

Türkiye’de İlk Kez Saptanan Bir Rekombinant HIV-1 Kökeni: CRF08_BC

The First Detected HIV-1 Recombinant Strain in Turkey: CRF08_BC

Murat SAYAN¹, Selçuk KAYA²

¹ Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, Merkez Laboratuvarı, PCR Ünitesi, Kocaeli.

¹ Kocaeli University Medical Faculty Hospital, Central Laboratory, PCR Unit, Kocaeli, Turkey.

² Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Farabi Hastanesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Trabzon.

² Karadeniz Technical University Medical Faculty Farabi Hospital, Department of Infectious Diseases and Clinical Microbiology, Trabzon, Turkey.

Geliş Tarihi (Received): 16.11.2012 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 25.01.2013

ÖZET

Dünya çapındaki HIV enfeksiyonlarının önemli ölçüde nedeni HIV-1 genotipinin M grubudur. M grubunun dokuz alt tipi ve 50 kadar tanımlanmış dolaşan rekombinant formu (CRF) bulunmaktadır. HIV-1 CRF, bireyleri enfekte eden en az iki farklı alt tipin rekombinasyonu ile ortaya çıkmaktadır. Bu raporda, ülkemizde ilk kez saptanan CRF08_BC kökeni ile enfekte bir HIV-1 pozitif olgu sunulmuştur. Ateş, iştahsızlık, kilo kaybı, 15 gündür devam eden ishal ve bilateral aksiler lenfadenit şikayetleriyle 2011 yılının başında hastaneye başvuran 48 yaşında erkek hastanın tetkiklerinde, anti-HIV pozitif, CD4⁺ T lenfosit sayısı 11/mm³ (%1.3) ve HIV-RNA yükü 129.000 kopya/ml olarak saptanmıştır. Mesleği gemici olan olgunun, uzakdoğu seferleri sırasında birçok ülkede çok sayıda ve korunmasız cinsel temasta bulunduğu öğrenilmiştir. CDC sınıflamasına göre klinik evresi C3 olarak tanımlanan hastaya antiretroviral tedavi verilmeden önce HIV-1 ilaç direnç analizi uygulanmış ve ilaç direnci saptanmayan hasta tenofovir/emtrisitabin + efavirenz tedavisine alınmıştır. Tedavinin 16. ayında, CD4⁺ T hücre sayısında düşme, HIV-RNA pozitifliği ve klinik durumun kötüleşmesi (herpes lezyonları ve akciğer tüberkülozu gelişimi) nedeniyle tedaviye yanıt-sızlık olduğu düşünülmüş efavirenz kesilerek tenofovir/emtrisitabin + lopinavir/ritonavir tedavisine geçilmiştir. Hastaya ayrıca klinik ve radyolojik bulgular ışığında dördü antitüberküloz tedavi başlanmıştır. Olgunun tedavi öncesi plazma örneğinden elde edilen HIV-1’in *pol* geni proteaz kangalı (kodon 1-99, 330 bp) *nested* PCR ile çoğaltılmış ve dizilenmiştir. Elde edilen HIV-1 dizisi, *neighbore-joining* yöntemiyle filogenetik olarak analiz edilmiş ve köken CRF08_BC olarak tanımlanmıştır (GenBank erişim numarası: JX536763.1). Bu CRF tipi, dünyada büyük oranda güneybatı Çin’de, damar içi ilaç bağımlılığı olanlarda

İletişim (Correspondence): Doç. Dr. Murat Sayan, Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, Merkez Laboratuvarı, PCR Ünitesi, Umuttepe Yerleşkesi 41380 Kocaeli, Türkiye. **Tel (Phone):** +90 262 303 8571, **E-posta (E-mail):** sayanmurat@hotmail.com

yaygın olarak saptanmaktadır. Bulgularımız, HIV-1 CRF08_BC kökeninin ülkemizde de bulunduğunu göstermiştir. Virusun ülkemize hangi yollardan girdiğini ve nasıl yayıldığını anlamak ve enfeksiyonları kontrol edebilmek için HIV-1 ile enfekte bireylerde daha fazla moleküler epidemiyolojik temelli çalışmaya gereksinim bulunmaktadır. Ayrıca HIV-1 CRF08_BC kökeninin ülkemizden de bildirilmesi global çaptaki moleküler epidemiyolojik izlemde önemli olabilir.

Anahtar sözcükler: HIV-1; pol geni; HIV proteaz; rekombinant alt tip; dizi analizi; moleküler epidemiyoloji.

ABSTRACT

A major proportion of the HIV infections worldwide is caused by group M of HIV-1 genotype and to date approximately nine subtypes and 50 circulating recombinant forms (CRFs) in the group M have been recognized. Recombinants between different HIV-1 group M subtypes are designated as CRF. The objective of this study was to present, for the first time, a HIV-1 positive case infected with CRF08_BC subtype in Turkey. In beginning of 2011, a sailor, 48-year-old male was admitted to hospital with fever, loss of appetite, weight loss, 15 days lasting diarrhea and bilateral axillary lymphadenitis. The laboratory tests yielded anti-HIV positivity, HIV-RNA positivity (129.000 copies/ml) and CD4⁺ T-cell count of 11 cells/mm³ (1.3%). He had a history of multiple unprotected sexual contacts during his journey to various far-east countries. His clinical level was defined as C3 according to CDC classification. Since drug resistance analysis done before the initiation of antiretroviral therapy indicated no antiretroviral resistance, tenofovir/emtricitabin + efavirenz therapy was initiated. In the 16th months of the therapy, decreasing CD4⁺ T-cell count, HIV-RNA positivity and worsening of clinical condition (development of herpes lesions and pulmonary tuberculosis) suggested an unresponsiveness to therapy, efavirenz was replaced with tenofovir/emtricitabin + lopinavir/ritonavir. The patient was also treated with quadruple anti-tuberculosis treatment based on the clinical and radiological findings of pulmonary tuberculosis. The protease domain (codon 1-99, 330 bp) of *pol* gene of HIV-1 strain obtained from pretreatment plasma sample, had been amplified by nested PCR and sequenced. This HIV-1 strain was then subtyped as CRF08_BC after phylogenetic analysis with neighbor-joining method (GenBank accession number: JX536763.1). In the world, HIV-1 CRF08_BC is substantially prevalent in southwestern China among injecting drug users. Our data suggested that the CRF08_BC subtype is also present in Turkey. Molecular epidemiologic studies are important tools for tracking transmission patterns, spread and for the control of the HIV infections in a given area. Therefore, HIV molecular research should be expanded in HIV-1 infected Turkish patients. The determination of subtype CRF08_BC of HIV-1 in Turkey may be contribute to global HIV surveillance systems.

Key words: HIV-1; *pol* gene; HIV protease; recombinant subtype; sequence analysis; molecular epidemiology.

GİRİŞ

İnsan immün yetmezlik virusu (HIV)'nin 1983 yılında tanımlanmasından sonra, 1990'lı yılların sonuna doğru HIV sınıflama sistemi, birçok yeni izolatin karakterize edilmesiyle kesinlik kazanmıştır¹. Günümüzde HIV, morfolojik ve biyolojik olarak birbirine benzeyen, ancak zarf glikoproteinleri ve diğer antijenik epitoplarda farklılık gösteren HIV-1 ve HIV-2 olmak üzere iki genotip içermektedir. HIV-1, M (main ya da major), N (new ya da non-M, non-O), O (outlier) ve P (alfabetik tanım) olmak üzere dört alt grupta tanımlanmaktadır. Dünya çapındaki enfeksiyonların %95'inden sorumlu tutulan HIV-1 M grubu dokuz alt tipe (A, B, C, D, F, G, H, J, K) ayrılmakta ve bunlardan A ve F'nin de alt-

alt tipleri (A1-A5 ve F1, F2) bulunmaktadır. Alt tiplerin yanında, HIV-1 grup M'nin altında "dolaşan rekombinant formlar (CRF)" ve "özgün rekombinant formlar (URF)" olmak üzere iki rekombinant form tipi yer alır². Önceleri HIV-1 alt tipi olarak tanımlanan E ve I, günümüzde CRF içinde sınıflandırılmaktadır. Her CRF, bir referans numarası ve rekombinasyonu oluşturan alt tiplerle tanımlanır. Rekombinasyon üç ya da daha fazla alt tip/CRF içeriyorsa "complex" anlamında "cpx" tanımlaması yapılmakta, ancak alt tip kompozisyonu ifade edilmemektedir. Sayısı sürekli değişmekle birlikte günümüzde tanımlanmış 50 CRF ve 30 kadar URF bulunmaktadır³.

Ülkemizde ilk HIV/AIDS olgusu 1985 yılında bildirilmiş, olgu sayısı günümüzde, Sağlık Bakanlığının Ekim 1985-Aralık 2011 HIV/AIDS surveyans verilerine göre 5224'e ulaşmıştır^{4,5}. Ancak dolaşımdaki HIV-1 alt tipleri konusunda bilgilerimiz henüz yeterli değildir. Ülkemizde HIV-1 alt tiplerinin analiz edildiği ilk çalışma, 2006 yılında İstanbul'da 27 olgu üzerinde yapılmış; herhangi bir CRF türü bulunmamakla birlikte alt tip B predominant olarak bulunmuş, B dışı alt tipler ise A, C, D ve F1 olarak bildirilmiştir⁶. Ülkemizde ilk HIV-1 CRF olgusu ise, hepatit B virusu (HBV) alt genotip D1 koenfeksiyonu bulunan CRF02_AG olgusu olarak rapor edilmiştir⁷. İstanbul'da 2009-2012 yılları arasında yaptığımız bir çalışmada, 57'si yeni tanı almış ve antiretroviral tedavi (ART) naif, 15'i çeşitli ART'ler altında takip edilen 72 HIV-1 pozitif hastada, HIV-1 ters transkriptaz (RT) bölgesinin direkt dizilemesine dayanan filogenetik analiz verilerine göre, en sık karşılaşılan (%50) HIV-1 tipinin CRF (sırasıyla CRF02_AG, CRF12_BF, CRF03_AB ve CRF01_AE) ve ardından alt tip B (%43) olduğu; alt-alt tip A1 (%4.2) ve F1'in (%2.8) de dolaşımda bulunduğu belirlenmiştir⁵. Yine 2009-2012 yılları arasında, HIV-1 ile enfekte 117 tedavi naif hastada primer ilaç direncini araştırdığımız bir çalışmamızda, alt tip B (%41) ve CRF'lerin (sırasıyla CRF 02_AG, CRF 01_AE, CRF 12_BF ve CRF 03_AB; %39.3) dolaşımdaki en yaygın HIV-1 tipleri olduğu ve az sayıda olguda da F1, G, C, D ve A1 alt tiplerinin bulunduğu saptanmıştır⁸. Bu raporda, ülkemizde ilk kez görülen CRF08_BC ile enfekte bir HIV-1 pozitif olgu sunulmaktadır.

OLGU SUNUMU

Yaklaşık 1.5 yıl önce ateş, iştahsızlık, kilo kaybı, süregen ishal ve koltuk altında bilateral lenfadenit ile hastaneye yatırılan 48 yaşındaki erkek hastanın tetkiklerinde; anti-HIV pozitif (375 S/Co; Architect HIV Ag/Ab Combo, Abbott Diagnostics, Almanya), HIV-RNA 129.000 kopya/ml (COBAS Ampliprep/Taqman 48 HIV-1, Roche Diagnostics, İsviçre) ve CD4⁺ T hücre sayısı 11/mm³ (%1.3) olarak bulundu. Hastanın beyaz küre sayısı: 3400/μL, Hb: 8.6 g/dl, Htc: %25.4, trombosit sayısı: 137.000/μL ve rutin biyokimyasal değerleri normal olup, anti-HBc ve anti-HBs pozitif, anti-HCV negatif, TORCH grubu tokzoplazma dışında geçirilmiş enfeksiyonla uyumlu idi. Mesleği gemici olan hastanın öyküsünden; 20 yıl önce diş tedavisi uygulandığı, cerrahi girişim geçirdiği, kan transfüzyonu yapıldığı, uzakdoğuya yaptığı seferler sırasında birçok ülkede çok sayıda ve korunmasız heteroseksüel cinsel temasta bulunduğu öğrenildi. Yapılan taramada hastanın eşi ve çocukları anti-HIV yönünden negatif bulundu. CDC (Centers for Disease Control and Prevention) sınıflamasına göre klinik evresi C3 olarak tanımlanan hastaya, ART başlama-

dan önce HIV-1 ilaç direnci analizi yapıldı ve nükleozid RT, nonnükleozid RT ve proteaz inhibitörleri (PI) grubu ilaçlara karşı direnç saptanmadı. Tenofovir/emtrisitabin + efavirenz kombinasyonu ile yüksek düzeyde aktif antiretroviral tedavi (HAART) başlandı. Profilaktik olarak trimetoprim/sülfametoksazol ve azitromisin verildi. Tedavinin 1. ve 16. ay kontrollerinde CD4⁺ T hücre sayısı sırasıyla 15/mm³ (%3) ve 9/mm³ (%1.4), HIV-RNA yükü 48.200 ve 61.900 kopya/ml olarak saptandı. Hasta, sağ çene ve dudakta şişlik şikayetleriyle tekrar hastaneye yatırıldı. Dudaktaki lezyonlar herpes enfeksiyonuyla uyumlu görülüp asiklovir tedavisi verildi. Tetkiklerinde, batin ultrasonografisinde hepatomegali ve toraks bilgisayarlı tomografisinde sağ akciğer üst zonda kaviter lezyon ve bilateral yaygın nodüller izlendi. Alınan ardışık balgam örneklerinde, aside dirençli boyama ve *Mycobacterium tuberculosis* PCR testleri negatif bulunmasına rağmen, klinik ve radyolojik bulguları akciğer tüberkülozu ile uyumlu olduğu için hastaya dördümlü antitüberküloz tedavi (izoniazid + rifabutin + etambutol + pirazinamid) başlandı. Hastada, tedavi altında CD4⁺ T hücre sayısında düşme, HIV-RNA pozitifliği ve klinik bulgulara kötüleşme nedeniyle HAART'ye yanıtızsızlık düşünüldü ve ilaç direnci analizinde PI direnci saptanmadığından efavirenz kesilerek tenofovir/emtrisitabin + lopinavir/ritonavir tedavisine geçildi.

Hastada HIV-1 enfeksiyonu tanısı, HAART ve tüberküloz tedavileri "European AIDS Clinical Society (EACS)" kılavuzuna göre yapıldı⁹. HIV-1 enfeksiyonunda klinik evreleme, CDC'nin önerilerine göre CD4⁺ T lenfosit sayısı esas alınarak yapıldı. Tedavi öncesi alınan EDTA'lı kan örneği hemen santrifüj edildi, plazma örneği alikotlandı ve çalışma gününe kadar -80°C'de saklandı. Hastada tekrarlı olarak pozitif saptanan anti-HIV-1/2 antikor sonuçları Western blot yöntemiyle (DIA PRO, HIV-1 LIA, Diagnostic Bioprobes Srl, İtalya) doğrulandı. Anti-HIV-1/2 antikor ve doğrulama testleri sırasında hastanın kimliği gizlendi ve örnek yeniden verilen kodla çalışıldı.

HIV-1 *pol* Geninin Dizilenmesi

HIV-1 *pol* geni (proteaz kangalı, kodon 1-99) dizilemesinde, The French ANRS (National Agency for AIDS Research) AC11 Direnç Grubu'nun PCR ve dizileme algoritmasından yararlanıldı (<http://www.hivfrenchresistance.org/ANRS-procedures.pdf>). Kullanılan dış primerler; 5'prot1: 5'-taatttttagggaagatctggccttc-3' ve 3'prot1: 5'-gcaaatctggagtattgtatggatttcagg-3' (653 bp), iç primerler; 5'prot2: 5'-tcagagcagaccagaccagccca-3' ve 3'prot2: 5'-atgcttttattactttcttctgtcaatg-3' (507 bp) şeklinde idi. 5'prot2 primeri aynı zamanda dizileme primeri olarak kullanıldı. HIV-1 cDNA sentezi M-MuLV RT enziminin kullanıldığı "First Strand cDNA Synthesis Kit" (Thermo Scientific Inc, Fermentas, Litvanya) ile gerçekleştirildi. PCR ürünleri, "DNA Engine Peltier" termal döngü platformunda (BioRad Laboratories, ABD), 95°C'de 10 dakika ön denatürasyon, 45 döngü 95°C'de 45 saniye, 55°C'de 45 saniye ve 72°C'de 45 saniye koşullarında elde edildi. Primerler, PCR için 0.2 µM, dizileme için 0.3 µM final konsantrasyonunda kullanıldı. Tüm PCR ürünleri "High Pure PCR Product Purification Kit" (Roche Diagnostics GmbH, Almanya) ile saflaştırıldı ve ürünler ABI PRISM 310 platformunda "DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit" (Amersham Pharmacia Biotech Inc., ABD) kullanılarak dizilindi. Direkt dizileme için kullanılan PCR protokolü; 35 döngü 95°C'de 20 saniye, 50°C'de

25 saniye ve finalde 60°C'de 2 dakika olarak gerçekleşti. Elektroferogramlar "Vector NTI v5.1" (InforMax, Invitrogen, ABD) programı aracılığıyla elde edildi.

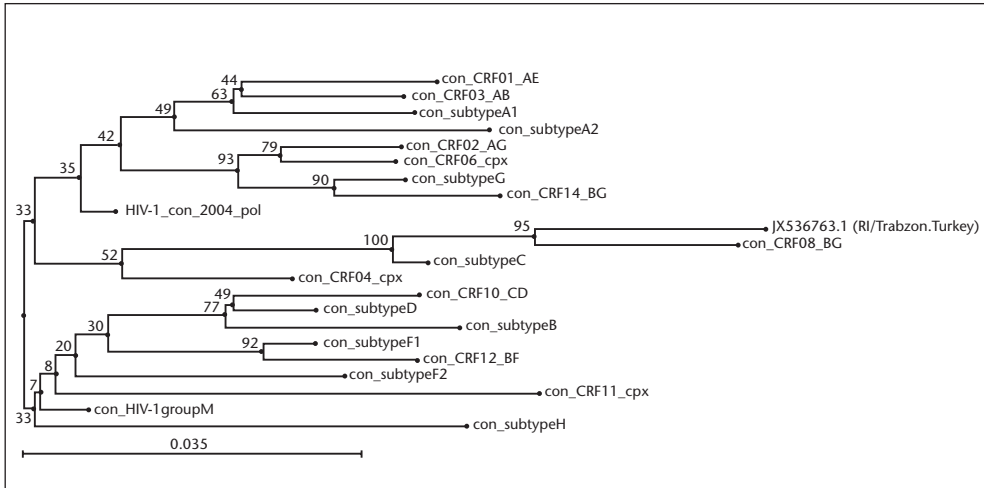
Filogenetik Analiz

HIV-1 alt tipi, *neighbor-joining* yöntemiyle filogenetik olarak analiz edildi. Filogenetik ağaç "CLC Sequence Viewer 6.7.1" (CLC bio A/S, Aarhus, Danimarka) programı kullanılarak oluşturuldu ve *bootstrap* değeri 100 olarak alındı (Şekil 1). Ağaç oluşturulurken kullanılan konsensus referans diziler "Los Alamos National Laboratory (LANL) HIV Databases"den sağlandı (<http://www.hiv.lanl.gov/cgi-bin/NEWALIGN/align.cgi>).

Filogenetik analiz sonucunda hastadan izole edilen HIV-1 suşu, CRF08_BC olarak tiplendirildi (Şekil 1). Ayrıca, HIV-1 CRF08_BC nükleotid dizisi GenBank'a yüklendi (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>) ve bir erişim numarası (JX536763.1) sağlandı.

TARTIŞMA

Ülkemizde HIV-1 CRF enfeksiyonları; Batı-Orta Afrika, Orta Doğu ve Kuzey Afrika kaynaklı CRF02_AG, Doğu Avrupa ve Orta Asya kaynaklı CRF03_AB, Güney Amerika kaynaklı CRF12_BF ve Güneydoğu Asya, Doğu Asya ve Orta Afrika kaynaklı CRF01_AE tipleriyle karşımıza çıkmaktadır⁵. Çalışmamız, ülkemizde, Güneybatı Çin'de görülen HIV-1 CRF08_BC kökeninin de bulunduğunu göstermiştir. Klinik etkileri tam olarak aydınlatılamamış olan CRF'ler, bir yandan HIV-1 alt tiplerini karmaşıktırırken, bir yandan da global ölçekte prevalansı artırmaktadır. 2000-2007 yılları arasında HIV-1 global epidemiyolojik izlem verilerine göre, dünyada CRF oranlarında artış, URF oranlarında ise azalma vardır³. Bildirimi yönünden ilk olmakla birlikte HIV-1 CRF08_BC kökeninin ülkemizde saptanması, son yıllarda CRF'lerde görülen dünya çapındaki artışın ülkemize yansımaları



Şekil 1. HIV-1 CRF08_BC suşunun filogenetik analizi [Filogenetik ağaç, HIV-1 pol geni proteaz kangalı (kodon 1-99, 330 bp) dizilenecek ve neighbor-joining yöntemi kullanılarak oluşturulmuştur].

olabilir. Öte yandan CRF08_BC, Güneybatı Çin'de yakın zamanda ortaya çıkmasına rağmen, uyuşturucu üretimi, trafiği ve kullanımı oldukça yüksek olan bölge karakterinden dolayı hızla yayılma özelliği gösterebilir ve bu nedenle global bir salgının potansiyel kaynağı olması yönüyle önem arzedebilir¹⁰.

Güneybatı Çin'de yaygın olarak bulunan CRF08_BC, ilk kez Güney Çin'deki Guangxi bölgesinde, 1997 yılında saptanmıştır¹¹. Hindistan kökenli HIV-1 alt tip C'nin alt tip B ile rekombinasyonu sonucunda oluşan CRF08_BC, Çin'de daha çok damar içi uyuşturucu kullananlarda saptanmakta, CRF07_BC ile birlikte yüksek değişkenlikte ve hızlı yayılma karakterinde HIV-1 suşları olarak tanımlanmaktadır¹⁰. Dünyada çok az sayıda Güneybatı Çin bölgesi dışında bildirilen HIV-1 CRF08_BC kökeni bulunmaktadır. HIV-1 *pol* ve *env* geni dizilerinin filogenetik analizine dayanan bu çalışmalarda, Tayvan'da beş, Slovakya ve İspanya'da birer CRF08_BC olgusu bildirilmiştir¹²⁻¹⁶. Çalışmamızda da HIV-1 CRF08_BC kökeni, filogenetik analiz yöntemiyle tanımlanmıştır.

HIV-1'in alt tiplendirmesi, altın standart yöntem olan filogenetik analiz yerine sıklıkla genotiplleme aracı programlarıyla (HIV-1 Subtyping Tool) yapılmaktadır^{17,18}. Bu programlar [Stanford, Rega, Geno2pheno, Los Alamos National Laboratories (LANL), Agence Nationale de Recherches sur le Sida (ANRS), National Center for Biotechnology Information (NCBI)] erişime açık olup, algoritma kuralları genellikle alt tip B'den in vivo ve in vitro olarak elde edilen verilerle işlemektedir¹⁷. HIV/AIDS İspanya Araştırma Ağı kohortu hastalarından izole edilen HIV-1 *pol* geni dizilerinin alt tiplendirmesinde, bilinen tüm genotiplleme programlarının güvenilirliği değerlendirilmiş ve B alt tipi için programların önemli ölçüde doğru tanımlama yaptığı, ancak B dışı alt tiplerin saptanmasında hata oranının %15 olduğu bildirilmiştir¹⁸. Ülkemizde ART-naif 117 hasta suşunun primer ilaç direncinin araştırıldığı çalışmada, filogenetik analiz verilerine göre Stanford alt tiplendirme algoritması, alt tip B dışı 13 HIV-1 kökenini %11 oranında hatalı tanımlamıştır⁸. Bunun nedeni, HIV-1 alt tiplendirme programlarının algoritmalarında, alt tip B dizilerinin referans olarak kullanılması olabilir. Dolayısıyla, bir HIV-1 CRF kökeni tanımlanırken, genotiplleme aracı programlarıyla birlikte mutlaka filogenetik analiz de yapılmalı ve doğrulanmalıdır.

HIV dizilerinin filogenetik analizi, virusun tanısı, patogenezi, bulaşı, klinik yönetimi ve aşı geliştirme çalışmalarında önem taşımaktadır. Bu nedenle moleküler epidemiyolojik sürveyans verilerine daha çok ihtiyaç bulunmaktadır³. Ancak ülkemizde moleküler epidemiyolojik çalışmalar az sayıdadır ve bu nedenle HIV-1 alt tipleri hakkındaki bilgilerimiz kısıtlıdır. HIV-1'in ülkemize hangi yollardan girdiğini ve nasıl yayıldığını anlamak ve enfeksiyonları kontrol edebilmek için HIV-1 ile enfekte bireylerde daha fazla moleküler epidemiyolojik temelli çalışmaya gereksinim vardır. Ayrıca HIV-1 CRF08_BC kökeninin ülkemizden de bildirilmesi, global çaptaki moleküler epidemiyolojik izlemde önemli olabilir.

KAYNAKLAR

1. Eberle J, Gürtler L. HIV types, groups, subtypes and recombinant forms: errors in replication, selection pressure and quasispecies. *Intervirology* 2012; 55(2): 79-83.
2. Delviks-Frankenberry K, Galli A, Nikolaitchik O, Mens H, Pathak VK, Hu WS. Mechanisms and factors that influence high frequency retroviral recombination. *Viruses* 2011; 3(9): 1650-80.
3. Hemelaar J. The origin and diversity of the HIV-1 pandemic. *Trends Mol Med* 2011; 25(5): 679-89.
4. Alp E, Bozkurt I, Doğanay M. Epidemiological and clinical characteristics of HIV/AIDS patients followed-up in Cappadocia region: 18 years experience. *Mikrobiyol Bul* 2011; 45(1): 125-36
5. Sayan M, Kumbasar Karaosmanoğlu H, Mete B, et al. Molecular epidemiological analysis of HIV-1 *pol* gene sequences isolated in Istanbul, Turkey. *Mikrobiyol Bul* 2013; 47(1): 87-97.
6. Yilmaz G, Midilli K, Turkoglu S, et al. Genetic subtypes of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) in Istanbul, Turkey. *Int J Infect Dis* 2006; 10(4): 286-90.
7. Akhan S, Sayan M. HIV and acute HBV infection: First case report from Kocaeli, Turkey. 22nd Conference of the Asian Pacific Association for the Study of the Liver (APASL), 16-19 February 2012, Taipei, Taiwan.
8. Sayan M, Willke A, Özgüneş N, Sargın F. Türkiye'de HIV-1 ile enfekte antiretroviral naif hastalarda HIV-1 sub-tip dağılımı ve primer ilaç direnci mutasyonları. Klinik HIV/AIDS Sempozyumu 2012, 23-25 Kasım 2012, Kapadokya, Türkiye.
9. European AIDS Clinical Society (EACS) Guidelines, Version 6 - October 2011. www.europeanaidsclinicalsociety.org.
10. Tee KK, Pybus OG, Li XJ, et al. Temporal and spatial dynamics of human immunodeficiency virus type 1 circulating recombinant forms 08_BC and 07_BC in Asia. *J Virol* 2008; 82(18): 9206-15.
11. Piyasirisilp S, McCutchan FE, Carr JK, et al. A recent outbreak of human immunodeficiency virus type 1 infection in southern China was initiated by two highly homogeneous, geographically separated strains, circulating recombinant form AE and a novel BC recombinant. *J Virol* 2000; 74(23): 11286-95.
12. Habekova M, Takacova M, Lysy J, et al. Genetic subtypes of HIV type 1 circulating in Slovakia. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2010; 26(10): 1103-7.
13. Lan YC, Elbeik T, Dileanis J, et al. Molecular epidemiology of HIV-1 subtypes and drug resistant strains in Taiwan. *J Med Virol* 2008; 80(2): 183-91.
14. Chen JH, Wong KH, Chan K, et al. Evaluation of an in-house genotyping resistance test for HIV-1 drug resistance interpretation and genotyping. *J Clin Virol* 2007; 39(2): 125-31.
15. Kao CF, Chang SY, Hsia KT, et al. Surveillance of HIV type 1 recent infection and molecular epidemiology among different risk behaviors between 2007 and 2009 after the HIV type 1 CRF07_BC outbreak in Taiwan. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2011; 27(7): 745-9.
16. de Mulder M, Yebra G, Martin L, et al; Madrid cohort of HIV-infected children. Drug resistance prevalence and HIV-1 variant characterization in the naïve and pretreated HIV-1-infected paediatric population in Madrid, Spain. *J Antimicrob Chemother* 2011; 66(10): 2362-71.
17. Liu TF, Shafer RW. Web resources for HIV type 1 genotypic-resistance test interpretation. *Clin Infect Dis* 2006; 42(11): 1608-18.
18. Yebra G, de Mulder M, Martin L, et al; Cohort of Spanish AIDS Research Network (CoRIS). Sensitivity of seven HIV subtyping tools differs among subtypes/recombinants in the Spanish cohort of naïve HIV-infected patients (CoRIS). *Antiviral Res* 2011; 89(1): 19-25.