



T.C.

**YEDİTEPE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**HIV İLE ENFEKTE OLMUŞ HASTALARDA
M41L DİRENÇ MUTASYONUNUN ‘REAL- TIME
POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU’ İLE SAPTANMASI**

(UZMANLIK TEZİ)

Dr. ZUHAL TEKKANAT TAZEGÜN

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. GÜLDEN ÇELİK**

İSTANBUL - 2011

TEŞEKKÜR

Öncelikle, Tıp Fakültesi Dekanımız Sayın Prof. Dr. Ayça VİTRİNEL'e

Uzmanlık eğitimimde hoşgörülü, huzurlu, verimli bir ortam sağlayarak, deneyimi, bilgi ve birikimi ile yetişmeme katkıda bulunan, her türlü desteğini her zaman yanımda hissettiğim, asistanı olmaktan gurur duyduğum, Anabilim Dalı Başkanımız hocam Sayın Prof. Dr. Gülden ÇELİK'e

Birlikte çalıştığım zamanlarda çok değerli zamanından ödün veren, engin bilgi birikimi ile kendisinden çok şey öğrendiğim, sabrını, okuma ve öğrenme hevesini hep takdir edeceğim ve meslek hayatımda örnek alacağım hocam Sayın Doç. Dr. İ. Çağatay ACUNER'e

İhtiyaç duyduğum her an yardımcı olan, araştırmacı ruhu, bilgi ve deneyimleri ile asistanlık dönemimde önemli bir yeri olan, hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Gülderen YANIKKAYA DEMİREL'e

Uzmanlık eğitimimin ilk gününden sonuna kadar birlikte çalışma fırsatına eriştiğim, hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Yeşim GÜROL'a

Çalışma örneklerinin sağlanmasında katkılarından dolayı, İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Sayın Doç. Dr. Kenan MİDİLLİ'ye,

Çalışmanın istatistik analizini yapan Sayın Yrd. Doç. Dr. Elif Çiğdem ALTUNOLUK'a

Dört yıl boyunca birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum, deneyimlerinden yararlandığım tüm biyolog ve tekniker arkadaşlarıma,

Bugünlere yetişmemi sağlayan, haklarını hiçbir zaman ödeyemeyeceğim, bana her zaman güç veren aileme,

En zor zamanlarımda, desteklerini esirgemeyen eşimin ailesine,

Hayatta en büyük şansım olan, değerli eşim Dr. Atakan TAZEGÜN ve hayatımın anlamı olan, bundan sonra daha çok zaman ayıracağım, biricik oğlum Arif Efe'ye

Sonsuz teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Dr. Zuhale TEKKANAT TAZEGÜN

İstanbul, 2011

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
TEŞEKKÜR	ii
İÇİNDEKİLER	iii
KISALTMALAR	v
ŞEKİL LİSTESİ.....	vi
TABLO LİSTESİ	viii
ÖZET.....	ix
ABSTRACT	xi
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. HIV Grupları, Alt Tipleri.....	3
2.2. Epidemiyoloji.....	5
2.3. HIV Virüsünün Mikrobiyolojik Özellikleri.....	8
2.4. Patogenez ve bağışıklık.....	9
2.5. HIV'in Enfekte Ettiği Hücreler ve Hücrel Hedefler.....	11
2.6. HIV Tanısı	13
2.7. HIV Tedavisi.....	14
2.7.1. HIV Replikasyonunu Baskılayan Kullanıma Onaylanmış İlaçlar ...	16
2.7.2. Revers Transkriptaz İnhibitörleri ve Direnç	18
2.7.3. Polimeraz İnhibitörleri ve Direnç.....	22
2.7.4. Giriş İnhibitörlerine (Füzyon İnhibitörlerine) Direnç	23
2.7.5. Integraz İnhibitörlerine Direnç.....	23
2.7.6. M41L Direnci.....	25
2.8. Nükleik Asit Çoğaltma Yöntemleri	26
2.8.1. Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR).....	27
2.8.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu Çeşitleri	28
2.8.3. Real Time PZR.....	29
2.8.3.1. Real Time –PZR'da Kullanılan Prob	
Sistemleri ve Boyalar	29
2.8.4. Dizi analizi	33
2.8.4.1. ABI Prism 310 Genetik Analiz Sistemi.....	35

3. YÖNTEMLER.....	36
3.1. RNA İzolasyonu.....	36
3.2. PZR Çalışmaları.....	37
3.2.1. RT-PZR Çalışmaları	37
3.2.2. İkinci PZR Çalışmaları.....	39
3.2.3. PZR Optimizasyonu	43
3.3. Sonuçlar	48
4. TARTIŞMA	52
4.1. HIV’de Direncin ve Saptanmasının Önemi	52
4.2. Dünyada HIV Direnci İle İlgili Yapılmış Çalışmalar	52
4.3. NMS-GZ-PZR Yöntemi.....	56
4.4. Türkiye’de HIV Direnci İle İlgili Yapılmış Çalışmalar.....	59
4.5. Konvansiyonel Dizi Analizi.....	59
4.6. NMS-GZ-PZR Yöntemi İle Konvansiyonel Dizi Analizi Yönteminin Karşılaştırmalı Diyagnostik Performans Analizi	60
4.7. Referans (“altın standart”) yöntemin olmadığı durumda performans analizi.....	60
4.8. Referans Yöntem (NMS-GZ-PZR Yöntemi) Varlığında ve Yokluğunda Yapılan Performans Analizlerinin Karşılaştırılması	62
4.9. Çalışma Örnekleme (ÇÖ) için NMS-GZ-PZR Yöntemi İle Elde Edilen $\Delta C_{t\text{ÇÖ}}$ Değerlerinin Analizi.....	63
4.10. $\Delta C_{t\text{ÇÖ}}$ Değerlerinin Analizi İle Belirlenen Yeni Pozitiflik Ölçütüne (ΔC_{t5} Kesim-Değeri) Göre Performans Analizi	63
4.11. $\Delta C_{t5.81}$ kesim-Değeri İle ΔC_{t10} Kesim-Değeri İle Elde Edilen Performans Analizlerinin Karşılaştırılması	63
4.12. NMS-GZ-PZR Yöntemi İle Dirençli Mutant Varyant Sub-Popülasyonların Saptanmasının Klinik Önemi	64
KAYNAKLAR	66

KISALTMALAR

PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
HIV	: Immune Deficiency Syndrome
AIDS	: Acquired Immune Deficiency Syndrome
LAV	: Lymphadenopathy Associated Virus
NIH	: National Institutes of Health
HTLV	: Human T Lymphotropic Virüs
ARV	: AIDS associated retrovirüs
CRFs	: Circulating Rekombine Forms
URFs	: Unique Rekombinant Forms
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
LTRs	: Long Terminal Repeats
SU	: Surface
TM	: Transmembrane
MALT	: Mukoza ile İlişkili Lenfoid Doku
SIV	: Simian İmmün Yetmezlik Virusü
NASBA	: Nükleik Asit Dizisine Dayalı Amplifikasyon
HAART	: Highly active antiretroviral therapy
RT	: Revers Transkriptaz
NRTI	: Nükleozid Analogu Revers Transkriptaz İnhibitörleri
NtRTI	: Nükleotid Analogu Revers Transkriptaz İnhibitörleri
ZDV, AZT	: Zidovudine
ddl	: Didanozine
d4T	: Stavudine
NNRT	: Non Nükleozid Analogu Revers Transkriptaz İnhibitörleri
PI	: Proteaz inhibitörleri
FI	: Füzyon İnhibitörleri
TAM	: Timidin Analog Mutasyonları
NAM	: Nucleoside Associated Mutations
ART	: AntiRetroviral Tedavi
AZTTP	: Zidovudine Trifosfat
IDT	: Integrated DNA Technologies
CT	: Threshold Cycle

ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa No
Şekil 1: HIV virusunun kesiti	3
Şekil 2: HIV -1 virusunun genomik yapısı.....	4
Şekil 3: HIV' in dünya üzerindeki prevalansı, coğrafi dağılım.....	5
Şekil 4: Türkiye'deki HIV (AIDS) vakalarının yıllara göre dağılımı	7
Şekil 5: HIV'in evrimi.....	10
Şekil 6: Antivirallerin etki mekanizması (De Clercq E: 2004)	18
Şekil 7: HIV revers transkriptazın üç boyutlu yapısı	19
Şekil 8: NRTI ayrılması.....	19
Şekil 9: NTRI mutasyonları.....	20
Şekil 10: NRTI çoklu ilaç direci yolları	21
Şekil 11: NNRTI Mutasyonları	21
Şekil 12: Proteaz inhibitörlerine direnç	22
Şekil 13: Giriş inhibitörlerine direnç	23
Şekil 14: Integraz inhibitörlerine direnç	23
Şekil 15: ART naif hastalarda yıllara göre HIV ilaç direç prevalansı.....	24
Şekil 16: Zidovudine direnç mutasyonu M41L' nin pozisyonu	26
Şekil 17: Polimeraz zincir reaksiyonunda bir siklusun aşamaları	28
Şekil 18: Syber Green; başlangıç aşaması	30
Şekil 19: Syber Green; Primerin hedef moleküle bağlanması.....	30
Şekil 20: Primer uzaması.....	31
Şekil 21: TaqMan Prob.....	31
Şekil 22: FRET Hibridizasyon	32
Şekil 23: Moleküler Boncuk Yöntemi "Moleküler Beacon"	33
Şekil 24: RT- PZR 52- 53 ve 54 °C 'de elde edilen ürünlerin M41L ve com PZR 52 °C 'deki amplifikasyon bölgelerinin görüntüsü	43
Şekil 25: RT- PZR 52- 53 ve 54 °C 'de elde edilen ürünlerin M41L ve com PZR 53 °C 'deki amplifikasyon bölgelerinin görüntüsü	44
Şekil 26: RT- PZR 52- 53 ve 54 °C 'de elde edilen ürünlerin M41L ve com PZR 54°C 'deki amplifikasyon bölgelerinin görüntüsü	44
Şekil 27: M41L ve com amplifikasyon bölgelerinin PZR görüntüsü.....	45

Şekil 28:	M41L bölgesinde Amplifikasyon olmamış; M41L mutasyonu negatif örnek.....	45
Şekil 29:	Δ Ct dağılımları	46
Şekil 30:	NMS-GZ-PZR PZR ve konvansiyonel dizi analizine göre pozitif ve negatif sonuçlar	51
Şekil 31:	NMS-GZ-PZR PZR ve konvansiyonel dizi analizine göre pozitif ve negatif sonuçların yüzde oranları	51
Şekil 32:	Total viral kopya sayısına kıyasla değişik oranlardaki mutant viral kopya sayılarına karşılık gelen nokta mutant-spesifik gerçek zamanlı PZR ile amplifikasyon eğrileri, Ct değerleri ve Δ Ct eşik (kesim) değeri	57

TABLO LİSTESİ

	Sayfa No
Tablo 1: Türkiye’de HIV/AIDS vakalarının yıllara göre dağılımı	6
Tablo 2: RT-PZR için kullanılan primer dizileri	37
Tablo 3: RTP –PZR karışımı	38
Tablo 4: RT-PZR şartları	38
Tablo 5: M41L Primerler ve taqman prob dizisi	39
Tablo 6: Com primerleri	40
Tablo 7: Nükleik asit bazları için tek harfli kodlar tablosu	40
Tablo 8: M41L Taqman PZR Karışımı	41
Tablo 9: Total kopya reaksiyonu Taqman PZR Karışımı.....	41
Tablo 10: 2.PZR M41L- COM Şartları	42
Tablo 11: IDT oligo analyzer sitesinden bulunan Primer ve problemlerin, Tm dereceleri.....	42
Tablo 12: Konvansiyonel Dizi analizi pozitif- NMS-GZ-PZR pozitif toplam 6 örneğin kümelenmesi	46
Tablo 13: Konvansiyonel dizi analizi negatif- NMS-GZ-PZR pozitif 10 örneğin kümelenmesi	47
Tablo 14: Konvansiyonel dizi analizi negatif- NMS-GZ-PZR negatif 16 örneğin kümelenmesi	47
Tablo 15: NMS-GZ-PZR Yöntemi ile saptanan M41L Mutant Varyant Sonuçlarının Konvansiyonel Dizi Analizi Yöntemi ile karşılaştırılması	49

ÖZET

HIV/AIDS, Sahra-altı Afrika'da birinci, dünyada ise dördüncü sıradaki ölüm nedeni olarak bildirilmektedir. AIDS'in tedavisindeki en önemli sorunlardan birisi, antiretroviral ilaçlara karşı dirençli mutantlardır. Günümüzde rutin veya epidemiyolojik amaçlı HIV antiviral direnç testleri, yaygın olarak konvansiyonel dizi analizi yöntemi ile yapılmaktadır. Oysa, son yıllarda tedavi başarısını olumsuz etkileyebilen ve total viral popülasyon içinde azınlıkta olan ilaç dirençli mutant varyantları, konvansiyonel dizi analizine kıyasla, daha duyarlı saptayan yöntemler geliştirilmiştir. Bu çalışmada, HIV tedavisinde ilk ve halen en önemli ilaç olan zidovudine ve stavudine direncinde en sık karşılaşılan mutasyonlardan biri olması ve gerçek zamanlı PZR yöntemiyle bu direncin daha önce ülkemizde araştırılmaması nedeniyle M41L direnç mutasyonu Nokta-Mutasyon Spesifik Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (NMS-GZ-PZR) yöntemi ile araştırıldı.

Çalışmada Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Moleküler Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda daha önce konvansiyonel dizi analizi ile (ABI Prism 310, Foster City, A.B.D.) incelenmiş, enfekte olduğu tarih bilinmeyen, 60 HIV-1 genotip B pozitif örnek kullanıldı. Center for Diseases Control'den (A.B.D.) Heneine ve arkadaşları tarafından HIV-1 genotip B'de oluşabilen dokuz ana ilaç mutasyonunu saptamak üzere geliştirilerek valide edilmiş olduğu ve konvansiyonel dizi analizine göre duyarlılığının daha yüksek ve yorumunun daha kolay olduğu bildirilen NMS-GZ-PZR yöntemi, LightCycler 2.0 (Roche Applied Science, Almanya) aygıt sisteminde, M41L direnç mutasyonunu saptamak üzere önerilen primerler ve TaqMan probu kullanılarak uygulandı. RNA kalitesinin bozuk olduğuna karar verilen 3 örnek çalışma dışı bırakıldı. Öneriye uygun olarak, vahşi tip ve mutant varyantları ayırt edebilmek için, pozitiflik ölçütünü belirlemek amacıyla, total viral kopya reaksiyonu ile mutant varyant reaksiyonunun Ct değerleri ("threshold cycle") arasındaki fark (ΔCt) değerlendirildi.

57 HIV-1 genotip B örnek arasından, NMS-GZ-PZR sonuçlarına göre, total viral kopya amplifikasyonunun Ct değeri 10'dan küçük olan (yüksek kopya sayısı nedeni dilüsyon ile tekrar gerekliliği) ve 26'dan büyük olan (düşük kopya sayısı nedeni ile belirsiz sonuç) 25 örnek, öneriye uygun olarak, pozitiflik ölçütü olarak kullanılacak ΔCt eşik değerini belirlemek için yapılan çalışmanın dışında bırakıldı.

Eşik değeri hesaplamasında kullanılan 32 örnek, merkezi eğilim dağılımına göre ΔCt ortanca değeri (5.81) eşik değeri olarak belirlendi. Buna göre, ΔCt değeri, eşik değerin üzerinde olan olgu örnekleri, M41L mutasyonu açısından negatif kabul edildi. Bu eşik değeri ölçütü ile değerlendirilen NMS-GZ-PZR sonuçlarına göre, 32 örneğin 16'sında M41L direnç mutasyonu pozitifliği saptandı. Bu örneklerin 6'sında, konvansiyonel dizi analizi sonuçlarına göre de, M41L direnç mutasyonu pozitifliği. Çalışmaya alınan toplam 57 örnek arasında, konvansiyonel dizi analizi ile pozitif olduğu bildirilen 13 örneğin 7'sinin sonuçları, NMS-GZ-PZR sonuçlarına göre total viral kopya Ct'si 26'nın üzerinde olduğu için, belirsiz kabul edildi. Bu örneklerde, düşük viral yüklerine bağlı olarak yanlış sonuç verme riski nedeniyle, ön amplifikasyon aşamasından sonra, testin tekrar edilmesi önerilmektedir. Ancak daha önceki saklama koşullarında dondurulup çözünme çok olduğu için, RNA kalitesi bozulan bu örnekler tekrar edilmedi. Konvansiyonel dizi analizi ve NMS-GZ-PZR yöntemlerinden birisinin referans yöntem statüsü olmadığı için, iki yöntem arasındaki karşılaştırmalı uyuşmanın güvenilirliği, kapa istatistiği ile ölçüldü. Kapa istatistiğine göre, iki yöntem arasında, orta düzeyde uyuşma ($k=0.375; P<0.007$) saptandı.

Bilgimize göre, bu çalışma, Türkiye'de, HIV enfeksiyonunun tedavisinde kullanılan antiviral ilaçlara karşı azınlık direnç mutasyonlarını, konvansiyonel dizi analizine kıyasla daha duyarlı ve uygulaması daha kolay bir yöntemle araştırarak bildiren ilk çalışmadır. NMS-GZ-PZR yöntemi, şimdilik, bilinen tüm direnç mutasyonları arasında yalnızca bir grubunu test etmek için geliştirilmiş durumdadır. NMS-GZ-PZR yöntemi, ultra derin dizi analizi düzeyindeki duyarlılıkta, minor azınlık direnç mutantlarının önemli bir grubunun araştırılmasını sağlayabilmekte ve böylece HIV enfeksiyonu olgularında gelişen antiviral dirence ilişkin epidemiyolojik dinamiklerin daha iyi anlaşılmasına ve tedavi başarısının artmasına katkıda bulunmaktadır.

ABSTRACT

HIV / AIDS, has been reported as most frequent cause of death in sub-Saharan Africa, and ranks fourth on the the world wide list. One of the most important problems in the treatment of AIDS is the resistant mutants for antiretroviral drugs. Currently, routine or epidemiological HIV antiviral resistance tests are commonly performed by conventional sequence assays. However in recent years, more sensitive methods have been developed, to detect drug resistant mutant variants in the minority of the total viral population which adversely affect the success of the treatment, compared to the conventional sequence assays. In this study, we investigate M41L mutations, for zidovudine, the first and still an important drug in HIV treatment and for Stavudine, which is for one of the common mutations, and has not been previously investigated by real-time PCR method. Point-mutation-specific Real-Time Polymerase Chain Reaction (PMS-RT-PCR) method which is more sensitive than conventional sequence analysis method is performed in this study. Sixty HIV-1 genotype B positive samples which were examined by conventional sequence analysis (ABI Prism 310, Foster City, USA) in the Laboratory of Molecular Microbiology, Cerrahpaşa Faculty of Medicine. Point mutation specific Real- time PCR method (PMS-RT-PCR; which was reported as a more sensivite and easy to interpret test compared to conventional sequence assays, developed and validated by Heneine et al. to detect HIV-1 genotype B, consisting nine major drug mutations; was performed on LightCycler 2.0 (Roche Applied Science, Germany) system. Recommended primers and TaqMan probe for detection of M41L mutation for resistance were used. Three samples were excluded due to poor quality of the RNA quality. To distinguish between wild type and mutant variants, in order to determine the criteria for positivity, difference between Ct values (“threshold cycle”) of the mutant variant and the Ct values of viral copies of total reaction were evaluated.

According to the results of the PMS-RT-PCR; for 57 samples of HIV-1 genotype B, when Ct value of the amplification of the total viral copies less than 10 (reexamination with the need for dilution due to the high number of copies), and higher than 26 (low copy number due to uncertain results) were applied, a total of 25 samples which would be used as measure of positivity were exculeded from the

study to determine the value of ΔC_t threshold. 32 samples, used to calculate the threshold. The threshold was determined according to the distribution of central tendency and median ΔC_t value (5.81). When ΔC_t value was at threshold level, samples were considered negative for the mutation M41L. M41L resistance mutation were detected in 16 of 32 samples which were evaluated by this threshold according to the PMS-RT-PZR. Six of these samples, were M41L resistance mutations which were positive according to the results of conventional sequence analysis. Results of the seven of 13 samples which were reported to be positive by conventional sequence analysis, were accepted uncertain as the total viral copy Ct's were above 26 according to the results of the PMS-RT-PCR assay. In these examples, because of low viral loads, after pre-amplification stage, to minimize the risk of false results, the test was performed. However, as the storage conditions were not proper (too much freeze- thaw) and since the quality of RNA were unacceptable, these samples were not examined again. Since both conventional sequence analysis and PMS-RT-PCR method were not at the status of a reference method, the reliability of comparison between the two methods, was measured by Kappa Statistics. According to Kappa statistics, between the two methods, a fair agreement ($k = 0,375$, $P < 0.007$) was found.

To our knowledge, this is the first study in Turkey which investigated the minority resistance mutations to antiviral drugs used to treat HIV infection with a more sensitive and easier method than conventional sequence assay. PMS-RT-PCR method, presently has been developed for testing only one group of mutations for HIV. PMS- RT-PCR method provides near to ultra-deep sequencing sensitivity for exploring an important group of minor resistance mutations. Therefore, testing with this method is expected to contribute to better understanding of epidemiologic dynamics related to antiviral resistance in HIV infections and increase the success of treatment.

1. GİRİŞ ve AMAÇ

İnsan immün yetmezlik virusu (HIV), Edinsel İmmün Yetmezlik Sendromu (Acquired Immune Deficiency Syndrome - AIDS)'nun etkenidir. HIV/AIDS, gerek uluslararası, gerek ulusal düzeyde pandemik duraksama döneminde olsa da, halen ekonomik, sosyoekonomik ve kültürel düzeyi düşük olan Afrika ve Asya gibi bölgelerde yaşamı önemli ölçüde tehdit eden bir hastalıktır.

HIV tedavisinde en büyük problemlerden biri, antiretroviral ilaçlara karşı dirençli mutantların gelişmesidir. Antiretroviral direnci saptayan testler genotipik veya fenotipik yöntemlerdir. Fenotipik testlerin sonuçlanması 2–3 hafta alır ve genotipik testlerden daha pahalıdır. Tedaviye direnç geliştirdiği düşünülen ve tedavi almamış naif hastalarda genotipik testler önerilir. Tüm genin / genlerin dizi analizi yapılabileceği gibi, bilinen mutasyonlar, dizi analizine göre daha duyarlı olan, Real - time Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) yöntemi ile de saptanabilir.

Ülkemizde henüz tedavi başlanmamış hastalarda, HIV direnci konusunda veriler mevcut değildir. HIV tanısı konulan hastaların, ne zaman enfekte olduklarına dair veriler de bulunmamaktadır. Primer dirençli olguları, dizi analizi ile saptamak mümkündür. Ancak kronik, ne zaman enfekte olduğu bilinmeyen olgularda, dirençli mutantları saptamada dizi analizi her zaman yeterli değildir.

Bu çalışmada ülkemizde de ilk kullanılmaya başlanan antiretroviral bir ilaç olan, zidovudine ve stavudine direncine yol açan M41L direnç mutasyonun, ilaç direnci taşıyan azınlıktaki varyantları saptamada duyarlı olan, Nokta-Mutasyon Spesifik Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (NMS-GZ-PZR) yöntemi ile saptanması amaçlandı.

2. GENEL BİLGİLER

Bugüne dek 35 milyon insanın ölümüne yol açan, birçoğunun tedavi alamadığı 30- 40 milyon kişinin bu hastalıkla yaşadığı, insan immünyetmezlik virüsü Tip-1'in yol açtığı enfeksiyon ve onun son dönemi olan Edinsel İmmün Yetmezlik Sendromu günümüzde önemli bir halk sağlığı sorunudur (1).

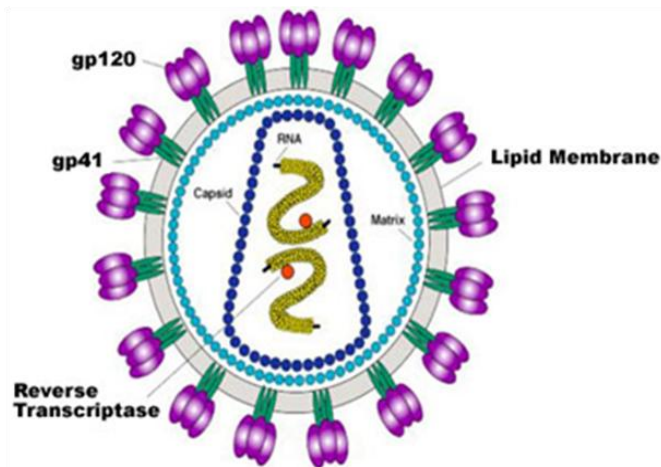
İlk defa 1981 yılında Amerika Birleşik Devletleri'nde Pnömocystitis jiroveci pnömonisi ve Kaposi sarkomu gibi açıklanamayan fırsatçı enfeksiyonların, New York ve SanFrancisco'daki homoseksüel erkeklerde görülmesiyle AIDS tanımlanmıştır (1). İlk epidemiyolojik çalışmalarla bu immün yetmezlik sendromunun bulaşıcı bir mikro-organizmaya bağlı olduğu, etkenin başlıca bulaşma yolunun da kan ve ürünlerinin tranfüzyonu, damariçi uyuşturucu kullanımı, anneden bebeğe vertical geçiş ve cinsel ilişki olduğu belirlenmiştir (2, 3).

AIDS etkeni olan virus, 1983 yılında; Fransa'da Jean-Claude Chermann laboratuvarında Françoise Barré-Sinoussi tarafından ve Pasteur Enstitüsü'nde Luc Montagnier başkanlığındaki ekibin çalışmasıyla ilk kez tanımlanmıştır. 1984 yılında Amerika Birleşik Devletleri'nde Ulusal Sağlık Enstitüsü'nde (NIH; National Institutes of Health) Robert Gallo ve arkadaşları tarafından ve aynı zamanda California Üniversitesi'nde Jay Levy ve arkadaşları tarafından saptanmıştır. Pasteur Enstitüsü'ndeki araştırmacılar tarafından, virusa lenfadenopatisi olan genç bir eşcinsel erkekte izole ettikleri için 'lenfadenopati ile ilişkili virüs' ('lymphadenopathy associated virus'; LAV) adı verilmiştir. NIH araştırmacıları, T-lenfositlerine tropizmi nedeniyle 'insan T lenfotropik virüs' (human T lymphotropic virus; HTLV); daha önceden bilinen diğer iki HTLV'nin ardından geldiği için HTLV-III adını vermişlerdir. Daha sonra bu HTLV-III'ün Pasteur Enstitüsü'nde izole edilen virusdan kontaminasyon olduğu görülmüştür. Levy grubu ise 'AIDS ile ilişkili retrovirus (AIDS associated retrovirus; ARV) adını vermiştir. Elektron mikroskopik çalışmalar bu virusların retrovirusler içinde lentiviruslarla ilişkili olduğunu göstermiştir. Uluslararası Virus Taksonomi Komitesi lentivirus olduğu belirlenen bu virüsü 'İnsan İmmün Yetmezlik Virüsü ('Human Immunodeficiency Virüs; HIV') olarak adlandırdı. 1986'da Clavel, Montagnier ve arkadaşları farklı bir HIV izole etmişlerdir. Özellikle Batı Afrika'nın bazı bölgelerinde yaygın olan bu tipe HIV-2 adı verildi. Afrika, Asya, Avrupa, Kuzey ve Güney Amerika' da yaygın

olarak saptanan HIV-1'e göre HIV-2 ile enfekte olanlarda klinik bulguların daha geç ortaya çıktığı ve mortalitenin daha düşük olduğu saptanmıştır (4, 5).

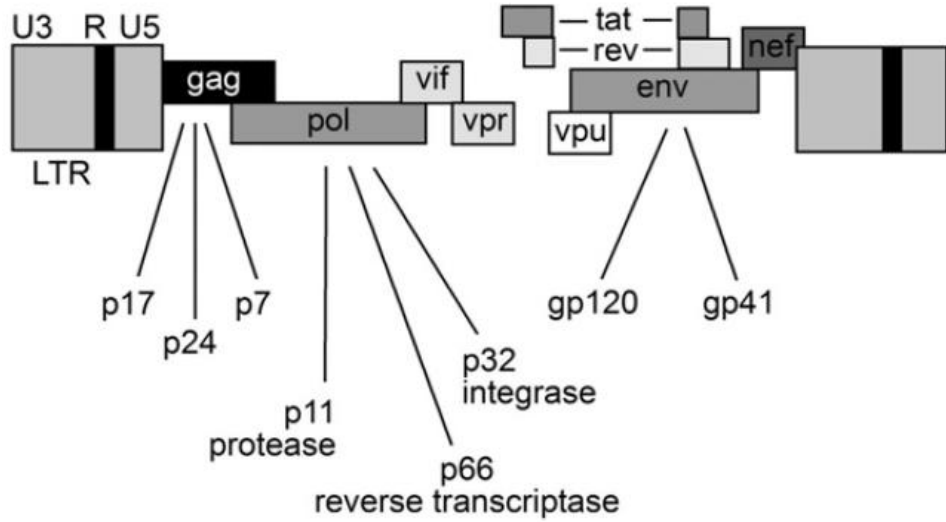
2.1. HIV Grupları, Alt Tipleri

Her iki HIV virüsü de *Retroviridae* ailesi içinde yer alan Lentivirüs genusunun üyesidir. Mutasyon ve rekombinasyon yeteneği nedeniyle, HIV virüsünün genetik değişkenliği HIV tanı testlerinin tasarımı ve yorumunda önemli rol oynamaktadır. HIV-1'in çeşitli genetik gruplara ayrıldığı belirlenmiştir: M (Mayor), O (Outlier), N (Non-M, Non O, Novel, New) ve yakın zamanda tanımlanan P virus (6). Klinik uygulama da en sık görülen HIV-1 grup M dokuz alt tipe ayrılmıştır; A, B, C, D, F, G, H, J ve K. Bu alt tiplerde de A1, A2, A3, A4, F1, F2 alt-alt tipleri tanımlanmıştır. HIV-1 rekombinasyona uygun bir virusdur, farklı izolatlarla bir konağın enfeksiyonu sonucu rekombine formlar oluşur. Bu formların başka konakları enfekte etmesi sonucunda dolaşan rekombine formlar (circulating rekombine forms; CRFs) gelişir. Şimdiye kadar 48 farklı CRFs tanımlanmıştır (7, 8, 9, 10, 4). CRF epidemiyolojik olarak bağımsız kişiler tarafından en az 3 kez, sekans ile tanımlanmalıdır. Bu kriterlere uymayanlar, daha nadir viral türler olan benzersiz rekombinant form (unique rekombinant forms; URFs) olarak adlandırılırlar (9). HIV-2 A ve B en yaygın olmak üzere sekiz farklı alt tiplere ayrılmıştır (10, 11, 12). Bu sınıflamalar *env* ve *gag* genlerindeki dizi değişikliklerine ve buna bağlı gp120 ve kapsid proteinlerindeki antijenik değişikliklere dayanmaktadır (Şekil 1 ve 2).



Şekil 1: HIV virusunun kesiti

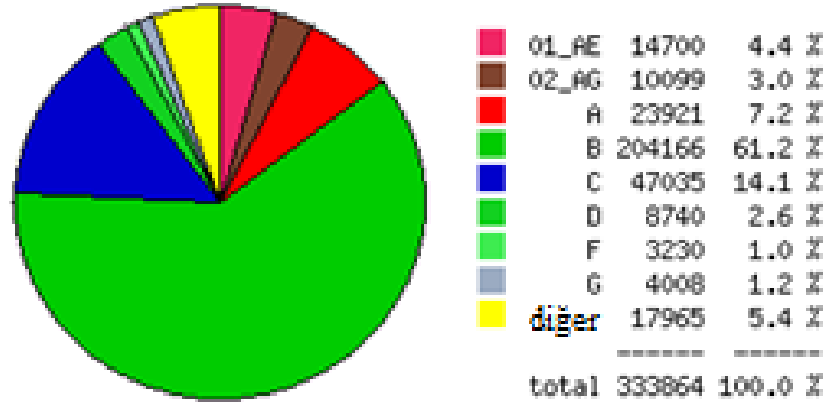
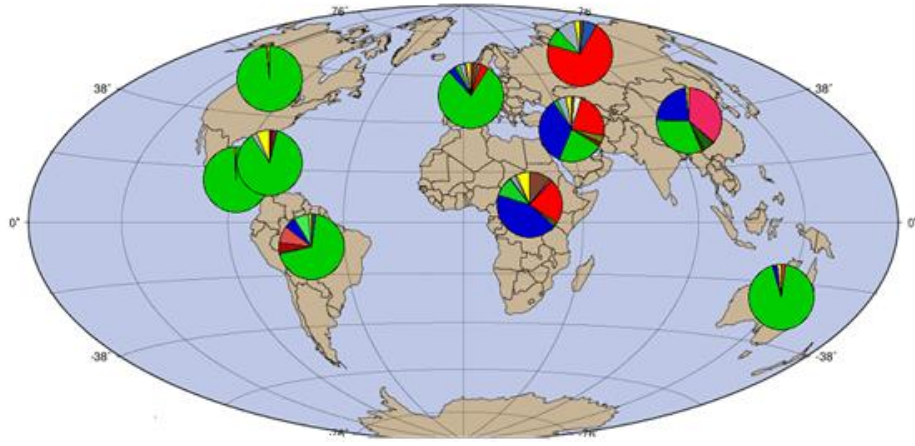
Zarflı virüs, iki birbirinin aynı RNA ipliği, RNA polimeraz, integraz ve genoma bağlı iki transfer RNAs (tRNAs) içeren kordan oluşur. Bu yapı, proteinler ve lipid membran ile çevrilidir. Zarf üzerinde glikoprotein (gp) 120 ataçman proteini ve gp41 füzyon proteini yer alır. (Niaid-HIV-virion. jpg)



Şekil 2: HIV -1 virusunun genomik yapısı

(HIV 2010 Medizin Fokus Verlag, 2010; 23)

Farklı M alt tipleri dünyanın çeşitli bölgelerinden izole edilmiştir. 1980'lerin başındaki Kuzey Amerika ve Avrupa'daki ilk salgın HIV-1 alt tip B nedeniyle olmuştur. Şu anda Amerika ve Avusturya'da hakim olan alt tip B olmasına rağmen, global epidemiden alt tip C sorumludur. Grup O nadiren izole edilmekte olup; Cameron, Gabon ve Ekvator Ginesinde görülür (Şekil 3)(13). Türkiye'de de en yaygın olan B tipidir. Yılmaz ve ark. 2008 yılında, env; gp41 analizi ile 27 HIV-1 izolatının 19'unu alt tip B, dördünü A, ikisini F1, birini C birisini ise D olarak bildirmiştir (13, 14, 4).



Dünya

Şekil 3. HIV' in dünya üzerindeki prevalansı, coğrafi dağılım

Harfler ülkeler üzerinde baskın olan alt tipleri gösteririr. (UNAIDS)

2.2. Epidemiyoloji

DSÖ (Dünya Sağlık Örgütü), Aralık 2009 verileri; dünyada ortalama 33.3 milyon HIV enfekte kişi olduğunu ve hastalığın tanımlandığı 1981 yılından beri 35.9 milyon kişinin hayatını bu hastalıktan kaybettiğini bildirmektedir. AIDS olgularının çoğu Sahra altı Afrika'sında olup, Asya ABD ve dünyanın geri kalan bölgelerinde endemik olarak hasta sayısı artmaktadır.

Ülkemizde 2010 Sağlık Bakanlığı verilerine göre 3694 kişi HIV taşımaktadır, 841 kişi ise AIDS tanısı almıştır, toplam 4525 kişi HIV/AIDS için takip edilmektedir. Ülkemizde ilk defa 1985 yılında bir HIV pozitif hasta ve AIDS basamağında bir hasta bildirilmiş, daha sonra her yıl HIV/AIDS vakalarında giderek artma gözlenmiştir. Ancak özellikle cinsel yolla bulaşan enfeksiyonlar konusunda

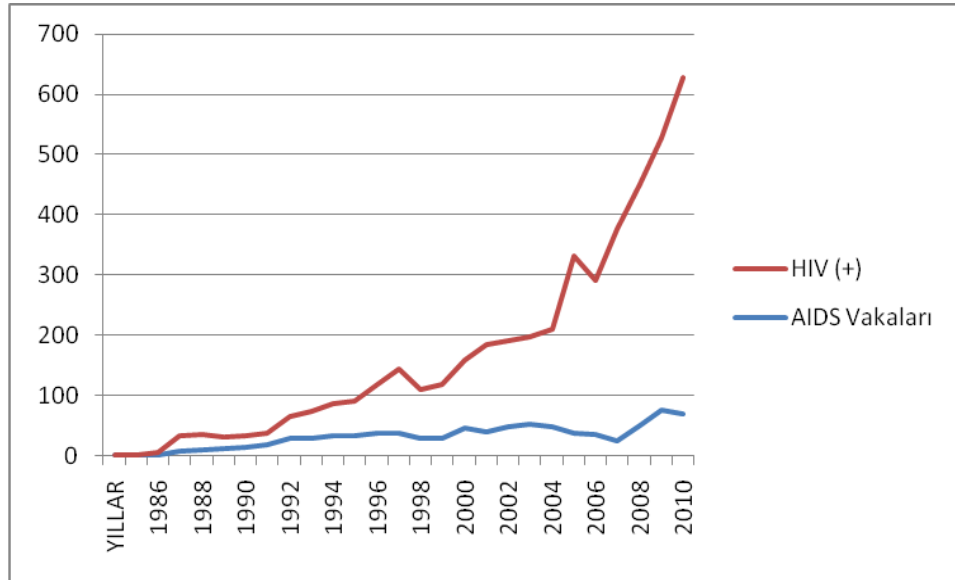
kişilerin sağlık kurumlarına yeterli başvurularının olmamaları, kayıt sistemlerinin yeterli çalışmaması, bu sayının gerçekleri yansıtmadığını düşündürmektedir (15).

Türkiye'deki HIV/AIDS vakalarında bulaşma yolları sırasıyla; %55.09 heteroseksüel cinsel temas, %8.44 homoseksüel cinsel temas, %3.25 damar içi madde bağımlıları, %1.22 kan nakli yapılanlar, %1.44 anneden bebeğe geçiş, % 0.24 hemofili hastaları ve %29.66 ise bulaşma yolları bilinmeyenlerin oluşturduğu görülmektedir (15).

Tablo 1: Türkiye'de HIV/AIDS vakalarının yıllara göre dağılımı

YILLAR	AIDS OLGULARI	HIV (+)	TOPLAM
1985	1	1	2
1986	2	3	5
1987	7	27	34
1988	9	26	35
1989	11	20	31
1990	14	19	33
1991	17	21	38
1992	28	36	64
1993	29	45	74
1994	34	52	86
1995	34	57	91
1996	37	82	119
1997	38	105	143
1998	29	80	109
1999	28	91	119
2000	46	112	158

YILLAR	AIDS OLGULARI	HIV (+)	TOPLAM
2001	40	144	184
2002	48	142	190
2003	52	145	197
2004	47	163	210
2005	37	295	332
2006	35	255	290
2007	24	352	376
2008	49	401	450
2009	75	453	528
2010	70	557	627
TOPLAM	841	3684	4525



Şekil 4: Türkiye'deki HIV (AIDS) vakalarının yıllara göre dağılımı

2.3. HIV Virüsünün Mikrobiyolojik Özellikleri

Tipik bir retrovirus olan HIV, enfeksiyöz virion yapısı pozitif polariteli iki adet birbirinin aynı olan tek iplikli RNA içerir. HIV proteinleri "proviral" DNA'dan kopyalanan m-RNA'lar tarafından kodlanır. HIV'in hücreleri enfekte etmesinden sonra, erken dönemde viron RNA'sı revers transkriptaz enzimi tarafından linear çift iplikli DNA haline çevrilir ve her iki ucunda "long terminal repeat"ler (LTRs) yer alır. Bu linear viral DNA hücre genomuna integre olarak "provirus" yapısını oluşturur. Genomik viral RNA ve m-RNA 'lar proviral DNA'dan hücre polimeraz II enzimi yardımı ile sentez edilir. HIV-1'in genom yapısındaki "gag" geni virion kapsid proteinlerinin öncüllerini, "pol" geni birçok virion enzimlerinin öncüllerini (proteaz, revers transkriptaz, Rnaz H ve integrase) ve "env" geni zarf glikoproteinlerinin öncüllerini sentez eder. Transkripsiyon transaktivatörü (*tat*) ve viral ekspresyon regülatörü (*rev*) virion yapısına girmeyen küçük moleküler ağırlıklı proteinler olup, virus replikasyonunda önemli fonksiyonları vardır (Şekil 2). Bunun dışında HIV replikasyonu için gerekli olmayan ve aksesuar olarak adlandırılan bazı genler mevcuttur. Bu genler HIV-1 için; *vif*, *vpr*, *vpu* ve *nef*; HIV-2 için *vif*, *vpr*, *vpx* ve *nef* tir (15).

Virion nükleokapsid yapısı 100 nm büyüklüğünde olup, ikozohedral bir yapı içerir. Nükleokapsid yapısı zarfla çevrilidir. HIV partikülünün membranında 72 adet çıkıntı şeklinde zarf peplomerleri yer alır. Virionun en büyük moleküler ağırlığına sahip (gp 160) bu çıkıntıların her biri 9–10 nm uzunluğunda olup, ovoid distal uçları 14-15 nm'dir. Zarf glikoproteini olarak bilinen gp 160 iki kısımdan oluşur. Bunlar yüzeyde serbest olarak bulunan gp 120 (surface=SU), yüzey ve membrana gömülü olarak bulunan gp 41 (transmembrane=TM) glikoproteinleridir. gp 120 HIV'in hücre yüzeyindeki reseptörlere tutunması ve birleşmesinde rol oynar. Bu reseptör T yardımcı hücrelerde bulunan CD4 reseptörüdür ki, virusun konak hücreyi enfeksiyonundaki ilk aşamada rol oynar. Transmembran proteini olan gp41 virüsü hücre içerisine girdiğinde, membranlar arası füzyon yapma özelliğine sahiptir. HIV zarf yapısının, hücre plazma membranında bulunan fosfolipidden farklı olduğu görülür. Viral zarfda bulunan kolesterol ve lipid içeriği hücre membranından 2 -3 misli daha fazladır (15).

2.4. Patogenez ve bağışıklık

HIV'in oluşturduğu hastalıkta ve patogenezde temel mekanizma, CD4 eksprese eden T hücreleri ve makrofajlara karşı virüsün gösterdiği tropizmdir. HIV'in neden olduğu immünoşüpresyon (AIDS), bağışıklık sisteminin yardımcı T hücre ve gecikmiş tip aşırı duyarlılık fonksiyonu taşıyan CD4⁺ T hücre sayısındaki azalmadan kaynaklanır(16).

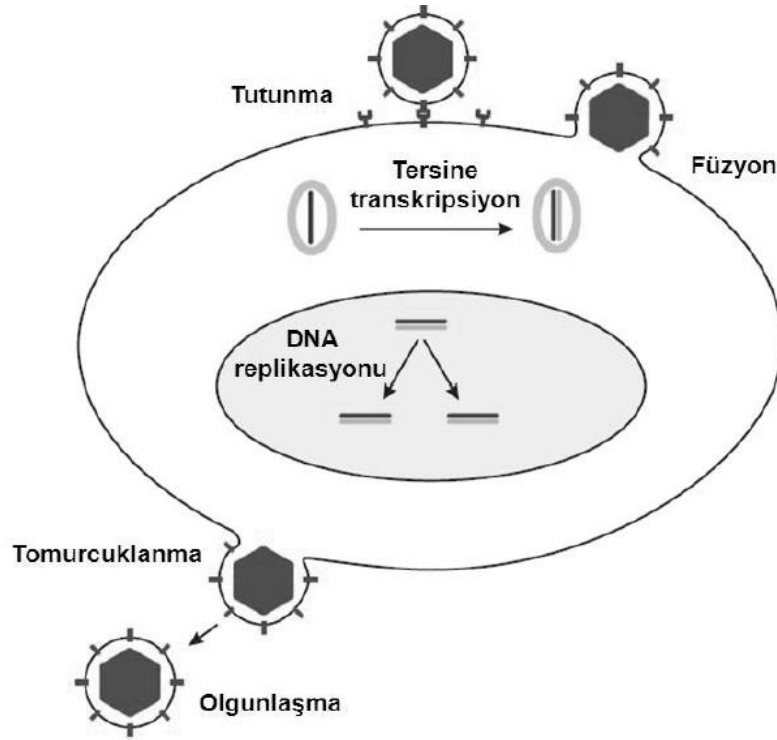
Cinsel temas sırasında HIV mukozal yüzeye bulaşır ve buradan içeri girerek hızla mukoza ile ilişkili lenfoid doku (MALT) hücrelerini enfekte eder. İnfeksiyonun başlangıç aşamaları, M tropik viruslar tarafından yürütülür. Bunlar, CD4 ve CCR5 kemokin reseptörlerine bağlanarak; dentritik hücreleri, diğer monosit-makrofaj seri hücrelerini ve periferik kan T hücrelerini enfekte ederler. CCR5 reseptörü açısından yetersiz olan bireyler HIV ile enfeksiyona daha dirençlidir. CCR5 antiviraller için hedef yapısıdır (16).

HIV-1'in replikasyonu erken ve geç dönem olmak üzere iki kısma ayrılır: Kısa süren erken dönemde; virusun konak hücreye bağlanması, girişi, revers transkripsiyon, konak hücre nükleusuna girişi ve çift zincirli DNA'nın (provirus) konak hücre genomuna integre olması gerçekleşir. Replikasyonun geç dönemi transkripsiyon, integre proviral kalıptan viral RNA'nın oluşumu ve hücreden progeni viriyonunun salınımı ile devam ederek hücrenin bütün yaşamı boyunca sürer (5).

Virus partikülü hücreye girdikten sonra viriyon tarafından kodlanan bir proteaz aracılığı ile kapsidi soyulur. Revers transkripsiyonla viral RNA sonradan konak hücre nükleusuna integre olacak olan DNA'ya çevrilir. Viriyon tarafından kodlanan RT ile katalize edilen ve enfeksiyondan sonra 4–6 saat süren revers transkripsiyon sitoplazmada gerçekleşir. Revers transkriptaz diğer bir retroviral enzim olan PR'in 3 farklı fonksiyonu vardır: RNA- bağımlı DNA polimeraz aktivitesi; DNA- bağımlı dna polimeraz aktivitesi; ribonükleaz H aktivitesi (Rnase H) (5).

Sitoplazmaya salındıktan sonra RT, viriyon tRNA'sını primer olarak kullanır ve komplementer negatif iplikçikli DNA'yı sentezler. RT ribonükleaz H aktivitesi ile de RNA genomunu ortadan kaldırır ve pozitif iplikçikli komplementer DNA (cDNA)'yı sentezler. Viriyon DNA'sının (provirus) sentezi sırasında genomun iki ucundaki sekanslar (U3 ve U5) duplike olur ve LTR'leri iki uca bağlar. Bu süreç

integrasyon için gerekli dizileri de oluşturur, transkripsiyonun regülasyonu için gerekli olan “protomer” ve “ enhancer” bölgelerini de yaratır. Genomun DNA kopyası orjinal RNA’dan daha uzundur. Revers transkripsiyon işlemi hataya eğilimlidir. HIV RT’si için hata oranı her bir 2000 baz çifti için bir’dir. Bu 9000 baz çiftlik HIV genomu için yaklaşık olarak en az bir hata demektir. Bu genetik değişkenlik, kişinin hastalığı sırasında yeni suşların, türümsülerin ortaya çıkışına yol açar. Bu özellik virusun patojenitesini değiştirir ve bağışık yanıtı kaçıtır (5).



Şekil 5. HIV’in evrimi

HIV CD4 ve Kemokin reseptörlerine bağlanır ve füzyon ile hücreye girer. Genom sitoplazmada DNA’ya çevrilir ve nükleer DNA’ya entegre olur. Genomun transkripsiyon ve translasyonu HTLV1’inkine benzer şekilde olur. Virüs plazma membranında toplanır ve hücreden tomurcuklandıktan sonra olgunlaşır.

Çift iplikli DNA nükleusa taşınır ve virus tarafından kodlanan integras enzimi aracılığıyla konak genomuna entegre olur. Replikasyonun geç fazı entegre proviral DNA’dan viral RNA transkripsiyonunun olabilmesi hücresel ve viral faktörlerin varlığına bağlıdır. DNA entegre olduktan sonra RNA polimeraz II gibi konak hücre enzimlerini kullanarak yeni viral RNA genomu ve proteinlerinin sentezi yapılır.

2.5. HIV'in Enfekte Ettiği Hücreler ve Hücresel Hedefler

Virusun tutunması ve hedef hücelere girmesi için viral yüzey proteinleri ile duyarlı konak hücre yüzeyindeki reseptörlerin ilişkisi gereklidir. HIV zarf proteinleri SU (surface; gp120) ve TM (transmembran; gp41) için başlıca reseptör CD4 molekülüdür. CD4 molekülü asıl olarak T yardımcı hücrelerde, myeloid seri hücrelerinden monositler, makrofajlar ve kemik iliğinden gelişen dendritik hücrelerin yüzeyinde bulunur. Normalde fonksiyonu, antijen sunucu hücrelerdeki MHC sınıf II moleküllerine bağlanmaktadır. HIV zarf proteinleri, viral ve hücresel membranların bileşiminin başlatılması ve sitoplazma içine girebilmek için yardımcı reseptör (ko-reseptör) moleküllerle de ilişkiye geçmek zorundadır. Farklı HIV kökenlerinin hücre tropizmlerini bu koreseptör moleküller belirler. Alfa kemokin reseptörü CXCR4, T-tropik kökenlerle enfeksiyonda, T hücrelerin birbiriyle etkileşmesi ve sinsityum oluşturmaya neden olur. Beta-kemokin reseptörü CCR5 ise M-tropik (monosit/makrofaj) HIV-1 kökenlerinin enfeksiyonunu sağlar. M tropik kökenler sinsityum oluşturmazlar. Ancak bazı M-tropik kökenler T hücrelerini de enfekte edebilirler. CCR5 geninde veya CXCR4 geninde mutasyonun HIV-1 enfeksiyonuna karşı dirençle ilişkili olabileceği öne sürülmektedir. Hemopoetik dizinin CD4 molekülü taşıyan ve yukarıda bahsedilen kemokin reseptörlerinden bir veya fazlasını bulunduran hücreleri, HIV enfeksiyonu için başlıca hedeflerdir ve enfeksiyon sırasında en fazla virus bulunduran hücrelerdir. Daha farklı ko-reseptör molekülleri de tanımlanmıştır. Ek ko-reseptörler, virus replikasyonunu etkileyen ya da hücresel transkripsiyon sinyallerini tetikleyen etkilere yol açabilir. HIV'in hücreye girişi, doğrudan hücreden hücreye geçişle veya antikor kompleksleri aracılığı ile hücre yüzeyindeki galaktosil seramid veya Fc reseptörlerine bağlanarak da olabilir (17).

Monosit ve makrofajlar; sitokin-kemokin sentezi ve HIV-1 enfeksiyonuna karşı farklı duyarlılık gösteren hücre popülasyonlarıdır. Bu hücrelerin in vitro çalışmalarda primer HIV-1 kökenleri ile enfekte olabilmeleri, bu hücrelerin olgunlaşma düzeyi (konağın genetik faktörleri, özellikle izolasyonun birinci ve ikinci günlerinde) ve hastalığın dönemi (viral genotipi) ile ilişkilidir. İnfeksiyonun başlangıcında CCR5 ile hücreye giren HIV varyantları ortaya çıkar. CXCR4 varyantlarının ortaya çıkışı ile CD4⁺ T hücreler hızla azalır (17).

Periferik monositler: HIV-1 ile enfekte periferik monosit oranı çok azdır. Periferik kan monositlerinden köken alan makrofajlar, HIV-1 enfeksiyonuna duyarlıdır. Monositlerin makrofajlara değişmesi CCR5 sunumunda artış ile ortaya çıkar, CD4 moleküllerinin yüzeyde önce azalması ve ardından artışı olur. CXCR4 ve CCR2b ko-reseptörleri azalır.

Doku makrofajları: HIV-1 enfeksiyonunda başlıca hedef hücrelerdir. Alveolar, peritoneal, plasental makrofajlar ve mikroglia hücreleri HIV-1 enfeksiyonuna duyarlıdır. Dokulardaki HIV ile enfekte makrofajların oranı yüksektir (4, 18)

HIV 'in başlıca giriş yolu cinsel ilişki ile mukozalardan olur. Genital mukoza, rektum, orofarinks gibi mukozal yüzeylerde antijenleri ve virus partiküllerini yakalayan dendritik hücrelerden Langerhans hücreleri çoktur. Mukozal yüzeylerin hemen altında lenfoid hücre kümeleri bulunur. Simian immün yetmezlik virusu (SIV) ile yapılan çalışmalarda, dişi maymunlara intravajinal yoldan (SIV) inokule edildiğinde virus önce Langerhans hücrelerinde, 18 saat sonra genital mukozadaki dendritik hücreler ve T hücrelerinde saptanmıştır. Birkaç gün sonra komşu lenfositlerde ve monositlerde, sonra da bölgesel lenfoid dokularda virus saptanmıştır. HIV'in bölgesel yerleşimi ve replikasyonunun ardından birincil viremi ile birlikte virus vücuda yayılır ve vücuttaki lenfoid dokular yaygın olarak enfekte olur (4, 19).

HIV'in enfekte bir bireyden enfekte olmayan bir bireye bulaşması vücut sıvısındaki HIV-1 konsantrasyonu ile ilgilidir. Çiftler arasındaki bulaşma ile ilgili Uganda'da yapılan retrospektif bir çalışmada; HIV-1 RNA'sı <3500 kopya/mililitre olan bireylerin virüsü partnerlerine bulaştırmadığı, HIV-1 RNA'sı 10000-49999 kopya/mililitre olan bireylerin virüsü partnerine %40 oranında bulaştırdığı bildirilmiştir (20).

İsviçre'de heteroseksüel HIV pozitif ve negatif çiftler arasında yapılan çalışmada; pozitif partnerlerin, negatif partnerlere HIV'i bulaştırma riskinin, pozitif partnerlerin antiretroviral tedavi alması ve plazma HIV RNA düzeyini baskı altında tutmasıyla %92 oranında azaldığı gösterilmiştir(21). Yakın zamanda Afrika'da heteroseksüel HIV pozitif ve negatif çiftler arasında yapılmış bir çalışmada da; benzer şekilde antiretroviral tedavi ile baskılanmış HIV'in bulaşma riskinin azaldığı bildirilmiştir (22).

2.6. HIV Tanısı

HIV enfeksiyonunun zamanında tanısı antiretroviral tedavi ve fırsatçı hastalıkların profilaksisi, korunma ve enfeksiyon kontrolü için önemlidir. HIV testleri:

- a. Tarama testleri; HIV enfeksiyonunu saptama amacıyla kullanılır. İnfeksiyon şüphesinde veya kan/ kan ürünlerinin güvenliğini sağlamak için vericilerin taranması ya da yenidoğanları koruyabilmek için kemoprofilaksi uygulama gereksinimini değerlendirmek amacıyla gebelerin taranması gibi tarama programlarında kullanılır.
- b. Destekleyici/ Doğrulama testleri; tarama testleri ile pozitif bulunanlarda HIV enfeksiyonu tanısını kesinleştirmek amacıyla kullanılır.
- c. Viral yük testleri; HIV enfeksiyonu tanısı konduktan sonra hastanın takibinde kullanılır.
- d. Antiretroviral direnç testleri; tedavide kullanılan ilaçlara karşı virusun duyarlılık ve direnç durumunun araştırılmasında kullanılır. Genotipik testlerde direnç ile ilişkili mutasyonlar; fenotipik testlerde ise virus kültürü ortamlarında ilacın virüsü inhibisyon oranı araştırılır(23). HIV enfeksiyonu tanısında öneriler, farklı ülkelerde enfeksiyon prevalansına ve koşullara göre özellik göstermektedir. Tanı sıklıkla iki pozitif tarama testi sonrası, doğrulama testi ile konulur. Tarama testlerinin sonuçları uyumsuz ve/ veya destekleme testi belirsiz ya da negatif ise kişinin ayrıntılı öyküsü ve klinik ile enfeksiyon olasılığı değerlendirilir. İnfeksiyon riski yakın geçmişte ise dikkatli izlem gerekir. Belirsiz sonuçların genellikle bir ayda pozitifleşmesi beklenir (23).

Akut HIV-1 enfeksiyonunun tanısı; klinik kuşku olduğunda anti-HIV1/2 testi ile beraber HIV -RNA yapılmalıdır. Antikor testleri negatif, HIV-RNA testi pozitif (>5000 RNA bulunduğunda akut HIV-1 enfeksiyonu tanısı konur. Akut HIV-1 enfeksiyonu izlenerek anti-HIV serokonversiyonu saptanır. Akut HIV-1 enfeksiyonunda viremi düzeyi yüksek olduğundan duyarlılık %100 kabul edilmektedir. Özgüllük % 95-98 olarak bildirilmekle beraber, yalancı pozitif sonuçlar 2000 RNA kopyası/ ml' den düşük, yani akut enfeksiyonda beklenen değerlerin çok altındadır. HIV enfeksiyonu ile antikor testlerinin (üçüncü kuşak testler)

pozitifleşmesi arasındaki süre ortalama üç haftadır. Primer HIV enfeksiyonunda önce 1–4 hafta süren lokalize virus replikasyonu olur. Bu dönem ender olarak aylarca uzayabilir. Sistemik virus replikasyonunun başlayıp yüksek düzeyde artmasından önce düşük düzeylerde viremi oynamaları olur. Bu aralıklı düşük düzey viremi dönemi 25 güne kadar uzayabilir. Ve plazmadaki virus konsantrasyonunun 1–10 kopya/ ml olduğu tahmin edilir. Bu durumun mukoza ve lenfoid dokudan kana düşük düzeyde HIV sızmasına bağlı olduğu düşünülmektedir. Bu dönemde tranfüzyon için alınan plazma enfeksiyöz olabilir ve tarama testleri ile enfeksiyon saptanamaz (4, 23).

Virusun hızla çoğalmaya başladığı dönem 100 kopya /ml ile başlar ve kısa sürede 10^8 kopya/ml düzeyine ulaşır. Virus replikasyonunun yükseldiği dönemde 1-5 gün sadece HIV-RNA pozitiftir; ardından virus yükü 10.000 kopya/ml olunca p24 antijeni saptanabilir. Virus yükü tepe noktaya ulaştıktan sonra azalmaya başlar ve denge noktasına (“set point”) gelir. Bu dönemde antikor testleri ve destekleyici doğrulama testleri pozitifleşir; ancak immün komplekslerin oluşması ile p24 antijeni saptanamaz duruma gelir (23).

Virus replikasyonunun yükseldiği dönemde immün yanıt da olmadığı için bulaştırıcılık çok yüksektir. HIV enfeksiyonun tanısı, enfeksiyondan korunma ve hastanın prognozu yönünden önemlidir (23).

2.7. HIV Tedavisi

HIV enfeksiyonunda antiretroviral tedavinin amacı, yaşam kalitesini arttırmak, HIV ile ilişkili morbidite ve mortaliteyi azaltmak, viral yükü uzun süre ve yeterince baskılanabilir düzeyde tutmaktır. Bu düzeyler farklı yöntemlerle farklı kopya sayısında belirlenmiştir. RT-PZR için <50 kopya/mL, NASBA için <80 kopya/mL, bDNA için <75 kopya/mL olarak bildirilmektedir (16). Enfeksiyöz HIV virüs partikülleri dolaşımdan kaybolmasına karşın, lenfoid dokulardaki HIV replikasyonu devam eder. Bu nedenle, HIV latent döneme hiç girmez, hastalığın tüm dönemlerinde sürekli replike olarak, kronik aktif bir enfeksiyon oluşturur. HIV enfeksiyonu sırasında sürekli lenfoid dokularda virüs replike olur ve immün sistem tarafından temizlenir. Yapılan çalışmalarda, HIV'in plazma yarı ömrünün 6–48 saat olduğu ve enfekte bir kişide günde 10^8 - 10^{10} virüs partikülünün üretildiği ve

temizlendiği gösterilmiştir (2, 24, 25). HIV replikasyonunda rol alan revers transkriptaz enzimi, her replikasyon döngüsünde yaklaşık 3×10^{-5} sıklıkta hata yapmakta ve yaptığı hatayı düzeltememektedir. Her replikasyon sırasında viral genomda en az bir mutasyon ortaya çıkmaktadır. Bu mutasyonlardan bazıları virüs açısından etkisiz ya da replikatif yönden defektif viral partiküllerin oluşumuna yol açarak zararlı olabilirken, bazıları da immün yanıt ya da antiretroviral ilaç gibi seçici baskılar karşısında mutant virusa replikatif avantaj sağlayabilmektedir. Önceden hiç antiretroviral tedavi almamış hastalardan izole edilen moleküler HIV klonlarında, nükleozid ve non-nükleozid revers transkriptaz inhibitörlerine direnç neden olan mutasyonlara rastlanmıştır (26).

Bazı dezavantajlı mutasyonlardan sonra, yeni mutasyonlar ortaya çıkmaya devam eder ve bu mutasyonlar önceki mutasyonun olumsuz etkisini kompanse edebilir. Genetik çeşitlilik kazanmada rekombinasyonların rolünün de unutulmaması gerekir. Bazı antiretroviral ilaçlar virüsün revers transkriptaz enziminin hata yapmasını artırır (27, 28). Belli mutasyon seçilmesinde konağın genetik özellikleri ile bağışıklık sisteminde de rolü vardır. Sitozin deaminaz enzimi olan APOBEC3 proteinlerinin de dirençle ilişkili mutasyonların ortaya çıkışında rolleri olabileceği üzerinde durulmaktadır (29). Tüm antiretrovirallerin plazma düzeyleri kişiler arasında büyük bir değişkenlik gösterir. Bunlardan sorumlu mekanizmalardan biri genellikle konağa ait genetik mutasyonlar ve/ veya polimorfizmlerdir. Hücresel aktif pompa işlevi gören P-gp ve MRP-4 proteinlerinin aşırı ekspresyonunda, zidovudinin hücre içinde birikiminde azalma olmaktadır. Konağa ait genetik faktörlerin bir diğer belirleyici rolü de ilaçların biyoyararlanım, yan etki profilleri, toksisite ya da tolerans durumudur. Bu özellikler tedavi uyumu, güvenliği ve etkinliği açısından son derece önemlidir (30). Tedavi sırasında dirençli olmayan yabani suşlar ortadan kalkmakta ve zamanla mutant suş hakim olmaktadır. Ancak tedavi herhangi bir nedenle kesildiğinde, eğer dirençle ilişkili mutasyon replikasyon kapasitesini ya da '*fitness*'ini düşürüyorsa yabani suş zamanla yeniden baskın hale geçmektedir. Bu durumda yapılan testlerde direnç saptanmayabilir. Ancak yeniden tedaviye başlanacak olursa, yabani suş yine hızla inhibe olurken, azınlıktaki mutant suşlar yeniden baskın hale geçecektir. Virusun replikasyon kapasitesi ile '*fitness*' kavramları sıklıkla birbirinin yerine kullanılabilir.

Replikasyon kapasitesi ve *'fitness'*, mutasyona uğramamış doğal suşlar arasında farklılıklar gösterebilmektedir (27, 30). Virusun replikasyon kapasitesi; bir viral izolatın ya da laboratuvarında oluşturulmuş bir tasarımın in vitro ideal koşullarda ve yeterince konak hücresi varlığında, herhangi bir inhibe edici baskı olmaksızın replike olabilme kapasitesidir. Viral *'fitness'* ise ideal koşullar olmadan, doğal bir virüs popülasyonunun, insanvücudu ve benzeri bir ekosistemde; konak hücre kıtlığı, bağışıklık sistemi ve farmakolojik ajanların baskısı ve yarışmacı virusların olduğu ortamda yayılabilme kapasitesidir (5). Seropozitif kişiler arasında bulaşmaların önlenmesi direnç gelişimi açısından önemlidir. HIV ile enfekte kişilerdeki dirençli suşlarla meydana gelen süperenfeksiyonlar, bu kişilerde viral yükte artış ve CD4 sayısında düşüşle bağlantılıdır. Tedavi altındaki kişiler tedaviye uyum gösterebilir bile tedavi başarısız kalabildiği bilinmektedir (31, 32, 33, 34).

Giderek yaygınlaşan ve çeşitlenen kombine antiretroviral tedavi, virusun eliminasyonu ile sonuçlanmasa da, virusu baskı altında tutarak HIV enfeksiyonuna bağlı mortalite ve morbiditeyi büyük ölçüde düşürmüştür. Gerek virusun yapısından kaynaklanan sorunlar, gerekse ilaç ve hasta uyumuna bağlı nedenler bu konudaki en büyük engellerden birini oluşturmaktadır. Antiretroviral ilaç direnç testleri, antiretroviral tedavinin düzenlenmesi ve optimizasyonu açısından büyük önem kazanmıştır. Antiretroviral ilaçlara karşı direnç, daha ilk kullanıma giren ilacın faz II çalışmaları sırasında gözlenmiş, ancak yeni antiretrovirallerin kullanıma girmesi ve 1995 yılından bu yana bunların kombine kullanıldığı artan sayıda hastaya *'Highly active antiretroviral therapy' (HAART)* uygulaması ile birlikte, HIV ile enfekte kişilerde düşük viral yük, stabil CD4 hücre sayısı ile birlikte komplikasyonlarda da azalma gözlenmiştir (5).

2.7.1. HIV Replikasyonunu Baskılayan Kullanıma Onaylanmış İlaçlar

1. Revers transkriptaz inhibitörleri
 - a. Nükleoz(t)id analogu RT inhibitörleri (NRTI, NtRTI) : Zidovudine (ZDV, AZT),

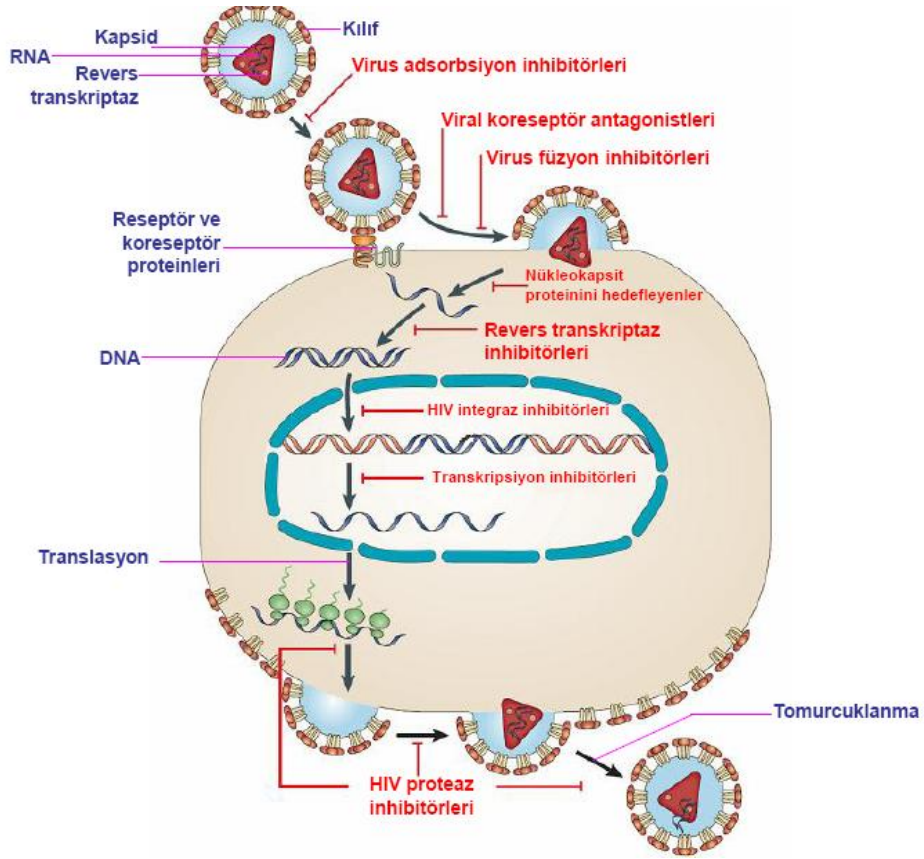
Didanozine (ddl), Stavudine (d4T), Lamivudine, Abacavir, Tenofovir (TDF), Emtricitabine. Tenofovir hariç diğerleri ön ilaçtır ve aktif olmaları için fosfarilasyona gereksinim duyarlar (35, 36, 37).

b. Nükleozid analogu olmayan RT inhibitörleri (NNRTI): Nevirapine, Delavirdine, Efavirenz. Direkt olarak enzime bağlanarak etki gösterirler. Sadece HIV-1 için etkilidirler. Enzimler üzerine indükleyici veya inhibitör etkileri nedeniyle diğer ilaçlarla etkileşimlerine dikkat edilmelidir. Tek ilaç olarak kullanıldıklarında hızla direnç geliştiği için mutlaka kombine tedavide kullanılmalıdır (35, 36).

2. Proteaz inhibitörleri (PI): Ritonavir, Saquinavir, Indinavir, Nelfinavir, Fosamprenavir, Lopinavir+Ritonavir, Atazanavir, Tipranavir, Darunavir. Fosamprenavir; Amprenavir'in ön ilaç halidir. Amprenavir'in yerine kullanılmaya başlanmıştır. Lopinavir ve Ritonavir birlikte kullanılırlar. PI'leri; HIV proteazı, gag ve pol genlerinin kodladığı poliproteinlerin, translasyon sonrası kesilmesini ve böylece işlevsel proteinlerin oluşmasını sağlar. Hızla direnç gelişmesi ve grup içindeki ilaçlarda çapraz direnç oluşabilmesi nedeniyle diğer grup antiviraller ile kombine edilerek kullanılırlar (35, 38).

3. Giriş inhibitörleri (Füzyon inhibitörleri FI): Enfuvirtide, Maraviroc. Biyomimetik peptid yapısındadır (38). HIV girişi viral yaşam siklusunun ilk basamağıdır. CD₄ reseptörüne bağlanma, CCR5 veya CXCR4 kemokin reseptörüne bağlanma ve Membran füzyonu basamaklarını hedef alır.(35, 38)

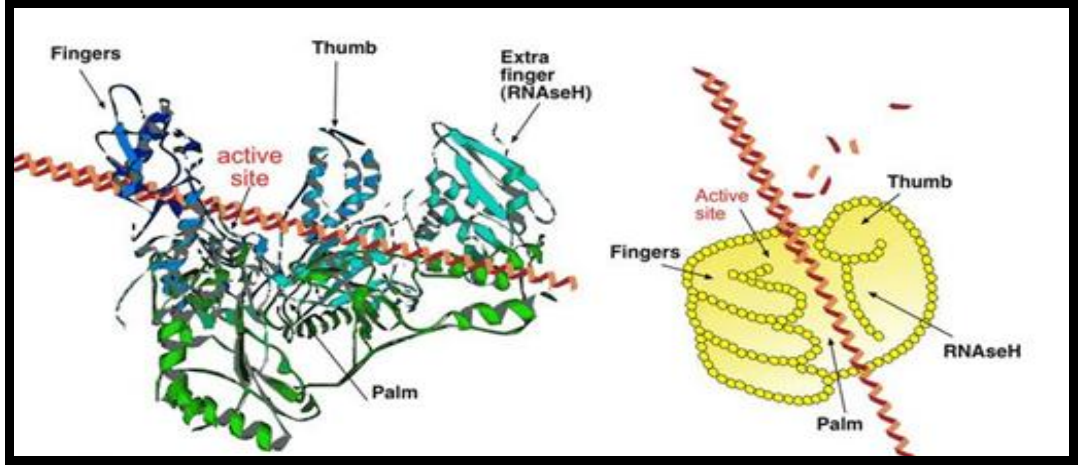
4. İntegraz inhibitörleri: Raltegravir. İntegraz HIV'in proviral DNA'sının konakçı genetik materyaline integrasyonundan sorumlu olan enzimdir. Bu integrasyonu inhibe eder ve sonuç olarak viral genlerin viral proteinlere translasyonunu engeller. Diğer ilaçlara direnç gösteren olgularda kurtarma tedavisinde kullanılır (38).



Şekil 6: Antivirallerin etki mekanizması (De Clercq E: 2004)

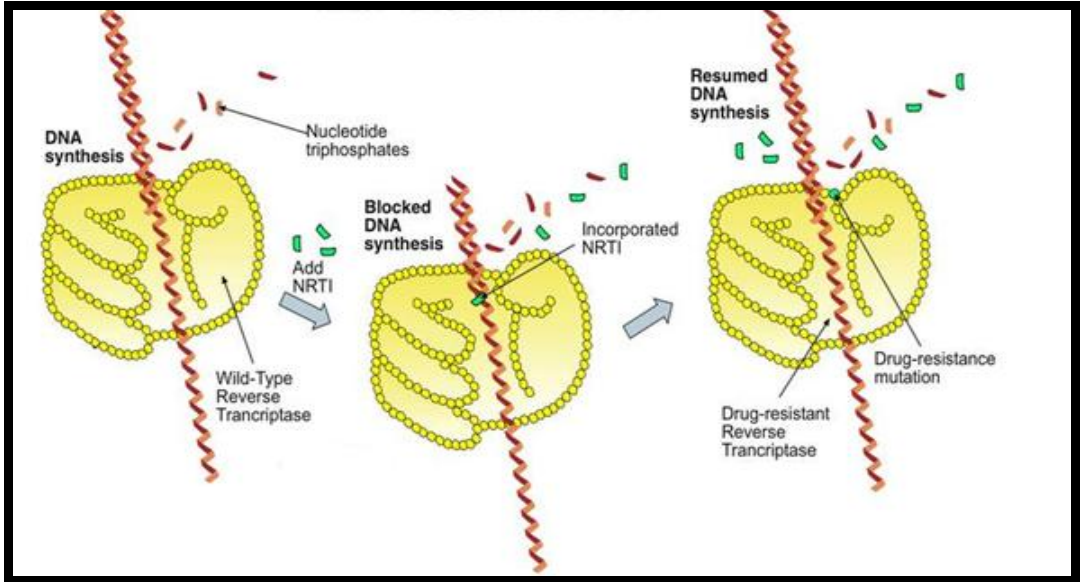
2.7.2. Revers Transkriptaz İnhibitörleri ve Direnç

Bu ilaçlar enzimin polimeraz etkinliğini hedef almaktadır. HIV-1 revers transkriptaz enzimi dimerik yapıda bir proteindir. İki zincirden birini p66, diğerini ise p66'nın proteolitik parçalanma ürünü olan p55 oluşturmaktadır. Her iki zincirde ortak olan 4 bölge bulunmaktadır. Bu ortak bölgelere; revers transkriptazın üç boyutlu yapısı sağ ele benzediği için; parmaklar (fingers), avuç içi (palm), başparmak (thumb) ve bağlantı (connection) adı da verilmektedir (39). Revers transkriptaz enziminin RNase etkinliğinden sorumlu olan diziler; p66 zincirinin karboksil ucunda yer alırken, polimerazın katalitik etkili, 110, 185 ve 186. Pozisyonlardaki aspartik asit rezidüleri, p66 zincirinin avuç içi bölgesinde bulunmaktadır. Katalitik bölgeye yakın, avuç içi ve başparmak arasındaki hidrofobik cebin içinde bulunan bağlanma bölgesine bağlanan non-nükleozid revers transkriptaz inhibitörleri; nükleotidlerin DNA zincirine eklenmesini sağlayan kimyasal tepkimeyi inhibe ederek etki gösterirler (40).



Şekil 7: HIV revers transkriptazın üç boyutlu yapısı

Sağ ele benzer (Immunopaedia.org).



Şekil 8: NRTI ayrılması

(Discrimination) Revers transkriptaz sırasında NRTI DNA ile birleşir ve zincirin sonlanmasına neden olur (Immunopaedia.org)

NRTI/NtRTI'lerin etkili olabilmeleri için hüresel kinazlar tarafından fosforillenip aktif formları olan nükleozid trifosfat formuna dönüştürülmeleri gerekir. Bu form zincire katıldığında, riboz halkasının 3' pozisyonunda -OH grubu taşımadıklarından, DNA sentezinin durmasına neden olur.

NRTI/NtRTI'lerin direnç mekanizmalarında 2 temel mekanizma söz konusudur. Birincisinde mutasyonlar sonucunda revers transkriptaz enzimi NRTI/

NtRTI'leri ayırt etmesi ve böylece NRTI/NtRTI'lerin uzamakta olan DNA zincirine sokulmaları engellenir. M184V, Q151M, L74V ve K65R mutasyonları bu mekanizmayı kullanır. İkinci mekanizma ise pirofosforilaz adı verilen hidrolitik yolla eklenmiş olan NRTI/ NtRTI'lerin zincirden çıkartılmalarıdır. M41L, D67N, K70R, L210W, T215Y ve K219Q mutasyonları da bu gruba girer. Sıklıkla zidovudin ya da stavudine tedavilerinin seçirici baskısı altında geliştiklerinden Timidin Analog Mutasyonları (TAMs) olarak adlandırılırlar (41).

Abacavir										
	K		L		Y		M			
	65		74		115		184			
	R		V		F		V			
Didanosine										
	K		L							
	65		74							
	R		V							
Emtricitabine										
	K						M			
	65						184			
	R						V			
							I			
Lamivudine										
	K						M			
	65						184			
	R						V			
							I			
Stavudine										
M		D		K				L	T	K
41		67		70				210	215	219
L		N		R				W	Y	Q
									F	E
Tenofovir										
	K			K						
	65			70						
	R			E						
Zidovudine										
M		D		K				L	T	K
41		67		70				210	215	219
L		N		R				W	Y	Q
									F	E

Şekil 9: NTRI mutasyonları

((Update of the Drug Resistance Mutations in HIV-1: December 2010))

NTRI'lerine çoklu ilaç direncine neden olan mutasyonlarda üç farklı yolak vardır: TAM (Timidin Analog Mutasyonları), 69 'insertion' kompleks ve 151 kompleks yolakları.

ZDV ve d4T TAM yolunu seçer ve diğer NRTI'lere çapraz direnç görülür. M41L ve T215Y/F primer direnç mutasyonu olarak tanımlanırken, D67N, K70R, L20W, K219Q sekonder direnç mutasyonları olarak tanımlanır. TAM bazen timidin

dışı nükleozidlerde de direnç görülebildiği için, nükleozid ilişkili mutasyon anlamında (NAM) da kullanılır (nucleoside associated mutations) (42).

69 ‘insertion’ kompleks yolu; 69. kodon değişiklik ile oluşur (sıklıkla T69S), 2 ya da daha fazla aminoasitin eklenmesi sonucu gelişir. 41, 210 ve 215. kodonlarda bir ya da daha fazla TAM‘da bulunursa tüm NRTI ile ilişkili olabilir.

151 Kompleks Yolağı; Q151M, D67N, K70R, L20W ve K219Q mutasyonlarını içerir. TDF hariç tüm NRTI‘lere direnç meydana gelir.

69 Insertion Complex										
M	A		K					L	T	K
41	62	69	70					210	215	219
L	V	insert	R					W	Y	Q
									F	E
151 Complex										
	A			V	F		F	Q		
	62			75	77		116	151		
	V			I	L		Y	M		
TAMs										
M		D		K				L	T	K
41		67		70				210	215	219
L		N		R				W	Y	Q
									F	E

Şekil 10: NRTI çoklu ilaç direnci yolları

((Update of the Drug Resistance Mutations in HIV–1: December 2010))

Katalitik bölgeye yakın, avuç içi ve başparmak arasındaki hidrofobik cebin içinde bulunan bağlanma bölgesine bağlanan non–nükleozid RT inhibitörleri; nükleotidlerin DNA zincirine eklenmesini sağlayan kimyasal tepkimeyi inhibe ederek etki gösterirler. En sık K103N, Y181C/I, Y188C mutasyonları görülür (43, 44, 45, 46).

Efavirenz				L	K	K	V	V			Y	Y	G		P
				100	101	103	106	108			181	188	190		225
				I	P	N	M	I			C	L	S		H
											I		A		
Etravirine ^a		V	A	L	K		V		E	V	Y		G		M
		90	98	100	101		105		138	179	181		190		230
		I	G	I*	E		I		A	D	C*		S		L
					H				G	F	I*		A		
					P*				K	T	V*				
Nevirapine				L	K	K	V	V			Y	Y	G		
				100	101	103	106	108			181	188	190		
				I	P	N	A	I			C		C	A	
							M			I			L		H

Şekil 11: NNRTI Mutasyonları

((Update of the Drug Resistance Mutations in HIV–1: December 2010))

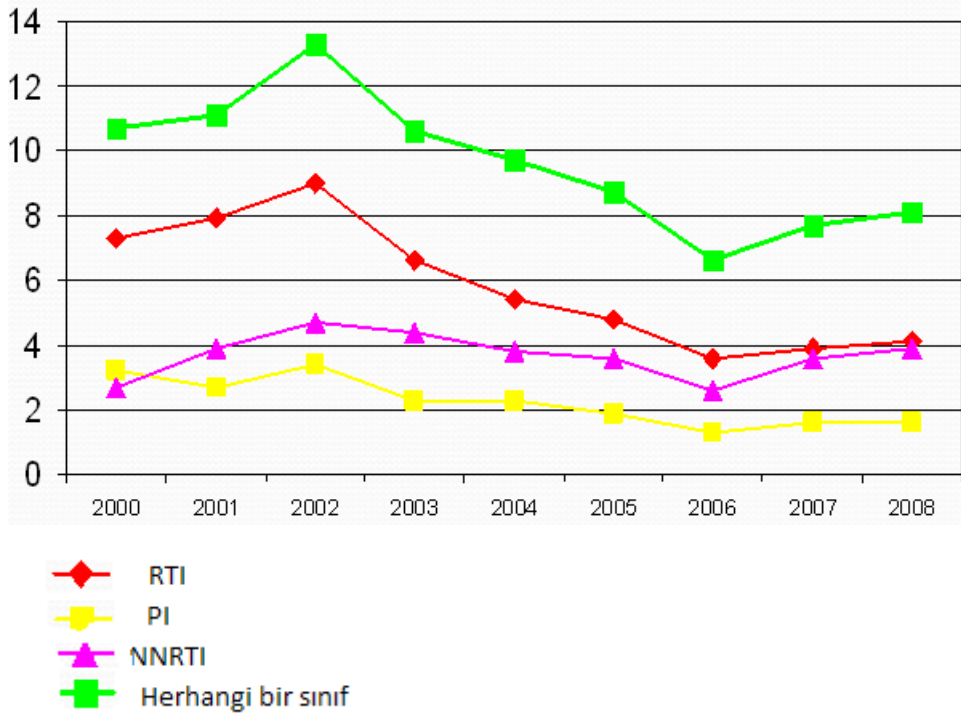
2.7.3. Polimeraz İnhibitörleri ve Direnç

HIV-1 proteaz enzimi pol geninin 5' ucundan kodlanan 99 aminoasitlik bir aspartik proteinazdır. Homodimerik yapıdaki bu enzim gag (p55) ve gag-pol (p160) poliprotein ürünlerini 9 ayrı spesifik bölgeden keserek, fonksiyonel kor proteinleri (p17, p24, p7 ve p6) ile RT, integraz ve proteaz enzimlerinin oluşmasını sağlar (47). Proteaz inhibitörleri (PI) enzimin aktif bölgesine bağlanarak, gag ve gag-pol poliproteinlerinin kesilmesine engel olur ve böylece olgun virionların oluşması inhibe edilir. RTI'lerin aksine, PI'leri kronik olarak enfekte hücrelerden infeksiyöz virüs oluşmasını engelleyebilmektedirler. (30) PI'lerine direnç proteaz enziminin aktif bölgesinde ve ilaçların bağlanma bölgelerinde ortaya çıkan nükleotid değişimleri ile ilişkilidir (30). PI'lerine karşı oluşan primer mutasyonlar virusun ilaca duyarlılığını beş kat azaltmakta, ancak daha sonra oluşan primer mutasyonlar tüm proteaz inhibitörlerine karşı çapraz direnç gelişimine yol açmaktadırlar. Bu sebeple PI'ne karşı direnç gelişmiş hastalarda diğer PI'leri de etkisiz kalmaktadır (30).

Atazanavir +/- ritonavir [†]	L 10	G 16	K 20	L 24	V 32	L 33	E 34	M 36	M 46	G 48	I 50	F 53	I 54	D 60	I 62	I 64	A 71	G 73	V 82	I 84	I 85	N 88	L 90	I 93
	I F V C	E R M I T V		I I Q I L V					I L	V	L L Y L V M T A			E V		L M V	V I T L A	C S T A	A T F I	V V V S			M L M	
Darunavir/ ritonavir [‡]	V 11				V 32	L 33			I 47		I 50	I 54						T 74	L 76		I 84	L 89		
	I				I F			V	V	M L								P V		V	V			
İmprenavir/ ritonavir [†]	L 10				V 32				M 46	I 47	I 50	I 54					G 73	L 76	V 82	V 84	I 89	L 90		
	F I R V				I			I V	V	V	L V M						S V	V	A F S T	V	V	M		
İndinavir/ ritonavir [†]	L 10	K 20	L 24	V 32	M 36				M 46		I 54					A 71	G 73	L 76	V 77	V 82	I 84	L 90		
	I R V	M R	I	I	I				I L		V					V T S A	V I	V I	A F T	V	V	M		
Lopinavir/ ritonavir [‡]	L 10	K 20	L 24	V 32	L 33				M 46	I 47	I 50	F 53	I 54			L 63	A 71	G 73	L 76	V 82	V 84	I 89	L 90	
	F I R V	M R	I	I F					I L	V A	V	L L A M T S				P	V T	V S	V	A F T S	V	V	M	
Nelfinavir [™]	L 10			D 30	M 36				M 46								A 71		V 77	V 82	I 84	N 88	L 90	
	F I			N	I				I L								V T		I A F T S	V	V	D S		
Saquinavir/ ritonavir [†]	L 10		L 24						G 48		I 54			I 62		A 71	G 73	V 77	V 82	V 84	I 89	L 90		
	I R V		I						V		V L			V		V T	V S	I A F T S		V	V	M		
Tipranavir/ ritonavir [™]	L 10			L 33	M 36	K 43	M 46	I 47			I 54	Q 58		H 69		T 74		V 82	N 83	I 84	L 89			
	V			F	I L V	T	L V				A M V	E		K R		P		L T	D V			I M V		

Şekil 12: Proteaz inhibitörlerine direnç

(Update of the Drug Resistance Mutations in HIV-1: December 2010)



Şekil 15: ART naif hastalarda yıllara göre HIV ilaç direç prevalansı

(UK HIV drug resistance database)

2011 AIDS rehberlerine göre şu durumlarda direnç testleri önerilir:

Tedavi naif hastalara antiretroviral tedavi (ART) başlamadan önce, tedavi rejimini değiştirirken aktif ilaçları seçmek için, ART' ye ara verilmiş veya tedavi ertelenmiş ise tekrar tedavi başladığı zaman direnç testi yapılır. En az bir ilaç dirençli HIV, hastalarının %6-%16'sında görülür ve suboptimal viral yanıt temel direnç mutasyonları varlığında görülebilir. Bazı direnç mutasyonları kronik tedavi almayan hastalarda yıllarca saptanabilir düzeyde kalabilir. Bu nedenle ART- naif kronik HIV hastalarında tedavi hemen başlamış veya ertelenmiş olduğuna bakılmaksızın, HIV bakımına girilir girilmez test yapılır. Viral yük izleminde kısmi yanıt alınıyorsa veya virolojik başarısızlık saptandığında, tedavi değişikliği yapmadan önce (tercihen hasta tedaviye devam ederken veya ilaçlar kesildikten 4 hafta içinde) direnç testleri yapılır.

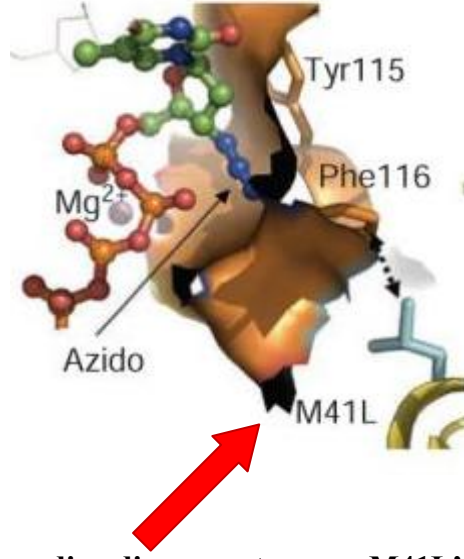
Tedavi başlanacak gebelerde veya tedavi alırken gebe kalan ve saptanabilir HIV RNA'sı olan kadınlarda, direnç testlerinin yapılması önerilir. Direnç testi HIV RNA > 1000 kopya/ ml ise, önerilir. HIV RNA düzeyleri >500 <1000 kopya/ ml ise test başarısız olabilir ama yine de dikkate alınmalıdır. (53).

Mutasyonun olması, ilacın başarısız olmasına yol açarken, direncin olmaması ilacın etkili olacağını göstermez. Tedavi rejimindeki tüm ilaçlar için direnç yoktur diye raporlansa bile tedavi başarısızlığının birçok nedeni vardır. Dirençli mutantlar virus popülasyonunun %25'inin altında ise saptanmayabilir. İlaç bir kez hastayı tedavi etmek için kullanıldığında dirençli varyant tekrar baskın hale gelir ve tedavi başarısızlığına yolaçar. İlaç-ilaç etkileşimi, düşük doz tedavi ya da laboratuvarın testi uygulama ya da yorumlamasında hata olabilir (54, 55).

2.7.6. M41L Direnci

Mutasyonların bir kısmı primer ya da majör, bir kısmı ise sekonder ya da minor mutasyonlar olarak tanımlanır. Primer ya da majör mutasyonlar ilgili ilaç ya da ilaç sınıfına karşı tek başlarına belirgin bir dirence yol açarken, minör ya da sekonder mutasyonlar ancak başka mutasyonlarla birlikte olduklarında dirence katkıda bulunurlar.

Mutasyonlar tipik olarak yabancı tipteki amino asidin kodu + pozisyon + yeni gelen aminoasidin kodu şeklinde ifade edilir. Örneğin 41. Kodondaki Metionin yerine Lösin geçmişse M41L şeklinde belirtilir. Kodon değişikliği: ATG→TTG/CTG şeklindedir. Bu mutasyon NTRI'lerinde görülür. Genellikle T215Y ile ilişkilidir. T215Y ile birlikte olduğunda fenotipik direnç tek başına T125Y'den daha fazladır. AZT direnç mutasyonu M41L, Glu44 (Glutamik asit) and Phe116 (Fenilalanin) proksimalindedir. 41. pozisyondaki lösin, Phe 116 ve 3'-azido grubu ile çevredeki kalıntıların (rezidülerin) etkisini dengeler (Şekil 16). M41L dışındaki diğer AZT direnç mutasyonlarının, Zidovudine Trifosfat (AZTTP)'in reverse transkriptaza kısmı bağlanmasına fark edilebilir herhangi bir yapısal etkisi yoktur (56, 57).



Şekil 16: Zidovudine direnç mutasyonu M41L' nin pozisyonu

(Structural basis of HIV-1 resistance to AZT by excision. Natural structural & molecular biology 2010)

2.8. Nükleik Asit çoğaltma Yöntemleri

Nükleik asit çoğaltma ve saptama yöntemleri genel olarak iki grupta incelenmektedir.

1. Nükleik asit prob hibridizasyon yöntemleri

2. Nükleik asit amplifikasyon yöntemleri

Nükleik asit prob hibridizasyon yöntemleri, moleküler yöntemlerin en eski ve en basit olanıdır. Örnekteki hedef nükleik asit dizisi, komplementeri olan işaretli bir prob ile hibritlenmekte ve tanı konmaktadır. Problar, 20–30 nükleotidten oluşmuş ve hedef dizinin karşıtı olarak laboratuvarında sentezlenmiş, sıklıkla bir dedektör molekülle işaretlenmiş oligonükleotidlerdir. Nükleik asit kimyası kendi karşıtını yapma yeteneğine dayanmaktadır. DNA molekülü yeteri kadar ısıtılırsa çift iplikli heliks yapıyı tutan hidrojen bağlar tahrip olur ve molekül tek sarmallı yapıya denatüre olur. DNA soğumaya bırakılırsa, komplementer baz çiftleri birleşir (renatürasyon) ve çift heliks yapı oluşur. Prob tek zincirli hale gelmiş DNA veya RNA dizisi olup, ilgi duyulan gendeki DNA veya RNA zincirinin komplementeridir. Uygun ısı, tuz, pH şartlarında, prob hedef DNA'ya bağlanır ve radyoaktif sinyallerin görünür hale getirilmesi ile tanı konur (58). Kültürü veya identifikasyonu zor olan

mikroorganizmaların genomik yapıları tespit edilerek, identifikasyonunun kolayca yapılabilmesi amacıyla kullanılmaktadır. Bir defada sınırlı sayıda patojenin işleme alınması, yaygın olmayan patojenlerin ön kültürlerinin ve duyarlılık testlerinin yapılmasının gerekli olması, yanlış pozitif ve yanlış negatif sonuçlarının fazla olması nedeniyle çok fazla kullanılmayan bir yöntemdir. Nükleik asit amplifikasyon yöntemleri ise son yıllarda sıklıkla kullanılmaktadır.

Nükleik asit amplifikasyon yöntemlerinde en sık kullanılan 3 farklı yöntem vardır.

- Hedef (target) amplifikasyon yöntemleri
- Probe amplifikasyon yöntemleri
- Sinyal amplifikasyon yöntemleri

Hedef amplifikasyon yöntemlerden en önemlisi polimeraz zincir reaksiyonu (PZR)'dur. PZR moleküler biyoloji ve biomedikal araştırmalar, bakteriyel, viral, fungal ve protozoal hastalık etkenlerinin tanısı, gıda, su ve yiyeceklerde bulunan mikroorganizmaların tanısı, genetik bozukluklar ve kanser taramaları, prenatal tanı ve cinsiyet belirlenmesi, gen tedavisi ve DNA aşılı, adli tıp'da suçlu teşhisi, antropoloji gibi oldukça geniş kullanım alanı vardır (58, 59).

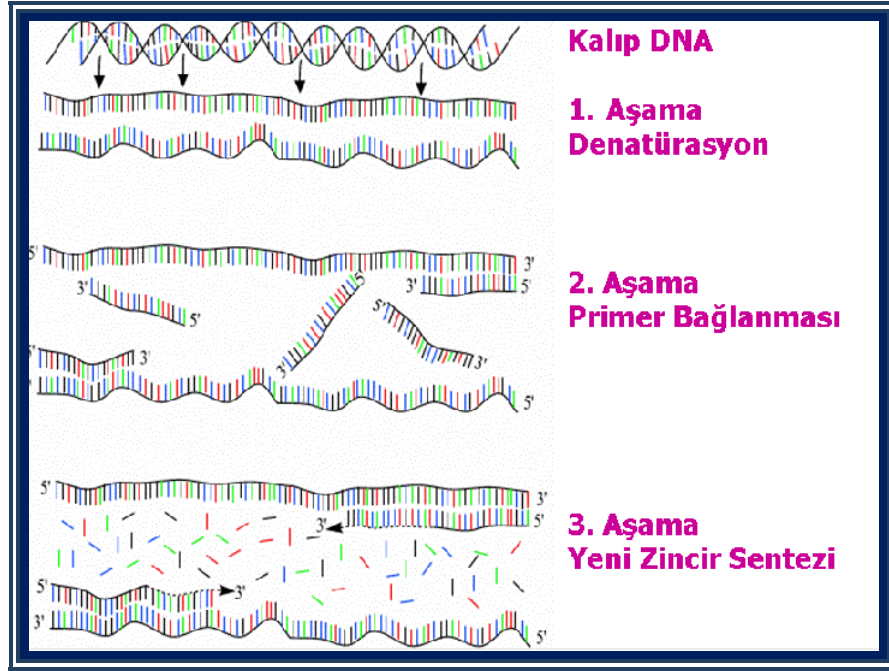
2.8.1. Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR)

PZR, spesifik DNA segmentlerinin vitro amplifikasyonudur. Hedef DNA bir tüpte in vivo DNA replikasyonuna benzer şekilde çoğaltılır. İlk kez 1983'de Kary Mullis adlı bir biyokimyacı tarafından geliştirilmiştir. İlk kez başarılı in vitro DNA amplifikasyonu Saiki ve ark. tarafından 1985 yılında gerçekleştirildi.

PZR Gerekli malzemeler:

- Hedef diziyi taşıyan kalıp DNA
- Kalıp DNA ile eşleşebilen 2 tür oligonükleotid primeri
- Dört tür dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
- Termostabil DNA polimeraz enzimi (taq, Vent)
- Tampon
- MgCl₂

Her PZR, istenilen sayıda tekrarlanabilen döngülerden oluşur. Bir PZR döngüsü sırasıyla, deoksiribonükleik asidin (DNA) iki zincirinin yüksek sıcaklıkta birbirinden ayrılması ("Denaturation"); sentetik oligonükleotidlerin hedef DNA'ya bağlanması ("Annealing") ve zincirin yeni çift zincirli DNA'lar oluşturacak şekilde uzaması ("Extension") aşamalarından meydana gelir (58, 60)



Şekil 17: Polimeraz zincir reaksiyonunda bir siklusun aşamaları

(Vierstrate A. Principle of the PZR. 1999)

2.8.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu Çeşitleri

- 1- İvers (Tersine Dönmüş) PZR
- 2- Homopolimerli PZR
- 3- İn situ PZR
- 4- Hot start PZR
- 5- Multipleks PZR
- 6- Kantitatif PZR
- 7- Nested, seminested PZR
- 8- RT (Revers transcriptase) PZR
- 9- Touch down PZR

10- Consensus PZR

11- Real time PZR

Bu çalışmamda TaqMan prob ile 'Real Time' PZR yöntemi kullanılmıştır.

2.8.3. Real Time PZR

Nükleik asit çoğalmasıyla eş zamanlı olarak artış gösteren floresans sinyalin ölçülmesiyle, kısa sürede kantitatif sonuç verebilen bir PZR yöntemidir. Ticari olarak geliştirilmiş üç tipi bulunmaktadır. Bunlar; LightCycler (Roche), TaqMan (PEBiosystem) ve iCycler (BIO-RAD) sistemleridir (61, 62, 63)

2.8.3.1. Real Time –PZR'da Kullanılan Prob Sistemleri ve Boyalar

1- Özgül olmayan floresan işaretli boyalar; Örneğin, Syber Green

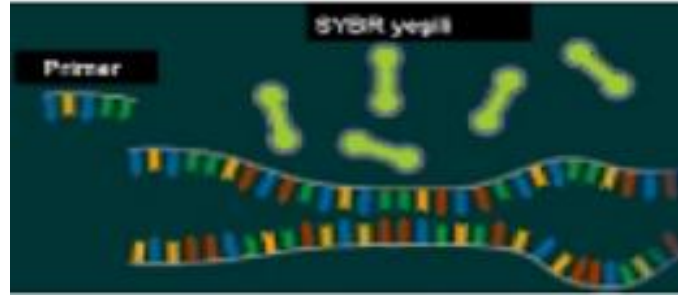
2- Özgül floresan işaretli boyalar;

- 5 nükleaz (TaqMan probları),
- FRET hibridizasyon probları
- Moleküler 'beacons'

Syber Green; sadece çift zincirli DNA'ya bağlandıklarında floresan veren, duyarlı fakat özgün olmayan bir floresan boyadır, amplifikasyona bağlı DNA artışı, ortaya çıkan floresanın miktarı ile ölçülmektedir. Primerin bağlanmasını takiben gerçekleştirilen uzama aşamasında hedef DNA'nın çift sarmal hale gelmesiyle DNA'ya bağlanan *Syber Green* miktarı artmakta ve buna bağlı olarak floresan miktarında artış gözlenmektedir. PZR amplifikasyonunun ardından sıcaklık yavaş yavaş yükseltilerek tüpteki floresans miktarı kaydedilir. Çift sarmal DNA zincirleri birbirinden ayrıldıkça 'Syber Green' boya serbest kalmakta ve floresan miktarı azalmaktadır.

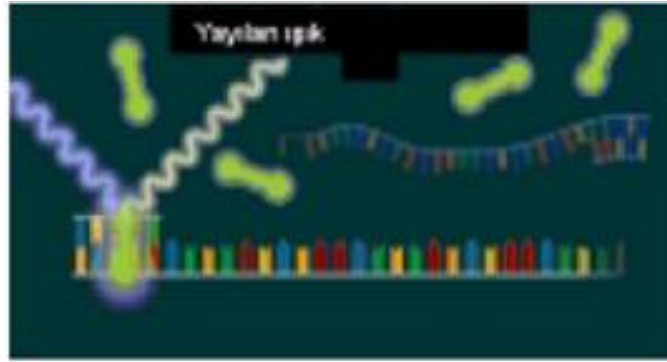
Denatürasyon olduğunda floresan sinyali aniden düşmektedir. Erime eğrisinden yararlanılarak ampikonun T_m derecesi saptanabilmektedir. Klinik örneğin T_m derecesi ile pozitif kontrolün T_m 'i karşılaştırılarak sonuç verilir. Bu uygulamada, floresans artışı her zaman spesifik amplifikasyonu göstermeyebilir. Çünkü çift sarmal DNA'ya entegre olan *Syber Green 1* ortamda hedef moleküller olmadığında

primerlerin kendi aralarında gerçekleşecek olan bağlanmalar (primer dimer) sonucunda da yapıya katılarak floresans oluşumuna sebep olabilmektedir. Bu olumsuz faktörü gidermek için amplifikasyon ürünlerinin erime eğrisi (melting curve) analizi yapılmaktadır. Her çift sarmal DNA, kendine özgü erime ısı (T_m, çift sarmal DNA'nın %50'sinin tek sarmal hale gelmesi için gerekli sıcaklık) değerine sahiptir (58, 64, 66, 67).



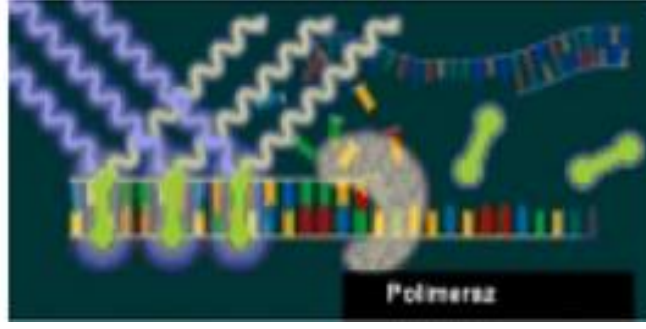
Şekil 18: Syber Green; başlangıç aşaması

Amplifikasyonun başlangıcında reaksiyon tüpü içinde 'Syber Green', primerler ve denatüre edilmiş DNA ayrı ayrı bulunduğu için floresans yok denecek kadar azdır.



Şekil 19: Syber Green; Primerin hedef moleküle bağlanması

Primerlerin hedef moleküle bağlanmasının ardından az miktarda 'cyber green' çift sarmal yapıya katılmakta ve bunun sonucu olarak yayılan floresans miktarı da az olmaktadır.

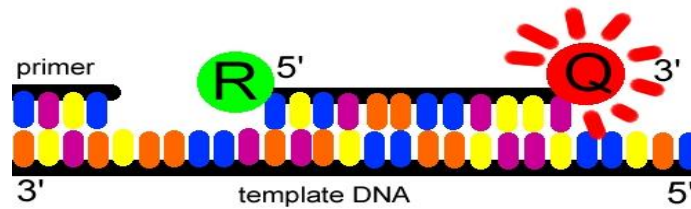


Şekil 20: Primer uzaması

Primer uzamasında yeni sentezlenen çift sarmal DNA'nın yapısına gittikçe fazla miktarda boya katılarak zaman içinde floresans derecesinde artışa neden olmaktadır.

TaqMan (Taq Polymerase + PacMan = TaqMan) Prob;

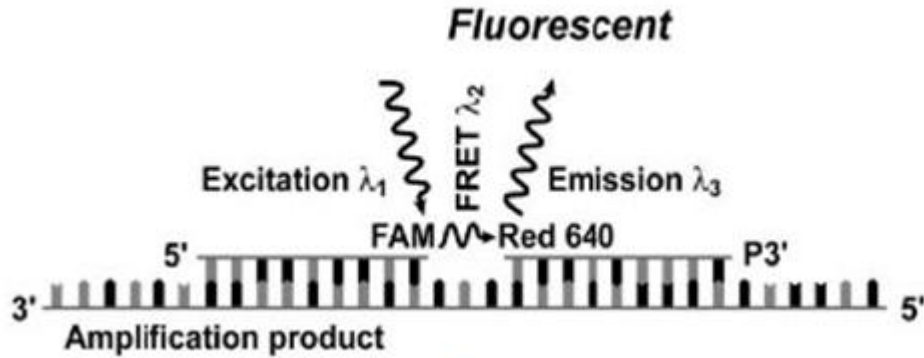
TaqMan sisteminde 5' ve 3' uçlarından florokrom maddelerle işaretli probalar kullanılmaktadır. Probun 5' ucunda reporter florokrom (6-carboxyfluorescein= 6-FAM), 3' ucunda ise baskılayıcı (quencher) florokrom (6-carboxy-tetramethyl-rhodamine= TAMRA) bulunmaktadır. Prob tek sarmal hale getirilen hedef molekül üzerinde, primerlerin bağlanma bölgesinin arasında kalan yere bağlanır. Prob-hedef molekül arasındaki hibridizasyon devam ettiği sürece reporter florokrom maddenin sinyal oluşturması, 3' uçtaki baskılayıcı florokrom tarafından engellenmektedir. Primerlerin hedef nükleik asite bağlanmasını takiben primer uzaması probun bağlandığı noktaya kadar geldiğinde, sentezin devam edebilmesi için Taq DNA polimeraz enzimi 5'-3' nükleaz aktivitesini kullanarak probu 5' uçtan yıkmaya başlar. Böylece reporter serbest hale geçer ve sinyal oluşur. Her siklusa üretilen ampliconun miktarına paralel olarak sinyal şiddeti de artmaktadır (62, 63, 68).



Şekil 21: TaqMan Prob

(<http://www.bio.davidson.edu/courses/Molbio/MolStudents/spring2003/Pierce/realtimePZR>)

FRET hybridizasyon; Bu sistemde ise hedefe özgül problemler kullanılarak testin spesifitesi artırılmıştır. Problemlerden biri 3' ucundan floresan boya (donör boya), diğeri 5' ucundan alıcı boya (acceptor dye) ile işaretlenmiştir. Problemler hedef amplikonlar üzerinde birbirine yakın (1–5 nükleotid) uzaklıkta yere bağlanmakta ve işaretli uçlar yan yana (head to tail) gelmektedir. İki boyanın yan yana gelmesiyle açığa çıkan enerji, ikinci prob üzerindeki alıcı boyayı etkileyerek floresans oluşumuna yol açmaktadır. FRET (Fluorescence resonance energy transfer) olarak adlandırılan bu enerji transferi sonucunda oluşan floresans miktarı, ortamdaki hibridizasyonun derecesine, diğeri bir ifadeyle PZR siklus süresince oluşan amplikonların miktarına bağlı olarak artmaktadır. Bu enerji (FRET) transferi sonucunda oluşan floresans miktarı, ortamdaki hibridizasyon derecesine, diğeri bir ifade ile PZR siklus süresince oluşan amplikonların miktarına bağlı olarak artmaktadır (62, 63).



Şekil 22. FRET Hibridizasyon

Moleküler Boncuk Yöntemi (Moleküler Beacons);

TaqMan ile arasındaki fark, moleküler boncukların uç ilmek yapılarının, prob hedef baz dizilerine hibridize olmasa dahi, iki etiketi mümkün olduğu kadar birbirine en yakın pozisyona getirme bakımından optimize edilmiş olmasıdır. Bu nedenle, floresan maximum oranda azaltılmıştır.

- Sanger dideoksi yöntemi (72)
- Maxam-Gillbert kimyasal degradesyon yöntemi (73)

Her iki teknik de üç temel basamaktan oluşmaktadır.

- DNA'nın hazırlanması
- Reaksiyonlar
- Yüksek voltajlı jel elektroforezi

Her iki analiz sırasında da tek iplikçikli DNA parçaları hazırlanan DNA dizi analiz yöntemleri arasındaki temel fark, DNA fragmanlarının üretilme biçiminden kaynaklanır. Jel elektroforezi yüksek çözünürlükteki DNA moleküllerini ayırttığı için her iki yöntemde de kullanılır.

İnsan Genom Projesi gibi büyük projeler çok sayıda DNA dizi analizi yapılmasını gerektirmektedir. Artan analiz sayısı, uzun zaman ve yüksek iş gücü gerektirir. Otomatik DNA dizi analizleri zaman kazancı yanında, standart çalışma koşulları ve elde edilen sonuçların değerlendirilmesinde de yarar sağlamıştır.

Otomatik analizde de, Sanger' in enzimatik DNA sentezine dayanan zincir sonlanma yöntemi kullanılmıştır. Otomatik DNA dizi analiz cihazları basit olarak, sabit bilgisayarda yüklü programlar ile bu programların yönettiği elektroforez sistemini içerir. Elektroforetik ünitelerde bulunan lazer ışık kaynağı ile monokromatik bir ışık oluşturulur. Söz konusu DNA'nın bulunduğu jel matris bu monokromatik ışık ile taranır. Elektroforez süresince DNA' ya bağlanan floresan boya ışık ile taranan bölgeye geldiğinde uyarılır. Uyarılan boya kendi için karakteristik olan dalga boyunda ışığı geri yansıtır. Yansıyan bu ışık demeti bir detektör tarafından kaydedilir. Kaydedilen veriler bilgisayar programları ile değerlendirilerek sonuçlar grafiksel ya da matematiksel olarak bilgisayar ekranına aktarılır. DNA dizi analizi cihazlarında 6 bazdan 1000 baza kadar güvenli okuma yapılabilmektedir (73).

Bu çalışmada daha önce ABI Prism 310 genetik analiz sistemi kullanılarak M41L direnci araştırılmış HIV ile enfekte olmuş hasta plazmaları Nokta-Mutasyon Spesifik Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (NMS-GZ-PZR) ile incelendi.

2.8.4.1. ABI Prism 310 Genetik Analiz Sistemi

Kendinden önceki sistemlerden farklı olarak ABI Prism 310 Genetik Analiz Sistemi poliakrilamid jel matriks sistemi yerine kapiler sistem içine doldurulan polimer jelmatriks sistemi içerir. Bu polimer jelmatriks çapı nanometre ölçütlerinde olan cam borular içerisine doldurulur. Cihaz iki ana parçadan oluşur. Birinci kısım veri ünitesidir. Veri ünitesi bir bilgisayar sisteminden ibarettir. Bu bilgisayarda, ikinci kısım ile bağlantıyı kuran ve ikinci kısmı kontrol eden programlar yüklüdür. İkinci kısım analizin yapıldığı elektroforez kısmıdır (74). ABI prism genetik analiz sistemin jel hazırlama işlemlerini ortadan kaldırma, yürütme işlemlerini dakikalar içerisinde gerçekleştirme iş akışını otomatize ederek maliyetleri ve iş gücünü azaltma, işlem hacmini arttırmak için 5 boyayı kendiliğinden saptama gibi avantajları vardır.

Klasik DNA dizileme tekniklerinde eldeki bir popülasyondaki farklılığı ayırt etme rezolüsyonu %20 civarındadır. Klasik DNA dizilemede sisteme başlangıçta milyonlarca fragman verilmiş olduğu halde tek bir sonuç elde edilir. Ancak, virus, bakteri, algler ile nadir görülen allel'ler olduğunda ve kanserde ilaca direncin daha baştan saptanabilmesi klasik DNA dizileme teknikleri ile mümkün değildir. Viral popülasyonda var olabilecek direncin %1 ve daha da aşağı bir hassasiyetle saptanabilmesi yeni nesil teknolojiyle mümkündür.

3. YÖNTEMLER

Çalışmada, İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Moleküler Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda daha önce konvansiyonel dizi analizi ile (ABI Prism 310, Foster City, A.B.D.) incelenmiş, enfekte olduğu tarih bilinmeyen, HIV-1 genotip B pozitif 60 olgunun kan örnekleri kullanıldı. Center for Diseases Control'den (A.B.D.) Heneine ve arkadaşları tarafından HIV-1 genotip B'de oluşabilen dokuz ana ilaç mutasyonunu saptamak üzere geliştirilerek valide edilmiş olduğu ve konvansiyonel dizi analizine göre duyarlılığının daha yüksek ve yorumunun daha kolay olduğu bildirilen NMS-GZ-PZR yöntemi, LightCycler 2.0 (Roche Applied Science, Almanya) aygıt sisteminde, M41L direnç mutasyonunu saptamak üzere önerilen primer setleri (n=5) ve TaqMan probu kullanılarak çalışıldı. RNA kalitesinin bozuk olduğuna karar verilen üç örnek çalışma dışı bırakıldı.

3.1. RNA İzolasyonu

HIV-1 RNA'sı plazmadan, QIAamp® MinElute® Virus Spin Kit(50) (Kat. No: 57704) manuel izolasyon kiti kullanılarak izole edilmiştir. Ekstraksiyon için, 25 µl Qiagen protease 1.5 ml. lik bir tüpe konuldu. Tüpe 200 µl HIV pozitif olduğu bilinen plazma eklendi. 220 µl tampon çözeltisi (buffer AL) + 6.2 µl taşıyıcı RNA karışımından 200 µl örneğin üzerine eklendi. Tüpün kapağı kapatılarak 15 sn. vortexlendi. Hazırlanan örnek 56°C'lik su banyosunda 15 dk. bekletildi. İnkübasyondan sonra örneğin üzerine 250 µl etanol eklendi. Tüpün kapağı kapatılarak 15 sn. vortexlendi. Oda sıcaklığında 5 dk bekletildikten sonra 8000 rpm'de 1dk santrifüj edildi. QIAamp MinElute kolonu temiz bir 2 ml'lik toplama tüpünün içine yerleştirildi ve alttaki 1.5 ml'lik tüp içinde biriken sıvıyla birlikte atıldı. Santrifüjden sonra sıvının tamamı kolondan geçip, kolonda hiç sıvı kalmayınca kadar santrifüj edildi. QIAamp MinElute kolonunu açıp 500 µl Buffer AW1 eklendi. Kapak kapatılıp 8000 rpm'de 1dk santrifüj edildi. QIAamp MinElute kolonu temiz bir 2 ml'lik toplama tüpünün içine yerleştirildi ve alttaki 1.5 ml'lik tüp içinde biriken sıvıyla birlikte atıldı QIAamp MinElute kolonunu açıp 500 µl Buffer AW2 eklendi. Kapak kapatılıp 8000 rpm'de 1dk santrifüj edildi. QIAamp MinElute kolonu temiz bir 2 ml'lik toplama tüpünün içine yerleştirildi ve alttaki 1.5 ml'lik tüp içinde biriken sıvıyla birlikte atıldı, QIAamp MinElute kolonunu açıp 500 µl etanol

(%96–100) eklendi. Kapak kapatılıp 8000 rpm’de 1dk santrifüj edildi. İçinde sıvı biriken toplama tüpü atıldı. QIAamp MinElute kolonu temiz bir 2 ml’lik toplama tüpünün içine yerleştirildi ve maksimum hızda (14, 000 rpm’de) 3dk santrifüjlendi. Kolon 1.5 ml’lik temiz bir tüpün içine yerleştirildi. Laminar kabinde kuru ısı tüplerinin içinde, ağzı açık şekilde 15 sn bekletilerek kolonun tamamen kuruması ve etanolun uçması sağlandı. 40 µl Buffer AWE eklendi, kapak kapatıldı 1dk. oda sıcaklığında bekletildikten sonra maksimum hızda (14000 rpm’de) 1dk santirüjlendi. Bu aşamada filtreli tüpler atıldı. Alttaki koleksiyon tüpleri içindeki örnekler ependorflara aktarıldı ve HIV–1 RNA’sı elde edilmiş oldu.

3.2. PZR Çalışmaları

3.2.1. RT-PZR Çalışmaları

RT-PZR (Revers Transkriptase) RNA Virüs Master kiti ile çalışıldı.

RT-PZR tekniği total RNA üzerinden sentezlenen cDNA fragmanlarının kalıp olarak kullanıldığı bir PZR metodudur. Bu metod ile DNA üzerinde bulunan bir genin protein üretmek üzere mesajcı RNA’ya (mRNA) dönüşüp dönüşmediği ve ekspresyon yapılan genin mRNA miktarlarının karşılaştırılması mümkün olmaktadır.

Çalışmamızın 1. aşaması, RT-PZR (Revers Transkriptase PZR) RNA Virüs Master kiti ile LightCycler (LC) 2. 0 (Roche Applied Science, Almanya) cihazında çalışıldı. LightCycler 2.0 optik ünitesi 6 farklı kanal ile aynı zamanda floresans ölçümü yapabilmektedir. Bu kanallar 530nm, 560nm, 610nm, 640nm, 670nm ve705nm. 530 nm’de kanal 1 (F1) Syber Green I ve floresan boyaalarını kullanarak, sinyalleri ölçer. Çalışmamızın analizleri 530 nm kanalında incelendi.

Tablo 2: RT-PZR için kullanılan primer dizileri

RT- PZR	Primer Dizisi
RTP-F1	CCT CAG ATC ACT CTT TGG CAA CG
RTP-REV	CTT CTG TAT GTC ATT GAC AGT CC

Primer dizileri, Integrated DNA Technologies (IDT) sitesi, OligoAnalyzer 3.1’den kontrol edildi. Yine bu siteden primer ve problemlerin T_m dereceleri bulundu.

Tablo 3: RTP –PZR karışımı

Bileşen	Miktar
Su	8.6 µl
Enzyme blend	0.4
Reaksiyon Buffer	4 µl
Forward Primer (RTP F1)	1.0 µl
Revers Primer (RTP REV2)	1.0 µl
RNA	5 µl
Toplam Hacim	20.0 µl

Tablo 4: RT-PZR şartları

Analiz Modu	Segment	Döngü	Sıcaklık (°C)	Hold Time (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisition Mode
RT						
Yok	1	1	50	00:08:00	20	Yok
Başlangıç denatürasyonu						
Yok	1	1	95	00:00:30	20	Yok
Amplifikasyon						
Amplifikasyon	Ayrılma	45	95	00:00:01	20	Yok
	Bağlanma		52	00:00:20	20	Single
	Uzama		72	00:00:01	2	Yok
Soğutma aşaması						
Yok	1	1	40	00:00:30	20	Yok

3.2.2. İkinci PZR Çalışmaları

İkinci PZR aşamasında RT-PZR’da elde edilen ürün, kalıp DNA olarak kullanıldı ve bu aşamada M41L mutasyonunu saptayacak primerler ve Taqman® problemleri kullanılarak mutant varyant; M41L bölgesi; total viral kopya sayısını saptayacak primerler ve Taqman® prob kullanılarak, yabancı virusun; total viral kopya bölgesi (com) araştırıldı.

Tablo 5: M41L Primerler ve taqman prob dizisi

M41L –özgü primerler	Primer Dizisi
F1	AAT AAA AGC ATT ART RGA AAT YTG TRC AGC AT
F2	AAT WAA AGC ATT ART RGA AAT YTG TRC WGC AT
F3	AAA AGC ATT ART RGA AAT YTG TRC AGG AC
F4	TAA AAG CAT TAR TRG AAA TYT GTR CAK GTC
F5	AAG CAT TAR TRG AAA TYT GTR CAK GGC
REV	CCT AAT TGA ACT TCC CAG AAG TCT TG
FAM	TTG GGC CTG AAA A‘T’C CAT ACA ATA CTC CAG TAT TT

Tablo 6: Com primerleri

Com spesifik Primerler	Primer dizisi
Com FWD	CTT CTG GGA AGT TCA ATT AGG AAT ACC
Com REV	TGG TGT CTC ATT GTT TRT ACT AGG TA
Com 1P	FAM-TGG ATG TGG GTG A“T”G CAT ATT TYT CAR TTC CCT TA
Com 2P	FAM-TAC TGG ATG “T” GGG TGA TGC ATA TTT TTC ART TCC CTT A

Total viral kopya reaksiyonu (Com) ve mutant varyant reaksiyonu (M41L) primer ve prob dizilerinde normal bazların dışında farklı kodlar kullanılmıştır. Bu bu kodlar aşağıdaki tabloda gösterilmiştir.

Tablo 7: Nükleik asit bazları için tek harfli kodlar tablosu

(IUPAC codes-Bioinformatics.com)

Sembol	Anlamı	Açıklama
G	G	Guanin
A	A	Adenin
T	T	Timin
C	C	Sitozin
R	A ya da G	püRin
Y	C ya da T	pYrimidin
M	A ya da C	aMino
K	G ya da T	Keto
S	C ya da G	Birbirine sıkıca bağlanmış 3H bağı
W	A ya da T	zayıf 2 H bağı
H	A, C ya da T (G değil)	H alfabe de G'yi izler
B	C, G ya da T (A değil)	B alfabe de A'yi izler
V	A, C ya da G T (U değil)	V alfabe de U'yu izler
D	A, G ya da T (C değil)	D alfabe de C'yi izler
N	A, C, G ya da T	herhangi bir baz

Tablo 8: M41L Taqman PZR Karışımı

Bileşen	Miktar
Steril distile su	7.6 µl
Forward Primer (M41L F1)	0.35 µl
Forward Primer (M41L F2)	0.1 µl
Forward Primer (M41L F3)	0.32µl
Forward Primer (M41L F4)	0.13 µl
Forward Primer (M41L F5)	0.1µl
Revers Primer(M41L REV)	1µl
Taqman Probe (M41L P)	1µl
Enzim karışımı	0.13 µl
Reaksiyon tamponu	4 µl
RNA	5 µl
Toplam Hacim	20.0 µl

Tablo 9: Total kopya reaksiyonu Taqman PZR Karışımı

Bileşen	Miktar
Steril distile su	7.6 µl
Enzim karışımı	0.4 µl
Reaksiyon tamponu	4 µl
Forward Primer (comF1)	1.0 µl
Revers Primer (com REV2)	1.0 µl
Taqman Probe (com P1)	0.6 µl
Taqmqn Probe (COMP2)	0.4 µl
RNA	5 µl
Toplam Hacim	20.0 µl

Tablo 10: 2.PZR M41L- COM Şartları

Analiz Modu	Segment	Döngü	Sıcaklık (°C)	Hold Time (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisition Mode
İnitial denaturation						
Yok	1	1	95	00:00:30	20	Yok
Amplifikasyon						
Amplifikasyon	Denaturation	45	95	00:00:01	20	Yok
	Annealing		52	00:00:20	20	Single
	Extension		72	00:00:01	2	Yok
Soğutma aşaması						
Yok	1	1	40	00:00:30	20	Yok

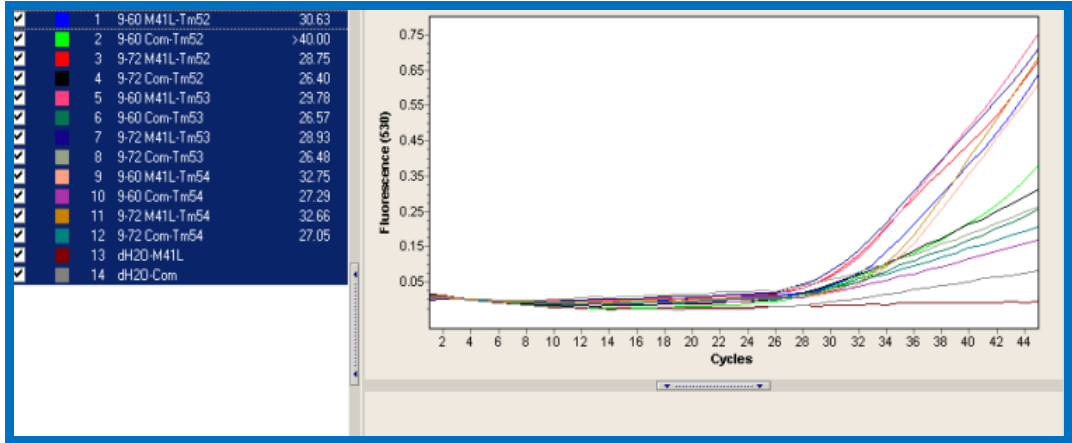
Tablo 11: IDT oligo analyzer sitesinden bulunan Primer ve problemlerin, T_m dereceleri

Primer	T _m
RT-FWD	58° C
RT-REV	53.2°C
Com-FWD	55.3°C
Com-REV	54.4°C
Com 1P	62.2°C
Com 2P	62.4°C
M41L F1	56.3°C
M41LF2	56.3°C
M41L F3	56.3°C
M41L F4	55.3°C
M41L F5	57° C
M41L REV	55.6
M41L P	60.8

3.2.3. PZR Optimizasyonu

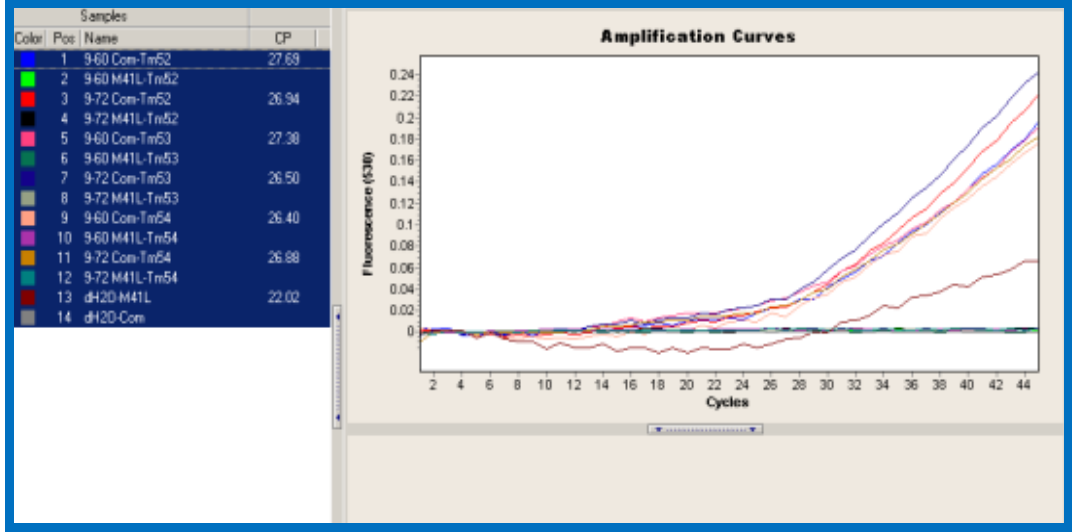
1. PZR (RT PZR) aşaması için sıcaklık optimizasyonu yapıldı. Bunun için dizi analizi ile M41L mutasyonu pozitif saptanan iki örnek seçildi ve 3 farklı T_m sıcaklığı (52, 53 ve 54° C) denendi.

RT PZR ile bir ürün elde edildi. 2. PZR'ın optimizasyonu için RT PZR'ın üç farklı T_m sıcaklığında elde edilen PZR ürünleri, yine 3 farklı T_m sıcaklığında (52, 53 ve 54°C) denendi. 2. PZR' da M41L mutasyonunu saptayacak 5 farklı forward primer, 1 revers primer ve bir özgün Taqman® prob ile M41L bölgesini ve 1 forward, 1 revers primer ve 2 özgün taqman prob ile kopya sayısı bölgesi çoğaltıldı. En iyi sonuçlar T_m 52°C'de alındığı için tüm örnekler T_m 52°C'de çalışıldı.



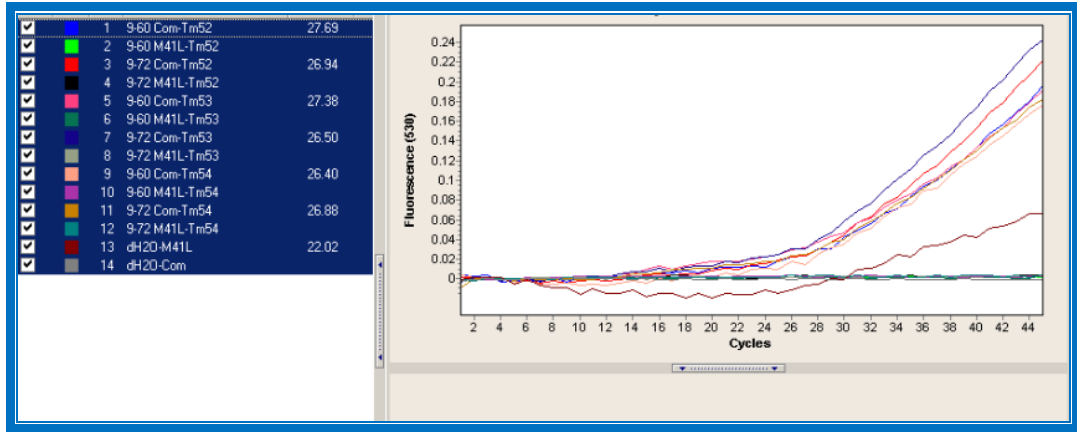
Şekil 24: RT- PZR 52- 53 ve 54 °C 'de elde edilen ürünlerin M41L ve com PZR 52 °C 'deki amplifikasyon bölgelerinin görüntüsü

52°C' de com ve M41L bölgelerinin her ikisinde de çoğalma görüldü.



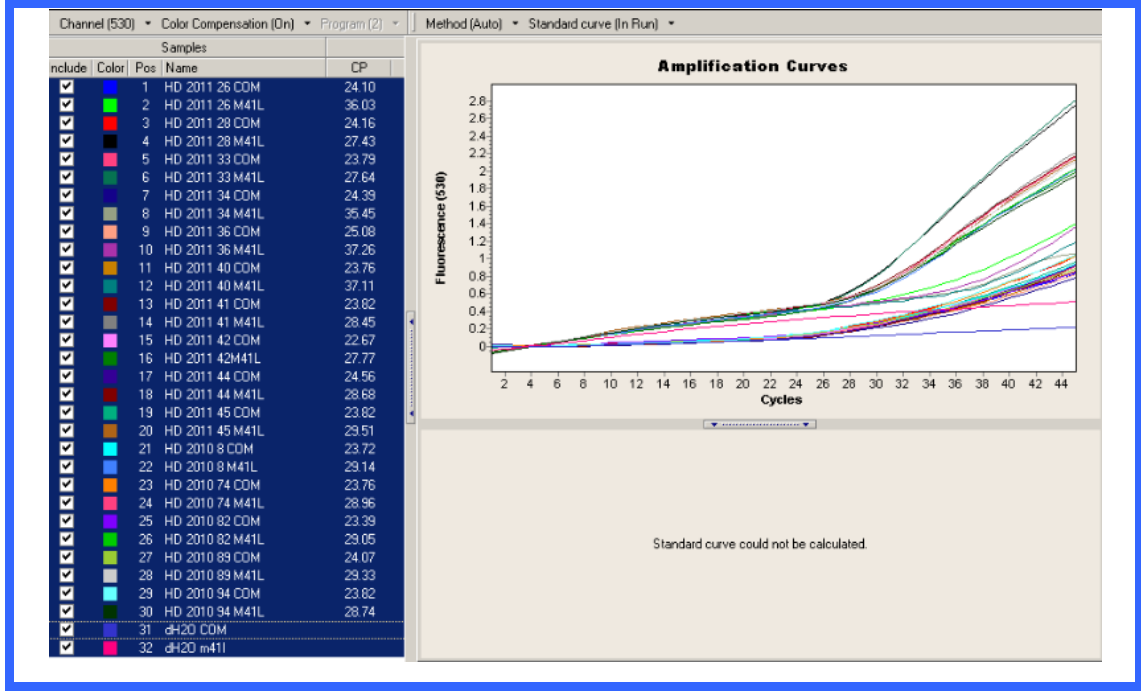
Şekil 25: RT- PZR 52- 53 ve 54 °C ‘de elde edilen ürünlerin M41L ve com PZR 53 °C ‘deki amplifikasyon bölgelerinin görüntüsü

54°C’ de M41L bölgelerinde çoğalma olmadı.

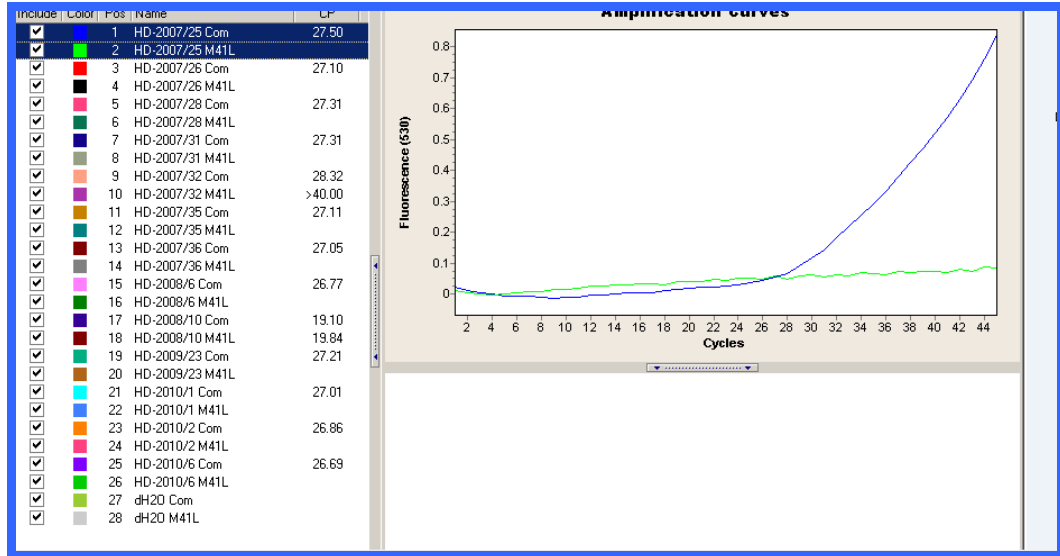


Şekil 26: RT- PZR 52- 53 ve 54 °C ‘de elde edilen ürünlerin M41L ve com PZR 54°C ‘deki amplifikasyon bölgelerinin görüntüsü

54°C’ de M41L bölgelerinde çoğalma olmadı.

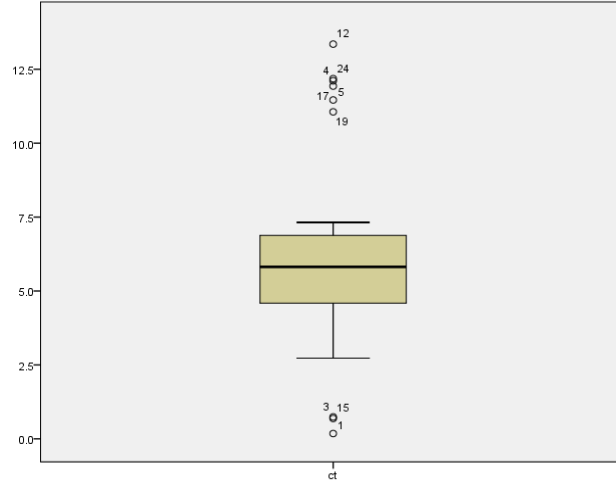


Şekil 27: M41L ve com amplifikasyon bölgelerinin PZR görüntüsü



Şekil 28: M41L bölgesinde Amplifikasyon olmamış;
M41L mutasyonu negatif örnek

Konvensiyonel dizi analizi ve NMS-GZ-PZR yöntemlerinden birisinin referans yöntem statüsü olmadığı için, iki yöntem arasındaki karşılaştırmalı uyuşmanın güvenilirliği, kapa istatistiği ile ölçüldü.



Şekil 29: ΔCt dağılımları

ΔCt değerleri, en düşük 0.18 ile en yüksek 13.5 arasında dağılmıştır. Üç örneğin ΔCt değeri çok düşük bulundu ve genel dağılımın gözlemlendiği grubun dışında kaldı. Altı örneğin ΔCt değeri yüksek bulundu ve genel dağılımın dışında kaldı. Genel dağılım grubunda yer alan 23 örneğin ΔCt değerleri, 2.5 ile 7.5 arasında dağılım gösterdi. Merkezi eğilim dağılımına göre, ΔCt ortanca değeri (5.81) eşik değer olarak belirlendi.

Kümeleme analizine göre 1. küme ΔCt ortanca değeri: 1.52 bulundu, 5 örnek bu kümede yer alırken, 2. kümenin ΔCt ortanca değeri 5.69 bulundu, bu grupta 21 örnek, 3. kümenin ortanca değeri: 12.02 bulundu, 6 örnek de 3 grupta yer aldı.

Tablo 12: Konvansiyonel Dizi analizi pozitif- NMS-GZ-PZR pozitif toplam 6 örneğin kümeleneşmesi

Dizi analizi (+) - NMS-GZ-PZR (+)		
Örnek sayısı	Küme	Uzaklık
1. örnek	1	.000
2. örnek	2	.330
3. örnek	2	.330
4. örnek	3	.227
5. örnek	3	.007
6. örnek	3	.233

Tablo 13: Konvansiyonel dizi analizi negatif- NMS-GZ-PZR pozitif 10 örneğin kümelenmesi

Dizi analizi (-) - NMS-GZ-PZR (+)		
Örnek sayısı	Küme	Uzaklık
11. örnek	1	0.025
8. örnek	1	0.025
15. örnek	3	0.762
14. örnek	3	0.222
12. örnek	3	0.358
16. örnek	3	0.628
10. örnek	2	0.35
9. örnek	2	0.25
7. örnek	2	0.24
13. örnek	2	0.36

Tablo 14: Konvansiyonel dizi analizi negatif- NMS-GZ-PZR negatif 16 örneğin kümelenmesi

Dizi analizi (-) - NMS-GZ-PZR (+)		
Örnek sayısı	Küme	Uzaklık
17. örnek	1	0.334
18. örnek	1	0.234
19. örnek	1	0.004
20. örnek	1	0.016
21. örnek	1	0.036
22. örnek	1	0.176
23. örnek	1	0.346

24. örnek	2	0.317
26. örnek	2	0.023
27. örnek	2	0.293
28. örnek	3	0.955
29. örnek	3	0.555
30. örnek	3	0.085
31. örnek	3	0.095
32. örnek	3	0.165
33. örnek	3	1.335

Konvansiyonel dizi analizi pozitif- NMS-GZ-PZR negatif sonucumuz olmadığı için bu gruba kümeleme analizi yapılmadı.

3.3. Sonuçlar

Olgu örnekleri ($n=57$) arasından, NMS-GZ-PZR sonuçlarına göre, total viral kopya amplifikasyonunun Ct değeri 10'dan küçük olan (yüksek kopya sayısı nedeni dilüsyon ile tekrar gerekliliği) ve 26'dan büyük olan (düşük kopya sayısı nedeni ile belirsiz sonuç) örnekler ($n=25$), öneriye uygun olarak, pozitiflik ölçütü amacıyla kullanılacak ΔCt eşik değerini belirlemek için yapılan çalışmanın dışında bırakıldı. Eşik değer hesaplamasında kullanılan örneklerin ($n=32$), merkezi eğilim dağılımına göre ΔCt ortanca değeri (5.81) eşik değer olarak belirlendi. Buna göre, ΔCt değeri, eşik değer üzerinde olan olgu örnekleri, M41L mutasyonu açısından negatif kabul edildi. Bu eşik değer ölçütü ile değerlendirilen NMS-GZ-PZR sonuçlarına göre, 32 örneğin 16'sında M41L direnç mutasyonu pozitifliği saptandı. Bu örneklerin altısında, konvansiyonel dizi analizi sonuçlarına göre de, M41L direnç mutasyonu pozitif. Çalışmaya alınan tüm olgu örnekleri ($n=57$) arasında, konvansiyonel dizi analizi ile pozitif olduğu bildirilen 13 örnekten yedisinin sonuçları, NMS-GZ-PZR sonuçlarına göre total viral kopya Ct'si 26'nın üzerinde olduğu için, öneriye uygun olarak, belirsiz kabul edildi. Bu örneklerde, testin, ön amplifikasyon aşamasından sonra tekrar edilmesi önerilmektedir. Ancak örnekler daha önce birkaç kez

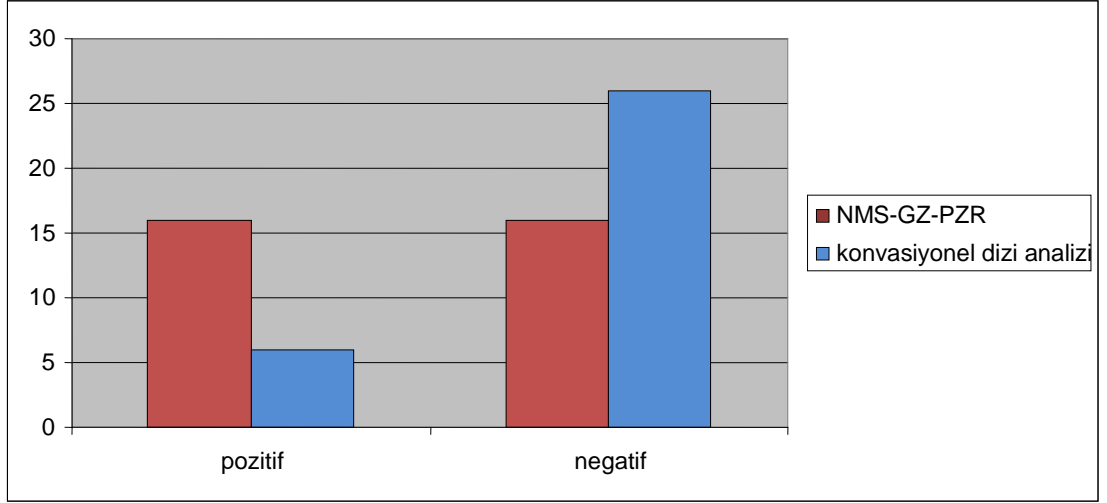
dondurulup çözdürüldüğü için ve RNA kalitesinde bozulma olduğu için tekrar edilemedi. Kapa istatistiğine göre, iki yöntem arasında, orta düzeyde uyuşma ($k=0.375$; $P < 0.007$) saptandı.

Tablo 15: NMS-GZ-PZR Yöntemi ile saptanan M41L Mutant Varyant Sonuçlarının Konvansiyonel Dizi Analizi Yöntemi ile karşılaştırılması

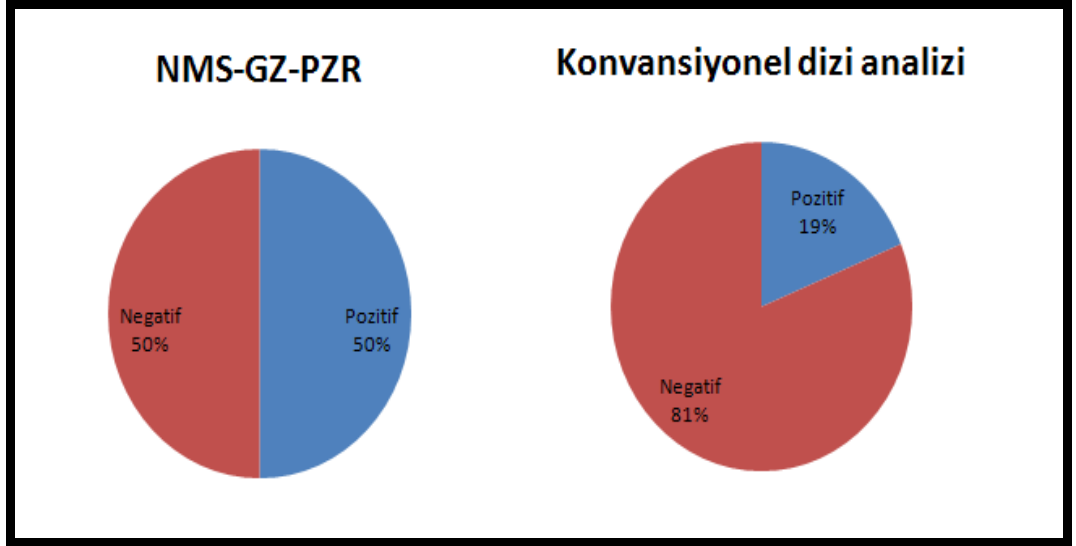
Örnek #	Konvansiyonel Dizi Analizi Yöntemi ile M41L Mutant Varyant Sonuçları	NMS-GZ-PZR Yöntemi ile C_t^* Değerleri			NMS-GZ-PZR Yöntemi ile M41L Mutant Varyant Sonuçları
		C_{tTV}^*	C_{tMV}^*	ΔC_t^*	
1	Pozitif	15.19	15.57	0.18	Pozitif
2	Pozitif	25.07	29.33	4.26	Pozitif
3	Pozitif	23.82	28.74	4.92	Pozitif
4	Pozitif	23.72	29.14	5.42	Pozitif
5	Pozitif	23.76	28.96	5.2	Pozitif
6	Pozitif	23.39	29.05	5.66	Pozitif
7	Negatif	25.72	28.45	2.73	Pozitif
8	Negatif	19.1	19.84	0.74	Pozitif
9	Negatif	24.16	27.43	3.27	Pozitif
10	Negatif	23.79	27.64	3.85	Pozitif
11	Negatif	23.82	24.45	0.69	Pozitif
12	Negatif	22.67	27.77	5.1	Pozitif
13	Negatif	24.56	28.68	4.12	Pozitif
14	Negatif	23.76	28.96	5.2	Pozitif
15	Negatif	18.16	23.97	5.81	Pozitif
16	Negatif	23.82	29.51	5.69	Pozitif
17	Negatif	23.04	29.54	6.5	Negatif

18	Negatif	24.95	32	7.05	Negatif
19	Negatif	21.87	33.29	11.46	Negatif
20	Negatif	24.49	31.81	7.32	Negatif
21	Negatif	25.71	31.63	5.92	Negatif
22	Negatif	19.35	31.46	12.11	Negatif
23	Negatif	25.48	31.81	6.33	Negatif
24	Negatif	25.84	32.03	6.19	Negatif
25	Negatif	25.28	32.49	6.71	Negatif
26	Negatif	25.34	31.51	6.17	Negatif
27	Negatif	25.78	31.93	6.15	Negatif
28	Negatif	25.74	31.56	5.82	Negatif
29	Negatif	24.1	36.03	11.93	Negatif
30	Negatif	24.39	35.45	11.06	Negatif
31	Negatif	25.08	37.26	12.18	Negatif
32	Negatif	23.76	37.11	13.35	Negatif

* C_t : threshold cycle, C_{tTV} :total viral kopya reaksiyonu C_t değerleri, C_{tMV} : mutant varyant reaksiyonunun C_t değerleri, ΔC_t : C_{tMV} ile C_{tTV} arasındaki fark



Şekil 30: NMS-GZ-PZR PZR ve konvasiyonel dizi analizine göre pozitif ve negatif sonuçlar



Şekil 31: NMS-GZ-PZR PZR ve konvasiyonel dizi analizine göre pozitif ve negatif sonuçların yüzde oranları

4. TARTIŞMA

4.1. HIV'de Direncin ve Saptanmasının Önemi

HIV-1 enfekte hastalarda HAART tedavisi ile morbidite ve mortalite önemli ölçüde azalmıştır, fakat ilaç direncinin oluşmasıyla birlikte tedavi başarısızlığı ortaya çıkmıştır. İlaça dirençli viruslar yeni enfekte bireylere bulaşabilir (75)

Dirençli virusların bulaşması sadece tedavi gören bireylerde klinik sorun oluşturmaz, aynı zamanda epidemiyolojik bir problem oluşturur. Bu nedenle dirençli virus bulaşması giderek artan bir ilgi alanı oluşturmaktadır (76, 77). HIV-1 tedavisi alan hastalar arasında ilaç direncinin epidemiyolojisini kavramak birkaç nedenle önemlidir. Birincisi, en sık rastlanan ilaca dirençli virüslere karşı etkili ilaçların geliştirilmesini sağlar. İkincisi, dirençli virusla enfekte bireyler direnci bulaştırabilir (78, 79). Direnci bulaştıran bireyler hakkında bilgi ise ilaç dirençlerinin dinamiğinin çözülmesine yardımcı olur (80).

HIV/AIDS hastalığı Sahra-altı Afrika'da birinci, dünyada ise dördüncü ölüm nedeni olarak bildirilmektedir (15). Önemli bir halksağlığı sorunu olan HIV-1 tedavisinde ilaç direncinin hızlı, ucuz, duyarlı, özgül ve kolay uygulanabilir bir yöntemle saptanması, hastalığın kontrol altına alınması ve tedavinin etkili olması açısından önemlidir.

4.2. Dünyada HIV Direnci İle İlgili Yapılmış Çalışmalar

HIV direncinin ortaya çıkması ve saptanması arasındaki gecikme, mevcut genotipleme yöntemlerinin duyarlılığının düşük olduğunu ve yetersiz kaldığını göstermiştir (81). Palmer ve arkadaşları 2005 yılında yaptıkları bir çalışmada minor varyantlardaki ilaç direncini saptamada tek genom dizi analizi gibi daha duyarlı teknikler geliştirmişlerdir (82). HIV-1 direnç mutasyonları saptamak için allel spesifik nested PZR'nin (ASPZR) ilk kez 1991 yılında kullanıldığı rapor edilmiştir (83). Metzner ve arkadaşları 2003 yılında (84), Bergroth ve arkadaşları 2005 yılında allele özgü PZR (ASPZR) yöntemini birkaç kat artmış duyarlılık ve kantitasyona izin veren teknoloji ile uygulamışlardır (85); Nissley ve arkadaşları 2005 yılında (86), Shi ve ark. 2004 yılında *S. cerevisiae* kullanarak fenotipik analiz (87) ; Leamon ve ark.

2003 yılında (87), Marquies ve ark. 2005 yılında, “parallel sequencing in microfabricated PicoTiterPlates” yöntemlerini kullanmışlardı (87).

Özellikle batı ülkelerinde ART'nin yaygınlaşması ile birlikte primer dirençli enfeksiyonların prevalansı, konvansiyonel dizi analizi yöntemleriyle yapılan araştırmalarda, % 0, 5–21 arasında değişmektedir. Avrupa'da 1996–98 yıllarında primer direnç prevalansı % 2 iken, 2000–2001 yıllarında % 8, 2'ye çıkmıştır. New York'da primer direnç 1995–1998 yılları arasında % 13, 2 den 2003–2004 yıllarında %24, 1'e yükselmiştir. Farklı ülkelerden verilere dayanarak, dirençli HIV bulaşmasının monitorizasyonu için her ülkenin kendi sürveyans sisteminin olması gerektiği ileri sürülmektedir. Antiretroviral tedavi sırasında gelişen ilaç direnci daha sık görülmektedir. Bu arada antiretroviral tedavi yaygın uygulandıkça ve direnç testleri uygulanabilir oldukça gerek primer, gerekse antiretroviral tedavi sırasında saptanan direnç problemi, sosyoekonomik düzeyi düşük olan ülkelerde de ortaya çıkacaktır. Buna bağlı olarak da dirençli suşların bulaşma riski arttığı için tedaviye başlanmamış yeni saptanan olgularda direnç testi önerilmektedir (88, 89).

İsviçre'de yapılan 10 yıllık HIV kohort çalışmasında; antiretroviral tedavi alan hastalarda ilaç direncinin prevalansı genotipik yöntemle, 1999 yılında %50–60 bulunurken, 2006 yılında bu oran % 39–53 bulunmuştur. Üçlü ilaç kullananlarda direnç % 5 gibi sabit bulunmuştur. Oranların yıllar içinde düşmesi etkin tedavinin gelişmesine bağlıdır (90, 91).

2002–2009 yılları arasında San Fransisco'da konvansiyonel dizi analizi ile yapılan prospektif kohort çalışmasında; akut ya da erken HIV enfeksiyonu olan (<6 ay) 372 hastanın 59'unda (%16) HIV-1 ilaçlarına karşı direnç mutasyonu saptanmıştır. Direnç mutasyonunun bulaşma prevalansı 2002'de %19 iken, 2003'de %7'ye düştüğü görülmüş, 2003- 2007'de pik yaparak % 24 olmuştur. 2008 ve 2009'da %15 bulunmuştur (92).

On beş Avrupa ülkesi arasında 2000–2004 yılları arasında, HIV-1 tedavisi başarısız olmuş 1988 hasta üzerinde genotip ve fenotipik dirençlerinin karşılaştırıldığı çalışmada; 1605 (%80, 7) suşda bir ya da daha fazla ilaç direnci aminoasit değişikliği ile ilişkili bulunmuştur. Erkek hasta oranı %71 olan grupta (homoseksüel erkek ve heteroseksüel ilişkisi olanlarda) %36 direnç bulaşı olduğu belirtilmiştir. NRTI direnci %73, 5, NNRT %48, 5, PI ise %35, 8 oranında bildirilmiştir. Genotip B oranı %59, alt tip G %15 ve genotip C ise %7 olarak

bulunmuştur. G alt tipinin büyük çoğunluğu bu grubun HIV epidemisinde yaygın olarak bulunduğu Portekiz’de saptanmıştır. En sık izole edilen beş mutasyon M184V (%47), M41L (%29, 4), K103N (%29, 4), D67N (%27, 9) ve T215Y (%27, 7) olmuştur. Bu beş mutasyon genotipik olarak direnci ispatlanmış sekansların %90’ında görülmüştür (93).

M41L, D67R, K70R, T215F/Y, L210W ve K219Q mutasyonlarının ZDV ile ilişkili olduğu bilinmektedir. Farklı çalışmaların genotipik data analizlerinde, ZDV direncinde en sık ratlanan mutasyonların M41L ve K70R olduğu saptanmıştır (94, 95, 96, 97, 98, 99, 100). Farklı çalışmalarda yeni tanı alan hastalarda ilaç direncinin %2 - %30 arasında değiştiği rapor edilmiştir. Değişkenlik kısmen yapılan çalışmalar arasında, ulusal, populasyon ve yerel farklılıklara bağlı olabildiği gibi örneğin toplanması, kullanılan direnç testi ve yorumlamaya bağlı olabilir. Tek bir aminoasit ile ilişkili mutasyon yorumunda sorunlar olabilir. Çünkü bunlardan bazıları en azından teorik olarak doğal sekans polimorfizmi ve seçilmiş ilaç direnç mutasyonu olarak bulunur. Örneğin K70R mutasyonunun Zidovudine tedavisine karşı direnç oluşturduğu bilinir, fakat bazı çalışmalarda örneklerin tedaviden önce alındığı gözlenmiştir (101).

Louvel ve arkadaşlarının 2008 yılında yaptıkları çalışmada NMS-GZ-PZR ile M184V mutasyonunu % 0.3 duyarlılıkta saptamışlardır (102).

Metzner ve arkadaşlarının 2011 yılında yaptıkları bir çalışmada NMS-GZ-PZR ile toplam virus çeşitliliğini oluşturan populasyonun içinde, %1 altındakileri azınlık oranda bulunan varyant sub-populasyonlarını saptayabildiğini göstermişlerdir (103).

M41L, K70R, K103N, Y181C, M184V ve T215F/Y direnç mutasyonlarının araştırıldığı bir çalışmada; M41L %10 sıklıkla en yüksek oranda bulunmuştur (104), 111 hasta üzerinde dizi analizi ile yapılan başka bir çalışmada yine M41L direnç mutasyonu 35 hastada (% 31.5) en sık saptanan mutasyon olmuştur. Aynı çalışmada M184V direnç mutasyonu %2 bulunmuştur. (105).

Johnson ve arkadaşlarının, 2010 yılında yaptığı çalışmada M41L direnç mutasyonunun yedi yıl kalıcı olduğunu göstermişlerdir (106), aynı araştırmacının farklı bir çalışmasında M41L düşük fitnessli mutasyonların uzun süre kalıcı olduğunu göstermişlerdir (107).

Bu çalışmada, M41L direnç mutasyonu, sık raslanan mutasyonlardan biri olduğu için ayrıca kalıcı mutasyon olduğu için araştırılmıştır.

Azınlık ilaç direnç mutantların tedavi başarısızlığındaki rolü henüz kesin değildir. Ultrasensitif yöntemler; NMS-GZ-PZR ve ultraderin dizileme ile birlikte direnç mutantlarını saptamada birlikte kullanılmaktadır (107).

Yapılan birçok çalışmada kaç hastada tek mutasyon olduğu çok net değildir. Fakat bazı çalışmalarda tüm direnç ilişkili viruslar arasında tek mutasyon olması önemli bir oran oluşturmaktadır (108, 109, 110, 111). İsviçre’de retrospektif olarak yapılan bir çalışmada, 1992–2002 yılları arasında 261 yeni tanı almış, homoseksüel erkek hasta grubunda HIV–1 mutasyon direnç prevalansı araştırılmıştır. 60 kişi çeşitli nedenlerle çalışma dışı bırakılmıştır. “In house nested” RT-PZR işleminden sonra sekanslanan 201 örnekten 28’inde (%13.9) major direnç mutasyonu saptanmış, 28 hastanın hepsinde, bir ya da birkaç RT mutasyonu bulunmuş, hiçbirinde PI’ne karşı direnç saptanmamıştır. 28 hastanın 17’sinde 215. pozisyonda mutasyon saptanmıştır. Bu hastalardan 5/17’sinde tek mutasyon saptanırken, 12/17’sinde M41L ile birlikte saptanmıştır. Diğer 11 hastada tek mutasyon bulunmuştur. Altı hastada tek M41L mutasyonu 4 hastada K70R mutasyonu, 1 hastada 188. pozisyonda vahşi tip (yabani) ve mutant sekans karışımı, NNRTI ile ilişkili H188H/Y mutasyonu saptanmıştır. Bu çalışmada da M41L mutasyonu, tek bulunan mutasyonlar içinde en sık görülenidir (101).

HIV kemokin tropizm tespitinde kullanılan yeni genotipik testlerle ilgili Swenson ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada, PI, N(t)RTI, NNRTI ve INI dirençlerinde duyarlı metodlar üzerinde durulmuştur (112). Literatürde tanımlanan duyarlı genotipik testlerden en belirginleri point mutasyon testleri; ASPZR (alel spesifik PZR), oligonükleotid ligasyon testleri ve gerçek zamanlı PZR gibi, birkaç direnç mutasyonunu (RT – K103N ya da M184V ve PR–L90M) saptayan testlerdir(113, 104). Bu testler farklı popülasyonlardaki mutasyonları ve bu mutasyonların tedavide sonuçlarına etkilerini incelemek için yararlı olmuştur. Nokta mutasyon testleri genel olarak ucuzdur. Yüksek duyarlılık ve özgüllük gösterir, ancak nokta mutasyon testleri, altı farklı sınıf antiretroviral ilacın 200’den fazla sayıda mutasyonunu tespit için uygun değildir. Bu sorun, HIV alanında bu tür direnç testlerinin klinikte rutin kullanımını zorlaştırmıştır. Bu yüzden, dirençli varyantlarda düşük düzey direnç mutasyonlarının tümünü taramak için, yeni teknolojik testler

geliştirilmiştir. Şu anda, ilgili mutasyonların mevcut olup olmadığını belirlemek için genin tüm uzunluğunu ultra-derin dizi analizi ile değerlendirme tek yoldur. Ultra-derin dizi analizi yeni bir yöntemdir, PR, RT ve IN (gerçek zamanlı PZR, ASPZR, oligonükleotid ligasyonu testi, paralel allele özgü dizi analizi ve mikroarray yöntemleri sadece sınırlı sayıda mutasyon saptayabilirler (104, 113).

Bu yeni duyarlı dizi analizi metodu dirençli varyantları mutasyonla birlikte hem mutlak sayı dizisini hem de oransal olarak ölçebilmektedir. Kullanılan formata bağlı olarak ultra derin dizi analizinde, klonal dizi analizi ile 1500'den fazla ilgili direnç kodon pozisyonlarında okuma sağlanabilir (114, 115, 116). Klonal dizi analizi genom mutasyonları 250–500 bazlar birbirinin içinde olduğu aynı viral dizisi içinde bağlı olup olmadığını bir kullanıcının belirlemesine olanak tanır. Ultra-derin dizi analizi, birçok HIV klinik çalışmalarda direnç sonuçları için kullanılmaktadır (103).

4.3. NMS-GZ-PZR Yöntemi

Yapılan çalışmalarda, NMS-GZ-PZR testleri çok sayıda örnekte değerlendirilmiş ve klinik kullanımı desteklediği görülmüştür. Konvansiyonel dizi analizi testlerine göre 10–67 kat daha duyarlı olan, gelişmiş, düşük frekanslı mutasyon tespiti NMS-GZ-PZR ile yapılabilir. Primer dirençli olgular dizi analizi ile saptanabilir fakat kronik, ne zaman enfekte olduğu bilinmeyen, minör varyantlar, daha duyarlı olan NMS-GZ-PZR ile saptanır. Çalışmamızda konvansiyonel dizi analizine göre duyarlılığı daha yüksek, yorumu kolay, . NMS-GZ-PZR PZR yöntemi ile mutant virusleri saptamak için; mutant viruslerin CT'si (threshold Cycle) ile vahşi (yabancıl) viruslarının CT'si arasındaki fark (Δ CT) ile değerlendirildi. Mutant virusların CT değeri vahşi tip HIV viruslardan daha yüksektir (113). Doğal polimorfizmin saptanmasının engellenmesi için, test “cut off” (kesme değeri) değerleri dikkatli ve hassas şekilde ayarlanmalıdır. Mutasyon saptama aralığını genişletmek için Δ CT kesme değerini arttırmak, mutantları, doğal bulunan varyantlardan ayırt etmeyi zorlaştırır (113).

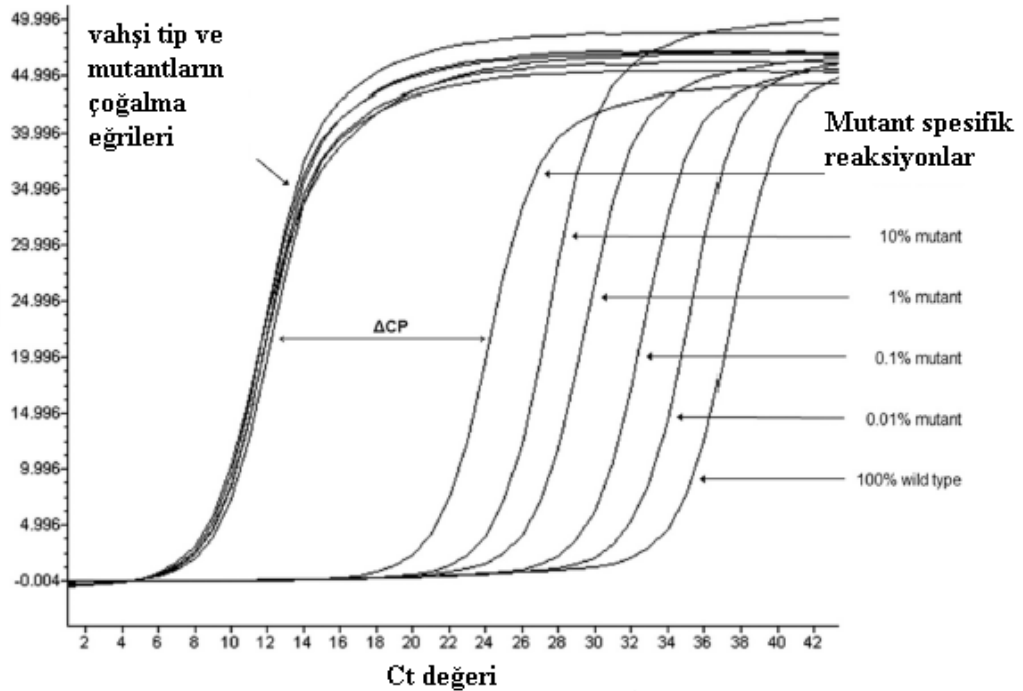
Δ CT' yi dar tutarak duyarlılığı artırırken, Yüksek polimorfizimli sekansların dahil olduğu örneklerde, %96'dan >%99'a kadar duyarlılık, >96 üzerinde özgüllük gösteren, primer tasarımı sonucunda duyarlılık ve özgüllük birlikte artırılmıştır. Bu çalışmada M41L için dirençli örneklerin polimorfik dizilerindeki TTG ve CTG

mutant kodonlarını saptayacak şekilde dizayn edilmiş beş farklı mutasyon spesifik primerler ve taqman prob kullanılmıştır. Büyük popülasyonlardaki değişik polimorfizmleri saptamak için, dejenere nükleotidler, komplementer pozisyonlara yerleştirilmiştir. NMS-GZ-PZR yöntemi % 0.001- % 0.2 klonlanmış mutant dizileri tespit edebilir (113).

Hauser ve arkadaşları, HIV-negatif insan plazmasına 107 kopya/mL son konsantrasyonunda HIV-1 NL4.3 virus RNA'sı ekleyerek oluşturdukları %100 vahşi tip ("wild type", wt) (HIV minor varyant oranı %0; mutant negatif) standardı ile yaptıkları sekiz bağımsız deney tekrarında elde edilen C_{twt} değerlerinin ortalamasının ("mean", \bar{x}) üç standart deviasyon (S) altını ($C_{twt} - 3S$), mutant varyant (mv) varlığını saptamakta kullanılacak ΔC_t eşik (kesim) değeri (threshold, cut-off; ΔC_{tco}) olarak kabul etmişlerdir ($C_{twt} - 3S = \Delta C_{tco}$) (117);

$$\Delta C_{t_i} = (C_{tmv_i} - C_{twt_i})$$

$$Sample_i(HIV_{mv+}) \xrightarrow{test\ result_i} \Delta C_{t_i} < \Delta C_{tco}$$



Şekil 32: Total viral kopya sayısına kıyasla değişik oranlardaki mutant viral kopya sayılarına karşılık gelen nokta mutant-spesifik gerçek zamanlı PZR ile amplifikasyon eğrileri, Ct değerleri ve ΔC_t eşik (kesim) değeri

Nokta mutasyon-spesifik (alel-spesifik) gerçek zamanlı PZR yöntemlerinin genel bir sorunu olarak, primerlerin bağlanma noktalarındaki polimorfizm, yanlış pozitif sonuç niteliğinde mutant popülasyon bildirimine veya yanlış negatif sonuç niteliğinde mutant popülasyon bulunmadığının bildirimine neden olabilir. (117)

Hauser ve arkadaşları, bu sorunu çözmek için, dört farklı yaklaşım olabileceğini belirtmişlerdir (117):

1. Hastanın plazma örneğinden, HIV'e yönelik, primer bağlanma bölgesini de içerecek biçimde yapılacak konvansiyonel ("conventional bulk sequencing"; popülasyon-temelli) dizi analizinin sonucuna dayalı olarak, olguya-spesifik primer tasarımı yapılabileceği bildirilmiştir. (117) Ancak, bu seçeneğin, rutin kullanım için elverişli olmadığı da belirtilmiştir. (117)

2. Eğer hastadan, antiretroviral tedaviye başlanmasından önce, temel ("baseline") plazma örneği alınmışsa (%100 vahşi popülasyon virüs içerdiği varsayılmaktadır), olguya-spesifik kesim-değeri belirlenebileceği bildirilmiştir. (117)

3. Total viral kopya sayısı (vahşi tip ve varsa diğer her türlü varyant sub-popülasyonlarla) uyumlu olarak amplifiye olan ve hem vahşi tip için ve hem de olası varyant sub-popülasyonlar için ortak nitelikteki evrimsel bakımdan korunmuş bölgeye yönelik (jenerik, j) primer seti ile elde edilen Ct_j değerinin aşırı düzeyde yüksek olduğu örneklerde; düşük total viral kopya sayısı nedeni ile amplifikasyon eğrisinin eksponensiyel faza geç girmesi nedeniyle, ΔCt_i de düşük çıkacağından, mutant sub-popülasyon kopya sayısının total popülasyon kopya sayısına kıyasla oranı görece daha fazla çıkma eğiliminde olur veya -yine aynı nedenle- $\Delta Ct_i < \Delta Ct_o$ sonucu elde edileceğinden, yanlış pozitif bildirimine neden olur. Bu nedenle, bu tür örnekler, analiz dışı bırakılmalı, sonuçları belirsiz kabul edilmeli, geçerli kabul edilmemelidir. (117)

4. ΔCt_o kesim değerini yükseltmek için, ΔCt_o kesim değerinin belirlenmesinde, Ct_{wtx}-3S değerini ölçüt olarak almak yerine, $\Delta Ct_o = (Ct_{mv1\%} - Ct_{wtx})$ kesim değerinin ölçüt olarak alınması durumunda ise, yöntemin özgüllüğü artmakla birlikte, oransal olarak (mutant viral subpopülasyon kopya sayısı/total viral popülasyon kopya sayısı) daha düşük düzeydeki mutant-subpopülasyonlar için yöntemin duyarlılığı azalacaktır. Bu nedenle, yanlış pozitif minor ilaç-dirençli popülasyon bildirimini ile yanlış negatif minor ilaç-dirençli popülasyon bildirimini arasında bir tercih yapılmak durumunda kalınmaktadır. (117)

4.4. Türkiye’de HIV Direnci İle İlgili Yapılmış Çalışmalar

Rutin veya epidemiyolojik amaçlı HIV antiviral direnç testleri, yaygın olarak konvansiyonel dizi analizi yöntemi ile yapılmaktadır. 2003 yılında Midilli ve arkadaşları, ‘line probe assay (LIPA) yöntemi ile, viral yükü >30 000 RNA kopya/ml olan on hastada RT gen bölgesinde M41L, K70R, M184V, T215Y/E, Q151M, V106A ve Y181C/I mutasyonlarını, proteaz gen bölgesinde;D30N, 154V, V82A ve L90M mutasyonlarını saptamışlardır (118). Aynı grubun 2003–2005 yılları arasında viral yükü >1000 kopya/ml olan 21 hastanın dahil edildiği dizi analizi ile yapılan başka bir çalışmada, hastaların tümünde en az bir ilaç sınıfına ait direnç saptanmış, en sık major proteaz M46I mutasyonunu, NNRTI naif beş hastada M41L+L210W+T215Y komminasyonu saptamışlardır (119). Bugüne dek Türkiye’de HIV ilaç direnç mutasyonu, ultra derin dizi analizi ile erişilebilen düzeyde bir duyarlılık ve özgüllük gösteren yöntemle araştırılmamıştır, en azından bildirilmiş bir çalışma bulunmamaktadır.

Kolay uygulanabilir yöntemle direnç testinin daha çok merkezde yapılması epidemiyolojik verilerin düzenli yapılması açısından önemlidir.

4.5. Konvansiyonel Dizi Analizi

Direnç testlerinde, geleneksel dizi analizinin en büyük kısıtlılıklarından biri, bir olgudaki örnekte bulunabilen toplam virus çeşitliliğini oluşturan populasyonun içinde, en az %20 veya daha fazla oranda bulunan varyant sub-populasyonlarını saptayabilmesi, bu oranın altındaki sub-populasyonları saptayamamasıdır. Standart genotipik yöntemlerin viral populasyondaki %20 nin üzerinde yer alan mutasyonları saptadığı Grant ve arkadaşları 2003 yılında (119), Brun- Vezinet ve arkadaşları 2004 yılında (120), Halvas ve arkadaşları 2006 yılında yaptıkları çalışmalarda göstermişlerdir (121).

Konvansiyonel dizi analizinin, bu düzeyde bir duyarlılığa erişebilmesi iki yolla mümkündür; a) mutasyon spesifik primer ile amplifiye edilen ampikonun dizi analizinin yapılması b) olgu örneğinden istatistik anlamlı düzeyde tekrar sayısı ile dilüsyon ve ardından klonlama ile yapılan (dirence neden olan mutant varyantlar, olgu örneğindeki populasyonda, alt-limit olarak % 0.02–0.03 oranında bir sub-populasyon oluşturabildiğinden) dizi analizidir.

Dirence neden olan sub-popülasyonların, geleneksel dizi analizi ile saptanabilecek olan $\geq\%$ 20 oranında bir düzeye erişmesi (mutant varyant sub-popülasyonun viral kopya sayısı/total viral kopya sayısı) ancak popülasyon dinamiklerindeki iki ayrı mekanizma ile olabilir:

a) Naif konak olguda, ilacın selektif baskısı altında olmaksızın, total viral popülasyon içinde, ilaca direnç sağlayan fakat diğer zindelik (“fitness”) özellikleri bakımından nötral veya nötrale yakın olan bir mutant varyant sub-popülasyonunun, %20’nin üzerinde dominans kazanması, yalnızca, HIV enfeksiyonun total viral kopya sayısının düşük olduğu evrelerinde, “random drift” ile oluşabilir.

b) Naif olmayan yani ilaç kullanan olguda, ilacın selektif baskısı altında olan viral popülasyonda, direnç sağlayan bir mutasyona sahip olan varyant sub-popülasyon için, bu mutasyon, zindelik açısından yararlı nitelikte olacağından, seçilerek, bu sub-popülasyonun konvansiyonel dizi analizi ile saptanabilecek alt-sınır olan total viral popülasyonun % 20’si veya üzerinde (varyant viral kopya sayısı/total viral kopya sayısı) bir düzeyde baskınlık sağlayabilir

4.6. NMS-GZ-PZR Yöntemi İle Konvansiyonel Dizi Analizi Yönteminin Karşılaştırmalı Diyagnostik Performans Analizi

Konvansiyonel dizi analizi pozitif- NMS-GZ-PZR pozitif toplam altı örnek, Konvansiyonel dizi analizi negatif- NMS-GZ-PZR negatif on örnek saptandı. Konvansiyonel dizi analizi pozitif- NMS-GZ-PZR negatif sonuç bulunmadı. Sonuçlar konvansiyonel dizi analizine göre NMS-GZ-PZR yönteminin daha duyarlı olduğunu desteklemektedir.

4.7. Referans (“altın standart”) yöntemin olmadığı durumda performans analizi

Birbirinden bağımsız tanı testlerinin karşılaştırmalı diyagnostik performans analizi, test sonuçlarının iki kategorili olduğu durumlarda (kategorik dikotomik veri), kestirim-gücü kuramı (“predictive value theory”) çerçevesinde, yeni yöntemin sonuçlarının, referans yöntemin (geçmiş terminoloji ile “altın standart yöntem”) sonuçlarına kıyaslanması ile yapılarak, gerçek pozitiflik, gerçek negatiflik, yalancı

pozitiflik, yalancı negatiflik, duyarlılık, özgüllük, pozitif ve negatif prediktif değer (prevalans da dikkate alınarak) sonuçları belirlenebilmektedir. (122, 123)

İlkesel olarak, tıpta, bir klinik durumun ilk kez tanımlanması, diğer klinik durumlardan farklı bir bileşim ve/veya seyirle ortaya çıkan klinik öykü, belirtiler ve bulgulardan oluşan bir “sendrom” veya “olgu tanımı” (“case definition”) biçiminde yapılmaktadır. Böylece, bir klinik durumun tanısı, ilk aşamada, tanımlanan “klinik altın standarda” göre yapılmaya başlamaktadır. Daha sonra, aynı klinik durumun tanısı için bir laboratuvar testi geliştirildiğinde, bu yeni tanı yönteminin performansı, klinik altın standarda kıyasla belirlenmekle birlikte, örneğin, yeni yöntemin pozitif veya negatif olarak saptadığı olgular eski yöntemle uyumsuz kategoride sonuç vermiş olmasına karşın, klinik sonuç bakımından olguların izlemine dayalı olarak, klinik durumun daha sonraki sonucunun yeni yöntemin sonucu lehine ortaya çıktığının, anekdotal gözlemlerin aktarımı veya formal olgu bildirimleri ile literatürde yeterince gözlem verisi birikmesi durumunda, yeni tanı yönteminin - önceden- kestirim gücü olduğu ve bu nedenle, klinik altın standarda kıyasla üstün performansı olduğu düşüncesi oluşabilir. Bu durumda, yeni yöntem, eski altın standardın yerini alarak referans yöntem özelliği kazanıncaya dek, bir “referans testin yokluğu” durumu ya da eski yöntem için “mükemmel olmayan altın standart” durumu (“imperfect gold standard”) ortaya çıkar. (122, 123)

Yukarıdaki örnekte olduğu gibi, bir referans yöntemin olmadığı durumlarda yapılacak performans analizi için, literatürde farklı yaklaşımlar önerilmiştir. Bunlar; “Kappa Statistics” (KS, kappa istatistik), “Discrepancy Resolution” (DR), “Composite Reference Standard” (CRS) veya “Latent Class Model” (LCM) gibi yöntemlerdir. (120) DR yöntemi, “mükemmel olmayan altın standart” test ile yeni tanı testinin uyuşmadığı durumlarda, “uyumsuzluğu çözmek” için, bir başka teste başvurulması ve bu başvuru testinin sonucu ile uyumlu olan yöntemin sonucunun gerçek pozitiflik veya negatiflik olduğuna karar verilmesi biçiminde uygulanır. (124) CRS yöntemi, birden fazla bağımsız testin sonuçlarını kombine ederek kompozit bir grup oluşturur ve kompozit grup içindeki testler arasında farklı sonuçlar çıkması durumunda uyumsuzluğun çözümü için pozitiflik ve negatiflik ölçütlerinin önceden tanımlanmış olması koşuluyla, bu kompozit testler grubunu, “birleşik referans yöntem” olarak kullanır (124). LCM, gözlenen katagorik (nitel) değişkenler arasındaki ilişkiyi açıklayan gizli değişkenleri (latent variables) bulmada kullanılan

istatistiksel yöntemleri içermektedir. Bu analizin yaygın kullanıldığı yerler, psikoloji, psikiyatri, sosyoloji, eğitim araştırmalarıdır. Bu bilim dallarında gizli yapı analizinin kullanılmasının temel amacı, kullanılan değişkenler arasındaki gizli yapıyı tanımlamaktır (125)

Kappa istatistiği, iki yönlü tablolarda satırda ve sütunda yer alan değişkenlerin seviyelerinin sayısı eşit olduğu durumda, yani 2×2 , 3×3 , .. $k \times k$ olduğu durumlarda, iki değişken arasında uyum ölçümü olarak kullanılmaktadır. Bu istatistik aynı deney ünitelerinin bazı özellik veya özellikleri dikkate alınarak iki farklı metod değerlendirilerek sınıflandırılması sonucunda metodlar arasındaki uyumu belirlemede kullanılır(126).

Ancak, HIV direnç tanısında aşağıdakiler referans olarak kabul edilebilir.

- a) Klinik
- b) Ultra derin dizi analizi; primerler varyant mutasyon bölgesine spesifik ise mutasyon dilüsyon gerekmeksizin saptanır. Primer mutasyona spesifik değilse, bir hastada görülme sıklığı kadar dilüsyon ve istatistik tekrar gerekir.
- c) Konvansiyonel dizi analizinde dilüsyon, klonlama, istatistik tekrar ile duyarlılık ve spesifite arttırılmış olur.
- d) NMS- GZ- PZR yönteminde kullanılan primerler ile aynı koşullarda iki ayrı reaksiyon biri konvansiyonel PZR diğeri PZR

4.8. Referans Yöntem (NMS-GZ-PZR Yöntemi) Varlığında ve Yokluğunda Yapılan Performans Analizlerinin Karşılaştırılması

Simen ve arkadaşlarının 264 HIV pozitif hastada ilaç direncini saptamak için standart dizi analizi ile ultra derin dizi analizini karşılaştırdığı bir çalışmada, mutasyonlar standart dizi analizi ile %14 oranında saptanırken, ultra derin dizi analizi ile % 28 oranında saptanmıştır (127). Benzer şekilde bizim çalışmamızda da konvansiyonel dizi analizi ile % 19 oranında saptanan M41L pozitifliği, ultra derin dizi analizi düzeyindeki duyarlılıkta, düşük oranlarda bulunan ilaç dirençli azınlıktaki mutantları (minority variants) konvansiyonel dizi analizine kıyasla, daha duyarlı saptayan NMS-GZ-PZR yöntemi ile % 50 bulunmuştur.

4.9. Çalışma Örnekleme (ÇÖ) için NMS-GZ-PZR Yöntemi İle Elde Edilen $\Delta C_{t\text{ÇÖ}}$ Değerlerinin Analizi

Orjinal çalışmada M41L mutasyonu için ΔC_t eşik değeri 10 olarak bildirilmiştir. Bizim çalışmamızda orjinal çalışmadaki ΔC_t eşik değeri 10 olarak analiz yapılsaydı; NMS-GZ-PZR yöntemi ile altı M41L pozitifliği, 26 M41L negatifliği saptanacaktı. Yazar ile kişisel iletişim sonucu, yazar tarafından ΔC_t eşik değerinin, her çalışmanın verilerine göre ayrı belirlenmesi önerilmiştir.

4.10. $\Delta C_{t\text{ÇÖ}}$ Değerlerinin Analizi İle Belirlenen Yeni Pozitiflik Ölçütüne (ΔC_{t5} Kesim-Değeri) Göre Performans Analizi

Çalışmanın verileri doğrultusunda merkezi eğilim dağılımına göre ΔC_t ortanca değeri (5.81) eşik değeri olarak belirlendi. Mutasyon saptama aralığını genişletmek için ΔC_t kesme değerini arttırmak, mutantları, doğal bulunan varyantlardan ayırt etmeyi zorlaştırır. ΔC_t 'yi dar tutmak duyarlılığı artırır (113). ΔC_t eşik değerine göre NMS-GZ-PZR yöntemi ile 16 M41L pozitifliği, 16 M41L negatifliği saptanmıştır.

4.11. $\Delta C_{t5.81}$ kesim-Değeri İle ΔC_{t10} Kesim-Değeri İle Elde Edilen Performans Analizlerinin Karşılaştırılması

$\Delta C_{t5.81}$ kesim-değeri ile



	pozitif	negatif
NMS-GZ-PZR	16	16
Konvensiyonel dizi analizi	6	16

ΔC_{t10} kesim-değeri ile



	pozitif	negatif
NMS-GZ-PZR	6	26
Konvensiyonel dizi analizi	13	19

4.12. NMS-GZ-PZR Yöntemi İle Dirençli Mutant Varyant Sub-Popülasyonların Saptanmasının Klinik Önemi

Konvansiyonel dizi analizi tarafından saptanamayan azınlıktaki ilaç direnç varyantlarının ART sonuçlarını etkilediği CDC'nin (Centers for Disease Control and Prevention) yaptığı bir çalışmada gösterilmiştir. Stavudine, abacavir, efavirenz tedavisine başladıktan 48 hafta sonra virolojik başarısızlık saptanan hastalarda retrospektif olarak direnç bulaştırıcılığı araştırılmış dizi analizi ile iki K103, bir Y181 ve bir M184V mutasyonu tespit edilirken, allele özgü PZR testi ile bu mutasyonlara ek olarak minor popülasyon grubunda bulunan iki K103, bir Y181 ve iki M184V tespit edilmiştir (103). NMS-GZ-PZR yöntemi

Bu çalışmanın bir takım kısıtlılıkları olmuştur;

Toplam 57 örnek arasında, MS-GZ-PZR sonuçlarına göre, total viral kopya amplifikasyonunun Ct değeri 10'dan küçük olan bir örnek; yüksek kopya sayısı nedeni ile dilüsyon yaparak tekrar edilmesi gerekirken, tek örnek olduğu ve birkaç kez dondurulup çözüldüğü için RNA kalitesi bozulması nedeniyle, tekrar edilemedi. Yine 26'dan büyük olan; düşük kopya sayısı sebebiyle yanlış pozitifliklere neden olabilecek belirsiz sonuç olarak kabul edilen 24 örnek, öneriye uygun olarak, pozitiflik ölçütü olarak kullanılacak ΔCt eşik değerini belirlemek için yapılan çalışmanın dışında bırakıldı, tekrar edilemedi. Total viral kopya amplifikasyonunun Ct değeri 26 üzerinde olan 24 örnekten 8'inin ΔCt değeri (5.81) altında bulundu, M41L mutasyonu pozitif kabul edilebilirdi. Bu sekiz örneğin yedi tanesi konvansiyonel dizi analizi ile de pozitif bulunmuştu.

Sonuçları karşılaştıracak altın standart bir yöntem bulunmaması istatistik analizde sorun oluşturdu.

Çalışmada diğer azınlıktaki mutasyonlar (minority variants) araştırılmadı.

Gerçek zamanlı PZR çalışması olduğu için, amplikonlardan tekrar dizi analizi yapılamadı.

İleri çalışma gereksinimleri

Bizim bulgularımız ve yayınlanmış diğer çalışmalar ışığında, bu yöntemin klinik laboratuvarında hasta ve hekimi için en uygun kullanımı; hastanın ilaç kullanımından önce ve sonra mutasyonların ölçümü ile dirence karar verilerek test sonuçlarının birlikte yorumlanması, popülasyonun epidemiyolojik özelliklerine göre

(demografik, enfeksiyon evrelerine, tedavi alıp almadığına vb.) stratifiye ederek değerlendirilmesi daha uygun olacaktır. İleriye dönük çalışmalarda NMS-GZ-PZR yöntemi azınlıktaki mutasyonların çoğunu aynı anda saptayan kullanıma hazır daha pratik multipleks ticari kitler tasarlanabilir.

Sonuç olarak, NMS-GZ-PZR yöntemi, ultra derin dizi analizi düzeyindeki duyarlılıkta, azınlık direnç mutantlarının önemli bir grubunun araştırılmasını sağlayabilmekte ve böylece HIV enfeksiyonu olgularında gelişen antiviral dirence ilişkin epidemiyolojik dinamiklerin daha iyi anlaşılmasına ve tedavi başarısının artmasına katkıda bulunmaktadır.

KAYNAKLAR

1. Reitz M.S, Gallo R.C. Human Immunodeficiency Viruses. In: Mandell, Douglas, and Bennett's (eds) . Principles and Practice of Infectious Diseases(7th ed) Churchill Livingstone, New York, pp 2323–2344, 2010
2. Gottlieb MS, Schroff R, Schander HM, Weisman JD, Fan PT, Wolf RA, Saxon A Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency The New England Journal of Medicine 1981;305: 1431–1438
3. Barré - Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, et al. Isolation of a T- Lymphotropic Retrovirus From Patient at Risk for Acquired Immun Deficiency Syndrome (AIDS). Science 1983; 220: 868–871.
4. Erensoy S.HIV/AIDS. Moleküler, Klinik ve Tanısal Viroloji Kitabı.. 2008 ss 212, 2008
5. Yılmaz G, Midilli K. Retrovirüs Ailesi. Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M. İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji, Etkenlere Göre İnfeksiyonlar Kitabından.3. Baskı Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, ss 1841–1870, 2008
6. Plantier JC, Leoz M, Dickerson JE, De Oliveira F, Cordonnier F, Leme V, et al. A new human immunodeficiency virus derived from gorillas. Nat Med 2009;15:871–2.
7. Hemelaar J, Gouws E, Ghys PD, Osmanov S. Global trends in molecular epidemiology of HIV-1 during 2000-2007. AIDS 2011;25:679–89.
8. Pasquier C, Millot N, Njouom R, Sandres K, Cazabat M, Puel J, et al. HIV-1 subtyping using phylogenetic analysis of pol gene sequences. J Virol Methods 2001;94:45–54.
9. Robertson DL, Anderson JP, Bradac JA, Carr JK, Foley B, Funkhouser RK, et al. HIV-1 nomenclature proposal. Science 2000;288:55–6.
10. LM Luft, MJ Gill, DL Church. HIV–1 Viral diversity and its implications for viral load testing: review of current platforms. Int. J. Infect Dis.(2011), doi: 10.1016/j.ijid.

11. Damond F, Gueudin M, Pueyo S, Farfara I, Robertson DL, Deschamps D, et al. Plasma RNA viral load in human immunodeficiency virus type 2 subtype A and subtype B infections. *J Clin Microbiol* 2002;40:3654–9.
12. Fonquernie L, Eholie SP, Damond F, Lacombe K, Girard PM. Failure of HIV-2 viral load assay in a severely immunodeficient patient: clinical and therapeutic management issues. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2006;100: 282–4.
13. Griffith B P, Campbell S. Human Immunodeficiency Viruses. In Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA (eds). *Manual of Clinical Microbiology*(9th ed) ASM, Washington 1308–1323
14. Yılmaz G, Midilli K, Türkoğlu S, Bayraktaroğlu Z, Kuşkucu AM, Özkan E, Atasever L, Calangu S, Atlas K. Genetic subtypes of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) in İstanbul, Turkey. *International Journal of Infectious Diseases*, 10: 286–290, 2006
15. www.hatam.hacettepe.edu.tr (Hacettepe Üniversitesi HIV/AIDS Tedavi ve Araştırma Merkezi web sayfası (erişim tarihi 30.06.2011)
16. Yılmaz G, Gürol Y. Retrovirüsler. Murray PR, Rosental KS, Pfaller MA. *Tıbbi Mikrobiyoloji kitabından*. 6.baskı. Atlas Kitapçılık Tic. Ltd. Şti. Ankara, ss 636, 2010
17. Kefziarska K, Crowe SM, Turville S, Cunningham AL. The influence of cytokines, chemokines and their receptors on HIV-1 replication in monocytes and macrophages. *Rev Med Virol* 2003; 13:39–56
18. Braun P. Wolf E. The Structure of HIV-1. In: Hoffmann C, Rockstroch JK eds *HIV 2010*. Hamburg. Medizin Fokus Verlag, 2010; 23)
19. Embretson, J., M. Zupancic, J. L. Ribas, A. Burke, P. Racz, K. Tenner-Racz, and A. T. Haase. 1993. Massive covert infection of helper T lymphocytes and macrophages by HIV during the incubation period of AIDS. *Nature* 362: 359-362
20. Quinn, T. C., M. J.Wawer, N. Sewankambo, D. Serwadda, C. Li, F.Wabwire Mangen, M. O. Meehan, T. Lutalo, and R. H. Gray. 2000. Viral load and heterosexual transmission of human immunodeficiency virus type 1. Rakai Project Study Group. *N. Engl. J. Med.* 342:921–9

21. Attia, S., M. Egger, M. Muller, M. Zwahlen, and N. Low. 2009. Sexual transmission of HIV according to viral load and antiretroviral therapy: systematic review and meta-analysis. *AIDS* 23:1397-1404
22. Donnell, D., J. M. Baeten, J. Kiarie, K. K. Thomas, W. Stevens, C. R. Cohen, J. McIntyre, J. R. Lingappa, and C. Celum. 2010. Heterosexual HIV-1 transmission after initiation of antiretroviral therapy: a prospective cohort analysis. *Lancet* 375:2092-2098.
23. Erensoy S. HIV/AIDS Tanısı ve Viral Yük Testleri. Virolojik Tanı Yöntemleri Kursu. 22-23 Haziran 2011. İstanbul.
24. Türker N, Örmen B. Antiretroviral Tedavi. *İnfeksiyon Dergisi (Turkish Journal of Infection)* 2006; 20(3): 207–217
25. Yılmaz G. Viral İnfeksiyonlarda Direnç: HIV .2.Türkiye Ekmud Bilimsel Platformu. Antimikrobiyal Direnç Kongre Bildiri Kitabı, ss 90-92, 11-14 Mart 2009, Ankara .
26. Ho DD, Neumann AU, Perelson AS, Chen W, Leonard JM, Markowitz M: Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection, *Nature* 373:123, 1995
27. Abacıoğlu H. Antiretrovirallere Direnç Mekanizmaları ve Direnç Testleri. *Ankem Derg* 14 (No.3) :400-405, 2000
28. Shafer RW and Schapiro. Drug resistance and retroviral drug development. *J Antimicrob Chemoth* 2005, 55: 817
29. Mansky L, Bernard. L. AZT and AZT resistant RT can increase in vivo mutation rate HIV- 1. *J Virol* 2000, 74: 9532
30. Hache G, Mansky LM and Haris RS. Human APOBEC3proteins, retrovirus restriction and HIVdrug resistance. *AIDSRev* 2006, 8:148–57
31. .Boffito M, Winston A and Owen A. Host determinants of antireroviral drug activitiy. *Curr Opinion in Inf Dis* 2005, 18:543.
32. Shafer RW Genotypic Testing for HIV–1 Drug Resistance. In: Peiper L, Coffey S, Volberding PA, eds.HIV InSite Knowledge Base (textbook online) ; San Francisco: UCSF Center for HIV Information; April 2004
33. Goudsmit J, Weverling GJ, van der Hoek L et al. Carrier rate of zidovudine resistant HIV–1: the impact of failing therapy on transmission of resistant strains. *AIDS*.2001, 15:2293

34. Kantor R, Katzenstein DA, Efron Bet al. Impact of HIV-1 subtype and antiretroviral therapy on protease and reverse transcriptase genotype: Results of global collaboration. *PloS Medicine* 2005, 2:326
35. Reitz M.S, Gallo R.C. Human Immunodeficiency Viruses. In: Mandell, Douglas, and Bennett's (eds) . *Principles and Practice of Infectious Diseases*(7th ed) Churchill Livingstone, New York, pp 2323–2344, 2010
36. Turner D, Wainberg MA. HIV transmission and primary drug resistance. *AIDS* 2006, 8:17
37. Greenberg ML, Cammack N. Resistance to Enfuvirtide, the First HIV Fusion Inhibitor. *J Antimicrob Chemother* 54:333–40, 2004
38. Saymer A. A. Anriviral Ajanlar. *Moleküler, Klinik ve Tanısal Viroloji Kitabı*. 2008 ss 255- 281
39. Markowitz M, Nguyen BY, Gotuzzo E, et al. Rapid and durable antiretroviral effect of the HIV-1 Integrase inhibitor raltegravir as part of combination therapy in treatment- naive patients with HIV-1 infection: results of a 48 – week controlled study. *J Acquir Immune Defic. Syndr.* 46:125–133, 2007
40. Kohlstaedt LA, Wang J, Friedman JM , Rice PA, Steitz TA: Crystal Structure at 3.5 Å resolution of HIV-1 reverse transcriptase complexed with an inhibitor, *Science* 256: 1783(1992)
41. Miller MD, Margot N, Lu B ve ark. Genotypic and Phenotypic Predictors of the Magnitude of Response to Tenofovir Didoproxil Fumarate Treatment in Antiretroviral Experienced Patients. *The Journal of Infectious Diseases* 2004; 189:857-856.
42. Tu X. Das K., Han Q., Bauman J., Clark Jr AD. Hou X. Frenkel YV. Gaffney BL, Jones RA. Boyer PL. Hughes SH. Sarafianos SG., Arnold E. Structural basis of HIV-1 resistance to AZT by excision. *Natural structural & molecular biology* 2010: 17; 1202-1210
43. Bachelier L. Jeffrey S. Hana G. et al. Genotypic Correlates of Phenotypic Resistance to Efavirenz in Virus Isolates from patients failing nonnucleoside Reverse Transcriptase Inhibitor Therapy. *Journal of Virology* 2001;75: 4999-5008

44. Deeks SG. International Perspectives on Antiretroviral Resistance, Nonnucleoside Reverse Transcriptase Inhibitor Resistance. *Journal of Acquired Immun Deficiency Syndromes* 2001; 26 Suppl I: 25-53
45. Spence RA, Kati WM, Anderson KS, Johnson KA: Mechanism of inhibition of HIV-1 reverse transcriptase by nonnucleoside inhibitors, *Science* 267: 998 (1995)
46. Boden D, Markowitz M: Resistance to human immunodeficiency virus type 1 protease inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother* 42: 2775 (1998)
47. Huang H, Chopra R, Verdine GL, Harrison SC: Structure of a covalently trapped catalytic complex of HIV-1 reverse transcriptase: implications for drug resistance, *Science* 282: 1669(1998)
48. Descamps D, Chaix ML, Andre P, et al. French national sentinel survey of antiretroviral drug resistance in patients with HIV-1 primary infection and in antiretroviral-naive chronically infected patients in 2001–2002. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2005; 38:545–52.
49. Grant RM, Kuritzkes DR, Johnson VA, et al. Accuracy of the TRUGENE HIV-1 genotyping kit. *J Clin Microbiol* 2003; 41:1586–93.
50. Little SJ, Holte S, Routy JP, et al. Antiretroviral-drug resistance among patients recently infected with HIV. *N Engl J Med* 2002; 347:385–94.
51. Masquelier B, Bhaskaran K, Pillay D, et al. Prevalence of transmitted HIV-1 drug resistance and the role of resistance algorithms: data from seroconverters in the CASCADE collaboration from 1987 to 2003. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2005; 40:505–11.
52. Wensing AM, van de Vijver DA, Angarano G, et al. Prevalence of drug-resistant HIV-1 variants in untreated individuals in Europe: implications for clinical management. *J Infect Dis* 2005; 192:958–66.
53. Guidelines for the Use of Antiretroviral Agents in HIV-1-Infected Adults and Adolescents January 10, 2011. Department of Health and Human Services.
54. Caliendo AM, Kraft CS. Molecular Detecting and Characterization of HIV-1. In: Persing DH, Tenover CF, Tang YW, Nolte FS, Hayden RT, Belkum AV (eds). *Molecular Microbiology Diagnostic Principles and Practise* (2nd ed) ASM press, Washington pp 541–556) 2011

56. Kellam P, Boucher CA, Larder BA. Fifth mutation in human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase contributes to the development of high-level resistance to zidovudine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1992;89:1934–1938. [PubMed: 1371886]
57. Tu X. Das K., Han Q., Bauman J., Clark Jr AD. Hou X. Frenkel YV. Gaffney BL, Jones RA. Boyer PL. Hughes SH. Sarafianos SG., Arnold E. Structural basis of HIV-1 resistance to AZT by excision. *Natural structural & molecular biology* 2010; 17; 1202-1210
58. Bozdayı G. DNA Çoğaltma Yöntemleri. Tanısal Moleküler Teorik ve Uygulamalı Kursu 18-19-20 Aralık 2009, Ankara Teorik Ders Notları. 31-92
59. Espy MJ, Uh RJ, Sloan ML, Buckwalter SP, Jones MF, Vetter EA. Yao CDS, Wengeneck NL, Rosenblatt JE. Cockerill III RF. Smith TF. Real- Time PZR In *Clinical Microbiology: Applications for Routine Laboratory Testing*. *Clinical Microbiology Reviews*. Jan.2006 p 165-256
60. Vierstrate A. Principle of the PZR. 1999. <http://users.ugent.be/~avierstr/principles/PZR.html> Erişim tarihi 20.06.2011)
61. Kubista M., Andrade J.M., Bengtsson M., Forootan A., Jonak J., Lind K., Sındelka, R., Sjöback R., Sjogreen J., Strombom, L., Stahlberg A., Zoric N., 2006. Real time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine*, 27: 95-125.
62. Holland P M., Abramson RD., Watson, R. and Gelfand D H., 1991.Detection of spesific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'-3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase.*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 88: 7276-7280.
63. Lıvak KJ., Flood SJA., Marmaro J., Giusti W., Deetz, K., 1995. Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PZR product and nucleic acid hybridization. *Gen. Res*. 4: 357–362.
64. Grove D. S., 1999. Quantitative gerçek zamanlı polymerase chain reaction for the corefacility using Taqman and the Perkin-Elmer/Applied BiosystemsDivision 7700 Sequence Detector *Journal of Biomolecular Techniques*, 10: 11-16.

65. Heid CA., Stevens J., Lıvak KJ., Williams PM, 1996. Gerçek zamanlı quantitative PZR. *Gen. Res.* 6: 986-994.
66. deKOK JB, Hendriks JCM. Van Solinge WW. Willems HL, Mensisk EJ, Swinkels DW. Use of gerçek zamanlı quantitative PZR to compare DNA isolation methods. *Clin Chem* 1998;44; 2201–4
67. Gibson UEM, Heid CA, Williams PM. A novel method for gerçek zamanlı quantitative RT- PZR. *Genome Res*1996; 6:995–1001
68. Park S, Wong M, Marras SA, ve ark. Rapid İdentification Of Candida Dublinensis using A species- specific molecular beacon. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 2829-36
69. Morris, T., Robertson, B., Gallagher, M., 1996. Rapid reverse transcription-PZR detection of hepatitis C virus RNA in serum by using the TaqMan fluorogenic detection system. *J. Clin. Microbiol.* 34: 2933-2936.
70. Adams SM. Linear Amplification DNA Sequencing *Focus* 1991: 13(2) 56-57
71. Zülal A., 2001, İnsan Genomu, kalıtım şifresinin peşinde 136 yıl, Tübitak Yayınları, Mart;5–11
72. Sanger, f., Nicklen, S., Coulson, A.R., DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1977; 74, 5463-7.
57. Maxam A., Gibert W., A new method of sequencing DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1977: 74, 560–4
73. Sambrook J. Fritsch, EF. Maniatis, T. *Molecular Cloning, a laboratory manual.* Cold spring harbor laboratory Press New York. 1989
74. Perkin Elmer, ABI 310 Genetic Analyzer Manuel, 2000.
75. David A.M.C. van de Vijver, Annemarie M.J. Wensing, Charles A.B. Boucher. *The Epidemiology of Transmission of Drug Resistant HIV-1*
76. Tang JW, Pillay D. Transmission of HIV-1 DRUG Resistance. *J Clin Virol* 2004; 30: 1- 10
77. Wensing AM, van de Vijver DA, Angarano G, et al. Prevalence of drug-resistance HIV–1 variants in untreated individuals in Europe: implications for clinical manegement. *J Infect Dis* 2005; 192:958–956.

78. van de Vijver DAMC, Wensing AMJ, Boucher CAB, et al. The epidemiology of transmission of drug resistant HIV-1. In: HIV Sequence Compendium 2006/2007: Theoretical Biology and Biophysics Group, Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, NM. LA-UR 07-4826;2007:17-36.
79. Wensing AM, van de Vijver DA, Angarano G, et al. Prevalence of drug-resistant HIV-1 variants in untreated individuals in Europe: implications for clinical management. *J Infect Dis.* 2005 Sep 15;192(6):958-66.
80. van de Vijver DAMC, Wensing AMJ, Boucher CAB, et al. HIV-1 Drug resistance patterns among patients on failing treatment in a large number of European countries. *Acta Dermatoven APA Vol19*, 2010, No 4
81. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166093407002418-bbib10>
R.M. D'Amato, R.T. D'Aquila and L.M. Wein. Management of Antiretroviral Therapy for HIV Infection: Modelling When to Change Therapy, *Antivir. Ther.* **3** (1998), pp. 147-158.
82. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166093407002418-bbib33>
S. Palmer, M. Kearney, F. Maldarelli, E.K. Halvas, C.J. Bixby, H. Bazmi, D. Rock, J. Falloon, R.T. Davey Jr., R.L. Dewar, J.A. Metcalf, S. Hammer, J.W. Mellors and J.M. Coffin, Multiple, linked human immunodeficiency virus type 1 drug resistance mutations in treatment-experienced patients are missed by standard genotype analysis, *J. Clin. Microbiol.* **43** (2005), pp. 406-413.
83. L.B.A. Larder, P. Kellam and S.D. Kemp, Zidovudine resistance predicted by direct detection of mutations in DNA from HIV-infected lymphocytes, *AIDS* **5** (1991), pp. 137-144.
84. K.J. Metzner, S. Bonhoeffer, M. Fischer, R. Karanickolas, K. Allers, B. Joos, R. Weber, B. Hirschel, L.G. Kostrikis and H.F. Gunthard, Emergence of minor populations of human immunodeficiency virus type 1 carrying the M184V and L90M mutations in subjects undergoing structured treatment interruptions, *J. Infect. Dis.* **188** (2003), pp. 1433-1443
85. T. Bergroth, A. Sonnerborg and Z. Yun, Discrimination of lamivudine resistant minor HIV-1 variants by selective real-time PCR, *J. Virol. Methods* **127** (2005), pp. 100-107
86. Nissley D.V , Halvas E. K. , Hoppman N.L, Garfinkel D.J, Mellors D.W, and Strathern J.N. Sensitive Phenotypic Detection of Minor Drug-Resistant

Human Immunodeficiency Virus Type 1 Reverse Transcriptase Variants. *Journal of Clinical Microbiology*, November 2005, p. 5696-5704, Vol. 43, No. 11

87. Paredes R, Marconi VC, Campbell T. B, Kuritzkes D.R. Systematic evaluation of allele-specific real-time PCR for the detection of minor HIV-1 variants with *pol* and *env* resistance Mutations. *Journal of Virological Methods* 146 (2007) 136–146
88. Hirsch MS, Gunthard H, Schapiro JM, Brun-Vezinet F, Clotet B, Hammer SM, Johnson VA, Kuritzkes DR, Mellors JW, Pillay D, Yeni PG, Jacobsen DM, Richman DD: Antiretroviral Drug Resistance Testing in Adult HIV-1 Infection: 2008 Recommendations of an International AIDS Society–USA Panel, *Clinical Infectious Diseases*; 47:266–85(2008).6
89. Deeks, S. G., N. S. Hellmann, R. M. Grant, N. T. Parkin, C. J. Petropoulos, M. Becker, W. Symonds, M. Chesney, and P. A. Volberding. 1999. Novel four-drug salvage treatment regimens after failure of a human immunodeficiency virus type 1 protease inhibitor-containing regimen: antiviral activity and correlation of baseline phenotypic drug susceptibility with virologic outcome. *J. Infect. Dis.* 179:1375–1381
90. Hirsch MS, Brun- Vezinet F, Clotet B, et al. Antiretroviral drug resistance testing in adults infected with human immunodeficiency virus type 1: 2003 recommendations of an International AIDS Society – USA Panel. *Clin Infect Dis* 2003; 37:113–128
91. Yerly S, Von Wyl V, Ledergerber B, et al. Transmission of HIV-1 drug resistance in Switzerland: a 10-year molecular epidemiology survey. *AIDS* 2007; 21:2223–9.
92. Jain V, Liegler T, Vittinghoff E, Hartogensis W, Bacchetti P, Poole L, Loeb L, Pilcher DC, Grant RM, Deeks SG, Hecht FM. Transmitted Drug Resistance in Persons with Acute/ Early HIV-1 in San Francisco, 2002-2006. *Plos One* / www.plosone.org. December 2010
93. Clercq D. Review anti- HIV drugs: 25 Compounds approved within 25 years after the discovery of HIV. *Int J. Antimicrob. Agents*, 33:307-320 2009
94. Myint L, Ariyoshi K, Yan H, Frater AJ, Auwanit W, Pathipvanith P, Yamada K, Matsuda M, Chiba T, Fujita K, McClure M, Weber NJ, Sugiura W.

Mutagenically Separated PZR Assay for Rapid Detection of M41L and K70R Zidovudine Resistance Mutations in CRF01_AE (Subtype E) Human Immunodeficiency Virus Type 1. ASM p3861-3868. 2002.

95. Nijhuis M, Schuurman R, de Jong D, et al. Increased fitness of drug resistant HIV-1 protease as a result of acquisition of compensatory mutations during suboptimal therapy. *AIDS* 1999; 13:2349–2359
96. Deeks, S. G., N. S. Hellmann, R. M. Grant, N. T. Parkin, C. J. Petropoulos, M. Becker, W. Symonds, M. Chesney, and P. A. Volberding. 1999. Novel four-drug salvage treatment regimens after failure of a human immunodeficiency virus type 1 protease inhibitor-containing regimen: antiviral activity and correlation of baseline phenotypic drug susceptibility with virologic outcome. *J. Infect. Dis.* 179:1375–1381
97. Hooker, D., G. Tachedjian, A. E. Soloman, A. D. Gurusinge, S. Land, C. Birch, J. L. Anderson, B. M. Roy, E. Arnold, and N. J. Deacon. 1996. An in vivo mutation from leucine to tryptophan at position 210 in human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase contributes to high-level resistance to 3-azido-3-deoxythymidine. *J. Virol.* 70:8010–8018.
98. Kaufmann, G. R., K. Suzuki, P. Cunningham, M. Mukaide, M. Kondo, M. Imai, J. Zaunders, and D. A. Cooper. 2001. Impact of HIV type 1 protease, reverse transcriptase, cleavage site, and p6 mutations on the virological response to quadruple therapy with saquinavir, ritonavir, and two nucleoside analogs. *AIDS Res. Hum. Retrovir.* 17:487–497.
99. Kuritzkes, D. R., D. Shugarts, M. Bakhtiari, D. Poticha, J. Johnson, M. Rubin, T. R. Gingeras, M. Kennedy, and J. J. Eron. 2000. Emergence of dual resistance to zidovudine and lamivudine in HIV-1-infected patients treated with zidovudine plus lamivudine as initial therapy. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 23:26–34.
100. Rousseau, M. N., L. Vergne, B. Montes, M. Peeters, J. Reynes, E. Delaporte, and M. Segondy. 2001. Patterns of resistance mutations to antiretroviral drugs in extensively. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2001 Jan 1;26(1): 36–43
101. Lindström A. Ohliss A. Huigen M. Nijhuis M. Berglung T. Bratt G. Sandström E. Albert J. HIV-1 Transmission Cluster with M41L ‘singleton’ mutation and

decreased transmission of resistance in newly diagnosed Swedish homosexual men. *Antiviral therapy* 11, 1031–10

102. Louvel S, Battegay M, Vernazza P, Bregenzler T, Klimkait T, Hamy F; Swiss HIV Cohort Study. Detection of drug-resistant HIV minorities in clinical specimens and therapy failure. *HIV Med.* 2008 Mar;9(3):133–41. Epub 2008 Jan 21.
103. Metzner KJ, Rauch P, Braun P, Knechten H, Ehret R, Korn K, Kaiser R, Sichtig N, Ranneberg B, van Lunzen J, Walter H. Prevalence of key resistance mutations K65R, K103N, and M184V as minority HIV–1 variants in chronically HIV–1 infected, treatment-naïve patients. - *J Clin Virol.* 2011 Feb;50(2):156–61. Epub 2010 Nov 4.
104. Johnson JA, Li JF, Wei X, Lipscomb J, Irlbeck D, Craig C, Smith A, Bennett DE, Monsour M, Sandstrom P, Lanier ER, Heneine W. Minority HIV–1 drug resistance mutations are present in antiretroviral treatment-naïve populations and associate with reduced treatment efficacy. *PLoS Med.* 2008 Jul 29;5(7):e158.
105. Wheeler WH, Ziebell RA, Zabina H, Pieniazek D, Prejean J, Bodnar UR, Mahle KC, Heneine W, Johnson JA, Hall HI; Variant, Atypical, and Resistant HIV Surveillance Group. Prevalence of transmitted drug resistance associated mutations and HIV–1 subtypes in new HIV–1 diagnoses, U.S.-2006. *AIDS.* 2010 May 15;24(8):1203–12.
106. Johnson VA, Brun-Vézinet F, Clotet B, Günthard HF, Kuritzkes DR, Pillay D, Schapiro JM, Richman DD. Update of the drug resistance mutations in HIV-1: December 2010. *Top HIV Med.* 2010 Dec;18(5):156–63.
107. Johnson JA, Geretti AM. Low-frequency HIV-1 drug resistance mutations can be clinically significant but must be interpreted with caution. *J Antimicrob Chemother.* 2010 Jul;65(7):1322–6. Epub 2010 May 13.
108. Delobel P, Saliou A, Nicot F, Dubois M, Trancart S, Tangre P, Aboulker JP, Taburet AM, Molina JM, Massip P, Marchou B, Izopet J; ANRS 106-Window Study Team. Minor HIV-1 Variants with the K103N Resistance Mutation during Intermittent Efavirenz-Containing Antiretroviral Therapy and Virological Failure. *PLoS One.* 2011;6(6):e21655. Epub 2011 Jun 27

109. Hana GJ, Balaguera HU, Freedberg KA. Drug selected resistance mutations and non-B subtypes in antiretroviral- naive adults with established human immunodeficiency virus infection. *J Infect Dis* 2003; 188:986–991
110. Bezemer D, Jurrians S, Prins M. Declining trend in transmission of drug-resistant HIV–1 in Amsterdam. *AIDS* 2004; 18:1571–1577
111. Vercauteren J, Derdelinckx I, Deforce K. Prospective collection of data on the prevalence of transmitted resistance in newly diagnosed HIV infected individuals in Belgium in 2004. 3rd European HIV Drug Resistance Workshop. March 30- April 2005, Athens, Greece. Abstract 13.
112. Swenson LC, Boehme R, Thielen A, McGovern RA, Harrigan PR. Genotypic determination of HIV-1 tropism in the clinical setting. *HIV Therapy* 4(3), 293-303 (2010).
113. Johnson JA, Li F, Wei X, Lipscomb J, Bennett D, Brant A, Cong M, Spira T, Shafer RW, Heneine W: Simple PZR Assays improve the sensitivity of HIV–1 subtype B drug resistance testing and allow linking of resistance mutations, *PLoS ONE* / www.plosone.org 2007
114. Le T, Chiarella J, Simen BB et al. :Low – abundance HIV drug- resistant viral variants in treatment- experienced persons correlate with historical antiretroviral use. *PLOS One* 4(6) E6079. Doi: 10.1371/journal.pone.0006079. 2009
115. Simen BB, Huppler Hullsiek K, Novak PM. Low abundance drug resistant viral variants in chronically HIV- infected antiretroviral- naive patients significantly impact treatment. *J. Infect Dis.* 199 (5), 693-701. 2009
116. Wang C, Mitsuya Y, Gharizadeh B, Ronaghi M, Shafer RW. Characterization of mutation of spectra with ultra-deep sequencing: application to HIV-1 drug resistance. *Genome Res.* 17(8) 1195-1201. 2007
117. Hauser A, Mugenyi K, Kabasinguzi R, Bluethgen K, Kuecherer C, Harms G, Kunz A. Detection and Quantification of Minor Human Immunodeficiency Virus Type 1 Variants Harboring K103N and Y181C Resistance Mutations in Subtype A and D Isolates by Allele-Specific Real-Time PCR. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, July 2009, p. 2965–2973 Vol. 53, No. 7
118. Midilli K, Çağatay A, Yılmaz G, Türkoğlu S, Aksözek A, Calangu S, Altay K. Preliminary Results for Detecting Human Immunodeficiency Virus Type 1

Mutations Related with Drug Resistance in Istanbul. *Journal of Clinical Virology* 27(2003) 16-72.

119. Midilli K, Yılmaz G, Istanbulu A, Ergin S, Kuşkucu M, Öztürk R, Korten V, Çalangu S, Çağatay A, Altaş K.HIV ile infekte tedavi attındaki hastalarda antiretroviral direncin Araştırılması.Ulusal Viroloji Kongre kitabı. 13-17 Eylül Antalya.S.227
120. R.M. Grant, D.R. Kuritzkes, V.A. Johnson, J.W. Mellors, J.L. Sullivan, R. Swanstrom, R.T. D'Aquila, M. Van Gorder, M. Holodniy, R.M. Lloyd Jr.JJr., C. Reid, G.F. Morgan and D.L. Winslow, Accuracy of the TRUGENE HIV-1 genotyping kit, *J. Clin. Microbiol.* 41 (2003), pp. 1586–1593
121. Brun –Vezinet F, Costagliola D, Khaled M A, Calvez V, Clavel F, Clotet B, Haubrich R, Kempf D, King M, Kuritzkes D, Lanier R, Miller M, Miller V, Phillips A, Pillay D, Schapiro J, Scott J, Shafer R, Zazzi M, Zolopa A and DeGruttola V. Clinically validated genotype analysis: guiding principles and statistical concerns, *Antivir. Ther.* 9 (2004), pp. 465–478
121. E.K. Halvas, G.M. Aldrovandi, P. Balfe, I.A. Beck, V.F. Boltz, J.M. Coffin, L.M. Frenkel, J.D. Hazelwood, V.A. Johnson, M. Kearney, A. Kovacs, D.R. Kuritzkes, K.J. Metzner, D.V. Nissley, M. Nowicki, S. Palmer, R. Ziermann, R.Y. Zhao, C.L. Jennings, J. Bremer, D. Brambilla and J.W. Mellors, Blinded, multicenter comparison of methods to detect a drug-resistant mutant of human immunodeficiency virus type 1 at low frequency, *J. Clin. Microbiol.* 44 (2006), pp. 2612–2614
122. John R, Lifshitz MS, Jhang J, Fink D. Post-analysis: Medical Decision-Making In: McPherson RA, Pincus MR (eds). *Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods* (21st ed) Saunders Elsevier pp 68-75, 2007
123. Burd M.E. Validation of Laboratory-Developed Molecular Assays for Infectious Diseases. *Clinical Microbiology Reviews*, July 2010, p. 550–576 Vol. 23, No. 3 0893-8512/10/\$12.00 doi:10.1128/CMR.00074-09
124. Genç Y. Tanı Testi Çalışmalarında Metodolojik Standartların Kullanılması. *Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası* cilt 56, sayı 4, 2003
125. Orsoy A. Olumsuzluk tablolarının analizinde gizli yapı modellerinin kullanımı. [http:// journal.qu.edu.az/article_pdf/1021_242](http://journal.qu.edu.az/article_pdf/1021_242)

- 126.** Keskin, S. 2001. İ ki yönlü (contingency) tablolar da kapp a (K) istatistiğinin kullanımı, Biyoteknoloji (Kükem) Dergisi, 25 (1)53-57.
- 127.** Simen BB, JF Simons, KH Hullsiek. RM Novak. Et al 2009 Low abundance drug resistance viral variants in chronically HIV infected, antiretroviral treatment- naive patients significantly impact treatment outcomes J. Infect. Dis.199: 693–701.