



HIV İLE ENFEKTE OLMUŞ HASTALARDA M41L DİRENÇ MUTASYONUNUN 'REAL- TIME POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU' İLE SAPTANMASI

ZUHAL TEKKANAT TAZEGÜN, İSKENDER KARALTI,
İBRAHİM ÇAĞATAY ACUNER, MERT AHMET KUŞKUCU,
GÜLDREN YANIKKAYA DEMİREL, ELİF ÇİĞDEM ALTIOK,
KENAN MİDİLLİ, MAHİR TULUNAY, YEŞİM GÜROL,
GÜLDEN ÇELİK

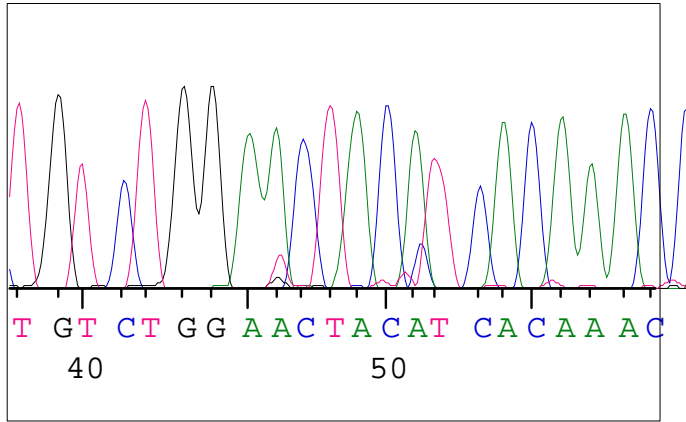
Antiretroviral direnç

- Fenotipik yöntemler
- Genotipik yöntemler:
 - Revers hibridizasyon (LIPA)
 - Mikroarray
 - Konvansiyonel dizi analizi
 - PZR yöntemleri
 - Ultra Derin Dizi Analizi

Antiretroviral direnç

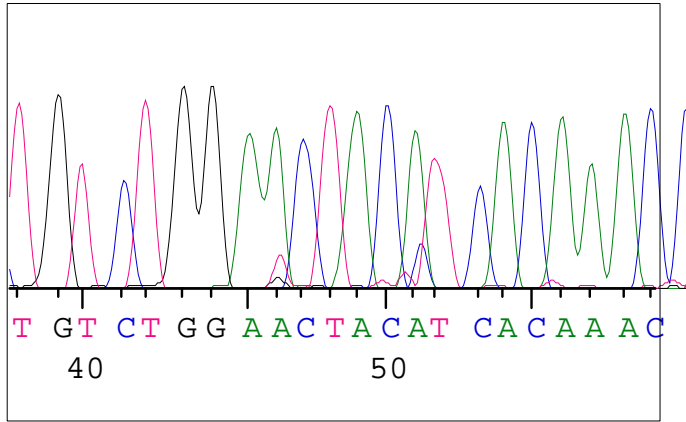
- Fenotipik yöntemler
- Genotipik yöntemler:
 - Revers hibridizasyon (LIPA)
 - Mikroarray
 - **Konvansiyonel dizi analizi**
 - PZR yöntemleri
 - Ultra Derin Dizi Analizi

Konvansiyonel dizi analizi



- Kısıtlılığı:
örnekte bulunabilen toplam virus çeşitliliğini oluşturan populasyonun içinde, %20 den az oranda bulunan varyant sub-populasyonlarını saptayamamasıdır
- Viral populasyonda var olabilecek direncin %1 ve daha da aşağı bir hassasiyetle saptanabilmesi: yeni nesil teknolojiyle mümkündür.

Konvansiyonel dizi analizi



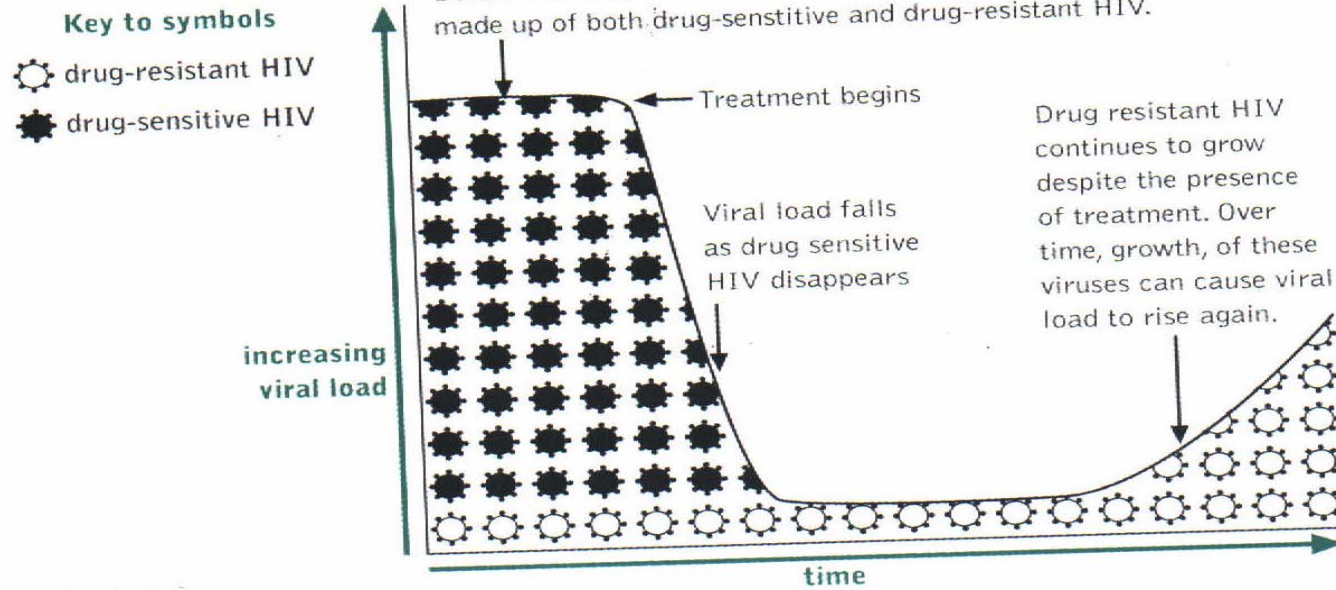
- **Kısıtlılığı:**
örnekte bulunabilen toplam virus çeşitliliğini oluşturan popülasyonun içinde, **%20 den az oranda bulunan varyant sub-popülasyonları saptayamamasıdır**
- Viral popülasyonda var olabilecek direncin %1 ve daha da aşağı bir hassasiyetle saptanabilmesi: yeni nesil teknolojiyle mümkündür.

Antiretroviral direnç

- Fenotipik yöntemler
- Genotipik yöntemler:
 - Revers hibridizasyon (LIPA)
 - Mikroarray
 - Konvansiyonel dizi analizi
 - PZR yöntemleri
 - Ultra Derin Dizi Analizi

Direnç gelişimi

Diagram 1



Konvansiyonel dizi analizi

- Kronik,
- ne zaman enfekte olduğu bilinmeyen naive olgularda:
 - bulaşmış dirençli mutantları saptamada her zaman yeterli değildir.

Azınlık ilaç direnç mutantlarının

- tedavi başarısızlığındaki rolü henüz kesin değildir.
- Bu konudaki çalışmalar yeni teknolojilerle hızla artmaktadır.

Azınlık ilaç direnç mutantları

- Metzner ve arkadaşları
- Nokta mutasyon spesifik gerçek zamanlı PZR:NMS-GZ-PZR
- toplam virus çeşitliliğini oluşturan popülasyonun içinde, %1 altındakileri azınlık oranda bulunan varyant sub-popülasyonlarını saptayabildiğini göstermişlerdir
- [Metzner KJ, et al: Prevalence of key resistance mutations K65R, K103N, and M184V as minority HIV-1 variants in chronically HIV-1 infected, treatment-naïve patients. - *J Clin Virol.* 2011 Feb;50\(2\):156-61.](#)

Azınlık ilaç direnç mutantlar

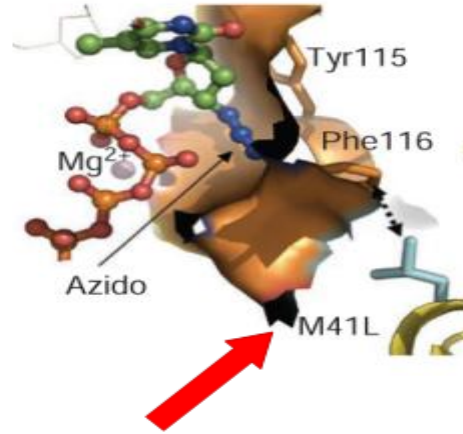
- Konvansiyonel dizi analizi tarafından saptanamayan
- azınlıktaki ilaç direnç varyantlarının
- ART sonuçlarına etkileri bu çalışmada incelenmiştir.

- [Metzner KJ](#), et al: Prevalence of key resistance mutations K65R, K103N, and M184V as minority HIV-1 variants in chronically HIV-1 infected, treatment-naïve patients. - [J Clin Virol](#). 2011 Feb;50(2):156-61.

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

Bu alıřmada M41L mutasyonu incelenmiştir

[Zidovudine direnç mutasyonu M41L' nin pozisyonu (Structural basis of HIV-1 resistance to AZT by excision. Natural structural & molecular biology 2010)]



- Mutasyonlar tipik olarak yabancı tipteki amino asidin kodu + pozisyon + yeni gelen aminoasidin kodu şeklinde ifade edilir. Örneğin 41. Kodondaki Metionin yerine Lösin geçmişse M41L şeklinde belirtilir. Kodon değişikliği: ATG→ TTG/CTG şeklindedir

M41L mutasyonu

- En sık saptanan mutasyonlardan
- Kalıcı mutasyon
- Zidovudine direnci

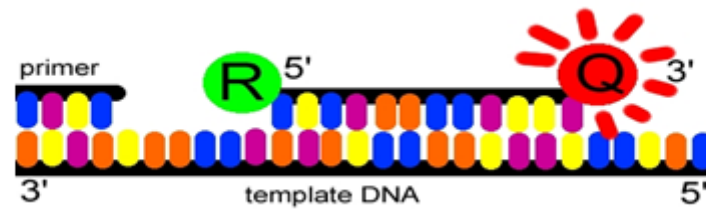
- Çalışmada, İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Moleküler Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda daha önce konvansiyonel dizi analizi ile (ABI Prism 310, Foster City, A.B.D.) incelenmiş, enfekte olduğu tarih bilinmeyen, HIV-1 genotip B pozitif 60 olgunun kan örnekleri kullanıldı.

- Center for Diseases Control'den (A.B.D.) Heneine ve arkadaşları
- HIV-1 genotip B'de oluşabilen dokuz ana ilaç mutasyonunu saptamak üzere geliştirilerek valide edilmiş olduğu ve konvansiyonel dizi analizine göre duyarlılığının daha yüksek ve yorumunun daha kolay olduğu bildirilen NMS-GZ-PZR yöntemi

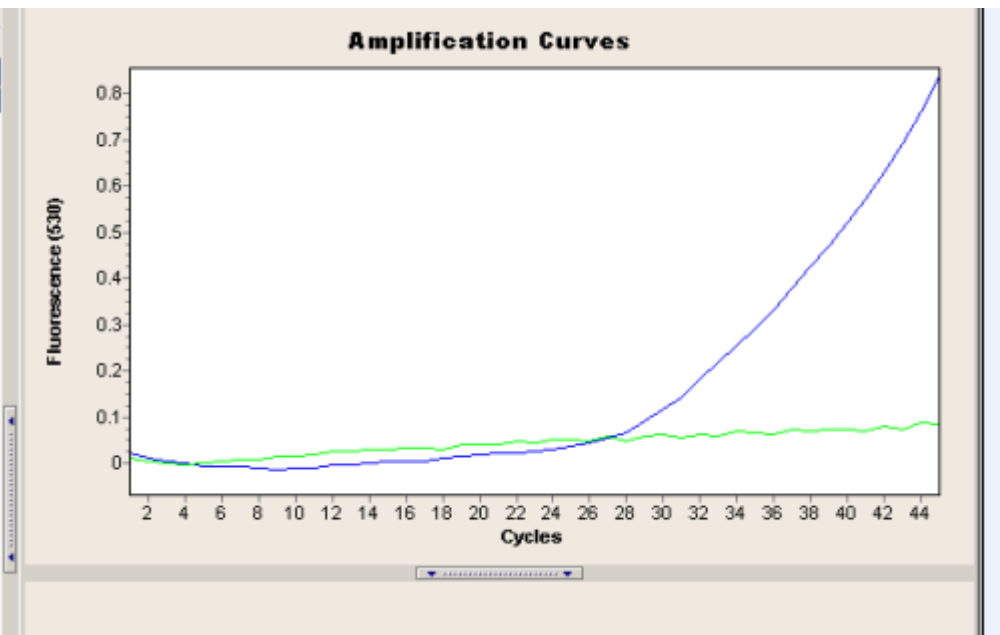
Johnson JA, Li F, Wei X, Lipscomb J, Bennett D, Brant A, Cong M, Spira T, Shafer RW, Heneine W: Simple PZR Assays improve the sensitivity of HIV-1 subtype B drug resistance testing and allow linking of resistance mutations, PLoS ONE / www.plosone.org 2007.

- LightCycler 2.0 (Roche Applied Science, Almanya)
- M41L direnç mutasyonunu saptamak üzere önerilen primer setleri (n=5)
- TaqMan probu kullanılarak çalışıldı.
- RNA kalitesinin bozuk olduğuna karar verilen üç örnek çalışma dışı bırakıldı.

Taqman GZ-PZR



Samples				
Include	Color	Pos	Name	CP
<input checked="" type="checkbox"/>	■	1	HD-2007/25 Com	27.50
<input checked="" type="checkbox"/>	■	2	HD-2007/25 M41L	
<input checked="" type="checkbox"/>	■	3	HD-2007/26 Com	27.10
<input checked="" type="checkbox"/>	■	4	HD-2007/26 M41L	
<input checked="" type="checkbox"/>	■	5	HD-2007/28 Com	27.31
<input checked="" type="checkbox"/>	■	6	HD-2007/28 M41L	
<input checked="" type="checkbox"/>	■	7	HD-2007/31 Com	27.31
<input checked="" type="checkbox"/>	■	8	HD-2007/31 M41L	
<input checked="" type="checkbox"/>	■	9	HD-2007/32 Com	28.32
<input checked="" type="checkbox"/>	■	10	HD-2007/32 M41L	>40.00
<input checked="" type="checkbox"/>	■	11	HD-2007/35 Com	27.11
<input checked="" type="checkbox"/>	■	12	HD-2007/35 M41L	
<input checked="" type="checkbox"/>	■	13	HD-2007/36 Com	27.05
<input checked="" type="checkbox"/>	■	14	HD-2007/36 M41L	
<input checked="" type="checkbox"/>	■	15	HD-2008/6 Com	26.77
<input checked="" type="checkbox"/>	■	16	HD-2008/6 M41L	
<input checked="" type="checkbox"/>	■	17	HD-2008/10 Com	19.10
<input checked="" type="checkbox"/>	■	18	HD-2008/10 M41L	19.84
<input checked="" type="checkbox"/>	■	19	HD-2009/23 Com	27.21
<input checked="" type="checkbox"/>	■	20	HD-2009/23 M41L	
<input checked="" type="checkbox"/>	■	21	HD-2010/1 Com	27.01
<input checked="" type="checkbox"/>	■	22	HD-2010/1 M41L	

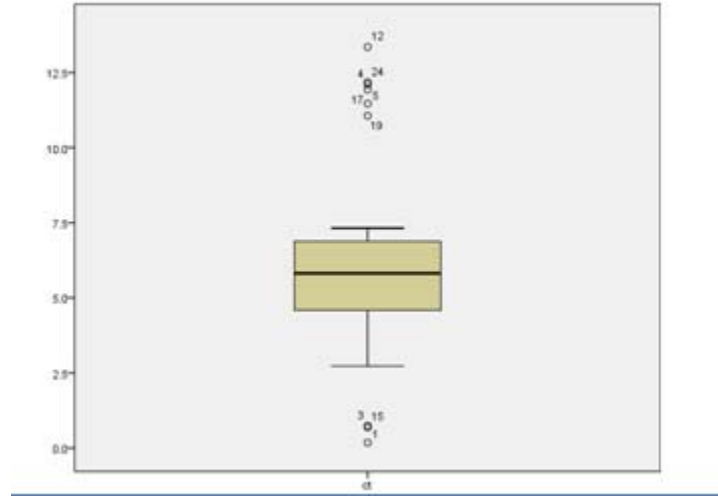


- Öneriye uygun olarak, vahşi tip ve mutant varyantları ayırt edebilmek için, pozitiflik ölçütünü belirlemek amacıyla, total viral kopya reaksiyonu ile mutant varyant reaksiyonunun Ct değerleri (“threshold cycle”) arasındaki fark (ΔCt) değerlendirildi.

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

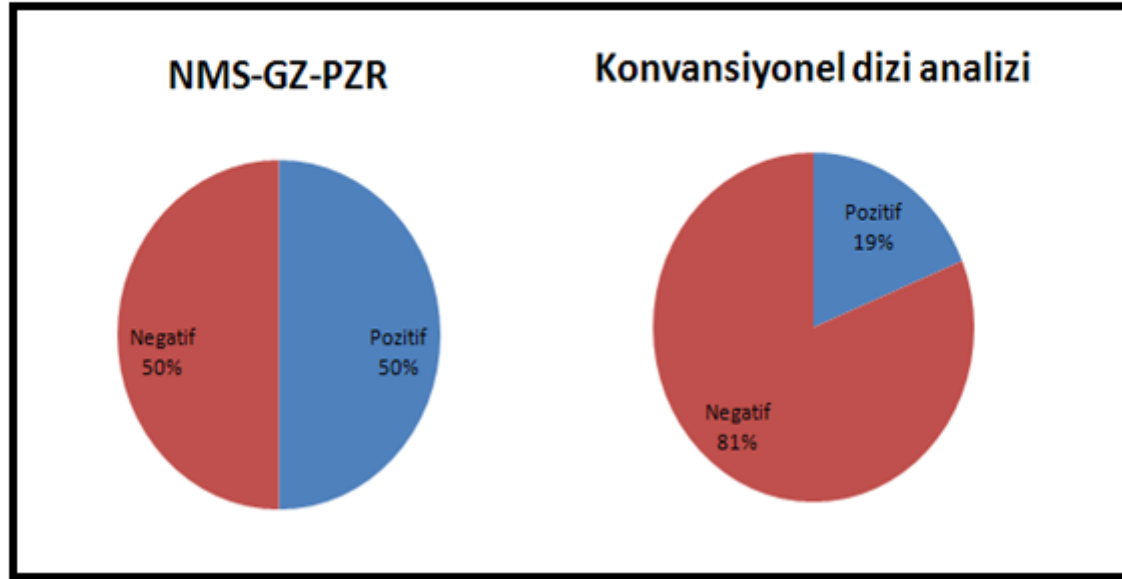
- Eşik değer hesaplamasında kullanılan örneklerin ($n=32$), merkezi eğilim dağılımına göre ΔCt ortanca değeri (5.81) eşik değer olarak belirlendi. Buna göre, ΔCt değeri, eşik değerin üzerinde olan olgu örnekleri, M41L mutasyonu açısından negatif kabul edildi.

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



- Bu eşik değer ölçütü ile değerlendirilen NMS-GZ-PZR sonuçlarına göre
- 32 örneğin:
- 16'sında M41L direnç mutasyonu pozitifliği saptandı.
- Bu örneklerin 6'sında, konvansiyonel dizi analizi sonuçlarına göre de, M41L direnç mutasyonu pozitifti.

NMS-GZ-PZR PZR ve konvansiyonel dizi analizine göre pozitif ve negatif sonuçların yüzde oranları.



- Konvansiyonel dizi analizi ve NMS-GZ-PZR yöntemlerinden birisinin referans yöntem statüsü olmadığı için, iki yöntem arasındaki karşılaştırmalı uyuşmanın güvenilirliği, kapa istatistiği ile ölçüldü.
- Kapa istatistiğine göre, iki yöntem arasında, orta düzeyde uyuşma ($k=0.375; P<0.007$) saptandı.

- Sonuç olarak,
- Konvansiyonel dizi analizi yönteminin kısıtlılıklarını (%20 altındaki minor varyantları saptamama)
- Bu konuda yeni teknolojilerin gelişmiş olduğunu hatırlamalı
 - Ultra derin dizi analizi
 - NMS-GZ-PZR
- Antiviral dirence ilişkin epidemiyolojik dinamiklerin daha iyi anlaşılmasına ve tedavi başarısının artmasına katkıda bulunacakları bilinmelidir.