

Antiretroviral Tedavi Almayan Olgularda HIV-1 Primer İlaç Direnci Mutasyonlarının Araştırılması*

Investigation of HIV-1 Primary Drug Resistance Mutations in Antiretroviral Therapy-Naive Cases

Tülay YALÇINKAYA¹, Şükran KÖSE²

¹ Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire Başkanlığı, Ankara.

¹ Turkish Public Health Agency, Directorate of Microbiology Reference Laboratories, Ankara, Turkey.

² İzmir Tepecik Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği, İzmir.

² İzmir Tepecik Training and Research Hospital, Clinic of Infectious Diseases and Clinical Microbiology, İzmir, Turkey.

* Bu çalışma 8. Ulusal Moleküler ve Tanısal Mikrobiyoloji Kongresi'nde (4-7 Haziran 2014, Ankara) poster olarak sunulmuştur.

Geliş Tarihi (Received): 21.06.2014 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 17.09.2014

ÖZET

İlk AIDS olgusunun 1985 yılında bildirildiği ülkemizde, 2013 Haziran sonu itibarıyla Sağlık Bakanlığı tarafından rapor edilen toplam HIV pozitif ve AIDS'li olgu sayısı 6802'dir. Kombine antiretroviral ilaç tedavisi, hastaların yaşam süresi ve kalitesini büyük ölçüde iyileştirmesine rağmen, HIV-1 ilaç direnci etkin bir tedavi için önemli bir engel teşkil etmektedir. Bu çalışmada, antiretroviral ilaç kullanmamış HIV-1 enfeksiyonu olan kişilerde primer ilaç direncinin saptanması hedeflenmiştir. Çalışmada, Mart 2010-Nisan 2014 döneminde rutin olarak direnç testi yapılmak üzere, ülkemizin farklı illerinden (Ankara: 64; Adana: 42; İstanbul: 20; Antalya: 13; Gaziantep: 11; Erzurum: 5; Elazığ: 3; Malatya: 3; Mersin: 3 ve diğer 21 ilden 26 örnek) Türkiye Halk Sağlığı Kurumu AIDS Doğrulama Merkezine gönderilen 190 olguya ait (28 kadın, 143 erkek, 19 bilinmeyen; yaş aralığı: 20-72 yıl, ortalama yaş: 34.7 yıl) plazma örneği incelenmiştir. Virusun *pol* geninin proteaz enzimini kodlayan kısmının tamamı ile ters transkriptaz (RT) enzimini kodlayan genin ilk 335 kodonluk kısmına ait nükleotid dizileri, ticari test kiti (ViroSeq, Abbott/Celera Diagnostics, ABD) kullanılarak Sanger popülasyon bazlı dizileme yöntemiyle belirlenmiştir. Ticari test kitiyle sonuç alınmadığı durumlarda farklı primer çiftlerinin kullanıldığı "in-house" PCR yöntemiyle çalışılmıştır. Primer ilaç direnci mutasyonları Dünya Sağlık Örgütü 2009 yılı ilaç direnci surveyans listesine göre tanımlanmıştır. Örneklerde ortalama HIV-RNA düzeyi 5.07 (aralık: 2.09-7.67) log₁₀ kopya/ml, CD4⁺ T hücre sayısı 280.3 (aralık: 0-1000) hücre/mm³ olarak saptanmıştır. HIV enfeksiyonu tanısının konulmasıyla HIV-1 ilaç direnci testi yapılması arasında geçen süre ortalama 18.4 (aralık: 0-973) haftadır. İncelenen örneklerde en sık saptanan alttipler; alttip B (%31); rekombinant B, F1 (%24.7);

İletişim (Correspondence): Dr. Tülay Yalçinkaya, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire Başkanlığı, Sağlık Mahallesi Adnan Saygun Caddesi No: 55 06100 Sıhhiye, Ankara, Türkiye.
Tel (Phone): +90 312 565 5000, E-posta (E-mail): ktyalcinkaya@yahoo.com

alt-alt tip A1 (%16.8); rekombinant B/CRF02_AG (%10.5) ve CRF02_AG (%7.9) olarak belirlenmiştir. Yapılan analizlerde örneklerin %10 (19/190)'unda mutasyon saptanmıştır. Bunlar; NRTİ (nükleozid RT inhibitörü) direncinden sorumlu M41L, K70E, M184V, L210W, T215C/D/S; NNRTİ (nonnükleozid RT inhibitörü) direncinden sorumlu K103N/S, Y181C ve Pİ (proteaz inhibitörü) direncinden sorumlu M46L, L90M olarak izlenmiştir. Örneklerin %5.2'sinde NRTİ, %3.1'inde NNRTİ ve %2.1'inde Pİ mutasyonu bulunmuştur. Bir örnekte hem NRTİ hem de NNRTİ mutasyonu, beş örnekte ise NRTİ direncine neden olan iki mutasyon birlikte saptanmıştır. Primer direnç mutasyonunun saptandığı toplam 19 suşun yedisi Ankara, üçü Adana, ikişer adedi İstanbul, Erzurum ve Mersin, birer adedi ise Amasya, Samsun ve Tokat illerinden gönderilen örneklerden izole edilmiştir. Primer ilaç direnci saptanan ve saptanmayan olgular arasında yaş, cinsiyet, CD4⁺ T hücre sayısı ve tanı ile direnç testi arasında geçen süre açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır ($p > 0.05$). Buna karşın, primer ilaç direncinin saptandığı gruptaki ortalama HIV-RNA düzeyi $[4.77 (2.95-6.87) \log_{10} \text{ kopya/ml}]$, saptanmayan gruba göre $[5.11 (2.09-7.67) \log_{10} \text{ kopya/ml}]$ anlamlı düzeyde düşük bulunmuştur ($p = 0.043$). Sonuç olarak, HIV-1 primer ilaç direnci oranının görece olarak yüksek olduğu (%10) ve hastalarda antiretroviral tedaviye başlamadan önce ilaç direnci mutasyonlarının araştırılmasının yol gösterici olacağı kanısına varılmıştır.

Anahtar sözcükler: HIV-1; primer ilaç direnci.

ABSTRACT

Following the report of the first AIDS case in Turkey in 1985, the total number of HIV-positive and AIDS cases is 6802 near the end of June 2013, according to the data obtained from the Turkish Ministry of Health. Although combined antiretroviral drug therapy has greatly improved the life-span and the life quality of the patients, HIV-1 drug resistance poses a major obstacle for treatment outcome. The aim of this study was to detect the presence of primary drug resistance in antiretroviral therapy-naïve cases. Plasma samples obtained from 190 cases (143 male, 28 female, 19 unknown; age range: 20-72 yrs; mean age: 34.7 yrs) sent to AIDS Confirmation Center of Turkish Public Health Institution, from different provinces of Turkey (Ankara: 64; Adana: 42; İstanbul: 20; Antalya: 13; Gaziantep: 11; Erzurum: 5; Elazığ: 3; Malatya: 3; Mersin: 3; and 26 samples from other 21 regions) for routine HIV-1 genotyping test between May 2010-April 2014 period were included in the study. In viral *pol* gene, complete protease encoding sequence and the first 335 codons of reverse transcriptase (RT) encoding sequence were analyzed by Sanger population-based sequencing method with a commercial test kit (ViroSeq, Abbott/Celera Diagnostics, USA). An alternative in house PCR method with different set of primers was used when the commercial test failed. Primary drug resistance mutations were identified according to the WHO 2009 drug resistance surveillance list. The mean HIV-RNA level at the time of resistance testing was 5.07 (range, 2.09-7.67) $\log_{10}$ copies/ml and the median CD4⁺ T cell count was 280.3 (range, 0-1000) cells/mm³. The period between the diagnosis of HIV infection and HIV-1 drug resistance test was 18.4 (range, 0-973) weeks. Most prevalent HIV-1 subtypes were subtype B (31%); recombinant B, F1 (24.7%), sub-subtype A1 (16.8%), recombinant B/CRF02_AG (10.5%) and CRF02_G (7.8%). Analysis of our results showed that 10% (19/190) of the samples exhibited resistance mutations. Detected mutations were as follows: M41L, K70E, M184V, L210W and T215C/D/S, responsible for nucleoside RT inhibitor (NRTI) resistance; K103N/S and Y181C, responsible for non-nucleoside RT inhibitor (NNRTI) resistance; M46L and L90M, responsible for protease inhibitor (PI) resistance. NRTI, NNRTI and PI mutation rates in the samples were found as 5.2%, 3.1% and 2.1%, respectively. Both NRTI and NNRTI mutations were detected in one sample. Two mutations leading to NRTI resistance were obtained together in five samples. Seven out of the 19 strains with primary resistance mutation were isolated from samples sent from Ankara, three from Adana, two of each from İstanbul, Erzurum and Mersin, and one of each from Amasya, Samsun and Tokat provinces. There were no statistically significant differences in terms of age, gender, CD4⁺ T cell count, time from diagnosis to resistance testing between the patient group with primary drug resistance and the group without resistance ($p > 0.05$). However, the mean HIV-RNA level in patients with primary drug resistance $[4.77 (2.95-6.87) \log_{10} \text{ copies/ml}]$ was significantly lower

than those without primary drug resistance [5.11 (2.09-7.67) $\log_{10}$ copies/ml] ($p=0.043$). Our results revealed a relatively high (10%) prevalence of HIV-1 primary drug resistance. We therefore support the need for routine HIV resistance testing so that clinicians can individualize their treatments taking into account the presenting drug resistance.

Key words: HIV-1; primary drug resistance.

GİRİŞ

İlk AIDS olgusunun 1985 yılında bildirildiği ülkemizde, 2013 Haziran sonu itibarıyla Sağlık Bakanlığı tarafından rapor edilen toplam HIV-pozitif ve AIDS'li olgu sayısı 6802'dir¹. Enfeksiyonun tedavisinde 1996 yılında uygulanmaya başlanan kombine antiretroviral ilaç tedavisi ile HIV pozitif kişilerde yaşam süresi ve kalitesi büyük ölçüde yükselmesine karşın, HIV'da hızla gelişen ilaç direnci, etkin bir tedavi için engel oluşturmaktadır²⁻⁴. Antiretroviral ilaç kullanımına rağmen viral replikasyonun tamamen baskılanamaması, virus popülasyonunda ilaca dirençli suşların seçilimine neden olmaktadır. Direnç gelişiminin en önemli nedeni, ilaçların tam dozunda ve sürekli kullanılmamasıdır (zayıf aderans). Bunun yanı sıra, direnç mutasyonu taşıyan virusla enfeksiyon sonucu da ilaç direnci gelişebilmektedir⁵. Nedeni ne olursa olsun, antiretroviral tedavide başarısızlık, kişinin kullanmakta olduğu ilaçlara karşı giderek artan oranda direnç gelişimine sebep olabilmektedir^{2,4}.

İlaça karşı önceden (primer) direnç mutasyonu taşıyan bir HIV suşu ile enfeksiyon (Transmitted Drug Resistance; TDR), başlanan tedavide başarısızlığa neden olabileceğinden, uluslararası rehberlerde de önerildiği üzere, özellikle Amerika Birleşik Devletleri ile Batı Avrupa ülkelerinin çoğunda bazal direnç surveyansı yapılmaktadır. Direnç gelişiminin azaltılması ve değerlendirilmesi için, bu uygulamanın kaynakları kısıtlı ülkelerde de yapılması önerilmektedir⁴⁻⁸. Çalışmamızın amacı, antiretroviral tedavi (ART) almayan kişilerde HIV antiretroviral ilaç direncinin saptanmasıdır.

GEREK ve YÖNTEM

İzmir Tepecik Eğitim ve Araştırma Hastanesi Yerel Etik Kurulu tarafından onaylanan (27.08.2014, Karar No: 5/1) bu çalışmaya, Mart 2010-Mart 2014 döneminde, rutin olarak direnç testi yapılmak üzere ülkemizin çeşitli illerinden laboratuvarımıza gönderilen, HIV-1 ile enfekte, ART almayan kişilere ait 190 plazma örneği dahil edildi (Tablo I).

Örneklerde, virusun *pol* geninin proteaz enzimini kodlayan kısmının tamamı ile ters transkriptaz (reverse transcriptase; RT) enzimini kodlayan ilk 335 kodonluk kısmı PCR yöntemiyle çoğaltılarak nükleotid dizi analizi yapıldı (HIV-1 HxB2 referans suşu üzerinde 2253-3354. nükleotidler). Bu amaçla ticari test kiti (ViroSeq, Abbott/Celera Diagnostics) kullanılarak Sanger popülasyon bazlı dizileme yöntemi uygulandı. Elde edilen diziler "ViroSeq HIV-1 Genotyping Software v2.8" programıyla değerlendirildi. Programda, ancak tanımlanan bölgenin tamamının nükleotid dizisi elde edildiğinde analiz yapılabilir. Dizileme primerlerinin tek veya çift ('forward' ve/veya 'reverse') olarak kapsadığı bölgeler için ayrı değerlendirme kriterleri uygulanmaktadır.

Tablo I. İncelenen Örneklerin illere Göre Dağılımı (n= 190)

Sıra	İl	Örnek sayısı	Sıra	İl	Örnek sayısı
1	Adana	42	16	İstanbul	20
2	Ağrı	1	17	İzmir	1
3	Aksaray	1	18	Kırşehir	1
4	Amasya	1	19	Konya	2
5	Ankara	64	20	Malatya	3
6	Antalya	13	21	Mardin	1
7	Bolu	1	22	Mersin	3
8	Bursa	1	23	Muş	1
9	Çorum	2	24	Ordu	2
10	Diyarbakır	1	25	Rize	1
11	Elazığ	3	26	Samsun	2
12	Erzurum	5	27	Sivas	1
13	Eskişehir	1	28	Tokat	1
14	Gaziantep	11	29	Trabzon	2
15	Hatay	1	30	Yozgat	1

Ticari test kiti ile sonuç alınmadığı durumlarda, farklı primer çiftlerinin kullanıldığı “in-house” yöntemi uygulandı⁹⁻¹¹. Yöntemde, ‘mini spin’ kolon tekniği ile saflaştırılan plazma örneklerinde referans HxB2 suşunda 2248-3309. nükleotidlere karşılık gelen kısım iki aşamalı (nested)-PCR ile çoğaltıldı. Dizi analizinde, JA273 (outer forward-2252 CCCTCARATCA CTCTTTGGC), JA311 (inner forward-2707 AAAA TCCATAYAAAYACTCCA), JA305 (inner reverse-2775 ATTCCTAATTGRACYTCCCA) ve JA276 (outer reverse-3303 TGTATRTCATGACAGTCCA) primerleri kullanıldı. PCR ürünlerinin nükleotid dizileri, Big-Dye Terminator kiti kullanılarak AB 3500 Genetic Analyzer cihazı (Applied Biosystems, ABD) ile belirlendi. Nükleotid dizileri Sequencher programı (Gene Codes Corporation, ABD) yardımıyla birleştirildi ve değerlendirildi. Dizilerin hizalanmasında Bioedit programı (version 7.2.2 [9/8/2013]) kullanıldı¹².

HIV-1 alttipleri, MEGA 5.2 programı kullanılarak alttip referans dizileri ve Neighbour-Joining yöntemiyle oluşturulan filogenetik ağaçla tanımlandı (Tablo II)^{13,14}. İlk aşamada Los Alamos referans dizileri ile tanımlanamayan ve iki ayrı grup oluşturan dizilerden ilk grup, Gen Bankasından JN882655 dizisinin referans dizisi olarak eklenmesiyle rekombinant B/CRF02_AG olarak belirlendi¹⁵. İkinci grupta yer alan diziler REGA otomatize HIV-1 alttipleme aracıyla rekombinant B, F1 olarak tanımlandı¹⁶. Tanımlanan her alttipin bir örnek ile temsil edildiği dendrogram Şekil 1’de gösterildi. Rekombinant B, F1 dendrogramda örnek no 178 ile temsil edildi.

Tablo II. İncelenen Örneklerde Alttip Dağılımı (n= 190)

Sıra	HIV-1 alttipi	Sayı (%)
1	Alt-alttip A1	32 (16.8)
2	Alttip B	59 (31)
3	Alttip C	8 (4.2)
4	Alttip G	2 (1)
5	Rekombinant B, F1	47 (24.7)
6	CRF29_BF	1 (0.5)
7	CRF14_BG	2 (1)
8	CRF01_AE	1 (0.5)
9	CRF02_AG	15 (7.9)
10	CRF03_AB	1 (0.5)
11	Rekombinant B/CRF02_AG	20 (10.5)
12	CRF06_cpx	1 (0.5)
13	CRF25_cpx	1 (0.5)

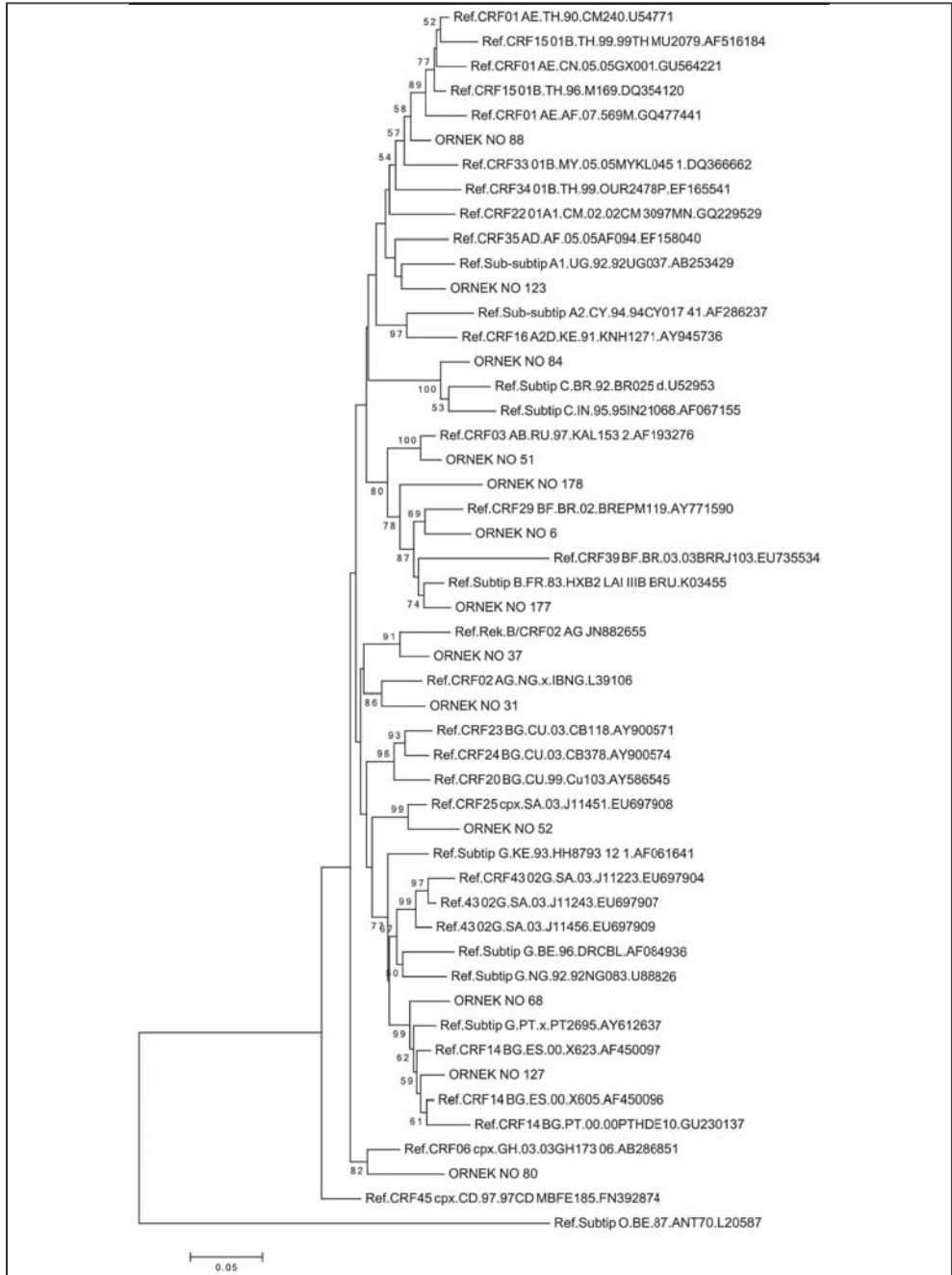
Nükleozid RT inhibitörü (NRTİ), non-nükleozid RT inhibitörü (NNRTİ) ve proteaz inhibitörü (PI) ilaçlara karşı primer ilaç direnci mutasyonları Dünya Sağlık Örgütü 2009 ilaç direnci surveyans listesine göre belirlendi (Tablo III)¹⁷.

İstatistiksel değerlendirmede Mann-Whitney U testi kullanıldı; $p < 0.05$ değeri anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Çalışmamızda incelenen 190 örneğin 19 (%10)'unda mutasyon saptanmış; bunların M41L, K70E, M184V, L210W, T215C/D/S (NRTİ); K103N/S, Y181C (NNRTİ); M46L, L90M (PI) olduğu belirlenmiştir (Tablo III). Örneklerin %5.2'sinde NRTİ, %3.1'inde NNRTİ ve %2.1'inde PI mutasyonu bulunmuştur. Bir örnekte hem NRTİ hem de NNRTİ mutasyonu, beş örnekte ise NRTİ direncine neden olan iki mutasyon birlikte saptanmıştır. En sık rastlanan NRTİ, NNRTİ ve PI mutasyonları sırasıyla T215C/D/S, K103N/S ve M46L'dir (Tablo IV). Saptanan mutasyonların yıllara göre dağılımı Tablo V'te verilmiştir.

Çalışmaya alınan olguların 143'ü erkek, 28'i kadın (19'u bilinmiyor) olup, yaşları 20-72 yıl (ortalama: 34.7 yıl) arasında değişmektedir (Tablo VI). Örneklerde ortalama HIV-RNA düzeyi 5.07 (aralık: 2.09-7.67) $\log_{10}$ kopya/ml, ortalama CD4⁺ T hücre sayısı 269.7 (aralık: 0-1000) hücre/mm³ olarak belirlenmiştir. HIV enfeksiyonu tanısı ile HIV-1 ilaç direnci testi yapılması arasında geçen süre ortalama 18.4 haftadır. Primer ilaç direnci saptanan ve saptanmayan olgular arasında yaş, cinsiyet, CD4⁺ T hücre sayısı ve tanı ile direnç testi arasında geçen süre açısından anlamlı farklılık saptanmamış; ancak iki grup arasında HIV-RNA düzeylerindeki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p = 0.043$) (Tablo VI).



Şekil 1. Saptanan alttiplerin filogenetik analizi [Temsili dendrogram MEGA 5.2 programında (www.megasoftware.net), "Neighbor-joining" yöntemi ve "Tamura-Nei" modeli ile oluşturulmuştur. Sadeleştirmek amacıyla çalışma örneklerinden uzak grup oluşturan referans diziler çıkarılmış veya sayıları azaltılmıştır. "Bootstrap" değeri olarak 1000 alınmıştır ve %50'nin altındaki değerler gösterilmemiştir].

Tablo III. Dünya Sağlık Örgütü İlaç Direnci Sürveyansı İçin Mutasyon Listesi¹⁷

NRTİ*		NNRTİ*		PI*	
M41	L	L100	I	L23	I
K65	R	K101	E, P	L24	I
D67	N, G, E	K103	N, S	D30	N
T69	D, Ins	V106	M, A	V32	I
K70	R, E	V179	F	M46	I, L
L74	V, I	Y181	C, I, V	I47	V, A
V75	M, T, A, S	Y188	L, H, C	G48	V, M
F77	L	G190	A, S, E	I50	V, L
Y115	F	P225	H	F53	L, Y
F116	Y	M230	L	I54	V, L, M, A, T, S
Q151	M			G73	S, T, C, A
M184	V, I			L76	V
L210	W			V82	A, T, F, S, C, M, L
T215	Y, F, I, S, C, D, V, E			N83	D
K219	Q, E, N, R			I84	V, A, C
				85	V
				N88	D, S
				L90	M

* Çalışmada saptanan mutasyonlar kalın yazı (bold) karakteri ile belirtilmiştir.

TARTIŞMA

Primer ilaç direnci, ART'nin başarısızlığına neden olabileceğinden önemli bir klinik ve epidemiyolojik sorundur. İlaç kullanımının yüksek olduğu zengin Batı ülkelerinde ART almayan kişilerde direnç oranı %10-17'lik plato düzeyine ulaşmıştır. ART'ye erişimin kısıtlı olduğu düşük veya orta gelir düzeyine sahip ülkelerde ise direnç oranı yükselme eğilimindedir; 2009 yılında %6.6 oranına ulaşmıştır⁵. Ülkemize komşu veya yakın konumdaki Gürcistan, İsrail, Güney Kıbrıs Rum Kesimi, Yunanistan, Romanya, Ukrayna ve Rusya'da saptanan primer direnç oranları sırasıyla %8.3, %10.1, %5.4, %1, %0-6, %3.1 ve %4.5-9.8'dir¹⁸. Bu çalışmada, ülkemizin çeşitli illerinden gönderilen örneklerin değerlendirildiği referans merkezimizde, daha önce antiretroviral ilaç kullanmamış HIV-1 pozitif olgularda primer ilaç direncinin saptanması hedeflenmiştir.

Çalışmada kullanılan ticari ViroSeq genotiplendirme testi Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından sadece HIV-1 alttip B'nin analizi için onay almıştır. Bu nedenle, çalışmamızda test kiti ile sonuç alınamadığı durumlarda B dışındaki diğer alttipleri de kapsayan alternatif primerleri içeren "in-house" yöntemle çalışılmıştır⁹⁻¹¹. İncelenen

Tablo IV. Örneklerde Saptanan Direnç Mutasyonları

Sıra	İl	Örnek No	Altıtip	NRTİ mutasyonu	NNRTİ mutasyonu	PI mutasyonu
1	Adana	29	C	M184V	K103N, Y181C	-
2	Adana	82	B	L210W, T215S	-	-
3	Adana	158	Rek. B, F1	-	K103S	-
4	Amasya	94	A1	-	-	M46L
5	Ankara	8	B	M41L, T215C	-	-
6	Ankara	81	CRF06_cpx	K70E	-	-
7	Ankara	92	A1	-	Y181C	-
8	Ankara	103	B	-	-	L90M
9	Ankara	112	Rek. B, F1	-	K103N	-
10	Ankara	165	A1	-	-	D30DN
11	Ankara	189	B	-	K103N	-
12	Erzurum	131	B	T215E	-	-
13	Erzurum	168	Rek. B, F1	-	K103KN	-
14	İstanbul	124	B	M41L, T215D	-	-
15	İstanbul	138	B	T215E	-	-
16	Mersin	97	B	M41L, T215C	-	-
17	Mersin	132	B	M41L, T215CS	-	-
18	Samsun	55	A1	-	-	M46L
19	Tokat	123	A1	K70E	-	-

Tablo V. Saptanan Mutasyonların Yıllara Göre Dağılımı

Yıl	Örnek sayısı	Mutasyon saptanan örnek sayısı (%)
2010	17	1 (5.8)
2011	27	1 (3.7)
2012	45	2 (4.4)
2013	53	10 (18.8)
2014	48	5 (10.4)
Ortalama		3.8 (8.6)

Tablo VI. Olguların Demografik ve Diğer Özellikleri (n= 190)

	Genel	Primer ilaç direnci		p değeri
		Saptanan olgular	Saptanmayan olgular	
Ortalama yaş; yıl (aralık)	34.7 (20-72)	40 (23-59)	37.1 (20-72)	> 0.05
Erkek cinsiyet (n, %)	143 (75.3)	14 (9.9)	129 (90.2)	> 0.05
Kadın cinsiyet (n, %)	28 (14.7)	4 (14.3)	24 (85.7)	> 0.05
Bilinmeyen cinsiyet (n, %)	19 (10)	1 (5.3)	18 (94.7)	*
Ortalama HIV-RNA düzeyi; log ₁₀ kopya/ml (aralık)	5.07 (2.09-7.67)	4.77 (2.95-6.87)	5.11 (2.09-7.67)	0.043
Ortalama CD4 T hücre sayısı; hücre/mm ³ (aralık)	280.3 (0-1000)	177.8 (7-486)	282.2 (0-1000)	> 0.05
Tanı ile direnç testi arasındaki ortalama süre; hafta (aralık)	18.4 (0-973)	19.3 (0-270)	16.9 (0-973)	> 0.05

* Cinsiyeti bilinmeyenler analiz dışı bırakılmıştır.

örneklerin %10 (19/190)'unda mutasyon tespit edilmiş; NRTİ, NNRTİ ve Pİ mutasyonlarının saptanma oranları sırasıyla; %5.2, %3.1 ve %2.1 olarak belirlenmiştir (Tablo IV). Bir örnekte hem NRTİ hem de NNRTİ mutasyonu, beş örnekte ise NRTİ direncine neden olan iki mutasyon birlikte saptanmıştır. En sık rastlanan NRTİ, NNRTİ ve Pİ mutasyonları sırasıyla; T215C/D/S, K103N/S ve M46L'dir (Tablo IV). Çalışmamızda saptanan primer ilaç direnci oranı (%10), komşu ülkeler ile Batı Avrupa ülkelerinde saptanan oranlarla uyumlu görünmektedir^{5,17,18}.

Primer ilaç direnci saptanan ve saptanmayan gruplar arasında yaş, cinsiyet, CD4⁺ T hücre sayısı ve tanı ile direnç testi arasında geçen süre açısından istatistiksel fark saptanmamış (p> 0.05); buna karşın iki grup arasında HIV-RNA düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur (p= 0.043) (Tablo VI). Primer ilaç direncine neden olan mutasyonlar genellikle enfektivite ve viral replikasyon kapasitesinde azalmaya neden olmaktadır¹⁹. Örneğin, M184V mutasyonu taşıyan virusla enfekte kişilerde viral yükün 0.6-0.8 log₁₀ daha düşük olduğu bulunmuştur²⁰. Çalışmamızda da HIV-RNA düzeyi, primer ilaç direnci saptanan grupta direnç saptanmayan gruba göre 0.3 log₁₀ kopya/ml daha düşük saptanmıştır.

Örnek sayısı ve dağılımı ülkemizin tamamının temsili için yetersiz olmakla birlikte, ilaç direnci mutasyonu saptanan örneklerin illere göre dağılımı örnek sayısı ile doğru orantılı görünmektedir (Tablo I ve IV). Saptanan mutasyonların yıllara göre dağılımı belirgin bir artış veya azalma eğilimi göstermemektedir (Tablo V). Altıtip dağılımı, CRF/CPX çeşitliliği ve sayısındaki artışa karşın, daha önce yapılan çalışmalarla uyumlu görünmekte; ancak daha ayrıntılı analiz ve sürekli takip gerektirmektedir. Afrika, eski Sovyetler Birliği Cumhuriyetleri ve Doğu Avrupa ile bağlantılı olabilecek sonuçlar, ülkemizdeki HIV epidemisinin karmaşıklığına işaret etmektedir^{15,21-23}.

Rehberlerde ART'ye başlanmadan önce direnç testi yapılması önerilmektedir⁴⁻⁸. Çalışmamızda, tanı alma tarihi ile direnç testi arasında geçen süre ortalama 18.4 haftadır (Tablo VI). Son yıllarda laboratuvarımızda rutin amaçlı test edilen örneklerde bu süre giderek kısalmakta, tanı konulduktan hemen sonra direnç testi için örnek gönderilmektedir.

HIV enfeksiyonunda CD4⁺ T hücre sayısı sürekli bir azalma göstermektedir. Bu nedenle ani ve belirgin bir düşme ve tekrar normal düzeye yükselmenin gözlemlendiği akut dönem dışında, çoğunlukla enfeksiyonun süresi ile ters orantılı bir şekilde giderek azalan düzeylerde saptanmaktadır. Çalışmamızda ortalama CD4⁺ T hücre sayısı düşük (280.3 hücre/mm³) saptanmıştır. Primer ilaç direnci saptanan ve saptanmayan kişiler arasındaki farklılık ise istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p > 0.05$) (Tablo VI). Bu bulgu ülkemizde enfeksiyonun genellikle geç dönemde tanındığı şeklinde yorumlanmıştır.

Sonuç olarak, çalışmamızda ART almayan kişilerde saptanan yüksek primer direnç oranı (%10), direnç testinin, HIV enfeksiyonu tedavisinin yönlendirilmesinde ayrılmaz bir öge olduğunu ve kullanılacak ilk ilaç kombinasyonunun seçiminde yol gösterici olacağını ortaya koymuştur.

KAYNAKLAR

1. T.C. Sağlık Bakanlığı. HIV/AIDS veri tabloları. HIV Tedavi Bülteni Türkiye 2013; 3:35. Erişim: http://www.egehaum.com/EGEHAUM_yayinlar/hiv_tedavi_bulteni_turkiye_aralik_2013.pdf
2. Clavel F, Hance AJ. HIV drug resistance. N Eng J Med 2004; 350(10): 1023-35.
3. Antiretroviral Therapy Cohort Collaboration. Life expectancy of individuals on combination antiretroviral therapy in high-income countries: a collaborative analysis of 14 cohort studies. Lancet 2008; 372(9635): 293-9.
4. Wittkop L, Günthard HF, de Wolf F, et al. Effect of transmitted drug resistance on virological and immunological response to initial combination antiretroviral therapy for HIV (EuroCoord-CHAIN joint project): a European multicohort study. Lancet Infect Dis 2011; 11(5): 363-71.
5. Maartens G, Cellum C, Lewin SR. HIV infection: epidemiology, pathogenesis, treatment and prevention. Lancet 2014; 384 (9939): 258-71.
6. European AIDS Clinical Society (EACS). HIV Guidelines Version 7.0, 2013. Erişim: http://www.eacsociety.org/Portals/0/Guidelines_Online_131014.pdf
7. AIDSinfo. Guidelines for the use of antiretroviral agents in HIV-1-infected adults and adolescents. 2014. Erişim: <http://aidsinfo.nih.gov/guidelines>
8. World Health Organization. Consolidated guidelines on the use of antiretroviral drugs for treating and preventing HIV infection. 2013. Available at: <http://www.who.int/hiv/pub/guidelines/arv2013/download/en/>
9. Aghokeng AF, Mpoudi-Ngole E, Chia JE, Edoul EM, Delaporte E, Peeters M. High Failure Rate of the ViroSeq HIV-1 genotyping system for drug resistance testing in Cameroon, a country with broad HIV-1 genetic diversity. J Clin Microbiol 2011; 49(4): 1635-1641.
10. Lindström A, Albert J. A simple and sensitive "in-house" method for determining genotypic drug resistance. J Virol Methods 2003; 107(1): 45-51.
11. Yalçinkaya T, Köse Ş. HIV-1 subtiplerinin dağılımı. Türk Mikrobiyol Cem Derg 2011; 41(3): 116-9.
12. Hall TA. BioEdit: a user friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT, pp: 95-8. In: Nucleic Acids Symposium Series No.41, 1999. Oxford University Press. Available at: <http://www.mbio.ncsu.edu/jwb/papers/1999Hall1.pdf>

13. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* 2011; 28(10): 2731-9.
14. Los Alamos HIV Sequence Database. HIV Sequence Alignments. Available at: <http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/NEWALIGN/align.html#ref>
15. Uluer Biçeroğlu S, Altuğlu I, Nazlı Zeka A, Gökengin D, Yazan Sertöz R. 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. *Mikrobiyol Bul* 2014; 48(3): 420-8.
16. REGA HIV Subtyping Tool, Version 3. Available at: <http://regatools.med.kuleuven.be/typing/v3/hiv/typing-tool>
17. Stanford University HIV Drug Resistance Database. The World Health Organization 2009 List of Mutations for Surveillance of Transmitted Drug Resistant HIV Strains. Available at: <http://hivdb.stanford.edu/pages/WHOResistanceList.html>
18. Stanford HIV Database. HIV-1 Drug Resistance in ARV-naïve Populations. Compendium of published virus sequences from 46,765 persons, 264 studies according to region, year and subtype 1998-2014. Erişim: <http://www.hivdb-stanford.edu/surveillance/map/>
19. Rodger AJ, Marshall N, Geretti AM, Booth C. Antiretroviral drug resistance, pp: 46-52. In: Rodger AJ, Mahungu TW, Johnson MA (eds), *An Atlas of Investigation and Management of HIV/AIDS*. 2011, 1st ed. Clinical Publishing, Oxford.
20. Turner D, Wainberg MA. HIV transmission and primary drug resistance. *AIDS Rev* 2006; 8(1):17-23.
21. Yılmaz G, Midilli K, Türkoğlu S, et al. Genetic subtypes of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) in İstanbul, Turkey. *Int J Infect Dis* 2006; 10(4): 286-90.
22. Midilli K, Kuşkucu MA, Ergin S ve ark. 2004-2011 yılları arasında HIV genotiplerinin dağılımı. 4. Ulusal Viroloji Kongresi, 23-26 Haziran 2011, İstanbul. Kongre Kitabı, s: 182, CYBH-008.
23. Midilli K, Ergin S, Kuşkucu MA ve ark. Türkiye’de HIV ile enfekte naif hastalarda antiretroviral direnci. 4. Ulusal Viroloji Kongresi, 23-26 Haziran 2011, İstanbul. Kongre Kitabı, s: 148, Sözlü Bildiri.