjną opcję terapeutyczną dzięki wyższej barierze genetycznej w porównaniu do pozostałych NNRTI. Korzystny profil oporności sugeruje, że stosowanie dorawiryny w pierwszorazowym schemacie terapii „rapid” nie wymaga wykonywania genotypowania przed rozpoczęciem leczenia antyretrowirusowego.
- Kilka czynników wirusologicznych potencjalnie wpływających na skuteczność długodziałającej terapii kabotegrawirem i ryłpiwiryną rzadko występowało jednocześnie (0,5% pacjentów), natomiast pojedynczy czynnik ryzyka był częsty (~20,0% badanych). Sub-subtyp A1/A6 obserwowany był u 11,8% pacjentów nieleczonych i 6,1% leczonych antyretrowirusowo. Oporność na ryłpiwirynę była częściej wykrywana u pacjentów leczonych (14,6% vs 5,9%) i była głównie związana z obecnością mutacji E138A. Uwzględniając oporność na kabotegrawir, przynajmniej dwa z trzech czynników występowały u mniej niż 5,0% pacjentów, a wszystkie trzy zidentyfikowano u jednego pacjenta leczonego (0,4%). Pomimo znacznej częstości sub-subtypu A1/A6 lub CAB/RPV RAMs analizowanych osobno, połączenie co najmniej dwóch czynników związanych z niepowodzeniem terapii CAB/RPV LAI pozostaje rzadkie.
- Mutacje związane z opornością na inhibitory integrazy występowały u 15,3% pacjentów, którzy nie byli dotychczas leczeni antyretrowirusowo. Należy jednak podkreślić, że kluczowe mutacje, które w znaczącym stopniu wpływają na lekooporność, obserwowane były jedynie u 0,5% badanych. Najczęściej wykrywanym wariantem był polimorfizm E157Q, który jest istotnie częściej obserwowany w populacji polskiej, szczególnie wśród

osób z subtypem B, kobiet i osób przyjmujących narkotyki drogą dożylną. Analiza częstości mutacji (głównie mniejszościowych) na przestrzeni lat wykazała zauważalną tendencję spadkową, zwłaszcza w grupie zakażeń drogą heteroseksualną. Obecność mutacji związanych z pierwotną opornością jest rzadsza, nie zanotowano obecności znaczących klastrow zawierających mutacje, które obserwowane były w poprzednich polskich pracach. Istotnym zjawiskiem jest systematyczny wzrost częstości sub-subtypu A6, przy jednoczesnym spadku częstości subtypu B, co może mieć konsekwencje dla oporności na LAI CAB/RPV z powodu polimorfizmu w pozycji L74.

7.2. Wnioski

- Mutacje związane z opornością na dorawirynę występowały rzadko oraz były mniej powszechne w porównaniu do wariantów związanych z opornością na inne nienukleozydowe inhibitory odwrotnej transkryptazy. Dzięki korzystnemu profilowi oporności oraz wysokiej barierze genetycznej dorawiryna pozostaje atrakcyjną opcją terapeutyczną.
- Obecność pojedynczego czynnika związanego z niepowodzeniem leczenia długodziałającej terapii kabotegrawirem i rylpiwiryną jest powszechna, jednak ze względu na rzadkie występowanie czynników w kombinacji, ryzyko niepowodzenia wirusologicznego terapii jest niskie. Biorąc pod uwagę wysoką częstość występowania wariantu A6 w Polsce, monitorowanie lekooporności powinno być kontynuowane, aby obniżyć ryzyko niepowodzenia leczenia w kontekście długotrwałej ekspozycji na LAI.
- Pomimo zmieniającego się rozkładu subtypów, kluczowe mutacje związane z opornością na INSTI pozostają rzadkie, a częstość mniejszościowych mutacji wykazuje tendencję spadkową, nie obserwuje się również znaczącego klastrowania mutacji. Jednakże, monitorowanie wzorców molekularnych pozostaje kluczowe z perspektywy optymalnego wykorzystania inhibitorów integrazy, zwłaszcza przy rozszerzonym wdrażaniu długodziałającego kabotegrawiru.

8. STRESZCZENIE

8.1. Wstęp

Za epidemię wirusa HIV w Polsce odpowiada głównie subtyp B, jednak w ostatnich latach obserwuje się zmianę w rozkładzie subtypów, z tendencją wzrostową częstości sub-subtypu A6, co w dużej mierze wynika z migracji z Europy Wschodniej. Ponadto ważnym zagadnieniem pozostaje lekooporność, który jest zarówno przyczyną, jak i konsekwencją niepowodzenia terapii przeciwwirusowej. Aktualnie brakuje danych dotyczących częstości mutacji związanych z opornością na najnowsze leki antyretrowirusowe, obejmujących dużą kohortę pacjentów dotychczas nieleczonych oraz poddanych leczeniu. Celem pracy była ocena częstości mutacji związanych z lekoopornością oraz innych czynników mogących potencjalnie przyczynić się do niepowodzenia wirusologicznego nowych leków stosowanych w leczeniu zakażenia wirusem HIV-1: dorawiryny, długodziałającego kabotegrawiru i ryłpiwiryny oraz inhibitorów integrazy.

8.2. Materiały i metody

Grupa badana obejmowała osoby żyjące z wirusem HIV-1, dotychczas nieleczone antyretrowirusowo oraz pacjentów uprzednio leczonych. Materiał do badań stanowiła krew, z której wyizolowano HIV RNA za pomocą komercyjnych zestawów do izolacji. Następnie przeprowadzono sekwencjonowanie regionu proteazy, odwrotnej transkryptazy oraz integrazy wykorzystując dostępne zestawy komercyjne. W wyniku sekwencjonowania metodą Sangera uzyskano sekwencje PR/RT oraz INT, które poddano dalszej analizie. Internetowe algorytmy pozwoliły na określenie subtypu, natomiast do oceny lekooporności wykorzystano narzędzie Stanford HIV Drug Resistance Database. Klastrowanie mutacji związanych z opornością na leki oraz potwierdzenie subtypów wykonano przy użyciu analiz filogenetycznych. Uzyskane dane poddano analizie statystycznej.

8.3. Wyniki

Mutacje związane z opornością na dorawirynę były rzadko obserwowane u badanych pacjentów (1,6%). Wśród osób, które nie rozpoczęły leczenia antyretrowirusowego, 99,3% wykazywało pełną wrażliwość na DOR, podczas gdy u pacjentów leczonych było to 90,5%. W obu grupach badanych zanotowano niższą częstość oporności na dorawirynę w odniesieniu do innych leków NNRTI. W przypadku długodziałającej terapii kabotegrawirem i ryłpiwiryną obecność pojedynczego czynnika związanego z jej potencjalnym niepowodzeniem (sub-subtyp A1/A6 lub CAB/RPV RAMs) była powszechna (~ 20,0% badanych), jednak kombinacja kilku czynników predysponująca do niepowodzenia terapii występowała rzadko (0,5% pacjentów).

Mutacje związane z opornością na inhibitory integrazy obserwowano u 15,3% pacjentów, którzy nie byli dotychczas leczeni antyretrowirusowo, jednak kluczowe mutacje, które w znaczącym stopniu wpływają na lekooporność, występowały jedynie u 0,5% badanych. Analiza częstości mutacji (głównie mniejszościowych) na przestrzeni lat wykazała zauważalną tendencję spadkową, zwłaszcza w grupie zakażeń drogą heteroseksualną, ponadto nie obserwowano klastrowania się mutacji. Dodatkowo, w ostatnich latach zaobserwowano systematyczny wzrost częstości sub-subtypu A6.

8.4. Wnioski

Mutacje związane z opornością na dorawirynę występowały rzadko oraz były mniej powszechne w porównaniu do wariantów związanych z opornością na inne NNRTI. Dzięki korzystnemu profilowi oporności oraz wysokiej barierze genetycznej dorawiryna pozostaje atrakcyjną opcją terapeutyczną.

Obecność pojedynczego czynnika związanego z niepowodzeniem leczenia długodziałającej terapii kabotegrawirem i ryłpiwiryną jest powszechna, jednak ze względu na rzadkie występowanie czynników w kombinacji, ryzyko niepowodzenia wirusologicznego terapii CAB/RPV jest niskie.

Pomimo zmieniającego się rozkładu subtypów, kluczowe mutacje związane z opornością na INSTI pozostają rzadkie, a częstość mniejszościowych mutacji wykazuje tendencję spadkową, nie obserwuje się również znaczącego klastrowania mutacji. Biorąc jednak pod uwagę wysoką częstość występowania wariantu A6 w Polsce, monitorowanie wzorców molekularnych pozostaje kluczowe z perspektywy optymalnego wykorzystania inhibitorów integrazy, zwłaszcza przy rozszerzonym wdrażaniu długodziałającego kabotegrawiru.

9. SUMMARY

9.1. Introduction

The HIV epidemic in Poland is mainly associated with subtype B, but in recent years there has been a shift in the distribution of subtypes, with an increasing trend in the frequency of sub-subtype A6, largely due to migration from Eastern Europe. In addition, drug resistance, which is both a cause and a consequence of failure of antiviral therapy, remains an important issue. Currently, there is a lack of data on the frequency of mutations associated with resistance to the latest antiretroviral drugs, covering a large cohort of previously untreated and treated patients. The aim of this study was to assess the frequency of drug resistance-associated mutations and other factors that could potentially contribute to virologic failure of the new drugs: doravirine, long-acting cabotegravir and rylpivirine, and integrase inhibitors.

9.2. Materials and methods

The study group included people living with HIV-1, treatment-naïve and treatment-experienced. The study material was blood, from which HIV RNA was isolated using commercial isolation kits. Subsequently, sequencing of the protease, reverse transcriptase and integrase region was performed using available commercial kits. PR/RT and INT sequences were obtained through Sanger sequencing and subsequently analyzed. Online algorithms were used for subtyping, while the Stanford HIV Drug Resistance Database tool was used to assess drug resistance. Clustering of mutations associated with drug resistance and confirmation of subtypes were performed using phylogenetic analyses. The data obtained were subjected to statistical analysis.

9.3. Results

Mutations associated with doravirine resistance were rarely observed (1.6% patients). Among treatment-naïve patients, 99.3% showed full DOR susceptibility, compared with 90.5% in treatment-experienced patients. A lower incidence of doravirine resistance to other NNRTI drugs was noted in both study groups. For long-acting cabotegravir and rylpivirine therapy, the presence of a single factor associated with its potential failure (sub-subtype A1/A6 or CAB/RPV RAMs) was common (~ 20.0% of subjects), however a combination of several factors predisposing to treatment failure was rare (0.5% of patients). Mutations associated with INSTI resistance were observed in 15.3% of patients who had not previously received antiretroviral treatment, but major mutations were present in only 0.5% of subjects. Analysis of the frequency of mutations (mainly minor) over the years showed a noticeable decreasing trend, especially in the heterosexual route infection group. Additionally, no clustering of mutations

was observed. However, a systematic increase in the frequency of sub-subtype A6 has been noted in recent years.

9.4. Conclusions

Mutations associated with resistance to doravirine were rare and less common compared to variants associated with resistance to other NNRTIs. With its favorable resistance profile and high genetic barrier, doravirine remains an attractive therapeutic option.

The presence of a single agent associated with treatment failure of long-acting cabotegravir and rylpivirine therapy is common, but due to the rare occurrence of agents in combination, the risk of virologic failure of CAB/RPV therapy is low.

Despite the changing distribution of subtypes, major mutations associated with INSTI resistance remain rare, the frequency of minor mutations shows a declining trend, and no significant mutation clustering is observed. However, given the high prevalence of the A6 variant in Poland, monitoring of molecular patterns remains crucial from the perspective of optimal use of integrase inhibitors, especially with the expanded use of long-acting cabotegravir.

10. BIBLIOGRAFIA

1. Niedźwiedzka-Stadnik MA, Nowakowska-Radziwonka E; Zakład Epidemiologii Chorób Zakaźnych i Nadzoru. Zakażenia HIV i zachorowania na AIDS w Polsce w 2023 roku. Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego PZH - Państwowy Instytut Badawczy; 2023. Dostępny online: https://wwwold.pzh.gov.pl/oldpage/epimeld/hiv_aids/index.htm. Dostęp 15.10.2024
2. Rosinska M. Current trends in HIV/ AIDS epidemiology in Poland, 1999 – 2004. *Euro Surveill.* 2006;11(4). <https://doi.org/10.2807/esm.11.04.00618-en>
3. Niedźwiedzka-Stadnik MA, Nowakowska-Radziwonka E, Kolenda A, Marzec-Bogusławska A. HIV infections and AIDS cases in Poland in 2021 year. Zakażenia HIV i zachorowania na AIDS w Polsce w 2021 roku. *Przegl Epidemiol.* 2024;77(4):429-448. doi:10.32394/pe/183578
4. Bbosa N, Kaleebu P, Ssemwanga D. HIV subtype diversity worldwide. *Curr Opin HIV AIDS.* 2019;14(3):153-160. doi:10.1097/COH.0000000000000534
5. Yamaguchi J, Vallari A, McArthur C, et al. Brief Report: Complete Genome Sequence of CG-0018a-01 Establishes HIV-1 Subtype L. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2020;83(3):319-322. doi:10.1097/QAI.0000000000002246
6. Mendes Da Silva RK, Monteiro de Pina Araujo II, Venegas Maciera K, Gonçalves Morgado M, Lindenmeyer Guimarães M. Genetic Characterization of a New HIV-1 Sub-Subtype A in Cabo Verde, Denominated A8. *Viruses.* 2021;13(6):1093. doi:10.3390/v13061093
7. Peeters M. Recombinant HIV sequences: Their role in the global epidemic. HIV Sequence Compendium 2000. Dostępny online: <http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/REVIEWS/PEETERS2000/Peeters.html>. Dostęp 05.10.2024.
8. Williams A, Menon S, Crowe M, et al. Geographic and Population Distributions of Human Immunodeficiency Virus (HIV)-1 and HIV-2 Circulating Subtypes: A Systematic Literature Review and Meta-analysis (2010-2021). *J Infect Dis.* 2023;228(11):1583-1591. doi:10.1093/infdis/jiad327
9. Serwin K, Urbańska A, Scheibe K, et al. Molecular epidemiology and HIV-1 variant evolution in Poland between 2015 and 2019. *Sci Rep.* 2021;11(1):16609. doi:10.1038/s41598-021-96125-w
10. Serwin K, Scheibe K, Urbańska A, et al. Phylodynamic evolution of HIV-1 A6 sub-subtype epidemics in Poland. *J Med Virol.* 2024;96(2):e29482. doi:10.1002/jmv.29482

11. van de Klundert MAA, Antonova A, Di Teodoro G, et al. Molecular Epidemiology of HIV-1 in Eastern Europe and Russia. *Viruses*. 2022;14(10):2099. doi:10.3390/v14102099
12. Cilento ME, Kirby KA, Sarafianos SG. Avoiding Drug Resistance in HIV Reverse Transcriptase. *Chem Rev*. 2021;121(6):3271-3296. doi:10.1021/acs.chemrev.0c00967
13. World Health Organization. Consolidated Guidelines on HIV Prevention, Testing, Treatment, Service Delivery and Monitoring: Recommendation for Public Health Approach; World Health Organization: Geneva, Switzerland, 2021. Dostępny online: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK572729>. Dostęp 18.10.2024
14. Gibas KM, Kelly SG, Arribas JR, et al. Two-drug regimens for HIV treatment. *Lancet HIV*. 2022;9(12):e868-e883. doi:10.1016/S2352-3018(22)00249-1
15. Lubber AD. Genetic barriers to resistance and impact on clinical response. *J Int AIDS Soc*. 2005;7(3):69. doi:10.1186/1758-2652-7-3-69
16. Johnson MM, Jones CE, Clark DN. The Effect of Treatment-Associated Mutations on HIV Replication and Transmission Cycles. *Viruses*. 2022;15(1):107. doi:10.3390/v15010107
17. Apetroaei MM, Velescu BŞ, Nedea MII, et al. The Phenomenon of Antiretroviral Drug Resistance in the Context of Human Immunodeficiency Virus Treatment: Dynamic and EverEvolving Subject Matter. *Biomedicines*. 2024;12(4):915. doi:10.3390/biomedicines12040915
18. Liu TF, Shafer RW. Web resources for HIV type 1 genotypic-resistance test interpretation. *Clin Infect Dis*. 2006;42(11):1608-1618. doi:10.1086/503914
19. Günthard HF, Calvez V, Paredes R, et al. Human Immunodeficiency Virus Drug Resistance: 2018 Recommendations of the International Antiviral Society-USA Panel. *Clin Infect Dis*. 2019;68(2):177-187. doi:10.1093/cid/ciy463
20. Brenner BG, Ibanescu RI, Hardy I, et al. Genotypic and phylogenetic insights on prevention of the spread of HIV-1 and drug resistance in “real-world” settings. *Viruses*. 2018;10: 10–25. <https://doi.org/10.3390/v10010010>
21. Sayyed SK, Quraishi M, Jobby R, et al. A computational overview of integrase strand transfer inhibitors (INSTIs) against emerging and evolving drug-resistant HIV-1 integrase mutants. *Arch Microbiol*. 2023;205(4):142. doi:10.1007/s00203-023-03461-8
22. Melikian GL, Rhee SY, Varghese V, et al. Non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor (NNRTI) cross-resistance: implications for preclinical evaluation of novel NNRTIs and clinical genotypic resistance testing. *J Antimicrob Chemother*. 2014;69(1):12-20. doi:10.1093/jac/dkt316

23. Orkin C, Squires KE, Molina JM, et al. Doravirine/Lamivudine/Tenofovir Disoproxil Fumarate is Non-inferior to Efavirenz/Emtricitabine/Tenofovir Disoproxil Fumarate in Treatment-naive Adults With Human Immunodeficiency Virus-1 Infection: Week 48 Results of the DRIVE-AHEAD Trial. *Clin Infect Dis.* 2019;68(4):535-544. doi:10.1093/cid/ciy540
24. Rhee SY, Grant PM, Tzou PL, et al. A systematic review of the genetic mechanisms of dolutegravir resistance. *J Antimicrob Chemother.* 2019;74(11):3135-3149. doi:10.1093/jac/dkz256
25. Kirichenko A, Lapovok I, Baryshev P, et al. Genetic Features of HIV-1 Integrase Subtype A6 Predominant in Russia and Predicted Susceptibility to INSTIs. *Viruses.* 2020;12(8):838. doi:10.3390/v12080838
26. Bertagnolio S, Hermans L, Jordan MR, et al. Clinical Impact of Pretreatment Human Immunodeficiency Virus Drug Resistance in People Initiating Nonnucleoside Reverse Transcriptase Inhibitor-Containing Antiretroviral Therapy: A Systematic Review and Meta-analysis. *J Infect Dis.* 2021;224(3):377-388. doi:10.1093/infdis/jiaa683
27. Parczewski M, Witak-Jedra M, Maciejewska K, et al. Time trends in HIV-1 transmitted drug resistance mutation frequency in Poland. *J Int AIDS Soc.* 2014;17(4 Suppl 3):19753. doi:10.7448/IAS.17.4.19753
28. Parczewski M, Leszczyszyn-Pynka M, Witak-Jędra M, et al. Transmitted HIV drug resistance in antiretroviral-treatment-naive patients from Poland differs by transmission category and subtype. *J Antimicrob Chemother.* 2015;70(1):233-242. doi:10.1093/jac/dku372
29. Parczewski M, Leszczyszyn-Pynka M, Urbańska A. Differences in the integrase and reverse transcriptase transmitted resistance patterns in Northern Poland. *Infect Genet Evol.* 2017;49:122-129. doi:10.1016/j.meegid.2016.12.019
30. U.S. Food & Drug Administration. FDA Approves Cabenuva and Vocabria for the Treatment of HIV-1 Infection 2021. Dostępny online: <https://www.fda.gov/drugs/human-immunodeficiency-virus-hiv/fda-approves-cabenuva-and-vocabria-treatment-hiv-1-infection>. Dostęp 12.10.2024.
31. Mejías-Trueba M, Gutierrez-Valencia A, Llaves-Flores S, et al. Long-term effectiveness, safety, and tolerability of doravirine in antiretroviral-experienced people with HIV in real life. *Microbiol Spectr.* 2024;12(8):e0065424. doi:10.1128/spectrum.00654-24
32. Colombier MA, Molina JM. Doravirine: a review. *Curr Opin HIV AIDS.* 2018;13(4):308-314. doi:10.1097/COH.0000000000000471

33. Iannone V, Farinacci D, D'Angelillo A, et al. Cardiovascular Disease Risk in a Cohort of Virologically Suppressed People Living with HIV Switching to Doravirine: Preliminary Data from the Real Life. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2022;38(11):878-880. doi:10.1089/AID.2022.0050
34. Molina JM, Squires K, Sax PE, et al. Doravirine versus ritonavir-boosted darunavir in antiretroviral-naive adults with HIV-1 (DRIVE-FORWARD): 96-week results of a randomised, double-blind, non-inferiority, phase 3 trial. *Lancet HIV*. 2020;7(1):e16-e26. doi:10.1016/S2352-3018(19)30336-4
35. Wensing AM, Calvez V, Ceccherini-Silberstein F, et al. 2019 update of the drug resistance mutations in HIV-1. *Top Antivir Med*. 2019;27(3):111–121.
36. Lai MT, Munshi V, Lu M, et al. Mechanistic Study of Common Non-Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitor-Resistant Mutations with K103N and Y181C Substitutions. *Viruses*. 2016;8(10):263. doi:10.3390/v8100263
37. Lai MT, Feng M, Falgout JP, et al. In vitro characterization of MK-1439, a novel HIV-1 nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;58(3):1652-1663. doi:10.1128/AAC.02403-13
38. Steegen K, Moorhouse M, Wensing AM, Venter WD, Hans L. Is there a role for doravirine in African HIV treatment programmes? A large observational resistance study in South Africa. *J Int AIDS Soc*. 2021;24(5):e25706. doi:10.1002/jia2.25706
39. Molina JM, Squires K, Sax PE, et al. Doravirine versus ritonavir-boosted darunavir in antiretroviral-naive adults with HIV-1 (DRIVE-FORWARD): 48-week results of a randomised, double-blind, phase 3, non-inferiority trial. *Lancet HIV*. 2018;5(5):e211-e220. doi:10.1016/S2352-3018(18)30021-3
40. Soulie C, Santoro MM, Charpentier C, et al. Rare occurrence of doravirine resistance-associated mutations in HIV-1-infected treatment-naive patients. *J Antimicrob Chemother*. 2019;74(3):614-617. doi:10.1093/jac/dky464
41. Soulie C, Santoro MM, Storto A, et al. Prevalence of doravirine-associated resistance mutations in HIV-1-infected antiretroviral-experienced patients from two large databases in France and Italy. *J Antimicrob Chemother*. 2020;75(4):1026-1030. doi:10.1093/jac/dkz553
42. Altice F, Evuarherhe O, Shina S, Carter G, Beaubrun AC. Adherence to HIV treatment regimens: systematic literature review and meta-analysis. *Patient Prefer Adherence*. 2019;13:475-490. doi:10.2147/PPA.S192735

43. Bares SH, Scarsi KK. A new paradigm for antiretroviral delivery: long-acting cabotegravir and rilpivirine for the treatment and prevention of HIV. *Curr Opin HIV AIDS*. 2022;17(1):22-31. doi:10.1097/COH.0000000000000708
44. Orkin C, Oka S, Philibert P, et al. Long-acting cabotegravir plus rilpivirine for treatment in adults with HIV-1 infection: 96-week results of the randomised, open-label, phase 3 FLAIR study [published correction appears in *Lancet HIV*. 2021 Dec;8(12):e734. doi: 10.1016/S2352-3018(21)00188-0]. *Lancet HIV*. 2021;8(4):e185-e196. doi:10.1016/S2352-3018(20)30340-4
45. Swindells S, Lutz T, Van Zyl L, et al. Week 96 extension results of a Phase 3 study evaluating long-acting cabotegravir with rilpivirine for HIV-1 treatment. *AIDS*. 2022;36(2):185-194. doi:10.1097/QAD.0000000000003025
46. Overton ET, Richmond G, Rizzardini G, et al. Long-Acting Cabotegravir and Rilpivirine Dosed Every 2 Months in Adults With Human Immunodeficiency Virus 1 Type 1 Infection: 152-Week Results From ATLAS-2M, a Randomized, Open-Label, Phase 3b, Noninferiority Study. *Clin Infect Dis*. 2023;76(9):1646-1654. doi:10.1093/cid/ciad020
47. European medicines agency validates ViiV healthcare's marketing authorisation application for cabotegravir long-acting injectable for HIV prevention. *ViiV Healthcare*. 2022. Oct 28. Dostępny online: <https://viivhealthcare.com/hiv-news-and-media/news/press-releases/2022/october/european-medicines-agency-validates-viiv-healthcare/#5>. Dostęp 12.10.2024
48. Cutrell AG, Schapiro JM, Perno CF, et al. Exploring predictors of HIV-1 virologic failure to long-acting cabotegravir and rilpivirine: a multivariable analysis. *AIDS*. 2021;35(9):1333-1342. doi:10.1097/QAD.0000000000002883
49. Duran Ramirez JJ, Ballouz T, Nguyen H, et al. Increasing Frequency and Transmission of HIV-1 Non-B Subtypes Among Men Who Have Sex With Men in the Swiss HIV Cohort Study. *J Infect Dis*. 2022;225(2):306-316. doi:10.1093/infdis/jiab360
50. Hanke K, Faria NR, Kühnert D, et al. Reconstruction of the Genetic History and the Current Spread of HIV-1 Subtype A in Germany. *J Virol*. 2019;93(12):e02238-18. doi:10.1128/JVI.02238-18
51. Parczewski M, Urbańska A, Maciejewska K, Witak-Jędra M, Leszczyszyn-Pynka M. Transmitted drug resistance to rilpivirine among antiretroviral-naïve patients living with HIV from northern Poland. *J Int AIDS Soc*. 2014;17(1):18929. doi:10.7448/IAS.17.1.18929

52. Parczewski M, Sulkowska E, Urbańska A, et al. Transmitted HIV drug resistance and subtype patterns among blood donors in Poland. *Sci Rep.* 2021;11(1):12734. doi:10.1038/s41598-021-92210-2
53. Machnowska P, Meixenberger K, Schmidt D, et al. Prevalence and persistence of transmitted drug resistance mutations in the German HIV-1 Seroconverter Study Cohort. *PLoS One.* 2019;14(1):e0209605. doi:10.1371/journal.pone.0209605
54. Raffi F, Jaeger H, Quiros-Roldan E, et al. Once-daily dolutegravir versus twice-daily raltegravir in antiretroviral-naïve adults with HIV-1 infection (SPRING-2 study): 96 week results from a randomised, double-blind, non-inferiority trial. *Lancet Infect Dis.* 2013;13(11):927-935. doi:10.1016/S1473-3099(13)70257-3
55. Molina JM, Clotet B, van Lunzen J, et al. Once-daily dolutegravir is superior to once-daily darunavir/ritonavir in treatment-naïve HIV-1-positive individuals: 96 week results from FLAMINGO. *J Int AIDS Soc.* 2014;17(4 Suppl 3):19490. doi:10.7448/IAS.17.4.19490
56. Viani RM, Alvero C, Fenton T, et al. Safety, Pharmacokinetics and Efficacy of Dolutegravir in Treatment-experienced HIV-1 Infected Adolescents: Forty-eight-week Results from IMPAACT P1093. *Pediatr Infect Dis J.* 2015;34(11):1207-1213. doi:10.1097/INF.0000000000000848
57. Brooks KM, Sherman EM, Egelund EF, et al. Integrase Inhibitors: After 10 Years of Experience, Is the Best Yet to Come?. *Pharmacotherapy.* 2019;39(5):576-598. doi:10.1002/phar.2246
58. Sichtig N, Sierra S, Kaiser R, et al. Evolution of raltegravir resistance during therapy. *J Antimicrob Chemother.* 2009;64(1):25-32. doi:10.1093/jac/dkp153
59. Abram ME, Hluhanich RM, Goodman DD, et al. Impact of primary elvitegravir resistance-associated mutations in HIV-1 integrase on drug susceptibility and viral replication fitness. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013;57(6):2654-2663. doi:10.1128/AAC.02568-12
60. Blanco JL, Varghese V, Rhee SY, Gatell JM, Shafer RW. HIV-1 integrase inhibitor resistance and its clinical implications. *J Infect Dis.* 2011;203(9):1204-1214. doi:10.1093/infdis/jir025
61. Tsiang M, Jones GS, Goldsmith J, et al. Antiviral Activity of Bictegravir (GS-9883), a Novel Potent HIV-1 Integrase Strand Transfer Inhibitor with an Improved Resistance Profile. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016;60(12):7086-7097. doi:10.1128/AAC.01474-16

62. van Wyk J, Ajana F, Bisshop F, et al. Efficacy and Safety of Switching to Dolutegravir/Lamivudine Fixed-Dose 2-Drug Regimen vs Continuing a Tenofovir Alafenamide-Based 3- or 4-Drug Regimen for Maintenance of Virologic Suppression in Adults Living With Human Immunodeficiency Virus Type 1: Phase 3, Randomized, Noninferiority TANGO Study. *Clin Infect Dis.* 2020;71(8):1920-1929. doi:10.1093/cid/ciz1243
63. Wohl DA, Yazdanpanah Y, Baumgarten A, et al. Bictegravir combined with emtricitabine and tenofovir alafenamide versus dolutegravir, abacavir, and lamivudine for initial treatment of HIV-1 infection: week 96 results from a randomised, double-blind, multicentre, phase 3, non-inferiority trial. *Lancet HIV.* 2019;6(6):e355-e363. doi:10.1016/S2352-3018(19)30077-3
64. HIV drug resistance: brief report 2024. Geneva: World Health Organization; 2024. Dostępny online: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240086319>.
Dostęp 17.10.2024
65. Landovitz RJ, Hanscom BS, Clement ME, et al. Efficacy and safety of long-acting cabotegravir compared with daily oral tenofovir disoproxil fumarate plus emtricitabine to prevent HIV infection in cisgender men and transgender women who have sex with men 1 year after study unblinding: a secondary analysis of the phase 2b and 3 HPTN 083 randomised controlled trial. *Lancet HIV.* 2023;10(12):e767-e778. doi:10.1016/S2352-3018(23)00261-8
66. Orkin C, Schapiro JM, Perno CF, et al. Expanded Multivariable Models to Assist Patient Selection for Long-Acting Cabotegravir + Rilpivirine Treatment: Clinical Utility of a Combination of Patient, Drug Concentration, and Viral Factors Associated With Virologic Failure. *Clin Infect Dis.* 2023;77(10):1423-1431. doi:10.1093/cid/ciad370
67. Chen GJ, Cheng CY, Yang CJ, et al. Trends of pre-treatment drug resistance in antiretroviral-naïve people with HIV-1 in the era of second-generation integrase strand-transfer inhibitors in Taiwan [published correction appears in *J Antimicrob Chemother.* 2024 Jun 3;79(6):1471. doi: 10.1093/jac/dkae131]. *J Antimicrob Chemother.* 2024;79(5):1157-1163. doi:10.1093/jac/dkae086
68. Viñuela L, de Salazar A, Fuentes A, et al. Transmitted drug resistance to antiretroviral drugs in Spain during the period 2019-2021. *J Med Virol.* 2023;95(12):e29287. doi:10.1002/jmv.29287

69. de Salazar A, Viñuela L, Fuentes A, et al. Transmitted Drug Resistance to Integrase-Based First-Line Human Immunodeficiency Virus Antiretroviral Regimens in Mediterranean Europe. *Clin Infect Dis*. 2023;76(9):1628-1635. doi:10.1093/cid/ciac972
70. Van Laethem K, Schrooten Y, Covens K, et al. A genotypic assay for the amplification and sequencing of integrase from diverse HIV-1 group M subtypes. *J Virol Methods*. 2008;153(2):176-181. doi:10.1016/j.jviromet.2008.07.008
71. Reuman EC, Rhee SY, Holmes SP, Shafer RW. Constrained patterns of covariation and clustering of HIV-1 non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor resistance mutations. *J Antimicrob Chemother*. 2010;65(7):1477-1485. doi:10.1093/jac/dkq140 49
72. Zhang Z, Xu W, Koh YH, et al. A novel nonnucleoside analogue that inhibits human immunodeficiency virus type 1 isolates resistant to current nonnucleoside reverse transcriptase inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007;51(2):429-437. doi:10.1128/AAC.01032-06
73. Theys K, Camacho RJ, Gomes P, Vandamme AM, Rhee SY; Portuguese HIV-1 Resistance Study Group. Predicted residual activity of rilpivirine in HIV-1 infected patients failing therapy including NNRTIs efavirenz or nevirapine. *Clin Microbiol Infect*. 2015;21(6):607.e1-607.e6078. doi:10.1016/j.cmi.2015.02.011
74. HIV Drug Resistance Report 2019. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2019. Dostępny online: <https://www.who.int/publications/i/item/WHO-CDS-HIV-19.21>. Dostęp 20.10.2024
75. Parczewski M, Leszczyszyn-Pynka M, Bander D, Urbańska A, Stańczak G, Boroń-Kaczmarek A. Characteristics of HIV-1 non-B subtype infections in Northwest Poland. *J Med Virol*. 2010;82(8):1306-1313. doi:10.1002/jmv.21797
76. Parczewski M, Leszczyszyn-Pynka M, Witak-Jędra M, et al. Distribution and time trends of HIV-1 variants in Poland: Characteristics of non-B clades and recombinant viruses. *Infect Genet Evol*. 2016;39:232-240. doi:10.1016/j.meegid.2016.02.001
77. Charpentier C, Storto A, Soulié C, et al. Prevalence of genotypic baseline risk factors for cabotegravir+rilpivirine failure among ARV-naïve patients [published correction appears in *J Antimicrob Chemother*. 2021 Oct 11;76(11):3070. doi: 10.1093/jac/dkab295]. *J Antimicrob Chemother*. 2021;76(11):2983-2987. doi:10.1093/jac/dkab161
78. Parczewski, M., Bander, D., Urbańska, A. *et al.* HIV-1 integrase resistance among antiretroviral treatment naïve and experienced patients from Northwestern Poland. *BMC Infect Dis*. 2012;12:368. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-12-368>

79. Bailey AJ, Rhee SY, Shafer RW. Integrase Strand Transfer Inhibitor Resistance in Integrase Strand Transfer Inhibitor-Naive Persons. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2021;37(10):736-743. doi:10.1089/AID.2020.0261
80. Fiebig U, Altmann B, Hauser A, et al. Transmitted drug resistance and subtype patterns of viruses from reported new HIV diagnoses in Germany, 2017-2020. *BMC Infect Dis*. 2023;23(1):673. doi:10.1186/s12879-023-08649-3
81. Tzou PL, Rhee SY, Descamps D, et al. Integrase strand transfer inhibitor (INSTI)-resistance mutations for the surveillance of transmitted HIV-1 drug resistance. *J Antimicrob Chemother*. 2020;75(1):170-182. doi:10.1093/jac/dkz417
82. Rhee SY, Parkin N, Harrigan PR, Holmes S, Shafer RW. Genotypic correlates of resistance to the HIV-1 strand transfer integrase inhibitor cabotegravir. *Antiviral Res*. 2022;208:105427. doi:10.1016/j.antiviral.2022.105427
83. Ji H, Patterson A, Taylor T, et al. Prevalence of Primary Drug Resistance Against HIV-1 Integrase Inhibitors in Canada. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2018;78(1):e1-e3. doi:10.1097/QAI.0000000000001649
84. Engone-Ondo JD, Bignoumba M, Boundzanga Moussavou P, et al. HIV-1 non-B resistance mutations and natural polymorphisms to integrase strand transfer inhibitors in recently diagnosed patients in Gabon, Central Africa. *J Antimicrob Chemother*. 2022;77(7):2035-2037. doi:10.1093/jac/dkac134
85. Zhang WW, Cheung PK, Oliveira N, et al. Accumulation of Multiple Mutations In Vivo Confers Cross-Resistance to New and Existing Integrase Inhibitors. *J Infect Dis*. 2018;218(11):1773-1776. doi:10.1093/infdis/jiy428
86. Charpentier C, Malet I, Andre-Garnier E, et al. Phenotypic analysis of HIV-1 E157Q integrase polymorphism and impact on virological outcome in patients initiating an integrase inhibitor-based regimen. *J. Antimicrob. Chemother*. 2018;73:1039–1044. doi:10.1093/jac/dkx511
87. Charpentier C, Descamps D. Resistance to HIV Integrase Inhibitors: About R263K and E157Q Mutations. *Viruses*. 2018;10(1):41. doi:10.3390/v10010041
88. Saladini F, Giannini A, Boccuto A, Tiezzi D, Vicenti I, Zazzi M. The HIV-1 integrase E157Q polymorphism per se does not alter susceptibility to raltegravir and dolutegravir in vitro. *AIDS*. 2017;31(16):2307-2309. doi:10.1097/QAD.0000000000001616
89. Uno S, Gatanaga H, Hayashida T, et al. Virological outcomes of various first-line ART regimens in patients harbouring HIV-1 E157Q integrase polymorphism: a multicentre

retrospective study. *J Antimicrob Chemother.* 2023;78(12):2859-2868.
doi:10.1093/jac/dkad319

90. Palumbo PJ, Zhang Y, Fogel JM, et al. HIV drug resistance in persons who inject drugs enrolled in an HIV prevention trial in Indonesia, Ukraine, and Vietnam: HPTN 074. *PLoS One.* 2019;14(10):e0223829. doi:10.1371/journal.pone.0223829
91. Ambrosioni J, Rico JÁF, Nicolás D, et al. E157Q integrase strand-transfer inhibitor substitution in patients with acute/recent HIV infection. *AIDS.* 2019;33(10):1613-1617. doi:10.1097/QAD.0000000000002243



Original Article

Low prevalence of doravirine-associated resistance mutations among polish human immunodeficiency-1 (HIV-1)-infected patients

Antiviral Therapy
2021, Vol. 26(3-4-5) 69-78
© The Author(s) 2021
Article reuse guidelines:
sagepub.com/journals-permissions
DOI: 10.1177/13596535211043044
journals.sagepub.com/home/avt
SAGE

Kaja Scheibe¹, Anna Urbańska¹, Paweł Jakubowski², Maria Hlebowicz³,
Monika Bociąga-Jasik⁴, Aleksandra Raczyńska⁴, Aleksandra Szymczak⁵, Bartosz Szetela⁵,
Władysław Łojewski⁶, Miłosz Parczewski¹

¹Department of Infectious, Tropical Diseases and Immune Deficiency, Pomeranian Medical University in Szczecin, Szczecin, Poland

²Pomeranian Hospital, Gdańsk, Poland

³Department of Infectious Diseases, Medical University of Gdansk, Gdańsk, Poland

⁴Department of Infectious and Tropical Diseases, Jagiellonian University Medical College, Kraków, Poland

⁵Department of Infectious Diseases, Liver Diseases and Acquired Immune Deficiencies, Wrocław Medical University, Wrocław, Poland

⁶Department of Infectious Diseases, Regional Hospital in Zielona Góra, Zielona Góra, Poland

Abstract

Introduction: Doravirine (DOR) is a novel non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor (NNRTI) that retains activity against common NNRTI resistance mutations. In this study, we aimed to investigate the prevalence of DOR resistance mutations compared with that of resistance mutations for other NNRTIs among HIV-1-infected treatment-experienced and -naïve patients from Poland.

Methods: Resistance to DOR and other NNRTIs was assessed in two datasets: 1760 antiretroviral treatment-naïve HIV-1 patients and 200 treatment-experienced patients. All 1960 sequences were derived from the patients using bulk sequencing. For resistance analyses, Stanford HIV drug resistance database scores were used.

Results: Overall, DOR resistance was present in 32 patients (1.62%), of whom 13 (0.74%) were naïve and 19 (9.50%) were treatment-experienced. The most common DOR resistance mutations observed among the naïve patients were A98G and K101E (0.2% each), and those among cART-experienced patients were L100I (2.0%), K101E, V108I, H221Y, and P225H (1.5% each). Furthermore, among the naïve patients, less common resistance to DOR (0.7%) compared with that to nevirapine (NVP) (2.1%; $p = 0.0013$) and rilpivirine (5.40%; $p < 0.0001$) was observed. For sequences obtained from treatment-experienced patients, the frequency of resistance to DOR (9.5%) was lower than that for efavirenz (25.5%; $p < 0.0001$) and NVP (26.0%; $p < 0.0001$).

Conclusions: The frequency of transmitted drug resistance to DOR is low, allowing for effective treatment of antiretroviral treatment-naïve patients and rapid treatment initiation. In cART-experienced patients, this agent remains an attractive NNRTI option with a higher genetic barrier to resistance.

Keywords

doravirine resistance, doravirine mutations, non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor resistance, human immunodeficiency virus, antiretroviral

Introduction

Currently, human immunodeficiency virus (HIV) infections can be effectively controlled using an array of antiretroviral regimens [1]. Antiretroviral drugs effectively

Corresponding author:

Miłosz Parczewski, Department of Infectious, Tropical Diseases and Immune Deficiency, Pomeranian Medical University, Arkońska 4, Szczecin 71-455, Poland.
Email: mparczewski@yahoo.co.uk

reduce the viral load in blood serum to an undetectable level, which decreases the risk of disease progression and prevents HIV transmission [2,3].

In 2018, 86% (72–92%) of people who received treatment across 60 countries were reported to have suppressed viral loads. However, globally, it is estimated that only 53% (42–63%) of all people with HIV infection achieve this success [4]. Virological success rates differ from >90% for West and North European countries to ~73.1% in Southern Africa [5]. In Europe and Central Asia, the highest virologic efficacy antiretroviral treatment rates of almost 99% was recorded in Denmark, Monaco, Switzerland, and the United Kingdom, whereas the lowest of 40–60% was observed in Albania, Azerbaijan, Bulgaria, Kazakhstan, and Ukraine [6].

Therapeutic success can be hampered by viral drug resistance, which is both a cause and consequence of antiretroviral therapy failure. Studies have estimated the prevalence of acquired and transmitted drug resistance (TDR) in naïve patients [7–10] as approximately 10% in low- and middle-income countries (LMICs) (due to late introduction and low availability of cART-combined antiretroviral therapy) [11,12]. Increasing frequency of TDR to first-line agents is especially important in the context of non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTIs), which are commonly used for therapy initiation, especially in LMICs [11,13,14]. Additionally, resistance mutations develop in 70–80% of patients with virological failure [15], with NNRTI resistance frequently observed in 50–97% of patients failing this drug class [11,16,17].

Non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor-based therapies have long been associated with low genetic barrier to antiretroviral drug resistance with cross-resistance between first-generation NNRTIs such as efavirenz (EFV) and nevirapine (NVP). In antiretroviral treatment guidelines, susceptibility testing is recommended prior to NNRTI treatment initiation [18–21]. The major primary mutations known to affect NNRTI susceptibility include K103N/S, V106A/M, Y181C/I/V, Y188L/C/H, and G190A/S/E [22–24]. Each of these mutations causes intermediate or high resistance to NVP and EFV [25]. Additionally, Y181C/I/V and Y188L/C/H are associated with a 5-fold reduction in susceptibility to rilpivirine (RPV) [26–28].

Accessory mutations such as L100I, K101P, P225H, and M230L usually appear in conjunction with one of the primary NNRTI resistance mutations [29]. Sequences with multiple mutations, including K103N/L100I and K103N/P225H, are frequently observed [30,31]. To increase the NNRTI genetic barrier against resistance, novel drugs of this group have been developed against common NNRTI-resistant viruses (with mutations K101E, E138K, and Y181V). These drugs are suitable for single-daily dosing with improved safety profiles [32–34].

Doravirine (DOR) is an NNRTI most recently approved by the United States Food and Drug Administration in August 2018 and by the European Medicines Agency in November 2018 [35,36]. Efficacy studies showed similar efficacy for DOR (DRIVE-AHEAD, 77.5%; DRIVE-FORWARD, 73.0%), darunavir/ritonavir (66.0%), and EFV (73.6%) based on three drug regimen combinations [37–40]. DOR can be used as a TDF/3TC/DOR single tablet or separately with available NNRTIs. Additionally, DOR has no pre-treatment HIV load limitations, no food restrictions, a reduced number of drug–drug interactions, and a favorable neuropsychiatric profile compared with EFV. Compared with other NNRTIs, DOR retains activity against common NNRTI resistance mutations, including K103N, E138K, Y181C, and G190A [23,41,42]. To date, only few studies have published data on the prevalence of resistance to DOR, which ranged from 0.52% to 1.92% in antiretroviral treatment-naïve patients [37,39,43] and 5.60% (based on the ANRS algorithm) to 16.0% (based on the Stanford database) in treatment-experienced patients [44].

To address the knowledge gap in the frequency of DOR-associated mutations, we aimed to analyze the prevalence of DOR-associated mutations (and those associated with other NNRTIs) in a large dataset of antiretroviral treatment-naïve and -experienced patients with HIV-1 infection living in Poland.

Methods

Study groups and sequencing

The study included a dataset of 1960 sequences, of which 1760 were obtained from newly diagnosed antiretroviral treatment-naïve HIV-1 patients, linked to care in the years 2015–2019 at eight Polish centers (Białystok, Bydgoszcz, Chorzów, Gdańsk, Kraków, Szczecin, Wrocław, and Zielona Góra), and the other 200 were from treatment-experienced patients treated at the Department of Infectious, Tropical Diseases and Immune Deficiency in Szczecin, Poland. All the sequences were derived from Polish patients of Caucasian origin. Plasma samples from the treatment-naïve patients were collected at care entry (first visit at HIV-treatment center or during in-hospital stay) prior to introduction of antiretroviral treatment and shipped to the genotyping laboratory.

Human immunodeficiency virus RNA extraction and reverse transcriptase (RT) and protease (PR) genotyping were performed using a genotyping assay (Viroseq 2.8 or 2.9, Abbott Molecular, Abbott Park, Illinois, USA) according to the manufacturer's protocol. Amplicons were obtained using nested PCR and sequenced utilizing the standard BigDye™ technology on the ABI 3500 platform (Applied Biosystems, Foster City, CA). Sequencing was

performed in a quality-controlled clinical laboratory at the Department of Infectious, Tropical Diseases and Acquired Immune Deficiency, Pomeranian Medical University in Szczecin, Poland.

Subtyping was performed using genotyping software (REGA genotyping 3.0 tool; <http://dbpartners.stanford.edu:8080/RegaSubtyping/stanford-hiv/typingtool>) based on the obtained PR and RT sequences.

The analyzed data included sex, age at diagnosis (age at first positive-confirmation test), HIV load at care entry, CD4 lymphocyte count at diagnosis, and subtype.

Drug resistance interpretation

DOR resistance-associated mutations were divided into the following key resistance mutations: V106A/M, Y188FL, P225H, F227L, and Y318F (based on the Stanford HIV drug resistance database, <http://hivdb.stanford.edu>). A mutation with a score >10–59 was considered to indicate intermediate resistance, whereas a score >60 indicated complete resistance. Variants with scores ≤10 are not shown.

Additionally, the frequency of A98G, L100I, K101E, V108I, Y181I, and H221Y was also investigated owing to their low resistance to DOR. Furthermore, to compare with resistance to other NNRTIs, the following mutations were also assessed: K101H/P, K103N, E138A/G/K/Q, V179L, Y181C, Y188C, G190A, and K238T.

Statistical analysis

Statistical comparisons were performed using the χ^2 test for nominal variables. Continuous variables were analyzed using the Mann–Whitney U test for nonparametric statistics. Commercial software (Statistica™ 13.1, Statsoft, Warsaw, Poland) was used for the statistical calculations. Drug resistance in the treatment-experienced and -naïve groups was compared using Fisher's exact test in R statistical platform, version 4.0.3.

Results

Baseline characteristics of patients

Treatment-naïve patients. Most of the cART-unexposed patients were male ($n = 1541$; 87.6%) with a median age of 34 (interquartile range [IQR], 28–40) years. A total of 1524 patients were infected with subtype B (86.6%) and 236 with non-B (13.4%) variants. The second most common subtype was A ($n = 167$, 9.5%), followed by subtypes C ($n = 21$, 1.2%), D ($n = 14$, 0.8%), and F ($n = 4$, 0.2%). Circulating recombinant forms CRF01_AE and CRF02_AG were noted in 10 (0.6%) and 17 (1.0%) cases, respectively, and CRF12_BF and CRF47_BF in one case

(0.1%) each. One unique recombinant form (URF) of A/B was observed in the group. For all analyzed NNRTI resistance mutations, patients with high or intermediate resistance were notably older than individuals with complete susceptibility to these NNRTIs (Table 1). Additionally, drug resistance mutations (DRMs) for EFV, NVP, and RPV were more frequent among women than among men (4.1% vs. 1.1%, $p = 0.0005$; 4.6% vs. 1.6%, $p = 0.005$; and 8.2% vs. 5.0%, $p = 0.05$, respectively). Furthermore, the median CD4 lymphocyte count was lower among patients with RPV resistance (median, 344 [IQR, 77–524] cells/ μ L) than among patients without DRMs for RPV (median, 420.5 [IQR, 217.5–614] cells/ μ L).

Treatment-experienced patients. The mean patient age was 37 (IQR, 33–45) years, and most of them ($n = 123$; 61.5%) were male. A total of 151 patients were infected with subtype B (75.5%) and 49 with non-B (24.5%) variants. The second most common subtype was D ($n = 31$, 15.5%), followed by C ($n = 4$, 2.0%), A ($n = 3$, 1.5%), and G ($n = 3$, 1.5%). The remaining strains displayed a recombinant forms and were classified as follows: CRF01_AE ($n = 4$, 2.0%), CRF02_AG ($n = 2$, 1.0%), and CRF12_BF ($n = 1$, 0.5%), with one A/G ($n = 1$, 0.5%) URF. Patients with high or intermediate resistance to etravirine (ETR) were notably older than individuals with complete susceptibility to this agent ($p = 0.02$). Treatment-experienced patients with viral load ≥ 5 -log copies/mL were more resistant to ETR than those with HIV-RNA < 5-log copies/mL ($p = 0.02$) (Table 2). Median CD4 lymphocyte count was lower among patients with DOR, EFV, NVP, and ETR resistance mutations (median: 95.5 [IQR, 25–160], 119 [26–367], 119 [26–367], and 51 [23–121], respectively) than among patients without DRMs for these antiretrovirals. There were no other statistically significant differences in gender or subtype distribution for the resistance mutations.

Prevalence of NNRTI DRMs, including DOR

Overall, resistance to any NNRTI was detected in 165 patients (8.42%), of whom 105 (5.97%) were treatment-naïve and 60 (30.0%), treatment-experienced. DOR resistance (at least one DOR DRM) in the total dataset was detected in 32 (1.62%) individuals, of whom 13 (0.74%) were treatment-naïve and 19 (9.50%) treatment-experienced.

The number of DOR resistance sequences with one, two, three, or four mutations among the treatment-naïve patients was four (0.23%), six (0.34%), two (0.11%), and one (0.06%), respectively (Supplementary Table 1). For cART-experienced patients, the numbers were one (0.50%), five (2.50%), nine (4.50%), and three (1.50%), respectively. Notably, one (0.50%) treatment-experienced patient had five mutations (Supplementary Table 2).

Table I. Baseline characteristics for cART-unexposed patients based on NNRTI susceptibility.

	Doravirine					Etravirine					Nevirapine					Raltegravir				
	High level	Intermediate	Susceptible	P value	P	High level	Intermediate	Susceptible	P value	P	High level	Intermediate	Susceptible	P value	P	High level	Intermediate	Susceptible	P value	P
	n (%)	n (%)	n (%)			n (%)	n (%)	n (%)			n (%)	n (%)	n (%)			n (%)	n (%)	n (%)		
Age, median years (IQR)*	44 (35-46)	34 (28-40)	0.016	40 (29-43)	44 (41-47)	34 (28-40)	0.0005	43 (37-48)	35 (29-44)	34 (28-40)	0.007	45 (41-48)	34 (30-43.5)	34 (28-40)	0.043	44.5 (41-45)	35 (30-44)	34 (28-40)	0.006	34 (28-40)
Gender, n (%)																				
Male	10 (0.6)	153 (0.4)	0.24	6 (0.4)	11 (0.7)	1524 (0.8)	0.0005	13 (0.8)	13 (0.8)	1515 (0.8)	0.005	3 (0.2)	19 (1.2)	1519 (0.8)	0.24	6 (0.4)	71 (4.6)	1444 (75.0)	0.05	1541 (87.6)
Female	3 (1.4)	21 (0.6)		5 (2.3)	4 (1.8)	210 (0.9)		6 (2.8)	4 (1.8)	207 (0.9)		0	1 (0.5)	210 (0.9)		0	18 (8.2)	20 (0.9)		217 (12.4)
Subtype*																				
Subtype B	11 (0.7)	1513 (0.4)	0.83	9 (0.6)	12 (0.8)	1503 (0.8)	0.67	15 (1.0)	16 (1.0)	1493 (0.8)	0.41	3 (0.2)	18 (1.2)	1503 (0.8)	0.71	6 (0.4)	74 (4.9)	1444 (74.7)	0.39	1524 (86.6)
Subtype non-B	2 (0.9)	23 (0.7)		2 (0.8)	3 (1.3)	23 (0.9)		4 (1.7)	1 (0.4)	23 (0.9)		0	2 (0.8)	23 (0.9)		0	15 (6.4)	22 (0.9)		236 (13.4)
Median HIV-RNA log copies/mL (IQR)	5.38 (3.8-4.8)	5.85 (4.1-5.2)	0.27	4.39 (4.27-5.20)	5.52 (3.78-5.55)	5.85 (4.13-5.24)	0.67	5.25 (4.27-5.38)	5.39 (4.38-5.49)	5.85 (4.13-5.24)	0.41	4.51 (3.78-4.77)	5.17 (4.72-5.46)	5.85 (4.13-5.23)	0.42	4.23 (3.27-4.51)	5.31 (4.2-5.38)	5.86 (4.13-5.23)	0.27	5.85 (4.1-5.2)
HIV-RNA > 5-log copies/mL, n (%)	2 (0.4)	474 (0.9)	0.32	2 (0.4)	6 (1.3)	468 (0.9)	0.20	5 (1.0)	6 (1.3)	465 (0.9)	0.26	0	6 (1.3)	470 (0.9)	0.83	0	29 (6.1)	447 (93.9)	0.11	476 (24.9)
HIV-RNA < 5-log copies/mL, n (%)	8 (0.9)	877 (99.1)		3 (0.3)	5 (0.6)	877 (99.1)		5 (0.6)	8 (0.9)	874 (98.5)		2 (0.2)	8 (0.9)	877 (98.9)		4 (0.5)	33 (7.7)	850 (95.8)		887 (65.1)
Median CD4 lymphocyte count at diagnosis, cells/μL (IQR)*	457.5 (233-709.5)	413 (211-611)	0.75	807 (807-807)	91 (31-830)	415 (212.5-610.5)	0.57	43 (30-807)	35 (140-589)	415 (213-611)	0.44	0	23 (76-527)	415 (213-612)	0.19	830 (830-830)	332 (77-470)	430.5 (217.5-614)	0.02	413 (211-611)

* Total group size varies based on data availability. Viral load data for 1363 cases, CD4 lymphocyte counts for 955 cases, and age for 1736 cases.

Table 2. Baseline characteristics for cART-exposed patients based on NNRTI susceptibility.

	Doravirine			Efavirenz			Nevirapine			Etravirine			Rilpivirine			Total, n (%)*	
	High level	Intermediate	Susceptible	High level	Intermediate	Susceptible	High level	Intermediate	Susceptible	High level	Intermediate	Susceptible	High level	Intermediate	Susceptible		
Age, median years (IQR) ^a	31 (30-34)	35.5 (33-45)	37 (33-45)	36 (32-38)	0.19 (33-45)	37 (33-45)	0.11 (32-40)	50 (30-50)	37 (33-45)	0.07 (36-55)	32 (30-37)	0.02 (33-45)	32 (30-37)	37.5 (31-50)	37 (33-45)	0.44 (33-46)	
Gender, n (%)																	
Male	5 (4.1)	10 (8.1)	108 (87.8)	0.10 (19.5)	7 (5.7)	92 (74.8)	0.90 (24.4)	2 (1.6)	91 (74.0)	0.99 (36.5)	5 (4.0)	13 (10.6)	105 (85.4)	0.15 (11.8)	13 (10.6)	99 (80.5)	0.81 (61.5)
Female	1 (1.3)	3 (3.9)	71 (94.8)	15 (19.5)	5 (6.5)	57 (74.0)	20 (26.0)	0	57 (74.0)	0	6 (7.8)	71 (92.2)	1 (1.3)	13 (16.9)	63 (81.8)	77 (38.5)	
Subtype																	
Subtype B	5 (3.3)	8 (5.3)	138 (91.4)	0.45 (17.9)	9 (5.9)	115 (76.2)	0.34 (23.8)	0	115 (76.2)	0.22 (33.3)	5 (3.3)	14 (9.3)	132 (97.4)	0.66 (11.7)	18 (11.9)	122 (80.6)	0.90 (75.5)
Subtype non-B	1 (2.0)	5 (10.2)	43 (87.8)	12 (24.5)	3 (6.1)	34 (69.4)	14 (28.6)	2 (4.1)	33 (67.3)	0	5 (10.2)	44 (89.8)	1 (2.1)	8 (16.3)	40 (81.6)	49 (24.5)	
Median HIV-RNA, log copies/mL (IQR) ^b	4.94 (4.1-5.0)	4.68 (3.1-5.1)	4.91 (3.3-4.6)	0.42 (3.37-4.93)	4.81 (3.37-4.93)	4.92 (3.16-4.84)	4.83 (3.4-4.96)	3.32 (3.32-3.32)	4.92 (3.16-4.84)	0.65 (3.35-4.87)	4.62 (3.35-4.87)	4.93 (3.36-5.14)	4.90 (3.38-4.77)	4.82 (3.10-5.00)	4.77 (3.70-4.80)	4.92 (3.29-4.85)	
HIV-RNA, < 5-log copies/mL, n (%)	2 (7.1)	3 (10.7)	23 (82.2)	0.09 (6.21-4)	3 (10.7)	19 (67.9)	0.36 (9.02-1)	0	19 (67.9)	0.41 (10.75-4)	0	7 (25.0)	21 (75.0)	3 (10.7)	5 (17.9)	20 (71.4)	0.18 (14.2)
HIV-RNA, < 5-log copies/mL, n (%)	3 (2.1)	8 (5.6)	131 (92.3)	26 (18.3)	8 (5.6)	108 (76.1)	34 (23.9)	1 (0.7)	107 (75.4)	2 (1.4)	11 (7.7)	129 (90.9)	6 (4.2)	19 (13.4)	117 (82.4)	142 (83.5)	
Median CD4 lymphocyte count at diagnosis, cells/μL (IQR) ^c	95.5 (77-121)	86 (72.5-274.5)	262 (51-497)	0.019 (30-350)	121 (34-367)	275 (65-524.5)	119 (26-367)	0	275 (65-524.5)	0.03 (30-350)	23 (15-84)	61 (24.5-151)	266 (59-508)	67.5 (20-128)	264 (42-390)	245.5 (55-497)	0.36 (49-85)

* Total group size varies based on data availability. Viral load data for 170 cases, CD4 lymphocyte counts for 167 cases, and age for 160 cases.

The number of sequences with DRMs for other NNRTIs is presented in the next section.

Considering all the mutations for both low and high resistance to DOR, the most prevalent among the antiretroviral-naïve patients were A98G and K101E ($n = 3$; 0.2% each), and among the antiretroviral-experienced patients, they were L100I ($n = 4$; 2.0%), K101E, V108I, H221Y, and P225H ($n = 3$; 1.5% each) (Figure 1).

The most common mutations associated with resistance to other NNRTIs in both the treatment-naïve and -experienced patients were E138A/G/K/Q (83 [4.7%] and 15 [7.5%] sequences, respectively), K103N (10 [0.6%] and 36 [18.0%] sequences, respectively), and Y181C/I (5 [0.3%] and 13 [6.5%] sequences, respectively). DRM frequencies for the individual NNRTIs, among antiretroviral-naïve and -experienced individuals, are shown in Supplementary Figures 1–4.

Comparison between number of patients with intermediate and high resistance to DOR and other NNRTIs

Among the antiretroviral-naïve patients, DRM to DOR was less common ($n = 13$; 0.7%) compared with mutations to NVP ($n = 36$; 2.1%; $p = 0.0013$), RPV ($n = 95$; 5.4%; $p < 0.0001$), and EFV ($p = 0.052$) (Figure 2). Additionally, frequency of RPV DRM in treatment-naïve patients was higher compared to EFV ($n = 26$; 1.5%; $p < 0.0001$), ETR ($n = 23$; 1.3%; $p < 0.0001$), and NVP ($p < 0.0001$). Among the treatment-experienced patients, the frequency of resistance mutations to DOR ($n = 19$; 9.5%) was lower than that for EFV ($n = 51$; 25.5%; $p < 0.0001$) and NVP ($n = 52$; 26.0%; $p < 0.0001$). In addition, resistance mutations for ETR ($n = 24$; 12.0%) were less frequent compared with

those for EFV ($p = 0.0001$) and NVP ($p < 0.0001$), and higher frequency of resistance to NVP than to RPV ($n = 38$; 19.0%; $p < 0.0001$) was observed.

Discussion

The data presented in this paper outline the frequency of DRMs associated with DOR compared with those for other NNRTIs among both treatment-naïve and -experienced individuals from Poland, in the years 2015–2019. This is the first Polish study on the frequency of DOR resistance, with the inclusion of a large dataset of sequences. Analyses were based on the Stanford HIV resistance database, as DOR resistance mutations were not included in the surveillance algorithm [45] and confirmed that the frequency of mutations reducing DOR susceptibility was exceptionally low (<2%), especially among treatment-naïve patients (0.74%), being 9.5% for treatment-experienced patients. This favorable resistance profile observed from real-world data confirms the possibility of rapidly introducing DOR as the initial antiretroviral regimen and eliminating the necessity of baseline genotyping prior to cART.

In treated patients, the occurrence of resistance to DOR is infrequent. In the DRIVE-FORWARD clinical trial that included 382 naïve patients, only two (0.52%) patients failed treatment owing to the emergence of NNRTI resistance mutations, with selection of the V106I/H221Y/F227C and V106A/P225Y/H variants [46]. Moreover, in the DRIVE-AHEAD study, among 364 patients, seven patients (1.92%) with protocol-defined virological failure had DOR resistance mutations (Y188L, Y318F, V106I+F227C, V106I+H221Y+F227C, F227C, V106A+P225H+Y318F, and V106M/T+F227C/

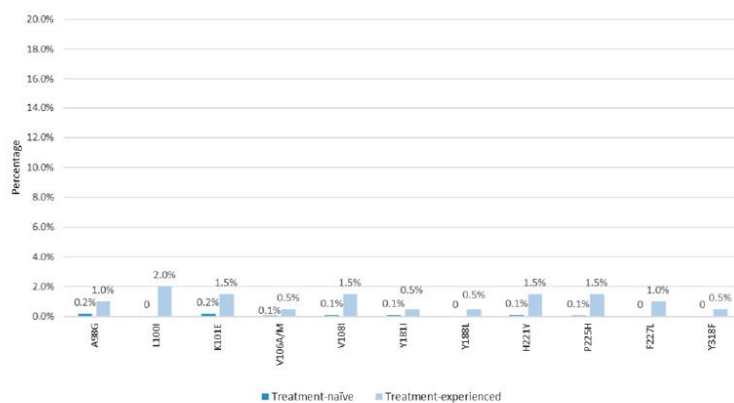


Figure 1. Frequency of doravirine resistance-associated mutations per codon position.

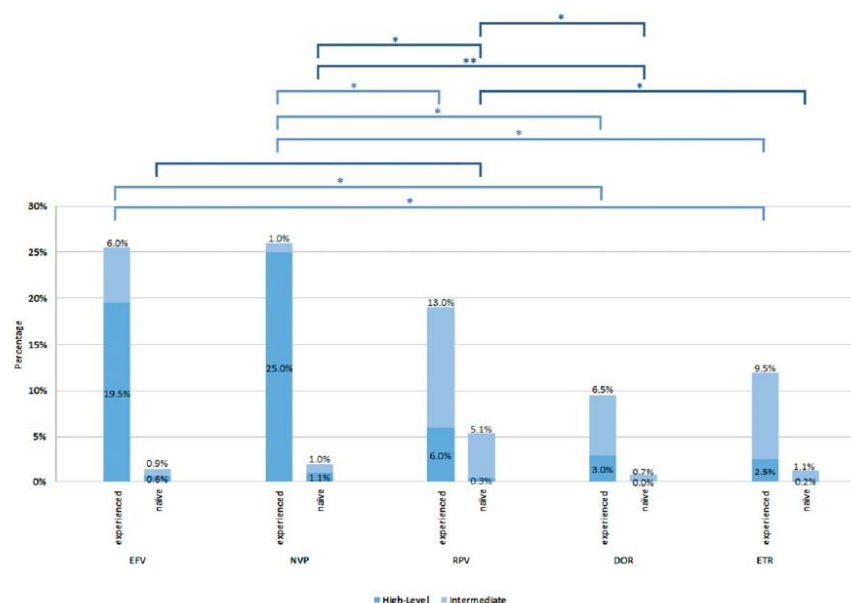


Figure 2. Comparison between number of patients with intermediate and high-level resistance to doravirine and other non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors. * $p < 0.0001$, ** $p = 0.001$.

R) [39]. Similar to the data shown in our study, these DOR resistance mutations were irregularly present with the most common V106A mutation in the DRIVE trials, present in only one (0.06%; V106A) treatment-experienced patient (the V106I mutation was present in 71 naïve [4.03%] and five cART-experienced patients [2.50%], but owing to its low scoring in the Stanford database, it was not analyzed in the current study).

Moreover, Soulie et al. (2018) reported that DOR resistance was present in 1.4% ($n = 142$) of 9764 treatment-naïve European patients (according to the 2017 ANRS algorithm; no data based on the Stanford database); this frequency is higher than that in our study (0.7%) [43]. The most common mutations reducing DOR susceptibility are also more frequent than those in our study (V108I, 0.6% vs 0.1%; Y188L and Y318F, 0.2% each vs no mutations in our study; and H221Y, 0.2% versus 0.1%). Comparing the resistance to individual NNRTIs, in our study, the treatment-naïve patients had higher frequency of resistance to RPV (5.4%) than to other NNRTIs owing to the presence of the E138A mutation, which reduces sensitivity to RPV by approximately 2-fold [47]. In the study by Soulie et al. [43], resistance to RPV was present in 9.9% of the patients.

In a different study by Soulie et al. [44] conducted on a dataset of 9199 sequences, among treatment-experienced

patients, the prevalence of sequences associated with DOR resistance was 16.0% ($n = 1468$; based on the Stanford algorithm), which is also higher than that in our study (9.5%). Among the treatment-experienced patients in our study, the mutation most commonly responsible for resistance to NVP (26.0%) and EFV (25.5%) was K103N, which causes high-level reduction in NVP and EFV susceptibility and does not affect responses to other NNRTIs [24,48,49]. However, studies have shown that up to 80% of patients who have failed EFV or NVP therapy develop NNRTI DRMs, which may impact the success of second-generation NNRTIs [50]. Moreover, the prevalence of resistance in people who restarted NVP and EFV after interrupting initial treatment was much higher (21%) than that in those who used them for the first time (8%) [11].

To conclude, DOR resistance mutations associated with virological failure were infrequent among antiretroviral treatment-naïve (99.3% of patients with complete DOR susceptibility) and -experienced (90.5% of sequences with DOR susceptibility) patients. Both groups also reported lower frequency of resistance to DOR than to other NNRTI drugs, which justifies the use of DOR in treatment-naïve groups and represents the attractive NNRTI option related to the higher genetic barrier to resistance in cART-experienced patients.

The limitation of this study is related to the fact that analysis of the DOR resistance mutations was based only on the Stanford HIV drug resistance database; as a new agent, it was not included in the resistance interpretation algorithms; also for the treatment-experienced group, we did not collect the full history of antiretroviral drug use—such analysis is in progress.

Declaration of conflicting interests

The author(s) declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

Funding

The author(s) disclosed receipt of the following financial support for the research, authorship, and/or publication of this article: The study was funded by the National Science Centre project UMO-2018/30/E/NZ6/00696

ORCID iD

Milosz Parczewski  <https://orcid.org/0000-0003-1869-1084>

Supplemental Material

Supplemental material for this article is available online.

References

1. Parczewski M, Siwak E, Leszczyszyn-Pynka M, et al. Meeting the WHO 90% target: antiretroviral treatment efficacy in Poland is associated with baseline clinical patient characteristics. *J Int AIDS Soc* 2017; **20**(1):21847. doi: 10.7448/IAS.20.1.21847.
2. INSIGHT START Study Group, Lundgren JD, Babiker AG, et al. Initiation of antiretroviral therapy in early asymptomatic HIV infection. *N Engl J Med* 2015; **373**(9):795–807. doi:10.1056/NEJMoa1506816N.
3. Cohen MS, Chen YQ, McCauley M, et al. Antiretroviral therapy for the prevention of HIV-1 transmission. *N Engl J Med* 2016; **375**(9):830–839. doi:10.1056/NEJMoa1600693.
4. Marsh K, Eaton JW, Mahy M, et al. Global, regional and country-level 90-90-90 estimates for 2018: assessing progress towards the 2020 target. *AIDS* 2019; **33**(Suppl 3): S213–S226. doi:10.1097/QAD.0000000000002355
5. Hermans LE, Carmona S, Nijhuis M, et al. Virological suppression and clinical management in response to viremia in South African HIV treatment program: a multicenter cohort study. *PLoS Med* 2020; **17**(2):e1003037. doi:10.1371/journal.pmed.1003037.
6. European Centre for Disease Prevention and Control. *Continuum of HIV care. Monitoring Implementation of the Dublin Declaration on Partnership to Fight HIV/AIDS in Europe and Central Asia: 2018 Progress Report*. Stockholm: ECDC; 2018.
7. Kassaye SG, Grossman Z, Balamane M, et al. Transmitted HIV drug resistance is high and longstanding in metropolitan Washington, DC. *Clin Infect Dis* 2016; **63**(6):836–843. doi: 10.1093/cid/ciw382.
8. Castor D, Low A, Evering T, et al. Transmitted drug resistance and phylogenetic relationships among acute and early HIV-1-infected individuals in New York City. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2012; **61**(1):1–8. doi:10.1097/QAI.0b013e31825a289b.
9. 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. doi:10.1371/journal.pone.0104474.
10. Baxter J, Dunn D, White E, et al. Global HIV-1 transmitted drug resistance in the INSIGHT strategic timing of antiretroviral treatment (START) trial. *HIV Med* 2015; **16**(Suppl 1):77–87. doi:10.1111/hiv.12236.
11. WHO, CDC, *The Global Fund. HIV Drug Resistance Report 2019*. <https://www.who.int/hiv/pub/drugresistance/hivdr-report-2019/en/>. Accessed 2020 Nov 25.
12. Hamers RL, Rinke de Wit TF, Holmes CB. HIV drug resistance in low-income and middle-income countries. *Lancet HIV* 2018; **5**(10):e588–e596. doi: 10.1016/S2352-3018(18)30173-5.
13. Rhee S-Y, Blanco JL, Jordan MR, et al. Geographic and temporal trends in the molecular epidemiology and genetic mechanisms of transmitted HIV-1 drug resistance: an individual-patient- and sequence-level meta-analysis. *PLoS Med* 2015; **12**:e1001810.
14. Gupta RK, Gregson J, Parkin N, et al. HIV-1 drug resistance before initiation or re-initiation of first-line antiretroviral therapy in low-income and middle-income countries: a systematic review and meta-regression analysis. *Lancet Infect Dis*. 2018; **18**:346–355.
15. Clutter DS, Jordan MR, Bertagnolio S, et al. HIV-1 drug resistance and resistance testing. *Infect Genet Evol* 2016; **46**: 292–307. doi:10.1016/j.meegid.2016.08.031.
16. TenoRes Study Group. Global epidemiology of drug resistance after failure of WHO recommended first-line regimens for adult HIV-1 infection: a multicentre retrospective cohort study [published correction appears in *Lancet Infect Dis* 2016; **16**(6):636. doi:10.1016/S1473-3099(15)00536-8.
17. Tien TV, Pho DC, Hong LT, et al. Antiretroviral drug resistance mutations among patients failing first-line treatment in Hanoi, Vietnam. *Infect Drug Resist* 2019; **12**:1237–1242. Published 2019 May 10. doi:10.2147/IDR.S196448.
18. Panel on Antiretroviral Guidelines for Adults and Adolescents. Guidelines for the use of antiretroviral agents in adults and adolescents with HIV. Department of health and human services. Available at <https://clinicalinfo.hiv.gov/sites/default/files/inline-files/AdultandAdolescentGL.pdf>. Accessed 2020 Nov 25.

19. Snedecor SJ, Khachatryan A, Nedrow K, et al. The prevalence of transmitted resistance to first-generation non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors and its potential economic impact in HIV-infected patients. *PLoS One Guidel Use Antiretroviral Agents Adults Adolescents HIV G-55* 2013; **8**(8):e72784. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23991151>.
20. Cohen CJ, Molina J-M, Cahn P, et al. Efficacy and safety of rilpivirine (TMC278) versus efavirenz at 48 weeks in treatment-naïve HIV-1-infected patients: pooled results from the phase 3 double-blind randomized ECHO and THRIVE Trials. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2012; **60**(1):33–42. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22343174>.
21. EACS. *Guidelines V 10.1 [Internet]* 2020. Available at: https://www.eacsociety.org/files/guidelines-10.1_5.pdf. Accessed 2020 Nov 25.
22. Sluis-Cremer N. The emerging profile of cross-resistance among the nonnucleoside HIV-1 reverse transcriptase inhibitors. *Viruses* 2014; **6**(8):2960–2973.
23. Wensing AM, Calvez V, Ceccherini-Silberstein F, et al. 2019 update of the drug resistance mutations in HIV-1. *Top Antivir Med* 2019; **27**(3):111–121.
24. Melikyan GL, Rhee S-Y, Varghese V, et al. Non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor (NNRTI) cross-resistance: implications for preclinical evaluation of novel NNRTIs and clinical genotypic resistance testing. *J Antimicrob Chemother* 2014; **69**(1):12–20.
25. Stanford HIV Drug Resistance Database. <https://hivdb.stanford.edu/dr-summary/resistance-notes/NNRTI/>. Accessed 2020 Nov 25.
26. Haddad M, Napolitano LA, Paquet AC, et al. *Mutation Y188L of HIV-1 Reverse Transcriptase Is Strongly Associated with Reduced Susceptibility to rilpivirine. Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections*, 2012.
27. Johnson BC, Pauly GT, Rai G, et al. A comparison of the ability of rilpivirine (TMC278) and selected analogues to inhibit clinically relevant HIV-1 reverse transcriptase mutants. *Retrovirology*, 2012.
28. Rimsky L, Vingerhoets J, Van Eygen V, et al. Genotypic and phenotypic characterization of HIV-1 isolates obtained from patients on rilpivirine therapy experiencing virologic failure in the phase 3 ECHO and THRIVE studies: 48-week analysis. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 2012.
29. Stanford HIV Drug Resistance Database. https://hivdb.stanford.edu/pages/documentPage/NNRTI_mutationClassification.html. Accessed 2020 Nov 25.
30. Koval CE, Dykes C, Wang J, et al. Relative replication fitness of efavirenz-resistant mutants of HIV-1: correlation with frequency during clinical therapy and evidence of compensation for the reduced fitness of K103N + L100I by the nucleoside resistance mutation L74V. *Virology* 2006; **353**(1):184–192. doi:10.1016/j.virol.2006.05.021.
31. Alcaro S, Alteri C, Artese A, et al. Docking analysis and resistance evaluation of clinically relevant mutations associated with the HIV-1 non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors nevirapine, efavirenz and etravirine. *Chem-MedChem* 2011; **6**(12):2203.
32. Khalilieh S, Yee KL, Sanchez R, et al. Clinical pharmacokinetics of the novel HIV-1 non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor doravirine: an assessment of the effect of patient characteristics and drug-drug interactions. *Clin Drug Investig* 2020; **40**(10):927–946. doi:10.1007/s40261-020-00934-2.
33. Feng M, Sachs NA, Xu M, et al. Doravirine suppresses common nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor-associated mutants at clinically relevant concentrations. *Antimicrob Agents Chemother* 2016; **60**:2241–2247.
34. Feng M, Wang D, Grobler JA, et al. In vitro resistance selection with doravirine (MK-1439), a novel nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor with distinct mutation development pathways. *Antimicrob Agents Chemother* 2015; **59**:590–598.
35. FDA. *Integrated Review for Pifeltro and Delstrigo Approval*. 2018. [Accessed November 20, 2020]. <https://www.fda.gov/media/128270/download>.
36. EMA. *Assessment Report for Delstrigo*. 2018. EMA/874672/2018. https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/delstrigo-epar-public-assessment-report_en.pdf. Accessed January 24, 2021.
37. Molina JM, Squires K, Sax PE, et al. Doravirine versus ritonavir-boosted darunavir in antiretroviral-naïve adults with HIV-1 (DRIVE-FORWARD): 48-week results of a randomised, double-blind, phase 3, non-inferiority trial. *Lancet HIV* 2018; **5**(5):e211–e220. doi: 10.1016/S2352-3018(18)30021-3.
38. Molina JM, Squires K, Sax PE, et al. DRIVE-FORWARD trial group. Doravirine versus ritonavir-boosted darunavir in antiretroviral-naïve adults with HIV-1 (DRIVE-FORWARD): 96-week results of a randomised, double-blind, non-inferiority, phase 3 trial. *Lancet HIV* 2020; **7**(1): e16–e26. doi: 10.1016/S2352-3018(19)30336-4.
39. Orkin C, Squires KE, Molina J-M, et al. DRIVE-AHEAD study group. doravirine/lamivudine/tenofovir disoproxil fumarate is non-inferior to efavirenz/emtricitabine/tenofovir disoproxil fumarate in treatment-naïve adults with human immunodeficiency virus-1 infection: week 48 results of the DRIVE-AHEAD trial. *Clin Infect Dis* 2019; **68**(4):535–544. doi: 10.1093/cid/ciy540.
40. Orkin C, Squires K, Molina JM, et al. 2018. Doravirine/lamivudine/tenofovir DF continues to be non-inferior to efavirenz/emtricitabine/tenofovir DF in treatment-naïve adults with HIV-1 infection: week 96 results of the DRIVE-AHEAD trial.
41. Lai MT, Munshi V, Lu M, et al. Mechanistic study of common non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor-resistant

- mutations with K103N and Y181C substitutions. *Viruses* 2016; **8**(10):263.
42. Lai M-T, Feng M, Falgoutet J-P, et al. In vitro characterization of MK-1439, a novel HIV-1 nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor. *Antimicrob Agents Chemother* 2014; **58**(3):1652–1663.
 43. Soulie C, Santoro MM, Charpentier C, et al. Rare occurrence of doravirine resistance-associated mutations in HIV-1-infected treatment-naïve patients. *J Antimicrob Chemother* 2019; **74**(3): 614–617. doi: [10.1093/jac/dky464](https://doi.org/10.1093/jac/dky464). PMID: 30476106.
 44. Soulie C, Santoro MM, Storto A, et al. Prevalence of doravirine-associated resistance mutations in HIV-1-infected antiretroviral-experienced patients from two large databases in France and Italy. *J Antimicrob Chemother* 2020; **75**(4): 1026–1030. doi: [10.1093/jac/dkz553](https://doi.org/10.1093/jac/dkz553). PMID: 31976534.
 45. Bennett DE, Camacho RJ, Otelea D, et al. Drug resistance mutations for surveillance of transmitted HIV-1 drug-resistance: 2009 update. *PLoS One* 2009; **4**(3):e4724. doi: [10.1371/journal.pone.0004724](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004724).
 46. Molina JM, Squires KE, Sax PE, et al. Doravirine (DOR) ver-sus ritonavir-boosted darunavir (DRV+r): 96-week results of the randomized, double-blind, phase 3 DRIVE-FORWARD Noninferiority trial. In: Paper presented at: 22nd international AIDS conference, Amsterdam, The Netherlands, July 23–27 2018.
 47. Haddad M, Napolitano LA, Paquet AC, et al. Impact of HIV-1 reverse transcriptase E138 mutations on rilpivirine drug susceptibility. [abstract 10.]. *Antivir Ther.* 2011; **16**(Suppl 1):A18.
 48. Reuman EC, Rhee SY, Holmes SP, et al. Constrained patterns of covariation and clustering of HIV-1 non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor resistance mutations. *J Antimicrob Chemother* 2010; **65**(7):1477
 49. Zhang Z, Xu W, Koh YH, et al. A novel nonnucleoside analogue that inhibits human immunodeficiency virus type 1 isolates resistant to current nonnucleoside reverse transcriptase inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother* 2007.
 50. Theys K, Camacho RJ, Gomes P, et al. Predicted residual activity of rilpivirine in HIV-1 infected patients failing therapy including NNRTIs efavirenz or nevirapine. *Clin Microbiol Infect* 2015; **21**(6):607. doi: [10.1016/j.cmi.2015.02.011](https://doi.org/10.1016/j.cmi.2015.02.011).



Contents lists available at ScienceDirect

Infection, Genetics and Evolution

journal homepage: www.elsevier.com/locate/meegid

Frequency of genotypic factors possibly associated with cabotegravir/rilpivirine failure in antiretroviral treatment-naïve and -experienced HIV-1-infected population

Kaja Scheibe^{*}, Anna Urbańska, Karol Serwin, Miłosz Parczewski

Pomeranian Medical University in Szczecin, Department of Infectious, Tropical Diseases and Immune Deficiency, Poland

ARTICLE INFO

Keywords:

Cabotegravir
Rilpivirine
HIV-1
Mutation
Resistance
Subtype A1/A6

ABSTRACT

Objectives: The long-acting injectable (LAI) cabotegravir (CAB) and rilpivirine (RPV) treatment offers important advantages over oral ART (antiretroviral therapy), however baseline factors possibly contributing to the CAB/RPV treatment failure were identified. The purpose of this study was to describe the frequency of virologic factors previously influencing efficacy of this treatment, namely RPV and CAB resistance-associated mutations (RAMs) and A1/A6 subtype among naïve and treatment-experienced HIV-1-infected patients from Poland.

Methods: The following datasets of HIV-1 sequences were analysed: 4809 protease and reverse transcriptase (PR/RT) sequences obtained from 4649 Polish Caucasian patients (4122 naïve and 687 non-naïve) supplemented with integrase (PR/RT/INT) sequences in 1217 cases (942 naïve and 275 non-naïve). Sub-subtypes A were assigned by phylogenetic methods. Major and minor CAB and RPV RAMs were determined according to the IAS-USA 2019 list, while minor RAMs were additionally defined based on the Stanford database algorithm.

Results: Subtype A1/A6 frequency ranged from 6.11% in ART failing cases with PR/RT sequences only, to 15.92% for the PR/RT/INT treatment-naïve dataset, while RPV RAMs were found in up to 5.89% of treatment-naïve and 14.56% of ART failing cases. Regardless treatment history, only <1% sequences had combination of two factors (RPV RAMs and A1/A6 subtype). Furthermore, CAB RAMs were found in 1.27% of treatment-naïve and 14.54% of experienced patients.

Conclusions: Despite notable frequency of subtype A1/A6 or CAB/RPV RAMs analysed separately, combination of at least two factors previously associated with failure or this treatment is rare. As subtype A1/A6 becomes more common across real-life cohorts continued subtyping and RAM screening will remain of key importance for LAI treatment implementation.

Sequence data from this article have been deposited in GenBank under accession numbers: GU906860, GU906864, GU906871-GU906874, JQ305750-JQ305791, KC409134-KC409222, KM057341-KM057362, KM283892-KM284490, KT340108-KT340205, MZ468643-MZ468894, MZ671788-MZ671823, OP298017-OP302727.

1. Introduction

In the era of oral ART, despite many benefits of two- and three-drug regimens, treatment fatigue may reduce the level of adherence, which may deteriorate clinical outcomes (Altice et al., 2019). Long-acting injectable antiretrovirals offer several advantages compared to

standard oral therapy - with less frequent use, well defined drug-drug interactions, and importantly, greater privacy and lower stigma, they seem to be an attractive option that may impact HIV treatment (Bares and Sears, 2022). The long-acting injectable cabotegravir and rilpivirine is the first available LAI treatment option, which may be administered every 4 or 8 weeks, with the efficacy and safety proven in the

Abbreviations: LAI, long-acting injectable; CAB, cabotegravir; RPV, rilpivirine; ART, antiretroviral therapy; PR, protease; RT, reverse transcriptase; RAM, resistance-associated mutation; INSTI, integrase strand-transfer inhibitor; NNRTI, non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor; HIV, human immunodeficiency virus; RNA, ribonucleic acid; PCR, polymerase chain reaction; PrEP, pre-exposure prophylaxis; TDF-FTC, tenofovir disoproxil fumarate - emtricitabine.

^{*} Corresponding author at: Pomeranian Medical University, Department of Infectious, Tropical Diseases and Immune Deficiency, Arkońska 4, 71-455 Szczecin, Poland.

E-mail address: kaja.scheibe@pum.edu.pl (K. Scheibe).

<https://doi.org/10.1016/j.meegid.2022.105358>

Received 25 April 2022; Received in revised form 29 August 2022; Accepted 30 August 2022

Available online 31 August 2022

1567-1348/© 2022 The Authors. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

ATLAS and FLAIR studies (Orkin et al., 2021; Overton et al., 2022; Swindells et al., 2022). However, recent data shows that several factors may notably contribute to the treatment failure of CAB/RPV. In multi-variable analysis, these baseline factors were subtype A1/A6 (confirmed virologic failure odds ratio (OR) of 5.92 (95% CI: 1.62–22.89), $p = 0.008$), RPV resistance-associated mutations (OR: 40.36 (95% CI: 8.81–99), $p < 0.001$), \log_2 of post hoc Week 8 RPV trough concentration (OR: 5.00 (95% CI: 1.79–16.67), $p = 0.002$) and higher body mass index (BMI in kg/m²) at baseline (OR: 1.13 (95% CI: 1.02–1.24), $p = 0.020$) (Cutrell et al., 2021; Overton et al., 2022). Several studies have demonstrated an increase in the frequency of subtype A not only in Poland (Serwin et al., 2021) but also in Europe (Duran Ramirez et al., 2022). Furthermore, RPV resistance is also commonly observed among European patients (Parczewski et al., 2014; Parczewski et al., 2021; Machnowska et al., 2019) mainly due to the presence of the E138 polymorphism.

As CAB/RPV LAI are currently implemented in the clinical practice across Europe, including Central-European regions we wished to present the prevalence of virologic factors which may limit real-life efficacy of this combination, namely CAB, RPV RAMs as well as A1/A6 subtype in a large dataset of the treatment-naïve and the treatment-experienced patients from Poland.

2. Patients and methods

2.1. Study population

This multicentre analysis included a dataset of 4809 sequences derived from 4649 Caucasian patients linked to care at 11 Polish centres in the years 1997–2021, of which 4122 sequences were obtained from the treatment-naïve HIV-1 patients, and the other 687 were from the treatment-experienced. As sequencing was performed multiple times in some patients, 252 sequences from 92 patients were included in both groups (64 naïve and 188 non-naïve). Plasma samples from the treatment-naïve patients were collected at first visit at HIV-treatment centre or during in-hospital stay prior to introduction of antiretroviral treatment, while samples from the ART-experienced patients were collected as part of routine tests. All samples were shipped to the Department of Infectious, Tropical Diseases and Immune Deficiency in Szczecin, Poland, where genotyping of protease and reverse transcriptase was performed.

Among the naïve patients 85.08% were male, median age was 34 (interquartile range [IQR], 28–41) years, while 68.41% of non-naïve patients were male with median age of 39 (IQR 34–46) years.

Additionally, for 1217 of this protease/reverse transcriptase dataset integrase sequences were also available and analysed - 942 naïve (81.95% male, median age 35, IQR 29–42 years) and 275 non-naïve patients (61.45% male, median age 40, IQR 35–47 years).

2.2. Sequencing and subtyping

HIV-1 RNA isolation and sequencing of 1302 base pair (b.p.) long HIV-1 protease and reverse transcriptase was performed using a Viroseq v2.0 genotyping assay (Abbott Molecular, Abbott Park, Illinois, USA) according to the manufacturer's protocol.

HIV-1 integrase region (866 b.p.) was amplified and sequenced with reagents and conditions according to methodology by Laethem (Van Laethem et al., 2008). Amplicons obtained by the nested PCR method were used for sequencing by standard techniques with BigDye technology on an ABI 3500 platform (Applied Biosystems, Foster City, CA). Integrase sequence assembly was performed with the Recall online tool (<https://recall.bccfe.ca>).

All sequences were codon-aligned using the Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo>) and then manually edited using MEGA11 (Tamura et al., 2021). The final alignment consisted of 4809 sequences with nucleotides that correspond to HXB2 reference

genome positions 2253–3554 and 4230–5096 (fragment of pol gene). We initially assessed all subtypes with REGAv3 (<http://www.bioafrica.net/typing-v3/hiv>), COMETv2 (Struck et al., 2014), and Stanford subtyping tools (<http://hivdb.stanford.edu>). Next, we confirmed subtypes A by reconstruction of phylogenetic trees. The GTR + I + G model with four gamma categories was selected as optimal for the analysed dataset using the ModelFinder application implemented in IQ-Tree (Nguyen et al., 2015) software. Reference dataset (Group M subtypes A-K + Recombinants) downloaded from Los Alamos HIV Database (<http://www.hiv.lanl.gov/>) was merged with the alignment and the phylogenetic reconstruction was done in IQ-Tree. Branch support was estimated using ultrafast Bootstrap for 1000 replicate trees.

2.3. Drug resistance interpretation

RPV resistance-associated mutations were divided into the following major RAMs: L100I, K101E/P, E138A/G/K/Q, Y179L, Y181C/I, Y188L, H221Y and M230I/L (based on the IAS-USA 2019 list, bolded mutations). Additionally, RAMs that were not bolded or included in IAS-USA list and according to the Stanford database obtained penalty score > 10 were considered as minor: A98G, G190A/E/S, V179F, Y188F. CAB resistance-associated mutations were selected by the same method. The major RAMs included: G118R, G140R, Q148H/K/R and R263K and minor RAMs included: T66K, E92Q, E138A/K/T, G140C/S, N155H.

2.4. Statistical analysis

Statistical comparison between nominal variables was performed using the Chi2-test. Commercial software (Statistica™ 13.1, Statsoft, Warsaw, Poland) was used for the statistical calculations.

3. Results

3.1. HIV-1 subtypes

Among PR/RT sequences, subtype B was dominant (83.02% naïve vs 81.80% non-naïve, $p = 0.435$), with subtype A being the second most common among the antiretroviral-naïve patients (11.89% vs 6.11% non-naïve, $p < 0.001$) and subtype D among the antiretroviral-experienced patients (7.28% vs 1.33% naïve, $p < 0.001$). Among subtype A the prevalence of sub-subtype A3, A1 and A6 among HIV treatment-naïve cases was 0.07%, 0.58% and 11.24%, respectively, while among treatment-experienced these frequencies were 0.00%, 1.02%, 5.09%, respectively. Of the remaining subtypes, C was found in 1.14% naïve and 2.33% non-naïve cases ($p = 0.011$), G in 0.17% vs 0.73% ($p = 0.007$) and F in 0.19% vs 0.15% ($p = 0.785$), respectively. Recombinant forms (RFs) were found in 2.26% naïve and 1.60% non-naïve sequences ($p = 0.274$), of which the most frequent were CRF02_AG (0.61% vs 0.58%, $p = 0.940$) and CRF01_AE (0.44% vs 0.29%, $p = 0.583$).

Additionally, subtype distribution over time for naïve and non-naïve patients is available in supplementary material (Supplementary fig. 1, Supplementary fig. 2). In the years 1997–2009 the number of sequences was small; therefore, it is hard to compare the frequency of subtypes. However, among the naïve patients subtype B decreased from 89.64% in 2010/2011 to 67.75% in 2020/2021 ($p < 0.001$). By contrast, in 2010/2011 the prevalence of A1/A6-infections increased from 55.17% of non-B subtypes to 87.45% in 2020/2021 ($p < 0.001$). Among the antiretroviral-experienced patients the prevalence of subtype B in 2010/2011 and 2020/2021 was similar (78.87 vs 77.14%, $p = 0.786$), yet subtype A1/A6 was more frequent in 2020/2021 (33.33% of non-B vs 62.50%, $p = 0.076$).

Among PR/RT/INT sequences, subtype B was also the most common (73.67% naïve vs 72.36% non-naïve, $p = 0.666$). The prevalence of subtype A among treatment-naïve and -experienced patients was 16.03% vs 8.00% ($p < 0.001$), of which the frequency of sub-subtype A3, A1 and A6 among naïve cases was 0.11%, 0.74% and 15.18%, while

among non-naïve cases these frequencies were 0.00%, 1.81% and 6.19%, respectively. The frequency of remaining subtypes was as following: D (3.93% naïve vs 13.09% non-naïve, $p < 0.001$), C (1.70% vs 2.18%, $p = 0.597$), G (0.53% vs 1.45%, $p = 0.116$) and F (0.11% vs 0.36%, $p = 0.354$). RPs were found in 4.03% naïve and 2.55% non-naïve sequences ($p = 0.250$), of which the most common were CRF_02AG (0.96% naïve vs 0.73% non-naïve, $p = 0.725$) and CRF01_AE (0.21% vs 0.36%, $p = 0.656$).

Furthermore, subtype distribution over time for both groups is available in supplementary material (Supplementary fig. 3, Supplementary fig. 4). Due to the small number of PR/RT/INT sequences in 2010/2011, the comparison with 2020/2021 is not presented.

3.2. Frequency of rilpivirine and cabotegravir RAMs

Overall, in 4809 PR/RT sequences, resistance to RPV (at least one

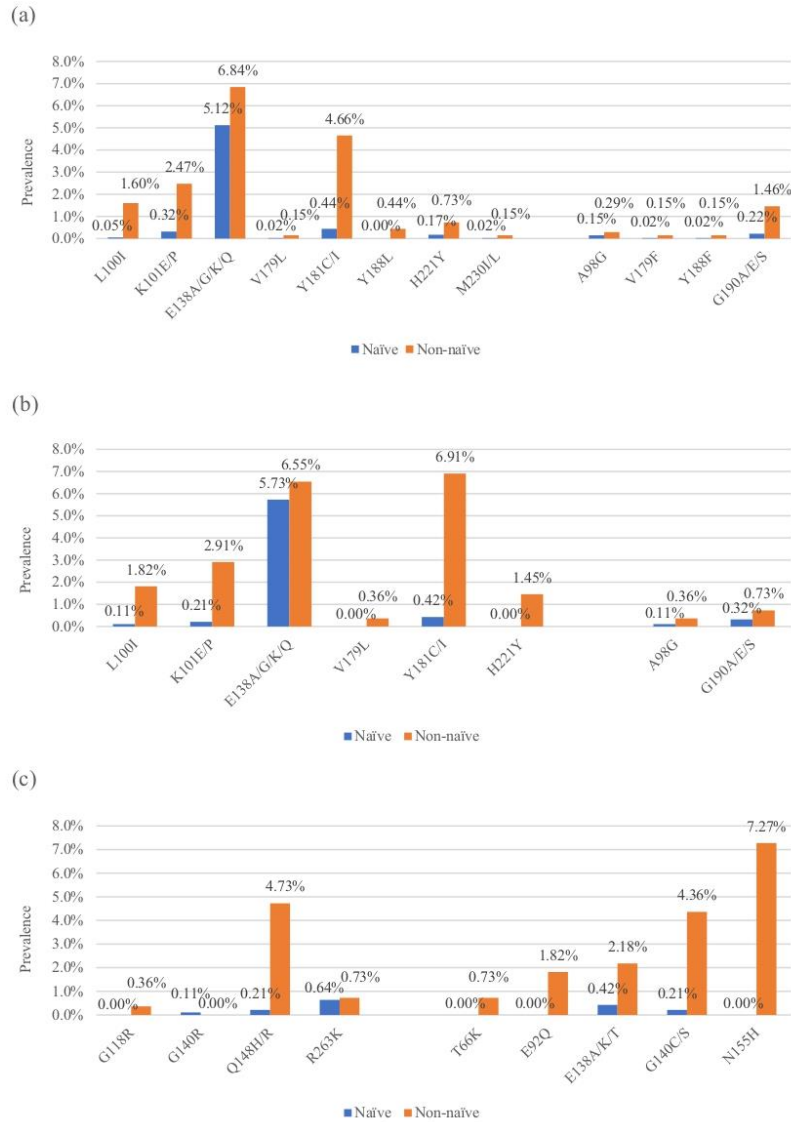


Fig. 1. Distribution of RPV and CAB RAMs among treatment-naïve and treatment-experienced patients. RPV RAMs in PR/RT sequences (a), RPV (b) and CAB (c) RAMs in PR/RT/INT sequences. Major RAMs on the left, minor RAMs on the right.

RPV RAM, major and/or minor) was noted in 243 (5.89%) naïve and 100 (14.56%) non-naïve patients ($p < 0.001$). Among them, 22 (0.53%) and 3 (0.44%) sequences were subtype A6, respectively. Considering all mutations (major and minor), the most prevalent RPV RAMs among the treatment-naïve patients were E138A/G/K/Q (5.12%), Y181C/I (0.44%), K101E/P (0.32%) and H221Y (0.17%), while among the treatment-experienced they were E138A/G/K/Q (6.84%), Y181C/I (4.66%), K101E/P (2.47%) and L100I (1.60%) (Fig. 1a). There were no statistically significant differences between the frequency of RPV RAMs in subtype A and B among naïve (4.90% vs 6.69%, $p = 0.131$) and non-naïve patients (19.05% vs 19.61%, $p = 0.934$), however among ART-experienced patients polymorphism G190S was more often observed in subtype A (A6 specifically) than in subtype B (12.50% vs 0.71%, $p < 0.001$). As the remaining subtypes were less frequent, mutation patterns are not shown.

In addition, RAMs distribution over time for naïve and non-naïve patients is available in supplementary material (Supplementary fig. 5, Supplementary fig. 6). There were no statistical differences between the frequency of resistance to RPV or most common RAMs between 2010/2011 and 2020/2021 for both naïve and non-naïve patients.

In dataset of 1217 PR/RT/INT sequences, resistance to RPV was observed in 62 (6.58%) naïve and 42 (15.27%) non-naïve patients ($p < 0.001$); 9 (0.95%) and 1 (0.36%) of them were subtype A6, respectively. The most prevalent RPV RAMs among the antiretroviral-naïve patients were E138A/G/K/Q (5.73%), Y181C/I (0.42%), K101E/P (0.21%) and L100I (0.11%), and among the antiretroviral-experienced, they were Y181C/I (6.91%), E138A/G/K/Q (6.55%), K101E/P (2.94%) and L100I (1.82%) (Fig. 1b). Resistance to CAB was detected in 12 (1.27%) naïve and 40 (14.54%) non-naïve patients ($p < 0.001$); 1 (0.11%) and 2 (0.73%) of them were subtype A1/A6, respectively. The most common CAB RAMs among the ART-naïve patients were R263K (0.64%), E138A/K/T (0.42%), G140C/R/S and Q148H/R (0.21% each), while among the ART-experienced were N155H (7.27%), Q148H/R (4.73%), G140C/R/S (4.36%) and E138A/K/T (2.18%) (Fig. 1c). There were no statistically significant differences in the frequency of CAB RAMs in subtype A and B in both naïve (0.66% vs 1.15%, $p = 0.595$) and non-naïve (13.64% vs 16.08%, $p = 0.766$) sequences.

Additionally, RPV RAMs (Supplementary fig. 7, Supplementary fig. 8) and CAB RAMs (Supplementary fig. 9, Supplementary fig. 10) distributions over time for both groups are available in supplementary material. For naïve patients no statistical differences were noted in the frequency of resistance to RPV or the most common mutations between 2010/2011 and 2020/2021. Among non-naïve patients in 2010/2011 22.22% of sequences were resistant to RPV with Y181C being the most common RAM (37.50%) in comparison to 13.58% ($p = 0.355$) RPV-resistant sequences with the most frequent E138A/G/K/Q (also 37.50%) in 2020/2021. In 2010/2011, no naïve sequence was resistant to CAB compared to 0.57% of patients resistant to CAB with G140S and Q148H being the only two RAMs in 2020/2021. Among ART-experienced patients 22.22% of sequences from 2010/2011 were resistant to CAB with N155H being the most common RAM (40.00%) in comparison to 9.88% ($p = 0.147$) CAB-resistant sequences with G140S and Q148H/R (26.67% each) in 2020/2021.

3.3. Prevalence of factors previously associated with RPV/CAB failure

Considering all RPV mutations (major and minor) in PR/RT dataset, 17.18% naïve and 20.23% non-naïve patients ($p = 0.052$) had any of the two failure associated factors (RPV RAMs and/or subtype A1/A6), but only 0.53% and 0.44% of sequences had both factors ($p = 0.743$), respectively (Table 1).

Among PR/RT/INT sequences at least one of the three baseline factors (RPV RAMs and/or CAB RAMs and/or subtype A1/A6) was observed in 22.61% naïve and 33.09% non-naïve patients ($p < 0.001$). Any two of the three factors were present in 1.17% and 4.36% ($p < 0.001$), respectively, while all three factors were found in one (0.36%)

Table 1

Presence of baseline factors possibly associated with CAB/RPV LAI failure- RPV total RAM(s), HIV-1 subtype A1/A6, CAB total RAM(s).

PR/RT sequences	Naïve	Non-naïve
Parameter		
None of the two baseline factors:	3414/4122 (82.82%)	548/687 (79.77%)
Any factor:	708/4122 (17.18%)	139/687 (20.23%)
RPV RAM(s)		
Non-A1/A6	221/4122 (5.36%)	97/687 (14.12%)
A1/A6		
Non-RPV RAM(s)	465/4122 (11.28%)	39/687 (5.68%)
RPV RAM(s)		
A1/A6	22/4122 (0.53%)	3/687 (0.44%)
PR/RT/INT sequences		
None of the three baseline factors:	729/942 (77.39%)	184/275 (66.91%)
Any one of the three baseline factors:	213/942(22.61%)	91/275 (33.09%)
RPV RAM(s)		
Non-A1/A6	52/942 (5.52%)	31/275 (11.27%)
Non-CAB RAM(s)		
A1/A6	140/942 (14.86%)	20/275 (7.27%)
Non-RPV RAM(s)		
Non-CAB RAM(s)		
CAB RAM(s)		
Non-A1/A6	10/942 (1.06%)	28/275 (10.18%)
Non-RPV RAM(s)		
Any two of the three baseline factors:	11/942 (1.17%)	12/275 (4.36%)
RPV RAM(s)		
A1/A6	9/942 (0.95%)	0/275 (0.00%)
CAB RAM(s)		
A1/A6	1/942 (0.11%)	1/275 (0.36%)
RPV RAM(s)		
CAB RAM(s)	1/942 (0.11%)	10/275 (3.64%)
All three factors:	0/942 (0.00%)	1/275 (0.36%)

treatment-experienced patient (Table 1).

In addition, Supplementary Table 1 presents the frequency of factors previously associated with RPV/CAB failure considering only the major RPV, CAB RAMs and subtype A1/A6.

4. Discussion

This study presents a novel data on the virologic factors possibly related to CAB/RPV LAI failure in the large dataset of the treatment-naïve and the treatment-experienced patients from Poland, sequenced in the years 1997–2021. This is the first Central European study on the frequency of both RPV and CAB RAMs. This analysis also focuses on subtype A1/A6, with steadily increasing frequency, mainly due to migration from Eastern Europe. At present, further increases resulting from war in Ukraine and migration from this region, where A6 variant is common may be expected.

In the dataset of 4809 patients, we indicated that 17.2% of naïve and 20.2% of non-naïve (17.6% of all) sequences had subtype non-B. Compared to Polish studies from previous years, in 2010, subtypes non-B accounted for 21.0% of patients (Parczewski et al., 2010) with a predominance of the subtype D in this group, while in 2016 a decrease in the percentage of non-B subtypes was observed (13.1%), yet with an increase of subtype A (A1–5.2%) (Parczewski et al., 2016). According to a recent Polish study subtype B decreased significantly, from 89.3% in 2015 to 80.3% in 2019, which was linked to the increasing number of subtype A1/A6 (Serwin et al., 2021). For both naïve and non-naïve sequences, in 2015 the frequency of subtype A was estimated at 5.6%, rising to 13.4% in 2019 (Serwin et al., 2021).

In the current study, RPV resistance among the treatment-naïve patients was 5.9%. This result is comparable with the findings of a recent study done in France, 6.2% (Charpentier et al., 2021) and the previous Polish study (5.3%) (Parczewski et al., 2014).

As expected, the most common (5.1%) polymorphism associated with RPV resistance among naïve patients was E138A/G/K/Q. More

specifically, E138A (which is associated with a 2-fold reduction in RPV susceptibility) was the most frequent (4.5%), which is also in line with previous Polish (3.7%) (Parczewski et al., 2014) and French (3.2%) results (Charpentier et al., 2021). The E138K and E138G mutations occurred in 0.6% of the sequences. Among the treatment-experienced patients, E138A/G/K/Q was also the most frequent (6.8%), following Y181C/I (4.7%), which is similar to our recent study on NNRTI RAMs (7.5% vs 6.5%, respectively) (Scheibe et al., 2021).

In the integrase sequences, CAB resistance was found in 1.3% of naïve patients (vs 0.7% in French study) (Charpentier et al., 2021). The most common RAM related to CAB resistance in naïve group was R263K (0.6%), which reduces the CAB sensitivity to an intermediate level. However, the L74I polymorphism which was the most frequent in Charpentier's study (12.9%) and observed among 88.3% of participants with subtype A1/A6 (6.6% of those had confirmed virologic failure, CVF) in Cutrell's paper, was noted in 18.5% of our naïve and 10.5% non-naïve sequences, of which 71.3% and 58.6% had subtype A1/A6 (Charpentier et al., 2021; Cutrell et al., 2021).

Overall, our study indicates that 17.2% naïve and 20.2% non-naïve patients had any of the two baseline factors which may affect CAB/RPV LAI (RPV RAMs and/or subtype A1/A6), although in only ~0.5% of sequences (in both groups) combined presence of both factors was noted, which is similar to findings from the French study (0.4%) (Charpentier et al., 2021).

If CAB RAMs were also considered, the prevalence of CAB/RPV factors possibly associated with treatment failure would be slightly higher, but still rare (1.2% in naïve and 4.4% in non-naïve sequences). Of note, in Cutrell's study, a combination of at least two of four baseline factors was observed in 3.4% patients and associated with increased CVF risk (25.7%), but BMI ≥ 30 kg/m² was one of the baseline factors, which was not available in our dataset (Cutrell et al., 2021). It should be noted that identification of factors possibly associated with CAB/RPV may be challenging in the settings with increased A1/A6 subtype prevalence (African countries, Russia, Ukraine, Belarus) as baseline sequence data are often uncollected. Therefore, efforts to validate which factors will be clinically critical for CAB/RPV ART failure and to expand HIV sequencing capacity is of key importance from the perspective of LAI implementation.

Recent studies showed that long-acting CAB used as a PrEP (pre-exposure prophylaxis) was more effective compared to daily oral TDF-FTC (tenofovir disoproxil fumarate – emtricitabine) and will be a useful prevention strategy for both male and female users (Delany-Moretwe et al., 2021; Landovitz et al., 2021; Landovitz et al., 2022). However, it is unknown if efficacy of such PrEP will be affected in the settings with prevalent A1/A6 subtype, and further research, including data on baseline subtypes among both recently infected and PrEP failing cases is needed.

Study limitations: This study has several limitations. Firstly, the data were collected across Polish treatment centres at physicians' request, therefore some sampling bias may be present. For this reason, we have included a large dataset of sequences. Furthermore, this study is limited only to the virologic factors, with baseline BMI not being collected for the sequenced patients, which would add valuable datum to the dataset. Lastly, in the treatment-experienced dataset no full treatment history was available and therefore it is impossible to investigate the patterns of PR/RT and integrase resistance evolution, but these data are now being collected and will be published in the future.

To conclude, despite common presence of single factor possibly associated with CAB/RPV LAI failure, expected clinical impact is low, as they were rarely observed in combination. In the real-life settings, the possibility of virological failure (including drug resistance) especially in the settings with high prevalence of A1/A6 variants may be increased, and molecular surveillance should be continued. Defining subtype and baseline resistance patterns remains useful prior to LAI treatment implementation, reducing the possibility of the treatment failure in the setting of the long-term drug exposure.

Authors' contributions

MP and KSc devised the study. MP collected patients' data and gave advices throughout the project. KSc and AU collated and processed the viral sequences. KSc and KSe performed subtype analysis. KSc wrote the manuscript and interpreted data. All authors reviewed and accepted the final manuscript.

Ethics declarations

All patients gave their informed consent to the proceeding of the sample and clinical data processing to conduct this study. The study protocol was approved by the Bioethical Committee of Pomeranian Medical University, Szczecin, Poland (approval number KB-0012/26/17 and KB-0012/08/12). The research was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki.

Funding

This work was funded by the Polish National Science Centre [SONATA-BIS Grant UMO-2018/30/E/NZ6/00696].

Credit author statement

The following authors contributed to this manuscript:

Kaja Scheibe – data collection, HIV sequencing and subtype interpretation, statistical analyses, manuscript drafting and revisions, data interpretation.

Anna Urbańska – HIV sequencing and subtype interpretation, manuscript drafting and review.

Karol Serwin – HIV sequencing and subtype interpretation, manuscript drafting and review.

Milosz Parczewski- clinical data collection, manuscript drafting and revisions, data interpretation.

Declaration of Competing Interest

All authors declare no conflict of interest related to the current study.

Data availability

Data will be made available on request.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2022.105358>.









References

- Altice, F., Evuarherhe, O., Shina, S., et al., 2019. Adherence to HIV treatment regimens: systematic literature review and meta-analysis. *Patient Prefer Adherence*. 13, 475–490. Published 2019 Apr 3. <https://doi.org/10.2147/PPA.S192735>.
- Bares, S.H., Scarsi, K.K., 2022. A new paradigm for antiretroviral delivery: long-acting cabotegravir and rilpivirine for the treatment and prevention of HIV. *Curr. Opin. HIV AIDS* 17 (1), 22–31. <https://doi.org/10.1097/COH.0000000000000708>.
- Charpentier, C., Storto, A., Soulié, C., et al., 2021 Oct 11. Prevalence of genotypic baseline risk factors for cabotegravir + rilpivirine failure among ARV-naïve patients. *J. Antimicrob. Chemother.* 76 (11), 2983–2987. <https://doi.org/10.1093/jac/dkab161>. Erratum in: *J. Antimicrob. Chemother.* 2021 Sep 17; PMID: 34015097.
- Cutrell, A.G., Schapiro, J.M., Perno, C.F., et al., 2021 Jul 15. Exploring predictors of HIV-1 virologic failure to long-acting cabotegravir and rilpivirine: a multivariable analysis. *AIDS*. 35 (9), 1333–1342. <https://doi.org/10.1097/QAD.0000000000002883>. PMID: 33730748; PMCID: PMC8270504.
- Delany-Moretwe, S., Hughes, J.P., Bock, P., et al., 2021. Long acting injectable cabotegravir is safe and effective in preventing HIV infection in cisgender women: interim results from HPTN 084. *HIVR4P (HIV Research for Prevention) Virtual*, 27–28 January and 3–4 February. Abstract HY01.02.
- Duran Ramirez, J.J., Ballouz, T., Nguyen, H., et al., 2022 Jan 18. Swiss HIV cohort study. Increasing frequency and transmission of HIV-1 non-B subtypes among men who

- have sex with men in the Swiss HIV Cohort Study. *J. Infect. Dis.* 225 (2), 306–316. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiab360>. 34260738.
- Landovitz, R.J., Donnell, D., Clement, M.E., et al., 2021 Aug 12. Cabotegravir for HIV prevention in cisgender men and transgender women. *N. Engl. J. Med.* 385 (7), 595–608. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2101016>. PMID: 34379922; PMCID: PMC8448593.
- Landovitz, R.J., Donnell, D., Tran, H., et al., 2022. Updated efficacy, safety, and case studies in HPTN 093: CAB-LA vs TDF/FTC for PrEP. *Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections*; February 12–16. Virtual. Abstract 96.
- Machnowska, P., Meixenberger, K., Schmidt, D., et al., 2019 Jan 16. German HIV-1 Serococonverter Study Group. Prevalence and persistence of transmitted drug resistance mutations in the German HIV-1 Serococonverter Study Cohort. *PLoS One* 14 (1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0209605>. PMID: 30650082; PMCID: PMC6334938.
- Nguyen, L.T., Schmidt, H.A., von Haeseler, A., et al., 2015 Jan. IQ-TREE: a fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. *Mol. Biol. Evol.* 32 (1), 268–274. <https://doi.org/10.1093/molbev/msu300>. Epub 2014 Nov 3. PMID: 25371430; PMCID: PMC4271533.
- Orkin, C., Oka, S., Philibert, P., et al., 2021 Apr. Long-acting cabotegravir plus rilpivirine for treatment in adults with HIV-1 infection: 96-week results of the randomised, open-label, phase 3 FLAIR study. *Lancet HIV* 8 (4), e185–e196. [https://doi.org/10.1016/S2352-3018\(20\)30340-4](https://doi.org/10.1016/S2352-3018(20)30340-4). Erratum in: *Lancet HIV*. 2021 Dec;8(12):e734. PMID: 33794181.
- Overton, E.T., Richmond, G., Rizzardini, G., et al., 2022. Long-acting cabotegravir and rilpivirine dosed every 2 months: ATLAS-2M week 152 results. *Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections*; February 12–16. Virtual. Abstract 479.
- Parczewski, M., Leszczyszyn-Pynka, M., Bander, D., et al., 2010 Aug. Characteristics of HIV-1 non-B subtype infections in Northwest Poland. *J. Med. Virol.* 82 (8), 1306–1313. <https://doi.org/10.1002/jmv.21797>. PMID: 20578066.
- Parczewski, M., Urbańska, A., Maciejewska, K., et al., 2014 Apr 17. Transmitted drug resistance to rilpivirine among antiretroviral-naïve patients living with HIV from northern Poland. *J. Int. AIDS Soc.* 17 (1), 18929. <https://doi.org/10.7448/IAS.17.1.18929>. PMID: 24746180; PMCID: PMC3991831.
- Parczewski, M., Leszczyszyn-Pynka, M., Witak-Jedra, M., et al., 2016 Apr. Distribution and time trends of HIV-1 variants in Poland: characteristics of non-B clades and recombinant viruses. *Infect. Genet. Evol.* 39, 232–240. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.02.001>. Epub 2016 Feb 3. PMID: 26851192.
- Parczewski, M., Sulkowska, E., Urbańska, A., et al., 2021 Jun 17. Transmitted HIV drug resistance and subtype patterns among blood donors in Poland. *Sci. Rep.* 11 (1), 12734. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-92210-2>. PMID: 34140600; PMCID: PMC8211697.
- Scheibe, K., Urbańska, A., Jakubowski, P., et al., May 2021. Low prevalence of daravirine-associated resistance mutations among polish human immunodeficiency-1 (HIV-1)-infected patients. *Antivir. Ther.* 69–78. <https://doi.org/10.1177/13596535211049044>.
- Serwin, K., Urbańska, A., Scheibe, K., et al., 2021 Aug 16. Molecular epidemiology and HIV-1 variant evolution in Poland between 2015 and 2019. *Sci. Rep.* 11 (1), 16609. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-96125-w>. PMID: 34400726; PMCID: PMC8367969.
- Struck, D., Lawyer, G., Ternes, A.M., et al., 2014 Oct. COMET: adaptive context-based modeling for ultrafast HIV-1 subtype identification. *Nucleic Acids Res.* 42 (18) <https://doi.org/10.1093/nar/gku739> e144. Epub 2014 Aug 12. PMID: 25120265; PMCID: PMC4191385.
- Swindells, S., Lutz, T., Van Zyl, L., et al., 2022 Feb 1. Week 96 extension results of a phase 3 study evaluating long-acting cabotegravir with rilpivirine for HIV-1 treatment. *AIDS*. 36 (2), 185–194. <https://doi.org/10.1097/QAD.0000000000003025>. PMID: 34261093; PMCID: PMC8711605.
- Tamura, K., Stecher, G., Kumar, S., 2021 Jun 25. MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis version 11. *Mol. Biol. Evol.* 38 (7), 3022–3027. <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>. PMID: 33892491; PMCID: PMC8233496.
- Van Laethem, K., Schrooten, Y., Covens, K., et al., 2008 Nov. A genotypic assay for the amplification and sequencing of integrase from diverse HIV-1 group M subtypes. *J. Virol. Methods* 153 (2), 176–181. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2008.07.008>. Epub 2008 Sep 2. PMID: 18706932.

Article

Frequency of Major Transmitted Integrase Resistance in Poland Remains Low Despite Change in Subtype Variability

Kaja Mielczak ^{1,*}, Karol Serwin ¹, Anna Urbańska ¹, Bogusz Aksak-Wąs ¹, Malwina Karasińska-Cieślak ¹, Elżbieta Mularska ², Adam Witor ², Paweł Jakubowski ³, Maria Hlebowicz ⁴, Monika Bociąga-Jasik ⁵, Elżbieta Jabłonowska ⁶, Aleksandra Szymczak ⁷, Bartosz Szetela ⁷, Władysław Łojewski ⁸ and Miłosz Parczewski ¹

¹ Department of Infectious, Tropical Diseases and Immune Deficiency, Pomeranian Medical University in Szczecin, 71455 Szczecin, Poland

² Outpatient Clinic for AIDS Diagnostics and Therapy, Specialistic Hospital in Chorzow, 41500 Chorzow, Poland

³ Infectious Diseases Gdansk, Pomeranian Hospitals, 80214 Gdansk, Poland

⁴ Department of Infectious Diseases, Medical University of Gdansk, 81519 Gdansk, Poland

⁵ Department of Infectious Diseases, Jagiellonian University Medical College, 30688 Krakow, Poland

⁶ Department of Infectious Diseases and Hepatology, Medical University of Lodz, 91347 Lodz, Poland

⁷ Department of Infectious Diseases, Liver Diseases and Acquired Immune Deficiencies, Wrocław Medical University, 51149 Wrocław, Poland

⁸ Department of Infectious Diseases, University Hospital in Zielona Gora, 65046 Zielona Gora, Poland

* Correspondence: kaja.mielczak@pum.edu.pl; Tel.: +48-918139456



Citation: Mielczak, K.; Serwin, K.; Urbańska, A.; Aksak-Wąs, B.; Karasińska-Cieślak, M.; Mularska, E.; Witor, A.; Jakubowski, P.; Hlebowicz, M.; Bociąga-Jasik, M.; et al. Frequency of Major Transmitted Integrase Resistance in Poland Remains Low Despite Change in Subtype Variability. *Viruses* **2024**, *16*, 1597. <https://doi.org/10.3390/v16101597>

Academic Editor: Bluma G. Brenner

Received: 13 September 2024

Revised: 2 October 2024

Accepted: 9 October 2024

Published: 11 October 2024



Copyright: © 2024 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: With the widespread use of integrase inhibitors and the expanding use of long-acting cabotegravir in both pre-exposure prophylaxis and antiretroviral treatment, molecular surveillance on the transmission of integrase resistance has regained clinical significance. This study aimed to determine the frequency of INSTI-transmitted drug resistance mutations (DRMs) among treatment-naïve individuals in Poland from 2016 to 2023. INSTI resistance was analyzed in 882 antiretroviral treatment-naïve individuals using Sanger sequencing. Integrase DRMs were defined based on the Stanford HIV drug resistance database scores. Phylogeny was used to investigate subtyping and clustering. For the analysis of time-trends, logistic regression was used. Major (E138K and R263K) integrase mutations were detected in 0.45% of cases with minor resistance observed in 14.85%, most commonly (13.95%) E157Q. Overall, no major clusters of transmitted drug resistance were identified, and the transmission of E157Q showed a decreasing trend ($p < 0.001$). While the frequency of sub-subtype A6 increased, it was predominantly found among migrants and associated with L74 mutations. The frequency of major integrase-transmitted DRMs remains low, despite the changes in subtype variability. Surveillance of changing HIV molecular variation patterns is vital from the perspective of the optimal use of integrase inhibitors, especially due to expanding long-acting cabotegravir implementation.

Keywords: HIV; integrase strand transfer inhibitors; transmitted drug resistance; resistance mutations; clustering

1. Introduction

The introduction of integrase strand transfer inhibitors (INSTIs) has significantly improved the therapeutic options for treating HIV-1 infection, due to their high efficacy, decreased number of drug–drug interactions and faster inhibition of viral replication compared to other groups of antiretroviral agents [1–4]. First introduced integrase inhibitors (raltegravir and elvitegravir) were characterized by a lower genetic barrier to the selection of resistance [5–7]. Currently, most commonly used antiretroviral regimens include second generation integrase inhibitors, such as dolutegravir or bictegravir with a higher genetic

barrier and infrequent selection of drug resistance in both in vitro studies and real-life cohorts [8–11]. Dolutegravir is also recommended as the global first line regimen by WHO recommendations [12]. Recently, with the introduction and expanding use of long-acting injectable cabotegravir in both pre-exposure HIV prophylaxis and antiretroviral treatment, which, despite its high efficacy, is associated with the selection of drug resistance in cases of virologic failure, the scientific interest in integrase resistance has been rekindled [13–16]. However, drug resistance testing for INSTIs is not routinely recommended or performed before the initiation of antiretroviral therapy.

Some studies have shown that transmitted INSTI drug resistance mutations (DRMs) are observed in 0.1–3% of naïve patients [17–19]. Transmission of major DRMs remains infrequent [20,21], while minor mutations and polymorphisms are observed more frequently but usually affect drug susceptibility or viral replicative capacity only when emerging in combination with major resistance variants [6,22]. Furthermore, the frequency of mutations may depend on the subtype or specific population [23,24]. A good example is the L74I polymorphism, which is characteristic of sub-subtype A6 and occurs in up to 90% of individuals [25]. In a study conducted by Hu et al. [26], it was demonstrated that L74I, in combination with mutations at positions 118, 140, 148 and 263, conferred a greater replication capacity to the sub-subtype A6.

In Poland, HIV prevalence used to be low, with the epidemic mainly driven by transmissions among men who have sex with men with a predominance of subtype B. However, since the outbreak of full-scale war in Ukraine in 2022, with the influx of war refugees, there has been a notable shift in the clinical and molecular patterns of the epidemic. This includes a rise in the number of heterosexually infected women under care and a significant increase in sub-subtype A6 transmissions and frequency [27]. Of note, the majority of refugees were already diagnosed in their home country and treated with a tenofovir disoproxil/emtricitabine/dolutegravir single tablet regimen; however, a notable proportion were newly diagnosed after arriving in Poland [28]. Studies on drug resistance transmission and selection in Ukraine are infrequent, while these new epidemiological trends may notably affect the patterns of drug resistance transmission in Poland. Also, there is a notable gap in the data on the recent transmission of integrase drug resistance, with the last available datasets encompassing 2010–2015 and a specific small group of blood donors from 2009 to 2017 [29,30]. Given the expanding use of integrase inhibitors in recent years and the above-mentioned differences in epidemiological patterns, in this study, we wished to determine the prevalence and time trends in transmitted DRMs associated with integrase inhibitors among treatment-naïve individuals living with HIV-1 in Poland.

2. Materials and Methods

2.1. Study Population

The study included 882 antiretroviral treatment-naïve people newly diagnosed with HIV-1 from 7 Polish centers (Szczecin, Chorzów, Gdańsk, Kraków, Łódź, Wrocław, Zielona Góra) from whom integrase sequences were obtained in the years of 2016–2023. Plasma samples were collected during the initiation of care (during hospitalization or their first visit to the HIV treatment center), before the introduction of antiretroviral treatment. The samples were subsequently sent to the Clinical Laboratory at the Department of Infectious, Tropical Diseases and Immune Deficiency, Pomeranian Medical University in Szczecin, where Sanger sequencing was performed. The number of sequences by year of diagnosis was as follows: 2016–88, 2017–111, 2018–293, 2019–132, 2020–124, 2021–44, 2022–38, 2023–52. The collected data included gender, age at diagnosis (first positive Western Blot test result), CD4 T-cell count and HIV-1 viral load at care entry, CDC clinical stage at care entry (AIDS vs. non-AIDS), and the route of transmission (as determined by the patient).

2.2. Sequencing and Subtyping

HIV RNA of samples collected from 2016 to 2022 were isolated using the Viroseq kit (Viroseq 2.8 and 2.9, Abbott Molecular, Abbott Park, IL, USA) according to the manufac-

turer's protocol, while the QIAamp[®] Viral RNA Mini Kit was used to isolate samples from 2023. The HIV-1 integrase region (866 b.p.) was amplified and sequenced with reagents and conditions according to the method outlined by Laethem et al. [31]. Amplicons obtained by the nested PCR method were used for sequencing using standard techniques with BigDye technology on an ABI 3500 platform (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Sequence assembly was performed with the Recall online tool (<https://recall.bccfe.ca>, accessed on 16 August 2024).

The subtype was initially identified using the COMET tool (<https://comet.liv.lu/>, accessed on 20 August 2024) and the HIV BLAST algorithm (https://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/BASIC_BLAST/basic_blast.html, accessed on 20 August 2024), and confirmed by phylogenetic analyses.

The accession numbers of the sequence data from this article have been deposited in GenBank and are available in the Supplementary Data.

2.3. Drug Resistance Interpretation

Drug resistance mutations were categorized according to the Stanford HIV drug resistance algorithm version 9.6 [32]. Each drug resistance mutation or combination has an assigned penalty score. We assumed that major DRMs have a score > 10, while minor mutations have a score of 10. Additionally, according to the Stanford interpretation, sequences with a resistance level ≥ 3 (indicating low, intermediate or high-level resistance) were considered resistant in our study. Due to the high number of sequences with sub-subtype A6, we have also included an analysis of the frequency of the L74I polymorphism, which is not associated with drug resistance according to the Stanford HIV database, but has been observed to influence the replicative capacity in cases with selected major integrase resistance mutations [26].

2.4. Statistical Analysis

Statistical comparisons were performed using the Chi² test for nominal variables using Statistica 13.1 (StatSoft, Warsaw, Poland) software. Using R 4.4.0 statistical software, logistic regression was employed to analyze the distribution of DRMs and subtypes over time.

2.5. Phylogenetic Analyses

For our study, we analyzed the HIV-1 pol gene fragment corresponding to the integrase region, spanning nucleotide positions from 4230 to 5096 of the HXB2 reference genome. We focused on lineage B and sub-subtype A6 sequences, excluding other subtypes due to their limited sample sizes. Sequences containing more than 5% ambiguous bases were discarded from the alignment. The final dataset included 605 sequences of subtype B and 205 of sub-subtype A6. Sequences were aligned against the reference sequence K03455.1 (HXB2) using Clustal Omega software for each subtype [33]. Maximum likelihood (ML) trees were inferred using IQ-TREE, employing the generalized time-reversible evolutionary model [34]. Putative transmission clusters were identified using ClusterPicker v1.332 [35], with a genetic distance threshold of 0.015 and branch support ≥ 0.90 according to the Shimodaira–Hasegawa approximate likelihood ratio test (SH-aLRT). The final phylogenetic trees were prepared and annotated in iTOL [36].

3. Results

3.1. Baseline Characteristics of the Patients and HIV-1 Subtypes

Most of the individuals were male, 748 (84.81%), with 762 being of Polish origin (86.39%), and a median age of 35 (interquartile range [IQR], 16–75) years (Table 1). The dominant mode of transmission was MSM, accounting for 487 (55.22%) cases. The median CD4 T-cell count was 349 cells/ μ L (range, 1–2253 cells/ μ L), while the median viral load among cases was 4.80 log₁₀ RNA copies/mL. HIV-1 RNA load ranged from 1.91 log₁₀ RNA copies to 7.39 log₁₀ RNA copies/mL. The proportion of late diagnosed cases was 411 (50.18%).

Table 1. Characteristics of the study population.

	Total	Subtype B n = 616	Sub-Subtype A6 n = 215	Subtype Non-B, Non-A6 n = 51	p Value: B vs. A6	p Value: B vs. Non-A6, Non-B	p Value: A6 vs. Non-B, Non-A6
Gender, n (%)							
Male	748 (84.81)	552 (89.61)	159 (73.95)	37 (72.55)	<0.001	<0.001	0.839
Female	134 (15.19)	64 (10.39)	56 (26.05)	14 (27.45)			
Age (years), median (IQR)	35 (16–75)	35 (16–75)	35 (21–73)	38 (18–68)			
CD4 T-cell count (cells/ μ L), median (IQR) ^a	349 (1–2253)	355 (1–2253)	335 (1–1296)	246 (1–1579)			
<200	245 (30.55)	165 (29.52)	60 (30.77)	20 (41.67)	0.742	0.079	0.150
\geq 200	557 (69.45)	394 (70.58)	135 (69.23)	28 (58.33)			
HIV-1 viral load (log ₁₀ RNA copies/mL), median (IQR) ^b	4.80 (1.91–7.39)	4.74 (2.22–7.24)	5.05 (1.91–7.00)	4.91 (2.55–7.39)			
<5	467 (58.01)	344 (61.87)	100 (48.78)	23 (52.27)	0.001	0.209	0.674
\geq 5	338 (41.99)	212 (38.13)	105 (51.22)	21 (47.73)			
Late diagnosis (CD4 T-cell count (cells/ μ L) <350 or AIDS) ^c	411 (50.18)	279 (49.12)	106 (52.48)	26 (53.06)	0.413	0.596	0.941
Clinical category at HIV diagnosis (AIDS vs. non-AIDS) ^d							
AIDS	150 (19.13)	106 (19.38)	35 (18.42)	9 (19.15)	0.772	0.969	0.908
Non-AIDS	634 (80.87)	441 (80.62)	155 (81.58)	38 (80.85)			
Risk exposure, n (%) ^e							
MSM [*]	487 (55.22)	364 (69.07)	101 (54.01)	22 (51.16)	<0.001	0.016	0.736
HET ^{**}	215 (24.38)	117 (22.20)	78 (41.71)	20 (46.51)	<0.001	<0.001	0.566
IDU ^{***}	54 (6.12)	45 (8.54)	8 (4.28)	1 (2.33)	0.056	0.150	0.551
MTC ^{****}	1 (0.11)	1 (0.19)	0	0	0.797		

Data available for: ^a 802 individuals, ^b 805 individuals, ^c 819 individuals, ^d 784 individuals, ^e 757 individuals. ^{*} Men who have Sex with Men, ^{**} Heterosexual, ^{***} Injection drug user, ^{****} Mother-to-child.

The most common HIV-1 variant was subtype B (616, 69.84%), followed by A6 (215, 24.38%), C and CRF02_AG (12, 1.36%, each), D (6, 0.68%), A1 (4, 0.45%), CRF01_AE, G and F (2, 0.23%, each), and other recombinant forms (11, 1.25%). Further details can be found in Table S1. Additionally, the distribution of subtypes by year of diagnosis is available in Table S2. Subtype B was more common in men compared to subtypes A6 and non-B non-A6 ($p < 0.001$), which were more common in women (Figure S1). There were no differences in median CD4 lymphocyte counts between subtypes. Median HIV-1 viral load was lower in subtype B compared to A6 ($p = 0.001$). Furthermore, the frequencies of late HIV diagnosis and advanced HIV disease (AIDS) were similar among all subtypes. In terms of transmission route, subtype B was more prevalent among MSM compared to A6 ($p < 0.001$) and non-B non-A6 subtypes ($p = 0.016$), in which heterosexual transmission was more frequent (B vs. A6, non-B non-A6 $p < 0.001$). Considering the country of origin, subtype B was significantly more frequent among Poles compared to migrants (77.95% vs. 18.33%, $p < 0.001$), in whom sub-subtype A6 was more frequently observed (75.00% vs. 16.40%, $p < 0.001$).

3.2. Frequency of INSTI DRMs and Drug Resistance Transmitted Integrase Drug Resistance Mutations

A total of 135 (15.31%) sequences with DRMs were found, with 4 cases with major drug resistance mutations and 131 with minor mutations. Importantly, most of these sequences were sensitive to all INSTIs or exhibited potential low-level resistance only to first-generation integrase inhibitors, EVG and RAL. Considering the definition of resistance (Stanford resistance level ≥ 3), 878 sequences (99.55%) were susceptible to all INSTIs, while only 2 of 4 resistant sequences (0.23%) showed resistance to all drugs in this class. Two

sequences had low-level resistance to EVG and RAL, while in two additional individuals, intermediate resistance to EVG, BIC, CAB, DTG and low resistance to RAL were detected. A detailed list of mutations is presented in the following sections.

- Major DRMs

Major DRMs were identified in four sequences (0.45%)—each had one major mutation—two (0.23%) E138K and two (0.23%) R263K. All individuals were male Poles with subtype B. Details on sequences with major mutations are provided in Table S3.

- Minor DRMs

A total of 132 minor DRMs were detected in 131 sequences (14.85%), with 2 mutations (E157Q and L74M) identified in one sequence with sub-subtype A6. The prevalence of the DRMs and their associated subtypes were as follows: E157Q (123, 13.95%)—121 (93.18%) with subtype B, 1 (0.81%) with A6, 1 (0.81%) with CRF03_AB, L74M (5, 0.57%, all males with sub-subtype A6), T97A (3, 0.34%, all males with subtype B), D232N (1, 0.11%, male with subtype B).

The E157Q mutation was notably more common among subtype B compared to sub-subtype A6 ($p < 0.001$) and non-B non-A6 subtypes ($p < 0.001$). It was also more frequent in women (44, 32.84%) compared to men (79, 10.56%, $p < 0.001$) and was associated with injection drug use (37, 68.52%). It was less frequent among MSM (10, 2.05%, $p < 0.001$) and the heterosexual population (46, 21.40%, $p < 0.001$).

The L74M mutation was observed more frequently in the A6 subtype compared to the other subtypes ($p < 0.001$), but no differences were noted for gender or transmission route. Details on sequences with minor mutations are provided in Table S4.

Additionally, we examined the prevalence of the L74I polymorphism which was found in 226 (25.62%) sequences that had the following subtypes: 1 (0.44%) A1, 189 (83.63%) A6, 27 (11.95%) B, 4 (1.77%) C, 4 (1.77%) CRF02_AG, and 1 (0.44%) D. The difference in the prevalence of L74I mutation between sub-subtype A6 and non-A6 was statistically significant ($p < 0.001$). It was also observed more frequently among women ($p < 0.001$) and heterosexual infections (HET vs. MSM $p = 0.002$).

Regarding the origin, minor DRMs were significantly more common among Poles ($p = 0.001$), with 125 mutations detected (117 E157Q, 4 L74M, 3 T97A, and 1 D232N), while among 6 migrants (4 with subtype B, 1 with A6 and 1 with CRF03_AB), only 7 substitutions were found (5 E157Q and 1 E157Q + L74M).

3.3. Distribution of Integrase DRMs and Subtypes over Time

The distribution of mutations over time is shown in Figure 1. Due to the small number of major DRMs, there was no significant trend over time (OR 0.68, 95% CI 0.31–1.25, $p = 0.291$); however, for minor DRMs, a significant decrease was noted from 20.45% in 2016 to 7.69% in 2023 (OR 0.83, 95% CI 0.74–0.92, $p = 0.001$).

There was no significant trend in the prevalence of minor DRMs among cases with subtype B (Figure 2a, $p = 0.298$), but we observed a decreasing trend over time in the frequency of minor substitutions among sequences with sub-subtype A6 (Figure 2b, $p = 0.051$).

Additionally, we estimated whether there were any temporal trends in the subtype prevalence. For subtype B (Figure 3a), we observed a statistically significant downward trend ($p < 0.001$), while for sub-subtype A6 (Figure 3b), there was a significant increase over time ($p < 0.001$).

Moreover, Figure S2 shows the downward temporal trends in the frequency of minor DRMs among men (a) ($p = 0.030$) and women (b) ($p < 0.001$). Furthermore, Figure S3 presents the temporal frequency of minor mutations by transmission route: MSM (a), HET (b), and IDU (c). For heterosexual cases, a statistically significant downward trend was observed ($p < 0.001$).

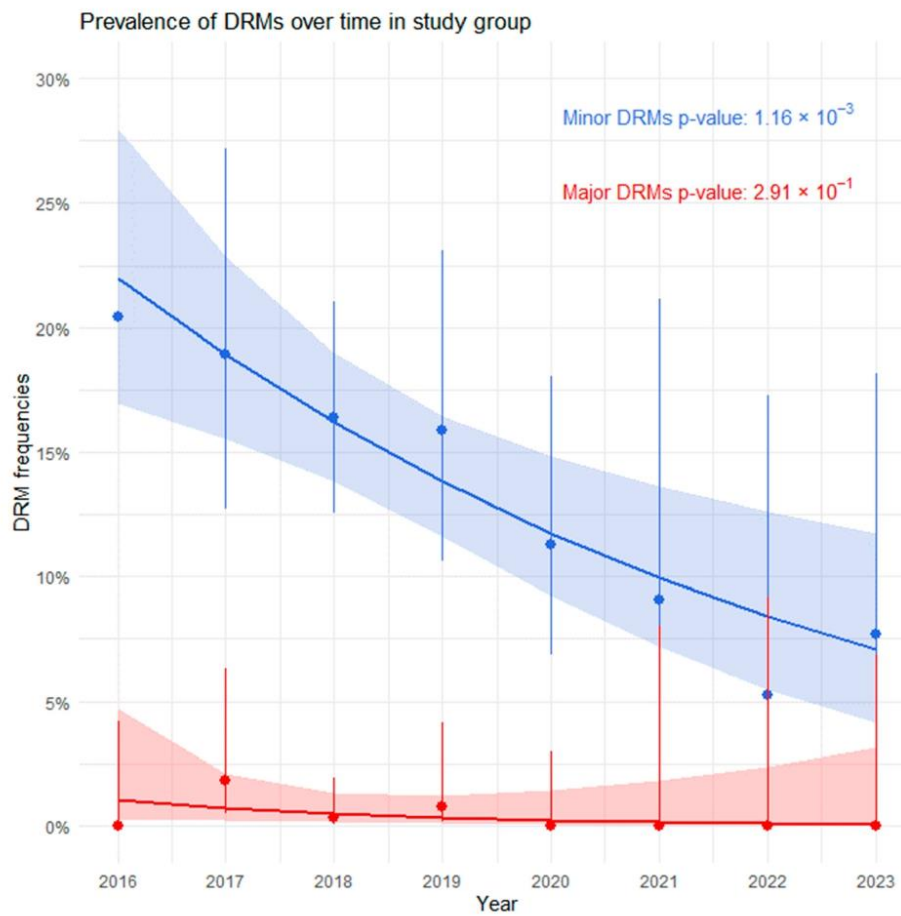


Figure 1. Logistic regression estimates for time trends between 2016 and 2023 are shown for major (red, dashed line) and minor (blue, solid line) DRMs. Dots represent the percentage per year, with vertical bars indicating 95% confidence intervals. The logistic regression trend lines are shown vertically, with shaded areas representing 95% confidence intervals for the regression estimate.

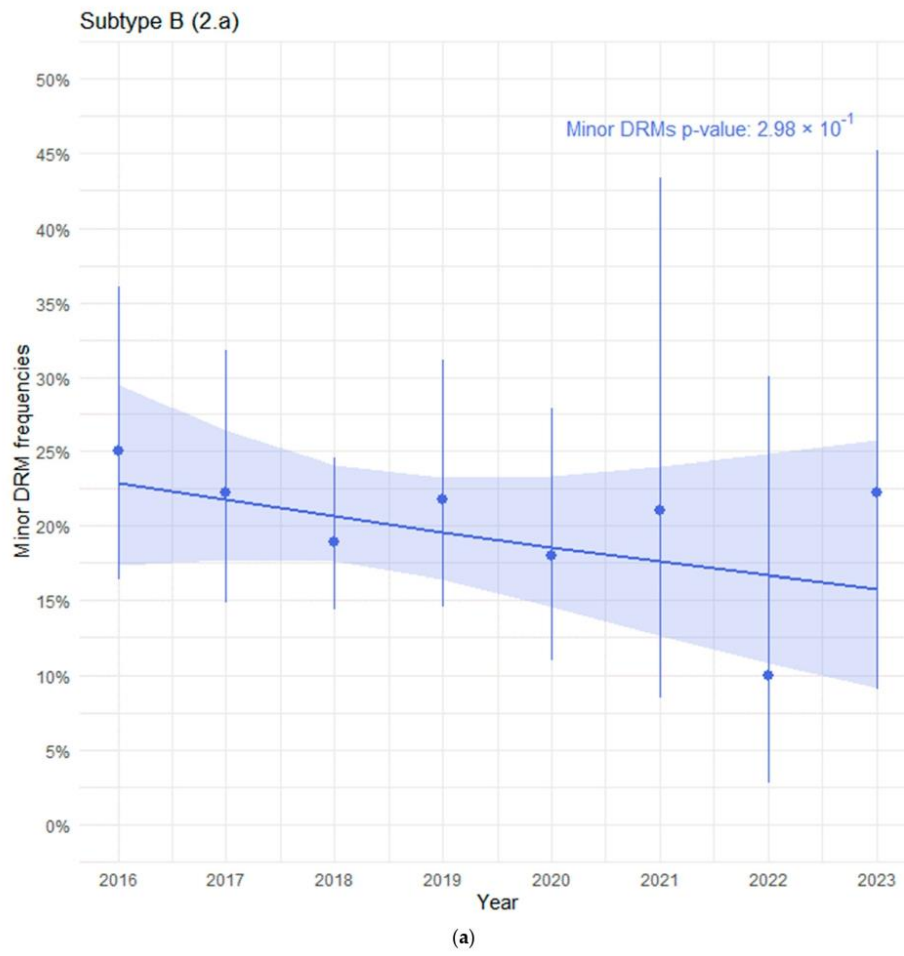


Figure 2. Cont.

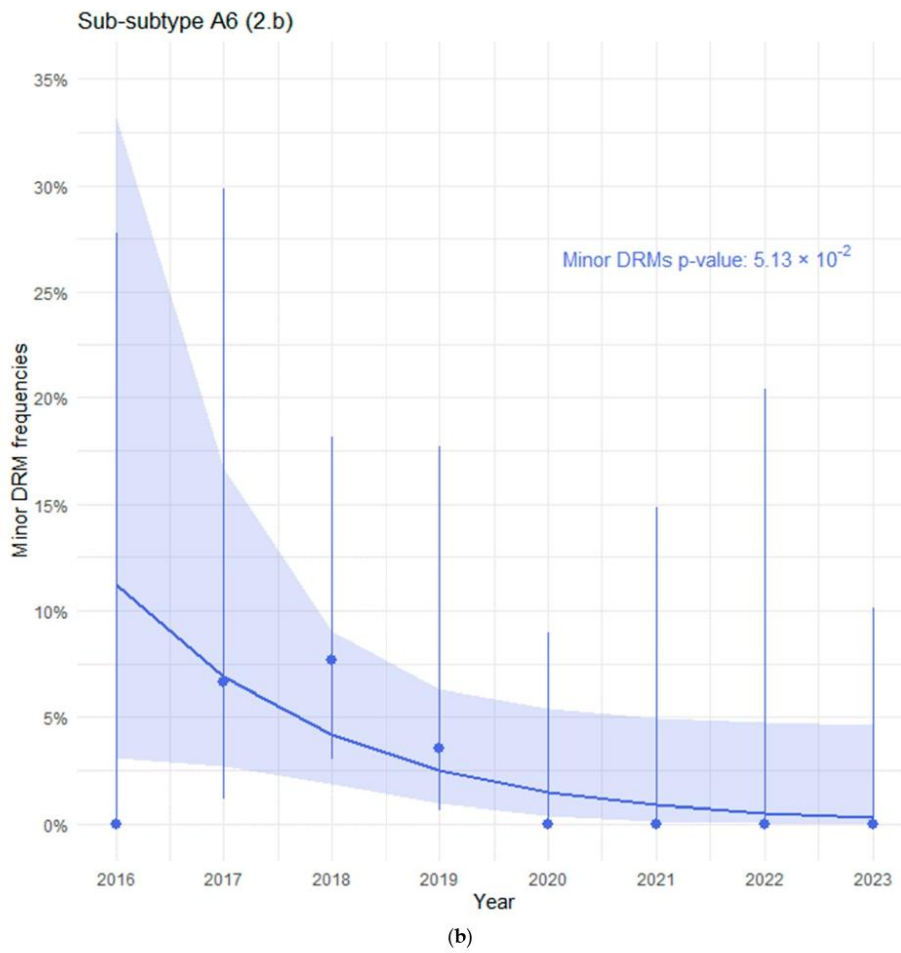


Figure 2. (a) Prevalence of minor DRMs over time among subtype B sequences. (b) Prevalence of minor DRMs over time among sub-subtype A6 sequences.

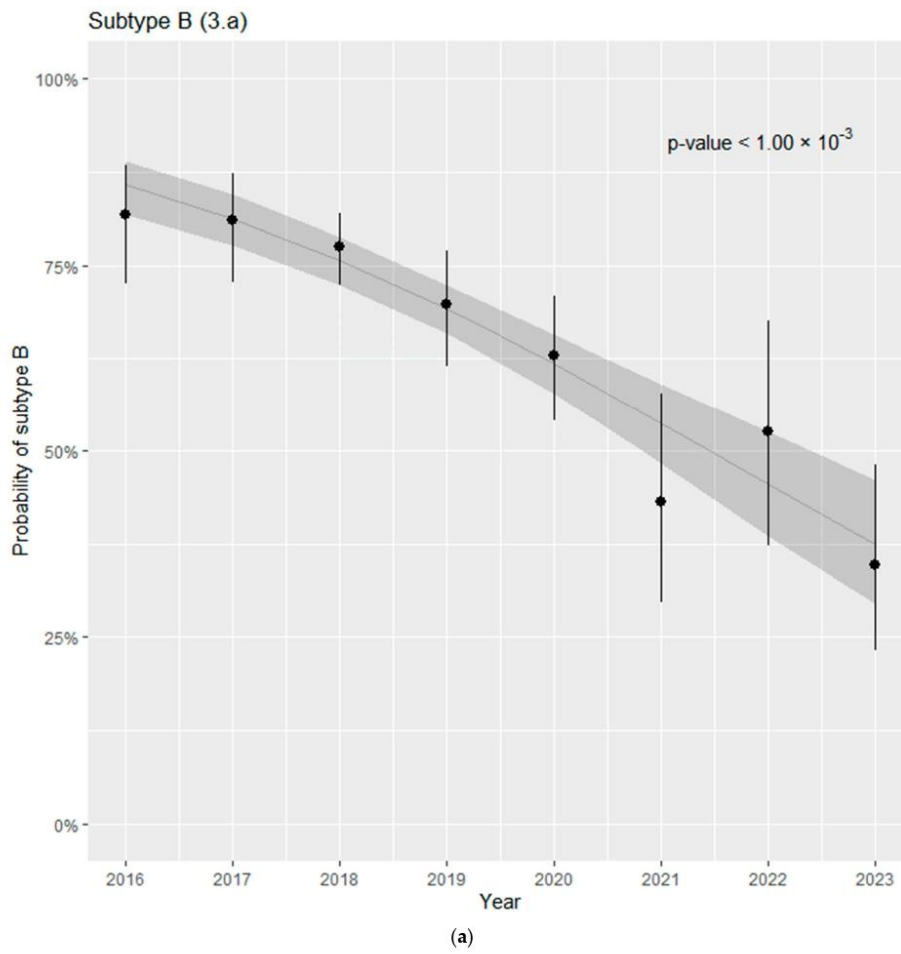


Figure 3. Cont.

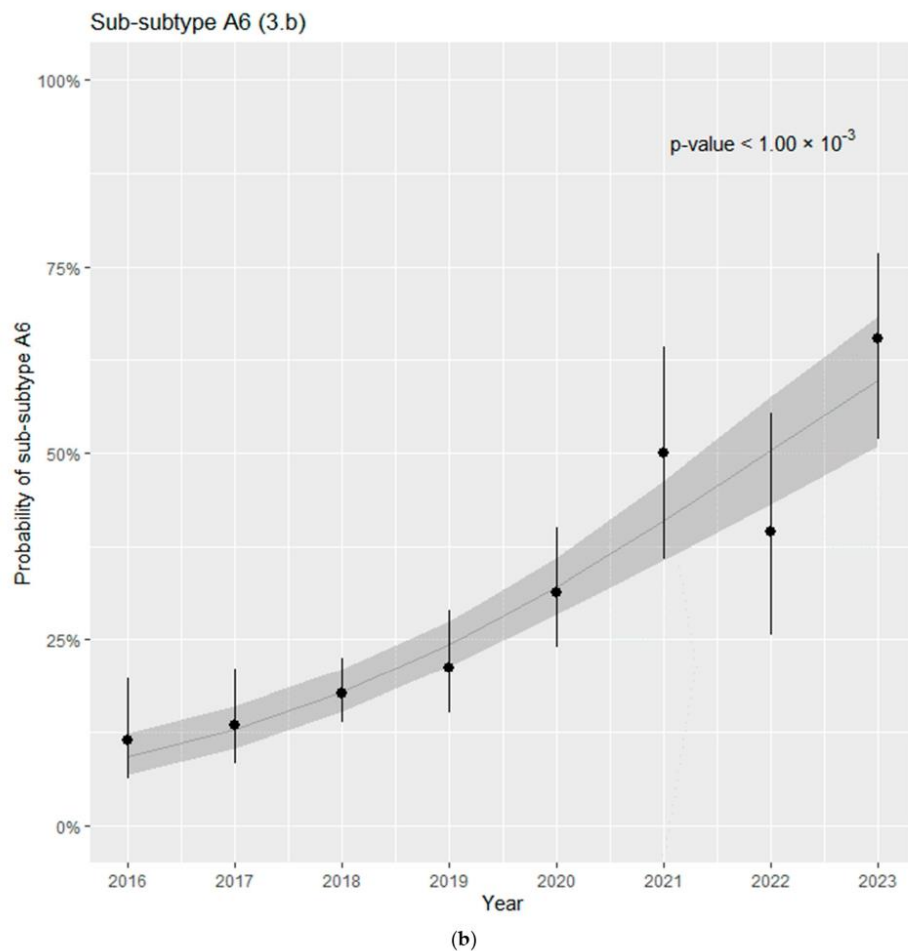


Figure 3. (a) Time trend in the prevalence of subtype B. (b) Time trend in the prevalence of sub-subtype A6.

3.4. Sequence Clusters Including Clusterings of DRMs

In total, 98 clusters were detected—72 for subtype B (Figure 4a) and 26 for sub-subtype A6 (Figure 4b).

For subtype B, there were 51 paired sequences, 6 of which had mutations: 1 with a R263K mutation, 1 with E138K and 4 with E157Q. Additionally, there were 15 clusters with 3 sequences, 3 clusters with 4 sequences, 1 cluster with 5 sequences and 2 clusters with 8 sequences.

For sub-subtype A6, there were 19 paired sequences, with 1 pair having an L74M polymorphic mutation. Moreover, six clusters with three sequences and one cluster with six sequences were found.

Overall, there were no major clusters of transmitted drug resistance.

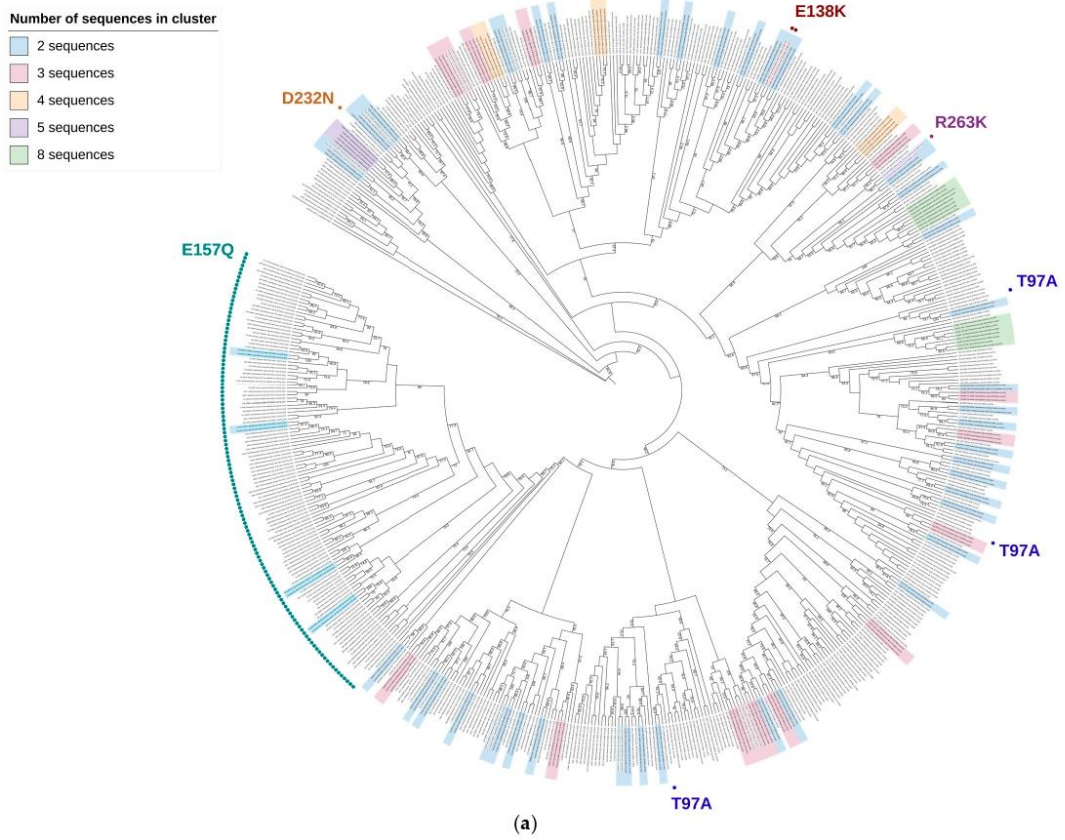


Figure 4. Cont.

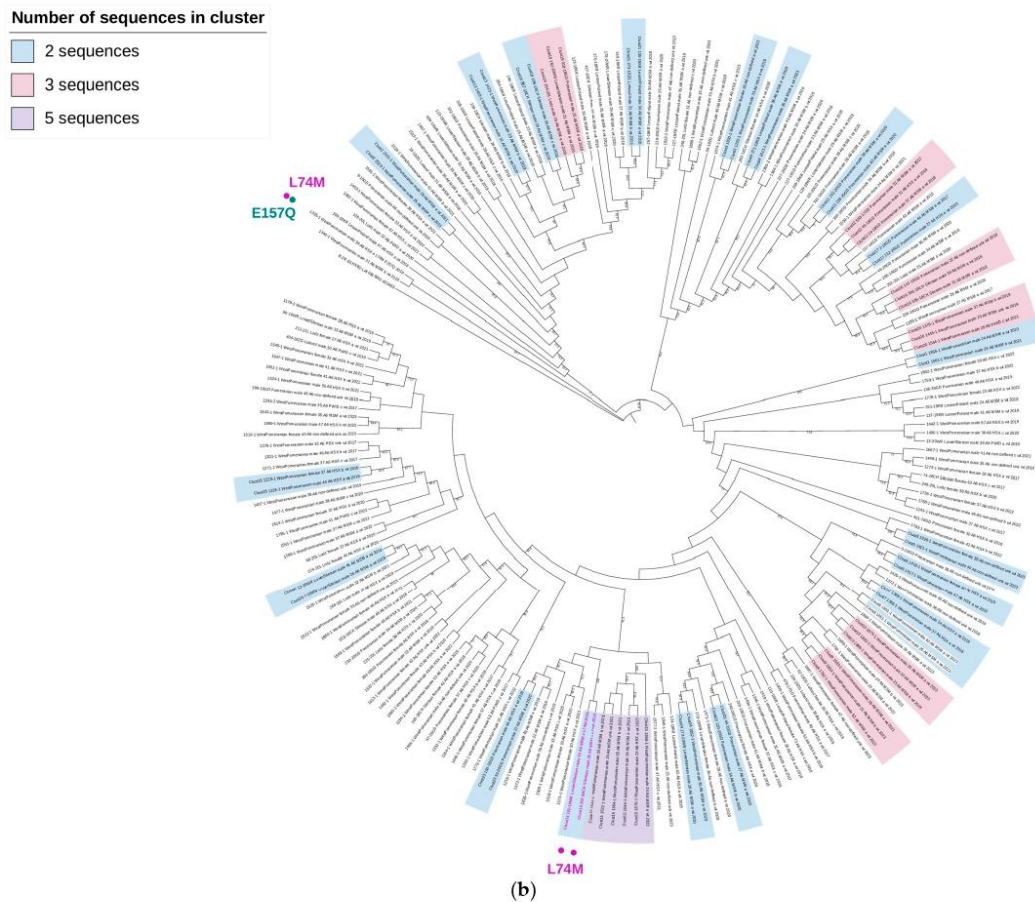


Figure 4. (a) Phylogenetic tree for subtype B. Sequences with DRMs are marked with dots. Clustering sequences are highlighted with different colors based on the number of sequences in the cluster, as indicated in the legend. Bootstrap values > 70% are shown at the branch nodes. (b) Phylogenetic tree for sub-subtype A6.

4. Discussion

This study presents new data on HIV-1 patterns of integrase inhibitor resistance variants among treatment-naïve individuals from Poland, collected between 2016 and 2023. The last Polish publication on transmitted INSTI resistance included sequences from 2010 to 2015; therefore, this study is relevant due to the current, more frequent use of integrase inhibitors among Polish patients.

The overall frequency of transmitted drug resistance was 15.31%; however, major mutations constituted only 0.45%. These results are comparable to our earlier studies, in which major mutations were observed infrequently (in the 2012 study, one R263K mutations was detected, which was then classified as a minor mutation) [29,37]. Studies from other countries show that major DRMs are found in about 0.3–1.5% of newly diagnosed people living with HIV [19,38–40]. The two major mutations detected in our study were E138K and R263K. Substitution of E138K is detected in approximately 0.15% of individuals [38,41],

and is selected in patients receiving RAL, EVG, CAB, and DTG. It confers resistance to INSTIs in combination with other mutations, although in our study it was detected alone and occurred in 0.23% of individuals. R263K, a nonpolymorphic mutation, occurs in ~0.10% of naïve individuals [38,41], it is selected *in vitro* by EVG, DTG, BIC, and CAB and reduces sensitivity to DTG, BIC and CAB by about 2-fold [11,42]. In our study, similarly to E138K, it was identified in 0.23% of sequences. Both E138K and R263K mutations can occur in conjunction with APOBEC G-to-A hypermutation; however, it was not detected in the sequences containing these mutations. Since 2020, we have not found any major DRMs, and in previous years, there was no significant trend due to the low number of mutations.

Minor mutations were detected in 14.85% of sequences, with the vast majority being the E157Q polymorphism (13.95%). Other detected DRMs included L74M (0.57%), T97A (0.34%), and D232N (0.11%). L74M is a polymorphic mutation that occurs in 1–5% of individuals depending on the subtype, and is more frequently observed in non-B subtypes [43,44]. It reduces sensitivity to INSTIs only in combination with other mutations [11,45], but in our study, it occurred alone and was observed only in sub-subtype A6.

Various studies show that the E157Q polymorphism is detected in about 2.5% of treatment-naïve patients [19,38,46]. However, depending on the subtype, its frequency may vary from 1.7% to 5.6% [47]. In the Polish population, this mutation is much more frequent—in 2012, it was observed in 28.8% of the population [37], and in 2017 in 19.19% [29]. The association between the E157Q mutation and reduced sensitivity to INSTIs is weak and this variant alone does not affect sensitivity to INSTIs *in vitro* [48]. In our study, only one combination with the E157Q mutation, E157Q + L74M, was observed, but it had no significant effect on resistance. However, according to the Stanford database, it may show potentially low resistance to raltegravir and elvitegravir, while the French ANRS database associates this substitution with full resistance to first-generation INSTIs [49]. Studies in real-world settings show that a small percentage of patients who carry the E157Q variant experience virological failure when treated with RAL or EVG [46,50].

Additionally, in our study, E157Q was more frequently observed among subtype B, women and injection drug users, which is in line with a previous Polish study [29]. The significant prevalence of the E157Q mutation in the subtype B population in Poland might indicate a weak founder effect, potentially resulting from a virus that was previously transmitted extensively among IDUs. The higher prevalence of this substitution in IDUs may be also related to their weaker adherence and more frequent virological failure, predisposing them to the development of drug resistance [51].

In Poland, a continuous decrease in the frequency of minor mutations (mainly E157Q) has been observed—in 2012, it was 38.5% [37], dropped to 21.5% in 2017 [29], and currently it is 14.85%. We did not observe significant differences in the distribution of minor mutations by year for gender or subtype. Regarding the route of transmission, a statistically significant downward trend is observed in heterosexual infections, which may be related to the fact that the E157Q variant mainly occurs in subtype B associated with MSM infections. Since we observed a systematic decrease in the prevalence of subtype B in Poland, the frequency of the E157Q mutation, which is a polymorphic variant for this subtype, is also decreasing. For sub-subtype A6, of which prevalence is significantly increasing, the E157Q mutation is not polymorphic and was detected in only one individual (0.81%).

Furthermore, the E157Q polymorphism clustered within subtype B—four pairs of sequences with this mutation were detected. Other studies have also observed clustering of this mutation [37,52]. In a previous Polish study, the E157Q variant was present in a large cluster of 33 sequences, which were transmitted to heterosexually infected female partners and associated with a history of injection drug use [29]. We did not observe such a trend in our clusters, as transmission route was unknown for four individuals, while the remaining consisted of two MSM, one IDU, and one heterosexual transmission.

The change in the distribution of subtypes over the last few years is noteworthy. There is a clear downward trend in the prevalence of subtype B and an upward trend in sub-subtype A6. In our previous study conducted by Serwin et al. [53], it was estimated

that from 2015 to 2019, sub-subtype A6 was present in 8.66% of cases, while in the current study, it has already increased to 24.38%. This change is largely attributable to the Russian invasion of Ukraine, which in 2022, led to significant migration, primarily to Poland. Among the Polish population, sub-subtype A6 was found in 16.4% of cases, while in migrants it was present in 75.0% of cases. Although no major mutations were observed among migrants and the E157Q variant was rare, it is important to note that sub-subtype A6 is associated with mutations at position L74, which are linked to the development of resistance to cabotegravir. In our study, the L74I polymorphism was frequent.

The study has several limitations. There was no systematic sampling of patients for integrase resistance analyses as there is no national systematic drug resistance surveillance program. Polish centers provided materials collected from patients for primary transmitted drug-resistance analysis based on physicians' request. Additionally, the study covers centers following up patients from approximately half the territory of Poland. Therefore, the study does not fully reflect the prevalence of integrase DRMs in the overall population, but remains the largest Polish cohort to date. It was also impossible to confirm whether all cases were truly treatment-naïve as it was self-reported by patients.

5. Conclusions

In conclusion, transmitted resistance to integrase inhibitors remains low, with a high frequency of the polymorphic E157Q mutation, which is more prevalent in the Polish population compared to other countries and primarily observed among females and injection drug users. The frequency of minor mutations continues to decrease, and their clustering is less frequent compared to previous years. It is important to highlight the significant shift in the subtype distribution in Poland. Sub-subtype A6 is becoming more common, and since it is primarily associated with mutations at position L74, it may affect resistance to long-acting cabotegravir. However, despite the changes in subtype variability, major integrase transmitted DRMs continue to be rare.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/v16101597/s1>: List of GenBank accession numbers of the sequence data; Table S1: Distribution of subtypes among study group; Table S2: Subtype distribution by year of diagnosis; Table S3: Detailed information on sequences with major mutations; Table S4: Detailed information on sequences with minor mutations; Figure S1: Subtype distribution among men and women; Figure S2: Prevalence of minor DRMs over time among men (a) and women (b); Figure S3: Prevalence of minor DRMs over time among MSM (a), HET (b) and IDU (c).

Author Contributions: Conceptualization, K.M. and M.P.; methodology, K.M. and M.P.; software, K.M. and K.S.; validation, K.M. and M.P.; formal analysis, K.M. and K.S.; investigation, K.M., M.P., A.U., K.S., B.A.-W., M.K.-C., E.M., A.W., P.J., M.H., M.B.-J., E.J., A.S., B.S. and W.L.; resources, K.M., M.P., A.U., K.S., B.A.-W., M.K.-C., E.M., A.W., P.J., M.H., M.B.-J., E.J., A.S., B.S. and W.L.; data curation, K.M. and K.S.; writing—original draft preparation, K.M.; writing—review and editing, K.M., M.P. and K.S.; visualization, K.M.; supervision, M.P.; project administration, K.M. and M.P.; funding acquisition, M.P. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the Polish National Science Centre, SONATA-BIS Grant UMO-2018/30/E/NZ6/00696.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki, and approved by the Bioethical Committee of Pomeranian Medical University, Szczecin, Poland (approval number KB-0012/26/17 and KB-0012/08/12).

Informed Consent Statement: All patients gave their informed consent to the proceeding of the sample and clinical data processing to conduct this study.

Data Availability Statement: The accession numbers of the sequence data from this article have been deposited in GenBank and are available in the Supplementary Data. The data presented in this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

References

- Raffi, F.; Jaeger, H.; Quiros-Roldan, E.; Albrecht, H.; Belonosova, E.; Gatell, J.M.; Baril, J.G.; Domingo, P.; Brennan, C.; Almond, S.; et al. Once-daily dolutegravir versus twice-daily raltegravir in antiretroviral-naïve adults with HIV-1 infection (SPRING-2 study): 96 week results from a randomised, double-blind, non-inferiority trial. *Lancet Infect. Dis.* **2013**, *13*, 927–935. [CrossRef] [PubMed]
- Molina, J.M.; Clotet, B.; van Lunzen, J.; Lazzarin, A.; Cavassini, M.; Henry, K.; Kulagin, V.; Givens, N.; Brennan, C.; de Oliveira, C.F. Once-daily dolutegravir is superior to once-daily darunavir/ritonavir in treatment-naïve HIV-1-positive individuals: 96 week results from FLAMINGO. *J. Int. AIDS Soc.* **2014**, *17* (Suppl. S3). [CrossRef] [PubMed]
- Viani, R.M.; Alvero, C.; Fenton, T.; Acosta, E.P.; Hazra, R.; Townley, E.; Steimers, D.; Min, S.; Wiznia, A.; P1093 Study Team. Safety, Pharmacokinetics and Efficacy of Dolutegravir in Treatment-experienced HIV-1 Infected Adolescents: Forty-eight-week Results from IMPAACT P1093. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **2015**, *34*, 1207–1213. [CrossRef] [PubMed]
- Brooks, K.M.; Sherman, E.M.; Egelund, E.F.; Brotherton, A.; Durham, S.; Badowski, M.E.; Cluck, D.B. Integrase Inhibitors: After 10 Years of Experience, Is the Best Yet to Come? *Pharmacotherapy* **2019**, *39*, 576–598. [CrossRef]
- Sichtig, N.; Sierra, S.; Kaiser, R.; Däumer, M.; Reuter, S.; Schülter, E.; Altmann, A.; Fätkenheuer, G.; Dittmer, U.; Pfister, H.; et al. Evolution of raltegravir resistance during therapy. *J. Antimicrob. Chemother.* **2009**, *64*, 25–32. [CrossRef]
- Abram, M.E.; Hluhanich, R.M.; Goodman, D.D.; Andreatta, K.N.; Margot, N.A.; Ye, L.; Niedziela-Majka, A.; Barnes, T.L.; Novikov, N.; Chen, X.; et al. Impact of primary elvitegravir resistance-associated mutations in HIV-1 integrase on drug susceptibility and viral replication fitness. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2013**, *57*, 2654–2663. [CrossRef]
- Blanco, J.L.; Varghese, V.; Rhee, S.Y.; Gatell, J.M.; Shafer, R.W. HIV-1 integrase inhibitor resistance and its clinical implications. *J. Infect. Dis.* **2011**, *203*, 1204–1214. [CrossRef]
- Tsiang, M.; Jones, G.S.; Goldsmith, J.; Mulato, A.; Hansen, D.; Kan, E.; Tsai, L.; Bam, R.A.; Stepan, G.; Stray, K.M.; et al. Antiviral Activity of Bictegravir (GS-9883), a Novel Potent HIV-1 Integrase Strand Transfer Inhibitor with an Improved Resistance Profile. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2016**, *60*, 7086–7097. [CrossRef]
- van Wyk, J.; Ajana, F.; Bisshop, F.; De Wit, S.; Osiyemi, O.; Portilla Sogorb, J.; Routy, J.P.; Wyen, C.; Ait-Khaled, M.; Nascimento, M.C.; et al. Efficacy and Safety of Switching to Dolutegravir/Lamivudine Fixed-Dose 2-Drug Regimen vs. Continuing a Tenofovir Alafenamide-Based 3- or 4-Drug Regimen for Maintenance of Virologic Suppression in Adults Living With Human Immunodeficiency Virus Type 1: Phase 3, Randomized, Noninferiority TANGO Study. *Clin. Infect. Dis.* **2020**, *71*, 1920–1929. [CrossRef]
- Wohl, D.A.; Yazdanpanah, Y.; Baumgarten, A.; Clarke, A.; Thompson, M.A.; Brinson, C.; Hagins, D.; Ramgopal, M.N.; Antinori, A.; Wei, X.; et al. Bictegravir combined with emtricitabine and tenofovir alafenamide versus dolutegravir, abacavir, and lamivudine for initial treatment of HIV-1 infection: Week 96 results from a randomised, double-blind, multicentre, phase 3, non-inferiority trial. *Lancet HIV* **2019**, *6*, e355–e363. [CrossRef]
- Rhee, S.Y.; Grant, P.M.; Tzou, P.L.; Barrow, G.; Harrigan, P.R.; Ioannidis, J.P.A.; Shafer, R.W. A systematic review of the genetic mechanisms of dolutegravir resistance. *J. Antimicrob. Chemother.* **2019**, *74*, 3135–3149. [CrossRef] [PubMed]
- World Health Organization. *Consolidated Guidelines on HIV Prevention, Testing, Treatment, Service Delivery and Monitoring: Recommendation for Public Health Approach*; World Health Organization: Geneva, Switzerland, 2021. Available online: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK572729> (accessed on 30 August 2024).
- Swindells, S.; Lutz, T.; Van Zyl, L.; Porteiro, N.; Stoll, M.; Mitha, E.; Shon, A.; Benn, P.; Huang, J.O.; Harrington, C.M.; et al. Week 96 extension results of a Phase 3 study evaluating long-acting cabotegravir with rilpivirine for HIV-1 treatment. *Aids* **2022**, *36*, 185–194. [CrossRef] [PubMed]
- Overton, E.T.; Richmond, G.; Rizzardini, G.; Jaeger, H.; Orrell, C.; Nagimova, F.; Bredeek, F.; García Deltoro, M.; Swindells, S.; Andrade-Villanueva, J.F.; et al. Long-acting cabotegravir and rilpivirine dosed every 2 months in adults with HIV-1 infection (ATLAS-2M), 48-week results: A randomised, multicentre, open-label, phase 3b, non-inferiority study. *Lancet* **2021**, *396*, 1994–2005. [CrossRef]
- Landovitz, R.J.; Hanscom, B.S.; Clement, M.E.; Tran, H.V.; Kallas, E.G.; Magnus, M.; Sued, O.; Sanchez, J.; Scott, H.; Eron, J.J.; et al. Efficacy and safety of long-acting cabotegravir compared with daily oral tenofovir disoproxil fumarate plus emtricitabine to prevent HIV infection in cisgender men and transgender women who have sex with men 1 year after study unblinding: A secondary analysis of the phase 2b and 3 HPTN 083 randomised controlled trial. *Lancet HIV* **2023**, *10*, e767–e778. [CrossRef] [PubMed]
- Orkin, C.; Schapiro, J.M.; Perno, C.F.; Kuritzkes, D.R.; Patel, P.; DeMoor, R.; Dorey, D.; Wang, Y.; Han, K.; Van Eygen, V.; et al. Expanded Multivariable Models to Assist Patient Selection for Long-Acting Cabotegravir + Rilpivirine Treatment: Clinical Utility of a Combination of Patient, Drug Concentration, and Viral Factors Associated With Virologic Failure. *Clin. Infect. Dis.* **2023**, *77*, 1423–1431. [CrossRef]
- Chen, G.J.; Cheng, C.Y.; Yang, C.J.; Lee, N.Y.; Tang, H.J.; Huang, S.H.; Huang, M.H.; Liou, B.H.; Lee, Y.C.; Lin, C.Y.; et al. Trends of pre-treatment drug resistance in antiretroviral-naïve people with HIV-1 in the era of second-generation integrase strand-transfer inhibitors in Taiwan. *J. Antimicrob. Chemother.* **2024**, *79*, 1157–1163. [CrossRef]
- Viñuela, L.; de Salazar, A.; Fuentes, A.; Serrano-Conde, E.; Falces-Romero, I.; Pinto, A.; Portilla, I.; Masiá, M.; Peraire, J.; Gómez-Sirvent, J.L.; et al. Transmitted drug resistance to antiretroviral drugs in Spain during the period 2019–2021. *J. Med. Virol.* **2023**, *95*, e29287. [CrossRef]

19. de Salazar, A.; Viñuela, L.; Fuentes, A.; Teyssou, E.; Charpentier, C.; Lambert-Niclot, S.; Serrano-Conde, E.; Pingarilho, M.; Fabeni, L.; De Monte, A.; et al. Transmitted Drug Resistance to Integrase-Based First-Line Human Immunodeficiency Virus Antiretroviral Regimens in Mediterranean Europe. *Clin. Infect. Dis.* **2023**, *76*, 1628–1635. [\[CrossRef\]](#)
20. Ntamungiro, A.J.; Kagura, J.; Weisser, M.; Francis, J.M. Pre-treatment HIV-1 drug resistance in antiretroviral therapy-naive adults in Eastern Africa: A systematic review and meta-analysis. *J. Antimicrob. Chemother.* **2022**, *77*, 3231–3241. [\[CrossRef\]](#)
21. Planinić, A.; Begovac, J.; Rokić, F.; Šimičić, P.; Oroz, M.; Jakovac, K.; Vugrek, O.; Zidovec-Lepej, S. Characterization of Human Immunodeficiency Virus-1 Transmission Clusters and Transmitted Drug-Resistant Mutations in Croatia from 2019 to 2022. *Viruses* **2023**, *15*, 2408. [\[CrossRef\]](#)
22. Cheung, P.K.; Shahid, A.; Dong, W.; Lepik, K.J.; Montaner, J.S.G.; Brockman, M.A.; Brumme, Z.L.; Brumme, C.J. Impact of combinations of clinically observed HIV integrase mutations on phenotypic resistance to integrase strand transfer inhibitors (INSTIs): A molecular study. *J. Antimicrob. Chemother.* **2022**, *77*, 979–988. [\[CrossRef\]](#)
23. Branda, F.; Giovanetti, M.; Sernicola, L.; Farcomeni, S.; Ciccozzi, M.; Borsetti, A. Comprehensive Analysis of HIV-1 Integrase Resistance-Related Mutations in African Countries. *Pathogens* **2024**, *13*, 102. [\[CrossRef\]](#)
24. Kirichenko, A.; Lapovok, I.; Baryshev, P.; van de Vijver, D.A.M.C.; van Kampen, J.J.A.; Boucher, C.A.B.; Paraskevis, D.; Kireev, D. Genetic Features of HIV-1 Integrase Sub-Subtype A6 Predominant in Russia and Predicted Susceptibility to INSTIs. *Viruses* **2020**, *12*, 838. [\[CrossRef\]](#)
25. Lapovok, I.; Laga, V.; Kazennova, E.; Bobkova, M. HIV Type 1 Integrase Natural Polymorphisms in Viral Variants Circulating in FSU Countries. *Curr. HIV Res.* **2017**, *15*, 318–326. [\[CrossRef\]](#)
26. Hu, Z.; Cordwell, T.; Nguyen, H.; Li, J.; Jeffrey, J.L.; Kuritzkes, D.R. Effect of the L74I Polymorphism on Fitness of Cabotegravir-Resistant Variants of Human Immunodeficiency Virus 1 Subtype A6. *J. Infect. Dis.* **2023**, *228*, 1352–1356. [\[CrossRef\]](#)
27. Serwin, K.; Chaillon, A.; Scheibe, K.; Urbańska, A.; Aksak-Wąs, B.; Zabek, P.; Siwak, E.; Cielniak, I.; Jabłonowska, E.; Wójcik-Cichy, K.; et al. Circulation of Human Immunodeficiency Virus 1 A6 Variant in the Eastern Border of the European Union—Dynamics of the Virus Transmissions Between Poland and Ukraine. *Clin. Infect. Dis.* **2023**, *76*, 1716–1724. [\[CrossRef\]](#)
28. Parczewski, M.; Jabłonowska, E.; Wójcik-Cichy, K.; Zhyvytsia, D.; Witak-Jędra, M.; Leszczyszyn-Pynka, M.; Aksak-Wąs, B.; Siwak, E.; Cielniak, I.; Olczak, A.; et al. Clinical Perspective on Human Immunodeficiency Virus Care of Ukrainian War Refugees in Poland. *Clin. Infect. Dis.* **2023**, *76*, 1708–1715. [\[CrossRef\]](#)
29. Parczewski, M.; Leszczyszyn-Pynka, M.; Urbańska, A. Differences in the integrase and reverse transcriptase transmitted resistance patterns in Northern Poland. *Infect. Genet. Evol.* **2017**, *49*, 122–129. [\[CrossRef\]](#)
30. Parczewski, M.; Sulkowska, E.; Urbańska, A.; Scheibe, K.; Serwin, K.; Grabarczyk, P. Transmitted HIV drug resistance and subtype patterns among blood donors in Poland. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 12734. [\[CrossRef\]](#)
31. Van Laethem, K.; Schrooten, Y.; Covens, K.; Dekeersmaecker, N.; De Munter, P.; Van Wijngaerden, E.; Van Ranst, M.; Vandamme, A.M. A genotypic assay for the amplification and sequencing of integrase from diverse HIV-1 group M subtypes. *J. Virol. Methods* **2008**, *153*, 176–181. [\[CrossRef\]](#)
32. Rhee, S.Y.; Gonzales, M.J.; Kantor, R.; Betts, B.J.; Ravela, J.; Shafer, R.W. Human immunodeficiency virus reverse transcriptase and protease sequence database. *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31*, 298–303. [\[CrossRef\]](#)
33. Madeira, F.; Park, Y.M.; Lee, J.; Buso, N.; Gur, T.; Madhusoodanan, N.; Basutkar, P.; Tivey, A.R.N.; Potter, S.C.; Finn, R.D.; et al. The EMBL-EBI search and sequence analysis tools APIs in 2019. *Nucleic Acids Res.* **2019**, *47*, W636–W641. [\[CrossRef\]](#)
34. Nguyen, L.T.; Schmidt, H.A.; von Haeseler, A.; Minh, B.Q. IQ-TREE: A fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. *Mol. Biol. Evol.* **2015**, *32*, 268–274. [\[CrossRef\]](#)
35. Ragonnet-Cronin, M.; Hodcroft, E.; Hué, S.; Fearnhill, E.; Delpech, V.; Brown, A.J.; Lycett, S.; UK HIV Drug Resistance Database. Automated analysis of phylogenetic clusters. *BMC Bioinform.* **2013**, *14*, 317. [\[CrossRef\]](#)
36. Letunic, I.; Bork, P. Interactive Tree Of Life (iTOL) v4: Recent updates and new developments. *Nucleic Acids Res.* **2019**, *47*, W256–W259. [\[CrossRef\]](#)
37. Parczewski, M.; Bander, D.; Urbańska, A.; Boroń-Kaczmarek, A. HIV-1 integrase resistance among antiretroviral treatment naive and experienced patients from Northwestern Poland. *BMC Infect. Dis.* **2012**, *12*, 368. [\[CrossRef\]](#)
38. Bailey, A.J.; Rhee, S.Y.; Shafer, R.W. Integrase Strand Transfer Inhibitor Resistance in Integrase Strand Transfer Inhibitor-Naive Persons. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **2021**, *37*, 736–743. [\[CrossRef\]](#)
39. Fiebig, U.; Altmann, B.; Hauser, A.; Koppe, U.; Hanke, K.; Gunsenheimer-Bartmeyer, B.; Bremer, V.; Baumgarten, A.; Bannert, N. Transmitted drug resistance and subtype patterns of viruses from reported new HIV diagnoses in Germany, 2017–2020. *BMC Infect. Dis.* **2023**, *23*, 673. [\[CrossRef\]](#)
40. McClung, R.P.; Oster, A.M.; Ocfemia, M.C.B.; Saduvala, N.; Heneine, W.; Johnson, J.A.; Hernandez, A.L. Transmitted Drug Resistance Among Human Immunodeficiency Virus (HIV)-1 Diagnoses in the United States, 2014–2018. *Clin. Infect. Dis.* **2022**, *74*, 1055–1062. [\[CrossRef\]](#)
41. Tzou, P.L.; Rhee, S.Y.; Descamps, D.; Clutter, D.S.; Hare, B.; Mor, O.; Grude, M.; Parkin, N.; Jordan, M.R.; Bertagnolio, S.; et al. Integrase strand transfer inhibitor (INSTI)-resistance mutations for the surveillance of transmitted HIV-1 drug resistance. *J. Antimicrob. Chemother.* **2020**, *75*, 170–182. [\[CrossRef\]](#)
42. Rhee, S.Y.; Parkin, N.; Harrigan, P.R.; Holmes, S.; Shafer, R.W. Genotypic correlates of resistance to the HIV-1 strand transfer integrase inhibitor cabotegravir. *Antivir. Res.* **2022**, *208*, 105427. [\[CrossRef\]](#)

43. Ji, H.; Patterson, A.; Taylor, T.; Rank, C.; Halverson, J.; Capina, R.; Brooks, J.; Sandstrom, P. Prevalence of Primary Drug Resistance Against HIV-1 Integrase Inhibitors in Canada. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* **2018**, *78*, e1–e3. [CrossRef]
44. Engone-Ondo, J.D.; Bignoumba, M.; Boundzanga Moussavou, P.; Gafou, A.; Diane, A.; Yangawagou, L.M.; Kassa Kassa, R.F.; Onanga, R.; Mouinga-Ondémé, A.; Aghokeng, A.F. HIV-1 non-B resistance mutations and natural polymorphisms to integrase strand transfer inhibitors in recently diagnosed patients in Gabon, Central Africa. *J. Antimicrob. Chemother.* **2022**, *77*, 2035–2037. [CrossRef]
45. Zhang, W.W.; Cheung, P.K.; Oliveira, N.; Robbins, M.A.; Harrigan, P.R.; Shahid, A. Accumulation of Multiple Mutations In Vivo Confers Cross-Resistance to New and Existing Integrase Inhibitors. *J. Infect. Dis.* **2018**, *218*, 1773–1776. [CrossRef]
46. Charpentier, C.; Malet, I.; Andre-Garnier, E.; Storto, A.; Bocket, L.; Amiel, C.; Morand-Joubert, L.; Tumiutto, C.; Nguyen, T.; Maillard, A.; et al. Phenotypic analysis of HIV-1 E157Q integrase polymorphism and impact on virological outcome in patients initiating an integrase inhibitor-based regimen. *J. Antimicrob. Chemother.* **2018**, *73*, 1039–1044. [CrossRef]
47. Charpentier, C.; Descamps, D. Resistance to HIV Integrase Inhibitors: About R263K and E157Q Mutations. *Viruses* **2018**, *10*, 41. [CrossRef]
48. Saladini, F.; Giannini, A.; Boccutto, A.; Tiezzi, D.; Vicenti, I.; Zazzi, M. The HIV-1 integrase E157Q polymorphism per se does not alter susceptibility to raltegravir and dolutegravir in vitro. *Aids* **2017**, *31*, 2307–2309. [CrossRef]
49. Agence National de Recherche sur le SIDA (ANRS). HIV-1 Genotypic Drug Resistance Interpretation's Algorithms. Available online: <https://hivfrenchresistance.org/> (accessed on 21 August 2024).
50. Uno, S.; Gatanaga, H.; Hayashida, T.; Imahashi, M.; Minami, R.; Koga, M.; Samukawa, S.; Watanabe, D.; Fujii, T.; Tateyama, M.; et al. Virological outcomes of various first-line ART regimens in patients harbouring HIV-1 E157Q integrase polymorphism: A multicentre retrospective study. *J. Antimicrob. Chemother.* **2023**, *78*, 2859–2868. [CrossRef]
51. Palumbo, P.J.; Zhang, Y.; Fogel, J.M.; Guo, X.; Clarke, W.; Breaud, A.; Richardson, P.; Piwowar-Manning, E.; Hart, S.; Hamilton, E.L.; et al. HIV drug resistance in persons who inject drugs enrolled in an HIV prevention trial in Indonesia, Ukraine, and Vietnam: HPTN 074. *PLoS ONE* **2019**, *14*, e0223829. [CrossRef]
52. Ambrosioni, J.; Rico, J.Á.F.; Nicolás, D.; Mosquera, M.M.; de Lazzari, E.; Marcos, M.Á.; García, F.; Miró, J.M.; Hospital Clinic Acute/Recent HIV infection Study Group. E157Q integrase strand-transfer inhibitor substitution in patients with acute/recent HIV infection. *Aids* **2019**, *33*, 1613–1617. [CrossRef]
53. Serwin, K.; Urbańska, A.; Scheibe, K.; Witak-Jędra, M.; Jankowska, M.; Hlebowicz, M.; Bociaga-Jasik, M.; Kalinowska-Nowak, A.; Biała, M.; Cieplucha, H.; et al. Molecular epidemiology and HIV-1 variant evolution in Poland between 2015 and 2019. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 16609. [CrossRef]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

12. ZGODA KOMISJI BIOETYCZNEJ

POMORSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY
W SZCZECINIE
KOMISJA BIOETYCZNA
70-204 Szczecin, ul. Rybacka 1
tel: +48 91 4800 773 fax: +48 91 4800 842
e-mail: bioetyka@pum.edu.pl



Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie

KB-0012/118/04/19

Szczecin, dnia 11.04.2019 r.

Sz.P.

Prof. dr hab. n. med. Miłosz Parczewski
Klinika Chorób Zakaźnych, Tropikalnych
i Nabytych Niedoborów Immunologicznych
PUM w Szczecinie

ul. Arkońska 4
71-455 Szczecin

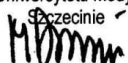
Uprzejmie informuję o zgodności tematów realizowanych w Klinice Chorób Zakaźnych, Tropikalnych i Nabytych Niedoborów Immunologicznych z realizowaniem programu badawczego Narodowego Centrum Nauki (NCN).

Uprzejmie informuję, że następujące opinie Komisji Bioetycznej PUM w Szczecinie:

1. KB-0012/26/17 "Zmienność molekularna HCV w regionach NS3, NS5A i NS5B a lekooporność na bezpośrednio działające preparaty przeciwwirusowe stosowane w leczeniu przewlekłego wirusowego zapalenia wątroby typu C",
2. KB-0012/08/12 „Sekwencjonowanie całości genomu HIV-1 dla subtypów nie-B oraz dla pacjentów o naturalnie niskiej wirēmii z subtypem HIV-1 B”.

umożliwiają realizację projektu badawczego pn.: "Użycie modeli molekularnych dla nadzoru nad lekoopornością i przewidywania rozwoju sieci transmisji HIV i HCV".

PRZEWODNICZĄCY
Komisji Bioetycznej
Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w
Szczecinie


prof. dr hab. n. med. Marek Drożdżik

13. OŚWIADCZENIA WSPÓLAUTORÓW

Szczecin 30.10.2024 r.

prof. dr hab. n. med. Miłosz Parczewski
Klinika Chorób Zakaźnych, Tropikalnych
i Nabytych Niedoborów Immunologicznych
Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie

OŚWIADCZENIE WSPÓLAUTORA

Potwierdzam mój wkład pracy w przygotowanie następujących publikacji:

1. Scheibe K, Urbańska A, Jakubowski P, Hlebowicz M, Bociąga-Jasik M, Raczyńska A, Szymczak A, Szetela B, Łojewski W, Parczewski M. Low prevalence of doravirine-associated resistance mutations among polish human immunodeficiency-1 (HIV-1)-infected patients. *Antiviral therapy*. 2021;26(3-5):69–78. <https://doi.org/10.1177/13596535211043044>
2. Scheibe K, Urbańska A, Serwin K, Parczewski M. Frequency of genotypic factors possibly associated with cabotegravir/rilpivirine failure in antiretroviral treatment-naïve and -experienced HIV-1- infected population. *Infect Genet Evol*. 2022;104:105358. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2022.105358>
3. Mielczak K, Serwin K, Urbańska A, Aksak-Wąs B, Karasińska-Cieślak M, Mularska E, Witor A, Jakubowski P, Hlebowicz M, Bociąga-Jasik M, Jabłonowska E, Szymczak A, Szetela B, Łojewski W, Parczewski M. Frequency of Major Transmitted Integrase Resistance in Poland Remains Low Despite Change in Subtype Variability. *Viruses*. 2024;16(10):1597. <https://doi.org/10.3390/v16101597>

Mój wkład pracy w w/w publikacjach polegał na rekrutacji pacjentów do badania, zarządzaniu danymi oraz nadzorowaniu przygotowania manuskryptów.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez mgr Kaję Mielczak w/w publikacji w postępowaniu o nadanie stopnia doktora nauk medycznych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część w/w prac wykazuje indywidualny wkład mgr Kai Mielczak przy opracowaniu koncepcji, wykonaniu części eksperymentalnej, opracowaniu i interpretacji wyników.

KIEROWNIK
Kliniki Chorób Zakaźnych, Tropikalnych
i Nabytych Niedoborów Immunologicznych
prof. dr hab. n. med. Miłosz Parczewski

Szczecin 29.10.2024 r.

dr n. med. Anna Urbańska
Klinika Chorób Zakaźnych, Tropikalnych
i Nabytych Niedoborów Immunologicznych
Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Potwierdzam mój wkład pracy w przygotowanie następujących publikacji:

1. Scheibe K, Urbańska A, Jakubowski P, Hlebowicz M, Bociąga-Jasik M, Raczyńska A, Szymczak A, Szetela B, Łojewski W, Parczewski M. Low prevalence of doravirine-associated resistance mutations among polish human immunodeficiency-1 (HIV-1)-infected patients. *Antiviral therapy*. 2021;26(3-5):69–78. <https://doi.org/10.1177/13596535211043044>
2. Scheibe K, Urbańska A, Serwin K, Parczewski M. Frequency of genotypic factors possibly associated with cabotegravir/rilpivirine failure in antiretroviral treatment-naïve and -experienced HIV-1- infected population. *Infect Genet Evol*. 2022;104:105358. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2022.105358>
3. Mielczak K, Serwin K, Urbańska A, Aksak-Wąs B, Karasińska-Cieślak M, Mularska E, Witor A, Jakubowski P, Hlebowicz M, Bociąga-Jasik M, Jabłonowska E, Szymczak A, Szetela B, Łojewski W, Parczewski M. Frequency of Major Transmitted Integrase Resistance in Poland Remains Low Despite Change in Subtype Variability. *Viruses*. 2024;16(10):1597. <https://doi.org/10.3390/v16101597>

Mój wkład pracy w w/w publikacjach polegał na wykonaniu części eksperymentalnej i opracowaniu wyników.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez mgr Kaję Mielczak w/w publikacji w postępowaniu o nadanie stopnia doktora nauk medycznych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część w/w prac wykazuje indywidualny wkład mgr Kai Mielczak przy opracowaniu koncepcji, wykonaniu części eksperymentalnej, opracowaniu i interpretacji wyników.

6738 dr n. med. Anna Urbańska
specjalista
laboratoryjnej diagnostyki
medycznej

Anna Urbańska

Szczecin 30.10.2024 r.

dr hab. n. med. Karol Serwin
Klinika Chorób Zakaźnych, Tropikalnych
i Nabytych Niedoborów Immunologicznych
Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie

OŚWIADCZENIE WSPÓLAUTORA

Potwierdzam mój wkład pracy w przygotowanie następujących publikacji:

1. Scheibe K, Urbańska A, Serwin K, Parczewski M. Frequency of genotypic factors possibly associated with cabotegravir/rilpivirine failure in antiretroviral treatment-naïve and -experienced HIV-1- infected population. *Infect Genet Evol.* 2022;104:105358. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2022.105358>

Mój wkład pracy polegał na opracowaniu wyników.

2. Mielczak K, Serwin K, Urbańska A, Aksak-Wąs B, Karasińska-Cieślak M, Mularska E, Witor A, Jakubowski P, Hlebowicz M, Bociąga-Jasik M, Jabłonowska E, Szymczak A, Szetela B, Lojewski W, Parczewski M. Frequency of Major Transmitted Integrase Resistance in Poland Remains Low Despite Change in Subtype Variability. *Viruses.* 2024;16(10):1597. <https://doi.org/10.3390/v16101597>

Mój wkład pracy polegał na opracowaniu wyników.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez mgr Kaję Mielczak w/w publikacji w postępowaniu o nadanie stopnia doktora nauk medycznych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część w/w prac wykazuje indywidualny wkład mgr Kai Mielczak przy opracowaniu koncepcji, wykonaniu części eksperymentalnej, opracowaniu i interpretacji wyników.



Szczecin 30.10.2024 r.

dr hab. n. med. Bogusz Aksak-Wąs
Klinika Chorób Zakaźnych, Tropikalnych
i Nabytych Niedoborów Immunologicznych
Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Potwierdzam mój wkład pracy w przygotowanie publikacji

Mielczak K, Serwin K, Urbańska A, Aksak-Wąs B, Karasińska-Cieślak M, Mularska E, Witor A, Jakubowski P, Hlebowicz M, Bociąga-Jasik M, Jabłonowska E, Szymczak A, Szetela B, Łojewski W, Parczewski M. Frequency of Major Transmitted Integrase Resistance in Poland Remains Low Despite Change in Subtype Variability. *Viruses*. 2024;16(10):1597. <https://doi.org/10.3390/v16101597>

Mój wkład pracy polegał na rekrutacji pacjentów do badania oraz zarządzaniu danymi.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez mgr Kaję Mielczak w/w publikacji w postępowaniu o nadanie stopnia doktora nauk medycznych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część w/w pracy wykazuje indywidualny wkład mgr Kai Mielczak przy opracowaniu koncepcji, wykonaniu części eksperymentalnej, opracowaniu i interpretacji wyników tej pracy.

dr hab. n. med. Bogusz J. Aksak-Wąs
lekarz
specjalista chorób zakaźnych
3186609

Szczecin 30.10.2024 r.

lek. Malwina Karasińska-Cieślak
Klinika Chorób Zakaźnych, Tropikalnych
i Nabytych Niedoborów Immunologicznych
Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie

OŚWIADCZENIE WSPÓLAUTORA

Potwierdzam mój wkład pracy w przygotowanie publikacji

Mielczak K, Serwin K, Urbańska A, Aksak-Wąs B, Karasińska-Cieślak M, Mularska E, Witor A, Jakubowski P, Hlebowicz M, Bociąga-Jasik M, Jabłonowska E, Szymczak A, Szetela B, Łojewski W, Parczewski M. Frequency of Major Transmitted Integrase Resistance in Poland Remains Low Despite Change in Subtype Variability. *Viruses*. 2024;16(10):1597. <https://doi.org/10.3390/v16101597>

Mój wkład pracy polegał na rekrutacji pacjentów do badania oraz zarządzaniu danymi.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez mgr Kaję Mielczak w/w publikacji w postępowaniu o nadanie stopnia doktora nauk medycznych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część w/w pracy wykazuje indywidualny wkład mgr Kai Mielczak przy opracowaniu koncepcji, wykonaniu części eksperymentalnej, opracowaniu i interpretacji wyników tej pracy.

Malwina
Karasińska-Cieślak

Malwina Karasińska-Cieślak
lek. med.
specjalista chorób zakaźnych
2602712

Kraków 29.10.2024 r.

dr hab. n. med. Monika Bociąga-Jasik, prof. UJ
Katedra Chorób Zakaźnych
Uniwersytet Jagielloński w Krakowie

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Potwierdzam mój wkład pracy w przygotowanie następujących publikacji:

1. Scheibe K, Urbańska A, Jakubowski P, Hlebowicz M, Bociąga-Jasik M, Raczyńska A, Szymczak A, Szetela B, Łojewski W, Parczewski M. Low prevalence of doravirine-associated resistance mutations among polish human immunodeficiency-1 (HIV-1)-infected patients. *Antiviral therapy*. 2021;26(3-5):69–78. <https://doi.org/10.1177/13596535211043044>

Mój wkład pracy polegał na rekrutacji pacjentów do badania oraz zarządzaniu danymi.

1. Mielczak K, Serwin K, Urbańska A, Aksak-Wąs B, Karasińska-Cieślak M, Mularska E, Witor A, Jakubowski P, Hlebowicz M, Bociąga-Jasik M, Jabłonowska E, Szymczak A, Szetela B, Łojewski W, Parczewski M. Frequency of Major Transmitted Integrase Resistance in Poland Remains Low Despite Change in Subtype Variability. *Viruses*. 2024;16(10):1597. <https://doi.org/10.3390/v16101597>

Mój wkład pracy polegał na rekrutacji pacjentów do badania oraz zarządzaniu danymi.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez mgr Kaję Mielczak w/w publikacji w postępowaniu o nadanie stopnia doktora nauk medycznych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część w/w prac wykazuje indywidualny wkład mgr Kai Mielczak przy opracowaniu koncepcji, wykonaniu części eksperymentalnej, opracowaniu i interpretacji wyników.

29.10.2024 r

Monika Bociąga-Jasik

Kraków 29.10.2024 r.

lek. Aleksandra Raczyńska
Katedra Chorób Zakaźnych
Uniwersytet Jagielloński w Krakowie

OŚWIADCZENIE WSPÓLAUTORA

Potwierdzam mój wkład pracy w przygotowanie publikacji

Scheibe K, Urbańska A, Jakubowski P, Hlebowicz M, Bociąga-Jasik M, Raczyńska A, Szymczak A, Szetela B, Łojewski W, Parczewski M. Low prevalence of doravirine-associated resistance mutations among polish human immunodeficiency-1 (HIV-1)-infected patients. *Antiviral therapy*. 2021;26(3-5):69–78. <https://doi.org/10.1177/13596535211043044>

Mój wkład pracy polegał na rekrutacji pacjentów do badania oraz zarządzaniu danymi.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez mgr Kaję Mielczak w/w publikacji w postępowaniu o nadanie stopnia doktora nauk medycznych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część w/w pracy wykazuje indywidualny wkład mgr Kai Mielczak przy opracowaniu koncepcji, wykonaniu części eksperymentalnej, opracowaniu i interpretacji wyników tej pracy.

29. 10 . 2024

A Racyńska

Wrocław, 29.10.2024 r.

dr n. med. Bartosz Szetela
Katedra i Klinika Chorób Zakaźnych,
Chorób Wątroby i Nabytych Niedoborów Odpornościowych
Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu

OŚWIADCZENIE WSPÓLAUTORA

Potwierdzam mój wkład pracy w przygotowanie następujących publikacji:

1. Scheibe K, Urbańska A, Jakubowski P, Hlebowicz M, Bociąga-Jasik M, Raczyńska A, Szymczak A, Szetela B, Łojewski W, Parczewski M. Low prevalence of doravirine-associated resistance mutations among polish human immunodeficiency-1 (HIV-1)-infected patients. *Antiviral therapy*. 2021;26(3-5):69–78. <https://doi.org/10.1177/13596535211043044>

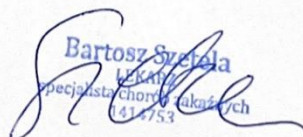
Mój wkład pracy polegał na rekrutacji pacjentów do badania oraz zarządzaniu danymi.

2. Mielczak K, Serwin K, Urbańska A, Aksak-Wąs B, Karasińska-Cieślak M, Mularska E, Witor A, Jakubowski P, Hlebowicz M, Bociąga-Jasik M, Jabłonowska E, Szymczak A, Szetela B, Łojewski W, Parczewski M. Frequency of Major Transmitted Integrase Resistance in Poland Remains Low Despite Change in Subtype Variability. *Viruses*. 2024;16(10):1597. <https://doi.org/10.3390/v16101597>

Mój wkład pracy polegał na rekrutacji pacjentów do badania oraz zarządzaniu danymi.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez mgr Kaję Mielczak w/w publikacji w postępowaniu o nadanie stopnia doktora nauk medycznych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część w/w prac wykazuje indywidualny wkład mgr Kai Mielczak przy opracowaniu koncepcji, wykonaniu części eksperymentalnej, opracowaniu i interpretacji wyników.


Bartosz Szetela
Lek. Kat.
Specjalista Chorób Zakaźnych
0414753

30 10 2024
Chorzów xx.xx.2024 r.

dr n. med. Adam Witor
Ośrodek Diagnostyki i Terapii AIDS
Szpital Specjalistyczny w Chorzowie

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Potwierdzam mój wkład pracy w przygotowanie publikacji

Mielczak K, Serwin K, Urbańska A, Aksak-Wąs B, Karasińska-Cieślak M, Mularska E, Witor A, Jakubowski P, Hlebowicz M, Bociąga-Jasik M, Jabłonowska E, Szymczak A, Szetela B, Łojewski W, Parczewski M. Frequency of Major Transmitted Integrase Resistance in Poland Remains Low Despite Change in Subtype Variability. *Viruses*. 2024;16(10):1597. <https://doi.org/10.3390/v16101597>

Mój wkład pracy polegał na rekrutacji pacjentów do badania oraz zarządzaniu danymi.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez mgr Kaję Mielczak w/w publikacji w postępowaniu o nadanie stopnia doktora nauk medycznych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część w/w pracy wykazuje indywidualny wkład mgr Kai Mielczak przy opracowaniu koncepcji, wykonaniu części eksperymentalnej, opracowaniu i interpretacji wyników tej pracy.

Adam Witor

Gdańsk 05.11.2024 r.

lek. spec. Paweł Jakubowski
Poradnia Leczenia Niedoborów Odporności
Szpitale Pomorskie

OŚWIADCZENIE WSPÓLAUTORA

Potwierdzam mój wkład pracy w przygotowanie następujących publikacji:

1. Scheibe K, Urbańska A, Jakubowski P, Hlebowicz M, Bociąga-Jasik M, Raczyńska A, Szymczak A, Szetela B, Łojewski W, Parczewski M. Low prevalence of doravirine-associated resistance mutations among polish human immunodeficiency-1 (HIV-1)-infected patients. *Antiviral therapy*. 2021;26(3-5):69–78. <https://doi.org/10.1177/13596535211043044>

Mój wkład pracy polegał na rekrutacji pacjentów do badania oraz zarządzaniu danymi.

2. Mielczak K, Serwin K, Urbańska A, Aksak-Wąs B, Karasińska-Cieślak M, Mularska E, Witor A, Jakubowski P, Hlebowicz M, Bociąga-Jasik M, Jabłonowska E, Szymczak A, Szetela B, Łojewski W, Parczewski M. Frequency of Major Transmitted Integrase Resistance in Poland Remains Low Despite Change in Subtype Variability. *Viruses*. 2024;16(10):1597. <https://doi.org/10.3390/v16101597>

Mój wkład pracy polegał na rekrutacji pacjentów do badania oraz zarządzaniu danymi.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez mgr Kaję Mielczak w/w publikacji w postępowaniu o nadanie stopnia doktora nauk medycznych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część w/w prac wykazuje indywidualny wkład mgr Kai Mielczak przy opracowaniu koncepcji, wykonaniu części eksperymentalnej, opracowaniu i interpretacji wyników.



dr n. med. Władysław Łojewski
Katedra Chorób Zakaźnych
Szpital Uniwersytecki im. Karola Marcinkowskiego
w Zielonej Górze

OŚWIADCZENIE WSPÓLAUTORA

Potwierdzam mój wkład pracy w przygotowanie następujących publikacji:

1. Scheibe K, Urbańska A, Jakubowski P, Hlebowicz M, Bociąga-Jasik M, Raczyńska A, Szymczak A, Szetela B, Łojewski W, Parczewski M. Low prevalence of doravirine-associated resistance mutations among polish human immunodeficiency-1 (HIV-1)-infected patients. *Antiviral therapy*. 2021;26(3-5):69–78. <https://doi.org/10.1177/13596535211043044>

Mój wkład pracy polegał na rekrutacji pacjentów do badania oraz zarządzaniu danymi.

2. Mielczak K, Serwin K, Urbańska A, Aksak-Wąs B, Karasińska-Cieślak M, Mularska E, Witor A, Jakubowski P, Hlebowicz M, Bociąga-Jasik M, Jabłonowska E, Szymczak A, Szetela B, Łojewski W, Parczewski M. Frequency of Major Transmitted Integrase Resistance in Poland Remains Low Despite Change in Subtype Variability. *Viruses*. 2024;16(10):1597. <https://doi.org/10.3390/v16101597>

Mój wkład pracy polegał na rekrutacji pacjentów do badania oraz zarządzaniu danymi.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez mgr Kaję Mielczak w/w publikacji w postępowaniu o nadanie stopnia doktora nauk medycznych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część w/w prac wykazuje indywidualny wkład mgr Kai Mielczak przy opracowaniu koncepcji, wykonaniu części eksperymentalnej, opracowaniu i interpretacji wyników.

dr n. med. Władysław Łojewski
specjalista chorób zakaźnych
9478921

Łódź 30.10.2024 r.

prof. dr hab. n. med. Elżbieta Jabłowska
Klinika Chorób Zakaźnych i Hepatologii
Uniwersytet Medyczny w Łodzi

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Potwierdzam mój wkład pracy w przygotowanie publikacji

Mielczak K, Serwin K, Urbańska A, Aksak-Wąs B, Karasińska-Cieślak M, Mularska E, Witor A, Jakubowski P, Hlebowicz M, Bociąga-Jasik M, Jabłowska E, Szymczak A, Szetela B, Łojewski W, Parczewski M. Frequency of Major Transmitted Integrase Resistance in Poland Remains Low Despite Change in Subtype Variability. *Viruses*. 2024;16(10):1597. <https://doi.org/10.3390/v16101597>

Mój wkład pracy polegał na rekrutacji pacjentów do badania oraz zarządzaniu danymi.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez mgr Kaję Mielczak w/w publikacji w postępowaniu o nadanie stopnia doktora nauk medycznych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część w/w pracy wykazuje indywidualny wkład mgr Kai Mielczak przy opracowaniu koncepcji, wykonaniu części eksperymentalnej, opracowaniu i interpretacji wyników tej pracy.

