



**HIV POZİTİF HASTALARDA GENOTİP TAYİNİ VE FİLOGENETİK
ANALİZ**

Erdem ŞAHİN

**DOKTORA TEZİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

AĞUSTOS 2021

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
 - Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
 - Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
 - Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
 - Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,
- bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Erdem ŞAHİN

19/08/2021

HIV POZİTİF HASTALARDA GENOTİP TAYİNİ VE FİLOGENETİK ANALİZ
(Doktora Tezi)

Erdem ŞAHİN

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Ağustos 2021

ÖZET

HIV enfeksiyonunun klinik yönetiminde ilaç direncinin değerlendirilmesi önemlidir. HIV genotiplendirmesinde Sanger dizileme altın standart kabul edilsede, yeni nesil dizileme yöntemleri, düşük frekanslı direnç mutasyonlarını saptamasıyla ön plana çıkmaktadır. Bu çalışmada HIV/AIDS hastalarından izole edilen HIV-1 suşlarının genotiplendirmesi Sanger ve yeni nesil dizileme yöntemleriyle yapılmıştır. Yöntemlerin direnç mutasyonlarını saptamadaki etkinlikleri karşılaştırılmıştır. Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Viroloji Laboratuvarı'nda rutin çalışılan 47 HIV pozitif hasta örneği çalışmaya dahil edilmiştir. Viral nükleik asit ekstraksiyonunu takiben, HIV *pol* gen bölgesinin proteaz ve reverse transkriptaz proteinlerini kodlayan kısımları çoğaltılmıştır. Nükleotid dizileri Sanger ve yeni nesil dizileme yöntemleriyle belirlenmiştir. Sanger dizilemeyle en az bir ilaca %10,6, nükleozid ters transkriptaz inhibitörlerine %4,3, nükleozid olmayan ters transkriptaz inhibitörlerine %6,4 direnç bulunmuştur. Proteaz inhibitörlerine direnç mutasyonu görülmemiştir. Yeni nesil dizilemeyle %1 eşik değer ve üzerinde en az bir ilaca %46,8, proteaz inhibitörlerine %19,1, nükleozid ters transkriptaz inhibitörlerine %27,7 ve nükleozid olmayan ters transkriptaz inhibitörlerine %19,2 direnç bulunmuştur. %5 ve üzerindeki eşik değerlerde %14,9 en az bir ilaca direnç bulunmuştur. %1 eşik değer üzerinde proteaz inhibitörleri için direnci mutasyonu görülmemiştir. Sanger dizilemeyle saptanan mutasyonların tamamı yeni nesil dizilemeyle tespit edilmiştir. Hastaların %66'sının alt tip B ile enfekte olduğu gözlenmiştir. Bunu %13 ile A, %9 ile G, %4 ile C, CRF_02AG, %2 ile B/CRF02_AG, %2 ile CRF63_02A1 tipleri takip etmektedir. Direnç mutasyonlarının yüksek prevalansı, HIV-1 genotiplendirmesinin önemini vurgulamaktadır. Yeni nesil dizileme, %5 eşik değer altındaki düşük frekanslı direnç mutasyonlarının tespitinde artan duyarlılığa sahiptir. %5 eşik değer altındaki düşük frekanslı direnç mutasyonlarının sayısında anlamlı artış görülmüştür. Türkiye'de HIV-1 genotiplerinin dağılımı çeşitlilik göstermektedir.

Bilim Kodu : 1039

Anahtar Kelimeler : HIV, AIDS, yeni nesil dizileme, Sanger, antiretroviral ilaç direnci

Sayfa Adedi : 138

Danışman : Prof. Dr. Gülendam BOZDAYI

GENOTYPING AND PHYLOGENETIC ANALYSIS IN HIV POSITIVE PATIENTS

(Ph. D. Thesis)

Erdem ŞAHİN

GAZİ UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF HEALTH SCIENCES

August 2021

ABSTRACT

Assessment of drug resistance is critical in clinical management of HIV infection. Although Sanger sequencing is considered gold standard in HIV genotyping, next-generation sequencing methods have emerged as a viable option for detecting low-frequency resistance mutations. Sanger and next generation sequencing methods were used in this study to genotype HIV-1 strains isolated from HIV/AIDS patients. Efficacy of methods in detecting resistance mutations was compared. Study included 47 samples routinely studied in Medical Virology Laboratory at Gazi University Medical Faculty. Following extraction, *pol* gene region encoding protease and reverse transcriptase were amplified. Sanger and next-generation sequencing were used to determine sequences. Sanger revealed 10.6%, 4.3% and 6.4% resistance to at least one drug, nucleoside reverse transcriptase inhibitors and non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors, respectively. At 1% threshold and above, next generation sequencing revealed 46.8%, 19.1%, 27.7% and 19.2% resistance to at least one drug, protease inhibitors, nucleoside reverse transcriptase inhibitors and non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors, respectively. At 5% and higher thresholds, 14.9% were found to be resistant to at least one drug. No resistance mutations observed for protease inhibitors above 1% threshold or with Sanger. All mutations detected by Sanger were also detected by next-generation sequencing. 66% of sequences were found to be subtype B followed by A (13%), G (9%), C (4%), CRF_02_AG (4%), B/CRF02_AG (2%), CRF63_02A1 (2%). Prevalence of resistance mutations emphasizes significance of HIV-1 genotyping. Next-generation sequencing has improved sensitivity in detecting low-frequency resistance mutations below 5% threshold. Number of low-frequency resistance mutations below 5% threshold increased significantly. In Turkey, distribution of HIV-1 genotypes varies.

Science Code : 1039

Key Words : HIV, next-generation sequencing, Sanger, antiretroviral drug resistance

Page Number : 138

Supervisor : Prof. Dr. Güldam BOZDAYI, MD, PhD

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın gerçekleştirilmesinde, değerli bilgilerini paylaşan saygıdeğer danışman hocam; Prof. Dr. Gülendam BOZDAYI'ya, çalışmam boyunca yardımlarını esirgemeyen arkadaşlarım Özge ALTAN ve Tuğba AKSOYLU'ya ve çalışma süresince tüm zorlukları benimle göğüsleyen ve hayatımın her evresinde bana destek olan değerli Ali Cüneyt BİROL'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Doktora Tezi olarak sunduğum bu çalışmayı destekleyen Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) birimine (Proje kod no: 01/2020-04) teşekkür ederim.

Teşekkürlerin az kalacağı diğer üniversite hocalarıma, bana doktora eğitimim boyunca kazandırdıkları her şey için ve beni gelecekte söz sahibi yapacak bilgilerle donattıkları için teker teker teşekkürlerimi sunuyorum.

Doktora yapma sürecinde birlikte çalıştığım Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı asistanları ve doktora arkadaşlarıma, laboratuvar sorumlularına ve laboratuvarında görevli tüm çalışma arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Her zaman iyi dilekleriyle bana güç veren, maddi ve manevi destekleriyle beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan sevgili anneme, babama ve abime sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	x
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xiv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Tarihçe.....	5
2.2. Tipler	6
2.3. Yapısı	9
2.3.1. Zarf yapısı.....	11
2.3.2. Matriks yapısı	12
2.3.3. Kapsid yapısı	13
2.3.4. Nükleokapsid yapısı	13
2.3.5. Viral genom ve gen ürünleri.....	15
2.4. Viral Döngü.....	20
2.4.1. Tutunma ve füzyon.....	21
2.4.2. Viral kapsidin soyularak RNA'nın sitoplazmaya alınması	23
2.4.3. Ters transkripsiyon	24
2.4.4. DNA entegrasyonu	25
2.4.5. Viral proteinlerin ifadenmesi.....	26
2.4.6. Montaj ve olgunlaşma	27
2.5. İmmünopatogenez	27
2.6. Epidemiyoloji.....	28

Sayfa

2.7. Klinik.....	30
2.8. HIV Tanı Testleri	32
2.9. Antiretroviral Tedavinin Moleküler Temelleri	34
2.9.1. HIV giriş inhibitörleri.....	35
2.9.2. Ters transkripsiyon inhibisyonu	36
2.9.3. İntegraz inhibisyonu	37
2.9.4. Proteaz inhibisyonu	37
2.10. HIV İlaç Direnci Mekanizmaları.....	38
2.11. HIV İlaç Direnci Testleri	40
2.11.1. Genotipik testler	41
2.11.2. Proviral DNA testleri.....	50
2.11.3. Fenotipik testler	50
2.11.4. Tropizm testleri	51
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	53
3.1. HIV-1 gerçek zamanlı ters transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu.....	54
3.1.1. HIV RNA ekstraksiyonu	55
3.1.2. HIV RNA amplifikasyonu.....	56
3.2. Sanger Yöntemiyle Dizileme	56
3.2.1. Primerlerin hazırlanması	56
3.2.2. Ters transkripsiyon ile komplementer DNA (cDNA) sentezlenmesi.....	57
3.2.3. Nested PCR yöntemi ile amplifikasyon aşaması.....	58
3.2.4. Amplifikasyon ürünlerinin jel elektroforezinde görüntülenmesi	61
3.2.5. PCR ürünlerinin saflaştırılması (pürifikasyon aşaması).....	62
3.2.6. Florometrik yöntem ile DNA miktar tayini.....	63
3.2.7. Sanger dizileme için BigDye karışımının hazırlanması	63
3.2.8. BigDye karışımının saflaştırılması; Presipitasyon aşaması.....	65

Sayfa

3.2.9. Sanger dizileme aşaması.....	65
3.3. Yeni Nesil Dizileme Aşaması	66
3.3.1. DNA'nın kısa fragmanlara ayrılması ve adaptör dizilerin eklenmesi: tagmantasyon	66
3.3.2. Kütüphane Amplifikasyonu.....	67
3.3.3. Manyetik bilye pürifikasyon.....	68
3.3.4. Saflaştırılmış DNA kütüphanelerinin normalizasyonu	69
3.3.5. Yeni nesil dizileme aşaması	69
3.4. Verilerin Analizi.....	70
4. BULGULAR.....	71
4.1. HIV RNA Real Time PCR ve CD4+ sonuçları.....	71
4.2. Alt Tiplerin Belirlenmesi	72
4.3. Sanger Dizileme ve Yeni Nesil Dizileme ile Tespit Edilen Mutasyonların Değerlendirmesi.....	73
4.3.1. Sanger Dizileme Sonuçları	73
4.3.2. Yeni Nesil Dizileme Sonuçları.....	73
4.3.3. Direnç durumunun incelenmesi.....	77
4.3.4. Mutasyonların incelenmesi.....	81
4.4. Viral Yük, CD4+ Sayısı ve DRM Frekansı Arasındaki İlişkinin İncelenmesi	88
4.5. Filogenetik Analiz	91
5. TARTIŞMA	93
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	103
KAYNAKLAR	105
EKLER.....	131
Ek-1 Etik Kurul Raporu	132
ÖZGEÇMİŞ	134

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Mevcut antiretroviral ilaçlar	35
Çizelge 3.1. Ekstraksiyon için kullanılan solüsyonlar.....	55
Çizelge 3.2. Real-Time RT-PCR için kullanılan solüsyonlar	56
Çizelge 3.3. Primer dizileri.....	57
Çizelge 3.4. Komplementer DNA sentezinde kullanılan solüsyonlar	58
Çizelge 3.5. Komplementer DNA sentezi termal döngü ayarları.....	58
Çizelge 3.6. Birinci amplifikasyon aşaması PCR reaksiyon karışımı	59
Çizelge 3.7. Birinci amplifikasyon aşaması için termal döngü ayarları	59
Çizelge 3.8. Birinci aşama PCR reaksiyonu kullanılan primer dizileri.....	59
Çizelge 3.9. İkinci amplifikasyon aşaması PCR reaksiyon karışımı.....	60
Çizelge 3.10. İkinci amplifikasyon aşaması termal döngü ayarları.....	60
Çizelge 3.11. İkinci aşama PCR reaksiyonu için kullanılan primer dizileri	61
Çizelge 3.12. Sanger dizileme aşaması için BigDye reaksiyon karışımı miktarları	64
Çizelge 3.13. BigDye karışımı termal döngü ayarları	64
Çizelge 3.14. Tagmantasyon aşaması termal döngü ayarları	66
Çizelge 3.15. Tagmantasyon aşaması reaksiyon bileşenleri	67
Çizelge 3.16. Kütüphane amplifikasyonu termal döngü cihazı ayarları	68
Çizelge 4.1. CD4+ T lenfosit sayısı, viral yük değerleri, cinsiyet ve yaş grupları dağılımı.....	71
Çizelge 4.2. CD4+ T lenfosit sayısının HIV viral yük değerlerine göre dağılımı.....	72
Çizelge 4.3. Cinsiyet, yaş, viral yük, CD4+ T lenfosit sayıları ve İlaç direnci mutasyonlarının (DRM) türü ve frekansı	74
Çizelge 4.4. PR ve RT gen bölgelerinde mutasyon tespit edilen örnek sayısı	78
Çizelge 4.5. PR ve RT gen bölgelerinde DRM tespit edilen örnek sayısı.....	78
Çizelge 4.6. PR majör, aksesuar ve diğer mutasyon tespit edilen örnek sayısı.....	78

Çizelge	Sayfa
Çizelge 4.7. RT NRTI, NNRTI ve diğer mutasyon tespit edilen örnek sayısı	79
Çizelge 4.8. PR ve RT bölgelerinde örneklerin tamamında gözlenen mutasyon sayıları	82
Çizelge 4.9. Örneklerin tamamında gözlenen PR ve RT DRM sayıları.....	83
Çizelge 4.10. PR ve RT bölgelerinin farklı mutasyon gruplarında örneklerin tamamında gözlenen mutasyon sayıları	84
Çizelge 4.11. DRM'ler ve sayıları.....	87
Çizelge 4.12. Viral yük ve DRM frekansı arasındaki ilişkinin incelenmesinde kullanılan Kruskal Wallis-H yönteminin ayrıntıları.....	89
Çizelge 4.13. CD4+ sayıları ve DRM frekansı arasındaki ilişkinin incelenmesinde kullanılan Kruskal Wallis-H yönteminin ayrıntıları.....	90

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. HIV alt tipleri.....	7
Şekil 2.2. Dünya genelinde alt tiplerin görülme sıklığı	8
Şekil 2.3. CRF01_AE rekombinant form	9
Şekil 2.4. CRF04_cpx rekombinant form	9
Şekil 2.5. HIV yapısı.....	11
Şekil 2.6. Zarf proteini	12
Şekil 2.7. HIV kapsidi.....	13
Şekil 2.8. HIV yapısal proteinleri	14
Şekil 2.9. HIV tüm genom haritası	15
Şekil 2.10. HIV ters transkriptaz enzimi.....	17
Şekil 2.11. HIV ters transkriptaz enzimi.....	17
Şekil 2.12. HIV integras enzimi	17
Şekil 2.13. HIV proteaz enzimi.....	18
Şekil 2.14. HIV replikasyon döngüsü	21
Şekil 2.15. Zarf proteininin tutunması CD4+ proteinine tutunması	22
Şekil 2.16. Reseptörler.....	23
Şekil 2.17. TRIM5 ve siklofilin A	24
Şekil 2.18. Ters transkriptaz enziminin polimeraz aktif bölgesi	25
Şekil 2.19. İntazom (Ön entegrasyon kompleksi).....	26
Şekil 2.20. HIV laboratuvar tanı algoritması	32
Şekil 2.21. HIV serolojik testleri	33
Şekil 2.22. Nevirapine mekanizması	37
Şekil 2.23. Primer ID yöntemi	44
Şekil 2.24. Sanger ve yeni nesil dizileme	45

Şekil	Sayfa
Şekil 2.25. Yeni nesil dizileme	47
Şekil 3.1. Çalışma yönteminin aşamaları	54
Şekil 4.1. Alt tip ve rekombinant formların oransal dağılımı	72
Şekil 4.2. PR ve RT gen bölgelerinde mutasyon tespit edilen örnek sayılarının karşılaştırılması	79
Şekil 4.3. PR ve RT gen bölgelerinde mutasyon tespit edilen örnek sayılarının karşılaştırılması	80
Şekil 4.4. PR majör ve aksesuar mutasyon tespit edilen örnek sayılarının karşılaştırılması	80
Şekil 4.5. NRTI ve NNRTI DRM tespit edilen örnek sayılarının karşılaştırılması	81
Şekil 4.6. PR ve RT bölgeleri diğer mutasyon tespit edilen örnek sayılarının karşılaştırılması	81
Şekil 4.7. PR ve RT bölgelerinde örneklerin tamamında gözlenen mutasyon sayılarının karşılaştırılması	83
Şekil 4.8. PR ve RT DRM sayılarının karşılaştırılması	84
Şekil 4.9. PR majör ve aksesuar DRM gruplarında mutasyon sayılarının karşılaştırılması	85
Şekil 4.10. RT NRTI ve NNRTI DRM gruplarında gözlenen mutasyon sayılarının karşılaştırılması	85
Şekil 4.11. PR ve RT diğer mutasyon grubunda gözlenen mutasyon sayılarının karşılaştırılması	86
Şekil 4.12. DRM'ler ve sayıları	88
Şekil 4.13. Viral yük ve DRM frekansı arasındaki ilişkinin incelenmesi.	89
Şekil 4.14. CD4+ sayıları ve DRM frekansı arasındaki ilişkinin incelenmesi.....	90
Şekil 4.15. Referans genom dizileriyle yapılan filogenetik ağaç	91

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler

µl	Mikrolitre
dk	Dakika
gr	Gram
mg	Milligram
ml	Mililitre
nm	Nanometre
sn	Saniye

Kısaltmalar

Açıklamalar

Ab	Antibody (Antikor)
ABC	Abacavir
ABD	Amerika Birleşik Devletleri
ADR	Edinilmiş ilaç direnci
Ag	Antigen (Antijen)
AIDS	Acquired Immunodeficiency Syndrome (Edinsel immün yetmezlik sendromu)
AMV	Avian myeloblastosis virüs (Kuş miyeloblastoz virüsü)
ART	Antiretroviral tedavi
Asp	Aspartik asit
ATV	Atazanavir
AZT	Azidothymidine
CA	Capside (Kapsid)

Kısaltmalar	Açıklamalar
CCR	C-C kemokin reseptör
cDNA	Komplementer DNA
CRF	Circulating recombinant forms (Dolaşımdaki rekombinant form)
CRS	Cis-acting repressive sequences (Cis-etkili baskılayıcı diziler)
CXCR	C-X-C kemokin reseptör
d4T	Stavudine
DBS	Dried blood spot (Kurutulmuş kan lekesi)
ddI	Didanosine
ddNTP	Dideoksi nükleotid trifosfat
DLV	Delavirdine
DNA	Deoksiribo nükleik asit
dNTP	Deoksi nükleotid trifosfat
DRV	Darunavir
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
DTG	Dolutegravir
EFV	Efavirenz
ENF	Enfuvirtide
env	Envelope (Zarf)
ESCRT	Endosomal sorting complex required for transport (Taşıma için Gerekli Endozomal Ayırma Kompleksleri)
ETR	Etravirine
EWI-HIVDR	Early warning indicators for HIV drug resistance (HIV İlaç Direnciyle İlişkili Erken Uyarı Göstergeleri)
FDA	Food and Drug Administration (Amerika İlaç ve Gıda Dairesi)
FPV	Fosamprenavir

Kısaltmalar	Açıklamalar
FTC	Emtricitabine
gag	Gruba özgü antijen
gp	Glikoprotein
HIV	Human immunodeficiency virüs (İnsan immün yetmezlik virüsü)
HIVDR	HIV drug resistance (Antiretroviral ilaç direnci)
HR	Heptad repeat region
HR1	N-terminal heptad tekrar bölgesi 1
HTLV	Human T-lymphotropic virus type 1 (İnsan T hücre lenftropik virüsü)
IDV	Indinavir
IFN	İnterferon
IN	İntegraz
INS	Inhibitory/Instability RNA sequences (İnhibitör/kararsız RNA dizileri)
INSTI	İntegraz inhibitörü
LAV	Lenfadenopat ilişkili virus
LEDGF	Lens epithelium derived growth factor (Lens epitelinden türetilen büyüme faktörü)
LPV	Lopinavir
LTR	Long repeat terminals (Uzun terminal tekrar bölgesi)
MA	Matriks
MMuLV	Moloney murin lösemi virüsü
mRNA	Mesajcı ribo nükleik asit
MVC	Maraviroc
NAT	Nükleik asit testleri
NC	Nükleokapsid
nef	Negative factor (Negatif düzenleyici faktör)

Kısaltmalar	Açıklamalar
NFV	Nelfinavir
NRTI	Nükleosid ters transkriptaz inhibitörü
NVP	Nevirapine
ORF	Open reading frame (Açık okuma bölgesi)
PBMC	Periferik kan mononükleer hücreleri
PCR	Polymerase chain reaction (Polimeraz zincir reaksiyonu polymerase chain reaction)
PE	Psi elements (Psi elemanları)
PI	Proteaz inhibitörü
pol	Polimeraz
PR	Proteaz
PrEP	Maruziyet öncesi profilaksi
Primer ID	Primer tanımyalıcı diziler
Rev	Virion regülatör proteini
rev	Regulator of virion (virion regülatörü)
RGV	Raltegravir
RNA	Ribonükleik asit
RPV	Rilpivirine
RRE	Rev duyarlı eleman
RT	Reverse transcriptase (Ters transkriptaz)
RTV	Ritonavir
SIV	Maymun yetmezlik virüsü
SP	Spacer peptide (Aralayıcı peptid)
SQV	Saquinavir
SU	Yüzeyel zarf glikoproteini gp120
TAF	Tenofovir alafenamide

Kısaltmalar**Açıklamalar**

TAR	Viral transaktivasyon için hedef gen bölgesi
tat	Trans-activator of transcription (Transkripsiyonun transaktivasyonu)
TCR	T hücre reseptörü
TDF	Tenofovir
TDR	Aktarılan ilaç direnci
TM	Transmembran zarf glikoproteini gp41
TNF	Tümör nekroz faktör
TPV	Tipranavir
tRNA	Taşıyıcı RNA
UNAIDS	The Joint United Nations Program on HIV/AIDS
URF	Unique recombinant form (Benzersiz rekombinant form)
V	Variable (Değişken)
V3	Değişken bölge 3
VF	Virologic failure (Virolojik başarısızlık)
vif	Viral infectivity factor (Viral enfeksiyon faktörü)
vpr	Viral protein R
vpu	Viral protein U
YND/NGS	Yeni nesil dizileme/Next-generation sequencing
ZDV	Zidovudine
3TC	Lamivudi

1. GİRİŞ

İnsan İmmün Yetmezlik Virüsü, *Retroviridae* ailesinde, *Orthoretrovirinae* alt familyasının, *Lentiviridae* grubuna ait olan bir RNA (Ribonükleik asit) virüsüdür. Bağışıklık sisteminin temel organizatör hücrelerinden biri olan yardımcı T hücreleri (CD4+ T lenfosit) enfekte ederek bu hücrelerin sayısının azalmasına neden olmaktadır ve vücudu enfeksiyon etkenlerine karşı savunmasız bırakmaktadır. Enfeksiyonun ileri evresi olan Edinsel İmmün Yetmezlik Sendromu (AIDS/Acquired Immunodeficiency Syndrome) döneminde fırsatçı enfeksiyonlar görülmektedir ve bu enfeksiyonlar HIV ile enfekte kişilerde önemli morbidite ve mortalite nedenlerindendir. Başlıca bulaşma yolları, HIV ile enfekte kişiyle korunmasız cinsel ilişki, parenteral (Enfekte kan ve kan ürünleri kullanımı, kontamine iğne paylaşımları ve yaralanmaları) ve anneden bebeğe perinatal yolla bulaş olarak bilinmektedir [1].

İnsan immün yetmezlik virusu (HIV) enfeksiyonu yıllık küresel insidansında ve ölüm oranlarında azalma olmasına rağmen prevalansındaki artış nedeniyle önemini korumaktadır. UNAIDS (The Joint United Nations Program on HIV/AIDS) 2020 verilerine göre 2019 yılının sonunda dünyada 38 milyon kişinin enfekte olduğu ve hastalığın tanımlandığı 1981 yılından beri 32 milyon kişinin hayatını bu hastalıktan kaybettiği bilinmektedir [2]. Ülkemizde ilk defa 1985 yılında HIV/AIDS vakaları bildirilmiş. Daha sonra her yıl vaka sayılarında giderek artma gözlenmiştir. Türkiye Halk Sağlığı Kurumu'nun Kasım 2020 verilerine göre ülkemizde 1985 ve 2020 yılları arasında toplam 25809 HIV pozitif ve 1958 AIDS vakası vardır [3].

Amerikan Hastalık Kontrol (CDC) ve Halk Sağlığı Laboratuvarları Birliği, 2014 senesinde akut HIV-1'in daha doğru teşhisine ve HIV-2'nin tespit edilmesine yönelik yeni bir HIV teşhis algoritması yayınlamıştır. Bu tanı yaklaşımında, bir antijen-antikor testi ile ilk tarama ve bir HIV-1/2 ayırma testi kullanılarak reaktif numunelerin pozitifliğinin kontrolünü sağlayan testlerden yararlanılması önerilmektedir [4]. Uzun bir süredir, antikor testleri, HIV tanı algoritmasında ilk laboratuvar testi olarak yaygın şekilde kullanılmıştır. 2014 yılından bu yana, HIV antikor testlerinin ilk tarama testi olarak kullanımının yerini HIV antijen-antikor testleri almıştır [4,5]. Ülkemizde de CDC'nin önerileri doğrultusunda bu tanı yaklaşımı benimsenmiştir.

Antiretroviral tedavi (ART) etkinliğinin takibi altın standart kabul edilen viral yükün saptanmasına dayanmaktadır. Viral yük saptanmasına yönelik testler tedavi başarısızlığının erken tespitini sağlamaktadır ve bir sonraki ilaç rejimine geçişi hızlandırmaktadır [6,7]. Viral yük takibinde kullanılan testlerinin yaygın kullanımı ile, ikinci basamak tedaviye geçen hastaların dünya genelinde 2030 yılına kadar yaklaşık 4-6 milyon olacağı ve bunun ART'deki tüm hastaların yaklaşık % 20'sini kapsayacağı tahmin edilmektedir [8]. Birleşmiş Milletler AIDS programı olan UNAIDS tarafından duyurulan 90-90-90 kuralı; 2020 yılı itibarıyla dünya genelinde HIV ile enfekte insanların en az %90'ının tanı almış ve HIV taşıyıcısı olduklarının farkında olmalarını, bu bireylerin en az %90'ının kesintisiz ART'ye erişmiş olmalarını, ilaç tedavisi sürdüren kişilerin en az %90'ında viral yük düzeyinin belirlenemeyen seviyede sağlanmış olmasını hedefleyen küresel bir program ve farkındalık kampanyasıdır [9].

HIV ilaç direnciyle ilişkili mutasyonlar genotipik ve fenotipik analizler olmak üzere iki farklı yöntem kullanılarak tespit edilebilmektedir. HIV ilaç direnç testleri çoğunlukla genotipik analizler kullanılarak tespit edilmektedir. Genotipik direnç testleri, viral genomdaki dirençle ilişkili olduğu bilinen amino asit değişikliklerini/mutasyonları tanımlayan ve dizileme esasına dayanan analizlerdir. Genotipik direnç analizleri, Sanger Zincir Sonlandırma ve Yeni Nesil Dizileme (YND, NGS/Next Generation Sequencing) gibi sekanslamaya dayalı yaklaşımları içermektedir [10]. HIV ilaç direncinin tespitinde 2000'li yıllardan beri kullanılan ve altın standart olarak kabul edilen Sanger dizileme esasına dayanan testler viral popülasyonun %15-20 arasında görülen mutasyonları saptayabilirken, düşük frekanslarda görülen dirençle ilişkili mutasyonların saptanmasında düşük duyarlılığa sahiptir bazı alt tiplerin ve antiretroviral ilaç direnci profillerinin tanımlanmasında yetersiz kalmaktadır [11].

İkinci basamak tedavi rejiminde bulunan hastaların yaklaşık %10-40'ının tedavi başarısızlığına sahip olduğu bilinmektedir [12]. Sınırlı sayıda üçüncü basamak ilaç seçenekleri nedeniyle, dirençli virüsleri barındıran kişilerin belirlenmesi ve optimal tedavi seçimini yönlendirmek HIV genotiplendirme testlerinin yokluğunda karmaşık hale gelebilmektedir. HIV genotiplendirmesinin ilkelerini anlamak, buna yönelik uygun sürveyans geliştirmek, tedavi algoritmalarını bilmek ve özellikle zor klinik vakaları yönetmek için yararlıdır. Genotiplendirmenin rutin klinik değerlendirmelerin bir parçası olduğu yüksek gelirli ülkelerde, bu yaklaşım, klinisyenlerin ilaca dirençli virüslerle enfekte

olan hastalar için en etkili rejimleri seçerek virolojik başarısızlığı önlemesine yardımcı olmaktadır [10].

Yeni nesil dizilemeyi esas alan moleküler tanı testleri ile HIV genomundaki ters transkriptaz (RT, reverse transcriptase), proteaz (PR) ve integras (IN) gen bölgelerine ait antiretroviral ilaç ilişkili mutasyonlar eş zamanlı olarak, etkin, uygun maliyetlerle ve kısa sürelerde saptanabilmektedir. Son yıllarda geliştirilen yeni nesil dizileme teknolojisi, genom varyasyonları hakkında bilgi üretimini sağlayan önemli bir sekanslama aracı olmuştur [13]. Yeni Nesil Dizileme yöntemleri, Sanger dizilemeye kıyasla yüksek duyarlılığı ve kısa geri dönüş süreleri göz önüne alındığında, HIV tedavi rejimlerinin optimum seçiminde kapsamlı bilgiler sağlayabilmektedir. Yeni nesil dizileme sistemleriyle yüksek doğrulukla, ultra hızlı olarak, aynı anda paralel olarak çok sayıda nükleik asit dizisinin sekanslaması yapılabilmektedir. Bu yöntemle elde edilen bir mikrobiyal genom dizisi araştırmacılara başka hiçbir deneysel yöntemle elde edilemeyecek kadar zengin ve özgün bilgi sağlamaktadır [14].

Bu çalışmada HIV genotiplendirmesinde kullanılan yeni nesil dizileme yönteminin değerlendirmesi yapılarak Sanger dizileme yöntemiyle etkinliğin karşılaştırılması hedeflenmiştir. HIV genotiplendirmesinde YND yöntemleriyle daha önce yapılan çalışmalarda Illumina'ya ait MiSeq cihazı kullanılarak değerlendirmeler yapılmıştır. Biz bu çalışmayla MiSeq cihazına göre maliyeti daha düşük olup kaynakların kısıtlı olduğu durumlarda elde edilmesi daha mümkün olan ve kullanımı daha pratik olan Illumina'ya ait iSeq 100 platformunu kullandık. Aynı zamanda, HIV genotiplendirmesinde yeni nesil dizileme yöntemi kullanılarak Türk populasyonu üzerinde yapılan araştırmalar sınırlı sayıda olup, bu çalışmayla birlikte bu alanda yapılan araştırmalara bir yenisi daha eklenmiştir. Bu sayede HIV enfeksiyonlarının izleminde yeni yaklaşımlar ön plana çıkacaktır ve olguların yönetiminde ilerlemeler kaydedilecektir.

Bu çalışmadan elde edilen veriler doğrultusunda, HIV genotiplendirme ve alt tiplerin belirlenmesiyle ülkemizde dolaşan HIV alt gruplarının ve rekombinant formlarının sürveyansında yapılan çalışmalara katkı sağlanacak olup, bu sayede epidemiyolojik olarak HIV'nin nasıl yayıldığını anlamak daha kolay olacaktır. İnsan İmmün Yetmezlik Virusu'na ait mutasyonlar, rekombinasyonlar, kısaca genetik değişiklikler belirlenerek HIV alt tiplerinin AIDS'e progresyonu açığa çıkaracak bilgiler elde edilecektir ve bu konuda

ilerleyen dönemlerde yapılacak çalışmalara yön verecektir. Bu çalışma, genotip ve alt tiplerin tedavi rejimleri üzerindeki etkisine yönelik yapılan araştırmalara yön verme niteliğinde olup, aşı çalışmalarına zemin hazırlayacak HIV genomuna ait yeni bilgiler sunacaktır.



2. GENEL BİLGİLER

İnsan İmmün Yetmezlik Virüsü, *Retroviridae* ailesinde, *Orthoretrovirinae* alt familyasının, *Lentiviridae* grubuna ait olan bir RNA (Ribonükleik asit) virüsüdür. HIV, esas olarak, bağışıklık sisteminin temel organizatör hücrelerinden olan yardımcı T hücreleri (CD4+ T lenfosit) enfekte ederek zamanla bu hücrelerin sayısının azalmasına neden olmaktadır ve bağışıklık sistemini baskılayarak vücudu enfeksiyon etkenlerine karşı savunmasız bırakmaktadır. Enfeksiyonun ileri evresi olan Edinsel İmmün Yetmezlik Sendromu (AIDS/Acquired Immunodeficiency Syndrome) döneminde HIV enfeksiyonu tanısı almış bireylerde fırsatçı enfeksiyonlar görülmektedir ve bu enfeksiyonlar HIV ile enfekte kişilerde önemli morbidite ve mortalite nedenlerindendir. Başlıca bulaşma yolları, HIV ile enfekte kişiyle korunmasız cinsel ilişki, parenteral (Enfekte kan ve kan ürünleri kullanımı, kontamine iğne paylaşımları ve yaralanmaları) ve anneden bebeğe perinatal yolla bulaş olarak bilinmektedir [1].

2.1. Tarihçe

Virüsün 20. yüzyılın ilk yarısında primatlardan insanlara geçtiği düşünülmektedir. Bu varsayımın nedeni, bu hayvanları enfekte eden Maymun Yetmezlik Virüsünün (SIV/Simian Immunodeficiency Virus), HIV ile olan benzerliğidir ve virüs primatlarda, HIV ile enfekte olmuş insanlarınkine benzer semptomları tetiklemektedir [15]. İlk HIV enfeksiyonu vakalarının Afrika'da görüldüğüne dair genel bir varsayım vardır. Hastalık Afrika'dan Haiti'ye ve oradan da 1981 yılında ilk HIV vakalarının tanımlandığı Amerika Birleşik Devletleri'ne (ABD) kadar izlenebilmektedir [16,17]. Avrupa'da ilk enfeksiyonlar Ekim 1983'te 267 vaka sayısı ile rapor edilmiştir [18]. New York'taki Aaron Diamond AIDS Araştırma Merkezi'nden Dr. David Ho ve meslektaşları bir konferansta ilk HIV enfeksiyonu vakasını 1959'da Belçika Kongosu'nda yaşayan bir kişiye kadar izlediklerini bildirmişlerdir. Bantu kabilesinin üyesi olan kişiden alınan kan numunesinde HIV bulunmuştur. Örnekteki HIV izolatının, şu anda tüm dünyada bulunan birkaç HIV alt türünün atası olduğu düşünülmektedir. Bu varsayım, 1959 yılından çok önce olmayan bir zaman diliminde, HIV'in Afrika nüfusuna ilk girişinden sonra evrimleştiğini göstermektedir [19].

Luc Montagnier, 1983 yılında lenfadenopati semptomları olan bir hastadan HIV'i izole eden ilk kişidir. Virüse Lenfadenopati İlişkili Virüs (LAV, Lymphadenopathy Associated Virus)

adını vermiştir [20]. Aylar sonra, aynı virüs, şu anda bilinen lenfotropik retrovirüslerle benzerliğinden dolayı, İnsan T Hücreli Lenfotropik Virüsü (HTLV III) olarak Robert Gallo tarafından adlandırılmıştır ve tekrar izole edilmiştir [21–24].

HIV için ilk testler 1985 yılında yapılmıştır. Bu testler kandaki virüse karşı gelişen antikorların saptanmasına dayanmaktaydılar. Bu testler, virüslerle kontamine olmuş kan ürünlerin tespit edilmesine olanak sağlamıştır [25]. Virüsün T hücreleri ve makrofajların CD4+ reseptörlerine bağlanması aynı yıl kanıtlanmıştır [26,27]. 1986 yılında, HIV-2 keşfedilmiştir [28] ve yaşam süresini uzatan ilk ilaç kabul edilen Zidovudine (AZT) piyasaya sürülmüştür [29]. 1996 yılından beri, birkaç virostatikle kombinasyon tedavisi, HIV enfeksiyonu için standart tedavi haline gelmiştir [30].

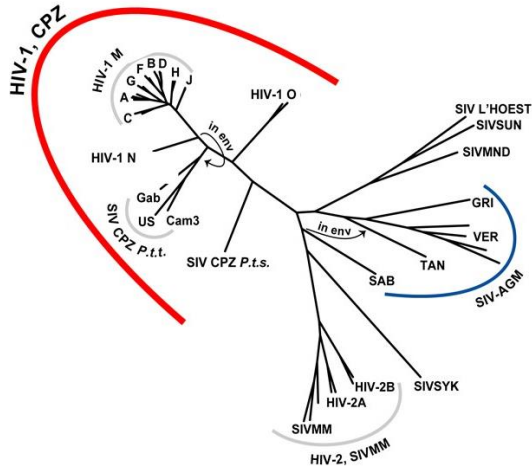
Yüksek Etkili Antiretroviral Terapi (HAART/Highly Active Antiretroviral Therapy) varlığı, 1990 yılının ortalarında, HIV enfeksiyonunu ölümcül bir hastalık olmaktan çıkarıp, kronik bir hastalığa dönüştürmüştür. Modern antiretroviral kombinasyon tedavisi, HIV enfeksiyonu ile ilişkili morbidite, mortaliteyi ve bulaşma riskini önemli ölçüde azaltmaktadır [31].

2.2. Tipler

Genetik ve antijenik değişikliklerine göre iki ana tipi mevcut olup bunlar HIV-1 ve HIV-2'dir (Şekil 2.1). HIV-2, genetik olarak HIV-1'den %55'ten fazla farklılık göstermektedir [32]. İlk olarak keşfedilen HIV-1, dünya çapında en yaygın ana tipken, HIV-2 en çok Batı Afrika'da yaygındır [33]. Klinik olarak benzer hastalıklara neden olmaktadır ve HIV-1 ile bulaşma yolları aynı olan HIV-2, daha yavaş AIDS'e neden olmaktadır [34]. Her ikisinin de simian immün yetmezlik virüsü (SIV) barındıran iki doğal konakçıdan ortaya çıktığı düşünülmektedir: HIV-1, şempanzeleri enfekte eden SIVcpz tarafından insan enfeksiyonundan [35] ve HIV-2, sooty mangabeylerin barındırdığı SIVsmm enfeksiyonundan kaynaklanmıştır [36].

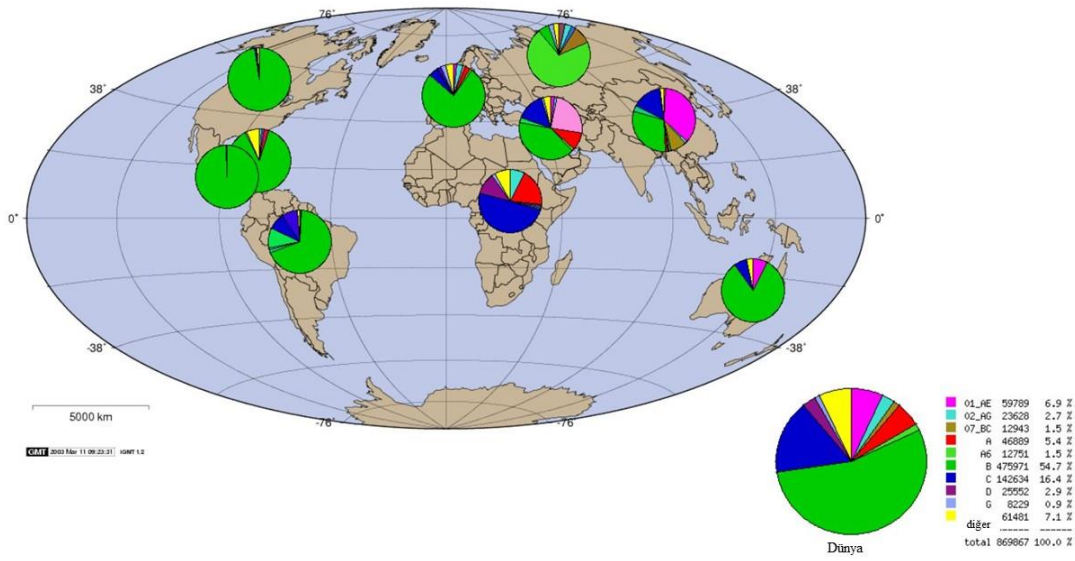
Her bir ana HIV tipi, kendi arasında alt gruplara ayrılmaktadır (Şekil 2.1). HIV-1, M (Main; Ana), O (Outlier; Aykırı), N (non-M or O; M veya O Olmayan) ve P gruplarını içerirken [37], bilinen 8 adet HIV-2 grubu (A-H) bulunmaktadır [38]. HIV-2 gruplarından A ve B yaygın olarak görülmektedir ve A grubu esas olarak Batı Afrika'da bulunmaktadır, ancak aynı zamanda küresel olarak Angola, Mozambik, Brezilya, Hindistan, Avrupa ve ABD'de

görülmektedir. HIV-2 grubu olan B, küresel olarak birçok ülkede görülmesine rağmen esas olarak Batı Afrika ile sınırlıdır [38–40]. HIV-1 O, N ve P grupları da Kamerun ve çevresinde ki ülkelerde sıklıkla görülmektedir [41–44].



Şekil 2.1. HIV alt tipleri

M grubu içinde nükleotid dizi analizlerine dayanarak, A-K'ya (A1, A2, A3, A4, A6, B, C, D, F1, F2, G, H, J ve K) farklı alt tipler belirlenmiştir. Herhangi bir alt tipteki, genom dizileri diğer alt tipteki genom dizilerine kıyasla birbirlerine daha benzerdir ve bu alt tipler, farklı HIV soylarını temsil etmektedir [37]. Alt tiplerin görülme sıklığı da coğrafi olarak farklılıklar göstermektedir (Şekil 2.2). Kuzey Amerika, Latin Amerika, Karayipler, Avrupa, Japonya ve Avustralya'da sıklıkla alt tip B görülmektedir. Çoğu alt tip Sahra Altı Afrika'da bulunmaktadır; A ve D alt tipleri Güney Afrika'da, C alt tipi Orta ve Doğu Afrika'da sık görülmektedir [45]. Hindistan, Nepal ve Çin'in bazı bölgelerinde alt tip C baskındır [46]. Zaire ve Kamerun'da alt tip H, Tayland ve Orta Afrika alt tip E, Brezilya ve Romanya'da alt tip F, Rusya ve Gabon'da alt tip G, Kongo ve Kamerun'da alt tip K sık görülmektedir. Amerika ve Avrupa'da baskın alt tip B'dir. HIV klinik araştırmalarının büyük çoğunluğu alt tip B'nin baskın olduğu popülasyonlarda gerçekleştirilmiştir [47].



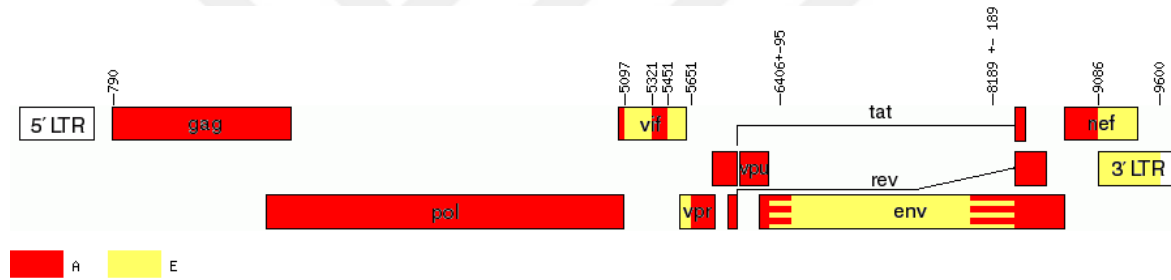
Şekil 2.2. Dünya genelinde alt tiplerin görülme sıklığı [48]

Tiplendirme sistemi, virüsleri genetik benzerliklerine göre organize etmek için kullanılmaktadır. Alt tipler HIV-1 genom dizilerine göre tanımlandığından, bazı durumlarda prototip sekanslar mevcut değildir. Örneğin, eski alt tipler olan E ve I, günümüzde rekombinant formlar olarak tanımlanmaktadır ve bu durum virüsün prototip ve rekombinant formları arasında ayırım yapmayı zorlaştırarak, isimlendirmede tartışmalara neden olmaktadır. Ek olarak, bir alt tip içindeki virüsler farklı oranlarda evrimleşmektedir ve özellikle genomun bazı bölgelerinde, alt tipler arasında değişik oranlarda farklılıklar gözlemlenmektedir. Yeni diziler ve daha iyi dizi analiz araçları kullanıldıkça, belirsizlikler çözülerek alt tiplerin isimlendirme sistemi geliştirilebilir [37].

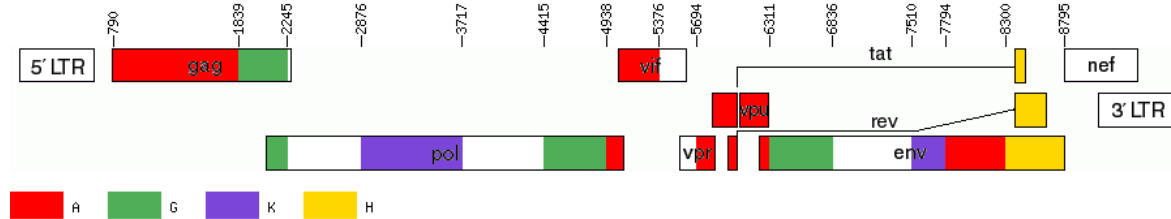
Retrovirüsler, diğer yakından ilişkili retrovirüslerle birleşerek rekombinant formlar oluşturma eğilimindedir. Viral genom, tek zincirli RNA'nın iki kopyası olarak paketlenmektedir ve hücre aynı veya farklı alt tipte iki farklı viral genomla enfekte olursa, bazı viral paketler bu iki virüsün her birinden bir kopya içerebilmektedir. İki alt tip, HIV-1 M grubunun farklı alt tiplerinden ise, ters transkripsiyon sırasında viral ters transkriptazın paketlenmiş genomlardan birinden diğerine atlaması ve "şablon değiştirme" sırasında, iki alt tipin her birinden bölgeler içeren mozaik genomlar ortaya çıkabilmektedir. Rekombinant formlar oldukça yaygındır, ancak bunların çoğu sadece tek bir hastada görülmektedir ve bu formlar, "benzersiz rekombinant form (URF, unique recombinant form)" olarak adlandırılmaktadır. Eğer bir rekombinant form birçok kişiye aktarırsa, HIV enfeksiyonunun dolaşan suşlardan biri haline gelir ve bu formlar "dolaşımdaki rekombinant

form (CRF, circulating recombinant form)" olarak sınıflandırılmaktadır. CRF'ler, epidemiyolojik olarak ilişkili olmayan üç veya daha fazla kişiyi enfekte eden rekombinant HIV-1 genomlarını temsil etmektedir ve bu formların, HIV-1 M grubu epidemisine katkısı olduğu varsayılmaktadır. Dolaşımdaki rekombinant formlar harfler yerine sayılarla etiketlenmektedir [37].

CRF01 başlangıçta rekombinant olmayan bir suş olarak kabul edilmiştir ve alt tip E olarak adlandırılmıştır (Şekil 2.3). Daha sonraki analizler, genomun A ve E alt tiplerinin rekombinant bir formu olma olasılığının daha yüksek olduğunu göstermiştir. HIV isimlendirme komitesi oylama yoluyla bu suşu CRF01_AE olarak adlandırmaya karar vermiştir [49–51]. Aynı şekilde, CRF04_cpx (Şekil 2.4) eski alt tip olan I, A, G, H ve K alt tiplerinin rekombinantı olan bir CRF'dir [52–54].



Şekil 2.3. CRF01_AE rekombinant form. Epidemik olarak Asya'da yayılan ancak Orta Afrika'dan kaynaklandığı varsayılan bir A/E rekombinant alt tipini temsil etmektedir [49–51].

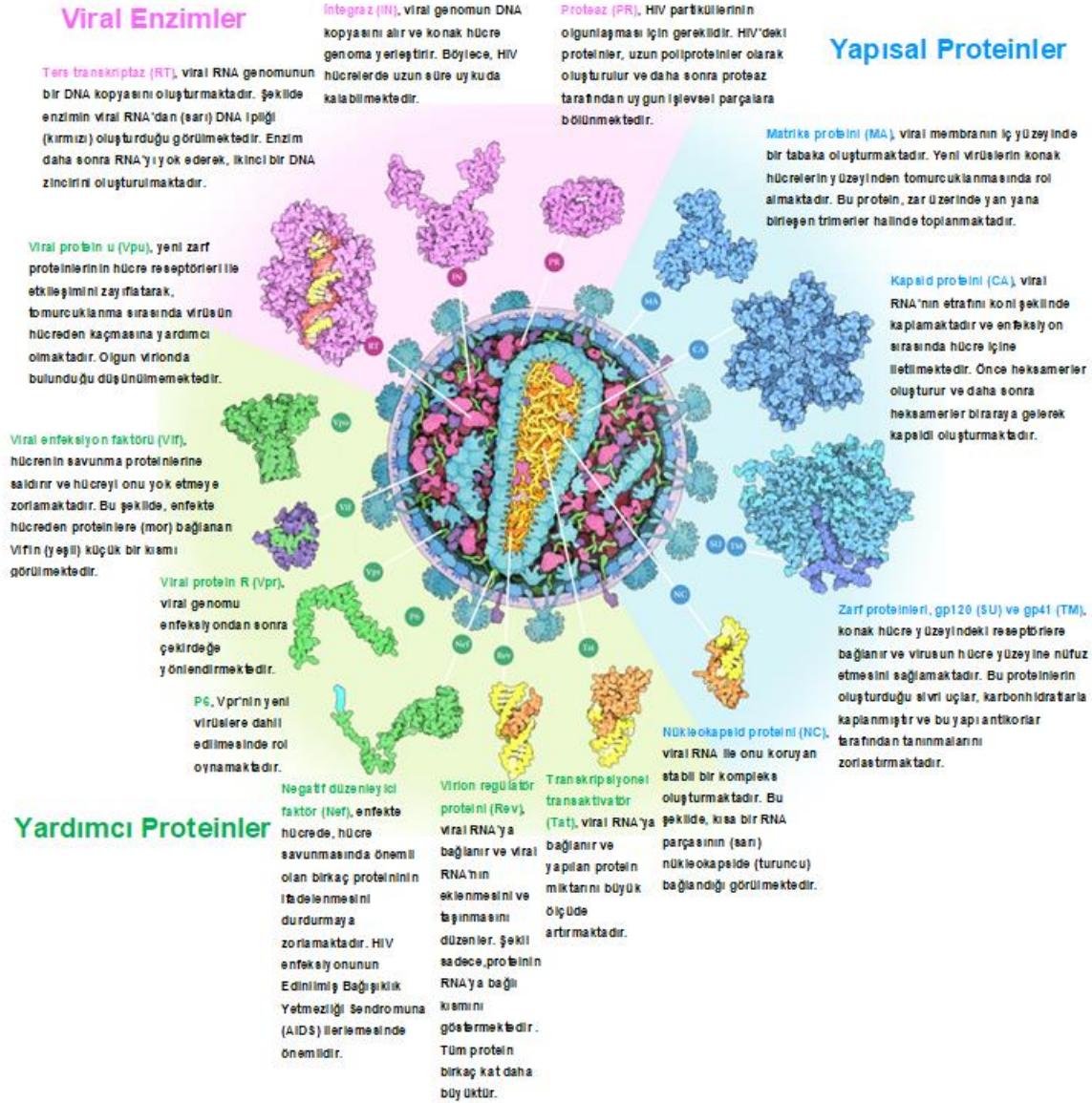


Şekil 2.4. CRF04_cpx rekombinant form. Daha önce A/G/I rekombinantı olarak sınıflandırılmış Kıbrıs/Yunan rekombinant formunu temsil etmektedir [52–54].

2.3. Yapısı

HIV, yapı olarak diğer retrovirüslerden farklılıklar göstermektedir. Eritrosit hücresinden boyut olarak yaklaşık 60 kat daha küçüktür ve yaklaşık 120 nm çapında, kabaca küresel bir

şekile sahiptir [55]. Virüsün dokuz genini kodlayan, pozitif polariteli tek zincirli RNA'nın iki kopyasını çevreleyen, viral protein p24'ün kopyalarından oluşan, konik şekilli bir kapsidi vardır. Tek zincirli RNA, ters transkriptaz, proteazlar, ribonükleaz ve integras gibi virion gelişimi için gerekli enzimlere ve nükleokapsid proteini olan, p7'ye sıkıca bağlanmıştır. Viral protein p17'den oluşan bir matriks, kapsidi çevrelemektedir ve virion partikülünün bütünlüğünü sağlamaktadır [56]. Yeni oluşan virüs partikülleri hücreden çıkarken, insan konak hücresinin zarından gelen çift tabaka bir lipid zarfla çevrilmiştir. Viral zarf, konak hücreden proteinleri ve kendi viral zarf proteinlerini içermektedir. Viral glikoproteinler gp120 olarak bilinen bir başlık ve gp41 molekülünden oluşan bir gövdeden oluşmaktadır. HIV *env* geninden ifadelenen zarf proteinleri, virüsün hedef hücreye tutunmasına ve viral zarfın füzyonuna izin vererek viral içeriğin hücreye aktarılmasını sağlamaktadır ve enfeksiyon döngüsünü başlatmaktadır (Şekil 2.5) [57].

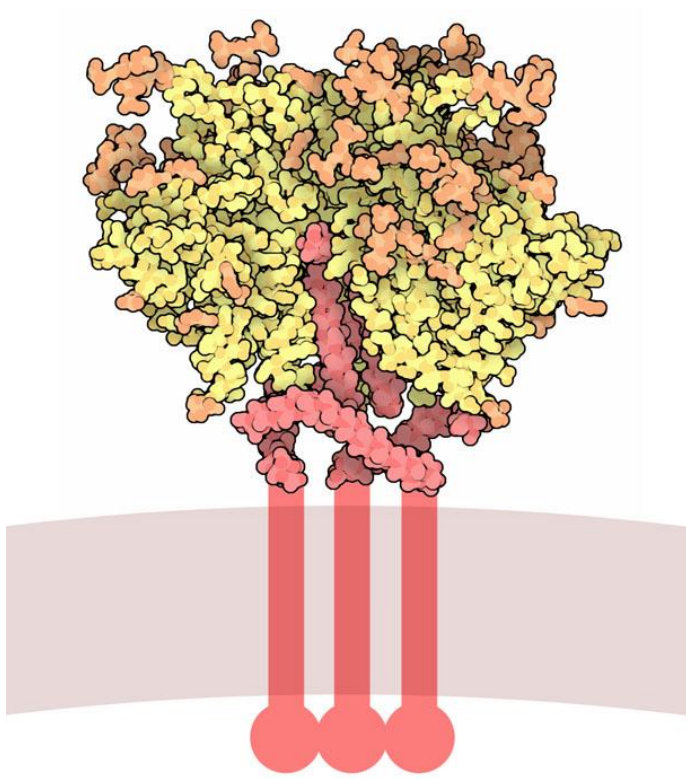


Şekil 2.5. HIV yapısı [58,59,68–74,60–67]

2.3.1. Zarf yapısı

Virüsün hücreye girişinde ilk aşama konak hücre yüzeyinde bulunan CD4+ reseptörlerine bağlanmasıdır. Zarf iki tabakalı lipid temelli bir yapı olup virüsün en dışında yer almaktadır ve üzerindeki glikoprotein çıkıntılar konak hücreye tutunmada rol almaktadır. Zarf glikoproteini olan gp160 iki alt bileşenden oluşmaktadır ve bunlar yüzeyel zarf glikoproteini gp120 (SU) ve transmembran zarf glikoproteini gp41 (TM)'dir [57]. Yaklaşık 14 tane çıkıntı olup, her bileşen 3 trimerik yapıdan oluşmaktadır (Şekil 2.6).

- gp120, zarfın konak reseptörleri ile etkileşime giren bileşenidir. Bu etkileşim, en dış yüzeyde CD4+ bağlanma bölgesini ve daha iç kısımda değişken 3 (V3) bölgesini içermektedir. V3 bölgesi, koreseptör tropizminin belirlenmesinde önemlidir.
- gp41, ektodomain (Hücre dışı bölge), transmembran domain (HIV membranını kapsamaktadır) ve sitoplazmik kuyruk (HIV membranının içinde) olmak üzere 3 birimden oluşmaktadır. Ektodomain, N-terminal hidrofobik bölge (Füzyon peptidi olarak işlev görür) ve N-terminal heptad tekrar bölgesi 1 (HR1) ve heptad tekrar bölgesi 2 (HR2) olarak adlandırılan birkaç fonksiyonel bileşene sahiptir. Hücreye tutunmadan önce, kendi üzerine katlandığı enerji yüklü bir konformasyondadır [75].



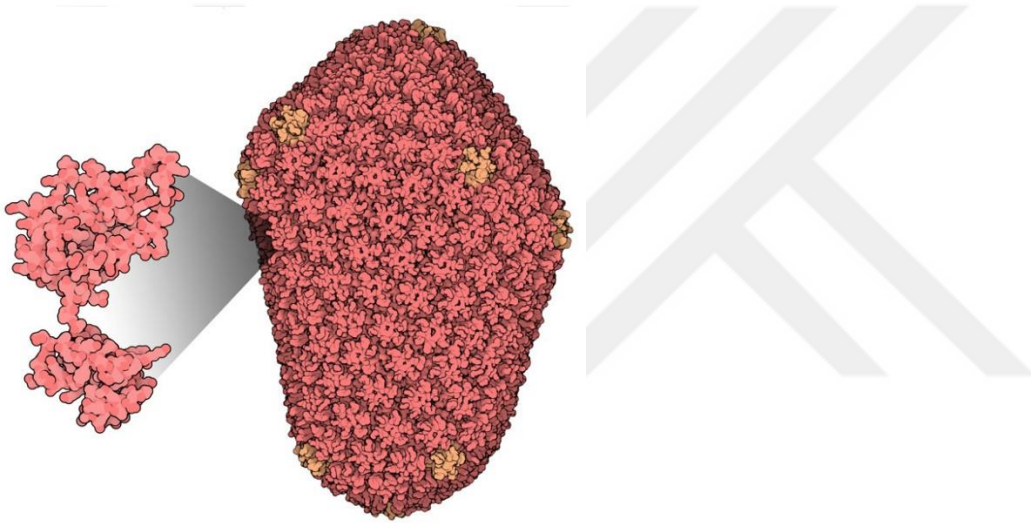
Şekil 2.6. Zarf proteini. Sarı görünen kısım gp120 ve kırmızı görünen ve transmembran yapıda olan gp41 kısmı [74,76,77]

2.3.2. Matriks yapısı

Virüsün konak hücreden salınması sırasında, kapsid tipik olarak konak hücre membranının fosfolipitlerinden oluşan iki tabakalı zarf ile kaplanmaktadır. Viral matriks proteini olan p17 (MA), zarf lipidlerine bağlanmaktadır. Bu protein virüsün yaşam döngüsünün birçok aşamasında kritik öneme sahip yapısal bir proteindir. Viral replikasyonunun erken aşamalarında, RNA'nın plazma membranını hedeflemesinde, zarfın virionlara dahil edilmesine ve partikül birleşmesine katılmaktadır [78].

2.3.3. Kapsid yapısı

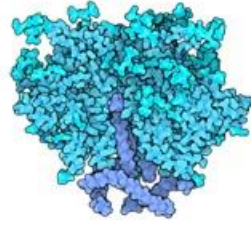
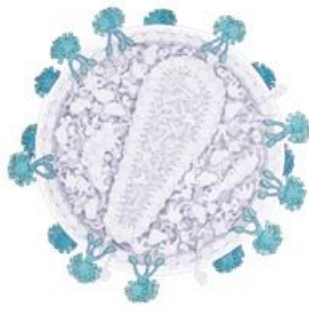
Genomu çevreleyen protein bir kılıftır. İkozohedraldir, 20 eşkenar üçgenin birleşmesiyle meydana gelen 12 köşeli bir yapıdır [79]. Kapsidin temel yapı taşı esnek bağlantılı iki bölümlü p24 (CA) proteinidir (Şekil 2.7). Bu esnek yapı, proteinin katlanması için farklı seçenekler sunmaktadır. Esneklik, simetrik olmayan bir yapının oluşmasına izin vermektedir. Altılı veya beşli halkalar şeklinde bir araya gelmektedirler. Kapsid içerisinde viral genomun iki kopyası viral genomun stabilizasyonda rol alan nükleokapsid proteini (NC, p7) ve üç temel viral enzim olan proteaz, integras ve ters transkriptaz enzimlerinin barındırmaktadır [56].



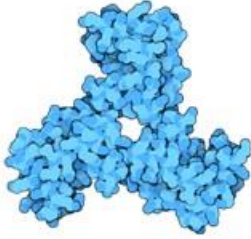
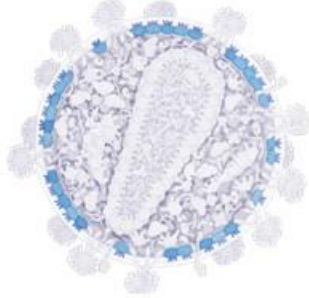
Şekil 2.7. HIV kapsidi. Kapsid proteini adı verilen tek bir proteinden oluşmaktadır [74,80,81]

2.3.4. Nükleokapsid yapısı

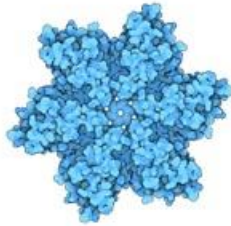
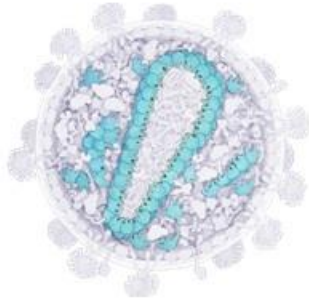
HIV nükleokapsid proteininin (NC, p7) bilinen işlevlerinin çoğu, viral genomla etkileşimleri içermektedir (Şekil 2.8). Nükleokapsid, viral genomun tanınmasında, paketlenmesinde ve ters transkripsiyon başlaması için gerekli primer görevi gören tRNA'ların paketlenmesinde işlev görmektedir. NC, proteolitik işlemin ardından, olgun virionda bir ribonükleoprotein kompleksi oluşturmaktadır ve tRNA primerini viral genoma bağlayarak ters transkripsiyonu başlatmaktadır. Proviral DNA'nın uzamasını kolaylaştırarak stabilizasyonunu sağlamaktadır [82].



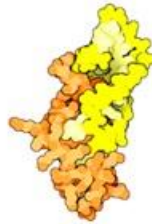
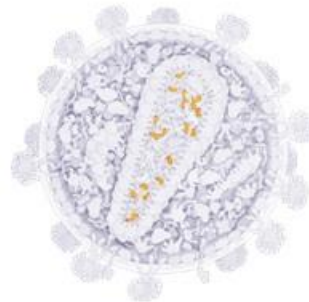
Zarf proteinleri, gp120 (SU) ve gp41 (TM), konak hücre yüzeyindeki reseptörlere bağlanır ve virusun hücre yüzeyine nüfuz etmesini sağlamaktadır. Bu proteinlerin oluşturduğu sivri uçlar, karbonhidratlarla kaplanmış ve bu yapı antikorlar tarafından tanınmalarını zorlaştırmaktadır.



Matriks proteini (MA), viral membranın iç yüzeyinde bir tabaka oluşturmaktadır. Yeni virüslerin konak hücrelerin yüzeyinden tomurcuklanmasında rol almaktadır. Bu protein, zar üzerinde yan yana birleşen trimerler halinde toplanmaktadır.



Kapsid proteini (CA), viral RNA'nın etrafını koni şeklinde kaplamaktadır ve enfeksiyon sırasında hücre içine iletilmektedir. Önce heksamerler oluşturur ve daha sonra heksamerler bir araya gelerek kapsidi oluşturmaktadır.

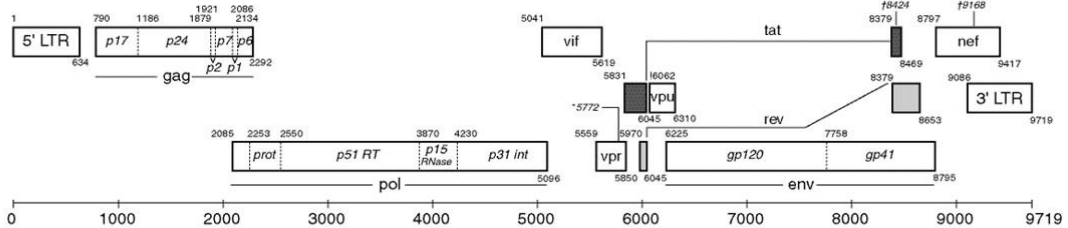


Nükleokapsid proteini (NC), viral RNA ile onu koruyan stabil bir kompleks oluşturmaktadır. Bu şekilde, kısa bir RNA parçasının (sarı) nükleokapside (turuncu) bağlandığı görülmektedir.

Şekil 2.8. HIV yapısal proteinleri [61,62,71,74,76]

2.3.5. Viral genom ve gen ürünleri

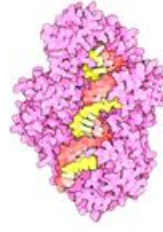
Viral genom, proteinlerle ilişkili olup transkripsiyonda doğrudan mRNA olarak işlev görmeyen pozitif zincirli bir RNA zincirinin iki kopyasından oluşmaktadır (Şekil 2.9). Proviral DNA olarak da bilinen HIV provirüs genomu, viral RNA genomunun DNA'ya ters transkripsiyonu, RNA'nın degradasyonu ve çift sarmallı HIV DNA'nın insan genomuna entegrasyonu ile ortaya çıkmaktadır. HIV RNA'sı bilinen dokuz açık okuma çerçevesine (ORF; open reading frame) sahiptir. Bunlardan üç tanesi (*gag*, *pol*, *env*) yapısal proteinleri ve enzimleri kodlamaktadır. Diğer altı gen (*rev*, *nef*, *tat*, *vif*, *vpr* ve *vpu*) genetik süreçlerin düzenleyici faktörlerinin ifadenmesinde görevlidir. RNA'nın 5' ve 3' uçlarında viral gen ürünlerinin ifadenmesinde güçlü promotor görevi olan uzun terminal tekrar bölgeleri (LTR, long terminal repeat) vardır; yapısal ve enzimatik tüm proteinleri kodlayan genler bu iki uç arasındadır. 5' dan 3' yönüne doğru ilk olarak *gag* geninin ORF'si yer almaktadır. *Gag* geninden, matriks proteini (MA, p17), kapsid proteinini (CA, p24), nükleokapsid proteini (NC, p7) ve nükleikasit stabilize edici protein olan p6 ifadenmektedir. *Gag* ORF'sini, proteaz (PR, p12), ters transkriptaz (RT, p51) ve RNaz H (p15) (RT+RNaz H, birlikte p66) ve integraz (IN, p32) enzimlerinin ifadelendiği *pol* ORF'si takip etmektedir. *Pol* genine bitişik, iki zarf glikoproteini gp120 (Yüzeyel zarf proteini, SU) ve gp41'in (Transmembran zarf protein, TM) ifadelendiği *env* ORF'si yer almaktadır. Yapısal proteinlere ve enzimlere ek olarak, HIV genomundan birkaç düzenleyici protein ifadenmektedir. Tat (Transkripsiyonel transaktivatör proteini) ve Rev (Virion regülatör proteini), HIV replikasyonunun başlaması için gereklidir, diğer düzenleyici proteinler Nef (Negatif düzenleyici faktör), Vif (viral enfeksiyon faktörü), Vpr (Virüs proteini r) ve Vpu (Viral protein u, benzersiz virüs proteini), viral replikasyon, virüs tomurcuklanması ve patogenez üzerinde etkiye sahiptirler [83].



Şekil 2.9. HIV tüm genom haritası [84]

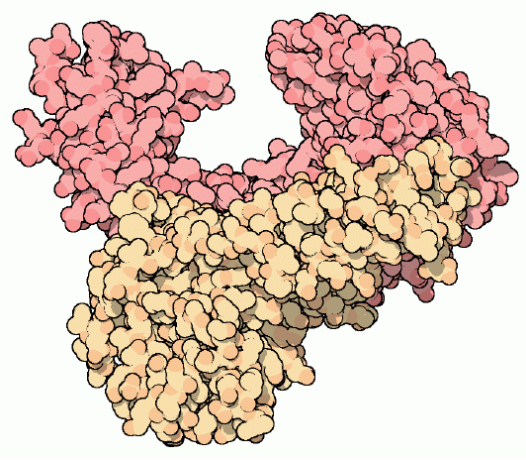
HIV Genleri ve Proteinleri

- *gag* (Group specific antigen; gruba özgü antijen): Prekürsör p55 proteini ifadenmektedir ve viral proteaz ile p17 (MA; matriks proteini), p24 (CA; kapsid proteini), p7 (NC; nükleokapsid proteini) ve p6 (Nükleikasit stabilize edici protein) proteinlerine işlenmektedir [85].
- *pol* (Polimeraz): Viral enzimleri (Proteaz; PR/p12, ters transkriptaz; RT/p66, p15 ve p51 ve integras; IN/p32) kodlayan genomik bölgedir [83]. Bu enzimler, viral proteaz tarafından işlenen Gag-Pol öncü poliproteini olarak ifadenmektedir; Gag-Pol öncüsü, *gag*'ın 3' ucunun yakınında translasyonel çerçeve kaydırması ile ifadenmektedir [85]. HIV ters transkriptaz enzimi, p66 ve p51 alt birimlerinden oluşan bir heterodimerdir (Şekil 2.10). p66 ve p51 alt birimleri, sırasıyla 560 ve 440 aminoasit uzunluğundadır ve p51'in 440 aminoasitlik kısmıyla, p66 alt biriminin ilk 440 aminoasidi ile örtüşmektedir. Katalitik etkisi olan p66 alt birimi, polimeraz ve RNaz H alanlarından oluşmaktadır. p51 alt birimi yapısal bir role sahiptir ve p66 alt biriminin polimeraz alanıyla çok yakından ilişkilidir (Şekil 2.11). Her HIV-1 virionu, yaklaşık 50 ters transkriptaz enzimi içermektedir [86]. HIV integras enzimi (Şekil 2.12), amino (N) terminal alanı, katalitik çekirdek alanı ve karboksi (C) terminal alanı olmak üzere üç farklı yapısal alandan oluşan 288 aminoasitlik bir proteindir [87]. Katalitik çekirdek alanı, iki değerlikli bir metal kofaktör (Mg^{2+}/Mn^{2+}) ile bağlanmayı koordine eden bir üçlü aminoasit içermektedir ve bu bölge aktif katalitik bölgeyi oluşturmaktadır. HIV integras enzimi, monomer, dimer, tetramer ya da oktamerler gibi daha yüksek dereceli formlarda bulunabilmektedir. Her HIV-1 virionu tahmini olarak 40-100 arasında integras enzimi içermektedir [88]. HIV proteaz enzimi, iki aynı alt birimden oluşan 99 aminoasitlik bir dimerdir (Şekil 2.13). Bu enzim, Gag (p55) ve Gag-Pol (p160) poliproteinlerinin transkripsiyon sonrası işlenmesinde görev almaktadır [89]. HIV proteazının açık, yarı açık ve kapalı olmak üzere üç konformasyonel formu vardır. Proteaz enzimi, heterodimerin merkezine yakın bir aktif bölgeye sahiptir ve aktif bölge, iki zıt aspartik asit (Asp) kalıntısını içermektedir. Açıktan kapalıya hareket, kanat uçlarının üst üste gelmesini ve işlevsel olarak bir moleküler makas görevi görmesini sağlamaktadır [90,91].

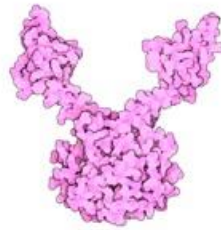


Ters transkriptaz (RT), viral RNA genomunun bir DNA kopyasını oluşturmaktadır. Şekilde enzimin viral RNA'dan (sarı) DNA ipliği (kırmızı) oluşturduğu görülmektedir. Enzim daha sonra RNA'yı yok ederek, ikinci bir DNA zincirini oluşturulmaktadır.

Şekil 2.10. HIV ters transkriptaz enzimi [58,74]

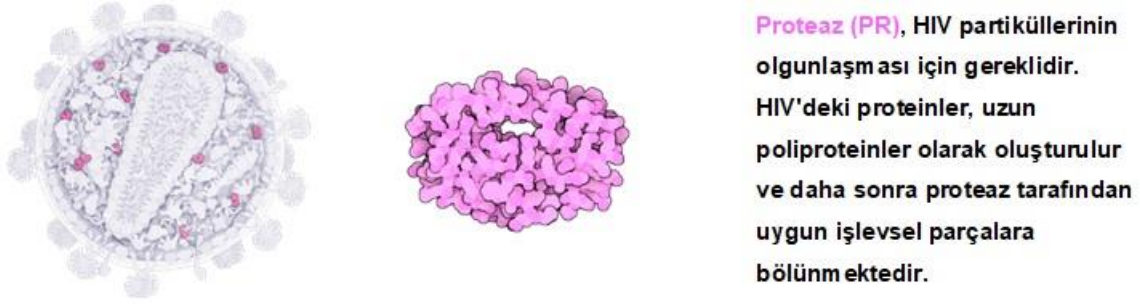


Şekil 2.11. HIV ters transkriptaz enzimi. Yukarı doğru bakan pençe şeklindeki bölge enzimin aktif kısmı olup, çift zincirli DNA sentezinde görev almaktadır [74,92,93]



İntegraz (IN), viral genomun DNA kopyasını alır ve konak hücre genomuna yerleştirir. Böylece, HIV hücrelerde uzun süre uyku da kalabilmektedir.

Şekil 2.12. HIV integrase enzimi [59,74]



Şekil 2.13. HIV proteaz enzimi [60,74]

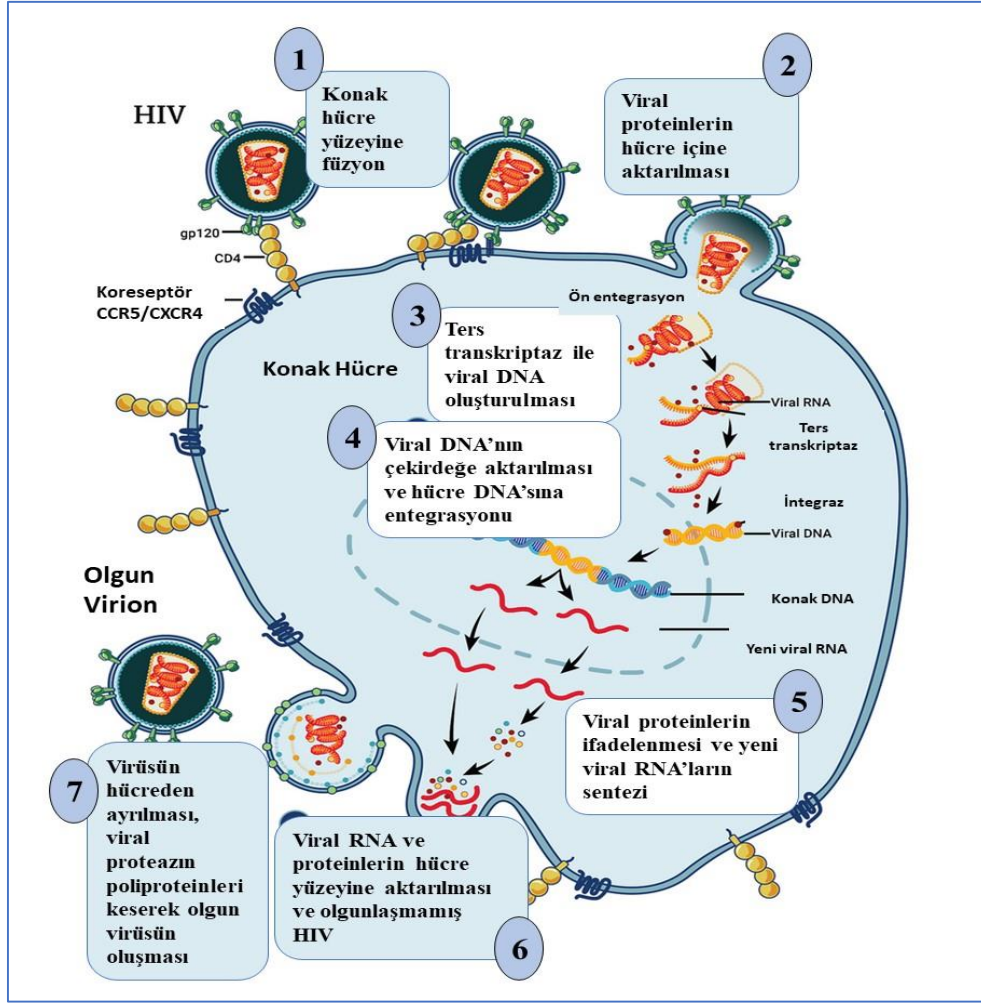
- *env* (Envelope; zarf): gp120 (Yüzeyel zarf proteini, SU) ve gp41'in (Transmembran zarf protein, TM) non-kovalent bir kompleksini oluşturan, prekürsör protein gp160'ın ifadelendiği gen bölgesidir. gp120, CD4+ reseptörü için bağlanma bölgesini ve HIV-1 için koreseptör görevi yapan yedi transmembran kemokin reseptörünü içermektedir [57].
- *rev* (Regulator of virion; virion regülatörü): Rev, RRE'ye (Rev duyarlı eleman) bağlanarak viral mRNA'ların transferini, stabilizasyonunu ve kullanımını sağlamaktadır. Rev, lentivirüslerin işlevsel olarak en çok korunmuş düzenleyici proteini olarak kabul edilmektedir. Sitoplazma ve çekirdek arasında sürekli hareket halinde olan bir proteindir [84,94].
- *tat* (Trans-activator of transcription; transkripsiyonun transaktivasyonu): HIV gen ekspresyonunda iki temel viral düzenleyici faktörden (Tat ve Rev) birisidir. 72 amino asitlik Tat-1 eksonu (Küçük form) ve 86 amino asitlik Tat-2 eksonu (Ana form) olmak üzere bilinen iki formu vardır. Enfekte olmuş hücrelerde her iki proteinde düşük seviyelerde kalıcı olarak bulunmaktadır [95]. TAR RNA (Viral transaktivasyon için hedef gen bölgesi) elemanına bağlanır ve LTR'den (Long terminal repeat; uzun terminal tekrar bölgeleri) transkripsiyon başlamasını aktive etmektedir. 5' LTR poliadenilasyon sinyalini engelleyerek, transkripsiyon ve poliadenilasyonun erken sonlandırılmasını önlemektedir [84,96,97].
- *vif* (Viral infectivity factor; viral enfeksiyon faktörü): Replikasyon döngüsünün son aşamalarında etkili olduğu bilinmektedir ve virüsün enfektivitesini artırmaktadır *Vif*'in yokluğunda, üretilen viral partiküller kusurlu olurken, *vif*'in virüsün hücreden hücreye aktarımında da önemli olduğu düşünülmektedir [98]. *Vif*'in sitoplazmada DNA-RNA heterodublekslerini deamine eden hücresel APOBEC-3G proteininin hareketini engellediği bilinmektedir [84,99].

- *vpr* (Viral protein R): Vpr proteini bu gen bölgesinden ifadenmektedir. Vpr, p55 Gag prekürsörünün p6 Gag kısmı ile etkileşime girmektedir. Hücre içerisinde çekirdekte lokalizedir. Fonksiyonları arasında, viral entegrasyon öncesi oluşan komplekslerin hücre çekirdeğine taşınması, hücre büyümesinin durdurulması, hücre genlerin transaktivasyonu ve hücre farklılaşmanın indüksiyonu yer almaktadır [84,100].
- *vpu* (Viral protein U): Bilinen iki önemli biyolojik fonksiyonu vardır; CD4⁺'ün endoplazmik retikulumda degradasyonu ve HIV ile enfekte hücre membranından virion salınımının artırılmasıdır. Viral zarfın olgunlaşmasında rol almaktadır ve olgun virionda bulunmamaktadır [101]. HIV-1 ile enfekte olmuş hücrelerde Fas aracılı apoptosize duyarlılığı artırdığı bilinmektedir [84,102].
- *nef* (Negative factor; negatif düzenleyici faktör): Enfekte hücrelerde üretilen ilk HIV proteinlerinden birisidir ve aksesuar proteinler arasında immünojenitesi en yüksek olanıdır. Yüksek viral yük düzeylerinin sürdürülmesinde ve AIDS'e ilerlemede rol aldığı bilinmektedir. HIV-1 ile enfekte olmuş ve beklenen yaşam süresi uzamış kişilerde Nef proteini kusurlu virüsler tespit edilmiştir [103]. Birincil viral reseptör olan CD4⁺ ve MHC klas I reseptörlerinin sayısı ve aktivitesini azalttığı bilinmektedir [84,104].
- LTR (Long terminal repeat; uzun terminal tekrar bölgeleri), entegre provirüslerin genomunu çevreleyen DNA dizisidir. Transkripsiyon başlatma ve poliadenilasyon gibi düzenleyici bölgeler içermektedir [84,105].
- TAR (Viral transaktivasyon için hedef gen bölgesi), Tat proteini ve hücre proteinleri için bağlanma bölgesidir [84,95].
- RRE (Rev duyarlı eleman), HIV-1'in *env* gen bölgesi içinde kodlanmış bir RNA elemanıdır. RRE, Rev işlevi için gereklidir. Rev için yüksek afiniteli bir bağlanma bölgesi içermektedir [84,94].
- PE (Psi elements; Psi elemanları), Gag başlangıç kodonundan önce başlayan ve bu kodonla üst üste gelen 4 stem-loop yapısıdır. PE, NC (p7) proteini tarafından tanınmaktadır. Psi Elementleri, işlenmemiş prekürsör genomik transkriptlerde bulunur, ancak işlenmiş viral mRNA'larda yoktur. Viral genomun nükleokapsid tarafından tanınarak paketlenmesinde görev almaktadır [84,106].
- Slippery dizisi, *gag* ve *pol* ORF'lerinde translasyonel çerçeve kaymasını düzenlemekle sorumludur [84,107].
- CRS (Cis-acting repressive sequences; Cis-etkili baskılayıcı diziler), Rev yokluğunda yapısal protein ekspresyonunu inhibe ettiği düşünülmektedir [84,108].

- INS (Inhibitory/Instability RNA sequences; inhibitör/kararsız RNA dizileri). Genomda birden fazla INS elemanı bulunmaktadır ve bunlar birbirinden bağımsız olarak hareket edebilmektedir. Posttranskripsiyonel ekspresyonu inhibe eden öğeler olarak tanımlanmışlardır [84].

2.4. Viral Döngü

Şekil 2.14'de HIV'nin konak hücre yüzeyine tutunmasıyla başlayan HIV replikasyon döngüsü görülmektedir. Virüsün genomunu ve proteinlerini içeren bir kapsid hücre içine aktarılmaktadır. Kapsid parçalanarak, virusun kendi enzimi olan ters transkriptaz, viral RNA'yı DNA'ya kopyalamaktadır. Viral DNA, HIV integrazının HIV DNA'sını konak hücre DNA'sına entegre ettiği çekirdeğe taşınmaktadır. Konak hücrenin normal transkripsiyon mekanizmasıyla, HIV DNA'sını yeni HIV RNA'nın birden çok kopyasına kopyalanmaktadır. Bu RNA'nın bir kısmı yeni bir virüsün genomunu oluştururken, hücre yeni HIV proteinlerini yapmak için RNA'nın diğer kopyalarını kullanmaktadır. Yeni viral RNA ve HIV proteinleri, olgunlaşmamış bir HIV'in olduğu hücre yüzeyine taşınmaktadır. Son olarak, virüs hücreden salınmaktadır ve HIV proteazı, olgun bulaşıcı virüs oluşturmak için yeni sentezlenmiş poliproteinleri kesmektedir [109].



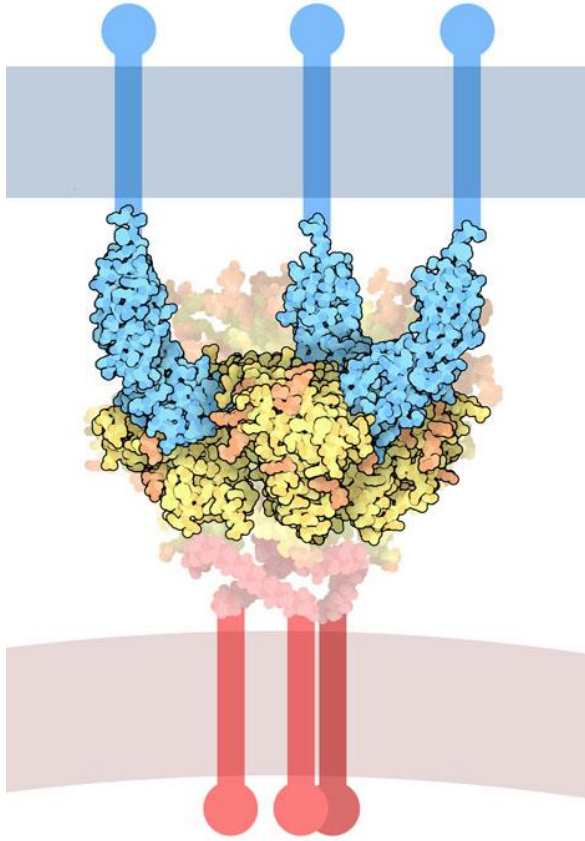
Şekil 2.14. HIV replikasyon döngüsü [109]

2.4.1. Tutunma ve füzyon

Virüs, kan dolaşımına girdikten sonra, yüzey proteini gp120 ile başta yardımcı T lenfositler ve makrofajlar olmak üzere çeşitli kan hücrelerinin CD4+ reseptörlerine bağlanmaktadır (Şekil 2.15). CD4+ reseptörü bulunan tüm hücreler, virüsün potansiyel konak hücreleridir; bu nedenle santral sinir sisteminde yer alan mikrogliya hücrelerini ve gastrointestinal sistemin hücrelerini de enfekte edebilirler [110].

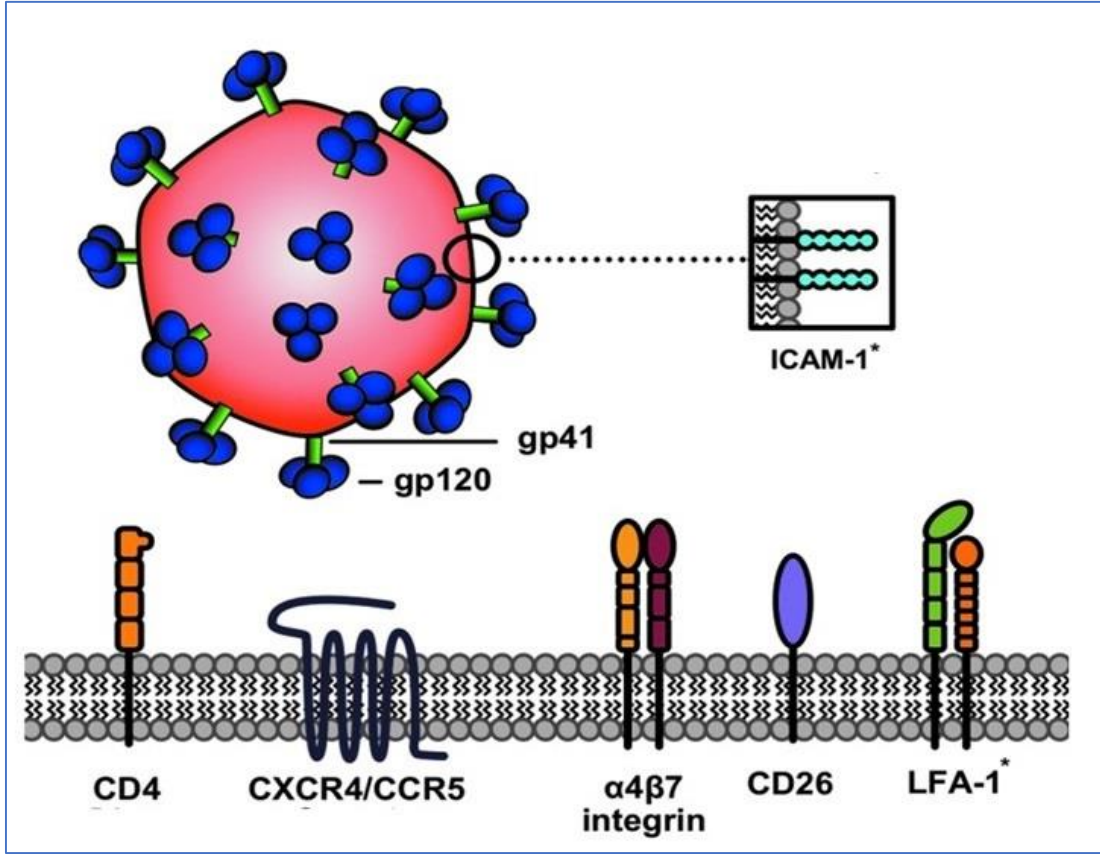
Hücreye giriş süreci, virüs ile konak hücre arasında üç anahtar adımdan oluşan koordineli bir etkileşimi içermektedir.

- **Tutunma:** HIV ile konak hücre arasındaki ilk özgün olmayan etkileşimlerden sonra, gp120 üzerindeki CD4+ bağlama bölgesiyle ve CD4+ reseptörünün ekstrasellüler alan 1 (D1) arasındaki tutunma ile konak CD4+ reseptörüne bağlanmaktadır [111].



Şekil 2.15. Zarf proteininin tutunması CD4+ proteinine tutunması. gp120, sarı; gp41, kırmızı [74,112]

Koreseptör bağlanması: gp120 CD4+ reseptör bağlanmasını takiben, gp120, V3 halkasının yeniden konumlandırılmasıyla değişime uğramaktadır. Bu yeniden düzenleme, V3 halkasının, konak kemokin koreseptörlerinden C-C kemokin reseptörü tip 5 (CCR5) veya C-X-C kemokin reseptörü tip 4 (CXCR4) koreseptörü ile etkileşime girmesini sağlamaktadır. Hangi koreseptöre bağlanacağı, temel olarak HIV alt tipine (R5 veya X4) göre değişmektedir ve V3 bölgesiyle belirlenmektedir [57]. Koreseptör bağlanmasını takiben gp41 füzyon proteini açığa çıkmaktadır. CD26 ve $\alpha 4\beta 7$ 'nin koreseptör etkileşimlerinde kofaktör olarak tutunmaya yardımcı olduğu düşünülmektedir. ICAM-1 (Şekil 2.16), tomurcuklanma olayları sırasında viral zarfa dahil edildiğinde, enfeksiyonu artırmak için reseptörü LFA-1 ile etkileşime girmektedir [113].



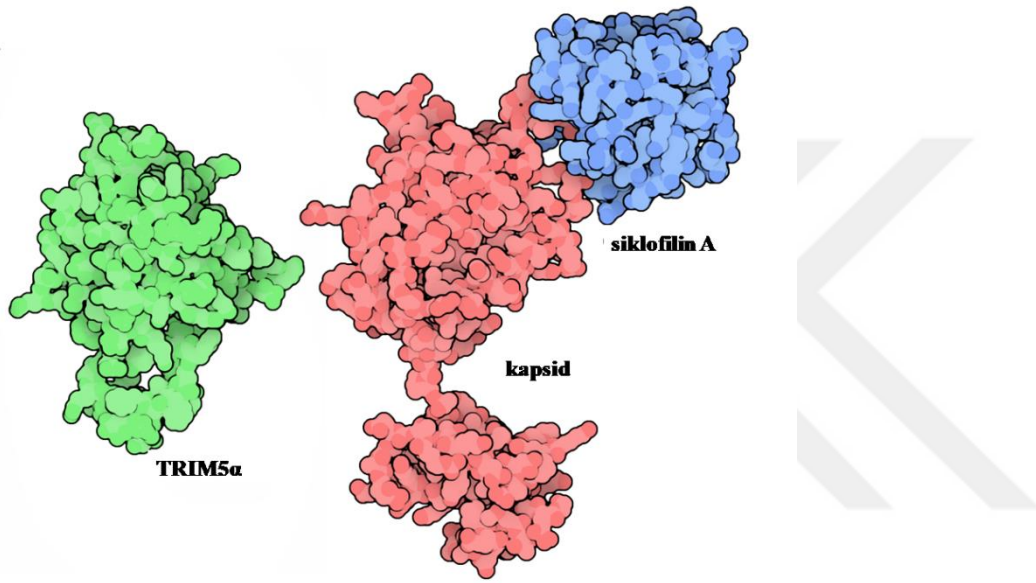
Şekil 2.16. Reseptörler. HIV tarafından CD4+ T hücrelerine girmek için kullanılan reseptörlerin özeti [113]

- Füzyon: HIV, konak hücreye tutunduğunda, hücre membranında bir girinti oluşmaktadır. Koreseptörlerin etkileşimiyle, virüs konak hücre zarına yaklaşır. Koreseptör gp120 etkileşiminin gp41 füzyonunu aktive ettiği düşünülmektedir. gp41 distal ucunun (gp41 füzyon peptidi) konak hücre membranına tutunması gp41'in konformasyonunu tetiklemektedir. Daha sonra, gp41'de hairpin benzeri katlanma olmaktadır, bu da HR1 (Heptad repeat regions; heptad tekrar bölgeleri) ve HR2 alanlarının bir dizi oluk boyunca birbirine geçtiği altı demetli bir sarmal merkez oluşumuyla sonuçlanmaktadır. HIV ve konak hücre membranı birbirine doğru çekilerek, membranda bir çıkıntı oluşmaktadır [114].

2.4.2. Viral kapsidin soyularak RNA'nın sitoplazmaya alınması

Kapsid içindeki viral genom konak hücre sitoplazması içinde serbestleşmektedir. Bununla birlikte kapsidin viral yaşam döngüsündeki işleviyle ilgili mekanizmalar henüz tam olarak bilinmemektedir. Kapsidin, yeni bir hücreyi enfekte ettiğinde virüsün uygun şekilde soyulması için gerekli olduğu düşünülmektedir [115].

TRIM5, canlı organizmalar tarafından virüslere karşı kullanılan silahlardan biridir. TRIM5, retroviral kapside bağlanarak virüsün soyulma sürecine müdahale etmektedir. TRIM5'in insan versiyonu HIV'e karşı etkili değildir, ancak diğer retrovirüsleri bloke etmektedir. Şekil 2.17'de rhesus maymunundan elde edilen TRIM5 proteini görülmektedir. HIV'e karşı oldukça potent bir proteindir. Diğer hücrel proteinler, viral replikasyona yardımcı olmak için HIV tarafından kullanılmaktadır. HIV, enfekte bir hücreden tomurcuklanırken, hücrel enzim siklofilin A, kapside bağlanmaktadır [116].



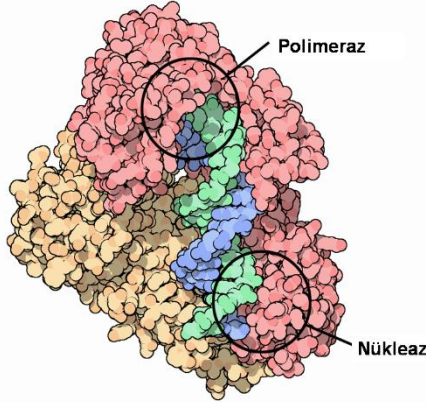
Şekil 2.17. TRIM5 ve siklofilin A [74,117,118]

2.4.3. Ters transkripsiyon

Virüs kapsidinde bulunan proteinler, virüs RNA'sıyla birlikte hücre içine alınmaktadır. Hücre içine alınan ters transkriptaz, tamamlayıcı DNA zincirinin sentezine başlamaktadır. Primer olarak, sitoplazmada bulunan veya kapsidin bileşenleri olarak taşınan tRNA molekülleri kullanılmaktadır.

HIV ters transkripsiyon süreci, tek sarmallı HIV RNA'dan üretilen doğrusal, çift sarmallı HIV DNA'sının bir kopyasıyla sonuçlanan çok aşamalı bir süreçtir. Her HIV virionu, iki adet pozitif polariteli genomik RNA kopyası içermektedir. Ters transkripsiyon süreci, tek zincirli HIV RNA'sının tek zincirli HIV DNA'sına dönüştürülmesi, ardından HIV RNA'sının sindirilmesi ve tek sarmallı HIV DNA'sından çift sarmallı HIV DNA oluşması adımlarını içermektedir. HIV ters transkriptaz enzimi, bu aşamalarda merkezi bir rol oynamaktadır ve

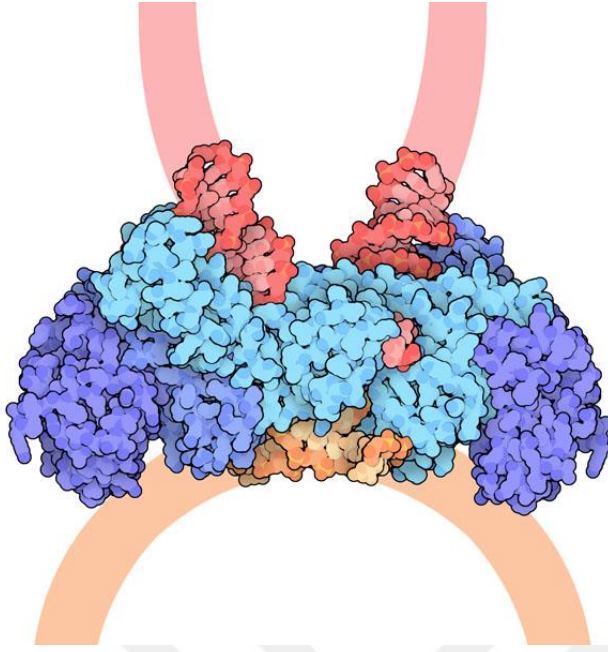
enzimatik aktiviteler, her ikisi de p66 alt biriminde bulunan polimeraz ve RNaz H aktif bölgelerininin yardımıyla gerçekleşmektedir (Şekil 2.18). HIV ters transkriptaz polimeraz alanı, DNA'nın uzayan zincirine nükleotidleri ekleme işlevi görürken, RNaz H, HIV RNA ve HIV DNA'nın istenmeyen parçalarını sindirmektedir [119].



Şekil 2.18. Ters transkriptaz enziminin polimeraz aktif bölgesi [74,120]

2.4.4. DNA entegrasyonu

Proviral DNA'nın konak hücre DNA'sına entegrasyonu çok adımlı bir süreçtir ve HIV integraz enzimi, proviral DNA 3' ucunun işlenmesi ve proviral DNA'nın konak hücre DNA'sına transferi olmak üzere iki temel reaksiyonu yürütmektedir. HIV integraz enzimi, proviral DNA'nın her iki ucuna bağlanarak ön entegrasyon kompleksi olarak bilinen, intazom (Şekil 2.19) olarak adlandırılan nükleoprotein partikülünü oluşturmaktadır [121]. DNA'ya bağlı integraz, DNA'nın 3' uçlarındaki iki nükleotidi kaldırarak, konak hücre DNA'sına yerleştirilebilen yapışkan uçlar oluşturmaktadır. Ön entegrasyon kompleksi daha sonra bir nükleer gözenek yoluyla konak hücrenin çekirdeğine transfer edilmektedir. Çekirdek içerisinde, konak proteini olan lens epitelinin türetilen büyüme faktörü (LEDGF, lens epithelium derived growth factor/p75), ön entegrasyon kompleksine ve konak hücre DNA'sına bağlanarak, ön entegrasyon kompleksi ile konak hücre DNA'sı arasında bir bağlama proteini olarak görev görmektedir. Daha sonra, integraz enzimi, konak hücre DNA'sına proviral DNA 3' hidroksil grubu tutunmasını katalize ederek entegrasyonu sağlamaktadır. Son aşamada, hücresel enzimler, oluşan DNA boşluklarının onarımını gerçekleştirmektedir [122].



Şekil 2.19. İntazom (Ön entegrasyon kompleksi). 2 adet integras alt ünitesi (Açık mavi), aktif bölgeyi oluşturmaktadır ve DNA entegrasyonundan sorumludur (Kırmızı, viral DNA; turuncu, hücre DNA'sı). Koyu mavi görünümlü 2 adet alt ünite enzimin yapısına katılmaktadır [74,123,124]

2.4.5. Viral proteinlerin ifadenmesi

DNA entegrasyonu tamamlandıktan sonra, konak hücrede, viral genlerin transkripsiyonu başlamaktadır. HIV genomu tarafından kodlanan regülatör proteinler ve konak hücreye özgü transkripsiyon faktörleri regülasyona katılmaktadır. Viral proteinler, ifadelendikten sonra birtakım değişikliklere uğramaktadır. Konak glikoziltransferaz enzimleri, zarf proteinleri gp41 ve gp120'nin glikosilasyonunu sağlamaktadır. Proteaz, integras ve ters transkriptaz enzimlerinin prekürsör proteinlerinden ayırması *pol* gen ürünü olan proteaz enzimiyle sağlanmaktadır. Prekürsör poliproteinlerin işlenmesi birbirleri ile tutarlı ve sıralı aşamaları kapsamaktadır. Gag poliproteini matriks (p17), kapsid (p24), nükleokapsid (p7) ve p6 proteinleri olmak üzere dört yapısal proteini içermektedir. Ek olarak, iki aralayıcı peptit (SP1,p2 ve SP2, p1) Gag proteininin parçasıdır. Gag translasyonunun yaklaşık %5-10'u sırasında, Gag-Pol poliproteininin translasyonu ile sonuçlanan bir translasyonel çerçeve kayması meydana gelmektedir [85]. Gag-Pol poliproteini, yapısal Gag proteinlerine ek olarak, Pol fonksiyonel enzimlerini (proteaz, ters transkriptaz ve integras) içermektedir. Her virion yaklaşık 5000 Gag poliproteini içermektedir [125]. HIV proteaz başlangıçta Gag-Pol poliproteininden kendi salımını katalize etmektedir. HIV proteaz, hem Gag-Pol hem de Gag poliproteinlerini işlemektedir. Poliprotein işlemenin zamanlaması, HIV replikasyon

döngüsünün sonlarında, tipik olarak konak hücreden virüs salınımı aşamasını ve bundan kısa bir süre sonrasında kapsamaktadır. Gag ve Gag-Pol poliproteinlerinin işlenmesi matriks, kapsid, nükleokapsid, p6, proteaz, ters transkriptaz ve integras proteinlerinin salınmasına neden olmaktadır [85,126]. HIV proteaz enzimi, gp120 ve gp41 zarf glikoproteinleri için prekürsör glikoprotein olan gp160 zarf proteininin işlenmesine dahil değildir [127].

2.4.6. Montaj ve olgunlaşma

Olgunlaşmamış HIV virionları, montaj sırasında, RNA genomunun iki kopyası, Gag ve Gag-Pol kopyaları ve HIV yardımcı proteinleriyle birlikte, membranı olan olgunlaşmamış virionlara paketlenmektedir. HIV virionları serbest kaldıktan sonra, HIV proteaz tarafından katalize edilen bir olgunlaşma sürecine girmektedir [128]. Bu olgunlaşmamış virionların hücreden salınması, Taşıma için Gerekli Endozomal Ayırma Kompleksleri (ESCRT) tarafından katalize edilmektedir. Olgunlaşmamış virionların salınmasındaki bir gecikme, proteazın zamansız bir şekilde aktivasyonu ve bulaşıcı olmayan partiküllerin salınmasıyla sonuçlanmaktadır [129].

2.5. İmmünopatogeneze

HIV vücuda çoğunlukla genital veya gastrointestinal sistemin mukozal yüzeylerinden girmektedir. Mukoza altında yer alan lamina propriya tabakası, koreseptör CCR5 ile kombinasyon halinde CD4+ eksprese eden ve HIV enfeksiyonu için hedef olan lenfositleri ve makrofajları barındırmaktadır. Doğal bağışıklık yanıtı, HIV'in vücuda girişte karşılaştığı ilk savunma hattıdır. Makrofajlar, HIV için hedef hücrelerden birisidir. Enfekte makrofajların fagositoz ve antijen sunma yeteneklerini kaybettikleri bilinmektedir. Makrofajların fonksiyon kaybı, HIV enfeksiyonunun neden olduğu genel bağışıklık fonksiyon bozukluğuna katkı sağlamaktadır [130]. CD1a ve Birbeck granüllerini eksprese eden epidermal dentritik hücreler, mukozal yüzeylerde HIV ile savaşan ilk immün hücreler arasındadır. Bu hücreler, virüsü enfeksiyon bölgesinden lenfoid dokuya taşımaktadır [131]. MHC sınıf I'in varlığı, T hücre reseptörlerine peptit sunumu için gerekli olduğundan, NK hücreleri, HIV'e bağışıklık yanıtta önemli rol almaktadır [132].

Hücrel bağışıklık yanıtı, HIV'in konak hücrelere girişi ve viral proteinlerin sentezi üzerine indüklenmektedir. Hücre yüzeyindeki MHC sınıf I molekülleri, degrade edilmiş HIV peptit fragmanlarını, CD8+ T lenfosit T hücre reseptörleri (TCR) tarafından tanınmak üzere

sunmaktadır. CD8+ T lenfositler, HIV ile enfekte olmuş hücreleri lizize uğratmaktadır ve virüs replikasyonunu inhibe eden sitokinler, interferon- γ (IFN- γ), tümör nekroz faktörü α (TNF- α) ve kemokinler (MIP-1 α , MIP β ve RANTES) salgılamaktadır [133]. CD8+ T lenfositlerin gelişimi, HIV replikasyonunun kontrolü için önemlidir. Akut enfeksiyon sırasında viremide azalmaya katkı sağlamaktadırlar [134]. Enfeksiyonun erken aşamalarında, CD4+ T lenfositler proliferatif kapasitelerini kaybetmektedir ve bu nedenle viral kontrole katkıları çok azdır. CD4+ T lenfosit sayısı, hastanın bağışıklık ve klinik durumunun, fırsatçı enfeksiyon riskinin ölçümü için önemlidir ve özellikle ilerlemiş HIV hastalığı olan kişiler için tanısal karar vermeyi desteklemektedir [135].

Humoral bağışıklık yanıt enfeksiyonun sonraki evrelerinde ortaya çıkmaktadır. Bu nedenle akut enfeksiyon sırasında antikor seviyesi düşüktür. Zarf proteinlerine karşı nötralizan olmayan antikorlar ilk olarak ortaya çıkmaktadır [136]. Daha sonra virüsün hücrelere girişinde rol alan proteinlere özgü nötralize edici antikorlar üretilmektedir. Bu antikorlar, gp120'nin V3 değişken bölgesine, CD4+ bağlanma bölgelerine ve kemokin reseptörlerine (CXCR4 ve CCR5), transmembran protein gp41'e özgüdür [137,138].

HIV, CD4+ T lenfositleri enfekte ederek, ağırlıklı olarak aktive edilmiş T hücrelerinde çoğalmaktadır ve kazanılmış bağışıklık sisteminin ana bileşenlerinden birinin fonksiyonlarını bozmaktadır. Bağışıklık yanıtı, esas olarak CD8+ T lenfositler aracılık etmektedir ve bu durum virüste bağışıklık yanıtından kaçmasına izin veren mutasyonların seçimini indüklemektedir. Bu mutasyonlar genellikle CD8+ T lenfosit insan lökosit antijen sınıf I (HLA-I) epitopları içinde seçilmektedir, bu da viral peptitlerin sunumunda ve tanınmasında azalmaya yol açarak CD8+ T lenfositlerin aktivasyonunu engellemektedir [139]. HIV, antikor epitopları üzerinde immünojenik olmayan glikanlar eksprese ederek anti-HIV antikorlarından saklanabilmektedir [140].

2.6. Epidemiyoloji

HIV, şimdiye kadar yaklaşık 32 milyon kişinin hayatına mal olan önemli bir küresel halk sağlığı sorunudur. Bununla birlikte, fırsatçı enfeksiyonlar da dahil olmak üzere HIV bulaşının etkili şekilde önlenmesi, teşhis, tedavi ve bakım hizmetlerine erişimin artmasıyla, HIV enfeksiyonu yönetilebilir kronik bir sağlık durumu haline gelmiştir ve HIV ile yaşayan kişilerin uzun ve sağlıklı yaşamlar sürmesine olanak tanınmıştır. İnsan immün yetmezlik virüsü (HIV) enfeksiyonu yıllık küresel insidansında ve ölüm oranlarında azalma olmasına

rağmen prevalansındaki artış nedeniyle önemini korumaktadır. UNAIDS 2020 verilerine göre 2019 yılının sonu itibariyle dünyada 38 milyon kişinin HIV ile infekte olduğu ve hastalığın tanımlandığı 1981 yılından beri 32 milyon kişinin hayatını bu hastalıktan kaybettiği bilinmektedir. 2019'da, küresel olarak HIV ile yaşayan yetişkinlerin %68'i ve çocukların %53'ü ART almaktadır. 2019'un sonunda, HIV ile yaşayan bireylerin tahmini %81'i durumlarını bilmektedir, %67'si ART almaktadır ve %59'u HIV virüsünün baskılanmasını, başkalarına bulaşma riski olmadan başarmıştır. Haziran 2020'ye kadar, 26 milyon kişi ART'ye erişmiştir ve 2019'un sonunda 25,4 milyon olduğu tahmin edilen bu sayıda %2,4'lük bir artışa işaret etmektedir. Bununla birlikte, 2000-2019 seneleri arasında, yeni HIV enfeksiyonları %39 ve HIV ile ilgili ölümler %51 azalırken, ART sayesinde 15,3 milyon hayat kurtarılmıştır. Bu başarı, sivil toplum ve uluslararası kalkınma ortakları tarafından desteklenen ulusal HIV programlarının çabalarının sonucudur. 2019'da 690.000 kişi HIV ile ilgili nedenlerden ölmüştür ve 1,7 milyon kişi yeni enfekte olmuştur. Bu oranlar yeni enfeksiyonlarda %23 düzeyinde düşüşe işaret etmektedir ve 1989 yılından beri en düşük rakam olarak bildirilmiştir. HIV ile yaşayan tüm insanların üçte ikisinden fazlası DSÖ Afrika Bölgesinde yaşamaktadır (25,7 milyon). Bu bölgedeki genel nüfus arasında HIV yaygın olmakla birlikte, kilit nüfus grupları arasında artan sayıda yeni enfeksiyonlar meydana gelmektedir [2].

Ülkemizde ilk defa 1985 yılında üç HIV/AIDS hastası bildirilmiş, daha sonra her yıl vaka sayılarında giderek artma gözlenmiştir. Türkiye Halk Sağlığı Kurumu'nun Ocak 2021 verilerine göre ülkemizde 1985 ve 31 Ocak 2021 tarihleri arasında toplam 26447 HIV pozitif ve 1974 AIDS vakası vardır. Türkiye'de HIV enfeksiyonuna en sık 25-34 yaş arası rastlanmaktadır ve cinsiyet dağılımına göre bakıldığında %81 erkek, %19 kadın olduğu gözlenmektedir. Bu verilerden anlaşıldığı üzere Türkiye'de önümüzdeki yıllarda HIV enfeksiyonunun halk sağlığı açısından önemi artacaktır. Bulaş yoluna göre vakaların dağılımı incelendiğinde, vakaların %47,5'inin cinsel yolla bulaş olduğu, cinsel yolla bulaştığı bildirilen bu vakaların %68,8'inin bulaşma yolunun heteroseksüel cinsel ilişki olduğu bilinmektedir. Vakaların %1,1'inin bulaşma yolu damar içi madde kullanımı olup, %51'inin bulaş yolu bilinmemektedir [3].

HIV enfeksiyonu başlıca bulaş yolları şunlardır:

- Heteroseksüel ve eşcinsel ilişki olmak üzere cinsel yolla bulaşma

- Parenteral bulaş; ağırlıklı olarak damar içi madde kullananlar arasında
- Perinatal bulaş

2019 yılında, ön planda olan popülasyonlar (Eşcinsel erkekler ve erkeklerle seks yapan diğer erkekler, damar içi madde kullananlar, seks işçileri, transseksüeller ve mahkumlar) ve bu popülasyonlarda ki bireylerin eşleri, dünya genelinde Doğu ve Güney Afrika dışındaki bölgelerde tüm yeni HIV enfeksiyonlarının %62'sinden sorumlu olduğu bildirilmiştir [141]. Türkiye’de HIV pozitif kişilerin ve AIDS vakalarının olası bulaş yollarına göre dağılımı incelendiğinde toplam vakaların %14,79’undan homoseksüel/biseksüel cinsel ilişki sorumlu tutulurken, %32,67’sinden heteroseksüel ilişki sorumlu tutulmuştur [3].

Dünya genelinde yeni yetişkin HIV enfeksiyonlarının yaklaşık %10'unu damar içi ilaç kullananlar oluşturmaktadır. Bu nüfus, Doğu Avrupa ve Orta Asya'daki yeni enfeksiyonların neredeyse yarısını (%48), Orta Doğu ve Kuzey Afrika'da %43'ünü, Asya ve Pasifik'te %17'sini ve Batı ve Orta Avrupa ile Kuzey Amerika'da %15'ini oluşturmaktadır [142]. Türkiye’de HIV pozitif kişilerin ve AIDS vakalarının olası bulaş yollarına göre dağılımı incelendiğinde toplam vakaların %1,08'i damar içi madde kullanımı, %0,47'sini hemofili hastalarının da dahil edildiği kan transfüzyonuyla ilişkilendirilmiştir [3].

HIV'in pozitif bir anneden çocuğuna hamilelik, doğum, doğum veya emzirme sırasında bulaşmasına anneden çocuğa perinatal bulaş olarak adlandırılmaktadır. Herhangi bir müdahalenin olmadığı durumlarda anneden çocuğa bulaşma oranları %15 ile %45 arasında değişmektedir. Hamilelik, doğum, doğum ve emzirme dönemlerinde etkili müdahaleler ile bu oran %5'in altına indirilebilmektedir [143]. HIV ile yaşayan hamile kadınların %85'i 2019'da HIV'in çocuklarına bulaşmasını önlemek için antiretroviral ilaçlara erişebilmiştir [142]. Türkiye’de HIV pozitif kişilerin ve AIDS vakalarının olası bulaş yollarına göre dağılımı incelendiğinde toplam vakaların %0,69'u perinatal bulaş olarak bildirilmiştir [3].

2.7. Klinik

Dünya Sağlık Örgütü’nün HIV ve AIDS klinik sınıflandırmasına göre HIV bulaşmasını takip eden dönemde 5 klinik evrede incelenmektedir [144]:

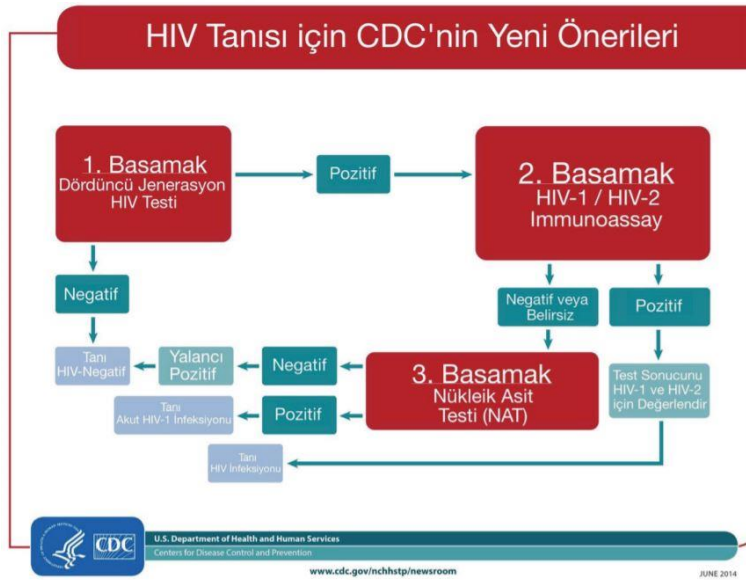
- Primer HIV enfeksiyonu: Enfeksiyonun ilk haftalarında görülen asemptomatik dönem ya da akut retroviral sendrom olarak adlandırılan dönem,

- Viremideki artış ve birincil HIV enfeksiyonuna eşlik eden CD4+ T lenfosit sayısındaki düşüş, akut hastalığın belirtilerinin çoğuna neden olmaktadır [145]. Akut retroviral sendrom, mononükleoza benzeyen hafif, özgün olmayan septomların eşlik ettiği viral hastalığı tanımlamaktadır. Birincil HIV semptomları tipik olarak enfeksiyondan sonraki 2-6 hafta içinde başlamaktadır [146] ve en yaygın belirtileri ateş, yorgunluk, miyalji, deri döküntüsü, baş ağrısı, farenjit ve servikal adenopatiden oluşur. [145].
- Evre 1: Asemptomatik ya da yaygın lenfadenopatinin eşlik ettiği dönem,
- Evre 2: Erken HIV enfeksiyonunda dahi, hastalar çeşitli klinik belirtiler gösterebilmektedir. Evre 2'ye dahil olan klinik bulgular şunlardır; toplam vücut ağırlığının yüzde 10'undan daha az oranda açıklanamayan kilo kaybı ve tekrarlayan solunum yolu enfeksiyonları (Sinüzit, bronşit, otitis media ve farenjit gibi) ve ayrıca çeşitli dermatolojik durumlardır (Herpes zoster alevlenmeleri, keilit, tekrarlayan oral ülserler, papüler kaşıntılı döküntüler, seboreik dermatit ve mantar tırnak enfeksiyonları).
- Evre 3: Bir aydan uzun süredir açıklanamayan kronik ishal, açıklanamayan inatçı ateş, toplam vücut ağırlığının yüzde 10'undan daha fazla oranda açıklanamayan kilo kaybı, oral kandidiyaz, akciğer tüberkülozu, pnömoni, ampiyem, menenjit, bakteremi, piyomiyozit, kemik veya eklemleri tutan bakteriyel enfeksiyonlar, akut nekrotizan ülseratif stomatit, periodontitis durumlarının eşlik ettiği evre,
- Evre 4: Fırsatçı ve sistemik enfeksiyonların beraber görüldüğü, AIDS olarak adlandırılan dönem
 - Evre 4 ciddi semptomatik aşama olarak adlandırılmaktadır ve AIDS'i tanımlayan hastalıkları içermektedir. AIDS'in varsayımsal teşhisinin tek başına klinik bulgulara dayanılarak yapılmasına olanak tanıyan evre 4'ün klinik belirtileri şunlardır; HIV zayıflama sendromu, Pneumocystis pnömoni, tekrarlayan şiddetli bakteriyel pnömoni, ekstrapulmoner tüberküloz, HIV ensefalopati, santral sinir sistemi toksoplazmoz, orolabial herpes simpleks enfeksiyonu, özofagus kandidiyazı ve Kaposi sarkomu. Bir hastanın klinik aşamada olduğuna dair şüphe uyandırması gereken diğer durumlar arasında sitomegaloviral enfeksiyonlar, akciğer dışı kriptokokoz, yaygın endemik mikozlar, kriptosporidiosis, isosporiasis, dissemine tüberküloz dışı mikobakteri enfeksiyonu, trakeal, bronşiyal veya pulmoner kandida enfeksiyonu, visseral herpes simpleks enfeksiyonu, rektal fistül, serebral veya B hücreli non-Hodgkin lenfoma, progresif

multifokal lökoensefalopati ve HIV ile ilişkili kardiyomiyopati veya nefropati yer almaktadır.

2.8. HIV Tanı Testleri

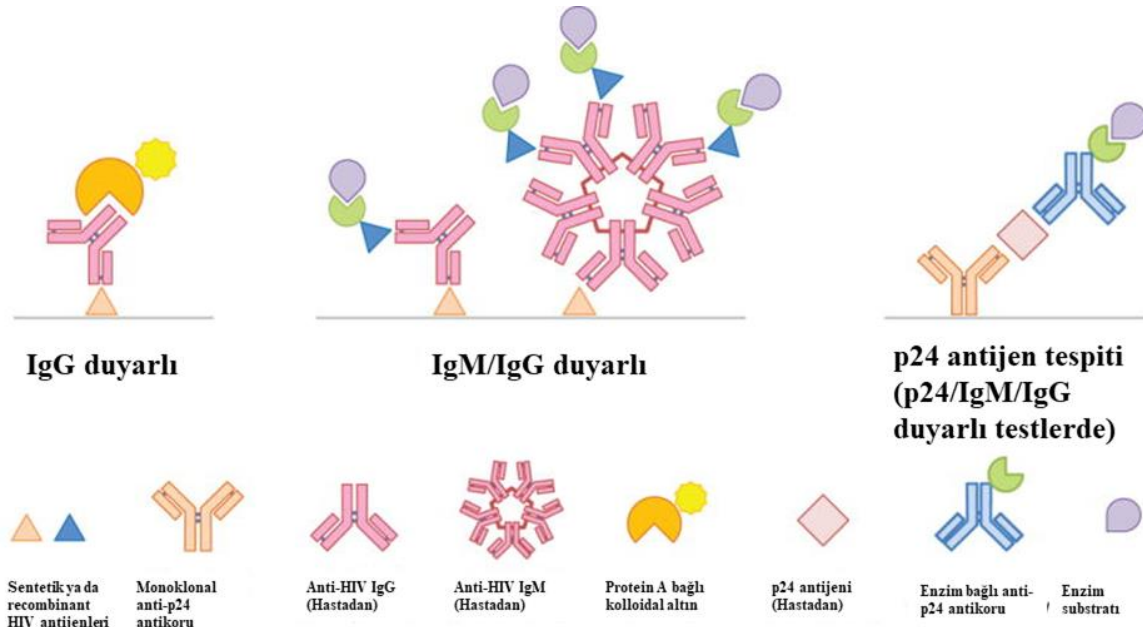
2014 yılında Amerikan Hastalık Kontrol (CDC) ve Halk Sağlığı Laboratuvarları Birliği, akut HIV-1'in daha doğru teşhisine ve HIV-2'nin tespit edilmesine yönelik yeni bir HIV teşhis algoritması yayınlamıştır. CDC tarafından önerilen HIV tanı yaklaşımı, bir antijen-antikor testi ile ilk tarama ve bir HIV-1/2 ayırma testi kullanılarak reaktif numunelerin pozitifliğinin kontrolünü sağlayan testlerden oluşmaktadır (Şekil 2.20) [4].



Şekil 2.20. HIV laboratuvar tanı algoritması. p24 antijenini (Ag) ve hem IgM hem de IgG antikorlarını (Ab) güvenilir bir şekilde tespit edebilen herhangi bir test, 2014 yılında güncellenen CDC algoritmasında HIV taraması için önerilen başlangıç noktasıdır. HIV-1'i HIV-2'den ayırabilen tamamlayıcı immünolojik test; bu adım, Western blot'un yerini almıştır. Ayırma testinden elde edilen belirsiz veya negatif sonuçlar, akut HIV enfeksiyonunu (p24 antijeni veya IgM antikoru için pozitif) veya biyolojik yanlış pozitif testi göstermektedir; takiben bir nükleik asit testinde saptanabilir HIV RNA'nın varlığı pozitif tanı koydurur [4,147].

Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylı HIV serolojik testleri, kullanılan tekniklere ve tahlil duyarlılığındaki artışa dayalı olarak, birinci, ikinci, üçüncü ve dördüncü nesil testler olarak kategorize edilmiştir [148]. Yeni geliştirilmiş HIV tanı testlerinin birçoğunda, HIV test kuşakları arasında açık bir ayrım yapmak mümkün değildir (Şekil 2.21) ve HIV testlerinde kuşak isimlendirmesinin kullanılması artık tavsiye edilmemektedir [149]. Birinci ve ikinci nesil antikor testleri IgG'ye duyarlı testler, üçüncü nesil testler IgM/IgG'ye

duyarlı testler ve dördüncü nesil antijen ve antikorunu birlikte saptayan testler olarak bilinmektedir [148].



Şekil 2.21. HIV serolojik testleri. IgG'ye duyarlı testlerde, hastanın örneğindeki anti-HIV IgG, katı fazda (Gri çizgi) sabitlenmiş HIV antijenlerine bağlanmaktadır; tespitte çoğunlukla koloidal altına konjuge protein A kullanılmaktadır. IgM/IgG'ye duyarlı testler, hasta numunesindeki hem IgM hem de IgG'nin bağlanmasına izin vermektedir ve tespitte, etiketli, sentetik HIV antijenleri (Enzimatik olarak bağlı veya kemilüminesan etiketli konjuge) kullanılmaktadır. Eşzamanlı, monoklonal antikor aracılı p24 antijen tespitinin eklenmesi, Ag/Ab kombine testlerini IgM/IgG'ye duyarlı testlerden ayırmaktadır [148].

Yirmi yıldan fazla bir süredir, HIV antikor testleri, HIV test algoritmasında ilk laboratuvar tanı testi olarak yaygın şekilde kullanılmıştır. Bununla birlikte, 2014 yılından bu yana, HIV antikor testlerinin ilk tarama testi olarak kullanımının yerini HIV antijen-antikor testleri almıştır [4,5]. Pozitif HIV antikor testi her zaman başka bir HIV testiyle doğrulanmalıdır [4]. Mevcut HIV antikor testlerinin çoğu, HIV antikorlarını enfeksiyon başlangıcından yaklaşık 23 ila 25 gün sonra tespit edebilen IgM/IgG'ye duyarlı testlerdir [148].

Antijen ve antikorun birlikte tespitine dayalı testler, HIV tanısında tercih edilen testlerdir. Bu immünolojik testler, HIV-1 p24 antijenini ve HIV-1 ve HIV-2'ye karşı antikorları (IgM ve IgG) tespit etmektedir. Tüm reaktif HIV-1/2 antijen-antikor testleri doğrulama testi gerektirmektedir. HIV-1/2 immünolojik testlerinin hiçbiri HIV-2 çekirdek antijenini (p26) tespit edemez, ancak HIV-1 p24 antijenine çapraz reaktivite HIV-2 ile enfekte kişilerde

görülebilmektedir [4]. Tek kullanımlık, HIV hızlı tanı test kitleriyle 40 dakika içinde sonuçlar alınabilmektedir [150]. Pozitif saptanan tüm HIV hızlı tanı testlerinin sonuçları bir doğrulama testi ile tekrar değerlendirilmelidir [4].

HIV-1 ve HIV-2 enfeksiyonlarının tanı testleriyle ayrımının yapılması önemlidir. Çalışmalar HIV-1 Western blot testinin, HIV-2 ile enfekte kişilerden alınan örneklerin % 46-85'inde hatalı HIV-1 pozitif olarak yorumlandığını göstermiştir [4]. Şu anda, sadece bir adet FDA onaylı HIV-1/HIV-2 ayırma testi mevcuttur (Geenius HIV 1/2 Supplemental Assay) [151]. Bu test, HIV-1 antikorlarını (p31, gp160, p24 ve gp41) ve HIV-2 antikorlarını (gp36 ve gp140) saptamak için birden fazla rekombinant veya sentetik peptit kullanmaktadır [152].

HIV-1 Western blot yönteminde, HIV-1 proteinleri jel elektroforezi ile ayrılmaktadır, ardından bunlar bir membran üzerine aktarılmaktadır. HIV-1 Western blot testi, büyük ölçüde daha duyarlı ve özgün HIV teşhis testlerine yerini bırakmıştır. HIV-1 Western blot kullanıldığında, üç ayrı HIV-1 gen bölgesinden ifadelenen HIV-1 proteinlerine karşı oluşmuş antikorlar tespit edilebilmektedir; *env* (gp41, gp120/160), *pol* (p31, p51, p66) ve *gag* (p15, p17, p24, p55) [153].

HIV RNA nükleik asit testleri (NAT) farklı durumda kullanılmaktadır [4]:

- Reaktif HIV-1/2 antijen-antikor testi sonucu, reaktif olmayan veya belirsiz bir HIV-1/HIV-2 ayırım testi sonucu alındığında, olası akut enfeksiyonu değerlendirmek için,
- Akut HIV şüphesi yüksek olduğunda ve başlangıçtaki HIV-1/2 antijen-antikor immünolojik test sonucu negatif olduğunda,
- Kronik HIV enfeksiyonunu doğrulamak için.

Kantitatif HIV RNA NAT, halihazırda HIV tanısı konmuş hastaların viral yüklerini izlemek için klinik uygulamada rutin olarak kullanılmaktadır ve piyasada bulunan birçok test, 20 kopya/ml'ye kadar düşük viremiyi tespit edebilmektedir [154].

2.9. Antiretroviral Tedavinin Moleküler Temelleri

HIV viral döngüsünün farklı aşamalarında etkili olan antiretroviral ilaçlar mevcuttur. Çizelge 2.1'de tedavide kullanılan mevcut antiretroviral ilaçların sınıfı, jenerik ve kimyasal isimleri özetlenmiştir.

Çizelge 2.1. Mevcut antiretroviral ilaçlar [155]

Sınıf	Jenerik isim	Kimyasal isim
Giriş inhibitörleri	Enfuvirtide	ENF
	Fostemsavir	-
	Maraviroc	MVC
	Ibalizumab	-
	Leronlimab	-
İntegraz inhibitörleri	Raltegravir	RGV
	Dolutegravir	DTG
	Cabotegravir	-
Nükleosit/Nükleotid ters transkriptaz inhibitörleri (NRTI)	Abacavir	ABC
	Azidothymidine/ Zidovudine	AZT/ZDV
	Didanosine	ddI
	Lamivudine	3TC
	Stavudine	d4T
	Tenofovir	TDF
	Emtricitabine	FTC
	Tenofovir alafenamide	TAF
	İslatravir	-
Nükleosit olmayan ters transkriptaz inhibitörleri (NNRTI)	Delavirdine	DLV
	Efavirenz	EFV
	Etravirine	ETR
	Nevirapine	NVP
	Rilpivirine	RPV
	Doravirine	-
Proteaz inhibitörleri (PI)	Atazanavir	ATV
	Darunavir	DRV
	Indinavir	IDV
	Lopinavir	LPV
	Nelfinavir	NFV
	Ritonavir	RTV
	Saquinavir	SQV
	Tipranavir	TPV
	Fosamprenavir	FPV

2.9.1. HIV giriş inhibitörleri

- **Tutunma İnhibitörü:** Tutunma inhibitörü olan fostemsavir aktif form temsavir'e hidrolize olan bir ön ilaçtır. gp120-CD4+ bağlanma bölgesine yakın yerde gp120 zarfına bağlanmaktadır. Temsavirin bağlanması, CD4+ reseptörüne normal bağlanma için gereken gp120 konformasyonel değişikliğini önlemektedir [156].
- **Tutunma Sonrası İnhibitörü:** Monoklonal antikor ibalizumab, konak hücre CD4+ reseptörünün D2 bölgesine bağlanmaktadır. gp120'de meydana gelen ve gp120-koreseptör bağlanmasını sağlayan yapısal değişikliği önleyerek virüsün hücreye girişini engellemektedir. Ibalizumab, CD4+ D1 ve HIV gp120'nin ilk bağlanmasını engellememektedir. İbalizumabın, CD4+ D1 bölgesinde meydana gelen MCH sınıf II moleküllerinin CD4+ bağlanmasına müdahil olmadığından, CD4+ aracılı bağışıklık fonksiyonunda etkisi olmadığı düşünülmektedir [157].

- **CCR5 Reseptör Antagonistleri:** CCR5 antagonistlerinin kullanımı, kişiyi enfekte eden HIV alt tipiyle ilişkilidir. Konak hücre koreseptör bağlanmasında üç farklı HIV alt tipi vardır: R5 HIV sadece CCR5 koreseptörüne bağlanabilir, X4 HIV sadece CXCR4 koreseptörüne bağlanabilir, dual-tropik HIV CCR5 veya CXCR4 koreseptörlerine bağlanabilir. R5 HIV ve X4 HIV karışımına sahip bireylerde karışık tip tropik HIV bulunmaktadır. CCR5 antagonistleri CCR5 koreseptörüne bağlanarak, HIV gp120'nin CCR5 koreseptörüne bağlanmasını önleyen konformasyonel bir değişikliğe neden olmaktadır. Maraviroc, FDA onaylı tek CCR5 antagonistidir ve sadece antiretroviral tedavi deneyimi olan kişilerde kullanılması önerilmektedir [158]. Maraviroc tedavisine başlamadan önce, HIV koreseptör tropizm testi yapılarak kişiyi enfekte eden virüsün saf R5 HIV olduğu doğrulanmalıdır [159].
- **Füzyon İnhibitörü:** Füzyon inhibitörü enfuvirtid, HIV gp41 HR2'de 36 aminoasitlik bir segmente karşılık gelen 36 aminoasit içeren sentetik bir peptididir [160]. Enfuvirtid peptidi gp41'in HR1'ine bağlanarak gp41 HR1 ve 2'nin normal etkileşimini ve katlanmasını önlemektedir [161].

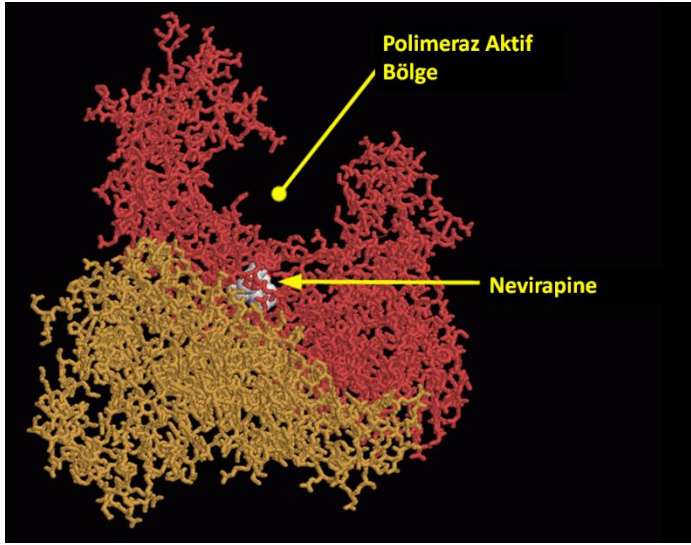
2.9.2. Ters transkripsiyon inhibisyonu

HIV ters transkriptaz inhibitörleri, nükleosit ters transkriptaz inhibitörleri (NRTI) ve nükleosit olmayan ters transkriptaz inhibitörleri (NNRTI) olmak üzere iki sınıf antiretroviral ilacı içermektedir. NRTI'ler nükleotid analogları olup hücre tarafından substrat olarak kullanılabilirler ve uzayan HIV DNA zincirinin sonlanmasına neden olmaktadır. NNRTI'ler ise doğrudan HIV ters transkriptaz enzimine bağlanarak enzimin işlevini inhibe etmektedir.

- **Nükleosit ters transkriptaz inhibitörleri:** NRTI'ların, aktifleşmesi için hücre içinde fosforilasyon olmaları gerekmektedir. Bir kez trifosforile olan NRTI'lar, insan nükleotidlerini taklit ederek ters transkriptaz enzimi tarafından kullanılabilirler. İnsan nükleotidlerinin aksine, NRTI ilaçlarının 3' hidroksil grubu yoktur ve NRTI'lara nükleotidler ilave edilemezler, dolayısıyla zincir uzamasını sonlandırırlar [162]. NRTI'nın başka bir versiyonu, nükleositler yerine nükleotidler kullanan nükleotid terst transkriptaz inhibitörleridir (NtRTI). Bu NRTI grubu ilaç, nükleosidi nükleotide dönüştürerek inhibe edici özelliklerini göstermesi için aktive edilmelidir. NtRTI'nin etki

modu NRTI'ya benzerdir, ancak NtRTI'nın daha fazla yan etkileri olduğu bilinmektedir [163].

- Nükleosit olmayan ters transkriptaz inhibitörleri: NNRTI'lar, p66 alt birimindeki aktif polimeraz bölgesine yakın olan hidrofobik cebe bağlanırlar (Şekil 2.22) [164]. NNRTI'nın bağlanması, ters transkriptazın konformasyonel bir değişikliğine neden olmaktadır ve bu da HIV ters transkripsiyonunda kritik adım olan DNA polimerizasyonunu bloke etmektedir [165].



Şekil 2.22. Nevirapine mekanizması. NNRTI olan nevirapine RT enziminin aktif bölgesine bağlanarak enzimi inhibe etmektedir [74,166]

2.9.3. İntegraz inhibisyonu

HIV integraz inhibitörleri (INSTI), integrazın transfer aşamasını bloke etmek için farklı mekanizmaları kullanmaktadır. INSTI'lar sadece integraz enzimi viral DNA'ya eklendiğinde integraz enzimine bağlanmaktadır. INSTI'lerin diketoasit grubu, HIV integraz enziminin aktif bölgesindeki magnezyum iyonlarına bağlanarak aktif bölgeyi inhibe etmektedir [121]. Magnezyum iyonlarına bağlandıktan sonra, INSTI'lar HIV DNA 3' hidroksil uçlarının yerini almaktadır, bu da entegrasyon sürecini kesintiye uğratmaktadır [167]. HIV entegrasyon süreci engellendiğinde, HIV DNA konak hücre onarım enzimleri için substrat haline gelir ve HIV DNA kompleksi yan ürün olan dairesel 2-LTR'lere dönüştürülür [168].

2.9.4. Proteaz inhibisyonu

HIV proteaz inhibitörleri, HIV proteazın aktif bölgesine bağlanarak enzim aktivitesini inhibe eden yapısal olarak karmaşık moleküllerdir. HIV proteaz inhibitörleri, Gag ve Gag-Pol

prekürsör poliproteinlerinin işlenmesini bozarak olgunlaşma sürecinin durmasına neden olurlar ve böylece yeni hücrelerin enfeksiyonunu önlemektedirler. Proteaz inhibitörlerinin, halihazırda HIV ile enfekte olmuş hücreler (Konak hücre DNA'sına entegre proviral DNA'ya sahip olanlar) üzerinde etkisi yoktur [85].

2.10. HIV İlaç Direnci Mekanizmaları

HIV ters transkriptaz enziminin replikasyon esnasında hata yapmaya meyilli olması, birden fazla varyantın aynı hücreyi enfekte etmesiyle ortaya çıkan rekombinant formlar ve enfeksiyon sırasında proviral varyantların birikmesi gibi durumlar HIV'da genetik çeşitliliğe neden olmaktadır. HIV RT her replikasyonda genomda bir hataya neden olmaktadır ve bu da her 2000 nükleotid için kabaca 1 mutasyon görüldüğü anlamına gelmektedir [169]. Ek olarak, HIV, son derece yüksek replikasyon kapasitesine sahiptir. Tedavi almayan hastalarda her gün birkaç milyar yeni viral partikül replike olabilmektedir. HIV ile enfekte tedavi görmemiş yetişkinlerde, plazma HIV RNA viral yük seviyeleri 10^3 ila 10^5 kopya/ml arasında değişebilmektedir ve akut enfeksiyonda veya ilerlemiş hastalıkta viral yük düzeyleri 10^6 kopya/ml'den fazla olabilmektedir [170]. HIV enfeksiyonu çoğunlukla tek bir viral varyantın bulaşmasıyla ortaya çıksada, enfeksiyon başlangıcından sonra ilk bulaşan virüsle ilişkili fakat bu virüsten genetik olarak farklı sayısız varyant ortaya çıkmaktadır. RT enziminin yüksek hata oranı ile birleşen bu yüksek replikasyon oranı, çok sayıda HIV genetik varyantının hızla ortaya çıkabileceği ve yayılabileceği anlamına gelmektedir.

İlaça dirençli varyantların görülmesi, tedavinin yeteri kadar baskılayıcı olmadığı durumlarda, viral replikasyonun ne ölçüde devam ettiği, belirli bir ilaç direnci mutasyonunun (DRM) ortaya çıkma olasılığı ve DRM'lerin ilaç duyarlılığı ve virüs replikasyonu üzerindeki etkisi gibi faktörlerle ilişkilendirilmektedir [10]. HIV-1'in anneden çocuğa bulaşmasını önlemek için kullanılan tek bir nevirapine (NVP) dozunun NNRTI'ya dirençli mutantları seçebileceği çalışmalarla gösterilmiştir [171,172]. Tedavi edilmeyen hastalarda her gün doğal olarak ilaca dirençli varyantlar ortaya çıkmaktadır. Polimorfik mutasyonlar, ilaç maruziyeti olmayan virüslerde görülen mutasyonlardır. Polimorfik olmayan mutasyonlar ise tedavi olmadığında ortaya çıkmayan mutasyonlardır [173]. Tedavi almayan hastalarda seçici ilaç baskısı olmadığından ilaca duyarlı varyantlar nadiren tespit edilebilir seviyelere yükselmektedir. Aslında, klinik olarak önemli DRM'lerin birçoğu seçici ilaç baskısının bir sonucu olarak ortaya çıkmaktadır. HIV ile enfekte kişilerde, ortaya çıkan varyantlar,

antiretroviral ajanlara karşı dirençte, ilaçların seçimini ve tedavi sürecini etkileyen önemli bir faktördür [174]. HIV ilaç direncinin gelişmesine neden olabilecek faktörler arasında zayıf hasta uyumu, antiretroviral ajanların terapötik düzeyin altındaki kan seviyeleri ve uygun olmayan antiretroviral ajanların seçimi de yer almaktadır. Antiretroviral ajanların kan seviyelerini etkileyebilen farmakokinetik faktörlerde direnç gelişimine neden olabilmektedir. Farmakokinetik faktörler arasında zayıf oral absorpsiyon ve diğer ajanlar tarafından ilacı metabolize eden enzimlerin etkinliğinin değişmesi ve birlikte alınan ilaçların etkileşimleri yer almaktadır [175].

Bazı ART'lere karşı, direnç gelişmesi için birden fazla DRM'nin birlikte bulunması gerekirken, bazı durumlarda tek bir DRM'nin olması direnç gelişmesi için yeterli olmaktadır. Direnç gelişimi için gerekli DRM sayısı ve her DRM'nin virüsün konak hücreye adaptasyon yeteneği (Viral fitness) üzerindeki etkisi, ART'nin dirence karşı “genetik bariyerine” katkıda bulunmaktadır. Bir ART'nin plazma HIV-1 RNA düzeylerini azaltma derecesi, “antiviralin potansiyeli” olarak tanımlanmaktadır. ARV potansiyeli ve genetik bariyer birlikte “virolojik başarısızlığın” önlenmesinde önemli faktörlerdir. DRM'ler, ilaçlara duyarlılığı doğrudan azaltan birincil DRM'ler ve virüsün replikasyon yeteneğini artıran veya duyarlılıkta daha fazla azalmaya katkıda bulunan birincil DRM'lerle birlikte bulunan, yardımcı DRM'ler olarak kategorize edilmektedir [10].

İlaç sınıfları arasında çapraz direnç yoktur. Bir ART sınıfındaki ilaçlara dirençli olan virüsler, diğer sınıflardaki ART'lere tamamen duyarlıdır [176]. Buna karşılık, çoğu DRM, aynı sınıftaki birden fazla ART'ye duyarlılığı azaltarak çapraz dirence neden olabilmektedir [177]. Bununla birlikte, birkaç DRM'nin aynı sınıftaki diğer ART'lere duyarlılığı artırdığı bilinmektedir [178].

Evrensel olarak kabul edilmiş bir tanım olmamasına karşın, ilaç uyumu, bir hastanın bir ilacı bir sağlık hizmeti sağlayıcısının amaçladığı şekilde ne ölçüde aldığı olarak tanımlanabilir. Antiretroviral ilaç uyumu, CD4+'den sonra AIDS'e ilerleme ve ölümün ikinci en güçlü öngörücüsüdür [179,180]. Birinci basamak tedavide kullanılan çoğu ART rejimi, HIV replikasyonunu tamamen bloke etmek için yeterince etkindir ve uzun vadeli virolojik baskılamayı sürdürmek için virüsün direnç mekanizmalarına karşı yeterince güçlü bir genetik bariyere sahiptir. Sonuç olarak, çoğu virolojik başarısızlık ve ilaç direnci vakası, hastanın antiretroviral ilaç uyumundan kaynaklanmaktadır [181].

2.11. HIV İlaç Direnci Testleri

HIV ilaç direncinin ilk klinik tanımı 1989 yılında yapılmıştır. Zidovudin monoterapisi alan hastalarda HIV ters transkriptaz enzimini sentezleyen gen bölgesinde biriken mutasyonlar ve bunun ilaç direncinde belirgin bir artışa neden olduğu bildirilmiştir [182].

İlaç direncinin gelişimi, etkili antiretroviral rejimin seçilmesinde klinik öneme sahiptir. HIV ilaç direnci testlerinin kullanımının, mortaliteyi düşürdüğü ve viral baskılamada daha etkin klinik yönetimin yapıldığını göstermiştir. 1999 ile 2005 yılları arasında 2699'dan fazla HIV ile enfekte hasta üzerinde yapılan gözlemsel bir çalışmada, direnç testi uygulamalarının mortaliteyi azalttığı bildirilmiştir [183].

Direnç testleri, genotipik ve fenotipik testler olmak üzere iki alt grupta kategorize edilmektedir. Temelde direnci farklı şekillerde tespit etselerde, bu iki gruptaki testlerin sonuçları genellikle birbiriyle ilişkilidir [184].

- Genotipik direnç testleri, HIV genomunda kodlanan proteaz, ters transkriptaz ve integras gen bölgelerindeki özgün ilaç direnci mutasyonlarının varlığını tespit etmektedir. Sonuçlar, her bir mutasyon ve her antiretroviral ajan için "duyarlı", "muhtemel dirençli" veya "dirençli" gibi yorumlarla rapor edilmektedir.
- Fenotipik direnç testleri, bir antiretroviral ilacın in vitro olarak virüs replikasyonunu ne ölçüde engellediğini ölçmektedir. Fenotipik analizlerle ölçülen duyarlılık, bir hastayı enfekte eden viral suştaki edinilmiş ilaç mutasyonlarının tamamını ifade etmektedir. Duyarlılık, HIV replikasyonunu %50 (IC50) inhibe eden ARV konsantrasyonu olarak rapor edilmektedir. Hastayı enfekte eden virüsünün IC50'si, ilaca duyarlı bir referans suş ile karşılaştırılarak hasta numunesinin ilaca duyarlılığındaki değişimin kaç kat olduğu rapor edilmektedir.

Çoğu hastanın klinik yönetiminde genotipik testler tercih edilmektedir. Genotipik testler, daha düşük maliyetli ve daha kısa sürede sonuçlanması nedeniyle fenotipik testlere göre daha üstündür. Birden fazla direnç mutasyonu olduğu durumlarda özellikle tedavi deneyimi olan hastalarda özgün bir mutasyonun önemini yorumlamak zor olabilmektedir. Bazı mutasyonlar belirli ilaçlara karşı direnç oluştururken, diğerlerine karşı duyarlılığı artırabilmektedir. Bu tür hastalar için fenotipik direnç testleri, direnci doğrudan ölçmesi ve

mutasyonlar arasındaki göreceli duyarlılığı ve etkileşimleri değerlendirebilmesi sebebiyle genotipik testlere göre bir avantaja sahip olabilmektedir [185,186].

2.11.1. Genotipik testler

Bu testler, hastada bulunan HIV suşlarının genomundaki proteaz, ters transkriptaz ve integras gen bölgelerinin polimeraz zincir reaksiyonu ile amplifiye edilerek sekanslanmasına dayanmaktadır. Genotipik testler nükleozid ters transkriptaz inhibitörleri (NRTI), nükleosid olmayan ters transkriptaz inhibitörü (NNRTI), proteaz inhibitörü (PI), integras inhibitörleri ve füzyon inhibitörlerine karşı direncinin test edilmesini içermektedir.

Plazma HIV viral popülasyonunda %20-30'un altındaki düşük frekanstaki varyantların standart genotipik testlerle tespit edilememesi direnç testlerinin yorumlanmasını sınırlandırmaktadır. Genotipik testler için kullanılan yaklaşımlardan bahsetmeden önce kullanılan testlerin düşük frekanslarda bulunan varyantları tespit etmede sınırlamaları olduğu vurgulanmalıdır. Testi yapılan numune yeterli popülasyon büyüklüğünde olmalıdır. Örneğin; viral yükü 5000 kopya/ml olan, 10 µl miktarında plazma örneği kullanılan testler, düşük frekanslarda bulunan varyantlar hakkında yeterli bilgi sağlamayabilir. İlaç direnciyle ilişkili mutasyon polimorfizmi, testlerde kullanılan primer ve problemlerin nükleik asit dizisine bağlanmalarını etkileyebilmektedir. Örneğin, terst transkriptaz gen bölgesindeki T215Y mutasyonu, aynı gen bölgesindeki 210 ve 214'üncü kodonlardaki varyantlarla ilişkilidir. Yaygın olarak tespit edilen suşları amplifiye etmek için tasarlanmış primerler ve problemler, yeni türemiş varyantların tespitinde daha az performans gösterebilmektedir. Pirosekanslama ve tek genom dizileme gibi klonlama yöntemi kullanılmayan popülasyon bazlı dizileme yöntemlerinde mutasyonların popülasyondaki farklı varyantlarda olup olmadığı belirlenememektedir [187].

Numune Seçimi ve Saklama Koşulları

Başlangıç materyalinin seçimi HIVDR tespitini etkileyerek sonuçlarının yorumlanmasında farklılıklara neden olabilmektedir. Başlangıç materyali olarak, plazmada bulunan viral RNA, periferik kan mononükleer hücrelerinden (PBMC) elde edilen proviral DNA veya buffy-coat kullanılabilir [188,189]. Proviral DNA kullanılarak yapılan dizilemelerde, kusurlu virüs dizilerinin dahil olması nedeniyle sonuçlarda farklılıklar görülebilmektedir. Düşük viral yüke sahip numunelerin genotiplendirilmesinde kullanılan proviral DNA

dizilemelerinde plazmadan viral RNA kullanıldığı durumlara göre artan oranda hipermutasyon ve stop kodonları tespit edilebilmektedir. Plazma sadece aktif olarak replike olan virüsleri içermesi sebebiyle, antiretroviral etkisi altında seçilen en son türeyen varyantları temsil etmektedir. Proviral DNA direnç testi, viral yükün tespit edilebilir seviyelerin altında olduğu durumlarda, önceden mevcut direnç sonuçları olmadığında ve plazma HIV RNA genotipik testinin başarılı olma olasılığının düşük olduğu durumlarda, hastanın ART rejimini değiştirirken faydalı olabilmektedir [190,191].

HIV genotiplendirmesinde, kurutulmuş kan lekelerinin (DBS; dried blood spot) kullanılması, plazma kullanımına kıyasla, saklama ve transfer avantajlardan dolayı, kaynakları sınırlı koşullarda daha çok tercih edilmektedir. DBS'den elde edilen HIVDR sonuçlarının plazmadan elde edilen sonuçlarla yüksek oranda eşdeğer olduğu, fakat sonuçların yorumlamasını etkileyebilecek farklılıklar ortaya çıkabildiği bilinmektedir [192]. DBS örneklerinden ekstrakte edilen nükleik asit materyali plazma viral RNA ve proviral DNA'yı birlikte içermektedir. Viral yükün 5000 kopya/ml'den fazla olduğu ve hastanın 2 seneden daha kısa antiretroviral tedavi (ART) aldığı durumlarda plazma viral RNA ve DBS genotiplendirme sonuçlarında birbiriyle uyumlu sonuçlar verdiği bildirilmiştir [193].

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Amplifikasyonu

Ekstraksiyon sonrası viral RNA'nın ters transkripsiyon reaksiyonu ile komplementer DNA (cDNA)'ye çevrilmesi gerekmektedir. Ters transkripsiyon işlemi, RNA'nın deoksi nükleotid tirifosfatlar (dNTP), RT enzimi ve DNA primeri ile inkübe edilmesini içermektedir. Moloney murin lösemi virüsü (MMuLV) ve kuş miyeloblastoz virüsü (AMV) gibi RT enzimleri kullanılabilir. RNase H aktivitesinden yoksun RT enzimleri, yüksek termostabiliteye sahip olup daha yüksek sıcaklıklarda ters transkripsiyonun gerçekleştirilmesine olanak tanımaktadır. Ters transkripsiyon, random heksamer primerler ile veya HIV'e özgü primerler ile gerçekleştirilebilir. Ters transkripsiyon ve PCR, tek adımlı veya iki adımlı formatlarda gerçekleştirilebilmektedir [194].

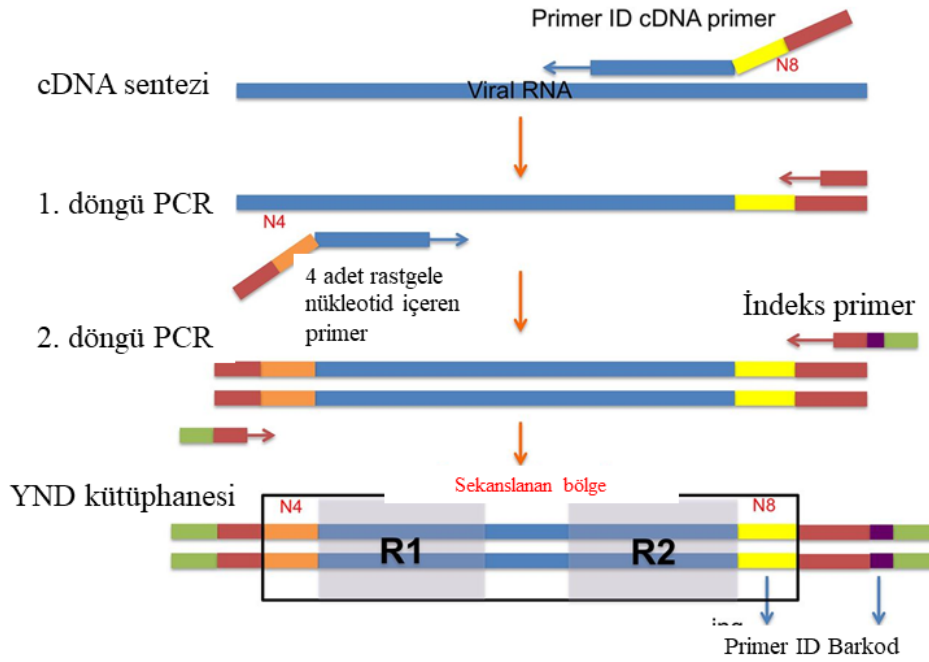
Ters transkripsiyonu takiben, dizileme için yeterli hedef DNA eldesi için PCR amplifikasyonu gereklidir. Virüsün korunan ve ilaç tedavisinden etkilenmeyen bölgelerine bağlanan primerler tercih edilmektedir. Sanger zincir sonlandırma ile yapılan sekanslamalarda Taq polimeraz yeterli olmaktadır. Klonlanmış DNA'nın sekans

analizlerinde, Taq polimeraz ile karşılaştırıldığında düşük hata oranına sahip olan Pfu gibi proofreading aktivitesine sahip bir enzim kullanılarak gerçekleştirilmektedir. Amplifikasyon için gerekli döngü sayısının azaltılması PCR kaynaklı dizileme hatalarını azaltmaktadır [195].

Optimizasyonu iyi yapılmış yöntemlerle, plazma HIV-1 RNA seviyeleri 1.000 kopya/ml'den fazla olan numunelerle 30-40 PCR döngüsünden sonra dizileme için yeterli genetik materyal elde edilebilmektedir [194].

Enzim kaynaklı yanlış okumalar ve PCR aracılı rekombinant formlar dizileme popülasyonunda yapay çeşitliliğe neden olabilmektedir. Buna karşılık aynı materyalin tekrarlanan PCR'ları ve yeniden örnekleme, yapay homojeniteye neden olarak viral çeşitliliğin yanlış yorumlanmasına sebebiyet verebilmektedir. PCR yeniden örneklemesini hesaba katmak ve dizilenen viral RNA miktarını doğru bir şekilde tanımlamak için "primer tanımlayıcı dizileri" (Primer ID) kullanılabilmektedir (Şekil 2.23) ve bu yöntem HIV genomik RNA popülasyonlarının YND'de hata oranını büyük ölçüde azaltmaktadır. Primer tanımlayıcı dizi stratejisi, cDNA sentez primerlerine dejenere bir nükleotid bloğunun eklenmesini içermektedir ve cDNA kopyalarının her birinin kendi tanımlayıcısına sahip olmasına izin vermektedir [196,197].

Aynı okumada az sayıda bulunan DRM varyantların birlikte görülmesini analiz ederek, her varyantın varlığını bağımsız olarak tespit etmek için faydalı olabilmektedir. Bununla birlikte, en sık kullanılan YND platformlarından elde edilen okumalar nispeten kısa olduğundan, uzun mesafelerde birlikte görülen varyantların analizini kısıtlandırmaktadır ve bu yaklaşım kısa genetik mesafelerle sınırlı kalmaktadır [197].



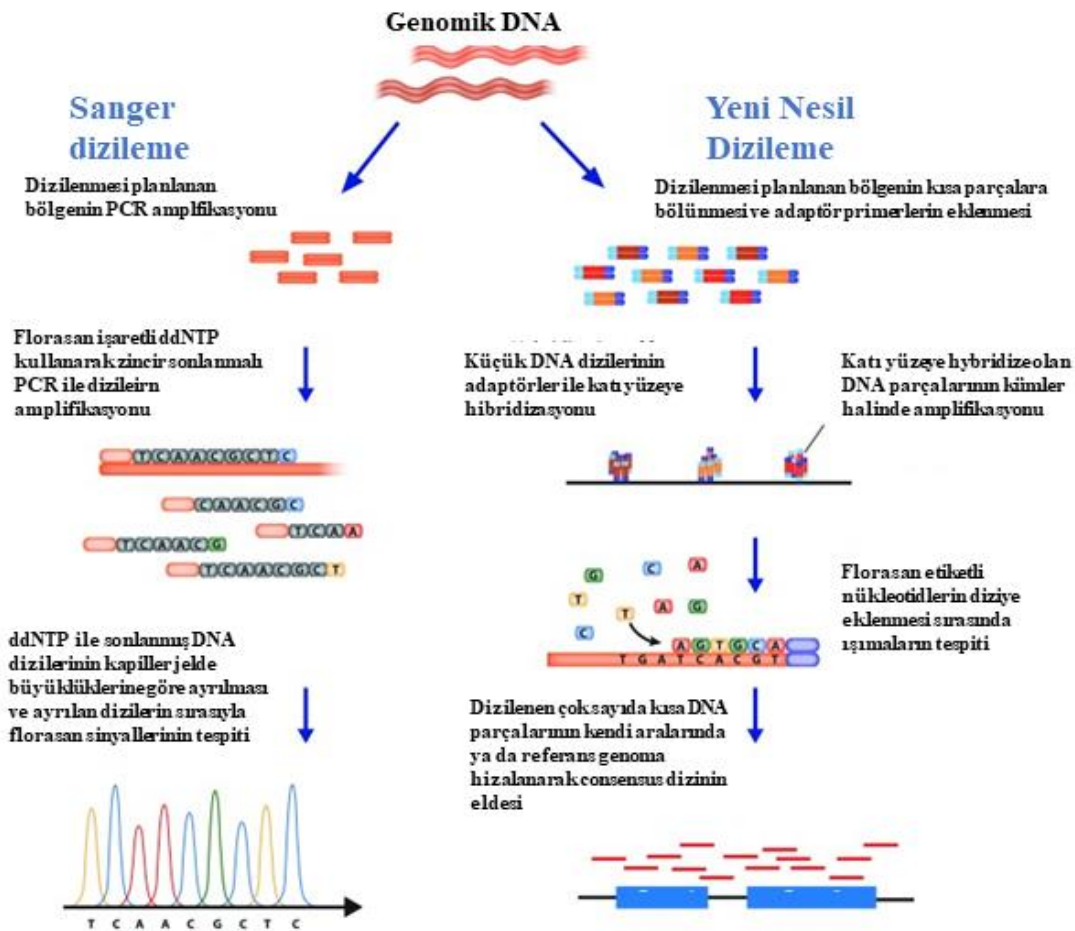
Şekil 2.23. Primer ID yöntemi. Primer ID (Sarı, N8), bir PCR primer bölgesi (kahverengi) ile birlikte cDNA primerine dahil edilmiştir ve cDNA sentezinde kullanılan diğer primer, birinci döngüde sentezlenen ilk diziye (Turuncu, N4) çeşitlilik eklemek için dört randomize baz içermektedir. YND için gerekli İndeks primerler (Mor barkodlu yeşil) ikinci PCR döngüsünde dahil edilmiştir. Ortada dizilenmesi planlanan bölge gözlenmektedir; bölge 1 (R1) ve bölge 2'nin (R2) çift yönlü sekanslandığı betimlenmiştir [196].

Primer tasarımı, yerel viral çeşitlilikler göz önünde bulundurularak primer tutunması optimize edecek şekilde tasarlanabilir. Amplifiye edilen HIV genetik bölgesinin uzunluğuda test sonuçlarında farklılıklara neden olabilmektedir. Uzun bölgelerin amplifikasyonunda düşük hata payına sahip ve uzun dizileri proses edebilecek enzimlerin kullanılması uygundur. Uzun bölgelerin amplifikasyonunda cDNA miktarıda önem teşkil etmektedir [197].

Dideoksinükleotid Dizileme (Sanger Dizileme)

Dideoksinükleotid dizileme, HIV dizilemesi için en çok kullanılan yöntemdir. Dizileme işlemi öncesinde, RNA izolasyonu, ters transkripsiyon ve polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) amplifikasyonu aşamaları gerçekleştirilmektedir. Bu yöntem enzimatik DNA sentezine dayanmaktadır ve en çok kullanılan dizi analiz tekniğidir. Yöntemde dizisi saptanacak olan DNA ipliği yeni sentezlenecek iplik için kalıp olarak kullanılmaktadır. Dizi analizi, polimeraz zincir reaksiyonu, dizileme reaksiyonu, jel elektroforezi ve bilgisayarda değerlendirme olmak üzere 3 basamak içermektedir (Şekil 2.24). DNA tek zincir haline

getirilerek reaksiyona girecek olan karışıma dört çeşit normal nükleotid (dNTP) ve diziyi rastgele sonlandırmak için farklı renkte floresan kimyasallarla işaretlenmiş dideoksi nükleotidler (ddNTP) eklenmektedir. Sentezlenen DNA ya bir ddNTP'nin katılması 3 pozisyonunda OH grubu olmadığı için sentezi durdurmaktadır. Reaksiyon sonunda deoksinükleotidlerle uzamış ve ddNTP'lerle sonlanmış çok sayıda dizi elde edilmektedir. Bu reaksiyon, nükleotid uzunluğuna göre birbirinden farklı olan bir dizi DNA zinciri oluşturmaktadır. Sonlandırma reaksiyonlarını tanımlamak için bir veya daha fazla boyadan gelen floresansı algılayan, otomatize sekanslama cihazları kullanılmaktadır. Reaksiyon karışımı, poliakrilamid jel matrikse yüklenerek elektroforezi yapılarak ayrılmaktadır. Elektroforez süresince DNA'ya bağlanan floresan boya ışık ile taranan bölgeye geldiğinde uyarılarak oluşan ışık dalga boyu bir detektör aracılığıyla tespit edilmektedir [198,199].



Şekil 2.24 Sanger ve yeni nesil dizileme. Sanger dizileme ve YND teknolojileri arasında karşılaştırma. Sanger dizileme, yaklaşık 700 baza kadar reaksiyon başına bir DNA fragmanının dizisini belirlemekle sınırlıdır. YND platformları, milyonlarca DNA parçasını tek bir reaksiyonda dizileme kapasitesine sahiptir [200].

Dideoksinükleotid dizilemesinde, ısıya dayanıklı bir DNA polimeraz enzimi kullanılarak, sadece 1 µg kadar çift sarmallı DNA zincirinin sekanslaması yapılabilmektedir. Dizilemesi yapılacak DNA kalitesi, yüksek kaliteli sekans verileri elde etmek için en önemli bir faktördür. Dizileme prosedürüne geçilmeden önce PCR ürünlerinin pürifikasyonu yapılmalıdır. Dizileme reaksiyon ürünleri, reaksiyon ürünlerinin elektroforetik olarak ayrılmasından önce bağlanmamış floresan etiketleri reaksiyon karışımından uzaklaştırmak için saflaştırılmalıdır. Dizileme esnasında elektroforetik peakler, sekanslanan ilk birkaç yüz nükleotidde keskin, iyi tanımlanmış ve yüksek ölçeklendirilmiş olmalıdır. Gürültülü verilere en yaygın olarak dizileme için kullanılan reaksiyon karışımında birden fazla DNA şablonunun olması veya saflaştırma aşamasının yetersiz olması neden olmaktadır. Sekans kalitesi ayrıca jel, cihaz ve yazılımla ilgili sorunlardan da etkilenebilmektedir [194].

Yeni Nesil Dizileme Yöntemleri

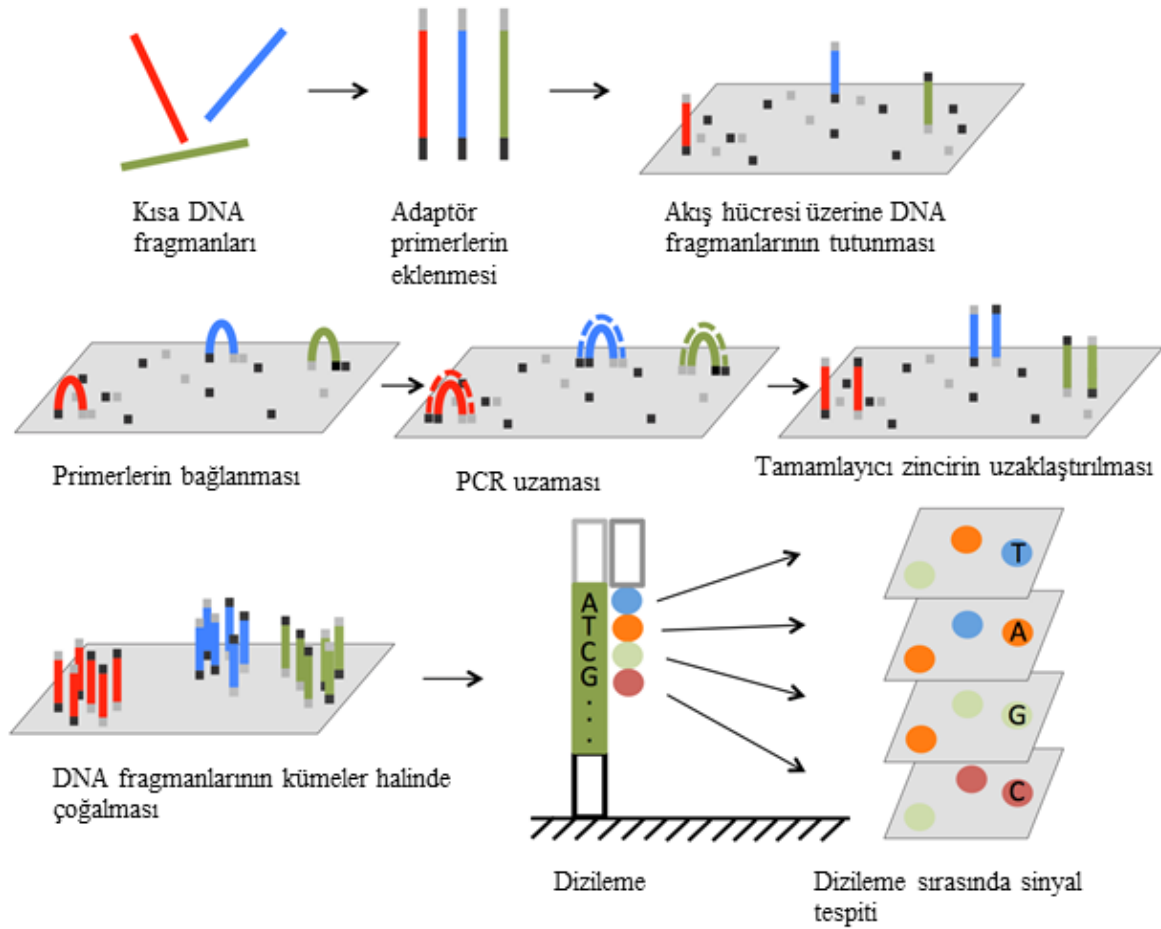
Sanger dizileme yöntemi DRM saptanmasında altın standart kabul edilsede %20 eşik değeri altında yer alan düşük frekanstaki ki minör DRM varyantlarının saptanmasında kısıtlamaları mevcuttur. Yeni nesil dizileme, %20 eşik altına bulunan DRM'lerin tespitini potansiyel olarak artırabilmektedir [11,201].

Yeni nesil dizileme, paralel olarak milyonlarca kısa dizileme okumasını aynı anda yaparak dizileme derinliğini artırmaktadır ve bu sayede hasta numunesinde düşük oranda bulunan HIV varyantlarında tespit edilmesini kolaylaştırmaktadır. Aynı zamanda, çok sayıda numuneye ait, tüm viral genomun eşzamanlı olarak sekanslanmasına izin vererek, örnek başına daha düşük maliyetlerle dizileme olanağı sunmaktadır. Çok sayıda hasta örneğinin aynı anda dizilenmesinde, her hasta benzersiz barkod dizileriyle işaretlenerek birbirinden kolayca ayırt edilebilmektedir [13,14].

Yeni nesil dizileme basamakları kısaca şu aşamaları içermektedir (Şekil 2.25) [13]:

- Dizilenmesi planlanan DNA'nın farklı yöntemler ile (Enzimatik, kimyasal, fiziksel) kısa DNA parçalarına bölünmesi
- Eş zamanlı olarak birden fazla farklı DNA numunelerinin dizelenebilmesi ve birbirinden ayırt edilerek kolayca takip edilebilmesi için DNA parçalarının uçlarına her bir örnek için özgün ayırt edici barkod dizilerin eklenmesi

- Adaptör dizilerin eklendiği kısa DNA parçalarının katı bir yüzeye tutunması sağlanarak bu katı yüzey üzerinde dizilerin kümeler halinde ampifikasyonunun yapılması
- Amplifiye edilmiş kısa DNA zincirlerinin denatüre edilmesi ve ardından işaretli bazlar kullanılarak karşı zincirin sentezlenmesi sırasında DNA dizisinin belirlenmesi
 - Her bir yeni bazın eklenmesiyle ortaya çıkan ışık, pH ve iyon dengesindeki değişimlerin sensörler aracılığıyla tespit edilerek hangi nükleotidin diziye eklendiğinin belirlenmesi.



Şekil 2.25. Yeni nesil dizileme; Illumina tabanlı. Kısa DNA fragmanlarının eldesi sonrası adaptör primerler bu fragmanlara eklenir. Adaptör dizilerin eklendiği kısa DNA fragmanlarının katı bir yüzeye tutunması sağlanarak bu katı yüzey üzerinde dizilerin kümeler halinde ampifikasyonu yapılır. Amplifiye edilmiş kısa DNA zincirlerinin denatüre edilmesi ve ardından işaretli bazlar kullanılarak karşı zincirin sentezlenmesi sırasında DNA dizisinin belirlenmesi sağlanır [202].

Yeni nesil dizileme teknolojilerine dayalı HIVDR testi pazarında şu anda ikinci nesil platformlardan olan Illumina ve Ion Torrent hakim konumdadır [203]. HIVDR testi için genel YND iş akışı, nükleik asit ekstraksiyonu, dirençle ilişkili HIV gen bölgelerinin PCR

amplifikasyonu, kütüphane hazırlanması ve dizileme dahil olmak üzere laboratuvar alanında gerçekleştirilen bir dizi genel adımı içermektedir. Laboratuvar çalışmalarını bilgisayar ortamında gerçekleştirilen veri analizi çalışmaları takip etmektedir. HIVDR yorumlanmasında kullanılan ücretsiz programlar sayesinde YND verilerinin yorumlanması zahmetsiz ve kolay bir hal almaktadır [197].

Kütüphane oluşturma yöntemleri için birden fazla ticari seçenek mevcut olup bu yöntemler çoğunlukla hedef DNA'nın etiketlenmesine ve enzimatik parçalanmasına dayanmaktadır. Tagmantasyon, eşzamanlı olarak DNA fragmentasyonunu ve kısa çift sarmallı oligonükleotid dizilerinin bölünmüş DNA parçalarının uçlarına bir transposaz ile tek bir aşamada eklenmesini içeren yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntem hızlı ve düşük miktarda DNA ile çalışmaya olanak sağlayan bir yöntemdir, ancak dizileme adaptörlerini tanıtmak için az sayıda amplifikasyon döngüsü ile zenginleştirme amaçlı bir PCR amplifikasyon adımı içermektedir. Enzimatik fragmentasyon yöntemleri arasında subsequent end repair, dA-tailing ve adapter ligasyon yöntemleride yer almaktadır. Bu yöntemler genellikle enzimatik reaksiyonlar arasındaki temizleme aşamaları nedeniyle numune kaybı dikkate alındığında daha yüksek DNA girdileri gerektirmektedir. Aynı tüp içerisinde gerekli tüm enzimatik reaksiyonları gerçekleştirmek ve mekanik DNA kesme işinden kaçınmak için optimize edilmiş metotlar geliştirilmiştir, sonuç olarak bu metodolojiler daha düşük DNA girdisi ile numune kaybını ve DNA hasarını önemli ölçüde azaltmaktadır [197,204].

Sekanslama cihazlarının çalışma prensipleri ve kullandığı yöntemlere bağlı olarak dizileme hatalarına sebebiyet veren artefaktlar görülebilmektedir [205]. Dizileme derinliğinin (Coverage) düşük olduğu durumlarda, düşük eşik değerlerde yapılan HIVDR test değerlendirmeleri hatalara neden olabilmektedir. Örneğin, 1000 dizileme derinliğinde %1 eşik değer ile yapılan değerlendirmede bir dizileme artefaktının yanlış konsensus dizeye neden olabilmesi için en az 10 kez, okunan dizilerin arasında bulunması gereklidir. Ancak, 100 dizileme derinliğinde %1 eşik değer ile yapılan değerlendirmede bir dizileme artefaktının yanlış konsensus dizeye neden olabilmesi için 1 kez görülmesi yeterli olacaktır [197]. Genel olarak, eşik değerinin düşürülmesi dizilemeden kaynaklı hatalar nedeniyle yanlış konsensus dizilerin elde edilmesine neden olabilmektedir. Eşik değeri ayarlamasından kaynaklanan hataların yanında, kütüphane hazırlığı öncesi kullanılan test edilecek

numunenin viral yük değerlerinin düşük olması, hastada bulunan düşük frekanstaki HIV varyantlarının tespitinde hatalara sebebiyet verebilmektedir [206].

Yeni nesil dizileme tabanlı HIVDR testi için otomasyon ve standardizasyon gereksinimlerini karşılamak ve testi yorumlayan kişilere kolaylık sağlaması için çeşitli analiz programları geliştirilmiştir. Mevcut ve geliştirilmekte olan HIVDR test programlarının optimize edilerek iyileştirilmesi ve standardizasyonun sağlanması için önerilerde bulunan, bir grup uzman tarafından kurulmuş Winnipeg Mütabakatı adıyla anılan bir konsensus bulunmaktadır. Bu mütabakat, YND okuma verilerinin kalite değerlendirmesi, referans genoma hizalanması, DRM mutasyonlarının belirlenmesi ve bu mutasyonların yorumlanması hakkında önerilerde bulunarak programların optimize edilmesinde katkıda sağlamaktadır [207,208].

Hibridizasyon ile Dizileme

Hibridizasyon yoluyla dizileme, özgün mutasyonları tespit etmek ve bir gen bölgesinin tam dizisini belirlemek için kullanılabilmektedir. Affymetrix GeneChip (Santa Clara, California), HIV-1 proteaz gen bölgesinin tam dizisini ve HIV-1 RT'nin ilk 1200 nükleotidini belirlemek için tasarlanmıştır. Affymetrix, ince cam bir kondaktör üzerine hassas şekilde konumlandırılmış ve yoğun şekilde paketlenmiş oligonükleotid problemlerini içermektedir. Floresan etiketli RNA, bir cDNA örneğinden kopyalanmaktadır ve bu cam yüzeye bağlanan problemlere hibridize edilmektedir. RNA'nın tamamlayıcı problemlere bağlanması, bir lazer tarayıcı kullanılarak tespit edilmektedir. GeneChip teknolojisi, her biri bir DNA veya RNA molekülündeki her nükleotid konumunu sorgulamak için tasarlanmış milyonlarca benzer prob içeren birkaç bin parçaya bölünmüştür. Test molekülündeki her nükleotid, o nükleotidin A, C, G veya T olup olmadığını belirlemek için en az dört set oligonükleotid probu gerektirmektedir. DNA çip sekanslaması "yeniden dizileme" olarak da adlandırılmaktadır. Affymetrix gen çiplerinin tasarımı, bir gendeki en yaygın olarak beklenen polimorfizmler hakkında ön bilgi gerektirmektedir [209]. Genetik farklılıklar nedeniyle, hibridizasyon yoluyla HIV-1'in dizilenmesi dideoksinükleotid dizileme ile karşılaştırıldığında oldukça zordur ve dideoksinükleotid dizilemesinin HIV-1 RT ve proteaz mutasyonlarını saptamada daha güvenilir olduğunu gösterilmiştir. DNA çipleri, viral sekanslardaki delesyonları veya eklenmeleri tespit etme ve orijinal çip döşemesinin dayandığı B alt tipi dışındaki viral alt tipleri sekanslama konusunda yeterli değildir [210].

Nokta Mutasyon Testleri

INNO-LiPA HIV-1, (Innogenetics, Ghent, Belçika), özgün HIV-1 proteaz ve RT mutasyonlarını tespit etmek için tasarlanmış bir nokta mutasyon testidir. Nitrosellüloz bir membran üzerine mutant alleleri içeren probler tutturulmuştur. Hastayı enfekte eden virüsten elde edilen ve biyotinle işaretlenmiş RT-PCR ürünü, bu membrana hibridize edilir. Avidin-enzim kompleksi ve bu enzimin substratı, PCR ürününün hibridize olduğu membran üzerinde renk değişikliği yapmaktadır. Bu testin kısıtlamaları mevcuttur. İlaç direnci mutasyonlarının tamamını tespit etmekte kullanılamamaktadır ve kodonlarda yaygın olmayan mutasyonlar mevcut olduğunda, zayıf hibridizasyon nedeniyle sonuçların yorumlanmasını zorlaştırmaktadır. Bununla birlikte, testin düşük maliyetli olması, sadece yaygın görülen direnç mutasyonlarının tespitine ihtiyaç duyulduğu durumlarda ve ilaç direnciyle ilişkili hızlı epidemiyolojik çalışmalar için kullanımı uygundur [211].

2.11.2. Proviral DNA testleri

Bazı genotipik direnç testleri, konak hücrede bulunan HIV proviral DNA'yı analiz etmek için tasarlanmıştır. Bu testler, periferik kan mononükleer hücreleri içinde bulunan proviral HIV DNA'sındaki ilaç direnci mutasyonlarını tespit edebilmektedir ve viral tropizmi belirleyebilmektedir. Proviral DNA direnç testi, HIV viral yükü saptanamadığında, önceden mevcut direnç sonuçları olmadığında, düşük seviyeli viremide plazma HIV RNA genotiplendirme testinin başarılı olma olasılığının düşük olduğu durumda, bir hastanın ART rejimini değiştirirken faydalı olabilmektedir [212].

2.11.3. Fenotipik testler

Fenotip testler, rekombinant virüs testleri (RVA; recombinant virus assay) kullanılarak gerçekleştirilmektedir. Referans HIV suşu dizisine, hastanın plazmasında dolaşan virüslerden elde edilen proteaz, ters transkriptaz ve integras gen dizileri eklenerek rekombinant virüsler elde edilmektedir. Elde edilen rekombinant DNA klonu, hasta HIV suşundan proteaz ve ters transkriptaz enzimlerini ifadeleyen enfeksiyöz bir virüs üretmek için canlı hücrelere transfer edilmektedir. Bu rekombinant virüsün ilaç duyarlılığı daha sonra fenotipik direnç testleriyle ölçülmektedir. Fenotipik testler, bir antiretroviral ilacın farklı konsantrasyonlarının varlığında virüsün çoğalma yeteneğini ölçmektedir [213].

2.11.4. Tropizm testleri

HIV, CD4+ T hücrelerine girmek için CD4+ reseptörüne ilave olarak bir koreseptöre ihtiyaç duymaktadır. Bu koreseptör CCR5 veya CXCR4 olabilir. CCR5'i koreseptör olarak kullanan virüsler, R5 virüsleri olarak adlandırılır; CXCR4 kullananlar X4 virüsleri olarak adlandırılmaktadır. Bir kişi R5 virüsle, X4 virüsüyle veya her ikisinin kombinasyonu ile enfekte olabilmektedir. Bulaşan virüslerin çoğu R5 virüsleridir; X4 virüsleri genellikle enfeksiyonda daha sonra ortaya çıkmaktadır [57].

Maraviroc, CCR5 (R5) tropik HIV-1 suşlarında gp120'nin R5 reseptörüne bağlanmasını inhibe etmektedir. HIV-1 gp120, R5'in N terminal bölgesine bağlanırken, maraviroc, transmembran heliksler tarafından oluşturulan bir cebe bağlanmaktadır [214]. R5 inhibitörleri alan hastalarda, virolojik başarısızlığın en çok görülen sebebi, R5 inhibitörlerine doğal olarak dirençli olan ve kişide önceden var olan CXCR4 (X4) tropik virüslerin replikasyonunun artmasıdır. Hastaların %80'inden fazlası başlangıçta yalnızca R5 tropik virüslerle enfekte olmaktadır. X4 tropik virüsleri genellikle enfeksiyonun sonraki aşamalarında ortaya çıkmaktadır [215].

Yalnızca R5 virüsünü inhibe eden bir CCR5 antagonistinin (maraviroc) tedavide kullanımı düşünüldüğünde viral tropizm için test yapılması önerilmektedir. Koreseptör tropizm testi, CCR5 inhibitörü tedavisinde virolojik başarısızlık gösteren hastalar için de yararlı olabilmektedir [212].

Fenotipik Tropizm Testi:

Hastadan izole edilmiş virüse ait *env* gen bölgesi ile üretilen rekombinant virüsler, CCR5 veya CXCR4'ü ifade eden hücre kültürlerini enfekte etmek için kullanılmaktadır. Enfektivite sonucuyla hastayı enfekte eden virüsün tropizmi belirlenmektedir [216]. Bu testlerin temel kısıtlamaları, sonuçlar için gereken geri dönüş süresinin uzun olması ve 1000 kopya / mL plazma HIV RNA düzeyinin altında yeterli sonuçlar alınamamasıdır. Yeterli viral yük düzeylerinde dahi, örneklerin bir kısmında sonuç alınamamaktadır ve tropizm belirlenmemektedir [217].

Genotipik Tropizm Testi

Genotipik testlerde virüsün *env* genindeki özgün gen bölgeleri dizilenerek tropizm belirlenmektedir. HIV'in yapısal proteinlerinde olan Env, HIV tropizmini belirlemektedir. Diğer genotipik yöntemlerde olduğu gibi, tropizmi tahmin etmek için dizileme algoritmaları kullanılmaktadır [216]. Yeni nesil dizileme yöntemleri ile plazmada düşük düzeylerde bulunan CXCR4 koreseptörünü kullanan düşük frekanstaki HIV varyantların tespitini kolaylaştırmıştır [218]. Tespit edilemeyen viral yükü veya düşük seviyede viremisi olan hastalarda, HIV-1 proviral DNA tropizm testi, koreseptör kullanımının belirlenmesine yardımcı olmak için kullanılabilmektedir [219].



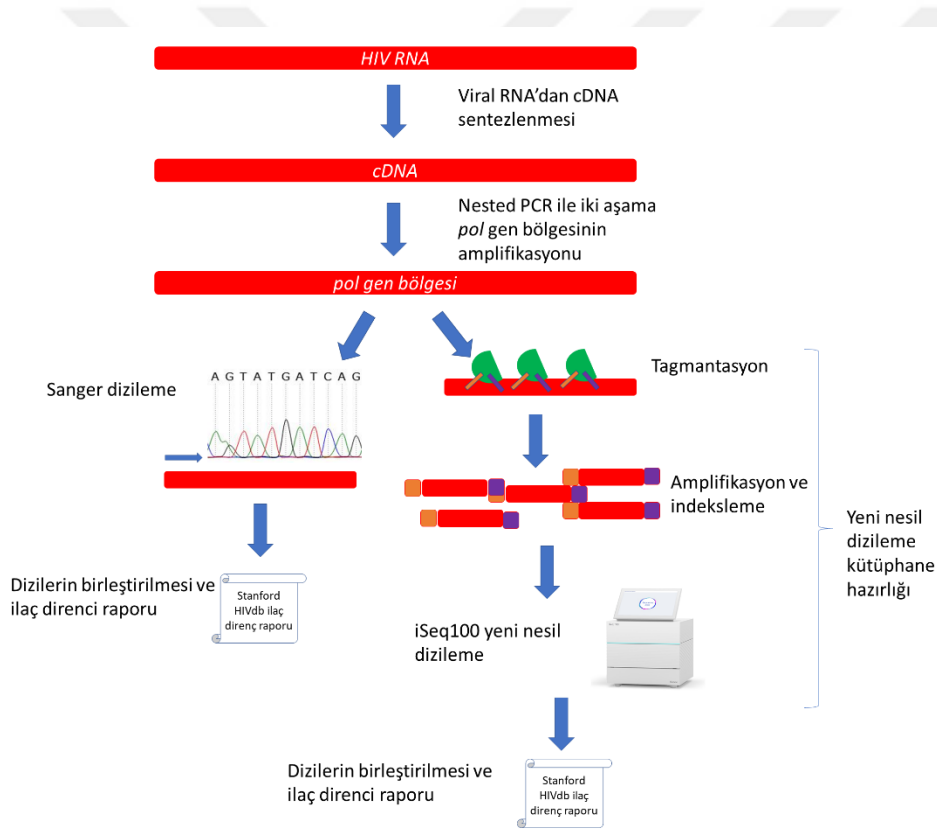
3. GEREÇ ve YÖNTEM

Hastanemiz laboratuvarında HIV-1 RNA pozitifliği araştırılması ve viral yük değerlendirilmesi için 2017-2020 seneleri arasında laboratuvarımıza gönderilen ve viral yük değeri 1000 kopya/ml ve üzerinde olan HIV-1 ile enfekte bireylere ait 47 adet serum örneği çalışmaya dahil edilmiştir. Çalışmaya dahil edilen hastaların 40 tanesi (%85,1) erkek iken, 7 (%14,9)'sini kadın hastalar oluşturmaktadır. Hastaların yaşları 18-74 aralığında değişmekte olup erkeklerde ortalama yaş 37,7, kadınlarda ortalama yaş 35,6 bulunmuştur. Hasta örneklerinin tamamının HIV pozitiflikleri ulusal referans laboratuvarında konfirme edilmiştir. Antiretroviral ilaçların seçiminde mevcut HIV genotipik direnç testleri, en az 1000 kopya/ml viral yük gerektirmektedir. Testlerin düşük viral yüklerdeki performansları hakkında yeterli veri yoktur [220].

Örneklerin ekstraksiyon aşamasından sonra virusun *pol* geninin proteaz enzimini kodlayan kısmı ile ters transkriptaz enzimini kodlayan kısmı polimeraz zincir reaksiyonu yöntemiyle çoğaltılarak nükleotid dizi analizi yapılmıştır. Belirtilen gen bölgelerinin çoğaltılmasında, virüsten elde edilen RNA molekülünün reverse transkriptaz PCR uygulaması ile komplementer DNA'sı yapılmıştır (iScript cDNA Synthesis, Biorad). Komplementer DNA elde edildikten sonra bu gen bölgelerini kapsayan forward (İleri) ve reverse (Ters) primerler kullanılarak ilk aşama PCR'ı yapılmıştır. İkinci aşamada ise gen bölgelerine özgün forward ve reverse iç primerler kullanılarak nested PCR uygulaması yapılmıştır (PCR Master Mix, Promega). Nested PCR uygulaması sonrası elde edilen amplifikasyon ürünlerine, yeni nesil dizileme platformuna uygun kütüphane hazırlık kiti (Nextera XT DNA Library Preparation Kit ve Nextera XT Index Kit) kullanılarak Illumina Iseq 100 platformunda yeni nesil dizileme yapılmıştır. Kütüphane hazırlık aşamasının ardından SeraMag Select manyetik pürifikasyon kiti kullanılarak örneklerle ait DNA kütüphane ürünleri temizlenmiştir. Florometrik yöntem ile iQuant dsDNA HS Assay kitiyle Qubit cihazında her bir örneğe ait DNA kütüphanesinde konsantrasyon tayini yapılarak normalizasyon yapılmıştır. Normalizasyonu takiben Iseq 100 platformuna uygun kartuşlar (iSeq 100 il Reagent) kullanılarak, yeni nesil dizileme yapılmıştır. Yeni nesil dizileme sonrası elde edilen dizilerin analizi ve ilaç direnç profillerinin saptanması, PASEq (<https://www.paseq.org/>) yazılımı kullanılarak yapılmıştır.

Aynı hedef bölgelere ait, ikinci aşamada nested PCR ile çoğaltılmış ampliconlar kullanılarak BigDye Terminator v3.1 kiti ile ABI Prism Genetic Analyzer platformunda, Sanger sekanslama yapılmıştır. Dizileme öncesi PCR ürünleri, Expin™ PCR SV Kit ile purifikasyon aşamasından geçirilmiştir. Sanger sekanslama sonrası elde edilen dizilerin analizi ve birleştirme işleminde UGene yazılımı kullanılmıştır.

Her iki dizileme yöntemi ile örneklerde yer alan virüse ait hedef gen bölgelerinden elde edilen konsensus diziler kullanılarak ilaç direnç profilleri belirlenmiştir. İlaç direnç profillerinin belirlenmesinde Stanford HIV Drug Resistance (<https://hivdb.stanford.edu/>) veritabanı kullanılmıştır.



Şekil 3.1. Çalışma yönteminin aşamaları

3.1. HIV-1 gerçek zamanlı ters transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu

Örneklerin HIV-1 RNA viral yük değerlerinin saptanması gerçek zamanlı revers transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (Real-Time RT-PCR) yöntemiyle yapılmıştır. Ekstraksiyon için EZ1 Virus Mini kit V2.0 (Qiagen, Almanya) ile EZ1 Advanced (Qiagen Almanya) otomatize ekstraksiyon sisteminde çalışılmıştır. Amplifikasyon işlemi ise artus HI Virus-1 RG RT-

PCR (Qiagen, Almanya) kiti kullanılarak yapılmıştır. Kit ile HIV-1 genomunun 5' LTR bölgesinin 93 bazlık kısmının revers transkripsiyonu ve amplifikasyonu yapılmaktadır ve ampliconların saptanması için Rotor-Gene Q (RGQ) cihazı (Qiagen, Almanya) ile Cycling Green floresans kanalında çalışılmıştır. Amplifikasyon eğrilerinin değerlendirilmesi ve viral yük değerlerinin belirlenmesi, Rotor Gene Software (Qiagen, Almanya) ile yapılmıştır. Kitin analitik duyarlılığı 66,9 IU/ml'dir (1IU/ml, Rotor-Gene Q cihazında HIV-1 RNA'nın saptanması için 0,45 kopya/ml'ye karşılık gelmektedir. Dönüştürme faktörü, testin dinamik aralığında ortalama bir değerdir).

3.1.1. HIV RNA ekstraksiyonu

Ekstraksiyon kitiyle gelen solüsyonlarla reaksiyon karışımı hazırlanarak 1,5 ml'lik tüplere dağıtılmıştır. Reaksiyon karışımını hazırlamak için kullanılan solüsyonlar ve miktarları Çizelge 3.1'de yer almaktadır.

- 200 µl serum örnekleri 2 ml'lik tüplere aktararak ve oda sıcaklığında numunelerin tamamen çözünerek sıvı hale gelmesi sağlanmıştır.
- Manyetik parçacıkların karışması için reaktif kartuşları 3 kez ters düz edilmiştir. Reaktif bileşenlerinin kuyucukların altında toplanması için kartuşlara hafifçe vurulmuştur.
- Çalışma kurulumunu başlatmak için cihaz ayarları yapılarak, elüsyon hacmi 30 µl olarak belirlenmiştir.
- Çalışma sonunda ekstraksiyon yapılmış RNA'ları içeren elüsyon tüplerini üzerleri etiketlenerek, PCR aşamasına kadar -20 °C'de buzdolabında saklanmıştır.

Çizelge 3.1. Ekstraksiyon için kullanılan solüsyonlar

Solüsyon	Miktar (Bir adet reaksiyon), µl
AVE buffer	49
İnternal Kontrol	3,8
Taşıyıcı RNA	7,2

3.1.2. HIV RNA amplifikasyonu

Real-Time RT-PCR aşaması için reaksiyon karışımı Çizelge 3.2'e göre hazırlanmıştır. Her bir çalışma döngüsü için bir adet negatif kontrol tüpü ve bir adet pozitif kontrol tüpü reaksiyona dahil edilmiştir.

- Her bir PCR tüpü içerisine 30 µl reaksiyon karışımından ve 20 µl kalıp RNA eklenerek toplam reaksiyon hacmi 50 µl'ye tamamlanmıştır.
- Rotor-Gene Q cihazında standart eğrisi oluşturmak için kitle birlikte gelen 4 kantitasyon standardı (QS 1-4), 20 µl hacminde kullanılmıştır.

Çizelge 3.2. Real-Time RT-PCR için kullanılan solüsyonlar

Bileşenler	Miktar (1 adet reaksiyon), µl
HI Virus-1 RG Master A	12
HI Virus-1 RG Master B	18
Reaksiyon Karışımı Toplam Hacmi	30

3.2.Sanger Yöntemiyle Dizileme

3.2.1. Primerlerin hazırlanması

Liyofilize olarak HPLC saflığında sentezlenmiş primerlerden stok çözelti hazırlanmıştır. 100 µM konsantrasyonda stok çözelti hazırlamak için kullanılan primerler, primer dizileri, primer miktarları ve çözeltiye eklenen steril distile su miktarları Çizelge 3.3'te özetlenmiştir.

Amplifikasyon ve dizileme aşamasında kullanılmak üzere hazırlanan primer stoklarından 10µl alınıp 90 µl distile su ilave edilerek 1,5 ml'lik kapaklı tüplerde 10 µM konsantrasyonda primer çözeltileri hazırlanmıştır. Stok primer çözeltileri ve 10 µM konsantrasyonda primer çözeltileri -20 °C'de buzdolabında saklanmıştır.

Çizelge 3.3. Primer dizileri [259]

Primer Adı	Primer Dizisi	Miktar, µg	Distile su miktarı, µl
NEF10	GARAGACAGGCTAATTTTTTAGGGA	681,1	795
245.RT	TACTTTAATTCCTGSRTAAATCTGACTTG	855	967
NEF11	CAAATCACTCTTTGGCARGACC	679,1	976
NER10	AAATTCTGTATATCATTGACAGTCCA	755,5	955

3.2.2. Ters transkripsiyon ile komplementer DNA (cDNA) sentezlenmesi

Ters Transkriptaz PCR (RT-PCR) aşaması için iScript cDNA Synthesis (Biorad) kiti kullanılmıştır. Bu kit ile RNA örnekleri kullanılarak komplementer DNA (cDNA) sentezlenmektedir. Kit, 2 adet tüp (5x iScript Reaksiyon Karışımı ve iScript Ters Transkriptaz) içermektedir. iScript ters transkriptaz, *Moloney Murine Leukemia* virüsüne ait modifiye edilmiş bir ters transkriptaz enzimidir. Enzim, RNaz inhibitörleri ile önceden muamele edilmiştir. 5x iScript Reaksiyon Karışımı, oligo dT ve random hekzamer primer karışımını içermektedir.

- Ters Transkriptaz PCR aşaması için reaksiyon karışımı Çizelge 3.4'e göre hazırlanmıştır. Her bir çalışma döngüsü için bir adet negatif kontrol tüpü reaksiyona dahil edilmiştir.
- RNA materyallerini içeren tüpler, 10 dakika, 65 °C'de, ısı bloğunda denatüre edildikten sonra 3 dakika buz üzerinde bekletilmiştir.
- 10 µl reaksiyon karışımı 0,2 µl'lik PCR tüplerine eklenerek, içeriğini tüpün altında toplanması için santrifüj uygulanmıştır.
- 10 µl RNA kalıbı, reaksiyon karışımına eklenerek toplam reaksiyon hacmi 20 µl'ye tamamlanmıştır.
- Termal döngü cihazında döngü sayısı, sıcaklıklar ve süreleri Çizelge 3.5'teki gibi düzenlenmiştir.

Çizelge 3.4. Komplementer DNA sentezinde kullanılan solüsyonlar

Bileşen	Miktar (1 adet reaksiyon), µl
5x iScript Reaksiyon Karışımı	4
iScript Ters Transkriptaz	1
Moleküler Derece Su	5
Reaksiyon Karışımı Toplam Hacmi	10
Kalıp RNA	10
Toplam Reaksiyon Hacmi	20

Çizelge 3.5. Komplementer DNA sentezi termal döngü ayarları

Döngü Aşaması	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı
Primerlerin tutunması	25	5 dakika	1
Ters Transkripsiyon	46	20 dakika	
Ters Transkripsiyon inaktivasyonu	95	1 dakika	
Bekleme	4	En fazla 18 saat	

3.2.3. Nested PCR yöntemi ile amplifikasyon aşaması

Hedef gen bölgelerinin sentezlenmesi için Nested PCR yöntemi kullanılmıştır. RT-PCR sonrası elde edilen cDNA ürünleri kullanılarak iki aşamalı amplifikasyon yapılmıştır. Her iki amplifikasyon aşamasında da Promega firmasının PCR Master Mix ürünü kullanılmıştır. Bu ürün reaksiyon bileşenlerinin önceden karıştırılmasıyla elde edilen kullanıma hazır PCR miksi içerir. (PCR Master Mix, 2X; Taq DNA polimeraz [50 U/ml], dNTP'ler [400 µM dATP, 400 µM dGTP, 400 µM dCTP, 400 µM dTTP], MgCl₂ [3mM]).

Birinci amplifikasyon aşaması için PCR reaksiyonu Çizelge 3.6'ya göre hazırlanmıştır. Her bir çalışma döngüsü için bir adet negatif kontrol tüpü çalışmaya dahil edilmiştir.

- Üzerleri etiketlenmiş 0,2 µl'lik PCR tüplerine PCR karışımından 20 µl ve RT-PCR sonrası elde edilen ürünlerden 5 µl eklenmiştir.

- Tüpler termal döngü cihazına yerleştirilerek, Çizelge 3.7’de yer alan bilgilere göre döngü sayıları, sıcaklıkları ve süreleri ayarlanarak PCR programı başlatılmıştır.

Çizelge 3.6. Birinci amplifikasyon aşaması PCR reaksiyon karışımı

Bileşenler	Miktar (1 adet reaksiyon), µl
PCR Master Mix, 2X	12,5
Forward Primer (10 µM)	1,5
Reverse Primer (10 µM)	1,5
Nuclease Free Water	4,5
Reaksiyon Karışımı Toplam Hacmi	20
RT-PCR Ürünü	5
Toplam Reaksiyon Hacmi	25

Çizelge 3.7. Birinci amplifikasyon aşaması için termal döngü ayarları

Döngü Aşaması	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı
İlk Denatürasyon Aşaması	95	3 dakika	1
Denatürasyon	95	45 saniye	35
Primer Birleşmesi	57	30 saniye	
Primer Uzaması	72	2 dakika	
Son Uzama Süresi	72	7 dakika	1
Bekleme	4	En fazla 18 saat	

Birinci aşama PCR reaksiyonu için kullanılan primer dizileri Çizelge 3.8’de yer almaktadır.

Çizelge 3.8. Birinci aşama PCR reaksiyonu kullanılan primer dizileri [259]

Primer Adı	Primer Dizisi	Primer Yönü	Referans Genom Dizi Aralığı
NEF10	GARAGACAGGCTAATTTTTTAGGGA	Forward	2071-2095
245.RT	TACTTTAATTCCTGSRTAAATCTGAC TTG	Reverse	3349-3377

İkinci amplifikasyon aşaması için PCR reaksiyon karışımı Çizelge 3.9'e göre hazırlanmıştır. Her bir çalışma döngüsü için bir adet negatif kontrol tüpü çalışmaya dahil edilmiştir.

- Üzerleri etiketlenmiş 0,2 µl'lik PCR tüplerine PCR karışımından 23 µl ve birinci amplifikasyon sonrası elde edilen ürünlerden 3 µl eklenmiştir.
- Tüpler termal döngü cihazına yerleştirilerek, Çizelge 3.10'da yer alan bilgilere göre döngü sayıları, sıcaklıkları ve süreleri ayarlanarak PCR programı başlatılmıştır.

Çizelge 3.9. İkinci amplifikasyon aşaması PCR reaksiyon karışımı

Bileşenler	Miktar (1 adet reaksiyon), µl
PCR Master Mix, 2X	12,5
Forward Primer (10 µM)	1,5
Reverse Primer (10 µM)	1,5
Nuclease Free Water	7,5
Reaksiyon Karışımı Toplam Hacmi	23
İlk aşama PCR Ürünü	2
Toplam Reaksiyon Hacmi	25

Çizelge 3.10 İkinci amplifikasyon aşaması termal döngü ayarları

Döngü Aşaması	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı
İlk Denatürasyon Aşaması	95	3 dakika	1
Denatürasyon	95	45 saniye	30
Primer Birleşmesi	55	30 saniye	
Primer Uzaması	72	2 dakika	
Son Uzama Süresi	72	7 dakika	1
Bekleme	4	En fazla 18 saat	

İkinci aşama PCR reaksiyonu için kullanılan primer dizileri aşağıdaki Çizelge 3.11'de yer almaktadır.

Çizelge 3.11. İkinci aşama PCR reaksiyonu için kullanılan primer dizileri [259]

Primer Adı	Primer Dizisi	Primer Yönü	Referans Genom Dizi Aralığı
NEF11	CAAATCACTCTTTGGCARGACC	Forward	2256-2278
NER10	AAYTTCTGTATATCATTGACAGTC CA	Reverse	3303-3328

3.2.4. Amplifikasyon ürünlerinin jel elektroforezinde görüntülenmesi

Amplifikasyon ürünlerini görüntülemek ve dizileme için uygun ampikonların elde edildiğini belirlemek için agaroz jel elektroforez yöntemiyle çalışılmıştır. Tris-Borate-EDTA (TBE) 5X stok çözeltisi kullanılarak agaroz jel hazırlanmıştır.

- Kuru ve temiz plastik bir jel tepsisinin kenarları bant ile kapatılmıştır. 12 adet yükleme kuyusunun oluşması için gerekli tarak, tarağın uç kısımları jel tepsisinden eşit uzaklıkta olacak şekilde tepsiye yerleştirilmiştir.
- Jel tepsisi düz bir zemine yerleştirilerek, jelin her alanda eşit kalınlıkta olması sağlanmıştır.
- 1X TBE solüsyonu hazırlamak için 5X TBE solüsyonundan 200 ml alınarak üzerine 800 ml distile su eklenmiştir.
- %2'lik agaroz jel hazırlamak için 75 ml 1X TBE solüsyonuna 1,5 gram agaroz eklenerek agaroz tamamen eriyene kadar mikrodalga fırında ısıtılmıştır. Ardından karışım 65 °C'ye kadar soğutulmuştur.
- Solüsyon jel tepsisine dökülerek jelin katılaşması beklenmiştir. Jel kalınlığının yaklaşık 4 mm kadar olması sağlanmıştır.
- Jel tamamen katılaştıktan sonra tarak ve jel tepsisi etrafındaki bant dikkatlice çıkarılarak, jel elektroforez tankına yerleştirilmiştir. Jelin üzerini tamamen kaplayacak ve jel yüzeyden 5 mm derinlikte olacak şekilde 1X TBE tamponu elektroforez tankına eklenmiştir.
- Her örneğin 3 µl'si ile yükleme tamponunun 3 µl'siyle pipetlenerek bir parafilm parçası üzerinde karıştırılmıştır ve ardından kuyulara eklenmiştir. Kuyulardan bir tanesine 3 µl DNA markörü yüklenmiştir.

- DNA anoda doğru hareket edecek şekilde jelin yönü ayarlanmıştır. Elektroforez tankının kapağı kapatılarak 80 voltta 50 dakika yürütülmüştür.
- Jel 0,5 µl etidiyum bromür ve 1X TBE tampon içeren bir kutunun içerisine aktarılarak kutunun kapağı kapatılmıştır. Etidiyum bromürün hava ile temasını önlemek için bu işlemler çeker ocak içerisinde yapılmıştır. Jel kutunun içerisinde 30 dakika bekletilmiştir.
- Jel kutunun içerisinden alınarak UV ışık kutusunun üzerine yerleştirilmiştir ve jeldeki bantlar görüntülenmiştir.

3.2.5. PCR ürünlerinin saflaştırılması (pürifikasyon aşaması)

Amplifikasyon reaksiyonlarından elde edilen DNA'nın saflaştırılması için GeneAll Expin™ PCR SV kiti kullanılmıştır. Bu kit pürifikasyon için spin-kolon yöntemini kullanmaktadır ve pürifikasyon için gerekli solüsyonlarla birlikte spin/vakum tüplerini içermektedir aynı zamanda 10 µg'a kadar, 100 bp ile 10 kb uzunluğunda saf DNA elde edilebilmektedir. Pürifikasyon aşamasında, başlangıç örnek hacmi 22 µl ve DNA elüsyon hacmi 30 µl olarak belirlenmiştir.

- İkinci PCR amplifikasyon aşaması sonrası elde edilen numunenin 22 µl'si pürifikasyon için kullanılmıştır. 110 µl bağlama tamponu numuneye eklenerek pipetaj yapılmıştır. Ardından elde edilen karışım toplama tüpü içerisine yerleştirilen Spin-vakum kolonuna (SV kolon) eklenmiştir.
- SV kolon 10 000 g'de 30 saniye santrifüjlenmiştir. Santrifüjden sonra toplama tüpü içerisindeki sıvıyla birlikte atılarak, SV kolon yeni bir toplama tüpüne yerleştirilmiştir.
- 700 µl yıkama tamponu SV kolonuna eklendikten sonra 30 saniye 10 000 g'de santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonrası toplama tüpünde kalan sıvı atılarak SV kolonu yeni bir toplama tüpüne aktarılmıştır.
- SV kolonda kalan yıkama tamponun tamamını çıkarmak için son hızda 1 dakika daha santrifüj yapılmıştır. Ardından SV kolonu yeni bir 1,5 ml'lik santrifüj tüpüne aktarılmıştır.
- SV kolon içinde yer alan membranın merkezine 30 µl ayrıştırma tamponu eklenerek, 1 dakika oda ısısında bekletilmiştir. Ardından 10 000 g'de santrifüjlenerek DNA içeren çözeltinin membrandan tüp içerisine geçmesi sağlanmıştır.

- SV kolon atılarak, 1,5 ml'lik mikro santrifüj tüpleri etiketlenmiştir. Safılaştırılmış DNA örnekleri dizileme aşamasına kadar -80 °C'de saklanmıştır.

3.2.6. Florometrik yöntem ile DNA miktar tayini

Pürifiye edilmiş DNA örneklerinin miktar tayini iQuant dsDNA HS Assay kiti kullanılarak Qubit 3.0 Fluorometer cihazında yapılmıştır. Kit konsantre kantitasyon reaktifi, dilüsyon tamponu ve önceden seyreltilmiş dsDNA standartlarını içermektedir.

- Kantitasyon reaktifi oda ısısına getirildikten sonra kantitasyon reaktifinde çökelme varlığı kontrol edilmiştir. Çökelme olması durumunda, vortekslenerek reaktiflerin homejen olarak çözünmesi sağlanmıştır.
- Ölçüme başlanmadan hemen önce reaktif solüsyonu dilüsyon tamponu ile 1:200 oranında seyreltilerek çalışma solüsyonu hazırlanmıştır. Her bir DNA örneği için 199 µl dilüsyon tamponu ve 1 µl reaktif solüsyonu 2 ml'lik tüplerde karıştırılmıştır.
- Her örnek için 198 µL çalışma solüsyonu Axygen marka PCR-05-C kapaklı tüplerine aktarılmıştır. Seyreltilmiş dsDNA standartlarının ölçümü için 190 µl çalışma solüsyonu 2 ayrı tüpe eklenmiştir.
- Standard ölçümleri için hazırlanan, 190 µl çalışma solüsyonu içeren tüplere 10 µl dsDNA standartlarından eklenmiştir (Bileşen C, dsDNA standart 1; Bileşen D, dsDNA standart 2). DNA örneklerinin kantitasyonu için hazırlanan 198 µl çalışma solüsyonu içeren tüplere 2 µl örnek eklenerek tüplerin kapağı etiketlenmiştir. Tüpler vortekslenerek bileşenlerin karışması sağlanmıştır.
- Tüm tüpler karanlıkta 2 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
- Qubit 3 Fluorometer cihazında dsDNA High Sensitivity programında ilk olarak standartları içeren tüpler ölçülmüştür. Ardından örnekleri içeren tüplerin ölçümü yapılmıştır.

3.2.7. Sanger dizileme için BigDye karışımının hazırlanması

Nested PCR sonrası pürifikasyonu yapılmış amplifikasyon ürünlerinin Sanger dizilemesinde BigDye Terminator v3.1 kiti kullanılmıştır. Bu kit, daha önce kombine edilmiş, dizileme reaksiyonu için gerekli bileşenleri içeren karışımı içermektedir. Dizilenmek istenen ampikon ve bu ampikona özgü primerlerin karışıma eklenmesi ile reaksiyon bileşenin

hazırlanmasına olanak sağlamaktadır. Kitle birlikte florasan tabanlı populasyon dizilemeleri için optimize edilmiş, Sequencing Buffer (5X)'te birlikte gelmektedir.

- Dizileme aşaması için BigDye reaksiyon karışımı Çizelge 3.12'de yer alan bileşen miktarlarına göre 0,2 ml'lik PCR tüplerinde hazırlanmıştır. Forward ve reverse diziler için ayrı PCR tüplerinde reaksiyon karışımı hazırlanmıştır. Dizileme için 10 μ M konsantrasyonunda NEF11 ve NER10 primerleri kullanılmıştır.

Çizelge 3.12. Sanger dizileme aşaması için BigDye reaksiyon karışımı miktarları

Bileşen	Forward Karışımı	Reaksiyon	Reverse Karışımı	Reaksiyon
Bigdye Terminator v3.1 hazır reaksiyon karışımı	4 μ L		4 μ L	
5X Dizileme Tamponu	4 μ L		4 μ L	
Forward Primer (10 μM)	0,5 μ L		-	
Reverse Primer (10 μM)	-		0,5 μ L	
Distile Su	9,5 μ L		9,5 μ L	
Reaksiyon Karışımı	18 μ L		18 μ L	
Toplam Hacim				
Saflaştırılmış PCR Ürünü	2 μ L		2 μ L	
Toplam Reaksiyon Hacmi	20 μ L		20 μ L	

BigDye reaksiyon karışımlarını içeren PCR tüpleri termal döngü cihazına yerleştirilerek, Çizelge 3.13'te yer alan bilgilere göre döngü sayıları, sıcaklıkları ve süreleri ayarlanmıştır.

Çizelge 3.13 BigDye karışımı termal döngü ayarları

Döngü Aşaması	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı
İlk Denatürasyon Aşaması	96	1 dakika	1
Denatürasyon	96	10 saniye	25
Tutunma	50	5 saniye	
Uzama	60	4 dakika	
Bekleme	4	En fazla 18 saat	

- Program sonunda BigDye reaksiyon karışımları presipitasyon aşamasına kadar -20 °C buzdolabında saklanmıştır.

3.2.8. BigDye karışımının saflaştırılması; Presipitasyon aşaması

Bu aşamada etanol/EDTA presipitasyon yöntemi kullanılarak BigDye reaksiyon karışımlarının saflaştırılması sağlanmıştır. Santrifüj aşamalarında üstte kalan etanolün bekletilmeden hızlı bir şekilde uzaklaştırılması ve BigDye bileşeninin etanol ile tekrar karışmasını önlemek için her bir döngüde 8 örnek çalışılmıştır.

- 20 ml BigDye ürünü içeren tüpler termal döngü cihazından çıkarıldıktan sonra, içerisindeki numuneler 2 ml'lik toplama tüplerine aktarılmıştır.
- Toplama tüplerine aktarılan numunelere, 2 ml sodyum asetat (NaOAc, 3M pH 4,6) ve takibinde 50 ml daha önce -20°C buzdolabında saklanmış %96-100 saflıkta etanol eklenmiştir. Elde edilen karışım vortekslenmeden tüplere parmak ucuyla hafifçe vurularak bileşenlerin karışması sağlanmıştır.
- Elde edilen karışım -20°C buzdolabında 15 dakika bekletilmiştir.
- Buzdolabında bekletildikten sonra tüpler 14 000 rpm'de -20°C 'de santrifüjlenmiştir.
- Santrifüj sonrası beklemeden hızlıca üstte kalan sıvının tamamı pipet ile çekilerek atılmıştır.
- Pipetleme ile üst sıvı atıldıktan sonra oda ısısında hazırlanmış %70 saflıkta 250 ml etanol eklenmiştir ve ardından 14 000 rpm'de 5 dakika santrifüj yapılmıştır.
- Santrifüj sonrası beklemeden hızlıca üstte kalan sıvının tamamı pipet ile çekilerek atılmıştır.
- Toplama tüpleri içerisinde kalan etanolün tamamının uzaklaştırılması için tüpler oda ısısında kapakları açık olarak bekletilmiştir.
- Etanolün tamamı uzaklaştırıldıktan sonra toplama tüplerinin içerisine 20 ml formamid eklenerek oda ısısında 15 dakika bekletilmiştir ve saflaştırılmış BidDye reaksiyonun formamid ile tamamen karışması sağlanmıştır.
- Numuneler dizileme aşamasına kadar -20°C 'de buzdolabında saklanmıştır.

3.2.9. Sanger dizileme aşaması

Sanger dizileme için ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Thermofisher) cihazında çalışılmıştır.

- Formamid içerisinde çözünmüş ve saflaştırılmış BigDye ürünleri termal döngü cihazında 95°C 'de 2 dakika bekletilerek denatüre olması sağlanmıştır. Denatürasyonu

yapılan ürünler cihaza yüklenene kadar buz üzerinde bekletilerek, tek zincir yapısındaki uzama ürünlerinin sekonder yapılarının açık şekilde kalması sağlanmıştır.

- Denatürasyonu yapılan BigDye ürünleri cihaz tepsisine yerleştirildikten sonra cihaza başlama komutu verilmiştir. Dizileme ve fragmant analizi için POP-7™ (Thermofisher) Polymer kullanılmıştır.

3.3. Yeni Nesil Dizileme Aşaması

3.3.1. DNA'nın kısa fragmanlara ayrılması ve adaptör dizilerin eklenmesi: tagmantasyon

Bu işlem DNA'nın kısa fragmanlara ayrılarak, bu fragmanların adaptör diziler ile etiketlenmesini sağlamaktadır. Bu işlem sırasında Illumina tarafından özel olarak tasarlanmış Nextera transpozon enzimi kullanılmaktadır.

- Prosedüre başlanmadan önce termal döngü cihazı açılarak, Çizelge 3.14'te yer alan bilgilere göre cihazın ayarları yapılmıştır. Bu ayarlar cihaza kaydedilerek bir sonraki deney aşamalarında kullanılmıştır.
- Amplicon Tagment Mix (ATM) ve Tagment DNA Buffer (TD) solüsyonları -20 °C'den çıkarılarak oda sıcaklığında çözündürülmüştür.
- Neutralize Tagment Buffer (NT) +4 °C'den çıkarılarak oda sıcaklığında çözünmesi sağlanmıştır. NT solüsyon presipitasyon varlığı açısından değerlendirilmiştir ve presipitasyon olması durumunda tüp vortekslenerek içeriğinin tamamen homojen bir şekilde çözünmesi sağlanmıştır.
- Sırasıyla Çizelge 3.15'te yer alan reaksiyon bileşenleri üzerleri etiketlenmiş 0,2 ml PCR tüplerine eklenerek reaksiyon bileşenlerinin karışması sağlanmıştır.

Çizelge 3.14. Tagmantasyon aşaması termal döngü ayarları

Döngü Aşaması	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı
Tagmantasyon	72	3 dakika	1
Bekleme	10	En fazla 7 dakika	
Kapak ısısı 100 °C ve reaksiyon hacmi 50 µl olarak ayarlanmıştır.			

Çizelge 3.15. Tagmantasyon aşaması reaksiyon bileşenleri

Bileşen	Miktar (1 adet reaksiyon), µl
Tagment DNA Buffer (TD)	10
Saflaştırılmış PCR ürünü	5
Amplicon Tagment Mix (ATM)	5

- Reaksiyon karışımlarını içeren tüpler termal döngü cihazına yerleştirilerek program başlatılmıştır.
- Program sonunda PCR tüpleri termal döngü cihazından çıkarılarak hızlı şekilde beklemeden NT solüsyonundan her tüpe 5 µl eklenerek 10 kere pipetaj yapılmıştır. Ardından tüpler 5 dakika oda ısısında bekletilmiştir.

3.3.2. Kütüphane Amplifikasyonu

Bu aşama ile, İndeks 1 (i7), İndeks 2 (i5) adaptörleri ve dizileme kümesi oluşturmak için gerekli sekanslar DNA parçalarına eklenmektedir.

- Nextera PCR Master Mix (NPM) solüsyonu ve indeks primerleri içeren tüpler – 20°C’den çıkarılarak oda sıcaklığında çözündürülmüştür.
- Prosedüre başlanmadan önce termal döngü cihazı ayarları, Çizelge 3.16’da yer alan bilgilere göre yapılmıştır. Bu ayarlar cihaza kaydedilerek bir sonraki deney aşamalarında kullanılmıştır.
- Tagmantasyon ürünlerini içeren her bir PCR tüpüne 5 µl indeks 1 ve 5 µl indeks 2 primerlerinden eklenmiştir.
- Primerlerin eklenmesini takiben her bir tüpe Nextera PCR Master Mix (NPM) solüsyonundan 15 µl eklenmiştir.
- Reaksiyon karışımlarını içeren tüpler termal döngü cihazına yerleştirilerek program başlatılmıştır. Program sonunda PCR tüpleri termal döngü cihazından çıkarılarak manyetik bilye ile pürifikasyon aşamasına geçilmiştir.

Çizelge 3.16. Kütüphane amplifikasyonu termal döngü cihazı ayarları

Döngü Aşaması	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı
İlk Denatürasyon Aşaması	72	3 dakika	1
Denatürasyon	95	30 Saniye	1
Denatürasyon	95	10 saniye	12
Primer Birleşmesi	55	30 saniye	
Primer Uzaması	72	30 saniye	
Son Uzama Süresi	72	dakika	1
Bekleme	10	En fazla 24 saat	
Kapak ısısı 100 °C ve reaksiyon hacmi 50 µl olarak ayarlanmıştır.			

3.3.3. Manyetik bilye pürifikasyon

- 50 µl amplifikasyon ürünlerini içeren tüplere 100 µl Sera-Mag Select reaktifinden eklenmiştir.
- Karışım vortekslenerek 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edilerek, DNA'nın manyetik boncukların yüzeyine bağlanması sağlanmıştır.
- Karışım kısa bir süre santrifüjlendikten sonra manyetik raka yerleştirilerek 5 dakika bekletilmiştir ve manyetik boncuklara bağlı PCR ürünlerinin solüsyondan ayrılması sağlanmıştır.
- İstenmeyen PCR ürünlerini ve primer dimerlerini içeren geriye kalan çözelti pipet ile manyetik boncukların dağılmasına izin vermeden çekilerek atılmıştır.
- Tüpler manyetik raf üzerindeyken %70'lik etanol içeren yıkama çözeltisi manyetik boncukları dağılmamasına dikkat edilerek tüplere eklenmiştir.
- Bir dakika oda ısısında tüpler manyetik rak üzerinde inkübe edilmiştir ve yıkama solüsyonu pipet ile aspire edilerek atılmıştır. Yıkama aşaması bir kez daha tekrarlanmıştır.
- Tüplerde kalan etanol kalıntısını temizlemek için manyetik boncuk pelletlerini içeren tüpler manyetik rak üzerinden ayrılmadan 40°C'de yaklaşık 10 dakika kadar inkübe edilmiştir.
- Etanolün tamamen uzaklaştırılmasından sonra Nextera XT kiti ile birlikte gelen Resuspension Buffer (RSB/Süspansüyon tamponu) kullanılarak PCR ürünlerinin

elüsyonu sağlanmıştır. Tüpler manyetik rak üzerinden alınarak her bir tüpe 50 µl RSB buffer eklenmiştir. Ardından tüpler vortekslenerek manyetik boncukların solüsyon ile homojen olarak karışması sağlanmıştır.

- Karışım 10 saniye santrifüjlendikten sonra tüpler tekrar manyetik raka yerleştirilerek 5 dakika beklenmiştir. Bu aşamada saflaştırılmış DNA ürünlerinin manyetik boncuklardan ayrılarak solüsyonun içerisine geçmesi sağlanmıştır. Saflaştırılmış DNA'yı içeren solüsyonlar pipet ile aspire edilerek, 0,2 µl'lik yeni PCR tüplerine aktarılmıştır.

3.3.4. Saflaştırılmış DNA kütüphanelerinin normalizasyonu

- Saflaştırılan kütüphane örneklerinin miktarları iQuant dsDNA HS Assay kiti kullanılarak Qubit 3.0 Fluorometer cihazında ölçülmüştür. Ölçülen değerler ve 1,5 dilüsyon katsayısı kullanılarak ($\text{ng/ul} \times \text{dilüsyon katsayısı}$) formülü ile kütüphane örneklerinin nM cinsinden konsantrasyonları belirlenmiştir.
- Distile su kullanılarak örnekler önce 0,2 µl'lik mikro santrifüj tüplerinde 1 nM konsantrasyona seyreltilmiştir. Ardından 1 nM kütüphaneyi 150 pM yükleme konsantrasyonuna seyreltilmiştir. 100 µl hacminde kütüphane hazırlamak için 85 µl distile su ve 15 µl kütüphane örneği yeni bir mikro santrifüj tüpünde karıştırılmıştır.
- Seyreltme işleminin ardından her bir kütüphane örneğinden 10 µl alınarak yeni bir tüpte karıştırılarak kütüphane yükleme havuzu oluşturulmuştur.
- Illumina firmasının sunduğu çevrimiçi kapsama (Coverage) aracı kullanılarak havuzlanması planlanan örnek sayısı hesaplanmıştır. Her bir çalışma döngüsünde 12 adet örneğin havuzlanması yapılmıştır.

3.3.5. Yeni nesil dizileme aşaması

Yeni nesil dizileme için iSeq 100 (Illumina) cihazında çalışılmıştır. Her biri çalıştırma başına 4 milyon okuma üreten 1x36 baz tek okuma ile 2x150 baz çift yönlü okuma yapabilen 300 döngülü iSeq 100 il Reagent v1 (Illumina) kartuşu ile çalışılmıştır.

- Kartuş içerisindeki reaktiflerin oda ısısında 24 saat bekletilerek çözünmesi sağlanmıştır. Yeni bir akış hücresi (Flow cell) +4 °C buzdolabından çıkarılmıştır ve 15 dakika süre ile bekletilerek oda sıcaklığına ulaşması sağlanmıştır.

- DNA kütüphaneleri kartuştaki rezervuara yüklenerek, akış hücresi kartuşa yerleştirilmiştir.
- Cihaz üzerinde çalışma kurulumu Generate Fsq seçeneği belirlenerek, okuma döngüsü olarak, Okuma 1 ve 2 için 151 ve Dizin 1 ve 2 için 8 değerleri belirlenmiştir.
- Sekanslama bittikten sonra yazılım verileri çıktı klasöründen, FASTQ dosyaları şeklinde kaydedilmiştir.

3.4.Verilerin Analizi

- Yeni Nesil Dizileme ile elde edilen ham okumalar web tabanlı PaSeq aracı ile birleştirilmiştir. Ham YND verileri kalite ve kontaminasyon filtresinden geçirilmiştir, referans genoma (HXB2) hizalanmıştır ve farklı eşik değerlerde konsensus diziler oluşturulmuştur. Amino asit varyantları için kodon düzeyinde Stanford HIVdb programı ile mutasyonların sorgulaması yapılmıştır.
- Sanger ile elde edilen diziler Ugene programıyla referans genom (HXB2) kullanılarak hizalanmış ve birleştirilmiştir. Amino asit varyantları için kodon düzeyinde Stanford HIVdb programı ile mutasyonların sorgulaması yapılmıştır.
- Dizilere NCBI Genbank üzerinden PRJNA658970 BioProject numarasıyla ulaşılabilmektedir.
- HIV-1 *pol* gen bölgesine ait parsiyel uzunluktaki her bir alt tipe ve rekombinant forma ait 4 adet referans genom dizisi Los Alamos veritabanından çekilmiştir. Referans diziler ve YND'nin %1 eşik değerinde elde edilen konsensus diziler MAFFT ile hizalandıktan sonra 3' ve 5' ucundaki diziler kesilmiştir. Filogenetik ağaç yapımında, Los Alamos HIV veritabanının TreeMaker çevrimiçi aracı yardımıyla, neighbor joining yöntemi kullanılmıştır.
- Verilerinin istatistiksel analizleri için GraphPad Prism versiyon 9 programı kullanılmıştır. Kategorik değişkenler sayı, yüzde verilerek, sürekli değişkenler ise ortalama, standart sapma ile sunulmuştur. Viral yük ve CD4+ T lenfosit sayısı ilişkisi Pearson korelasyon analiziyle değerlendirilmiştir. Direnç prevalansları Sanger dizileme kontrol grubu olarak belirlenerek, yeni nesil dizilemenin farklı eşik değerleriyle, bağımlı iki örnekleme ait ki-kare (McNemar) testiyle kıyaslanmıştır. Viral yük değerleri ve CD4+ sayıları ortalamalarının DRM grupları değişkenine göre değerlendirmesi Kruskal Wallis-H testiyle yapılmıştır. İstatistiksel olarak p değeri 0,05 düzeyine anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. HIV RNA Real Time PCR ve CD4+ sonuçları

Örneklerin HIV viral yük değerleri 1260 ila 2 025 000 kopya/ml arasında değişmektedir ve 6 hastada (%12,8) viral yük 1000-10000 kopya/ml iken, 41 hastada (%87,2) viral yük >10000 kopya/ml saptanmıştır.

Çalışmaya dahil edilen 47 hastanın 38'inin CD4+ sonuçları mevcuttur. Hastaların HIV RNA viral yük tayini anındaki CD4+ T lenfosit sayıları, 209-917,91/mm³ arasında değişmektedir. CD4+ düzeyi, <200/mm³ olan hasta sayısı 8 (%21,1), 200-349/mm³ aralığında olan hasta sayısı 11 (%28,9), 350-499/mm³ aralığında olan hasta sayısı 7 (%18,4), ≥500/mm³ olan hasta sayısı 12 (%31,6) bulunmuştur (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. CD4+ T lenfosit sayısı, viral yük değerleri, cinsiyet ve yaş grupları dağılımı

Cinsiyet		Erkek			Kadın			Toplam
Yaş Aralığı		18-39	40-59	≥60	18-39	40-59	≥60	
HIV Viral Yük (kopya/ml)	1000-10000	2	3	-	-	1	-	6
	>10000	23	10	2	6	-	-	41
Toplam		25	13	2	6	1		47
CD4+ T Lenfosit Sayısı (hücre/mm ³)	<200	3	4	-	1	-	-	8
	200-349	7	1	1	2	-		11
	350-499	5	1	1	-	-		7
	≥500	6	3	-	2	1		12
Toplam		21	9	2	5	1		38

Örneklerin CD4+ T lenfosit sayısı ve HIV viral yük değerlerine göre dağılımı Çizelge 4.2 'de verilmiştir. Yedi hastanın viral yük değerleri ile eş zamanlı bakılan CD4 sayılarına ulaşamamıştır ve 38 hasta sonucu ile viral yük ve CD4 sayısı değerlendirmesi yapılmıştır. Hastaların CD4+ sayıları ve viral yük değerleri arasında ilişki Pearson korelasyon analizi ile incelenmiştir ve değerler arasındaki ilişki istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($r = -0,19$, $p = 0,24$).

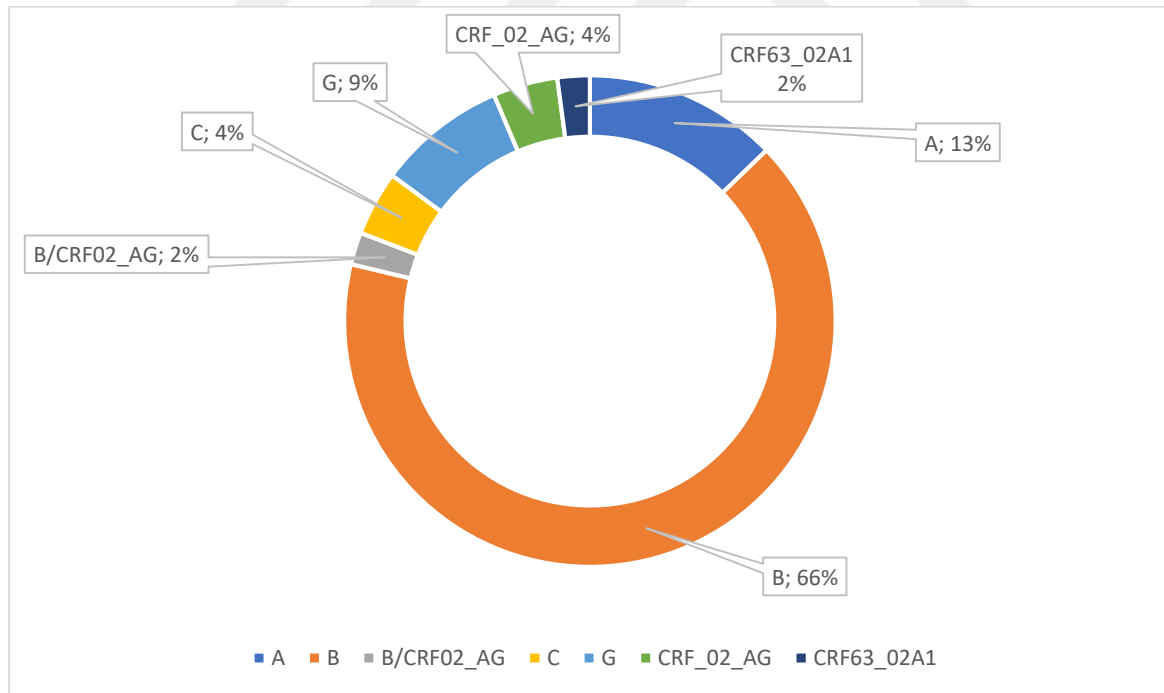
Çizelge 4.2. CD4+ T lenfosit sayısının HIV viral yük değerlerine göre dağılımı

CD4+ T Lenfosit Sayısı (hücre/mm ³)	Viral Yük (kopya/mm)	
	1 000-10 000 n (%)	>10 000 n (%)
<200	2	4
200-349	-	14
350-499	1	6
≥500	1	10
Toplam	4	34

* Pearson korelasyon; $r = -0,19$, $p > 0,05$

4.2.Alt Tiplerin Belirlenmesi

Stanford HIVdb ilaç direnci uygulamasından alınan veriler doğrultusunda, hastaların çoğunluğunun alt tip B ile enfekte olduğu gözlenmiştir (31 hasta, %66) (Şekil 4.14). Bunu %13 ile A (6 hasta), %9 ile G (4 hasta), %4 ile C (2 hasta), CRF_02AG (2 hasta), %2 ile B/CRF02_AG (1 hasta), %2 ile CRF63_02A1 (1 hasta) tipleri takip etmektedir.



Şekil 4.1 Alt tip ve rekombinant formların oransal dağılımı

4.3. Sanger Dizileme ve Yeni Nesil Dizileme ile Tespit Edilen Mutasyonların Değerlendirmesi

Çalışmaya dahil edilen 47 hasta örneğinde görülen ilaç direnci mutasyonlarının (DRM) türü ve frekansı, tüm hastaların yaş, cinsiyet, viral yük ve CD4+ T lenfosit özellikleri Çizelge 4.3'te özetlenmektedir. Stanford HIVdb version 9 programından elde edilen verilere göre, YND'nin farklı eşik değerlerinde ve Sanger dizilemede tespit edilen DRM'ler incelenmiştir. Veritabanından elde edilen verilerde her bir gen bölgesiyle ilgili mutasyonlar alt gruplara ayrılmaktadır. Proteaz bölgesiyle ilişkili DRM'ler "PR majör", "PR aksesuar" ve "PR diğer" alt gruplarına ayrılırken, ters transkriptaz bölgesiyle ilişkili DRM'ler "NRTI DRM", "NNRTI DRM" ve "RT diğer" alt gruplarına ayrılmaktadır. Diğer alt grubunda yer alan mutasyonlar surveyansı yapılan DRM'ler olup ilaç direnciyle olan ilişkileri henüz kanıtlanamamıştır. Bu grupta yer alan mutasyonlar sadece bazı özgün mutasyonlarla birlikte görüldüğünde ya da belirli alt tiplerde gözlemlendiğinde ilaç direnci yapabilen mutasyonlardır. Sekanslar YND ile tespit edilen DRM frekanslarına göre üç gruba ayrılmıştır. İlaç direnciyle ilişkili mutasyon içermeyen sekanslar "DRM yok", %15 eşik değer altında DRM görülenler "düşük frekans grubu (DF)" ve %15 eşik değer üzerinde DRM görülenler "yüksek frekans grubu (YF)" olarak sınıflandırılmıştır.

4.3.1. Sanger Dizileme Sonuçları

Sanger dizilemeyle, 5 örnekte (%10,6) en az bir antiretroviral ilaca karşı direnç tespit edilmiştir. NRTI ve NNRTI direnç mutasyon oranları sırasıyla %4,3 (2 örnek) ve %6,4 (3 örnek)'tür. Proteaz inhibitörlerine karşı direnç mutasyonu görülmemiştir. İki örnekte T215E (NRTI DRM) ve 3 örnekte K103N (NNRTI DRM) mutasyonları bulunmuştur.

4.3.2. Yeni Nesil Dizileme Sonuçları

Yeni nesil dizilemeyle %1 eşik değer ve üzerinde, 22 örnekte (%46,8) en az bir antiretroviral ilaca karşı direnç tespit edilmiştir. PI, NRTI, NNRTI direnç mutasyonlarının oranları sırasıyla %19,1 (9 örnek), %27,7 (13 örnek), %19,1 (9 örnek) olarak bulunmuştur. Örneklerin 16 (%34)'sında en az bir düşük frekanslı direnç mutasyonu varken, 24 (%51,1)'ünde DRM görülmemiştir ve 7 (%14,9)'sinde yüksek frekanslı direnç mutasyonları gözlemlenmiştir.

Çizelge 4.3. Cinsiyet, yaş, viral yük, CD4+ T lenfosit sayıları ve ilaç direnci mutasyonlarının (DRM) türü ve frekansı

Sekans no.	Cinsiyet	Yaş	Viral yük (kopya/ml)	CD4+ sayısı (hücre/mm ³)	Alt tip	YND DRM (Frekans, %)				YND Frekans grubu	Sanger DRM			
						PR majör	PR aksesuar	NRTI	NNRTI		PR majör	PR aksesuar	NRTI	NNRTI
1	E	35	562500	215,34	B	-	-	-	-	DRM yok	-	-	-	-
2	E	22	13500	556,95	B	-	T74P (1,2)	-	-	DF	-	-	-	-
3	E	30	630000	654,30	B	-	-	F77L (2.1)	K103N (98,9), E138G (1)	YF	-	-	-	K103N
4	E	18	180000	321,69	B	-	-	-	-	DRM yok	-	-	-	-
5	E	56	112500	559,06	C	-	-	-	-	DRM yok	-	-	-	-
6	K	33	427500	231,17	B	-	-	-	-	DRM yok	-	-	-	-
7	E	37	191250	291,51	B	-	-	-	-	DRM yok	-	-	-	-
8	K	30	31500	1366,83	B	-	-	-	K103N (99)	YF	-	-	-	K103N
9	E	23	450000	917,91	B	-	F53L (2.6)	-	-	DF	-	-	-	-
10	E	33	54000	333,57	B	-	-	K65R (1.8), M184V (1), T215A (2.8)	K103N (99,3)	YF	-	-	-	K103N
11	E	25	22510	-	CRF02_ AG	-	-	-	-	DRM yok	-	-	-	-
12	E	61	91800	431,5	G	-	-	-	-	DRM yok	-	-	-	-
13	E	28	130500	212	B	-	-	-	-	DRM yok	-	-	-	-
14	E	74	506250	290,16	B	M46I (1)	-	-	-	DF	-	-	-	-
15	E	33	130500	405,9	B	M46L (2,9), V82A (1,1)	-	M184V (1,5)	E138G (2,3)	DF	-	-	-	-

Çizelge 4.3. (devam) Cinsiyet, yaş, viral yük, CD4+ T lenfosit sayıları ve İlaç direnci mutasyonlarının (DRM) türü ve frekansı

Sekans no.	Cinsiyet	Yaş	Viral yük (kopya/ml)	CD4+ sayısı (hücre/mm ³)	Alt tip	YND DRM (Frekans, %)				YND Frekans grubu	Sanger DRM			
						PR majör	PR aksesuar	NRTI	NNRTI		PR majör	PR aksesuar	NRTI	NNRTI
16	E	52	720000	-	G	-	N88D (1,1)	-	E138G (1,8)	DF	-	-	-	-
17	E	22	6075	475,80	B	-	-	-	-	DRM yok	-	-	-	-
18	K	52	1260	676,43	C	-	-	-	-	DRM yok	-	-	-	-
19	E	41	1125000	39,19	B	-	-	-	-	DRM yok	-	-	-	-
20	E	39	1350	128,81	G	-	-	-	-	DRM yok	-	-	-	-
21	E	38	1350000	54,49	CRF63_02A1	-	-	D67G (1,3)	-	DF	-	-	-	-
22	K	34	562500	53,94	A	-	-	-	-	DRM yok	-	-	-	-
23	E	39	78300	550	B	-	-	K70R (1,3)	-	DF	-	-	-	-
24	E	31	64350	209	A	-	-	V75I (2,6)	-	DF	-	-	-	-
25	E	27	832500	626,38	B	-	-	K65R (1), K70R (1), M184V (1,4)	-	DF	-	-	-	-
26	E	46	765000	706,61	CRF02_AG	-	-	-	G190E (1,6)	DF	-	-	-	-
27	E	34	162000	882,5	B	-	-	-	-	DRM yok	-	-	-	-
28	E	21	225000	-	B	-	-	D67G (1,1), M184I (6,2), T215E (99,6)	-	YF	-	-	T215E	-
29	E	52	562500	137,04	B	-	-	-	-	DRM yok	-	-	-	-
30	E	26	2025000	389,42	B	-	-	A62V (64), T215D/E/ A/N (80,2)	-	YF	-	-	T215E	-
31	K	39	315000	798,14	G	-	-	-	-	DRM yok	-	-	-	-
32	E	39	540000	393,14	B	-	N88D (1,23)	-	-	DF	-	-	-	-
33	E	55	25600	-	B	-	N83D (1,3)	-	-	DF	-	-	-	-
34	E	29	182000	251,88	B	-	-	-	-	DRM yok	-	-	-	-
35	E	19	765000	-	B	-	-	-	-	DRM yok	-	-	-	-

Çizelge 4.3. (devam) Cinsiyet, yaş, viral yük, CD4+ T lenfosit sayıları ve İlaç direnci mutasyonlarının (DRM) türü ve frekansı

Sekans no.	Cinsiyet	Yaş	Viral yük (kopya/ml)	CD4+ sayısı (hücre/mm ³)	Alt tip	YND DRM (Frekans, %)				YND Frekans grubu	Sanger DRM			
						PR majör	PR aksesuar	NRTI	NNRTI		PR majör	PR aksesuar	NRTI	NNRTI
36	E	34	553500	64,22	B	-	-	-	-	DRM yok	-	-	-	-
37	K	27	21870	-	B	-	-	M184V (1,1)	Y181YC (16,8)	YF	-	-	-	-
38	E	35	1900000	-	B	-	-	-	-	DRM yok	-	-	-	-
39	E	42	6300	176,75	B	-	-	-	-	DRM yok	-	-	-	-
40	E	41	153000	146,44	B	-	-	T215A (3,1)	Y188C (2,8)	DF	-	-	-	-
41	K	34	39000	258,91	A	-	-	-	-	DRM yok	-	-	-	-
42	E	46	7335	-	A	-	-	-	V106I (36,7), G190V (3,7)	YF	-	-	-	-
43	E	32	1299000	414,84	B/ CRF02_ AG	-	-	K70T (1,9), K219E (4,4)	-	DF	-	-	-	-
44	E	51	101475	365,26	A	-	L89V (1,6)	K219E (1)	-	DF	-	-	-	-
45	E	49	1647	-	A	I54T (2,3)	N83D (1,5)	-	-	DF	-	-	-	-
46	E	45	56880	800,84	B	-	-	-	-	DRM yok	-	-	-	-
47	E	49	573750	242,80	B	-	-	-	-	DRM yok	-	-	-	-

4.3.3. Direnç durumunun incelenmesi

DRM sınıflandırmasına göre YND farklı eşik değerlerinde ve Sanger dizilemede kaç örnekte DRM tespit edildiği Çizelge 4.4, 4.5, 4.6, 4.7 ve 4.8’de özetlenmiştir.

Yeni nesil dizilemeyle %1 eşik değerinde 9 (%19,1) hasta örneğinde PR bölgesinde DRM tespit edilirken, 17 (%36,2) hasta örneğinde RT bölgesinde DRM tespit edilmiştir (Çizelge 4.5). PR bölgesi majör mutasyon tespit edilen örnek sayısı 3 (%6,4), aksesuar DRM tespit edilen örnek sayısı 7 (%14,9) olarak gözlenmiştir. Yeni nesil dizilemenin %1 eşik değerinin üzerinde ve Sanger dizilemede PR DRM’si gözlenen örnek yoktur (Çizelge 4.6).

Yeni nesil dizilemenin %1 eşik değerinde RT bölgesi NRTI DRM tespit edilen örnek sayısı 13 (%27,7), NNRTI DRM tespit edilen örnek sayısı 9 (%19,2) olarak gözlenmiştir. Eşik değer %1 üzerinde RT DRM’leri eşit sayıda örneklerde gözlenmiştir. Her bir eşik değerinde NRTI DRM için 2 örnekte, (%4,3), NNRTI DRM için 5 örnekte (%10,6) DRM gözlenmiştir. Sanger dizileme ile NRTI DRM tespit edilen örnek sayısı 2 (%4,3), NNRTI DRM tespit edilen örnek sayısı 3 (%6,4) bulunmuştur (Çizelge 4.7).

Mutasyon saptanan örnek sayıları, Sanger dizileme kontrol grubu olarak belirlenerek, yeni nesil dizilemenin farklı eşik değerleriyle, bağımlı iki örnekleme ait ki-kare (McNemar) testiyle istatistiksel olarak kıyaslanmıştır. Sanger dizileme ile karşılaştırıldığında, PR mutasyon ve RT mutasyon gruplarında %1, %5, %10 ve %15 eşik değerlerde anlamlı farklılık gözlenmiştir ($p<0,05$). Herhangi bir sınıfta DRM grubunda bütün eşik değerlerde anlamlı farklılık gözlenirken, PR DRM ve RT DRM grubunda %1 eşik değerinde anlamlı farklılık gözlenmiştir ($p<0,05$). Proteaz inhibitörü direnç grubunda PR aksesuar DRM ve PR diğer mutasyon gruplarında %1 eşik değerinde anlamlı farklılık gözlenirken ($p<0,05$), PR majör grubunda fark gözlenmemiştir ($p>0,05$). NRTI ve NNRTI DRM gruplarında %1 eşik değerinde anlamlı farklılık gözlenirken ($p<0,05$), RT diğer grubunda istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı gözlenmiştir ($p>0,05$).

Gen bölgelerine ve ilaç direnç grubuna göre mutasyon saptanan örneklerin Sanger ve yeni nesil dizilemenin farklı eşik değerlerinde gözlenen sayılarının karşılaştırması Şekil 4.2, Şekil 4.3, Şekil 4.4, Şekil 4.5 ve Şekil 4.6’da gösterilmiştir.

Çizelge 4.4. PR ve RT gen bölgelerinde mutasyon tespit edilen örnek sayısı

Mutasyon grupları	YND %1		YND %5		YND %10		YND %15		YND %20		Sanger
	n (%)	p değeri	n (%)	p değeri	n (%)	p değeri	n (%)	p değeri	n (%)	p değeri	n (%)
PR mutasyon	33 (70,2)	0,0001	30 (63,8)	0,0310	30 (63,8)	0,0310	30 (63,8)	0,0310	27 (57,5)	0,0543	17 (36,2)
RT mutasyon	35 (74,5)	0,0133	29 (61,7)	0,0412	28 (59,6)	0,0233	29 (61,7)	0,0412	26 (55,3)	0,1336	26 (55,3)

*Bağımlı iki örnekleme ait ki-kare (McNemar) testi, $p < 0,05$

Çizelge 4.5. PR ve RT gen bölgelerinde DRM tespit edilen örnek sayısı

Mutasyon grupları	YND %1		YND %5		YND %10		YND %15		YND %20		Sanger
	n (%)	p değeri	n (%)	p değeri	n (%)	p değeri	n (%)	p değeri	n (%)	p değeri	n (%)
Herhangi bir sınıfta DRM	22 (46,8)	0,0009	7 (14,9)	0,0133	7 (14,9)	0,0133	7 (14,9)	0,0133	7 (14,9)	0,0133	5 (10,6)
PR DRM	9 (19,1)	0,0077	0 (0)		0 (0)		0 (0)		0 (0)		0 (0)
RT DRM	17 (36,2)	0,0001	7 (14,9)	0,4795	7 (14,9)	0,4795	7 (14,9)	0,4795	7 (14,9)	0,4795	5 (10,6)

*Bağımlı iki örnekleme ait ki-kare (McNemar) testi, $p < 0,05$

Çizelge 4.6. PR majör, aksesuar ve diğer mutasyon tespit edilen örnek sayısı

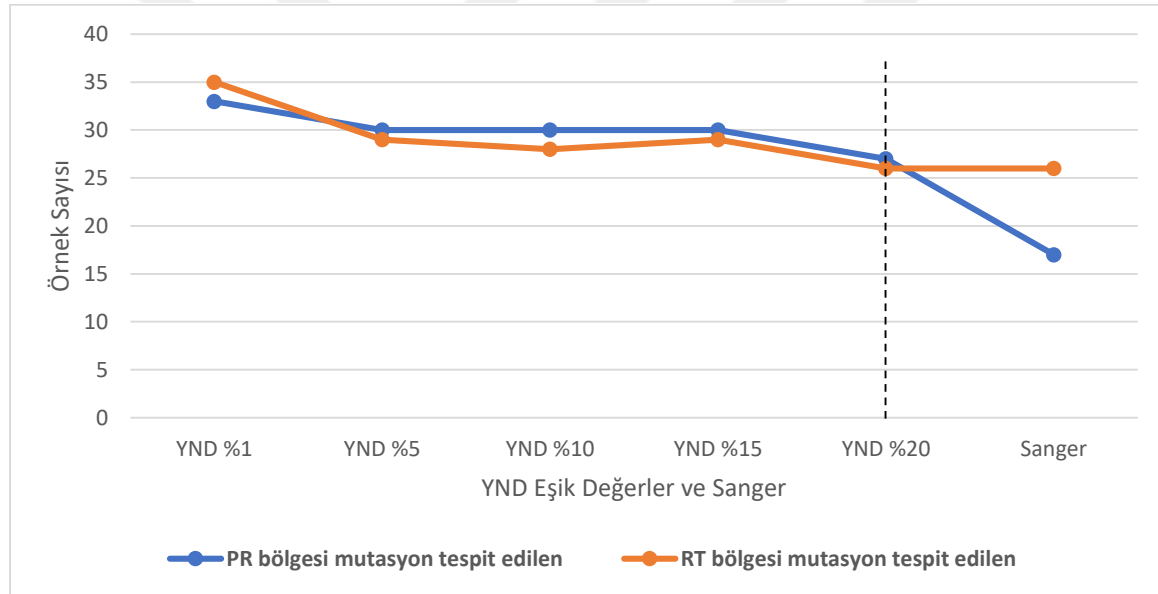
Mutasyon grupları	YND %1		YND %5		YND %10		YND %15		YND %20		Sanger
	n (%)	p değeri	n (%)	p değeri	n (%)	p değeri	n (%)	p değeri	n (%)	p değeri	n (%)
PR majör DRM	3 (6,4)	0,2482	0 (0)	-	0 (0)	-	0 (0)	-	0 (0)	-	0 (0)
PR aksesuar DRM	7 (14,9)	0,0233	0 (0)	-	0 (0)	-	0 (0)	-	0 (0)	-	0 (0)
PR diğer	31 (65,9)	0,0009	30 (63,8)	0,0009	30 (63,8)		30 (63,8)	0,0009	27 (57,5)	0,02	17 (36,2)

*Bağımlı iki örnekleme ait ki-kare (McNemar) testi, $p < 0,05$

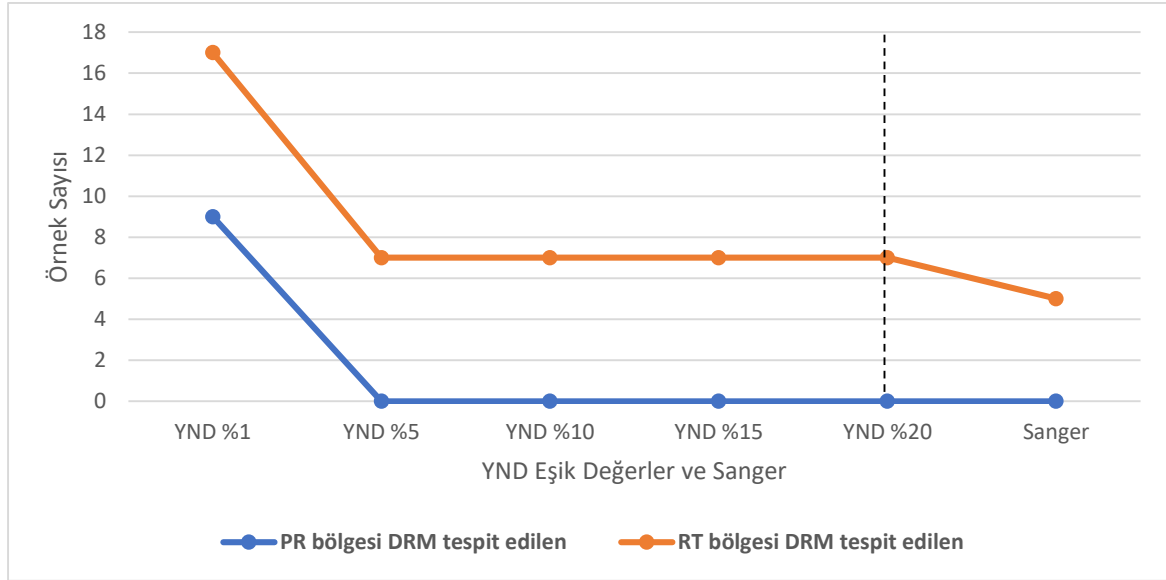
Çizelge 4.7. RT NRTI, NNRTI ve diğer mutasyon tespit edilen örnek sayısı

Mutasyon grupları	YND %1		YND %5		YND %10		YND %15		YND %20		Sanger
	n (%)	p değeri	n (%)	p değeri	n (%)	p değeri	n (%)	p değeri	n (%)	p değeri	n (%)
NRTI	13	0,0026	2	-	2	-	2	-	2	-	2 (4,3)
DRM	(27,7)		(4,3)		(4,3)		(4,3)		(4,3)		
NNRTI	9	0,0412	5	0,4795	5	0,4795	5	0,4795	5	0,4795	3 (6,4)
DRM	(19,2)		(10,6)		(10,6)		(10,6)		(10,6)		
RT diğer	27	0,2482	26	0,4795	25	1	26	0,4795	25	1	24
	(57,5)		(55,3)		(53,2)		(55,3)		(53,2)		(51,1)

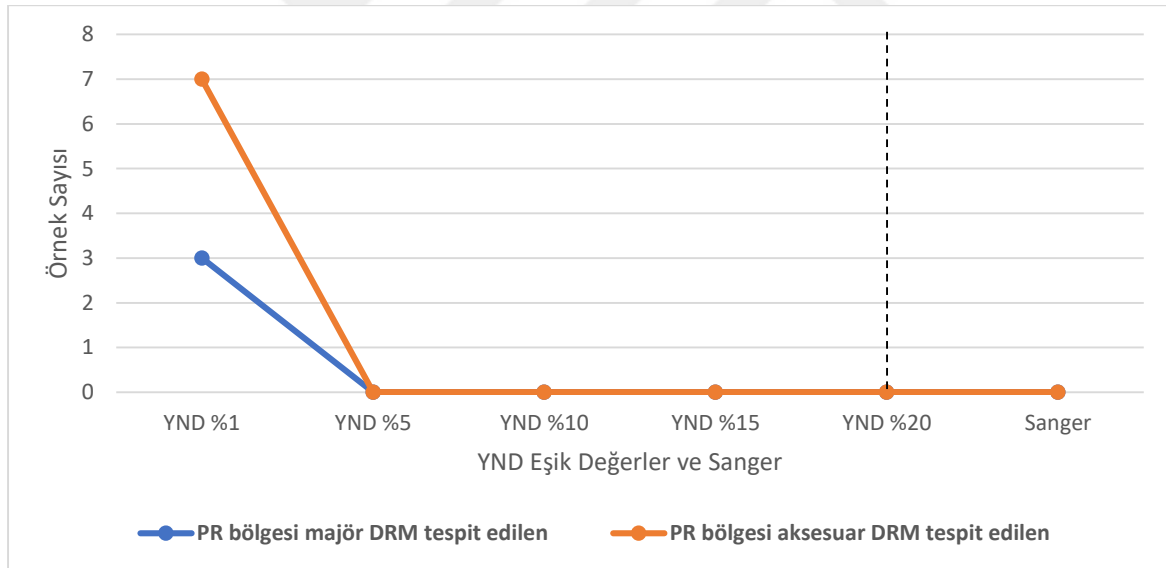
*Bağımlı iki örnekleme ait ki-kare (McNemar) testi, $p < 0,05$



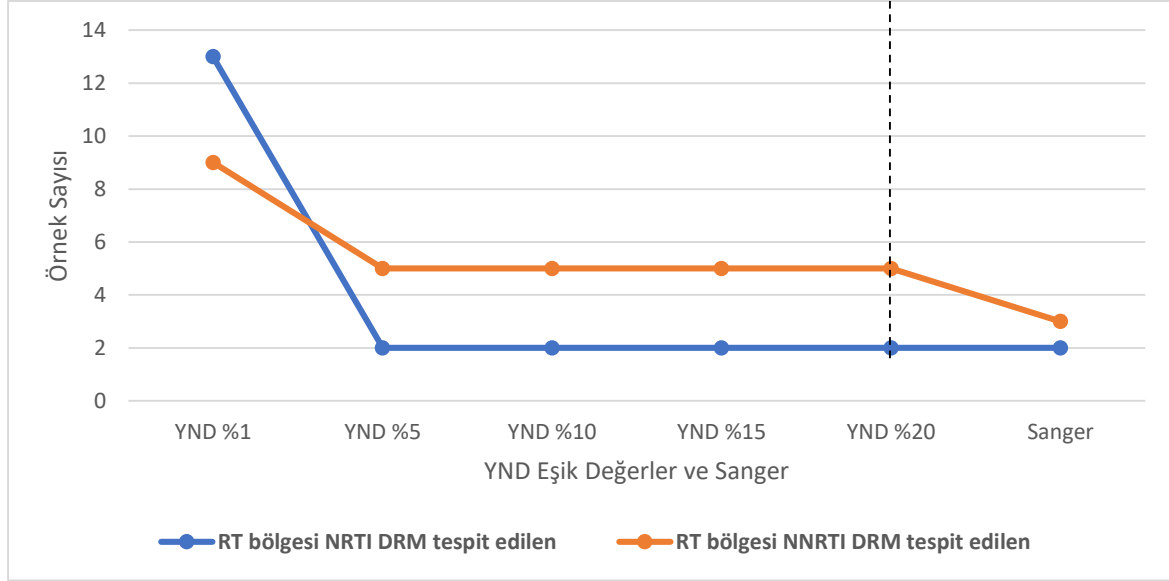
Şekil 4.2. PR ve RT gen bölgelerinde mutasyon tespit edilen örnek sayılarının karşılaştırılması



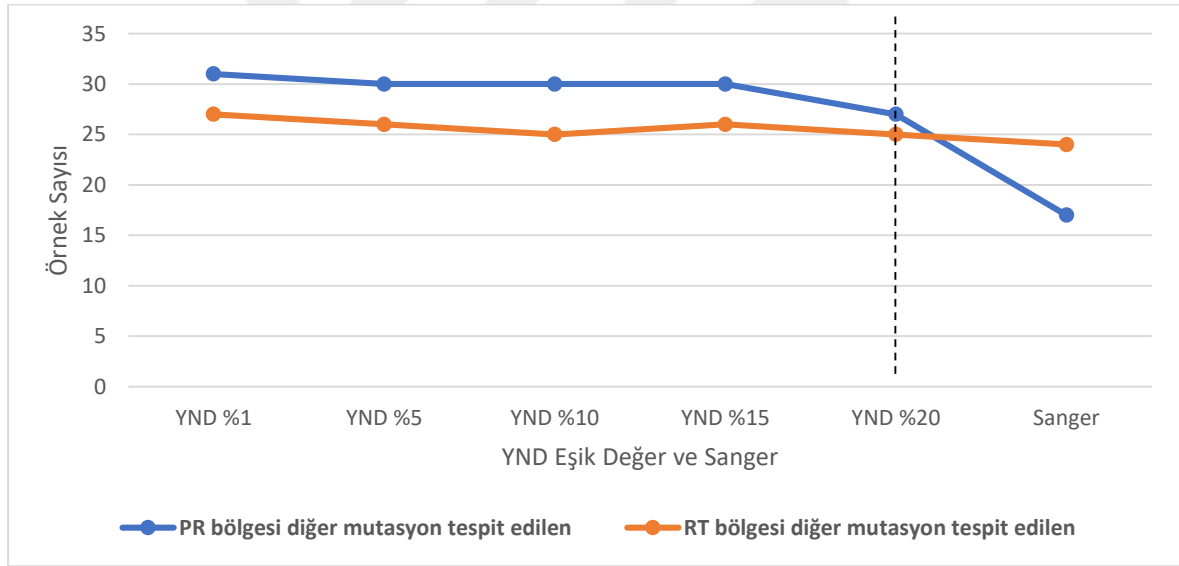
Şekil 4.3. PR ve RT gen bölgelerinde mutasyon tespit edilen örnek sayılarının karşılaştırılması



Şekil 4.4. PR majör ve aksesuar mutasyon tespit edilen örnek sayılarının karşılaştırılması



Şekil 4.5. NRTI ve NNRTI DRM tespit edilen örnek sayılarının karşılaştırılması



Şekil 4.6. PR ve RT bölgeleri diğer mutasyon tespit edilen örnek sayılarının karşılaştırılması

4.3.4. Mutasyonların incelenmesi

Stanford HIVdb version 9 programından elde edilen verilere göre, YND'nin ve farklı eşik değerlerinde ve Sanger dizilemede tespit edilen, mutasyonların gözlenen sayıları Çizelge 4.8, Çizelge 4.9 ve Çizelge 4.10'da özetlenmiştir.

Mutasyonlar en fazla YND %1 eşik değerinde gözlenmiştir. Örneklerin tamamında YND %1 eşik değerinde toplamda 120 adet mutasyon bulunmuştur. YND %1 eşik değerinde

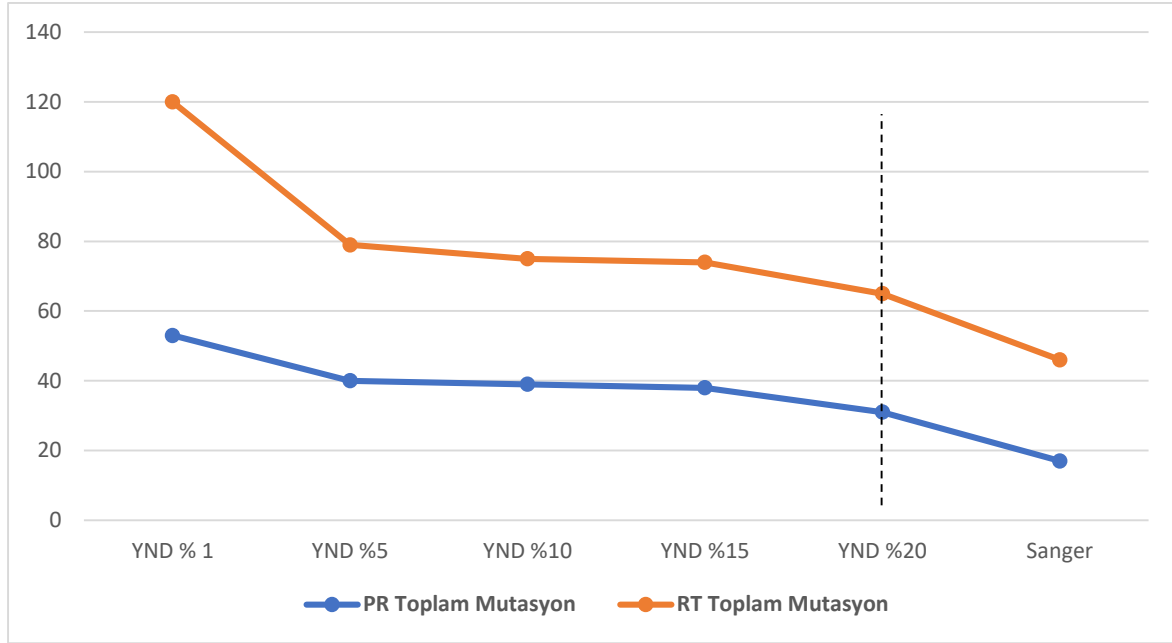
gözlenen mutasyonların 67 (%55,3) tanesi PR bölgesinde tespit edilirken, 53 (%44,7) tanesi RT bölgesinde bulunmuştur (Çizelge 4.8, Şekil 4.7). YND %1 eşik değerinde PR bölgesi DRM sayısı 11 (%25,6) iken, PR DRM'lerin 4 tanesi majör DRM ve 7 tanesi aksesuar DRM olarak bulunmuştur. YND %1 eşik değerin üzerinde PR bölgesinde DRM gözlenmemiştir. YND %1 eşik değerinde RT bölgesi DRM sayısı 32 (%74,4) iken, RT DRM'lerin 21 tanesi NRTI DRM ve 11 tanesi NNRTI DRM olarak bulunmuştur (Çizelge 4.10, Şekil 4.9, Şekil 4.10).

YND %5 ve %10 eşik değerlerinde, RT bölgesinde 4'er adet NRTI DRM gözlenirken, YND %15 ve %20 eşik değerlerinde 3'er adet NRTI DRM gözlenmiştir. YND %5, %10, %15 ve %20 eşik değerlerinde, RT bölgesinde 5'er adet NNRTI DRM gözlenmiştir (Çizelge 4.10).

Sanger dizilemede toplamda 46 adet mutasyon bulunmuştur. Sanger dizilemeyle gözlenen mutasyonların 17 (%36,9)'si PR bölgesindeyken, 29 (%63,1)'u RT bölgesinde tespit edilmiştir (Çizelge 4.8). Sanger dizilemede PR bölgesinde DRM gözlenmezken, RT bölgesinde 5 adet DRM tespit edilmiştir (Çizelge 4.9, Şekil 4.8). Sanger dizilemede tespit edilen RT DRM'lerin 2 tanesi NRTI DRM iken 3 tanesi NNRTI DRM olarak bulunmuştur (Çizelge 4.10). Yeni nesil dizilemenin %20 eşik değeriyle karşılaştırıldığında Sanger dizilemeyle gözlenen mutasyon sayılarında azalma olduğu görülmüştür.

Çizelge 4.8. PR ve RT bölgelerinde örneklerin tamamında gözlenen mutasyon sayıları

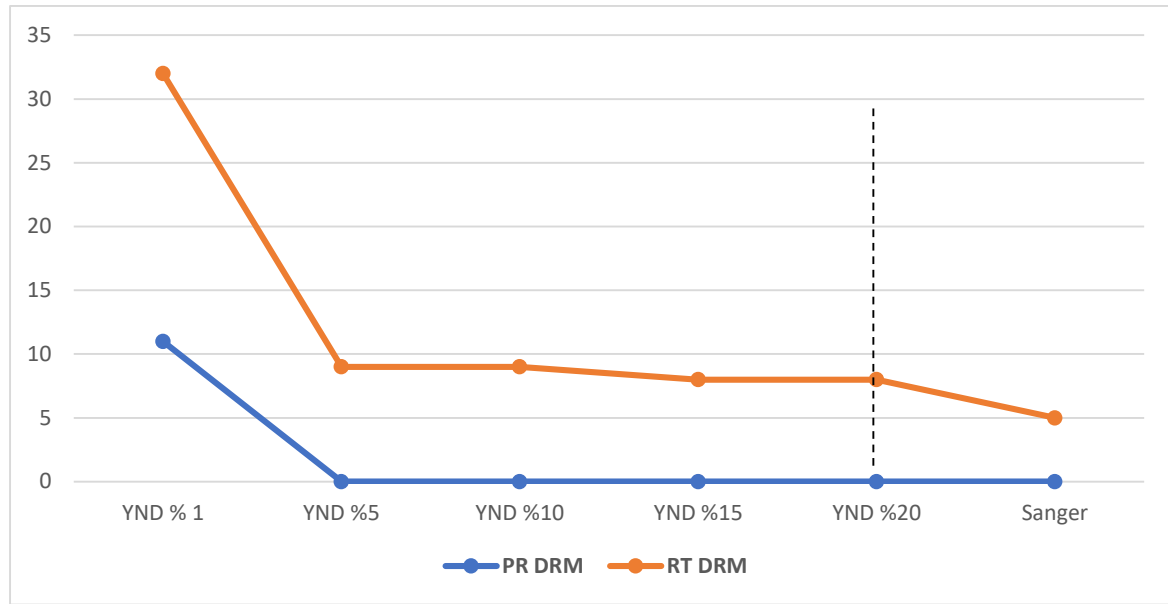
YND Eşik Değer/Sanger	PR toplam	RT toplam	Toplam
YND %1	53 (44,7)	67 (55,3)	120 (100)
YND %5	40 (50,6)	39 (49,4)	79 (100)
YND %10	39 (52)	36 (48)	75 (100)
YND %15	38 (51,4)	36 (48,6)	74 (100)
YND %20	31 (47,7)	34 (42,3)	65 (100)
Sanger	17 (36,9)	29 (63,1)	46 (100)



Şekil 4.7. PR ve RT bölgelerinde örneklerin tamamında gözlenen mutasyon sayılarının karşılaştırılması

Çizelge 4.9. Örneklerin tamamında gözlenen PR ve RT DRM sayıları

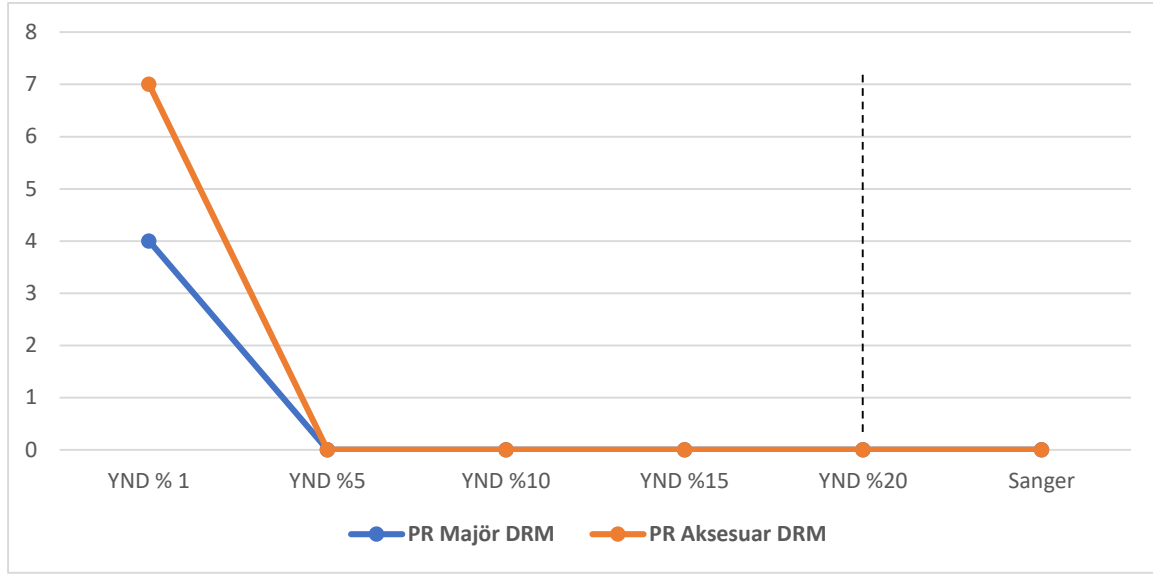
YND Eşik Değer/Sanger	PR DRM toplam n (%)	RT DRM toplam n (%)	Toplam n (%)
YND %1	11 (25,6)	32 (74,4)	43 (100)
YND %5	-	9 (100)	9 (100)
YND %10	-	9 (100)	9 (100)
YND %15	-	8 (100)	8 (100)
YND %20	-	8 (100)	8 (100)
Sanger	-	5 (100)	5 (100)



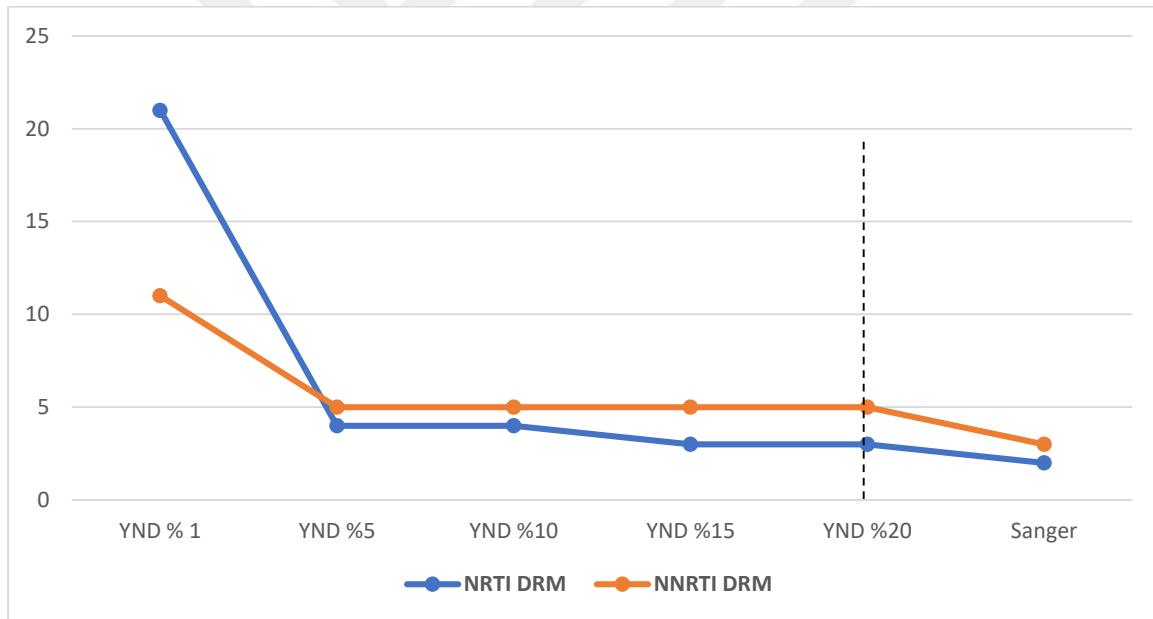
Şekil 4.8. PR ve RT DRM sayılarının karşılaştırılması

Çizelge 4.10. PR ve RT bölgelerinin farklı mutasyon gruplarında örneklerin tamamında gözlenen mutasyon sayıları

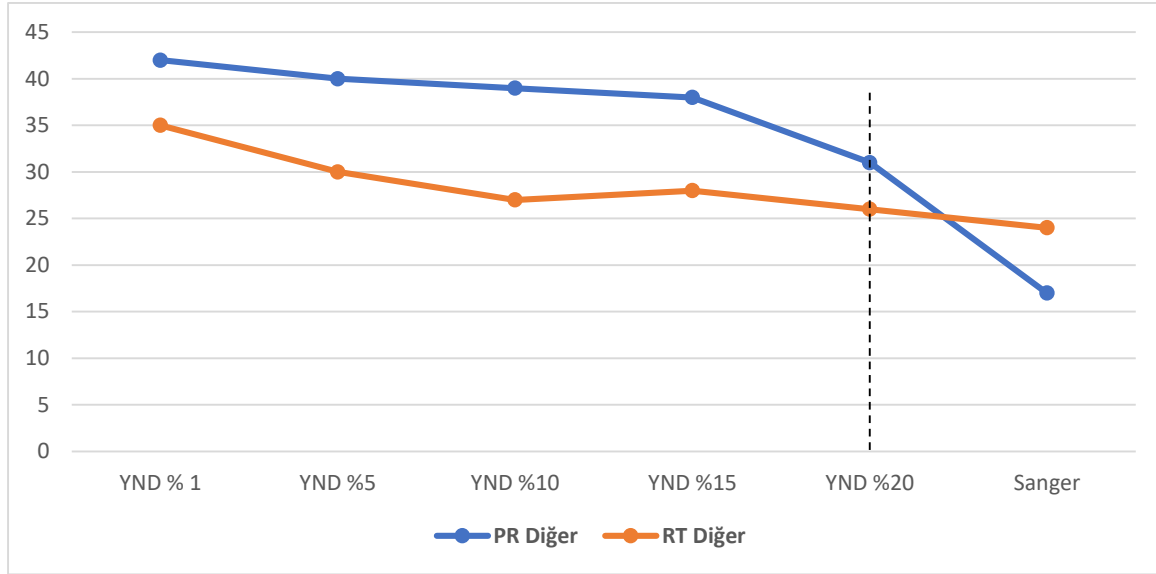
Mutasyon grupları	YND %1 n (%)	YND %5 n (%)	YND %10 n (%)	YND %15 n (%)	YND %20 n (%)	Sanger n (%)
<u>PR majör DRM</u>	4 (100)	-	-	-	-	-
<u>PR aksesuar DRM</u>	7 (100)	-	-	-	-	-
<u>PR diğer mutasyonlar</u>	42 (20,3)	40 (19,3)	39 (18,8)	38 (18,4)	31 (15)	17 (8,2)
<u>RT NRTI DRM</u>	21 (56,8)	4 (10,8)	4 (10,8)	3 (8,1)	3 (8,1)	2 (5,4)
<u>RT NNRTI DRM</u>	11 (32,4)	5 (14,7)	5 (14,7)	5 (14,7)	5 (14,7)	3 (8,8)
<u>RT diğer mutasyonlar</u>	35 (20,6)	30 (17,6)	27 (15,9)	28 (16,5)	26 (15,3)	24 (14,1)



Şekil 4.9. PR majör ve aksesuar DRM gruplarında mutasyon sayılarının karşılaştırılması



Şekil 4.10. RT NRTI ve NNRTI DRM gruplarında gözlenen mutasyon sayılarının karşılaştırılması



Şekil 4.11. PR ve RT diğer mutasyon grubunda gözlenen mutasyon sayılarının karşılaştırılması

Yeni nesil dizileme ve Sanger dizilemede aminoasit pozisyonlarında tespit edilen DRM'ler ve YND'de hangi frekans aralıklarında gözleendiği Çizelge 4.11 ve Şekil 4.12'de özetlenmiştir.

Yeni nesil dizileme ve Sanger dizilemede toplamda 23 aminoasit pozisyonunda DRM tespit edilmiştir. İlaç direnciyle ilişkili mutasyonlar PR bölgesinde 8 (%34,8) aminoasit pozisyonunda tespit edilmiştir. PR bölgesinde tespit edilen DRM pozisyonlarının 5 tanesi (%21,7) majör PR DRM'si iken, 3 tanesi (%13) aksesuar PR DRM'si olarak bulunmuştur. İlaç direnciyle ilişkili mutasyonlar RT bölgesinde 15 (%65,2) aminoasit pozisyonunda tespit edilmiştir. RT bölgesinde tespit edilen DRM pozisyonlarının 9 tanesi (%39,1) NRTI DRM'si iken, 6 tanesi (%26,1) NNRTI DRM'si olarak bulunmuştur.

Yeni nesil dizilemede en sık görülen DRM pozisyonu K103 (15 adet) olup, bu pozisyonu T215 (12 adet), M184 (7 adet), V106 (5 adet) ve Y181 (5 adet) DRM pozisyonları takip etmektedir. PR bölgesine ait DRM'lerin tamamı (5 adet majör DRM ve 3 adet aksesuar DRM) sadece YND %1 eşik değerinde gözlenirken, RT bölgesinde 9 adet DRM (6 adet NRTI DRM ve 3 adet NNRTI DRM) sadece YND %1 eşik değerinde gözlenmektedir (Şekil 4.11 ve Çizelge 4.11). 4 adet DRM (T215A/D/E/N, NRTI DRM; K103N, NNRTI DRM; V106I, NNRTI DRM; Y181C/Y, NNRTI DRM) YND eşik değerlerinin tamamında gözlenmiştir.

Sanger dizilemeyle ilaç direnciyle ilişkili mutasyonlar PR bölgesinde gözlenmezken, RT bölgesinde 2 aminoasit pozisyonunda (T215 aminoasit pozisyonu, 2 adet, NRTI DRM; K103

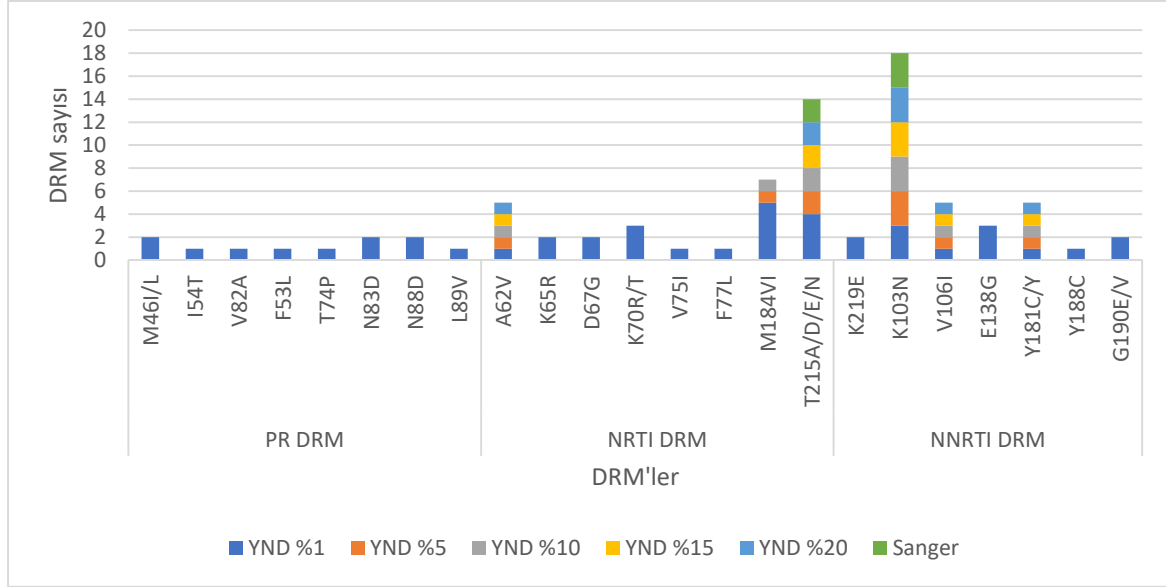
aminoasit pozisyonu, 3 adet, NNRTI DRM) DRM görülmektedir. Yeni nesil dizileme %20 eşik değerde 5 aminoasit pozisyonunda DRM gözlenmiştir. Bunlardan 2 tanesi (A62 ve T215 aminoasit pozisyonları) NRTI DRM sınıfındayken, 3 tanesi (K103, V106 VE Y181 aminoasit pozisyonları) NNRTI DRM sınıfında yer almaktadır. Yeni nesil dizileme ile %20 eşik değerinde Sanger dizilemeyle tanımlanan bütün mutasyonlar tespit edilmiştir. Yeni nesil dizilemede yüksek frekanslarda mutasyonların görüldüğü A62 (Frekans %64), V106 (Frekans %36,7) ve Y181 (Frekans %16,8) aminoasit pozisyonlarında Sanger dizileme ile mutasyon saptanmamıştır. Yeni nesil dizilemenin %10 eşik değerinin üzerinde NRTI M184 aminoasit pozisyonunda DRM gözlenmemektedir (Çizelge 4.11, Şekil 4.12).

Aminoasit pozisyonu T215 YND ile örneklerin 2 tanesinde düşük frekanslarda 2 tanesinde ise yüksek frekanslarda tespit edilmiştir (Frekans aralığı %2,8-99,6). Bu aminoasit pozisyonundaki DRM, YND ile düşük frekanslarda tespit edildiği örneklerde, Sanger dizileme ile tespit edilememiştir (bkz. Çizelge 4.3). Düşük frekanslı (DF) DRM'ler YND ile tespit edilebilirken, Sanger dizileme ile tespit edilememiştir. Düşük frekanslı mutasyonların, frekans aralığı %1-6,2 arasında değişmektedir. En sık görülen DF DRM pozisyonu M184 olup %1-6,2 frekans aralığında, YND ile toplamda 7 kere gözlenmiştir.

Çizelge 4.11. DRM'ler ve sayıları

Mutasyon tipi	Mutasyon (Frekans %)	YND %1	YND %5	YND %10	YND %15	YND %20	YND toplam	Sanger
PR majör DRM	M46I/L ^a (1-2,9)	2	0	0	0	0	2	0
	I54T ^a (2,3)	1	0	0	0	0	1	0
	V82A ^a (1,1)	1	0	0	0	0	1	0
PR aksesuar DRM	F53L ^a (2,6)	1	0	0	0	0	1	0
	T74P ^a (1,2)	1	0	0	0	0	1	0
	N83D ^a (1,3-1,5)	2	0	0	0	0	2	0
	N88D ^a (1,1-1,23)	2	0	0	0	0	2	0
NRTI DRM	L89V ^a (1,6)	1	0	0	0	0	1	0
	A62V (64)	1	1	1	1	1	5	0
	K65R ^a (1-1,8)	2	0	0	0	0	2	0
	D67G ^a (1,1-1,3)	2	0	0	0	0	2	0
	K70RT ^a (1-1,9)	3	0	0	0	0	3	0
	V75I ^a (2,6)	1	0	0	0	0	1	0
	F77L ^a (2,1)	1	0	0	0	0	1	0
	M184IV (1-6,2)	5	1	1	0	0	7	0
	T215ADEN ^b (2,8-99,6)	4	2	2	2	2	12	2
	K219E ^a (1-4,4)	2	0	0	0	0	2	0
	K103N ^b (98,9-99)	3	3	3	3	3	18	3
	V106I ^b (36,7)	1	1	1	1	1	5	0
	E138G ^a (1-2,3)	3	0	0	0	0	3	0
NNRTI DRM	Y181CY ^b (16,8)	1	1	1	1	1	5	0
	Y188C ^a (2,8)	1	0	0	0	0	1	0
	G190EV ^a (1,6-3,7)	2	0	0	0	0	2	0

Açıklama: ^a Sadece YND %1 eşik değerinde gözlenen DRM'ler; ^b YND eşik değerlerinin tamamında gözlenen DRM'ler



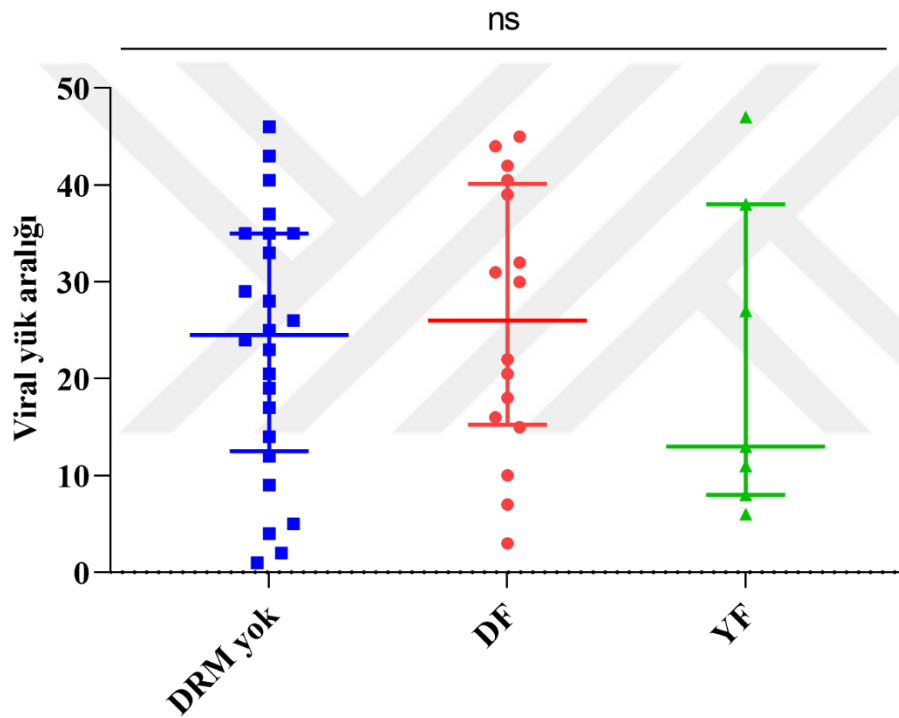
Şekil 4.12. DRM'ler ve sayıları

4.4. Viral Yük, CD4+ Sayısı ve DRM Frekansı Arasındaki İlişkinin İncelenmesi

Sekanslar YND ile tespit edilen DRM frekanslarına göre üç gruba ayrılmıştır. İlaç direnciyle ilişkili mutasyon içermeyen sekanslar DRM yok, %15 eşik değer altında DRM görülenler düşük frekans grubu (DF) ve %15 eşik değer üzerinde DRM görülenler yüksek frekans grubu (YF) olarak sınıflandırılmıştır. Örneklerin tamamında viral yük değerleri elde edilmiştir. Yeni nesil dizileme ile sekansların 24'ünde DRM görülmezken, 16'sı düşük frekans grubunda ve 7'si yüksek frekans grubunda yer almaktadır. DRM içermeyen sekansların viral yük ortalaması 355445 kopya/ml, DF grubunun viral yük ortalaması 439445 kopya/ml ve YF grubunun viral yük ortalaması 427815 kopya/ml bulunmuştur. Viral yük değerleri ortalamalarının örneklerin DRM grupları değişkenine göre anlamlı bir farklılık gösterip göstermediğini belirlemek amacıyla yapılan Kruskal Wallis-H testi sonucunda, DRM frekans gruplarının viral yük ortalamaları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$) (Çizelge 4.16, Şekil 4.13).

Çizelge 4.12. Viral yük ve DRM frekansı arasındaki ilişkinin incelenmesinde kullanılan Kruskal Wallis-H yönteminin ayrıntıları

	Sekans sayısı	Minimum	Ortanca	Maksimum	Ortalama	Standard sapma	p	H
DRM Yok	24	1260	181 000	1 900 000	355 445	355 445	0,74	0,6
DF	16	1647	301 500	1 350 000	439 445	439 445		
YF	7	7335	54 000	2 025 000	427 815	427 815		



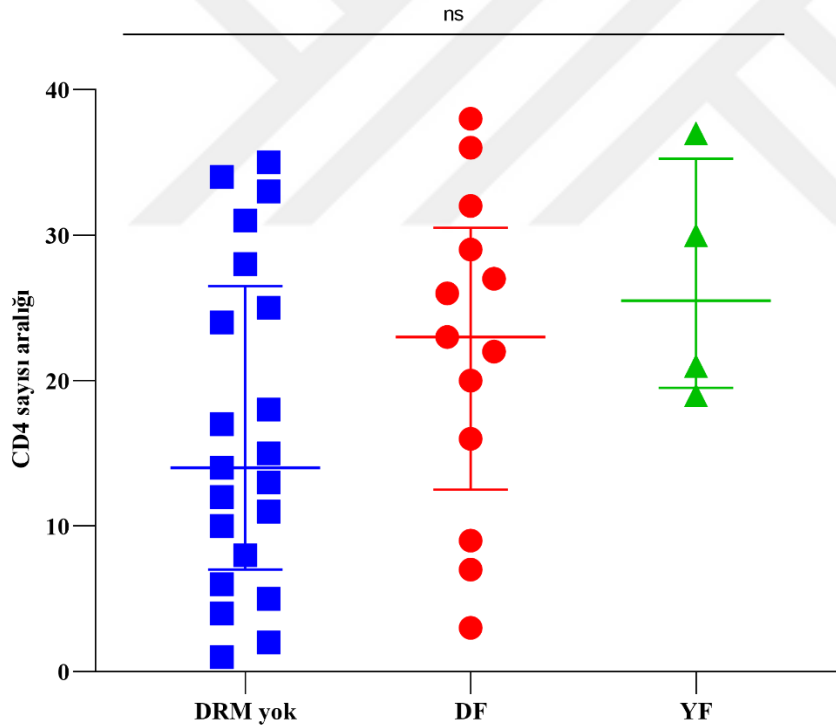
Şekil 4.13. Viral yük ve DRM frekansı arasındaki ilişkinin incelenmesi. DRM frekans gruplarının, viral yük ortalamaları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$).

Yeni nesil dizileme ile örneklerin 38 tanesinde CD4+ sayıları elde edilmiştir. Yeni nesil dizileme ile sekanslanıp CD4+ sayılarına ulaşılan örneklerin, 21'inde DRM görülmezken, 13'ü düşük frekans grubunda ve 4'ü yüksek frekans grubunda yer almaktadır. DRM içermeyen sekansların CD4+ ortalaması 345,2 hücre/mm³, DF grubunun CD4+ ortalaması 714,16 hücre/mm³ ve YF grubunun CD4+ ortalaması 686 hücre/mm³ bulunmuştur (Çizelge 4.13). CD4+ sayıları ortalamalarının sekansların DRM grupları değişkenine göre anlamlı bir

farklılık gösterip göstermediğini belirlemek amacıyla yapılan Kruskal Wallis-H testi sonucunda, DRM gruplarının CD4+ ortalamaları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$) (Çizelge 4.13, Şekil 4.14).

Çizelge 4.13. CD4+ sayıları ve DRM frekansı arasındaki ilişkinin incelenmesinde kullanılan Kruskal Wallis-H yönteminin ayrıntıları

	Sekans sayısı (n)	Minimum	Ortanca	Maksimum	Ortalama	Standard sapma	p	H
DRM Yok	21	39,19	251,9	882,5	345,2	258,4		
DF	13	54,49	414,8	4 059	714,6	1 033	0,14	3,9
YF	4	333,6	521,9	1 367	686,0	474,9		



Şekil 4.14. CD4+ sayıları ve DRM frekansı arasındaki ilişkinin incelenmesi. DRM frekans gruplarının, CD4+ ortalamaları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$).



5. TARTIŞMA

İlk tanımlanmasından bu yana dünya çapında 70 milyondan fazla kişinin enfekte olmasıyla sonuçlanan HIV/AIDS, günümüzde de önemini korumaktadır. AIDS nedeniyle dünya genelinde 32 milyondan fazla ölüm meydana gelmiştir. Dünya genelinde 2020 yılında 37,7 milyon kişinin HIV ile yaşadığı, 1,5 milyon kişinin 2020 senesinde enfekte olduğu düşünülmektedir. HIV ile yaşayan tüm insanların %53'ü kadın ve kız çocuklarından oluşmaktadır [142].

HIV/AIDS, ülkemizde bildirimi zorunlu hastalıklar arasında olup, 1985 senesinde ilk vakaların bildirilmesinden bu yana Türkiye Halk Sağlığı Kurumu tarafından sürveyansı yapılmaktadır. Türkiye'de 1985 senesinden 31 Ocak 2021 tarihine kadar, 26447 HIV pozitif ve 1974 AIDS olgusu olmak üzere toplamda 28421 HIV/AIDS vakası bildirilmiştir. Olguların 1492'si 2020 senesinde bildirilmiş olup toplam vakaların %5,6'sını oluşturmaktadır. Olguların büyük çoğunluğunu erkekler (%81) ve 25-34 yaş grubu oluşturmaktadır [3]. Çalışmamıza dahil ettiğimiz olguların çoğunluğunu erkek hastalar (%85,1) oluşturmaktadır ve olgular en çok 18-39 yaş aralığında yer almaktadır. Araştırmamıza dahil edilen olguların yaş ve cinsiyet verilerinin Türkiye Halk Sağlığı Kurumu'nun güncel verileriyle yakın olduğu gözlenmiştir.

Yaş, viral yük ve CD4+ sayısının, HIV-1 enfeksiyonunun AIDS'e ilerleme hızına araştıran çalışmalarda, HIV-1 enfeksiyonun ilk tanısında ileri yaş ve yüksek plazma HIV-1 RNA seviyelerinin, AIDS'e daha hızlı ilerlemeyle ilişkili olduğu gösterilmiş [221–223]. HIV-1 ile akut enfeksiyondan AIDS gelişimine kadar olan sürenin ileri yaşlarda daha kısa olduğu öne sürülmüştür [224]. Goodkin ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, ileri yaşların, antiretroviral tedavi kullanımı ve hastalık evresinden bağımsız olarak düşük HIV-1 viral seviyeleriyle ilişkilendirilmiştir [225]. Bizim çalışmamızda da ileri yaşlar düşük viral yük düzeyleriyle ilişkilendirilmiştir. 18-39 yaş grubunda 23 olguda, 60 yaş ve üstü grupta 2 olguda 10000 kopya/ml üzeri viral yük değerleri gözlenmiştir.

HIV pozitif bireylerin tedavi takipleri, direnç gelişimi gibi tedavi başarısızlığına neden olan durumlar göz önüne alındığında önem arz etmektedir. Plazma HIV-RNA düzeylerinin ölçümü ve CD4+ hücre sayımı, prognozun değerlendirilmesi ve tedaviye yanıtın ölçümünde önemlidir. Mellors ve arkadaşlarının araştırmasında 10 yıl içinde AIDS gelişme olasılığının

düşük viral yük ve yüksek CD4+ sayısı varlığında %3,6, tam tersi durumda ise %100 olduğu belirtilmiştir [226]. Antiretroviral tedavi başlanmasıyla HIV viral yük değerindeki düşüşle birlikte CD4+ sayısındaki artış tedavi başarısını gösteren önemli bir kriterdir. Ancak tedavi altında olmayan HIV enfekte bireylerde HIV viral yük değerinin doğrudan CD4+ sayısı ile uyumlu olmadığını gösteren çalışmalar da bulunmaktadır [227]. Bizim çalışmamızda HIV viral yük değerleri ve CD4+ sayıları arasında anlamlı istatistiksel ilişki bulunamamıştır. Çalışmamızda hastaların tedavi durumlarıyla ilgili veri yoktur. Viral yük, tedavi değişikliği ihtiyacını belirlediğinden ve CD4+ hücre sayımı, fırsatçı enfeksiyon ve tedavi başarısızlığı riskinin izlenmesine yardımcı olduğundan, tek bir parametrenin kullanılmasından ziyade, viral yük izleme ve CD4+ hücre sayımı izlemenin birlikte kullanılması önerilmektedir.

HIV'in genetik heterojenliği, virüsün ve salgının önemli özelliklerinden olup, genomdaki dinamik değişimler, hastalığın kontrolünü ve epidemiyolojik takibini güçleştirmektedir. Mutasyonlar ve rekombinasyon süreçleriyle ortaya çıkan bu çeşitlilik, viral genomların sınıflandırılmasında, tiplendirme yapılması ihtiyacını doğurmuştur. Tiplendirme, rekombinant olmayan alt tipleri ve dolaşımdaki rekombinant formları içermektedir. Alt tiplerin dağılımı bölgelere göre heterojenlik göstermektedir ve geçmişten günümüze HIV'in küresel moleküler epidemiyolojisini tanımlamak için HIV tiplendirmesi birçok araştırmaya konu olmuştur [228].

Ülkemizde çok sayıda HIV tiplendirme araştırması yapılmıştır. Yılmaz ve arkadaşları tarafından (2006) yapılan 27 olgununun değerlendirildiği ilk tiplendirme çalışmasında HIV-1 *env* gen bölgesinin *gp41* segmenti Sanger dizileme ile analiz edilerek alt tipler belirlenmiştir. Çalışmaya dahil edilen, 19 dizinin B alt tipi, 4 dizinin A alt tipi, 2 dizinin F1, 1'er dizinin C ve D alt tipleri olduğu belirlenmiştir [229]. Bu çalışmada rekombinant formlara rastlanılmamıştır. Bizim çalışmamızda en yüksek oranda B alt tipi bulunmuştur. Olgularımız arasında 2 adet rekombinant tip bulunmuştur (CRF02_AG, CRF63_02A1).

İlerleyen yıllarda yapılan tiplendirme araştırmalarında B alt tipin prevalansının yüksek olduğu fakat rekombinant formların sayısında artış olduğu gözlenmiştir. Alpars ve arkadaşlarının (2013), İstanbul'da yaşayan 20 eşcinsel olgunun dahil edildiği HIV tiplendirme çalışmasında, B alt tip (10 örnek, %50) prevalansı en yüksek bulunmuştur. B alt tipi olmayan tipler arasında, A1, C alt tipleri, ve CRF02_AG, CRF03_AB, CRF06_cpx rekombinant formları gözlenmiştir [230]. Oransal olarak B alt tipinin sıklığı (%66) bizim

çalışmamızla paralellik göstermekle birlikte, çalışmamızda bulduğumuz CRF02_AG rekombinant formuna (%2) bu araştırmada da yer verilmiştir. Çalışmamızda bu araştırmada yer verilen A (%13), C (%4) alt tipleri de saptanmıştır.

Sayan ve arkadaşlarının (2013), 72 hasta örneğiyle, HIV-1 *pol* gen bölgesini dizileme yöntemiyle değerlendirdikleri çalışmasında, örneklerde en sık B alt tipine rastlanmıştır (31 örnek, %43). Rekombinant formlar birlikte değerlendirildiğinde, HIV-1 B alt tipine göre prevalansının yüksek olduğu gözlenmiştir (2 adet CRF01_AE, 18 adet CRF02_AG, 7 adet CRF03_AB, 9 adet CRF12_BF; toplamda 36 adet, %50) [231].

Biçeroğlu ve arkadaşlarının (2013), 70 hasta örneğiyle, HIV-1 *pol* gen bölgesini dizileme yöntemiyle değerlendirdikleri çalışmasında, 31 olguda (%34,2) alt tip B saptanmıştır. Otuz üç olguda (24 adet CRF42_BF, 6 adet B/CRF02_AG, 1 adet CRF25_cpx, 1 adet CRF02_AG, 1 adet CRF01_AE rekombinant formları; %46,9) gözlenmiştir. Bu çalışmada da rekombinant formların sayısında artış olduğu gözlenmiştir [232].

Ziyade ve arkadaşlarının (2019), yabancı uyruklu olgular (Afrika, Gürcistan, Türkmenistan, Moldova) ve Türk olguları birlikte değerlendirdiği HIV tiplendirme çalışmasında, postmortem 28 adet HIV pozitif olgu, HIV-1 *pol* gen bölgesini dizilemesiyle incelenmiştir. Çalışmada B alt tipinin en yüksek oranda olduğu (%39,3) gözlenmiştir. B alt tipinin yanında rekombinant formlara da rastlanmıştır (CRF02_AG, CRF01_AE). Rekombinant formlar her iki olgu grubunda da benzer oranlarda gözlenmiştir (Türk, %20; yabancı uyruklu, %22,1). Yabancı uyruklu olguların %46,4 olduğu çalışmada, Türk olgularla B alt tipi daha fazla gözlenirken (%66,7), yabancı olgularda A alt tipinin daha çok görüldüğü (%30,8) bildirilmiştir [233].

Almanya'da 2011 senesinde Türk kökenli HIV pozitif olguların da dahil edildiği bir HIV tiplendirme araştırmasında, en çok B alt tipinin gözleendiği bildirilmiştir. Türk kökenli (76 olgu) ve Türk olmayan olguların (4579 olgu) değerlendirildiği araştırmada, Türk kökenli olgularda B alt tipine daha çok rastlanıldığı bildirilmiştir (%82,9). Buna karşın, Türk olmayan olgularla karşılaştırıldığında, B alt tipinin Türk kökenli olgularda sık görülmesinin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı gösterilmiştir [234].

Çalışmamızda, daha önce Türkiye’de yapılan HIV tiplendirme araştırmalarında bildirilmeyen CRF63_02A1 rekombinant formu bulunmuştur. Bu rekombinant form ilk olarak Baryshev ve arkadaşları (2014) tarafından tanımlanmıştır [235]. Shcherbakova ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada (2014), CRF63_02A1 rekombinant formunun Novosibirsk (Rusya) bölgesinde oldukça baskın olduğu, damar içi ilaç kullanan ve heteroseksüel olgularda bulaşının yaygın olduğu gözlenmiştir [236].

Ülkemizden de 2 farklı olgu sunumunda Türkiye’de ilk kez görülen rekombinant formlar bildirilmiştir. Sayan ve arkadaşları tarafından (2013), CRF08_BC rekombinant formu [237] ve tekrar Sayan ve arkadaşları tarafından (2014) evli HIV pozitif bir çiftte saptanan CRF06_cpx rekombinant formu bildirilmiştir [238]. Her iki olgu sunumunda da HIV-1 *pol* gen bölgesi Sanger dizileme ile çalışılarak değerlendirilmiştir.

Çalışmamızın sonuçları, Türkiye’de önceki yıllarda yapılan HIV-1 tiplendirme araştırmalarıyla paralellik göstermektedir. Bizim araştırmamız ve Türkiye’de yapılan diğer araştırmalardan elde edilen veriler, Türkiye’de HIV-1 ile enfekte hastalar arasında en yaygın tipin B alt tipi (%66) olduğunu göstermektedir. Bunu %13 ile A, %9 ile G, %4 ile C, CRF_02AG, %2 ile B/CRF02_AG, %2 ile CRF63_02A1 tipleri takip etmektedir. Ülkemizde ilk yapılan tiplendirme çalışması ve sonraki yıllarda yapılan çalışmalar karşılaştırıldığında B alt tipi yaygın olmakla birlikte, sonraki yıllarda yapılan çalışmalarda rekombinant formların sayısında artış olduğu bildirilmiştir. Bunların arasında Türkiye’de ilk kez bildirilen rekombinant formlar mevcuttur. Türkiye’deki HIV-1 dolaşımındaki eğilimler incelendiğinde, B alt tipine sık rastlanmaktadır ve B alt tipi olmayan tiplerinde farklı oranlarda heterojen bir dağılımda olduğu gözlenmiştir.

HIV-1 tiplerinin dağılımında gözlenen bu heterojenlik Türkiye’nin coğrafi konumu ve ülkemizdeki demografik değişimin hızlı dinamiğiyle ilişkilendirilebilir. B alt tipi dışında ki tiplerin prevalansındaki ve tiplerin heterojen dağılımındaki artışın, HIV’nin endemik olduğu ülkelerinden gelen yabancı öğrencilerin ve sığınmacıların sayısındaki artışla ilişkilendirilebilir.

İnsan immün yetmezlik virusu enfeksiyonlarının klinik yönetiminde, ilaç direnci değerlendirmesi kritik öneme sahiptir. Dizileme yöntemleriyle, eş zamanlı olarak genotiplendirme, alt tiplerin belirlenmesi ve rekombinasyon analizleri yapılabilmektedir.

Genotiplendirmeyeyle virusun *pol* gen bölgesinde ilaç direnciyle ilişkili mutasyonlarının değerlendirilmesi mümkündür. Genotiplendirmeden elde edilen bilgiler, HIV pozitif bireylerin tedavilerinin planlanmasında, kullanılan sınırlı ilaç rejimlerinin uzun süreli dayanıklılığı sağlamada ve ilaçların etkin kullanılmasında önemlidir.

Sanger dizileme ile dizilerimizin 5 tanesinde (%10,6) en az bir ilaç grubunda DRM tespit edilmiştir. Sanger dizilerinde PI DRM tespit edilmezken, 2 olguda (%4,3) NRTI DRM (T215E) ve 3 olguda (%6,4) NNRTI DRM (K103N) bulunmuştur. Örneklerimizdeki NRTI ve NNRTI DRM görülme oranlarında Türkiye’de yapılan diğer Sanger dizilemeyle HIV geneotiplendirme araştırmalarıyla benzer olduğu gözlenmiştir. Sayan ve arkadaşlarının 2012 yılında yaptığı, ülkemizdeki ilk HIV-1 genotiplendirme araştırmasında, 2009 ve 2012 yılları arasında İstanbul ilinde yeni tanı almış ve tedavi başlanmamış 59 HIV-1 pozitif hastanın değerlendirilmesi yapılmıştır. Sanger dizileme ile HIV-1 *pol* gen bölgesinin PR ve RT segmentlerinin incelendiği çalışmada, PI (I54V, V82A), NRTI (M41L, D67N, T215D/E/S) ve NNRTI (V179D) DRM’leri saptanmıştır. En az bir ilaca direnç %7,6 (7 olgu), PI’ler için direnç prevalansı %1,7 (1 olgu), NRTI’ler için direnç prevalansı %10 (6 olgu) ve NNRTI’ler için direnç prevalansı %1,7 (1 olgu) oranlarında bildirilmiştir [239].

Sayan ve arkadaşları 2013, 2014 ve 2016 yıllarında HIV-1 pozitif olgularda, Sanger dizilemeyle (HIV-1 *pol* geni PR/RT segmentleri) genotiplendirme değerlendirmesi yapmıştır. Yeni tanı almış 117 HIV-1 pozitif hastanın dahil edildiği çalışmada (2013), dizilerde PI (I47V, G73S), NRTI (M41L, T215C/D, K219Q) ve NNRTI (K103N) DRM’leri saptanmıştır. En az bir ilaca direnç prevalansı %7,6 (9 hasta) olarak gözlenmiştir. PI’ler için direnç prevalansı %1,7 (2 hasta), NRTI’ler için direnç prevalansı %4,2 (5 hasta) ve NNRTI’ler için direnç prevalansının %1,7 (2 hasta) oranlarında bildirilmiştir [240]. Yeni tanı almış 774 HIV-1 pozitif olgunun dahil edildiği çalışmada (2014), dizilerde, PI (M46L, I54V, L76V, V82L/T, N83D, I84V, L90M), NRTI (K65R, M184V), NNRTI (K101E, K103N/S, G190A/E/S, Y181I/C, Y188H/L) DRM’leri saptanmıştır. En az bir ilaca direnç prevalansı %6,7 (52 hasta) olarak PI’ler için direnç prevalansının %2,1 (17 hasta), NRTI’ler için direnç prevalansı %0,7 (6 hasta) ve NNRTI’ler için direnç prevalansı %4,1 (32 hasta) oranlarında bildirilmiştir [241]. Yeni tanı almış 1306 HIV-1 pozitif olgunun dahil edildiği çalışmada (2016), örneklerin 30’unda (%2,3) PI DRM’ler (M46L, I50V, I54V, Q58E, L76V, V82A/C/L/T, N83D, I84V, L90M), 8’inde (%0,6) NRTI DRM’ler (K65R, M184V, M41L, L210W, T215C/D/S/F/Y, D67N, K70R, K219E/Q/N/R) ve 44’ünde (%3,3) NNRTI

DRM'ler (L100I, K101E/P, K103N/S, V179F, Y188H/L/M, Y181I/C, G190A/E/S) görülmüştür [242]. Türkiye'de yapılan HIV genotiplendirme araştırmaları arasında, örneklem sayısının en fazla olmasıyla, bu çalışma Türkiye'deki en kapsamlı HIV genotiplendirme verilerini sunmaktadır. Sayan ve arkadaşlarının yaptığı çalışmalar ve bizim çalışmamızda gözlenen ilaç direnci mutasyonlarının yüksek prevalansı ve çeşitliliği düşünüldüğünde, antiretroviral direncin epidemiyolojik dinamiklerinin belirlenmesinde ve tedavinin yönlendirilmesinde HIV genotiplendirme çalışmalarının yol gösterici olacağı düşünülmektedir.

Yalçinkaya ve arkadaşları (2014), Türkiye Halk Sağlığı kurumuna, Mart 2010 ve Nisan 2014 tarihleri arasında, ülkemizin farklı illerinden gönderilen toplamda 190 HIV-1 pozitif örneğinde, Sanger dizileme (HIV-1 *pol* geni PR/RT segmentleri) ile genotiplendirme değerlendirmesi yapmıştır. Örneklerin, %2,1'inde PI DRM'ler (M46L, L90M), %5,2'sinde NRTI DRM'ler (M41L, M184V, T251C/D/S), %3,1'inde NNRTI DRM'ler (K103N/S, Y181C) tespit edilmiştir [258]. Bizim çalışmamızda PI DRM saptanmazken, NRTI direnç prevalansının (%4,3) benzer olduğu ve NNRTI DRM oranlarının (%6,4) bu çalışmayla karşılaştırıldığında daha fazla olduğu gözlenmiştir.

Pediyatrik yaş grubunda ülkemizde her yıl artan sayıda HIV enfeksiyonu görülmektedir. Yaşam süreçlerinin başlangıcında olan bu grupta tedavinin uzun soluklu olması kaçınılmazdır. Bu yaş grubun yaşam kalitesinin yüksek tutulabilmesi için doğru tedavinin seçimi önem arz etmektedir. Yoldaş ve arkadaşları (2014), 18 yaş ve altı, 15 pediyatrik hastada Sanger dizileme ile genotiplendirme değerlendirmesi yapmıştır. Dizilerde, PI (I54V, V82A, L90M), NRTI (M41L, D67N, T69N/T, K70R, T215D/S, M184V, K219Q) ve NNRTI (A98G, Y181C) DRM'leri saptanmıştır. En az bir ilaca direnç prevalansı %33,3 (5 hasta), NRTI'ler için direnç prevalansı %33,3 (5 hasta), NNRTI'ler için direnç prevalansı %6,7 (1 hasta) ve PI'ler için direnç prevalansı %6,7 (1 hasta) oranlarında bildirilmiştir [243]. Bizim çalışmamızda 18 yaş altı olgular dahil edilmemiştir. Pediyatrik yaş gruplarında tedaviye başlanmadan önce genotiplendirmenin diğer testlerle birlikte rutin değerlendirmeler arasında yer alması gerekliliğini araştıran 18 yaş ve altı HIV pozitif olgularında dahil edildiği çalışmaların yol gösterici olacağı düşünülmektedir.

Türkiye'de yapılan HIV genotiplendirme çalışmaları değerlendirildiğinde, araştırmaların büyük bir kısmının yeni tanı almış, tedavisine başlanmamış olgularla yapıldığı

gözlenmektedir. Çalışmalarda hastalarda HIV ilaç direncinin yüksek prevalansı dikkat çekmektedir. İlaç direncinin yüksek prevalansı düşünüldüğünde, yeni tanı almış ilk kez tedavi başlanacak HIV/AIDS olgularında ilk basamak antiretroviral tedavi rejiminin seçiminde genotiplendirmenin gerekliliği ön plana çıkmaktadır. Ülkemizde yapılan çalışmalarda genotiplendirmeyi takiben tedavi başlanan hastalarda, tedavi sırasında ve sonrasında genotiplendirmenin yapıldığı araştırmalar yoktur. Çalışmaların çoğunda hastaların tedavi durumları hakkında verilere rastlanmamıştır. Tedavi rejimleri hakkında verilerin paylaşıldığı çalışmaların örneklem büyüklüğü ise sınırlıdır. Bizim çalışmamızda da olguların tedavi rejimleri hakkında veriler yer almamaktadır ve genotiplendirmenin periyodik değerlendirilmesi yapılmamıştır. Ülkemizde HIV pozitif olgularda antiretroviral direnç prevalansının belirlenmesi ve direnç mutasyonlarının klinik öneminin değerlendirmesine yönelik çok merkezden yönetilen, örneklem sayısının çok olduğu, çalışmaya dahil edilen kişilerin klinik özgeçmişlerinin paylaşıldığı ve periyodik genotiplendirmelerinin yapıldığı araştırmalara ihtiyaç vardır.

Sanger dizilemeyle HIV genotiplendirme, HIV-1 pozitif bireylerin klinik ve tedavi yönetiminde en yaygın kullanılan yöntemdir. Sanger dizilemeyle genotiplendirmede, virüs popülasyonundaki %20 ve üzerindeki frekanslarda bulunan HIV varyantları tespit edilebilirken, düşük frekanslı mutasyonların görüldüğü varyantlar saptanamamaktadır. Virüs popülasyonunda %20'den az görülen bu varyantlar, antiretroviral ilaçlar tarafından seçilerek baskın hale gelebilmektedir. Yeni nesil dizilemeyle HIV genotiplendirmesinde, %0,4 gibi düşük frekanslarda görülen DRM'ler de tespit edilebilmektedir [244]. Çalışmamızda örneklerimizin YND ve Sanger dizileme yöntemlerinin HIV DRM saptama durumlarını karşılaştırdık. Her iki yöntemle tespit edilen DRM'ler karşılaştırıldığında, Sanger dizileme ile tespit ettiğimiz DRM'lerin tamamı yeni nesil dizilemeyle tespit edilebilmiştir. Yeni nesil dizilemede, Sanger dizilemede gözlenen DRM'lere ek olarak, düşük frekanslarda görülen çok sayıda DRM tespit edilmiştir. Araştırma bulgularımızın dikkat çekici diğer yanı ise, Sanger dizileme ile direnç tespit edilen örnek sayısının yeni nesil dizilemenin %20 eşik değerinde, en az bir ilaca direnç tespit edilen örnek sayısından daha az olduğu gözlenmiştir. Daha önce yapılan çalışmalarda da Sanger dizileme ile karşılaştırıldığında, yeni nesil dizileme ile daha fazla sayıda DRM'nin tespit edildiği gösterilmiştir.

Tekin ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada 49 hasta örneğinde PI, NRTI, NNRTI ve INSTI DRM'leri YND kullanılarak araştırılmıştır ve Sanger dizileme yöntemiyle DRM tespit oranları karşılaştırmıştır. En az bir antiretroviral ilaca direnç, YND ile %22,4 (11 örnek) ve Sanger dizileme ile %10,2 (5 örnek) bulunmuştur. YND ile %20 eşik değer ve üzerinde tespit edilen direnç mutasyonları, Sanger dizileme sonuçlarıyla aynı bulunmuştur [245]. Bizim çalışmamızda da Sanger dizileme ile tespit edilen bütün DRM'ler YND %20 eşik değerinde saptanmıştır. Bu çalışma HIV genotiplendirmesinde dizileme yöntemlerini karşılaştıran ülkemizdeki ilk araştırmadır. Bizim çalışmamız bu konuda ülkemizde yapılan ikinci araştırma niteliğindedir.

Yeni nesil dizileme, %1 eşik değerinde düşük frekanslı direnç mutasyonlarının tespitinde artan duyarlılığa sahip olduğunu çalışmamızda gösterdik. Sanger dizilemeyle karşılaştırıldığında %5 eşik değerinin altında direnç prevalansında istatistiksel olarak anlamlı artış görülmüştür (YND %1 eşik değerinde en az bir ilaca direnç Sanger dizilemeyle karşılaştırıldığında, $p=0,0009$). Benzer şekilde, Li ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada da Sanger ve yeni nesil dizilemenin farklı eşik değerlerindeki direnç prevalansı karşılaştırıldığında, %5 eşik değer ve altında istatistiksel olarak anlamlı farklılık olduğu gözlenmiştir (%5, $p=0,011$; %2, $p<0,001$; %1, $p<0,001$) [246]. Önceki çalışmalarda YND'nin %20 ve %5 eşik değerleri karşılaştırıldığında, NRTI ve NNRTI direnç prevalansında artış olduğu ve %1 eşik değerinde artışın belirgin olduğu bildirilmiştir. Moscona ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, YND ile örneklerin %31,3'ünde en az bir ilaca karşı DRM tespit edilirken, Sanger dizileme ile örneklerin %8,8'inde en az bir ilaca karşı DRM tespit edilmiştir. Yeni nesil dizileme örneklerin %11,3'ünde PI DRM, %26,2'sinde NRTI DRM, %7,5'inde NNRTI DRM tespit edilmiştir. Sanger dizilemede ise dizilerde PI DRM tespit edilmezken, örneklerin %3,8'inde NRTI DRM, %5'inde NNRTI DRM tespit edilmiştir [247]. Taylor ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, Sanger dizilemeyle saptanan mutasyonların tamamı yeni nesil dizilemeyle tespit edilmiştir [248]. Bu çalışmada olduğu gibi, bizim araştırmamızda, Sanger dizilemede tespit edilen mutasyonların tamamı yeni nesil dizilemeyle tespit edilirken, proteaz inhibitörleriyle ilişkili DRM'ler sadece YND ile tespit edilmiştir.

HIV pozitif olgularda hastalığın ilerlemesi CD4+ T hücre sayıları ölçülerek izlenmektedir. Antiretroviral tedavinin kesilmesinden sonra, CD4+ T hücre sayısı ilk birkaç ayda hızla düşer, ardından yavaş yavaş düşer [249,250]. Bir çalışmada, direnç mutasyonları tespit edilen ve edilmeyen hastalar arasında CD4+ T hücre sayısında anlamlı bir fark bulunamamış

[251]. Li ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, sekanslar YND ile tespit edilen DRM frekanslarına göre üç gruba ayrılmıştır. İlaç direnciyle ilişkili mutasyon içermeyen sekanslar DRM yok, %15 eşik değeri altında DRM görülenler düşük frekans grubu ve %15 eşik değeri üzerinde DRM görülenler yüksek frekans grubu olarak sınıflandırılmıştır. Üç grup arasında CD4+ T hücre sayılarında istatistiksel farklılık bulunmuştur [246]. Bizim çalışmamızda ise DRM frekans gruplarının CD4+ sayıları ve viral yük ortalamaları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır

Günümüze kadar yapılan araştırmalarda düşük frekanslı DRM'lerin klinik önemi henüz tam olarak netleştirilmesede, bu mutasyonların tedavi başarısızlığına neden olabileceği çalışmalarda gösterilmiştir. Metzner ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, yeni tanı almış ve tedavinin başlanmasından önce %0,07-2 arasında değişen sıklıkta ilaca dirençli virüsleri barındıran hastaların, birinci basamak antiretroviral tedavi rejimini takiben viral yük değerlerinin azalmadığı gözlenmiştir [252]. Li ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, düşük frekanslı mutasyonların varlığında, antiretroviral tedavide artan viral yük değerleri arasında ilişki olduğu gözlenmiştir. Bu konuyla ilişkili araştırmaların derlenerek, sistematik değerlendirmesinin yapıldığı bu çalışmada, viral yük değerlerindeki artış riskinin, %0,5 altındaki frekanslarda gözlenen mutasyonlarla dahi ilişkili olabileceği düşünülmüştür [253].

Ülkemizde HIV genotiplendirmesinde yeni nesil dizileme yönteminin değerlendirildiği tek çalışma mevcuttur. Türkiye’de yapılan HIV genotiplendirme araştırmalarında Sanger dizileme yöntemi kullanılmıştır. Ülkemizdeki Sanger dizilemeyle yapılan genotiplendirme araştırmalarının verileri, bizim çalışmamızda YND %1 eşik değeri de saptanan DRM verileriyle karşılaştırıldığında, çalışmamızda tespit edilen DRM oranları daha yüksek olduğu gözlenmiştir (En az bir ilaç grubunda DRM tespit edilen 22/47, %46,8; PI DRM tespit edilen 9/47, %19,1, NRTI DRM tespit edilen 13/47, %27,7; NNRTI DRM tespit edilen 9/47, %19,2). Bu farklılık, YND’nin %15-20 eşik değeri altında düşük frekanslı DRM’lerin tespitinde Sanger dizilemeye üstün olmasıyla açıklanabilir. Yeni dizileme teknolojilerinin ülkemizde de yaygınlaşmasıyla, HIV genotiplendirme araştırmalardan elde edilen verilerin daha iyi anlaşılacağı ve hastaların klinik yönetiminde ilerlemeler kaydedileceği düşünülmektedir.

Örneklerimizde bulunan, PI DRM grubunda olan M46I/L mutasyonunun TPV (Tipranavir) ve ATV (Atazanavir) direnciyle ilişkili olduğu bilinmektedir. Tipranavir ülkemizde

preparatı bulunan antiretroviral ilaçlar arasında değildir. Ritonavirle birlikte kombinasyon halinde daha önce tedavi almış hastalarda ve çoklu PI direnci gelişmiş hastalarda tercih edilmektedir. Atazanavir ise tek başına veya kombine olarak, ilk kez tedavi alacak ya da tedavi tecrübesi olan kişilerde tercih edilen bir ilaçtır [254]. Benzer şekilde, PI DRM grubunda örneklerimizde tespit edilen I54T ve N88D mutasyonlarının ülkemizde preparatı bulunmayan NFV (Nelfinavir) direnciyle ilişkili olduğu bilinmektedir.

Örneklerimizde tespit edilen NNRTI DRM'leri olan E138G, Y181C/Y ve G190E/V mutasyonları RPV (Rilpivirin) direnciyle ilişkili olduğu bilinmektedir. Rilpivirine direnç tek bir NNRTI DRM varlığında gelişmemekle birlikte, Rilpivirin direnciyle ilişkili en sık görülen DRM, tüm NNRTI'lara çapraz direnç geliştiren E138K'dır [255]. Ülkemizde tedavide kullanılmayan antiretroviral preparatlar, bazı mutasyonların aynı ilaç grubu içerisinde çok sayıda ilaca çapraz dirence neden olması, bulaşan ilaç direnci ve HIV pozitif pediatrik grup göz önünde bulundurulduğunda, HIV genotiplendirme testlerinin rutin testler arasında yer almasının gerekliliği ön plana çıkmaktadır.

Ülkemizde yapılan HIV tiplendirme araştırmalarında ve bizim çalışmamızda tüm genom dizi analizi yerine, *pol* gen bölgesinin proteaz ve ters transkriptaz kısımlarını kapsayan diziler kullanılmıştır. HIV genomunun dinamik karakteri düşünüldüğünde, tiplendirme ve filogenetik değerlendirmelerde, kısa gen bölgelerini kullanmak yerine, tam genom dizilerini kullanmanın daha sağlıklı değerlendirme sonuçları vereceğini düşünmekteyiz. Daha önce yapılan bir araştırmada HIV rekombinant formlarına ait dizilerin dahil edildiği klasik filogenetik ağaç değerlendirmelerinin doğru sonuçlar vermediği gözlenmiştir [256]. HIV/AIDS İspanyol Araştırma Ağı'nda (CoRIS) tedavi almamış bir hasta kohortunda HIV-1 *pol* dizileri kullanarak yapılan, tiplendirme araçlarının ve filogenetik analizin güvenilirliğinin değerlendirildiği bir çalışmada, tiplendirmede kullanılan araçların alt tip B'yi doğru bir şekilde tanımladığı, ancak B alt tipi olmayan tipler ve rekombinant formların %15 oranında yanlış tanımlanmadığı bildirilmiştir [257]. Çalışmamızda ve Türkiye'de yapılan diğer HIV tiplendirme araştırmalarında rekombinant formların varlığı düşünüldüğünde, gelecekte yapılacak olan moleküler epidemiyolojik temelli araştırmalarda, tam genom dizilerinin kullanılarak viral sınıflandırmayı iyileştirmeye yönelik çalışmaların yapılması gerekliliğini vurgulamak istiyoruz.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

HIV pozitif bireylerde virüsün genetik karakterizasyonu ortaya koymak, virüsün bulaşma dinamiklerini izlemek için önemlidir. Araştırmamızda HIV-1 pozitif hastalarda, virüsün tiplendirmesi yapılmıştır. Örneklerimizde B alt tipinin baskın olduğu gözlenmiştir. B alt tipinin yanında, diğer alt tipler ve rekombinant formlar gözlenmiştir. Rekombinant formlar içinde daha önce Türkiye’de bildirimi yapılmayan bir tip bulunmuştur. Çalışmamızdan elde edilen verilerin ve Türkiye’de HIV tiplendirmesi üzerine daha önceki yıllarda yapılan araştırmalarının ışığında, ülkemizde dolaşan HIV alt tiplerinin oranlarında dinamik bir değişimin olduğu ve ilerleyen zamanlarda, ülkemizdeki hızlı demografik değişimin etkisiyle, HIV viral populasyonunda yeni tiplerin ve rekombinant formların gözleneceğini düşünmekteyiz. HIV alt tipi dağılımındaki dinamik değişim, tanı ve tedavi yaklaşımlarının uygulanmasında gelecekte bizi daha zorlu bir sürecin beklediğini göstermektedir. Rekombinant formların sayısındaki artış, farklı HIV viral suşları ile koenfeksiyon artışıyla sonuçlanmaktadır ve viral suşların yakın takibi için etkin olarak kullanılan sürveyans sistemlerine ihtiyaç vardır.

Sanger dizileme, HIV ilaç direnci profillerinin belirlenmesinde en sık kullanılan genotiplendirme yöntemidir. Fakat, Sanger dizilemenin dezavantajı, %15-20 eşik değer altındaki düşük frekanslı ilaç direnci mutasyonlarını tespit edememesidir. Çalışmamızda yeni nesil dizileme ile HIV genotiplendirmede, %1 eşik değer kullanıldığında, tespit edilen mutasyon sayılarında Sanger dizilemeyle karşılaştırıldığında artış gözlenmiştir. Yeni nesil dizileme %1 eşik değerde, 22 örnekte (%46,8) en az bir ilaca direnç, proteaz inhibitörlerine 9 örnekte (%19,1), nükleozid ters transkriptaz inhibitörlerine 13 örnekte (%27,7) ve nükleozid olmayan ters transkriptaz inhibitörlerine 9 örnekte (%19,2) direnç mutasyonları görülmüştür. Özellikle, yeni nesil dizilemenin %5 eşik değerinin altında DRM sayısında oldukça keskin bir artış gözlenmiştir.

Çalışmamız, HIV pozitif hastaların klinik yönetiminde ve tedavi rejimlerinin belirlenmesinde, Sanger dizilemenin yerini alabilecek, yeni nesil dizilemeye dayalı bir HIV genotiplendirme test protokolünün doğrulanmasını ve uygulanabilirliğini gösterir nitelikte bir araştırmadır. Yeni nesil dizileme, %20 eşik değer altında bulunan direnç ilişkili mutasyonların tespitini potansiyel olarak artırsa da bu artan tespit düzeyinin klinik önemi henüz bilinmemektedir. Düşük frekanslı ilaç direnci mutasyonlarının klinik önemini

anlamak için, özellikle düşük genetik bariyere sahip, dirençle ilişkisi yüksek olan, klinikte kullanımı yaygın olan antiretroviral ilaçların değerlendirmelerinin yapıldığı ve çalışmaya dahil edilen kişilerin ayrıntılı klinik özgeçmişlerinin de dahil edildiği, daha çok sayıda katılımcının bulunduğu araştırmalara gereksinim vardır.



KAYNAKLAR

1. Fanales-Belasio, E., Raimondo, M., SuligoI., B., & Buttò, S. (2010). HIV virology and pathogenetic mechanisms of infection: A brief overview. In *Annali dell'Istituto Superiore di Sanita*, 46(1), 5–14. Ann Ist Super Sanita. <https://doi.org/10.4415/ANN-10-01-02>
2. Internet: HIV/AIDS. 15 Mart 2021 tarihinde, adresinden erişildi <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hiv-aids>
3. İnternet: HIV/AIDS İstatistik. 15 Mart 2021 tarihinde, adresinden erişildi, <https://hsgm.saglik.gov.tr/tr/bulasici-hastaliklar/hiv-aids/hiv-aids-liste/hiv-aids-istatistik.html>
4. Branson, B. M., Owen, S. M., Wesolowski, L. G., Bennett, B., Werner, B. G., Wroblewski, K. E., and Pentella, M. A. (n.d.). *Laboratory testing for the diagnosis of HIV infection : updated recommendations* (C. for D. C. and P. (U.S.), A. of P. H. Laboratories., & V. H. National Center for HIV/AIDS and TB Prevantion (U.S.). Division of HIV/AIDS Prevantion. (Eds.)). <http://dx.doi.org/10.15620/cdc.23447>. <https://stacks.cdc.gov/view/cdc/23447>
5. İnternet: National Center for HIV/AIDS and TB Prevantion (U.S.). Division of HIV/AIDS Prevantion., V. H., & Laboratories., A. of P. H. (Eds.). (n.d.). *2018 Quick reference guide: Recommended laboratory HIV testing algorithm for serum or plasma specimens*. <https://stacks.cdc.gov/view/cdc/50872>
6. Lecher, S., Williams, J., Fonjungo, P. N., Kim, A. A., Ellenberger, D., Zhang, G., Toure, C. A., Agolory, S., Appiah-Pippim, G., Beard, S., Borget, M. Y., Carmona, S., Chipungu, G., Diallo, K., Downer, M., Edgil, D., Haberman, H., Hurlston, M., Jadzak, S., ... Nkengasong, J. (2016). Progress with Scale-Up of HIV Viral Load Monitoring — Seven Sub-Saharan African Countries, January 2015–June 2016. *MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report*, 65(47), 1332–1335.
7. World Health Organization. Consolidated guidelines on the use of antiretroviral drugs for treating and prevanting HIV infection : recommendations for a public health approach. 429 s.
8. Ajose, O., Mookerjee, S., Mills, E. J., Boulle, A., & Ford, N. (2012). Treatment outcomes of patients on second-line antiretroviral therapy in resource-limited settings. *AIDS*, 26(8), 929–938. <https://doi.org/10.1097/QAD.0b013e328351f5b2>
9. İnternet: Global HIV & AIDS statistics — 2020 fact sheet | UNAIDS. 23 Şubat 2021 tarihinde, adresinden erişildi <https://www.unaids.org/en/resources/fact-sheet>
10. Clutter, D. S., Jordan, M. R., Bertagnolio, S., and Shafer, R. W. (2016). HIV-1 drug resistance and resistance testing. In *Infection, Genetics and Evolution* (Vol. 46, pp. 292–307). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.08.031>
11. Gibson, R. M., Schmotzer, C. L., and Quiñones-Mateu, M. E. (2014). Next-generation sequencing to help monitor patients infected with HIV: Ready for clinical use? İçinde

- Current Infectious Disease Reports* (C. 16, Sayı 4, ss. 1–9). Current Medicine Group LLC 1. <https://doi.org/10.1007/s11908-014-0401-5>
12. Estill, J., Ford, N., Salazar-Vizcaya, L., Haas, A. D., Blaser, N., Habiyambere, V., and Keiser, O. (2016). The need for second-line antiretroviral therapy in adults in sub-Saharan Africa up to 2030: a mathematical modelling study. *The Lancet HIV*, 3(3), e132–e139. [https://doi.org/10.1016/S2352-3018\(16\)00016-3](https://doi.org/10.1016/S2352-3018(16)00016-3)
 13. Mardis, E. R. (2013). Next-Generation Sequencing Platforms. *Annual Review of Analytical Chemistry*, 6(1), 287–303. <https://doi.org/10.1146/annurev-anchem-062012-092628>
 14. Koboldt, D. C., Steinberg, K. M., Larson, D. E., Wilson, R. K., and Mardis, E. R. (2013). The Next-Generation Sequencing Revolution and Its Impact on Genomics. *Cell*, 155(1), 27–38. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.09.006>
 15. Sharp, P. M., Bailes, E., Chaudhuri, R. R., Rodenburg, C. M., Santiago, M. O., and Hahn, B. H. (2001). The origins of acquired immune deficiency syndrome viruses: Where and when? *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 356(1410), 867–876. <https://doi.org/10.1098/rstb.2001.0863>
 16. Gottlieb, M. S. (2006). Pneumocystis pneumonia--Los Angeles. 1981. *American Journal of Public Health*, 96(6), 980. <https://doi.org/10.2105/ajph.96.6.980>
 17. A cluster of Kaposi's sarcoma and Pneumocystis carinii pneumonia among homosexual male residents of Los Angeles and Orange Counties, California. (1982). *MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report*, 31(23), 305–307.
 18. De Cock, K. M., Jaffe, H. W., and Curran, J. W. (2012). The evolving epidemiology of HIV/AIDS. *AIDS*, 26(10), 1205–1213. <https://doi.org/10.1097/QAD.0b013e328354622a>
 19. Zhu, T., Korber, B. T., Nahmias, A. J., Hooper, E., Sharp, P. M., and Ho, D. D. (1998). An African HIV-1 sequence from 1959 and implications for the of the epidemic. *Nature*, 391(6667), 594–597. <https://doi.org/10.1038/35400>
 20. Barré-Sinoussi, F., Chermann, J. C., Rey, F., Nugeyre, M. T., Chamaret, S., Gruest, J., Dautuet, C., Axler-Blin, C., Vézinet-Brun, F., Rouzioux, C., Rozenbaum, W., and Montagnier, L. (1983). Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science*, 220(4599), 868–871. <https://doi.org/10.1126/science.6189183>
 21. Popovic, M., Sarngadharan, M. G., Read, E., and Gallo, R. C. (1984). Detection, isolation, and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS. *Science*, 224(4648), 497–500. <https://doi.org/10.1126/science.6200935>
 22. Gallo, R. C., Salahuddin, S. Z., Popovic, M., Shearer, G. M., Kaplan, M., Haynes, B. F., Palker, T. J., Redfield, R., Oleske, J., Safai, B., White, G., Foster, P., and Markham, P. D. (1984). Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science*, 224(4648), 500–503. <https://doi.org/10.1126/science.6200936>

23. Schüpbach, J., Popovic, M., Gilden, R. V., Gonda, M. A., Sarngadharan, M. G., and Gallo, R. C. (1984). Serological analysis of a subgroup of human T-lymphotropic retroviruses (HTLV-III) associated with AIDS. *Science*, 224(4648), 503–505. <https://doi.org/10.1126/science.6200937>
24. Sarngadharan, M. G., Popovic, M., Bruch, L., Schüpbach, J., and Gallo, R. C. (1984). Antibodies reactive with human T-lymphotropic retroviruses (HTLV-III) in the serum of patients with AIDS. *Science*, 224(4648), 506–508. <https://doi.org/10.1126/science.6324345>
25. Roberts, B. D. (1994). HIV antibody testing methods: 1985-1988. *Journal of Insurance Medicine (New York, N.Y.)*, 26(1), 13–14.
26. Dalgleish, A. G., Beverley, P. C. L., Clapham, P. R., Crawford, D. H., Greaves, M. F., and Weiss, R. A. (1984). The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature*, 312(5996), 763–767. <https://doi.org/10.1038/312763a0>
27. Klatzmann, D., Champagne, E., Chamaret, S., Gruest, J., Guetard, D., Hercend, T., Gluckman, J. C., and Montagnier, L. (1984). T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV. *Nature*, 312(5996), 767–768. <https://doi.org/10.1038/312767a0>
28. Clavel, F., Guétard, D., Brun-Vézinet, F., Chamaret, S., Rey, M. A., Santos-Ferreira, M. O., Laurent, A. G., Dauguet, C., Katlama, C., Rouzioux, C., Klatzmann, D., Champalimaud, J. L., and Montagnier, L. (1986). Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. *Science*, 233(4761), 343–346. <https://doi.org/10.1126/science.2425430>
29. Mondal, D. (2016). Zidovudine (azidothymidine AZT)☆. İçinde *Reference Module in Biomedical Sciences*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-801238-3.99390-5>
30. Carpenter, C. (1996). Antiretroviral Therapy for HIV Infection in 1996: Recommendations of an International Panel. *JAMA*, 276(2), 146–154. <https://doi.org/10.1001/jama.1996.03540020068031>
31. Van Lelyveld, S. F. L., Wind, C. M., Mudrikova, T., Van Leeuwen, H. J., De Lange, D. W., and Hoepelman, A. I. M. (2011). Short- and long-term outcome of HIV-infected patients admitted to the intensive care unit. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 30(9), 1085–1093. <https://doi.org/10.1007/s10096-011-1196-z>
32. Motomura, K., Chen, J., and Hu, W.-S. (2008). Genetic Recombination between Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) and HIV-2, Two Distinct Human Lentiviruses. *Journal of Virology*, 82(4), 1923–1933. <https://doi.org/10.1128/jvi.01937-07>
33. Campbell-Yesufu, O. T., and Gandhi, R. T. (2011). Update on human immunodeficiency virus (HIV)-2 infection. *Clinical Infectious Diseases*, 52(6), 780–787. <https://doi.org/10.1093/cid/ciq248>

34. Vijayan, K. V., Karthigeyan, K. P., Tripathi, S. P., and Hanna, L. E. (2017). Pathophysiology of CD4⁺ T-Cell depletion in HIV-1 and HIV-2 infections. İçinde *Frontiers in Immunology* (C. 8, Sayı may, s. 580). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00580>
35. Keele, B. F., Van Heuverswyn, F., Li, Y., Bailes, E., Takehisa, J., Santiago, M. L., Bibollet-Ruche, F., Chen, Y., Wain, L. V., Liegeois, F., Loul, S., Ngole, E. M., Bienvenue, Y., Delaporte, E., Brookfield, J. F. Y., Sharp, P. M., Shaw, G. M., Peeters, M., and Hahn, B. H. (2006). Chimpanzee reservoirs of pandemic and nonpandemic HIV-1. *Science*, 313(5786), 523–526. <https://doi.org/10.1126/science.1126531>
36. Santiago, M. L., Range, F., Keele, B. F., Li, Y., Bailes, E., Bibollet-Ruche, F., Fruteau, C., Noë, R., Peeters, M., Brookfield, J. F. Y., Shaw, G. M., Sharp, P. M., and Hahn, B. H. (2005b). Simian Immunodeficiency Virus Infection in Free-Ranging Sooty Mangabeys (*Cercocebus atys atys*) from the Taï Forest, Côte d'Ivoire: Implications for the Origin of Epidemic Human Immunodeficiency Virus Type 2. *Journal of Virology*, 79(19), 12515–12527. <https://doi.org/10.1128/jvi.79.19.12515-12527.2005>
37. Robertson, D. L. (2000). HIV-1 Nomenclature Proposal. *Science*, 288(5463), 55d – 55. <https://doi.org/10.1126/science.288.5463.55d>
38. V Visseaux, B., Damond, F., Matheron, S., Descamps, D., and Charpentier, C. (2016). Hiv-2 molecular epidemiology. *Infection, Genetics and Evolution*, 46, 233–240. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.08.010>
9. Santiago, M. L., Range, F., Keele, B. F., Li, Y., Bailes, E., Bibollet-Ruche, F., Fruteau, C., Noë, R., Peeters, M., Brookfield, J. F. Y., Shaw, G. M., Sharp, P. M., and Hahn, B. H. (2005a). Simian Immunodeficiency Virus Infection in Free-Ranging Sooty Mangabeys (*Cercocebus atys atys*) from the Taï Forest, Côte d'Ivoire: Implications for the Origin of Epidemic Human Immunodeficiency Virus Type 2. *Journal of Virology*, 79(19), 12515–12527. <https://doi.org/10.1128/jvi.79.19.12515-12527.2005>
40. Marx, P. A., Alcabes, P. G., and Drucker, E. (2001). Serial human passage of simian immunodeficiency virus by unsterile injections and the emergence of epidemic human immunodeficiency virus in Africa. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 356(1410), 911–920. <https://doi.org/10.1098/rstb.2001.0867>
41. Delaunay, C., De Oliveira, F., Lascoux-Combe, C., Plantier, J. C., and Simon, F. (2011). HIV-1 group N: Travelling beyond Cameroon. *The Lancet*, 378(9806), 1894. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)61457-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)61457-8)
42. Gürtler, L. G., Zekeng, L., Tsague, J. M., Von Brunn, A., Afane Ze, E., Eberle, J., and Kaptue, L. (1996). HIV-1 subtype O: Epidemiology, pathogenesis, diagnosis, and perspectives of the evolution of HIV. *Archives of Virology, Supplement*, 1996(11), 195–202. https://doi.org/10.1007/978-3-7091-7482-1_17
43. Vallari, A., Holzmayer, V., Harris, B., Yamaguchi, J., Ngansop, C., Makamche, F., Mbanya, D., Kaptue, L., Ndambi, N., Gurtler, L., Devare, S., and Brennan, C. A. (2011). Confirmation of Putative HIV-1 Group P in Cameroon. *Journal of Virology*, 85(3), 1403–1407. <https://doi.org/10.1128/jvi.02005-10>

44. Plantier, J. C., Leoz, M., Dickerson, J. E., De Oliveira, F., Cordonnier, F., Lemée, V., Damond, F., Robertson, D. L., and Simon, F. (2009). A new human immunodeficiency virus derived from gorillas. *Nature Medicine*, 15(8), 871–872. <https://doi.org/10.1038/nm.2016>
45. McCutchan, F. E. (2006). Global epidemiology of HIV. *Journal of Medical Virology*, 78(S1), S7–S12. <https://doi.org/10.1002/jmv.20599>
46. Huang, A., Hogan, J. W., Istrail, S., Delong, A., Katzenstein, D. A., and Kantor, R. (2012). Global analysis of sequence diversity within HIV-1 subtypes across geographic regions. İçinde *Future Virology* (C. 7, Sayı 5, ss. 505–517). NIH Public Access. <https://doi.org/10.2217/fvl.12.37>
47. Bbosa, N., Kaleebu, P., and Ssemwanga, D. (2019). HIV subtype diversity worldwide. *Current Opinion in HIV and AIDS*, 14(3), 153–160. <https://doi.org/10.1097/COH.0000000000000534>
48. İnternet: *HIV Databases*. (y.y.). İndex Tarihinde 15 Mart 2021, adresinden erişildi <https://www.hiv.lanl.gov/content/index>
49. Gao, F., Robertson, D. L., Morrison, S. G., Hui, H., Craig, S., Decker, J., Fultz, P. N., Girard, M., Shaw, G. M., Hahn, B. H., and Sharp, P. M. (1996). The heterosexual human immunodeficiency virus type 1 epidemic in Thailand is caused by an intersubtype (A/E) recombinant of African origin. *Journal of Virology*, 70(10), 7013–7029. <https://doi.org/10.1128/jvi.70.10.7013-7029.1996>
50. Carr, J. K., Salminen, M. O., Koch, C., Gotte, D., Artenstein, A. W., Hegerich, P. A., St Louis, D., Burke, D. S., and McCutchan, F. E. (1996). Full-length sequence and mosaic structure of a human immunodeficiency virus type 1 isolate from Thailand. *Journal of virology*, 70(9), 5935–5943. <https://doi.org/10.1128/jvi.70.9.5935-5943.1996>
51. Murphy, E., Korber, B., Georges-Courbot, M. C., You, B., Pinter, A., Cook, D., Kieny, M. P., Georges, A., Mathiot, C., Barré-Sinoussi, F., and Girard, M. (1993). Diversity of V3 Region Sequences of Human Immunodeficiency Viruses Type 1 from the Central African Republic. *AIDS Research and Human Retroviruses*, 9(10), 997–1006. <https://doi.org/10.1089/aid.1993.9.997>
52. Gao, Feng, Robertson, D. L., Carruthers, C. D., Li, Y., Bailes, E., Kostrikis, L. G., Salminen, M. O., Bibollet-Ruche, F., Peeters, M., Ho, D. D., Shaw, G. M., Sharp, P. M., and Hahn, B. H. (1998). An Isolate of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Originally Classified as Subtype I Represents a Complex Mosaic Comprising Three Different Group M Subtypes (A, G, and I). *Journal of Virology*, 72(12), 10234–10241. <https://doi.org/10.1128/jvi.72.12.10234-10241.1998>
53. Nasioulas, G., Paraskevis, D., Magiorkinis, E., Theodoridou, M., and Hatzakis, A. (1999). Molecular analysis of the full-length genome of HIV type 1 subtype I: Evidence of A/G/I recombination. *AIDS Research and Human Retroviruses*, 15(8), 745–758. <https://doi.org/10.1089/088922299310836>

54. Paraskevic, D., Magiorkinis, M., Vandamme, A. M., Kostrikis, L. G., and Hatzakis, A. (2001). Re-analysis of human immunodeficiency virus type 1 isolates from Cyprus and Greece, initially designated “subtype I”, reveals a unique complex A/G/H/K/? mosaic pattern. *Journal of General Virology*, 82(3), 575–580. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-82-3-575>
55. Richard A. Harvey (Ph.D.). (2007). *Lippincott's Illustrated Reviews: Microbiology*. Lippincott's Illustrated Reviews (B. D. F. (M. D. . Pamela C. Champe (Ed.); Second edi).
56. Pornillos, O., Ganser-Pornillos, B. K., and Yeager, M. (2011). Atomic-level modelling of the HIV capsid. *Nature*, 469(7330), 424–427. <https://doi.org/10.1038/nature09640>
57. Wilen, C. B., Tilton, J. C., and Doms, R. W. (2012). HIV: cell binding and entry. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(8). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006866>
58. Sarafianos, S. G., Das, K., Tantillo, C., Clark, A. D., Ding, J., Whitcomb, J. M., Boyer, P. L., Hughes, S. H., and Arnold, E. (2001). Crystal structure of HIV-1 reverse transcriptase in complex with a polypurine tract RNA:DNA. *EMBO Journal*, 20(6), 1449–1461. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.6.1449>
59. Chen, J. C., Krucinski, J., Miercke, L. J., Finer-Moore, J. S., Tang, A. H., Leavitt, A. D., and Stroud, R. M. (2000). Crystal structure of the HIV-1 integrase catalytic core and C-terminal domains: a model for viral DNA binding. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(15), 8233–8238. <https://doi.org/10.1073/pnas.150220297>
60. Kim, E. E., Baker, C. T., Dwyer, M. D., Murcko, M. A., Rao, B. G., Tung, R. D., and Navia, M. A. (1995). Crystal structure of HIV-1 protease in complex with VX-478, a potent and orally bioavailable inhibitor of the enzyme. *Journal of the American Chemical Society*, 117(3), 1181–1182. <https://doi.org/10.1021/ja00108a056>
61. Hill, C. P., Worthylake, D., Bancroft, D. P., Christensen, A. M., and Sundquist, W. I. (1996). Crystal structures of the trimeric human immunodeficiency virus type 1 matrix protein: implications for membrane association and assembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(7), 3099–3104. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.7.3099>
62. Pornillos, O., Ganser-Pornillos, B. K., Kelly, B. N., Hua, Y., Whitby, F. G., Stout, C. D., Sundquist, W. I., Hill, C. P., and Yeager, M. (2009). X-ray structures of the hexameric building block of the HIV capsid. *Cell*, 137(7), 1282–1292. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.04.063>
63. Caffrey, M., Cai, M., Kaufman, J., Stahl, S. J., Wingfield, P. T., Covell, D. G., Gronenborn, A. M., and Clore, G. M. (1998). Three-dimensional solution structure of the 44 kDa ectodomain of SIV gp41. *The EMBO Journal*, 17(16), 4572–4584. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.16.4572>

64. Park, S. H., Mrse, A. A., Nevzorov, A. A., Mesleh, M. F., Oblatt-Montal, M., Montal, M., and Opella, S. J. (2003). Three-dimensional Structure of the Channel-forming Trans-membrane Domain of Virus Protein “u” (Vpu) from HIV-1. *Journal of Molecular Biology*, 333(2), 409–424. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jmb.2003.08.048>
65. Willbold, D., Hoffmann, S., and Rösch, P. (1997). Secondary Structure and Tertiary Fold of the Human Immunodeficiency Virus Protein U (Vpu) Cytoplasmic Domain in Solution. *European Journal of Biochemistry*, 245(3), 581–588. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1997.t01-1-00581.x>
66. Stanley, B. J., Ehrlich, E. S., Short, L., Yu, Y., Xiao, Z., Yu, X.-F., and Xiong, Y. (2008). Structural insight into the human immunodeficiency virus Vif SOCS box and its role in human E3 ubiquitin ligase assembly. *Journal of Virology*, 82(17), 8656–8663. <https://doi.org/10.1128/JVI.00767-08>
67. Wecker, K., Morellet, N., Bouaziz, S., and Roques, B. P. (2002). NMR structure of the HIV-1 regulatory protein Vpr in H₂O/trifluoroethanol. *European Journal of Biochemistry*, 269(15), 3779–3788. <https://doi.org/https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2002.03067.x>
68. Geyer, M., Munte, C. E., Schorr, J., Kellner, R., and Kalbitzer, H. R. (1999). Structure of the anchor-domain of myristoylated and non-myristoylated HIV-1 Nef protein11Edited by A. R. Fersht. *Journal of Molecular Biology*, 289(1), 123–138. <https://doi.org/https://doi.org/10.1006/jmbi.1999.2740>
69. Battiste, J. L., Mao, H., Rao, N. S., Tan, R., Muhandiram, D. R., Kay, L. E., Frankel, A. D., and Williamson, J. R. (1996). α Helix-RNA major groove recognition in an HIV-1 Rev peptide-RRE RNA complex. *Science*, 273(5281), 1547–1551. <https://doi.org/10.1126/science.273.5281.1547>
70. Arold, S., Franken, P., Strub, M. P., Hoh, F., Benichou, S., Benarous, R., and Dumas, C. (1997). The crystal structure of HIV-1 Nef protein bound to the Fyn kinase SH3 domain suggests a role for this complex in altered T cell receptor signaling. *Structure*, 5(10), 1361–1372. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(97\)00286-4](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(97)00286-4)
71. De Guzman, R. N., Wu, Z. R., Stalling, C. C., Pappalardo, L., Borer, P. N., and Summers, M. F. (1998). Structure of the HIV-1 nucleocapsid protein bound to the SL3 ψ -RNA recognition element. *Science*, 279(5349), 384–388. <https://doi.org/10.1126/science.279.5349.384>
72. Kwong, P. D., Wyatt, R., Majeed, S., Robinson, J., Sweet, R. W., Sodroski, J., and Hendrickson, W. A. (2000). Structures of HIV-1 gp120 envelope glycoproteins from laboratory-adapted and primary isolates. *Structure*, 8(12), 1329–1339. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(00\)00547-5](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(00)00547-5)

73. Péloponèse, J. M., Grégoire, C., Opi, S., Esquieu, D., Sturgis, J., Lebrun, É., Meurs, É., Collette, Y., Olive, D., Aubertin, A. M., Witvrow, M., Pannecouque, C., De Clercq, E., Bailly, C., Lebreton, J., and Loret, E. P. (2000). ^1H - ^{13}C nuclear magnetic resonance assignment and structural characterization of HIV-1 Tat protein. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences - Serie III*, 323(10), 883–894. [https://doi.org/10.1016/S0764-4469\(00\)01228-2](https://doi.org/10.1016/S0764-4469(00)01228-2)
74. Berman, H. M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T. N., Weissig, H., Shindyalov, I. N., and Bourne, P. E. (2000). The Protein Data Bank. *În: Nucleic Acids Research* (C. 28, Sayı 1, ss. 235–242). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.235>
75. Zhu, P., Liu, J., Bess, J., Chertova, E., Lifson, J. D., Grisé, H., Ofek, G. A., Taylor, K. A., and Roux, K. H. (2006). Distribution and three-dimensional structure of AIDS virus envelope spikes. *Nature*, 441(7095), 847–852. <https://doi.org/10.1038/nature04817>
76. Julien, J. P., Cupo, A., Sok, D., Stanfield, R. L., Lyumkis, D., Deller, M. C., Klasse, P. J., Burton, D. R., Sanders, R. W., Moore, J. P., Ward, A. B., and Wilson, I. A. (2013). Crystal structure of a soluble cleaved HIV-1 envelope trimer. *Science*, 342(6165), 1477–1483. <https://doi.org/10.1126/science.1245625>
77. Goodsell, D. S. (2014). HIV Envelope Glycoprotein. *RCSB Protein Data Bank*. https://doi.org/10.2210/rcsb_pdb/mom_2014_1
78. Zhang, Z., Zhang, F., Bai, S., Qiao, J., Shen, H., Huang, F., Gao, S., Li, S., Gu, Y., and Xia, N. (2018). Characterization and epitope mapping of a panel of monoclonal antibodies against HIV-1 matrix protein. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 65(6), 807–815. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/bab.1662>
79. Zhao, G., Perilla, J. R., Yufenyuy, E. L., Meng, X., Chen, B., Ning, J., Ahn, J., Gronenborn, A. M., Schulten, K., Aiken, C., and Zhang, P. (2013). Mature HIV-1 capsid structure by cryo-electron microscopy and all-atom molecular dynamics. *Nature*, 497(7451), 643–646. <https://doi.org/10.1038/nature12162>
80. Monaco-Malbet, S., Berthet-Colominas, C., Novelli, A., Battaï, N., Piga, N., Cheynet, V., Mallet, F., and Cusack, S. (2000). Mutual conformational adaptations in antigen and antibody upon complex formation between an Fab and HIV-1 capsid protein p24. *Structure*, 8(10), 1069–1077. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(00\)00507-4](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(00)00507-4)
81. Goodsell, D. S. (2013). HIV Capsid. *RCSB Protein Data Bank*. https://doi.org/10.2210/rcsb_pdb/mom_2013_7
82. Mori, M., Kovalenko, L., Lonnais, S., Antaki, D., Torbett, B. E., Botta, M., Mirambeau, G., and Mély, Y. (2015). *Nucleocapsid Protein: A Desirable Target for Future Therapies Against HIV-1* BT - *The Future of HIV-1 Therapeutics: Resistance Is Futile?* (B. E. Torbett, D. S. Goodsell, and D. D. Richman (Ed.); ss. 53–92). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/82_2015_433
83. German Advisory Committee Blood (Arbeitskreis Blut), S. 'Assessment of P. T. by B. (2016). Human Immunodeficiency Virus (HIV). *Transfusion Medicine and Hemotherapy : Offizielles Organ Der Deutschen Gesellschaft Fur Transfusionsmedizin Und Immunhamatologie*, 43(3), 203–222. <https://doi.org/10.1159/000445852>

84. Foley Los Alamos, NM (United States)], B. T. [Los A. N. L. (LANL), Korber Los Alamos, NM (United States)], B. T. M. [Los A. N. L. (LANL), Leitner Los Alamos, NM (United States)], T. K. [Los A. N. L. (LANL), Apetrei Pittsburgh, PA (United States)], C. [Univ. of P., Hahn Philadelphia, PA (United States)], B. [Univ. of P., Mizrachi Bethesda, MD (United States)], I. [National C. for B. I., Mullins Seattle, WA (United States)], J. [Univ. of W., Rambaut Scotland (United Kingdom)], A. [Univ. of E., and Wolinsky Evanston, IL (United States)], S. [Northwestern U. (2018). *HIV Sequence Compendium 2018*. <https://doi.org/10.2172/1458915>
85. Adamson, C. S. (2012). Protease-Mediated Maturation of HIV: Inhibitors of Protease and the Maturation Process. *Molecular Biology International*, 2012, 604261. <https://doi.org/10.1155/2012/604261>
86. Hu, W. S., and Hughes, S. H. (2012). HIV-1 reverse transcription. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006882>
87. Rhee, S.-Y., Liu, T. F., Kiuchi, M., Zioni, R., Gifford, R. J., Holmes, S. P., and Shafer, R. W. (2008). Natural variation of HIV-1 group M integrase: Implications for a new class of antiretroviral inhibitors. *Retrovirology*, 5(1), 74. <https://doi.org/10.1186/1742-4690-5-74>
88. Engelman, A., and Cherepanov, P. (2015b). Retroviral Integrase Structure and DNA Recombination Mechanism. *İçinde Mobile DNA III* (C. 2, Sayı 6, ss. 1011–1033). American Society of Microbiology. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.mdna3-0024-2014>
89. Flexner, C. (1998). HIV-Protease Inhibitors. *New England Journal of Medicine*, 338(18), 1281–1293. <https://doi.org/10.1056/NEJM199804303381808>
90. Hornak, V., Okur, A., Rizzo, R. C., and Simmerling, C. (2006). HIV-1 protease flaps spontaneously open and reclose in molecular dynamics simulations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(4), 915–920. <https://doi.org/10.1073/pnas.0508452103>
91. McGillewie, L., Ramesh, M., and Soliman, M. E. (2017). Sequence, Structural Analysis and Metrics to Define the Unique Dynamic Features of the Flap Regions Among Aspartic Proteases. *The Protein Journal*, 36(5), 385–396. <https://doi.org/10.1007/s10930-017-9735-9>
92. Smerdon, S. J., Jäger, J., Wang, J., Kohlstaedt, L. A., Chirino, A. J., Friedman, J. M., Rice, P. A., and Steitz, T. A. (1994). Structure of the binding site for nonnucleoside inhibitors of the reverse transcriptase of human immunodeficiency virus type 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(9), 3911–3915. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.9.3911>
93. Goodsell, D. S. (2002). Reverse Transcriptase. *RCSB Protein Data Bank*. https://doi.org/10.2210/rcsb_pdb/mom_2002_9
94. Mishra, S. H., Shelley, C. M., Barrow, D. J., Darby, M. K., and Germann, M. W. (2006). Solution structures and characterization of human immunodeficiency virus Rev responsive element HB RNA targeting zinc finger proteins. *Biopolymers*, 83(4), 352–364. <https://doi.org/10.1002/bip.20565>

95. Li, W., Li, G., Steiner, J., and Nath, A. (2009). Role of Tat Protein in HIV Neuropathogenesis. *Neurotoxicity Research*, 16(3), 205–220. <https://doi.org/10.1007/s12640-009-9047-8>
96. Wilusz, J. (2013). Putting an ‘End’ to HIV mRNAs: capping and polyadenylation as potential therapeutic targets. *AIDS Research and Therapy*, 10(1), 31. <https://doi.org/10.1186/1742-6405-10-31>
97. Kao, S.-Y., Calman, A. F., Luciw, P. A., and Peterlin, B. M. (1987). Anti-termination of transcription within the long terminal repeat of HIV-1 by tat gene product. *Nature*, 330(6147), 489–493. <https://doi.org/10.1038/330489a0>
98. Goncalves, J., Silva, F., Freitas-Vieira, A., Santa-Marta, M., Malhó, R., Yang, X., Gabuzda, D., and Barbas, C. (2002). Functional neutralization of HIV-1 Vif protein by intracellular immunization inhibits reverse transcription and viral replication. *Journal of Biological Chemistry*, 277(35), 32036–32045. <https://doi.org/10.1074/jbc.M201906200>
99. Feng, Y., Love, R. P., and Chelico, L. (2013). HIV-1 Viral Infectivity Factor (Vif) Alters Processive Single-stranded DNA Scanning of the Retroviral Restriction Factor APOBEC3G*[S]. *Journal of Biological Chemistry*, 288(9), 6083–6094. <https://doi.org/https://doi.org/10.1074/jbc.M112.421875>
100. Le Rouzic, E., and Benichou, S. (2005). The Vpr protein from HIV-1: distinct roles along the viral life cycle. *Retrovirology*, 2(1), 11. <https://doi.org/10.1186/1742-4690-2-11>
101. González, M. E. (2015). Vpu Protein: The Viroporin Encoded by HIV-1. İçinde *Viruses* (C. 7, Sayı 8). <https://doi.org/10.3390/v7082824>
102. Casella, C. R., Rapaport, E. L., and Finkel, T. H. (1999). Vpu Increases Susceptibility of Human Immunodeficiency Virus Type 1-Infected Cells to Fas Killing. *Journal of Virology*, 73(1), 92 LP – 100. <https://doi.org/10.1128/JVI.73.1.92-100.1999>
103. Kirchhoff, F., Greenough, T. C., Brettler, D. B., Sullivan, J. L., and Desrosiers, R. C. (1995). Absence of Intact nef Sequences in a Long-Term Survivor with Nonprogressive HIV-1 Infection. *New England Journal of Medicine*, 332(4), 228–232. <https://doi.org/10.1056/NEJM199501263320405>
104. Das, S. R., and Jameel, S. (2005). Biology of the HIV Nef protein. *Indian Journal of Medical Research*, 121(4), 315-32.
105. Klaver, B., and Berkhout, B. (1994). Comparison of 5’ and 3’ Long Terminal Repeat Promoter Function in Human Immunodeficiency Virus. İçinde *JOURNAL OF VIROLOGY* (C. 68, Sayı 6). <http://jvi.asm.org/>
106. Amarasinghe, G. K., De Guzman, R. N., Turner, R. B., Chancellor, K. J., Wu, Z. R., and Summers, M. F. (2000). NMR structure of the HIV-1 nucleocapsid protein bound to stem-loop SL2 of the Ψ-RNA packaging signal. implications for genome recognition 11Edited by P. Wright. *Journal of Molecular Biology*, 301(2), 491–511. <https://doi.org/https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.3979>

107. Chen, C., and Montelaro, R. C. (2003). Characterization of RNA elements that regulate gag-pol ribosomal frameshifting in equine infectious anemia virus. *Journal of Virology*, 77(19), 10280–10287. <https://doi.org/10.1128/jvi.77.19.10280-10287.2003>
108. Olsen, H. S., Cochrane, A. W., and Rosen, C. (1992). Interaction of cellular factors with intragenic Cis-acting repressive sequences within the HIV genome. *Virology*, 191(2), 709–715. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0042-6822\(92\)90246-L](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0042-6822(92)90246-L)
109. İnternet: *HIV Replication Cycle* | NIH: National Institute of Allergy and Infectious Diseases. (y.y.). Tarihinde 22 Mart 2021, adresinden erişildi <https://www.niaid.nih.gov/diseases-conditions/hiv-replication-cycle>
110. Mzingwane, M. L., and Tiemessen, C. T. (2017). Mechanisms of HIV persistence in HIV reservoirs. İçinde *Reviews in Medical Virology* (C. 27, Sayı 2, s. e1924). John Wiley and Sons Ltd. <https://doi.org/10.1002/rmv.1924>
111. Li, Y., Deng, L., Yang, L.-Q., Sang, P., and Liu, S.-Q. (2019). Effects of CD4 Binding on Conformational Dynamics, Molecular Motions, and Thermodynamics of HIV-1 gp120. İçinde *International Journal of Molecular Sciences* (C. 20, Sayı 2). <https://doi.org/10.3390/ijms20020260>
112. Wyatt, R., Robinson, J., and Sodroski, J. (1998). Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody. *Nature*, 393, 648–659. <https://doi.org/10.2210/pdb1gc1/pdb>
113. Woodham, A. W., Skeate, J. G., Sanna, A. M., Taylor, J. R., Da Silva, D. M., Cannon, P. M., and Kast, W. M. (2016). Human Immunodeficiency Virus Immune Cell Receptors, Coreceptors, and Cofactors: Implications for Prevention and Treatment. *AIDS Patient Care and STDs*, 30(7), 291–306. <https://doi.org/10.1089/apc.2016.0100>
114. Keller, P. W., Morrison, O., Vassell, R., and Weiss, C. D. (2018). HIV-1 gp41 Residues Modulate CD4-Induced Conformational Changes in the Envelope Glycoprotein and Evolution of a Relaxed Conformation of gp120. *Journal of Virology*, 92(16), e00583-18. <https://doi.org/10.1128/JVI.00583-18>
115. Arhel, N. (2010). Revisiting HIV-1 uncoating. *Retrovirology*, 7(1), 96. <https://doi.org/10.1186/1742-4690-7-96>
116. Ganser-Pornillos, B. K., and Pornillos, O. (2019). Restriction of HIV-1 and other retroviruses by TRIM5. *Nature Reviews Microbiology*, 17(9), 546–556. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0225-2>
117. Gamble, T. R., Vajdos, F. F., Yoo, S., Worthylake, D. K., Houseweart, M., Sundquist, W. I., and Hill, C. P. (1996). Crystal structure of human cyclophilin A bound to the amino-terminal domain of HIV-1 capsid. *Cell*, 87(7), 1285–1294. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81823-1](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81823-1)
118. Biris, N., Yang, Y., Taylor, A. B., Tomashevski, A., Guo, M., Hart, P. J., Diaz-Griffero, F., and Ivanov, D. N. (2012). Structure of the rhesus monkey TRIM5α PRYSPRY domain, the HIV capsid recognition module. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(33), 13278–13283. <https://doi.org/10.1073/pnas.1203536109>

119. Hu, W.-S., and Hughes, S. H. (2012). HIV-1 reverse transcription. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(10), a006882. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006882>
120. Ding, J., Das, K., Hsiou, Y., Sarafianos, S. G., Clark, A. D., Jacobo-Molina, A., Tantillo, C., Hughes, S. H., and Arnold, E. (1998). Structure and functional implications of the polymerase active site region in a complex of HIV-1 RT with a double-stranded DNA template-primer and an antibody Fab fragment at 2.8 Å resolution. *Journal of Molecular Biology*, 284(4), 1095–1111. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1998.2208>
121. Engelman, A., and Cherepanov, P. (2015a). Retroviral Integrase Structure and DNA Recombination Mechanism. *İçinde Mobile DNA III* (C. 2, Sayı 6, ss. 1011–1033). American Society of Microbiology. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.mdna3-0024-2014>
122. Delelis, O., Carayon, K., Saïb, A., Deprez, E., and Mouscadet, J.-F. (2008). Integrase and integration: biochemical activities of HIV-1 integrase. *Retrovirology*, 5(1), 114. <https://doi.org/10.1186/1742-4690-5-114>
123. Maertens, G. N., Hare, S., and Cherepanov, P. (2010). The mechanism of retroviral integration from X-ray structures of its key intermediates. *Nature*, 468(7321), 326–329. <https://doi.org/10.1038/nature09517>
124. Goodsell, D. S. (2011). Integrase. *RCSB Protein Data Bank*. https://doi.org/10.2210/rcsb_pdb/mom_2011_3
125. Briggs, J. A. G., Simon, M. N., Gross, I., Kräusslich, H.-G., Fuller, S. D., Vogt, V. M., and Johnson, M. C. (2004). The stoichiometry of Gag protein in HIV-1. *Nature Structural and Molecular Biology*, 11(7), 672–675. <https://doi.org/10.1038/nsmb785>
126. Freed, E. O. (2015). HIV-1 assembly, release and maturation. *Nature Reviews. Microbiology*, 13(8), 484–496. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3490>
127. Haim, H., Salas, I., and Sodroski, J. (2013). Proteolytic Processing of the Human Immunodeficiency Virus Envelope Glycoprotein Precursor Decreases Conformational Flexibility. *Journal of Virology*, 87(3), 1884 LP – 1889. <https://doi.org/10.1128/JVI.02765-12>
128. Saffarian, S. (2021). Application of Advanced Light Microscopy to the Study of HIV and Its Interactions with the Host. *İçinde Viruses* (C. 13, Sayı 2). <https://doi.org/10.3390/v13020223>
129. Gupta, S., Bromley, J., and Saffarian, S. (2020). High-speed imaging of ESCRT recruitment and dynamics during HIV virus like particle budding. *PLOS ONE*, 15(9), e0237268. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0237268>
130. Kruize, Z., and Kootstra, N. A. (2019). The Role of Macrophages in HIV-1 Persistence and Pathogenesis. *İçinde Frontiers in Microbiology* (C. 10, s. 2828). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02828>

131. Rhodes, J. W., Tong, O., Harman, A. N., and Turville, S. G. (2019). Human dendritic cell subsets, ontogeny, and impact on HIV infection. İçinde *Frontiers in Immunology* (C. 10, Sayı MAY, s. 1088). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01088>
132. Vijayan, K. V., Karthigeyan, K. P., Tripathi, S. P., and Hanna, L. E. (2017). Pathophysiology of CD4+ T-Cell depletion in HIV-1 and HIV-2 infections. İçinde *Frontiers in Immunology* (C. 8, Sayı MAY, s. 580). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00580>
133. Viganò, S., Negrón, J. J., Tse, S., Chowdhury, F. Z., Lichterfeld, M., and Yu, X. G. (2017). HLA-G+ HIV-1-specific CD8+ T cells are associated with HIV-1 immune control. *AIDS (London, England)*, 31(2), 207–212. <https://doi.org/10.1097/QAD.0000000000001326>
134. Takata, H., Buranapraditkun, S., Kessing, C., Fletcher, J. L. K., Muir, R., Tardif, V., Cartwright, P., Vandergeeten, C., Bakeman, W., Nichols, C. N., Pinyakorn, S., Hansasuta, P., Kroon, E., Chalermchai, T., O'Connell, R., Kim, J., Phanuphak, N., Robb, M. L., Michael, N. L., and Trautmann, L. (2017). Delayed differentiation of potent effector CD8+ T cells reducing viremia and reservoir seeding in acute HIV infection. *Science Translational Medicine*, 9(377). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aag1809>
135. Ford, N., Meintjes, G., Vitoria, M., Greene, G., and Chiller, T. (2017). The evolving role of CD4 cell counts in HIV care. *Current Opinion in HIV and AIDS*, 12(2). https://journals.lww.com/co-hivandaids/Fulltext/2017/03000/The_evolving_role_of_CD4_cell_counts_in_HIV_care.5.aspx
136. Willey, S., Aasa-Chapman, M. M. I., O'Farrell, S., Pellegrino, P., Williams, I., Weiss, R. A., and Neil, S. J. D. (2011). Extensive complement-dependent enhancement of HIV-1 by autologous non-neutralising antibodies at early stages of infection. *Retrovirology*, 8(1), 16. <https://doi.org/10.1186/1742-4690-8-16>
137. Dashti, A., DeVico, A. L., Lewis, G. K., and Sajadi, M. M. (2019). Broadly Neutralizing Antibodies against HIV: Back to Blood. *Trends in Molecular Medicine*, 25(3), 228–240. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.molmed.2019.01.007>
138. Overbaugh, J., and Morris, L. (2012). The antibody response against HIV-1. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(1), a007039. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a007039>
139. Arcia, D., Acevedo-Sáenz, L., Rugeles, M. T., and Velilla, P. A. (2017). Role of CD8+ T Cells in the Selection of HIV-1 Immune Escape Mutations. *Viral Immunology*, 30(1), 3–12. <https://doi.org/10.1089/vim.2016.0095>
140. Seabright, G. E., Doores, K. J., Burton, D. R., and Crispin, M. (2019). Protein and Glycan Mimicry in HIV Vaccine Design. *Journal of Molecular Biology*, 431(12), 2223–2247. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.04.016>
141. *Sexual transmission of HIV | UNAIDS*. (y.y.). Tarihinde 23 Mart 2021, adresinden erişildi <https://www.unaids.org/en/keywords/sexual-transmission-hiv>

142. Unaid. UNAIDS Data 2020.
143. World Health Organization (2021). *Mother-to-child transmission of HIV*. (y.y.). Tarihinde 23 Mart 2021, adresinden erişildi <https://www.who.int/hiv/topics/mtct/about/en/>
144. World Health Organization (y.y.). *WHO case definitions of HIV for surveillance and revised clinical staging and immunological classification of HIV-related disease in adults and children*. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/43699>
145. Crowell, T. A., Colby, D. J., Pinyakorn, S., Fletcher, J. L. K., Kroon, E., Schuetz, A., Krebs, S. J., Slike, B. M., Leyre, L., Chomont, N., Jagodzinski, L. L., Sereti, I., Uday, N. S., Dewar, R., Rerknimitr, R., Chomchey, N., Trichavaroj, R., Valcour, V. G., Spudich, S., ... Ananworanich, J. (2018). Acute Retroviral Syndrome Is Associated With High Viral Burden, CD4 Depletion, and Immune Activation in Systemic and Tissue Compartments. *Clinical Infectious Diseases*, 66(10), 1540–1549. <https://doi.org/10.1093/cid/cix1063>
146. *Primary Care of Patients With HIV Infection: Overview, Components of HIV Care, Presenting Signs and Symptoms*. (y.y.). Tarihinde 23 Mart 2021, adresinden erişildi <https://emedicine.medscape.com/article/2061054-overview#a4>
147. Akgül, Ö., and Çalışkan, R. (2018). HIV/AIDS: Güncel Yaklaşımlar. *Tıp Fakültesi Klinikleri*, 1(1), 19–31. <https://dergipark.org.tr/tr/download/article-file/519649>
148. Hurt, C. B., Nelson, J. A. E., Hightow-Weidman, L. B., and Miller, W. C. (2017). Selecting an HIV Test: A Narrative Review for Clinicians and Researchers. *Sexually Transmitted Diseases*, 44(12), 739–746. <https://doi.org/10.1097/OLQ.0000000000000719>
149. Delaney, K. P., Wesolowski, L. G., and Owen, S. M. (2017). The Evolution of HIV Testing Continues. *Sexually Transmitted Diseases*, 44(12). https://journals.lww.com/stdjournal/Fulltext/2017/12000/The_Evolution_of_HIV_Testing_Continues.6.aspx
150. Cdc, S. (2016). *Rapid HIV tests suitable for use in non-clinical settings (CLIA-waived) a Link to Chembio*.
151. İnternet: *Geenius HIV 1/2 Supplemental Assay | FDA*. (y.y.). Tarihinde 23 Mart 2021, adresinden erişildi <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/approved-blood-products/geenius-hiv-12-supplemental-assay>
152. Fernández McPhee, C., Álvarez, P., Prieto, L., Obiang, J., Avedillo, P., Vargas, A., Rojo, P., Abad, C., Ramos, J. T., and Holguín, A. (2015). HIV-1 infection using dried blood spots can be confirmed by Bio-Rad Geenius™ HIV 1/2 confirmatory assay. *Journal of Clinical Virology*, 63, 66–69. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jcv.2014.12.018>
153. İnternet: Interpretation and Use of the Western Blot Assay for Serodiagnosis of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infections. (y.y.). Tarihinde 23 Mart 2021, adresinden erişildi <https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/00001431.htm>

154. den Oudsten, M., van Kampen, J., Rijnders, B., van de Vijver, D., and van der Ende, M. (2019). Is HIV-1 viraemia below 20 copies/mL in antiretroviral-treated patients associated with virologic outcome? *Infectious Diseases*, 51(4), 259–267. <https://doi.org/10.1080/23744235.2018.1554909>
155. İnternet: HIV/AIDS Medications (y.y.). POZ. Tarihinde 23 Mart 2021, adresinden erişildi https://www.poz.com/drug_charts/hiv-medications
156. Kozal, M., Aberg, J., Pialoux, G., Cahn, P., Thompson, M., Molina, J.-M., Grinsztejn, B., Diaz, R., Castagna, A., Kumar, P., Latiff, G., DeJesus, E., Gummel, M., Gartland, M., Pierce, A., Ackerman, P., Llamoso, C., and Lataillade, M. (2020). Fostemsavir in Adults with Multidrug-Resistant HIV-1 Infection. *New England Journal of Medicine*, 382(13), 1232–1243. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1902493>
157. Iacob, S. A., and Iacob, D. G. (2017). Ibalizumab Targeting CD4 Receptors, An Emerging Molecule in HIV Therapy. *Frontiers in Microbiology*, 8, 2323. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02323>
158. Wilkin, T. J., and Gulick, R. M. (2012). CCR5 antagonism in HIV infection: current concepts and future opportunities. *Annual Review of Medicine*, 63, 81–93. <https://doi.org/10.1146/annurev-med-052010-145454>
159. Dean, L. (2012). Maraviroc Therapy and CCR5 Genotype. İçinde *Medical Genetics Summaries*. National Center for Biotechnology Information (US). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28520358>
160. Mzoughi, O., Teixido, M., Planès, R., Serrero, M., Hamimed, I., Zurita, E., Moreno, M., Granados, G., Lakhdar-Ghazal, F., BenMohamed, L., Giralt, E., and Bahraoui, E. (2019). Trimeric heptad repeat synthetic peptides HR1 and HR2 efficiently inhibit HIV-1 entry. *Bioscience Reports*, 39(9). <https://doi.org/10.1042/BSR20192196>
161. Eggink, D., Bontjer, I., de Taeye, S. W., Langedijk, J. P. M., Berkhout, B., and Sanders, R. W. (2019). HIV-1 anchor inhibitors and membrane fusion inhibitors target distinct but overlapping steps in virus entry. *Journal of Biological Chemistry*, 294(15), 5736–5746. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.007360>
162. El Safadi, Y., Vivet-Boudou, V., and Marquet, R. (2007). HIV-1 reverse transcriptase inhibitors. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 75(4), 723–737. <https://doi.org/10.1007/s00253-007-0919-7>
163. Verma, A. S., Kumar, V., Saha, M. K., Dutta, S., and Singh, A. (2019). HIV: Biology to Treatment. *NanoBioMedicine*, 167–197. https://doi.org/10.1007/978-981-32-9898-9_7
164. Schauer, G., Leuba, S., and Sluis-Cremer, N. (2013). Biophysical Insights into the Inhibitory Mechanism of Non-Nucleoside HIV-1 Reverse Transcriptase Inhibitors. *Biomolecules*, 3(4), 889–904. <https://doi.org/10.3390/biom3040889>
165. Singh, K., Marchand, B., Kirby, K. A., Michailidis, E., and Sarafianos, S. G. (2010). Structural aspects of drug resistance and inhibition of HIV-1 reverse transcriptase. İçinde *Viruses* (C. 2, Sayı 2, ss. 606–638). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/v2020606>

166. Ren, J., Nichols, C., Bird, L., Chamberlain, P., Weaver, K., Short, S., Stuart, D. I., and Stammers, D. K. (2001). Structural mechanisms of drug resistance for mutations at codons 181 and 188 in HIV-1 reverse transcriptase and the improved resilience of second generation non-nucleoside inhibitors. *Journal of Molecular Biology*, 312(4), 795–805. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2001.4988>
167. McColl, D. J., and Chen, X. (2010). Strand transfer inhibitors of HIV-1 integrase: Bringing IN a new era of antiretroviral therapy. *Antiviral Research*, 85(1), 101–118. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2009.11.004>
168. Thierry, E., Deprez, E., and Delelis, O. (2017). Different Pathways Leading to Integrase Inhibitors Resistance . İçinde *Frontiers in Microbiology* (C. 7, s. 2165). <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2016.02165>
169. Preston, B. D., Poiesz, B. J., and Loeb, L. A. (1988). Fidelity of HIV-1 reverse transcriptase. *Science*, 242(4882), 1168 LP – 1171. <https://doi.org/10.1126/science.2460924>
170. Perelson, A. S., Neumann, A. U., Markowitz, M., Leonard, J. M., and Ho, D. D. (1996). HIV-1 Dynamics in Vivo: Virion Clearance Rate, Infected Cell Life-Span, and Viral Generation Time. *Science*, 271(5255), 1582 LP – 1586. <https://doi.org/10.1126/science.271.5255.1582>
171. Jackson, J. B., Becker-Pergola, G., Guay, L. A., Musoke, P., Mracna, M., Fowler, M. G., Mofenson, L. M., Mirochnick, M., Mmiro, F., and Eshleman, S. H. (2000). Identification of the K103N resistance mutation in Ugandan women receiving nevirapine to prevent HIV-1 vertical transmission. *AIDS (London, England)*, 14(11), F111-5. <https://doi.org/10.1097/00002030-200007280-00001>
172. Cunningham, C. K., Chaix, M.-L., Rekacewicz, C., Britto, P., Rouzioux, C., Gelber, R. D., Dorenbaum, A., Delfraissy, J. F., Bazin, B., Mofenson, L., and Sullivan, J. L. (2002). Development of resistance mutations in women receiving standard antiretroviral therapy who received intrapartum nevirapine to prevent perinatal human immunodeficiency virus type 1 transmission: a substudy of pediatric AIDS clinical trials group protocol . *The Journal of Infectious Diseases*, 186(2), 181–188. <https://doi.org/10.1086/341300>
173. Shafer, R. W., Rhee, S.-Y., Pillay, D., Miller, V., Sandstrom, P., Schapiro, J. M., Kuritzkes, D. R., and Bennett, D. (2007). HIV-1 protease and reverse transcriptase mutations for drug resistance surveillance. *AIDS (London, England)*, 21(2), 215–223. <https://doi.org/10.1097/QAD.0b013e328011e691>
174. Martinez-Picado, J., DePasquale, M. P., Kartsonis, N., Hanna, G. J., Wong, J., Finzi, D., Rosenberg, E., Günthard, H. F., Sutton, L., Savara, A., Petropoulos, C. J., Hellmann, N., Walker, B. D., Richman, D. D., Siliciano, R., and Dand#039;Aquila, R. T. (2000). Antiretroviral resistance during successful therapy of HIV type 1 infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(20), 10948 LP – 10953. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.20.10948>
175. Zdanowicz, M. M. (2006). The pharmacology of HIV drug resistance. *American Journal of Pharmaceutical Education*, 70(5), 100. <https://doi.org/10.5688/aj7005100>

176. Larder, Brendan A. (1994). Interactions between drug resistance mutations in human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. İçinde *Journal of General Virology* (C. 75).
177. Brenner, B. G., Thomas, R., Blanco, J. L., Ibanescu, R.-I., Oliveira, M., Mesplède, T., Golubkov, O., Roger, M., Garcia, F., Martinez, E., and Wainberg, M. A. (2016). Development of a G118R mutation in HIV-1 integrase following a switch to dolutegravir monotherapy leading to cross-resistance to integrase inhibitors. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 71(7), 1948–1953. <https://doi.org/10.1093/jac/dkw071>
178. Michailidis, E., Ryan, E. M., Hachiya, A., Kirby, K. A., Marchand, B., Leslie, M. D., Huber, A. D., Ong, Y. T., Jackson, J. C., Singh, K., Kodama, E. N., Mitsuya, H., Parniak, M. A., and Sarafianos, S. G. (2013). Hypersusceptibility mechanism of Tenofovir-resistant HIV to EFdA. *Retrovirology*, 10(1), 65. <https://doi.org/10.1186/1742-4690-10-65>
179. de Olalla, P. G., Knobel, H., Carmona, A., Guelar, A., López-Colomé, J. L., and Caylà, J. A. (2002). Impact of Adherence and Highly Active Antiretroviral Therapy on Survival in HIV-Infected Patients. *JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*, 30(1). https://journals.lww.com/jaids/Fulltext/2002/05010/Impact_of_Adherence_and_Highly_Active.14.aspx
180. Bangsberg, D. R., Perry, S., Charlebois, E. D., Clark, R. A., Roberston, M., Zolopa, A. R., and Moss, A. (2001). Non-adherence to highly active antiretroviral therapy predicts progression to AIDS. *AIDS*, 15(9). https://journals.lww.com/aidsonline/Fulltext/2001/06150/Non_adherence_to_highly_active_antiretroviral.15.aspx
181. Iacob, S. A., Iacob, D. G., and Jugulete, G. (2017). Improving the Adherence to Antiretroviral Therapy, a Difficult but Essential Task for a Successful HIV Treatment—Clinical Points of View and Practical Considerations. *Frontiers in Pharmacology*, 8(NOV), 831. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00831>
182. Larder, B A, Darby, G., and Richman, D. D. (1989). HIV with reduced sensitivity to zidovudine (AZT) isolated during prolonged therapy. *Science*, 243(4899), 1731 LP – 1734. <https://doi.org/10.1126/science.2467383>
183. Palella, F. J., Armon, C., Buchacz, K., Cole, S. R., Chmiel, J. S., Novak, R. M., Wood, K., Moorman, A. C., and Brooks, J. T. (2009). The Association of HIV Susceptibility Testing With Survival Among HIV-Infected Patients Receiving Antiretroviral Therapy: A Cohort Study. *Annals of Internal Medicine*, 151(2), 73–84. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-151-2-200907210-00003>
184. Blaise, P., Clevenbergh, P., Vaira, D., Moutschen, M., and Dellamonica, P. (2002). HIV resistance to antiretroviral drugs: Mechanisms, genotypic and phenotypic resistance testing in clinical practice. *Acta Clinica Belgica*, 57(4), 191–201. <https://doi.org/10.1179/acb.2002.041>

185. Günthard, H. F., Calvez, V., Paredes, R., Pillay, D., Shafer, R. W., Wensing, A. M., Jacobsen, D. M., and Richman, D. D. (2019). Human Immunodeficiency Virus Drug Resistance: 2018 Recommendations of the International Antiviral Society-USA Panel. *Clinical Infectious Diseases*, 68(2). <https://doi.org/10.1093/cid/ciy463>
186. Saag, M. S., Benson, C. A., Gandhi, R. T., Hoy, J. F., Landovitz, R. J., Mugavero, M. J., Sax, P. E., Smith, D. M., Thompson, M. A., Buchbinder, S. P., Del Rio, C., Eron Jr, J. J., Fätkenheuer, G., Günthard, H. F., Molina, J.-M., Jacobsen, D. M., and Volberding, P. A. (2018). Antiretroviral Drugs for Treatment and Prevention of HIV Infection in Adults: 2018 Recommendations of the International Antiviral Society-USA Panel. *JAMA*, 320(4), 379–396. <https://doi.org/10.1001/jama.2018.8431>
187. Gianella, S., and Richman, D. D. (2010). Minority variants of drug-resistant HIV. *The Journal of Infectious Diseases*, 202(5), 657–666. <https://doi.org/10.1086/655397>
188. Ji, H., Li, Y., Graham, M., Liang, B. B., Pilon, R., Tyson, S., Peters, G., Tyler, S., Merks, H., Bertagnolio, S., Soto-Ramirez, L., Sandstrom, P., and Brooks, J. (2011). Next-generation sequencing of dried blood spot specimens: A novel approach to HIV drug-resistance surveillance. *Antiviral Therapy*, 16(6), 871–878. <https://doi.org/10.3851/IMP1839>
189. Derache, A., Shin, H.-S., Balamane, M., White, E., Israelski, D., Klausner, J. D., Freeman, A. H., and Katzenstein, D. (2015). HIV Drug Resistance Mutations in Proviral DNA from a Community Treatment Program. *PLOS ONE*, 10(1), e0117430. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0117430>
190. Alidjinou, E. K., Coulon, P., Hallaert, C., Robineau, O., Meybeck, A., Huleux, T., Ajana, F., Hober, D., and Bocket, L. (2019). Routine drug resistance testing in HIV-1 proviral DNA, using an automated next- generation sequencing assay. *Journal of Clinical Virology*, 121, 104207. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jcv.2019.104207>
191. Alidjinou, E. K., Deldalle, J., Robineau, O., Hallaert, C., Meybeck, A., Huleux, T., Ajana, F., Hober, D., and Bocket, L. (2019). Routine drug resistance testing in proviral HIV-1 DNA: Prevalence of stop codons and hypermutation, and associated factors. *Journal of Medical Virology*, 91(9), 1684–1687. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jmv.25474>
192. Masciotra, S., Garrido, C., Youngpairoj, A. S., McNulty, A., Zahonero, N., Corral, A., Heneine, W., De Mendoza, C., and García-Lerma, J. G. (2007). High concordance between HIV-1 drug resistance genotypes generated from plasma and dried blood spots in antiretroviral-experienced patients. *AIDS*, 21(18), 2503–2511. <https://doi.org/10.1097/QAD.0b013e3281c618db>
193. Ji, H., Li, Y., Liang, B., Pilon, R., MacPherson, P., Bergeron, M., Kim, J., Graham, M., Van Domselaar, G., Sandstrom, P., and Brooks, J. (2013). Pyrosequencing Dried Blood Spots Reveals Differences in HIV Drug Resistance between Treatment Naïve and Experienced Patients. *PLoS ONE*, 8(2), 56170. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056170>

194. Shafer RW, Dupnik K, Winters MA, Eshleman SH. A Guide to HIV-1 Reverse Transcriptase and Protease Sequencing for Drug Resistance Studies. HIV Seq Compend [Internet]. 2001 [kaynak 23 Şubat 2021];2001:1–51. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22324021>
195. Lundberg, K. S., Shoemaker, D. D., Adams, M. W. W., Short, J. M., Sorge, J. A., and Mathur, E. J. (1991). High-fidelity amplification using a thermostable DNA polymerase isolated from *Pyrococcus furiosus*. *Gene*, 108(1), 1–6. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0378-1119\(91\)90480-Y](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0378-1119(91)90480-Y)
196. Zhou, S., Jones, C., Mieczkowski, P., and Swanstrom, R. (2015). Primer ID Validates Template Sampling Depth and Greatly Reduces the Error Rate of Next-Generation Sequencing of HIV-1 Genomic RNA Populations. *Journal of Virology*, 89(16). <https://doi.org/10.1128/jvi.00522-15>
197. Ávila-Ríos, S., Parkin, N., Swanstrom, R., Paredes, R., Shafer, R., Ji, H., and Kantor, R. (2020). Next-generation sequencing for HIV drug resistance testing: Laboratory, clinical, and implementation considerations. İçinde *Viruses* (C. 12, Sayı 6). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/v12060617>
198. Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(12), 5463–5467. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463>
199. Sanger, F., and Coulson, A. R. (1975). A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *Journal of Molecular Biology*, 94(3), 441–448. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0022-2836\(75\)90213-2](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0022-2836(75)90213-2)
200. Bunnik, E. M., and Le Roch, K. G. (2013). An Introduction to Functional Genomics and Systems Biology. *Advances in Wound Care*, 2(9), 490–498. <https://doi.org/10.1089/wound.2012.0379>
201. Nimitsantiwong, P., Wathitphan, C., Kaveepatharanon, S., Thanomphakorn, K., Chantratita, W., and Pasomsub, E. (2018). Comparison of Sentosa Sq Deep Sequencing-Based HIV-1 Genotyping Coupled to Integrated Workflow with Sanger Sequencing Method for Detection of Drug Resistance Mutations. *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 49.
202. Lu, Y., Shen, Y., Warren, W., and Walter, R. (2016). Next Generation Sequencing in Aquatic Models. İçinde *Next Generation Sequencing - Advances, Applications and Challenges*. InTech. <https://doi.org/10.5772/61657>. <http://dx.doi.org/10.5772/61657>
203. Heather, J. M., and Chain, B. (2016). The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. *Genomics*, 107(1), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2015.11.003>
204. Picelli, S., Björklund, Å. K., Reinius, B., Sagasser, S., Winberg, G., & Sandberg, R. (2014). Tn5 transposase and tagmentation procedures for massively scaled sequencing projects. *Genome research*, 24(12), 2033–2040.

205. Quail, M. A., Smith, M., Coupland, P., Otto, T. D., Harris, S. R., Connor, T. R., and Gu, Y. (2012). A tale of three next generation sequencing platforms: comparison of Ion Torrent, Pacific Biosciences and Illumina MiSeq sequencers. *BMC Genomics*, 13(1), 1-13.
206. Tzou, P. L., Kosakovsky Pond, S. L., Avila-Rios, S., Holmes, S. P., Kantor, R., & Shafer, R. W. (2020). Analysis of unusual and signature APOBEC-mutations in HIV-1 pol next-generation sequences. *PloS One*, 15(2), e0225352. <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0225352>
207. Lee, E. R., Parkin, N., Jennings, C., Brumme, C. J., Enns, E., Casadellà, M., and Ji, H. (2020). Performance comparison of next generation sequencing analysis pipelines for HIV-1 drug resistance testing. *Scientific Reports*, 10(1), 1-10. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-58544-z>
208. Ji, H., Enns, E., Brumme, C. J., Parkin, N., Howison, M., Lee, E. R., and Noguera-Julian, M. (2018). Bioinformatic data processing pipelines in support of next-generation sequencing-based HIV drug resistance testing: the Winnipeg Consensus. *Journal of the International AIDS Society*, 21(10), e25193. <https://doi.org/10.1002/jia2.25193>
209. Dalma-Weiszhausz, D. D., Warrington, J., Tanimoto, E. Y., and Miyada, C. G. B. T.-M. in E. (2006). [1] The Affymetrix GeneChip® Platform: An Overview. İçinde *DNA Microarrays, Part A: Array Platforms and Wet-Bench Protocols* (C. 410, ss. 3–28). Academic Press. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(06\)10001-4](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0076-6879(06)10001-4)
210. Hanna, G. J., Johnson, V. A., Kuritzkes, D. R., Richman, D. D., Martinez-Picado, J., Sutton, L., and D'Aquila, R. T. (2000). Comparison of sequencing by hybridization and cycle sequencing for genotyping of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(7), 2715-2721.
211. Servais, J., Lambert, C., Fontaine, E., Plesséria, J. M., Robert, I., Arendt, V., and Schmit, J. C. (2001). Comparison of DNA sequencing and a line probe assay for detection of human immunodeficiency virus type 1 drug resistance mutations in patients failing highly active antiretroviral therapy. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(2), 454-459.
212. Panel on Clinical Practices for Treatment of HIV Infection. (1998). Guidelines for the use of antiretroviral agents in HIV-infected adults and adolescents. *African Journal of Medical Practice*, 5(2), 79-104.
213. Saladini, F., Giannini, A., Boccuto, A., Vicenti, I., and Zazzi, M. (2018). Agreement between an in-house replication competent and a reference replication defective recombinant virus assay for measuring phenotypic resistance to HIV-1 protease, reverse transcriptase, and integrase inhibitors. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 32(1), e22206. <https://doi.org/10.1002/jcla.22206>
214. Lewis, M., Mori, J., Toma, J., Mosley, M., Huang, W., Simpson, P., and Westby, M. (2018). Clonal analysis of HIV-1 genotype and function associated with virologic failure in treatment-experienced persons receiving maraviroc: results from the

- MOTIVATE phase 3 randomized, placebo-controlled trials. *PloS One*, 13(12), e0204099.
215. Bader, J., Däumer, M., Schöni-Affolter, F., Böni, J., Gorgievski-Hrisoho, M., Martinetti, G., and Swiss HIV Cohort Study. (2017). Therapeutic immune recovery and reduction of CXCR4-tropic HIV-1. *Clinical Infectious Diseases*, 64(3), 295-300. <https://doi.org/10.1093/cid/ciw737>
 216. Heera, J., Valluri, S., Craig, C., Fang, A., Thomas, N., Dan Meyer, R., and Demarest, J. (2014). First prospective comparison of genotypic vs phenotypic tropism assays in predicting virologic responses to Maraviroc (MVC) in a phase 3 study: MODERN. *Journal of the International AIDS Society*, 17, 19519.
 217. Kozal, M. J., Sax, P. E. (2013). Overview of HIV drug resistance testing assays. *UpToDate*. Available: <http://www.uptodate.com/contents/overview-of-hiv-drug-resistance-testing-assays>. Accessed, 22.
 218. Raymond, S., Nicot, F., Jeanne, N., Delfour, O., Carcenac, R., Lefebvre, C., and Izopet, J. (2017). Performance comparison of next-generation sequencing platforms for determining HIV-1 coreceptor use. *Scientific Reports*, 7(1), 1-8. <https://doi.org/10.1038/srep42215>
 219. Fabeni, L., Berno, G., Svicher, V., Ceccherini-Silberstein, F., Gori, C., Bertoli, A., and Santoro, M. M. (2015). Genotypic tropism testing in HIV-1 proviral DNA can provide useful information at low-level viremia. *Journal of Clinical Microbiology*, 53(9), 2935-2941.
 220. Santoro, M. M., Fabeni, L., Armenia, D., Alteri, C., Di Pinto, D., Forbici, F., and Perno, C. F. (2014). Reliability and clinical relevance of the HIV-1 drug resistance test in patients with low viremia levels. *Clinical Infectious Diseases*, 58(8), 1156-1164. <https://doi.org/10.1093/cid/ciu020>
 221. Operskalski, E. A., Mosley, J. W., Busch, M. P., and Stram, D. O. (1997). Influences of age, viral load, and CD4+ count on the rate of progression of HIV-1 infection to AIDS. Transfusion Safety Study Group. *Journal of acquired immune deficiency syndromes and human retrovirology: official publication of the International Retrovirology Association*, 15(3), 243-244.
 222. Mellors, J. W., Kingsley, L. A., Rinaldo, C. R., Todd, J. A., Hoo, B. S., Kokka, R. P., and Gupta, P. (1995). Quantitation of HIV-1 RNA in plasma predicts outcome after seroconversion. *Annals of Internal Medicine*, 122(8), 573-579.
 223. Henrard, D. R., Phillips, J. F., Muenz, L. R., Blattner, W. A., Wiesner, D., Eyster, M. E., and Goedert, J. J. (1995). Natural history of HIV-1 cell-free viremia. *Jama*, 274(7), 554-558. <https://doi.org/10.1001/jama.1995.03530070052029>
 224. Operskalski, E. A., Stram, D. O., Lee, H., Zhou, Y., Donegan, E., Busch, M. P., and Transfusion Safety Study Group. (1995). Human immunodeficiency virus type 1 infection: relationship of risk group and age to rate of progression to AIDS. *Journal of Infectious Diseases*, 172(3), 648-655. <https://doi.org/10.1093/infdis/172.3.648>

225. Goodkin, K., Shapshak, P., Asthana, D., Zheng, W., Concha, M., Wilkie, F. L., and Khamis, I. (2004). Older age and plasma viral load in HIV-1 infection. *Aids*, 18, 87-98.
226. Mellors, J. W., Munoz, A., Giorgi, J. V., Margolick, J. B., Tassoni, C. J., Gupta, P., ... & Rinaldo Jr, C. R. (1997). Plasma viral load and CD4+ lymphocytes as prognostic markers of HIV-1 infection. *Annals of Internal Medicine*, 126(12), 946-954.
227. Rodríguez, B., Sethi, A. K., Cheruvu, V. K., Mackay, W., Bosch, R. J., Kitahata, M., and Lederman, M. M. (2006). Predictive value of plasma HIV RNA level on rate of CD4 T-cell decline in untreated HIV infection. *Jama*, 296(12), 1498-1506. <https://doi.org/10.1001/jama.296.12.1498>
228. Tatt, I. D., Barlow, K. L., Nicoll, A., and Clewley, J. P. (2001). The public health significance of HIV-1 subtypes. *Aids*, 15, S59-S71.
229. Yılmaz, G., Midilli, K., Türkoğlu, S., Bayraktaroğlu, Z., Kuşkucu, A. M., Özkan, E., and Altaş, K. (2006). Genetic subtypes of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) in Istanbul, Turkey. *International Journal of Infectious Diseases*, 10(4), 286-290.
230. Alpsar, D., Agacfidan, A., Lübke, N., Verheyen, J., Eraksoy, H., Çağatay, A., and Akgül, B. (2013). Molecular epidemiology of HIV in a cohort of men having sex with men from Istanbul. *Medical Microbiology and Immunology*, 202(3), 251-255. <https://doi.org/10.1007/s00430-012-0285-7>
231. Sayan, M., Kumbasar Karaosmanoğlu, H., Mete, B., Gündüz, A., Altuntaş Aydın, Ö. Yemişen, M., ve Tabak, F. (2013). İstanbul'da izole edilen HIV-1 pol geni dizilerinin moleküler epidemiyolojik analizi. *Mikrobiyol Bül*, 47(1), 87-97./
232. Biçeroğlu, S. U., Altuğlu, İ., Zeka, A. N., Gökengin, D., ve Sertöz, R. Y. (2014). Ege bölgesi'nde izole edilen HIV-1 izolatlarının alttip dağılımının pol gen bölgesi filogenetik analizi ve otomatize araçlar kullanılarak belirlenmesi. *Mikrobiyol Bul*, 48(3), 420-428.
233. Ziyade, N., Sayan, M., Elgörmüş, N., Büyük, Y., Adli Tıp Kurumu, İ., Mikrobiyoloji Laboratuvarı, P., and İhtisas Dairesi, M. (n.d.). *Türkiye'de Postmortem İzole Edilen HIV-1 Suşlarında Moleküler Epidemiyoloji Postmortem Molecular Epidemiology of HIV-1 Strains Isolated in Turkey*. <https://doi.org/10.5578/mb.68681>
234. Schülter, E., Oette, M., Balduin, M., Reuter, S., Rockstroh, J., Fätkenheuer, G., Esser, S., Lengauer, T., Agacfidan, A., Pfister, H., Kaiser, R., and Akgül, B. (2011). HIV prevalence and route of transmission in Turkish immigrants living in North-Rhine Westphalia, Germany. *Medical Microbiology and Immunology*, 200(4), 219. <https://doi.org/10.1007/s00430-011-0193-2>
235. Baryshev, P. B., Bogachev, V. V., and Gashnikova, N. M. (2014). HIV-1 genetic diversity in Russia: CRF63_02A1, a new HIV type 1 genetic variant spreading in Siberia. *AIDS Research and Human Retroviruses*, 30(6), 592-597. <https://doi.org/10.1089/aid.2013.0196>
236. Shcherbakova, N. S., Shalamova, L. A., Delgado, E., Fernández-García, A., Vega, Y., Karpenko, L. I., and Thomson, M. M. (2014). Molecular epidemiology, phylogeny, and

- phylodynamics of CRF63_02A1, a recently originated HIV-1 circulating recombinant form spreading in Siberia. *AIDS research and human retroviruses*, 30(9), 912-919.
237. Sayan, M., ve Kaya, S. (2013). Türkiye’de ilk kez saptanan bir rekombinant HIV-1 Kökeni: CRF08_BC. *Mikrobiyol Bul*, 47(2), 339-345.
 238. Sayan, M., Kaptan, F., Örmən, B., and Türker, N. (2014). Türkiye’de saptanan kompleks rekombinant HIV-1 CRF06_cpx alttipinin moleküler karakterizasyonu. *Mikrobiyoloji Bülteni*, 48(1), 160–167.
 239. Sayan, M., Aydın, O., Mete, B., Uzun, N., Karaosmanoglu, H., Gunduz, A., and Tabak, F. (2012). HIV-1 primary drug resistance mutations in antiretroviral therapy-naïve patients in Istanbul, Turkey. *Journal of the International AIDS Society*, 15, 1-1.
 240. Sayan, M., Willke, A., Ozgunes, N., and Sargin, F. (2013). HIV-1 subtypes and primary antiretroviral resistance mutations in antiretroviral therapy naïve HIV-1 infected individuals in Turkey. *Japanese Journal Of Infectious Diseases*, 66(4), 306-311.
 241. Sayan, M., Sargın, F., Inan, D., Yıldız Sevgi, D., Kocagül Celikbas, A., Yasar, K., and Willke, A. (2014). Transmitted antiretroviral drug resistance mutations in newly diagnosed HIV-1 positive patients in Turkey. *Journal of the International AIDS Society*, 17, 19750. <https://doi.org/https://doi.org/10.7448/IAS.17.4.19750>
 242. Sayan, Murat, Sargin, F., Inan, D., Sevgi, D. Y., Celikbas, A. K., Yasar, K., Kaptan, F., Kutlu, S., Fisgin, N. T., Inci, A., Ceran, N., Karaoglan, I., Cagatay, A., Celen, M. K., Koruk, S. T., Ceylan, B., Yildirmak, T., Akalin, H., Korten, V., and Willke, A. (2016). HIV-1 Transmitted Drug Resistance Mutations in Newly Diagnosed Antiretroviral-Naive Patients in Turkey. *AIDS Research and Human Retroviruses*, 32(1), 26–31. <https://doi.org/10.1089/AID.2015.0110>
 243. Yoldaş, Ö., Ağaçfidan, A., Lübke, N., Somer, A., Hançerli, S., Verheyen, J., Kaiser, R., and Akgül, B. (2014). Determination of Drug Resistance and Virus Typology in HIV-1-Positive Pediatric Patients in Istanbul, Turkey. *Intervirolgy*, 57(5), 297–299. <https://doi.org/10.1159/000362335>
 244. Kozal, M. J., Chiarella, J., St John, E. P., Moreno, E. A., and Simen, B. B. (2011). Prevalence of low-level HIV-1 variants with reverse transcriptase mutation K65R among different HIV subtypes and the effects of antiretroviral drug exposure on variant levels. *Antiviral Therapy*, 16(6), 925-9.
 245. Tekin, D., Gokengin, D., Onay, H., Erensoy, S., and Serto, R. (2021). Investigation of drug resistance against protease, reverse transcriptase, and integrase inhibitors by next-generation sequencing in HIV-positive patients. *Journal of Medical Virology*, 93(6), 3627-3633. <https://doi.org/10.1002/jmv.26582>
 246. Li, M., Liang, S., Zhou, C., Chen, M., Liang, S., Liu, C., and Liao, L. (2021). HIV Drug Resistance Mutations Detection by Next-Generation Sequencing during Antiretroviral Therapy Interruption in China. *Pathogens*, 10(3), 264.
 247. Moscona, R., Ram, D., Wax, M., Bucris, E., Levy, I., Mendelson, E., and Mor, O. (2017). Comparison between next-generation and Sanger-based sequencing for the detection of transmitted drug-resistance mutations among recently infected HIV-1

- patients in Israel, 2000–2014. *Journal of the International AIDS Society*, 20(1), 21846. <https://doi.org/10.7448/IAS.20.1.21846>
248. Taylor, T., Lee, E. R., Nykoluk, M., Enns, E., Liang, B., Capina, R., and Ji, H. (2019). A MiSeq-HyDRA platform for enhanced HIV drug resistance genotyping and surveillance. *Scientific Reports*, 9(1), 1-11.
 249. Strategies for Management of Antiretroviral Therapy (SMART) Study Group. (2006). CD4+ count–guided interruption of antiretroviral treatment. *New England Journal of Medicine*, 355(22), 2283-2296. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa062360>
 250. Mocroft, A., Phillips, A. N., Gatell, J., Ledergerber, B., Fisher, M., Clumeck, N., and EuroSIDA study group. (2007). Normalisation of CD4 counts in patients with HIV-1 infection and maximum virological suppression who are taking combination antiretroviral therapy: an observational cohort study. *The Lancet*, 370(9585), 407-413.
 251. Iarikov, D. E., Irizarry-Acosta, M., Martorell, C., Rauch, C. A., Hoffman, R. P., and Skiest, D. J. (2010). Use of HIV resistance testing after prolonged treatment interruption. *JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*, 53(3), 333-337.
 252. Metzner, K. J., Giulieri, S. G., Knoepfel, S. A., Rauch, P., Burgisser, P., Yerly, S., and Cavassini, M. (2009). Minority quasiespecies of drug-resistant HIV-1 that lead to early therapy failure in treatment-naïve and-adherent patients. *Clinical Infectious Diseases*, 48(2), 239-247. <https://doi.org/10.1086/595703>
 253. Li, J. Z., Paredes, R., Ribaud, H. J., Svarovskaia, E. S., Metzner, K. J., Kozal, M. J., and Kuritzkes, D. R. (2011). Low-frequency HIV-1 drug resistance mutations and risk of NNRTI-based antiretroviral treatment failure: a systematic review and pooled analysis. *Jama*, 305(13), 1327-1335. <https://doi.org/10.1001/jama.2011.375>
 254. Bernardino JJ, Arribas JR. Antiviral Therapy. İçinde: Infectious Diseases [Internet]. Elsevier; 2017 [kaynak 11 Nisan 2021]. s. 918-926.e1. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780702062858001039>
 255. Eckhardt, B. J., Gulick, R. M. (2017). Drugs for HIV infection. In *Infectious Diseases* (pp. 1293-1308). Elsevier. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780702062858001520>
 256. Posada, D., Crandall, K. A. (2002). The effect of recombination on the accuracy of phylogeny estimation. *Journal of Molecular Evolution*, 54(3), 396-402. <https://doi.org/10.1007/s00239-001-0034-9>
 257. Yebra, G., de Mulder, M., Martín, L., Pérez-Cachafeiro, S., Rodríguez, C., Labarga, P., and Cohort of the Spanish AIDS Research Network (CoRIS). (2011). Sensitivity of seven HIV subtyping tools differs among subtypes/recombinants in the Spanish cohort of naïve HIV-infected patients (CoRIS). *Antiviral Research*, 89(1), 19-25.
 258. Yalçinkata, T., & KÖSE, Ş. (2014). Investigation of hiv-1 primary drug resistance mutations in Antiretroviral Therapy-naïve Cases. *Mikrobiyoloji Bulteni*, 48(4), 585–595. <https://doi.org/10.5578/mb.8321>

259. Dalmat, R., Makhsous, N., Pepper, G., Magaret, A., Jerome, K. R., Wald, A., & Greninger, A. L. (2018). Limited marginal utility of deep sequencing for hiv drug resistance testing in the age of integrase inhibitors. <https://doi.org/10.1101/414995>







EKLER

Ek-1 Etik Kurul Raporu

GAZİ ÜNİVERSİTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU GİRİŞİMSSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR KARAR FORMU							
ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUNUN ADI	Gazi Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu					
	AÇIK ADRES						
	TELEFON						
	FAKS						
	E-POSTA						
BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	HIV Pozitif Hastalarda Genotip Tayini ve Filogenetik Analiz					
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Prof. Dr. Güldam BOZDAYI					
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI /UZMANLIK ALANI/ BULUNDUĞU MERKEZ	Tıbbi Mikrobiyoloji AD. / G.Ü.T.F.					
	YARDIMCI ARAŞTIRMACILAR	Dr. Erdem Şahin					
	DESTEKLEYİCİ (Varsa)						
	ARAŞTIRMANIN TÜRÜ	Kan, idrar, doku, radyolojik görüntü gibi biyokimya, mikrobiyoloji, patoloji ve radyoloji kolleksiyon materyalleriyle veya rutin muayene tetkik tahlil ve tedavi işlemleri sırasında (önceden) elde edilmiş materyallerle yapılacak araştırmalar- Tanımlamaya yönelik olarak genetik materyalde yapılacak araştırmalar(gen tedavisi klinik araştırmaları dışında kalan)-Doktora Tezi					
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☒	ÇOK MERKEZLİ ☐	ULUSAL ☒	ULUSLARARASI ☐			
DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Ver.No	Dili			
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	09.10.2019	1	Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐			
	AYDINLATILMIŞ ONAM FORMU	09.10.2019	1	Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐			
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı			Açıklama			
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	☒					
	BİYOLOJİK MATERYAL TRANSFER FORMU	☐					
	DİĞER	☐					
KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 88	Toplantı tarihi: 21.10.2019					
	Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın gerekçe amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve "bütçesi dışında" uygun bulunmuş olup, araştırma dosyasında belirtilen merkez/merkezlerde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına, G.Ü. Klinik Araştırmalar Etik Kurulu üyelerinin oybirliği ile karar verilmiştir. Etik Kurulun kararı, projenin bütçesi BAP tarafından kabul edildiği takdirde yürürlüğe girecek olup, BAP kararının Kurulumuza bildirilmesi gerekmektedir.						
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU							
ETİK KURULUN ÇALIŞMA ESASI	İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu						
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:	Prof. Dr. D. Berrin GÜNEYDİN						
Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet	Araştırma ile ilişkisi	Katılım *	İmza	
Prof. Dr. D. Berrin GÜNEYDİN BAŞKAN	Anest. ve Rea. AD, Farmako. Bİ.Dr.	G.Ü.T.F	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐		

Ek-1 (devam) Etik Kurul Raporu

Prof. Dr. Gülten TAÇOY BAŞKAN YARD.	Kardiyoloji AD.	G.Ü.T.F	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐
Doç. Dr. İlyas OKUR BİLDİRİMDEN SORUMLU ÜYE	Çocuk Sağ. ve Hast AD Ç.Met. Bes BD	G.Ü.T.F	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐
Prof. Dr. Nevzat YÜKSEL ÜYE	Psikiyatri AD.	G.Ü.T.F	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐
Prof. Dr. Nesrin ÇOBANOĞLU ÜYE	Tıp Tarihi ve Etik AD.	G.Ü.T.F	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐
Prof. Dr. Mehmet Ali ERGÜN ÜYE	Tıbbi Genetik AD.	G.Ü.T.F	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐
Prof. Dr. Nuriye ÖZDEMİR ÜYE	İç Hast. AD. Tıbbi Onkoloji BD.	G.Ü.T.F	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐
Prof. Dr. Aylin SEPİCİ DİNÇEL ÜYE	Tıbbi Biyokimya AD	G.Ü.T.F	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐
Doç. Dr. Hasan BOSTANCI ÜYE	Genel Cerrahi AD.	G.Ü.T.F	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐
Doç. Dr. Murat UÇAR ÜYE	Radyoloji AD.	G.Ü.T.F	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐
Doç. Dr. Gökçe S. ÖZTÜRK FİNCAN ÜYE	Tıbbi Farmakoloji AD.	G.Ü.T.F	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐
Dr. Öğr. Üyesi A. Meltem SEVGİLİ ÜYE	Tıbbi Fizyoloji AD.	G.Ü.T.F	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐
Uzm Dr. Emine AVCI ÜYE	Halk Sağlığı	Halk Sağlığı Genel Müd.	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐
Araş. Gör. Dr. Fahri Erdem KAŞAK ÜYE	Hukukçu	Hacı Bayram Veli Üniv.	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐
İ. Nüket EKŞİ ÜYE	Sivil Temsilci	-	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☐	H ☐

* :Araştırma ile İlişki

** :Toplantıda Bulunma

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgileri

Adı Soyadı Erdem Şahin

Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet tarihi
Doktora	Gazi Üniversitesi/Tıbbi Mikrobiyoloji	Devam ediyor
Lisans	Gazi Üniversitesi/Tıp Fakültesi	2015

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
2015 – devam ediyor	Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi/Acil Servis	Pratisyen Hekim
2014	Graz Tıp Fakültesi/ERASMUS Mobility	Placement İntern Doktor

Yabancı Dil

İngilizce, Almanca

Yayınlar

Dergilerde Yayınlanan Makaleler

1. Manav, S., Ayhan, M. S., Deniz, E., Özkoçer, E., Elmas, Ç., Yalinay, M., **Şahin, E.** (2020). Capsular contracture around silicone miniimplants following bacterial contamination: an in vivo comparative experimental study between textured and polyurethane implants. *Journal of Plastic, Reconstructive and Aesthetic Surgery*, 73(9), 1747–1757. <https://doi.org/10.1016/j.bjps.2020.02.049>

2. **Sahin, E.**, Bozdayi, G., Yigit, S., Muftah, H., Dizbay, M., Tunccan, O. G., Fidan, I., & Caglar, K. (2021). Genomic Characterization of SARS-CoV-2 Isolates from Patients in Turkey Reveals the Presence of Novel Mutations in Spike and nsp12 Proteins. *Journal of Medical Virology*. <https://doi.org/10.1002/jmv.27188>
3. **Şahin, E.**, Sarzhanova, S., Çuhadar, Uysal, B., Yıldız, Ş., Hızıl, K., Özkan, S. ve ark. (2021). Investigation of HTLV-I/II Seroprevalance of Patients with HIV Positivity being Monitored by Real-Time RT-PCR. *Mikrobiyol Bul*, 55(3):426-434. <https://doi.org/10.5578/mb.20219811>

Bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında (Proceedings) basılan bildiriler

1. **Erdem Şahin**, Hager Muftah, Selin Yiğit, Shaknoza Sarzhanova, Özlem Güzel Tunçcan, Murat Dizbay, Işıl Fidan, Kayhan Çağlar, Gülendam Bozdayı. COVID-19 Hastalarından İzole Edilen SARS-CoV-2 Virüsünün Yeni Nesil Dizileme ile Tüm Genom Dizi Analizi SS-061, TMC 2020 Çevrimiçi Mikrobiyoloji Sempozyumu, 25-27 Aralık 2020, Çevrimiçi (Sözlü bildiri - Tam metin)
2. Selin Yiğit, **Erdem Şahin**, Kenan Yüce, Aylin Altay Koçak, Gülendam Bozdayı. SARS-CoV-2 kalitatif 'Real Time PCR' ile elde edilen Ct (Cycle threshold) değerlerinin kantitatif 'Real Time PCR' sonuçları ile karşılaştırılması, 25-27 Aralık 2020, Çevrimiçi (Sözlü bildiri - Tam metin)
3. Safa Manav, Mehmet Sühan Ayhan, Erkan Deniz, Süheyla Esra Özkoçer, Çiğdem Elmas, **Erdem Şahin**, Meltem Yalınay. Comparison of Smooth, Textured and Polyurethane Surface Implants from the Perspective of Biofilm and Capsule Formation Under Local Antibiotherapy: An Experimental Study 42385, Plastic Surgery 2019, 20 - 23 Eylül 2019, SAN DIEGO
4. **Erdem Şahin**, Shakhnoza Sarzhanova, Burcu Çuhadar Uysal, Kenan Hızıl, Gülendam Bozdayı. Human T-Lymphotropic Virus Type 1 and Type 2 Co-Infections in Individuals Infected with Human Immunodeficiency Virus P185, 22nd Annual Meeting of the European Society for Clinical Virology, 11 - 14 Eylül 2019, COPENHAGEN
5. Safa Manav, Mehmet Sühan Ayhan, Erkan Deniz, Süheyla Esra Özkoçer, Çiğdem Elmas, **Erdem Şahin**, Meltem Yalınay. Comparison of Smooth, Textured and Polyurethane Surface Implants from the Perspective of Biofilm and Capsule Formation Under Local Antibiotherapy, 30th Annual Meeting of the European Association of Plastic Surgeons, Mayıs 23–25, 2019, HELSINKI
6. Safa Manav, Mehmet Sühan Ayhan, Erkan Deniz, Süheyla Esra Özkoçer, Çiğdem Elmas, **Erdem Şahin**, Meltem Yalınay. Düz, Pürüklü ve Poliüretan Yüzeyli İmplantların, Lokal Antibiyoterapi Altında Kapsül Ve Biyofilm Oluşumu Açısından Karşılaştırılması ABY-D 03, Türk Plastik Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Derneği 40. Ulusal Kurultayı, 17 – 21 Ekim 2018, ANTALYA

7. Sinan Özdemir, **Erdem Şahin**, İmran Sona Ayvalı, Halecan Zeynep Özcan, Mustafa Tosun, Miraç Altun, Vahdettin Talha Baran, Murat Ongar, Yahya Kemal Günaydın. Datura Stromonium Intoxication; A Case Report SS-115, 14. Ulusal Acil Tıp Kongresi, 5th Intercontinental Emergency Medicine Congress, 5th International Critical Care and Emergency Medicine Congress, 19 - 22 Nisan 2018, ANTALYA
8. Sinan Özdemir, Mustafa Tosun, İmran Sona Ayvalı, Halecan Zeynep Özcan, Miraç Altun, **Erdem Şahin**, Yahya Kemal Günaydın. Karın Ağrısı ile Başvuran Çoğul Gebelikli Hastada Over Torsiyonu; Olgu Sunumu PS-106, 14. Ulusal Acil Tıp Kongresi, 5th Intercontinental Emergency Medicine Congress, 5th International Critical Care and Emergency Medicine Congress, 19 - 22 Nisan 2018, ANTALYA
9. Halecan Zeynep Özcan, Sinan Özdemir, İmran Sona Ayvalı, Vahdettin Talha Baran, Mustafa Tosun, Hande Erdoğan, Miraç Altun, Serdal Ateş, **Erdem Şahin**, Yahya Kemal Günaydın. Herpes Zoster Göz Tutulumu; Olgu Sunumu PS-316, 14. Ulusal Acil Tıp Kongresi, 5th Intercontinental Emergency Medicine Congress, 5th International Critical Care and Emergency Medicine Congress, 19 - 22 Nisan 2018, ANTALYA
10. Selim İnan, Ayşe Esra Paçacı, **Erdem Şahin**, Gülseren Özdemir, Deniz Berkcan Arı, Şükrü Yorulmaz, Aynur Acar, Mehmet Okumuş. Recognition Early Symptoms of Guillain-Barre Syndrome – A case of Guillain-Barre Syndrome Presenting isolated Sensory Disturbance SS-063, 13. Ulusal Acil Tıp Kongresi, 4th Intercontinental Emergency Medicine Congress, 4th International Critical Care and Emergency Medicine Congress, 18 - 21 Mayıs 2017, ANTALYA
11. Selim İnan, **Erdem Şahin**, İbrahim Güven, Mustafa Tosun, Şükrü Yorulmaz, Burak Katipoğlu, Sinan Özdemir, Mehmet Okumuş. Metastatic Lung Cancer as a Cause of Persistent Hiccup PS-368, 13. Ulusal Acil Tıp Kongresi, 4th Intercontinental Emergency Medicine Congress, 4th International Critical Care and Emergency Medicine Congress, 18 - 21 Mayıs 2017, ANTALYA
12. Selim İnan, Ayşe Esra Paçacı, Sinan Özdemir, Vahdettin Talha Baran, Gülseren Özdemir, **Erdem Şahin**, Halecan Zeynep Özcan, Mehmet Okumuş. Pseudo Peripheral Palsy as a result of Ischemic Cerebral Infarction- Isolated Weakness in 3th, 4th and 5th Fingers PS-369, 13. Ulusal Acil Tıp Kongresi, 4th Intercontinental Emergency Medicine Congress, 4th International Critical Care and Emergency Medicine Congress, 18 - 21 Mayıs 2017, ANTALYA
13. Selim İnan, Hayri Ramadan, Gülseren Özdemir, Ayşe Esra Paçacı, **Erdem Şahin**, Seyid Yıldırım, Deniz Berkcan Arı, Mehmet Okumuş. Atypical presentation of Aortic Dissection with Only Symptom of Dyspnea PS-496, 3. Ulusal Acil Tıp Kongresi, 4th Intercontinental Emergency Medicine Congress, 4th International Critical Care and Emergency Medicine Congress, 18 - 21 Mayıs 2017, ANTALYA
14. Selim İnan, Gülseren Özdemir, Deniz Berkcan Arı, **Erdem Şahin**, Ayşe Esra Paçacı, Seyid Yıldırım, Burak Katipoğlu, Mehmet Okumuş. Deplase Femur and Humerus Fracture after an Epileptic Seizure PS-499. Ulusal Acil Tıp Kongresi, 4th Intercontinental Emergency Medicine Congress, 4th International Critical Care and Emergency Medicine Congress, 18 - 21 Mayıs 2017, ANTALYA

Kongre ve Sempozyum Katılımları

1. 14. Ulusal Acil Tıp Kongresi, 5th Intercontinental Emergency Medicine Congress, 5th International Critical Care and Emergency Medicine Congress, 19 - 22 Nisan 2018, ANTALYA
2. Maternal ve Perinatal Enfeksiyonların Tanısı: Tarama ve Takipte Klinik ve Laboratuvar Uygulamaları Sempozyumu, 8 Mart 2019, ANKARA
3. Klinikte Kan Bileşenleri Kullanımı Eğitim Sempozyumları, 29 Eylül 2017, Ankara
4. 22nd European Society for Clinical Virology's Annual Meeting, ESCV 2019 in Copenhagen, Denmark · 11 – 14 September 2019
5. ESCV Virtual Meeting on Covid-19, European Society for Clinical Virology, September 2020
6. 16.Ulusal Acil Tıp Kongresi, 12 - 15 Kasım 2020, Çevrimiçi
7. TMC 2020 Çevrimiçi Mikrobiyoloji Sempozyumu, 25-27 Aralık 2020, Çevrimiçi

Sertifikalar

1. Bacterial Genomes: From DNA to Protein Function Using Bioinformatics - Wellcome Genome Campus Advanced Courses and Scientific Conferences
2. Participation - Achievement Certificate, Distance Education Program, Invasive Fungal Infections in The Intensive Care Unit
3. National HIV Curriculum, Basic HIV Primary Care Self-Study Module Certificate of Completion, Non-CE Certificate
4. National HIV Curriculum, Screening and Diagnosis Self-Study Module, Certificate of Completion, Non-CE Certificate
5. Bacterial Genomes: Accessing and Analyzing Microbial Genome Data - Wellcome Genome Campus Advanced Courses and Scientific Conferences
6. Clinical Bioinformatics: Unlocking Genomics in Healthcare, Futurelearn
7. COVID-19: Tackling the Novel Coronavirus, London School of Hygiene & Tropical Medicine, Future Learn
8. COVID-19: What You Need to Know (CME Eligible), Coursera
9. Python for Data Science: Intermediate, Dataquest.io
10. HIV Basics, Certificate of Completion, Catie

11. National STD Curriculum, Self Study STD Modules, Certificate of Completion,
Non-CE Certificate





GAZİLİ OLMAK AYRICALIKTIR..