

Ege Bölgesi'nde İzole Edilen HIV-1 İzolatlarının Altıtip Dağılımının *pol* Gen Bölgesi Filogenetik Analizi ve Otomatize Araçlar Kullanılarak Belirlenmesi*

HIV-1 Subtype Distribution Determined by Phylogenetic Analysis of *pol* Gene Sequences and Automated Subtyping Tools among HIV-1 Isolates from the Aegean Region of Turkey

Servet ULUER BİÇEROĞLU¹, İmre ALTUĞLU², Arzu NAZLI ZEKA³, Deniz GÖKENGİN³, Rüçhan YAZAN SERTÖZ²

¹ Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kan Merkezi, İzmir.

¹ Ege University Faculty of Medicine, Blood Center, İzmir, Turkey.

² Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir.

² Ege University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, İzmir, Turkey.

³ Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir.

³ Ege University Faculty of Medicine, Department of Infectious Diseases and Clinical Microbiology, İzmir, Turkey.

* Bu çalışma, 2. Ulusal Klinik Mikrobiyoloji Kongresi (9-13 Kasım 2013, Belek, Antalya)'nde poster olarak sunulmuştur.

Geliş Tarihi (Received): 25.02.2014 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 19.05.2014

ÖZET

Yüksek genetik değişkenlik gösteren insan immün yetmezlik virusu (HIV)'nin, HIV-1 (grup M, N, O ve P) ve HIV-2 (grup A-H) olmak üzere iki genotipi bulunmaktadır. HIV-1 grup M, dünyadaki enfeksiyonların önemli bir bölümünden sorumludur ve dokuz altıtip, 45'ten fazla dolaşan rekombinant form (CRF) ve çok sayıda özgün rekombinant formlardan (URF) oluşmaktadır. Türkiye'de, Haziran 2013 tarihine kadar, Sağlık Bakanlığı verilerine göre 1096'sı AIDS'li olmak üzere toplam 6802 HIV pozitif olgu bildirilmiştir. Ülkemizde altıtip B dominant olarak görülse de, son yıllarda yapılan yayınlarda tüm dünya ile paralel olarak artan oranda CRF'ler bildirilmektedir. Bu çalışmada, kurumumuza Nisan 2008-Haziran 2013 tarihleri arasında başvuran 70 hastadan (61 erkek, 9 kadın; yaş aralığı: 16-73 yıl, yaş ortalaması: 39.6 yıl) izole edilen HIV-1 izolatlarının altıtip dağılımlarının belirlenmesi amaçlanmıştır. Altıtiplendirme için, *pol* gen bölgelerinin filogenetik analizi ile birlikte Stanford HIVdb v6.2.0 ve Rega v3.0 otomatize araçları kullanılmıştır. Los Alamos Ulusal Laboratuvarı HIV-1 2010 referans dizi seti ve Gen Bankasından elde edilen kökenlerin tüm genomlarından, *pol* gen bölgelerinin 1302 baz çiftlik bölümü kesilerek kullanılmış; filogenetik analiz

İletişim (Correspondence): Uzm. Dr. Servet Uluer Biçeroğlu, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kan Merkezi, Bornova, İzmir, Türkiye. **Tel (Phone):** +90 232 390 4762, **E-posta (E-mail):** servetuluer@hotmail.com

Mega v5.2 programı ile yapılmıştır. Diziler Muscle seçeneği kullanılarak hizalanmış ve Kimura-2 parametre yöntemi (transisyon/transversiyon oranı: 2.0) ile genetik uzaklıklar belirlenmiştir. Filogenetik ağaç *neighbor-joining* yöntemi kullanılarak oluşturulmuş ve *bootstrap* değeri 1000 olarak alınmıştır. Hastaların 61 (%87.1)'i daha önce antiretroviral tedavi (ART) kullanmamış olup, dokuz hasta farklı tedaviler ile izlenmektedir. Filogenetik analiz sonuçlarına göre kökenlerin alttip dağılımı; 31 (%44.2) alttip B, 24 (%34.2) CRF42_BF, 6 (%8.5) B/CRF02_AG rekombinantı, 5 (%7.1) alt-alttip A1, 1 (%1.4) alt-alttip F1, 1 (%1.4) CRF25_cpx, 1 (%1.4) CRF02_AG ve 1 (%1.4) CRF01_AE olarak belirlenmiştir. Rega v3.0 programı sonuçları incelendiğinde; dördü B/CRF02_AG rekombinantı ve biri de CRF42_BF olmak üzere toplam beş izolatta filogenetik analiz ile uyumsuz sonuç görülmüştür. Stanford HIVdb v6.2.0 programında ise sekiz köken (3 CRF42_BF, 2 alttip B, 2 alt-alttip A1, 1 CRF25_cpx) filogeni ile uyumsuz olarak değerlendirilmiştir. Tüm B/CRF02_AG rekombinantları Stanford HIVdb v6.2.0 ile tanımlanabilmiştir. Fransa'da daha çok homoseksüel erkeklerde rastlanan ve ülkemizden ilk kez bildirilen B/CRF02_AG rekombinantları, çalışmamızda beşi erkek (2 homoseksüel, 2 biseksüel, 1 heteroseksüel) ve biri heteroseksüel kadın olmak üzere toplam altı hastadan izole edilmiştir. CRF42_BF suşu da Türkiye'den daha önce bildirilmemiştir ve komşu ülkelerde de yaygın olarak bulunmamaktadır. Bu nedenle çalışmamızda CRF42_BF olarak tanımlanan izolatların tüm genom analizlerinin yapılması faydalı olacaktır. Çalışmamızın sonuçları, ülkemizde son yıllarda CRF oranında artış olduğunu bildiren diğer çalışmaları desteklemektedir. Türkiye'nin coğrafi konumu düşünülecek olursa bu beklenen bir durumdur; ancak ülkemizdeki HIV-1 alttip dağılımı ile ilgili daha fazla veriye gereksinim olduğu açıktır.

Anahtar sözcükler: HIV-1; alttip; filogenetik analiz; Ege bölgesi.

ABSTRACT

Human immunodeficiency virus (HIV) exhibiting remarkable genetic variability, includes two genotypes namely HIV-1 (group M, N, O and P) and HIV-2 (group A-H). HIV-1 group M, which is mainly the cause of the AIDS pandemic, is divided into nine pure subtypes, more than 45 circulating recombinant forms (CRF) and numerous unique recombinant forms (URF). According to the documents of Turkish Government of Health, among a total of 6802 HIV-positive cases, 1096 of them were defined as AIDS as of June 2013 in Turkey. Although subtype B is the predominant subtype, recent studies indicate higher proportion of CRFs similar to their increasing role in the HIV pandemic. The aim of this study was to determine the subtype distribution of HIV-1 strains isolated from 70 patients (61 male, 9 female; age range: 16-73 yrs, mean age: 39.6 yrs) who presented to our institution between April 2008-June 2013. HIV-1 strains were subtyped by phylogenetic analysis of the *pol* gene region and commonly used automated subtyping tools namely, Stanford HIV db v6.2.0 and Rega v3.0. *Pol* sequences retrieved from the Los Alamos database and from GeneBank, were trimmed from full-length genomes. Phylogenetic analysis of the 1302 base pair of the *pol* gene region was performed using Mega v5.2 software. The sequences were aligned using Muscle and phylogenetic distances between sequences were estimated by using Kimura two-parameter model (transition/transversion ratio: 2.0). Tree topology was obtained using neighbour-joining method and bootstrap value was set at 1000. Sixty-one (87.1%) patients were antiretroviral treatment (ART)-naïve and nine were on different ART regimens. The subtypes of the isolates according to phylogenetic analysis were found as follows; 31 (44.2%) subtype B, 24 (34.2%) CRF42_BF, 6 (8.5%) B/CRF02_AG recombinants, 5 (7.1%) sub-subtype A1, 1 (1.4%) sub-subtype F1, 1 (%1.4) CRF 25_cpx, 1 (1.4%) CRF02_AG and 1 (1.4%) CRF01_AE. Rega v3.0 subtyping tool produced five discrepant results (4 B/CRF02-AG and 1 CRF42_BF) compared to phylogenetic analysis. Stanford HIVdb v6.2.0 had eight results (3 CRF42_BF, 2 subtype B, 2 sub-subtype A1, 1 CRF25_cpx) that were not concordant with phylogenetic analysis. Stanford HIVdb v6.2.0 was able to subtype all B/CRF02_AG recombinant strains. B/CRF02_AG recombinants which were seen among homosexual men in France were for the first time isolated in Turkey from five men (2 homosexual, 2 bisexual, 1 heterosexual) and one heterosexual woman. CRF42_BF had not been found in Turkey previously and it has not been a common type isolated in neighboring countries either. Full genome sequencing could be helpful to

further analysis of those isolates. Our results support the latest studies from Turkey reporting increase in the proportion of CRF-related infections. This is not an unusual finding when geographical location of Turkey is considered. Nevertheless, more comprehensive data regarding molecular epidemiology and subtype distribution of HIV-1 isolates in Turkey are needed.

Key words: HIV-1; subtype; phylogenetic analysis; Turkey.

GİRİŞ

İnsan immün yetmezlik virusu (HIV), yüksek genetik değişkenlik özelliği ile tüm dünyada yaygın olarak bulunan bir RNA virusudur. HIV'in yüksek replikasyon hızı ve düzeltme mekanizması olmayan ters transkriptaz (reverse transcriptase; RT) enziminin mutasyon ve rekombinasyon sıklığının fazla oluşu, konağın immün sisteminin pozitif seleksiyonu ile birlikte hem konak içinde hem de konaklar arasında değişken HIV popülasyonlarının oluşumuna neden olmaktadır^{1,2}. HIV'in HIV-1 (grup M, N, O ve P) ve HIV-2 (grup A-H) olmak üzere iki genotipi bulunmaktadır. HIV-1 grup M, dünyada HIV pandemisinin sorumludur ve A-D, F-H, J ve K olmak üzere dokuz altıtipi mevcuttur. HIV kökenleri arasında rekombinasyon sıklıkla görülen bir durumdur. Rekombinasyon hem farklı HIV grupları arasında hem de grup M alttıpleri arasında görülebilir^{3,4}. HIV-1 grup M alttıpleri arasındaki rekombinasyon sonucunda CRF (Circulating Recombinant Form) ve URF (Unique Recombinant Form) formları oluşur. Tam genom dizisi yapılmış rekombinant formlar, epidemiyolojik olarak birbirleriyle ilişkisi olmayan üç ya da daha fazla kişide saptanırsa CRF, diğerleri URF olarak isimlendirilir⁵. Yaygın olarak görülen rekombinant HIV formları dünyadaki HIV-1 enfeksiyonlarının en az %20'sinden sorumludur⁶.

HIV'in genetik çeşitliliği, enfeksiyonun yayılımı, patogenezi, tanısı ve viral yükün saptanması, antiviral tedaviye yanıt, direnç gelişimi ve aşı çalışmalarını etkileyen önemli bir özelliktir⁷. HIV-1 altıtip farklılıkları, kombinasyon tedavilerine yanıtı değiştirmese de alttıpler arasındaki değişkenlikler ilaç direnci gelişmesini ve antiretroviral tedavi (ART) duyarlılığını etkileyebilir⁸. Örneğin, D altıtipi ile oluşan enfeksiyonların A alttipine oranla daha hızlı klinik ilerleme ve ölüme sebep olduğu ve daha düşük CD4 değerleri ile seyrettiği bildirilmiştir⁹⁻¹¹. Dünyada en sık C altıtipi (%48) bildirilirken; Batı ve Orta Avrupa'da altıtip B (%85) en sık görülmektedir⁶. Avrupa ülkelerinde HIV-1 moleküler epidemiyolojisinin oldukça heterojen olduğu, cinsiyet ve risk grubuna göre farklılıklar gösterdiği ve göçmenlerdeki enfeksiyonlar incelendiğinde alttıplerin kendi ülkelerindekiler ile benzerlik gösterdiği bildirilmiştir¹². Ülkemizde ise, Haziran 2013 tarihine kadar Sağlık Bakanlığı verilerine göre 1096'sı AIDS'li olmak üzere toplam 6802 HIV pozitif olgu bildirilmiş; en sık görülen bulaş yolunun heteroseksüel ilişki olduğu belirtilmiştir¹³.

Bu çalışmanın amacı, kurumumuza Nisan 2008-Haziran 2013 tarihleri arasında başvuran, büyük çoğunluğu Ege Bölgesi'nde yaşayan, HIV-1 ile enfekte kişilerden rutin olarak istenen HIV direnç analizi sonucunda elde edilen dizilerin retrospektif olarak değerlendirilmesidir. Bu amaçla altın standart kabul edilen filogenetik analiz⁵ ile birlikte internet üzerinden açık erişimli yazılımlar olan otomatize alttıpleme araçları kullanılarak HIV-1 alttıplerinin belirlenmesi ve otomatize sistemlerin filogenetik analiz ile karşılaştırılması hedeflenmiştir.

GEREÇ ve YÖNTEM

Örnek Grubu

Çalışmaya, HIV-1 ile enfekte 70 hastadan elde edilen diziler dahil edildi. Hastaların 61'i daha önce ART kullanmamış, dokuzu ise daha önce farklı tedaviler almıştı. İki hasta tedaviye düzensiz olarak devam etmekteydi.

HIV *pol* Gen Bölgesinin Dizilenmesi ve Filogenetik Analizi

Hasta örneklerinden viral RNA ekstraksiyonu ve amplifikasyonundan sonra elde edilen ürünlerin dizileri, Viroseq HIV-1 genotiplleme sistemi (Abbott, ABD) ile yedi çakışan primer kullanılarak ABI3130 cihazında (Applied Biosystems, ABD) belirlendi¹⁴. Diziler iki ayrı kişi tarafından farklı zamanlarda kontrol edildi. Filogenetik analiz daha önce önerildiği gibi yapıldı¹⁵. Dizilerin hizalanması, genetik uzaklıkların belirlenmesi ve filogenetik ağaç oluşturulması için Mega v5.2 (<http://www.megasoftware.net/>) programı kullanıldı¹⁶. Diziler programda Muscle seçeneği kullanılarak hizalandı ve Kimura-2 parametre (transisyon/transversiyon oranı: 2.0) yöntemiyle genetik uzaklıklar belirlendi. Filogenetik ağaç *neighbor-joining* yöntemi kullanılarak oluşturuldu ve *bootstrap* değeri 1000 olarak alındı.

Referans Diziler

Filogenetik analiz için Los Alamos Ulusal Laboratuvarı HIV-1 2010 referans dizi seti (<http://www.hiv.lanl.gov/>) ve Gen Bankasından (www.ncbi.nlm.nih.gov) elde edilen diziler kullanıldı. Referans kökenlerin tam genomlarından *pol* gen bölgesinin 1302 baz çiftlik (bp) kısmı kesilerek filogenetik analiz için kullanıldı. HIV-1 Grup M (A-D ve F-K) alttipleri ve 49 CRF içeren toplam 160 diziden oluşan Los Alamos HIV-1 2010 referans dizi setinden alttip B ve A'nın tüm referans dizileri kullanıldı; diğer alttiplerden ikişer tane, CRF'lerden ise birer tane referans dizisi seçilerek filogenetik ağaç oluşturuldu¹⁶. Kökenlerimizle ilişkili bulunmayan bazı diziler filogenetik ağacın anlaşılabilirliği açısından çıkarıldı. EF589044 (alt-alttip A1) ve JN882655 (B/CRF02_AG) referans kökenleri de Gen Bankasından elde edildi.

Otomatize Altipleme Araçları

HIV-1 dizilerinin alttip analizi için Rega v3.0¹⁷ (<http://bioafrica.mrc.ac.za:8080/regagenotype-3.0.2/hiv/typingtool#/>) ve Stanford HIVdb v6.2.0¹⁸ (<http://hivdb.stanford.edu/>) otomatize HIV-1 subtipleme araçları kullanıldı ve sonuçlar filogenetik analiz ile karşılaştırıldı.

BULGULAR

Çalışmaya alınan hastaların 61 (%87.1)'i erkek, 9 (%12.9)'u kadın olup, yaşları 16-73 (yaş ortalaması: 39.6) yıl arasında değişmektedir. Hastaların 67 (%95.7)'sinin Ege Bölgesi'ndeki illerde (İzmir, Aydın, Muğla, Manisa, Balıkesir), birinin İstanbul, birinin Diyarbakır ve birinin de Azerbaycan'da ikamet ettiği belirlenmiştir. Bulaş yolunun; hastaların 28'inde heteroseksüel, 14'ünde homoseksüel, 7'sinde ise biseksüel ilişki olduğu öğrenilmiştir. Bir hasta, yurt dışında yaptırdığı çok sayıda dövme sonucunda HIV-1 ile

enfekte olduğunu ifade etmiş; diğer 20 hastanın ise olası bulaş yolu hakkında sağlıklı bilgiye ulaşamamıştır.

Filogenetik analiz sonuçlarına göre izole edilen kökenlerin altıtip dağılımı; 31 (%44.2) altıtip B, 24 (%34.2) CRF42_BF, 6 (%8.5) B/CRF02_AG rekombinanı, 5 (%7.1) alt-altıtip A1, 1 (%1.4) alt-altıtip F1, 1(%1,4) CRF25_cpx, 1 (%1.4) CRF02_AG ve 1 (%1.4) CRF01_AE şeklinde bulunmuştur. Buna göre hastalarda saptanan basın tiplerin altıtip B ve CFR_42BF olduğu izlenmiştir. ART alan 9 hastanın 8'i altıtip B, biri altıtip F olarak tanımlanmış; tedaviye düzensiz devam eden 2 hastada da altıtip B saptanmıştır. Çalışmaya alınan tüm izolatların filogenetik analiz sonuçları Şekil 1'de görülmektedir.

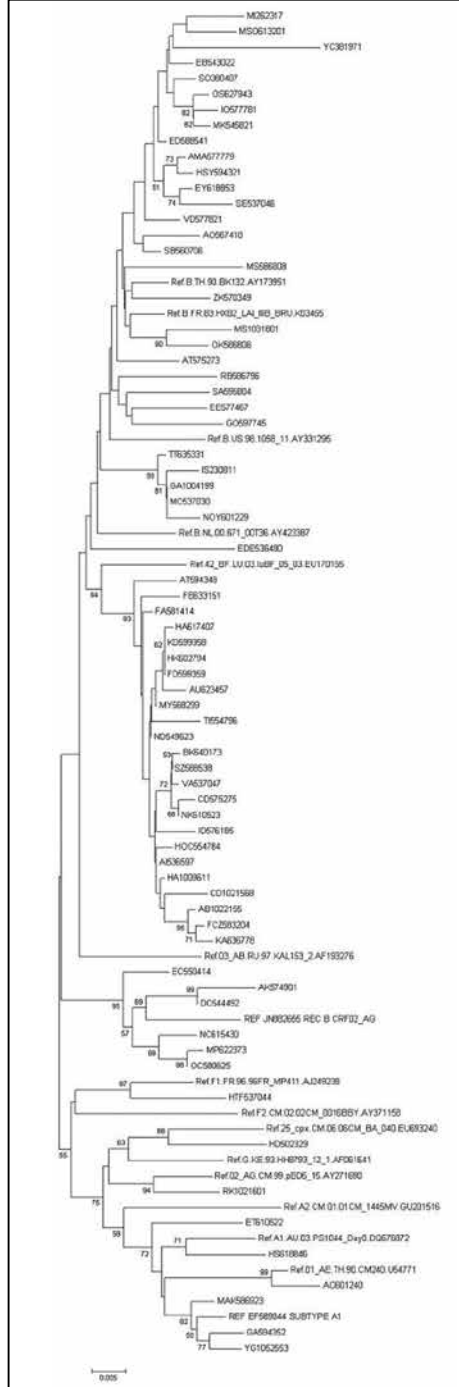
Filogenetik analiz ile elde edilen altıtiplendirme sonuçlarının, Rega v3.0 ve Stanford HIV db v.6.2.0 programları ile elde edilen sonuçlarla karşılaştırması Tablo I'de verilmiştir. Rega programı, tümü rekombinant kökenlerde olmak üzere 5 örnekte (4 B/CRF02_AG ve 1 CRF42_BF) filogenetik analiz ile uygunsuz sonuç verirken, Stanford programı 8 örnekte (3 CRF42_BF, 2 altıtip B, 2 alt-altıtip A1, 1 CRF25_cpx) filogeni ile uyumsuz olarak değerlendirilmiştir (Tablo I).

TARTIŞMA

Türkiye'de HIV-1 altıtiplerinin araştırılmasına yönelik ilk çalışma, 2006 yılında Yılmaz ve arkadaşları¹⁹ tarafından *env* geni gp41 bölgesi analiz edilerek yapılmış ve baskın olarak altıtip B (%70.4) bulunmuştur. Sayan ve arkadaşlarının²⁰ çalışmasında, 57'si daha önce

Tablo I. Filogenetik Analiz ile Elde Edilen HIV-1 Altıtiplendirme Sonuçlarının Rega ve Stanford Programları ile Karşılaştırılması

Filogenetik analiz (n)	Rega v3.0 (n)	Stanford HIV db v.6.2.0 (n)
Altıtip B (31)	Altıtip B (29) B-benzeri (2)	Altıtip B (29) <i>Rec K/B (1)</i> <i>Rec D/B (1)</i>
CRF42_BF (24)	<i>Rec B, F1 (23)</i> <i>Rec B, F1, D (1)</i> <i>Rec G, A1, B (2)</i>	<i>Rec B, F (21)</i> <i>Altıtip B (3)</i>
B/CRF02_AG rekombinant (6)	<i>Altıtip B (pot rec) (2)</i> <i>Rec B, G (1)</i> <i>Altıtip G (pot rec) (1)</i>	<i>Rec B, CRF02_AG (6)</i>
Altıtip A1 (5)	Altıtip A1 (5)	Altıtip A1 (3) CRF01_AE (1) <i>Rec A, CRF01_AE (1)</i>
Altıtip F1 (1)	Altıtip F1 (1)	Altıtip F1 (1)
CRF02_AG (1)	CRF02_AG (1)	CRF02_AG (1)
CRF01_AE (1)	CRF01_AE (1)	CRF01_AE (1)
CRF25_cpx (1)	CRF25_cpx (1)	Altıtip G (1)
* Filogenetik analiz ile uyumsuz sonuçlar italik olarak belirtilmiştir. Rec: Rekombinant; Pot rec: Potansiyel rekombinant.		



[Filogenetik ağaç Mega v5.2 programında Neighbour-joining yöntemi ile Los Alamos Ulusal Laboratuvarı HIV-1 2010 referans dizisi kullanılarak oluşturulmuştur. Bootstrap değeri 1000 olarak alınmış ve %50'nin altındaki değerler ağaçta gösterilmemiştir. Referans kökenleri Ref/alttip ya da CRF ismi/ menşei/yıl/hasta bilgileri/GenBankası kayıt numarası şeklinde tanımlanmıştır. EF589044 (alt-alttip A1) ve JN882655 (Rec B/CRF02_AG) referans kökenleri GenBankasından elde edilmiştir].

Şekil 1. HIV-1 kökenlerinin pol gen bölgelerine göre filogenetik analizi.

ART kullanmamış toplam 72 HIV-1 pozitif hastada *pol* gen dizileri analiz edilmiş ve en sık CRF'ler (%50) saptanırken, bunu altıtip B (%43), alt-altıtip A1 ve alt-altıtip F1'in izlediği bildirilmiştir. Daha önce ART kullanmamış 117 hastada *pol* gen dizilerinin analiz edildiği bir başka çalışmada da, benzer şekilde CFR'ler (%47) ve altıtip B (%33) en sık karşılaşılan altıtipler olarak rapor edilmiştir²¹. Alpsar ve arkadaşları²² HIV ile enfekte 20 homoseksüel erkekten izole edilen kökenleri kapsayan çalışmalarında, en sık altıtip B (%50) varlığı saptamışlardır. Almanya'da 127 Türk göçmen arasında yapılan başka bir araştırmada, altıtip B (%82.9) yine en sık rastlanılan tip olmuş, CRF02_AG, altıtip C ve altıtip G saptanan diğer altıtipler olarak bildirilmiştir²³.

Ülkemize ait ilk HIV-1 altıtiplendirme çalışmasında¹⁹ altıtip B baskın olarak bulunurken, son yıllarda yapılan araştırmalarda²⁰⁻²² altıtip B ile birlikte CRF'ler de artan oranda görülmektedir. Çalışmamızda izole edilen 70 HIV-1 kökeninin %44.2'si altıtip B, %7.1'i alt-altıtip A1, %1.4'ü alt-altıtip F1 olarak tanımlanırken, izolatların %47.1'inin rekombinant kökenler (24 CRF42_BF; 6 B/CRF02_AG; 1 CRF25_cpx; 1 CRF02_AG ve 1 CRF01_AE) olduğu görülmüştür. Sonuçlarımız, Sayan ve arkadaşları^{20,21} ile Alpsar ve arkadaşlarının²² verileri ile bu anlamda paralellik göstermektedir.

Filogenetik analiz HIV-1 altıtiplerinin belirlenmesinde altın standart olarak kabul edilse de, uygulama kolaylığı, internet ortamında kolay erişilebilirlik özelliği ve bilgi ve deneyim gerektirmemesi gibi özellikleri nedeniyle otomatize altıtipleme araçları pratikte tercih edilmektedir. Bu araçlar kullandıkları yöntem açısından benzerlik temelli, istatistik temelli ve filogenetik temelli olmak üzere sınıflandırılır²⁴. Yaygın olarak kullanılan araçlardan Stanford benzerlik, Rega ise filogenetik temellidir. Kullanım kolaylıklarına rağmen, filogenetik analiz ile karşılaştırıldıklarında otomatize sistemlerin, özellikle CRF'ler olmak üzere B dışındaki altıtiplerin analizindeki performansları kısıtlıdır^{24,25}. Toplumda B dışı altıtiplerin prevalansı arttığında otomatize yöntemlerin duyarlılıklarında azalma olduğu bildirilmiştir²⁵. Çalışmamızda 70 HIV-1 dizisinin Stanford HIVdb v.6.2.0 ve Rega v.3.0 sonuçlarının filogenetik analiz ile karşılaştırılmasında, Stanford sekiz, Rega ise beş HIV-1 kökeninde uyumsuz sonuç sergilemiştir. Sonuçlar genel olarak değerlendirildiğinde, her iki sistemin de altıtip B (Stanford: 29/31, Rega: 29/31), alt-altıtip F1 (Stanford: 1/1, Rega: 1/1), CRF02_AG (Stanford: 1/1, Rega: 1/1) ve CRF01_AE (Stanford: 1/1, Rega: 1/1) tanımlamalarında benzer performans gösterdiği görülmüştür. Rega'nın alt-altıtip A1 (5/5) tanımlamasında Stanford'a (3/5) kıyasla; B/CRF02_AG tanımlamalarında ise Stanford'un (6/6) Rega'ya (2/6) kıyasla daha başarılı olduğu saptanmıştır. Filogenetik analiz ile CRF42_BF olarak tanımlanan 24 köken ise otomatize araçlar ile genellikle B/ F1 rekombinantı olarak tanımlanmış (Stanford: 21/24, Rega: 23/24), ancak herhangi bir CRF olarak isimlendirilmemiştir. HIV-1 altıtiplerinin belirlenmesi için kullanılan algoritmaların B dışı altıtiplerde performanslarının düşük olduğu ve özellikle CRF tanımlamalarında filogenetik analiz sonuçları ile uyumsuzluklar olabildiği bilinmektedir^{24,25}.

Los Alamos referans setindeki diziler ile ilişkili bulunamayan altı köken Gen Bankasında araştırıldığında, bunların Fransa'da 2011 yılında izole edilen ve altıtip B ile CRF02_AG rekombinantı olarak tanımlanan JN882655 dizisi ile benzerlik gösterdiği belirlenmiştir²⁶. Bu dizi, referans olarak filogenetik analize eklendiğinde altı köken de JN882655 dizisi ile

gruplanmış ve B/CRF02_AG rekombinantı olarak tanımlanmıştır. Bu izolatlar ülkemizden bildirilen ilk alttip B ve CRF02_AG rekombinant kökenleridir. Fransa'da dolaşan bu rekombinant kökenlerin daha ziyade homoseksüel erkeklerde görüldüğü bildirilmiştir²⁶. Çalışmamızdaki kökenler ise iki homoseksüel, iki biseksüel ve bir heteroseksüel olmak üzere beş erkek ve bir heteroseksüel kadından izole edilmiştir.

CRF42_BF Lüksemburg'da rastlanan alttip B ve alt-alttip F1 rekombinantıdır⁷. Ülkemizde daha önce bildirilmemiş olup, komşu ülkelerde de yaygın olarak bulunmamaktadır. Filogenetik analiz ile CRF42_BF olarak belirlenen, ancak Stanford ve Rega programları ile alttip B ve alt-alttip F1 rekombinantı olarak sonuç veren kökenlerin tanımlanmasında, filogenetik analiz sonucu dikkate alınmıştır. Bu HIV-1 izolatlarının tüm genom analizlerinin yapılması, moleküler epidemiyolojik veriler açısından faydalı olacaktır.

CRF25_cpx de, ülkemizde ve komşularımızda sıklıkla rastlanmayan CRF'ler arasındadır. CRF25_cpx izole edilen hastanın öyküsü incelendiğinde, bir süre Afrika'da yaşadığı ve bulaş yolunun da Afrika'da heteroseksüel korunmasız ilişki olabileceği anlaşılmıştır.

Çalışmamızın sonuçları, ülkemizde görülen HIV-1 çeşitliliğinin artmakta olduğunu desteklemektedir. Türkiye'nin coğrafi konumu düşünülecek olursa, bu beklenen bir durumdur. Etkin bir HIV-1 surveians sistemimiz bulunmamaktadır ve HIV-1 alttip analizi konusunda moleküler veri birikimi henüz yeterli değildir. HIV alttiplerinin tüm dünyada takip edildiği ve yeni CRF tanımlamalarındaki önemi de düşünülecek olursa, bu konudaki çalışmalar uluslararası verilere de katkı sağlayacaktır.

TEŞEKKÜR

Teknik desteklerinden dolayı sağlık teknisyenleri Seyhan Dargın ve Ergül Utkun'a teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

1. Roberts JD, Bebenek K, Kunkel TA. The accuracy of reverse transcriptase from HIV-1. *Science* 1988; 242(4882): 1171-3.
2. 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* 1995; 373(6510): 123-6.
3. Peteers M, Liegeois F, Torimiro N, et al. Characterization of highly replicative intergroup M/O human immunodeficiency virus type 1 recombinant isolated from a Cameroonian patient. *J Virol* 1999; 73(9): 7368-75.
4. Rousseau CM, Learn GH, Bhattacharya T, et al. Extensive intrasubtype recombination in South African human immunodeficiency virus type 1 subtype C infections. *J Virol* 2007; 81(9): 4492-500.
5. Robertson DL, Anderson JP, Bradac JA, et al. HIV-1 nomenclature proposal. *Science* 2000; 288(5463): 55-6.
6. Hemelaar J, Gouws E, Ghys PD, et al. Global trends in molecular epidemiology of HIV-1 during 2000-2007. *AIDS* 2011; 25(5): 679-89.
7. Hemelaar J. The origin and diversity of the HIV-1 pandemic. *Trends Mol Med* 2012; 18(3):182-92.
8. Lessells RJ, Katzenstein DK, Olivier T. Are subtype differences important in HIV drug resistance? *Curr Opin Virol* 2012; 2(5): 636-43.

9. Kiwanuka N, Laeyendecker O, Robb M. Effect of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) subtype on disease progression in persons from Rakai, Uganda, with incident HIV-1 infection. *J Infect Dis* 2008; 197(5): 707-13.
10. Baeten JM, Chohan B, Lavreys L, et al. HIV-1 subtype D infection is associated with faster disease progression than subtype A in spite of similar plasma HIV-1 loads. *J Infect Dis* 2007; 195(8): 1177-80.
11. Kiwanuka N, Robb M, Laeyendecker O, et al. HIV-1 viral subtype differences in the rate of CD4+ T-cell decline among HIV seroincident antiretroviral naive persons in Raiki district, Uganda. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2010; 54(2): 180-4.
12. Abecasis AB, Wensing AM, Paraskevis D, et al. HIV-1 subtype distribution and its demographic determinants in newly diagnosed patients in Europe suggest highly compartmentalized epidemics. *Retrovirology* 2013; 10: 7.
13. T.C. Sağlık Bakanlığı. HIV/AIDS Veri Tabloları. HIV Tedavi Bülteni Türkiye 2013; 3:35. Erişim: <http://www.egehaum.com>
14. Mracna M, Becker-Pergola G, Dileanis J, et al. Performance of Applied Biosystems Viroseq HIV-1 genotyping system for sequence-based analysis of non-subtype B human immunodeficiency virus type 1 from Uganda. *J Clin Microbiol* 2001; 39(12): 4323-7.
15. Pasquier C, Millot N, Njouou R, et al. HIV-1 subtyping using phylogenetic analysis of *pol* gene sequences. *J Virol Methods* 2001; 94(1-2): 45-54.
16. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA 5: molecular evolutionary genetic analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* 2011; 28(10): 2731-9.
17. Pineda AC, Faria NR, Imbrechts S, et al. Performance of the subtyping tools in the surveillance of HIV-1 epidemic: comparison between Rega version 3 and six other automated tools to identify pure subtypes and circulating recombinant forms. 17th International Bioinformatics Workshop on Virus Evolution and Molecular Epidemiology. 27-31 August 2012, Belgrade, Serbia. Poster presentation. Available at: <http://www.breach-hiv.be/media/docs/SymposiumBrussels/PinedaAndreaClemencia.pdf>
18. Rhee SY, Kantor R, Katzenstein DA, et al; International Non Subtype B HIV-1 Working Group. HIV-1 *pol* mutation frequency by subtype and treatment experience: extension of the HIVseq program to seven non-B subtypes. *AIDS* 2006; 20(5): 643-51.
19. Yılmaz 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.
20. Sayan M, Kumbasar Karaosmanoğlu HK, Mete B, et al. Molecular epidemiological analysis of HIV-1 *pol* gene sequences isolated in Istanbul, Turkey. *Mikrobiyol Bul* 2013; 47(1): 87-97.
21. Sayan M, Willke A, Ozgüneş N, Sargin F. HIV-1 subtypes and primary antiretroviral resistance mutations in antiretroviral therapy naive HIV-1 infected individuals in Turkey. *Jpn J Infect Dis* 2013; 66(4): 306-11.
22. Alpars D, Agacfidan A, Lübke N, et al. Molecular epidemiology of HIV in a cohort of men having sex with men from Istanbul. *Med Microbiol Immunol* 2013; 202(3): 251-5.
23. Schülter E, Oette M, Balduin M, et al. HIV prevalence and route of transmission in Turkish immigrants living in North-Rhine Westphalia, Germany. *Med Microbiol Immunol* 2011; 200(4): 219-23.
24. Pineda-Pena AC, Faria NR, Imbrechts S, et al. Automated subtyping of HIV-1 genetic sequences for clinical and surveillance purposes: performance evaluation of the new REGA version 3 and seven other tools. *Infect Genet Evol* 2013; 19: 337-48.
25. Yebra G, de Mulder M, Martin L, et al; Cohort of Spanish AIDS Research Network (CoRIS). Sensitivity of seven subtyping tools differs among subtypes/recombinants in the Spanish cohort of naive HIV-infected patients (CoRIS). *Antiviral Res* 2011; 89(1): 19-25.
26. Leoz M, Chaix ML, Delaugerre C, et al. Circulation of multiple patterns of unique recombinant forms B/CRF02_AG in France: precursor signs of the emergence of an upcoming CRF B/02. *AIDS* 2011; 25(11): 1371-7.