

HIV-1 Subtiplerinin Dağılımı

Tülay YALÇINKAYA*, Şükran KÖSE **

* Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı Salgın Hastalıklar Araştırma Müdürlüğü Viroloji Laboratuvar Şefliği AIDS Doğrulama Merkezi ** Tepecik Tepecik Eğitim ve Araştırma Hastanesi Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği

ÖZET

Amaç: Çalışmanın amacı HIV/AIDS hastalarından izole edilen HIV-1 suşlarının subtiplerinin saptanmasıdır.

Gereç ve Yöntem: Bu çalışmada, Ankara Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı AIDS Doğrulama Merkezi'nde Türkiye doğumlu HIV/AIDS hastalarından izole edilen toplam 34 plazma örneği (24 erkek, 10 kadın, ortalama yaş 36.7) kullanılmıştır. Virüsün pol geninin ilk 1056 bazlık kısmının nükleotid dizisi belirlenmiş ve bu diziler subtip saptanmasında kullanılmıştır.

Bulgular: HIV-1 izolatlarının büyük çoğunluğunda subtip B olarak saptanmıştır (%61.8). Saptanan diğer subtipler, A1 (%14.7), C (%11.8), G (%8.8) ve CRF02_AG (%2.9)'dir. HIV-1 subtip B baskın olmasına karşın, diğer subtipler de saptanmıştır.

Sonuç: Elde ettiğimiz bulgular ve ülkemizin köprü konumundaki coğrafi yerleşimi HIV-1 subtiplerinin belirlenmesine yönelik ulusal sürveyansa gereksinimimiz olduğuna işaret etmektedir.

Anahtar kelimeler: HIV-1, subtip

SUMMARY

The Distribution of the Genetic Subtypes of HIV-1

Objective: The aim of this study was to assess the subtypes of HIV-1 strains isolated from HIV/AIDS patients.

Materials and Methods: A total of 34 plasma samples were studied (24 males, 10 females; mean age 36.7 years). First 1056 bases of the pol gene were directly sequenced from plasma of these 34 individuals and the sequences were used for genotypic analyses.

Results: The majority of the HIV-1 isolates were found to be subtype B virus (61.8%). Subtypes A1 (14.7%), C (11.8%), G (8.8%), and CRF02_AG (2.9%) were also determined. Although HIV-1 subtype B is the dominant one, other subtypes were also identified.

Conclusion: Our findings in the study and the bridging structure of the geographic localization of Turkey indicated the need for the national surveillance of the subtypes of HIV.

Key words: HIV-1, subtype

GİRİŞ

HIV tip 1 (HIV-1) virüsü yüksek genetik farklılığa sahiptir. Virüsün yanlış baz bağlama özelliğine sahip revers transkriptaz enziminin bulunması, hızlı turnover ve rekombinasyon oluşturabilmesi ve konakta seçici immün baskılama yapması bu farklılığın nedenidir. HIV-1 virüsü M (majör), O (outlier), N (non-M, non-O-new) olmak üzere üç ana gruba ayrılır. HIV izolatlarının büyük çoğunluğunu kapsayan M grubu en az dokuz (A-D, F-H, J ve K) genetik subtip ayrılır. Subtip saptanmasında önceleri çoğunlukla gag ve env genleri kullanılırken son yıllarda antiretroviral ilaç direnci saptanmasına yönelik testlerin kullanımı ile birlikte pol geni de gittikçe artan sıklıkta kullanılır hâle gelmiştir^(1,2). M grubunda yer alan bu subtipler

env geninde %20-30, gag geninde %15-22 oranında farklılık gösterir. Her bir subtip içinde bile belirgin farklılık bulunmaktadır. Örneğin subtip F, F1 ve F2 olmak üzere iki sub-subtip içerir. Benzer şekilde subtip A da A1-A4 sub-subtiplerine ayrılmıştır. Ayrıca, "majör circulating recombinant formlar" (majör-CRF) ve "unique rekombinant formlar" (URF) da tanımlanmıştır^(3,4). Rekombinant formların görülme sıklığı bölgeden bölgeye farklılıklar gösterse de rekombinasyonun global HIV epidemiyolojisinde önemli rolü vardır. Sahra altı Afrika gibi HIV subtip çeşitliliğinin fazla olduğu yerlerde kişilerin iki veya daha fazla viral suşla ko-enfeksiyonu nedeniyle rekombinasyon oranları daha yüksektir.

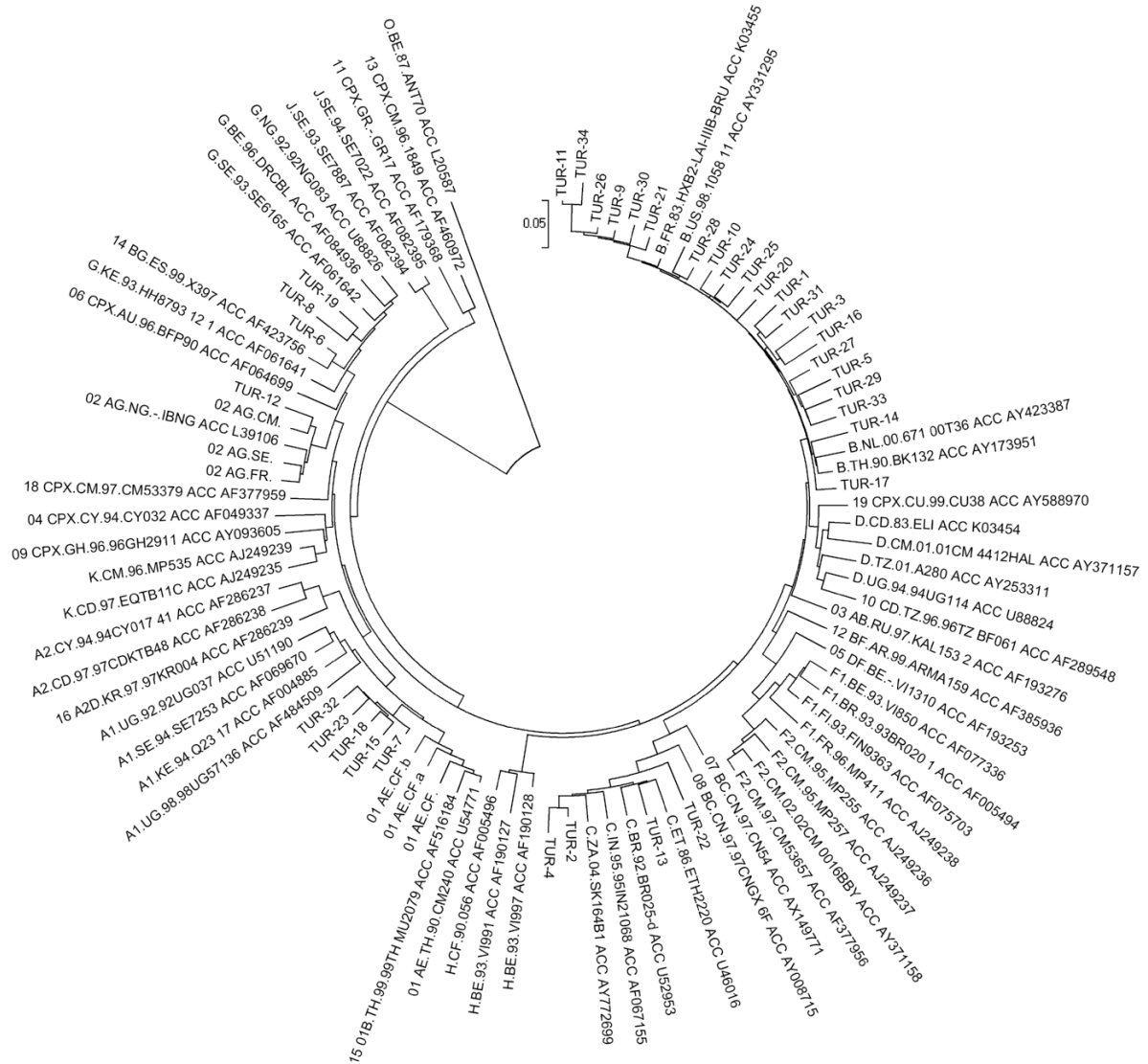
HIV-1 virüsünün bu genetik değişkenliği farklı subtip

Alındığı tarih: 18.05.2011

Kabul tarihi: 25.07.2011

Yazışma adresi: Tülay Yalçinkaya, Reşat Nuri Sok. 52A Blok 138, Yukarı Ayrancı, Çankaya 06580, Ankara

e-posta: ktyalcinkaya@yahoo.com



Şekil 1. İzole edilen HIV-1 suşlarının filogenetik analizi. Filogenetik ağaç, Mega programı kullanılarak “neighbor-joining” yöntemi ile oluşturulmuştur.

ve grupların gelişimine ve coğrafi dağılımına yol açmıştır. HIV-1 grup ve subtipleri antiretroviral ilaçların bir kısmına doğal direnç gösterebilir. Virüsün çoğalma yeteneği, farklı subtipler arasında farklılık gösterebilir ve antiretroviral ilaç duyarlılığını etkileyebilir. Bazı subtiplerin ilaç tedavisi altında hızla direnç geliştirdiği saptanmıştır. HIV enfeksiyonunun tanı ve takibinde kullanılan testlerin etkinliği subtip/grup farklılığına göre değişebilmektedir. Bu nedenlerle HIV-1 subtiplerinin epidemiyolojik sürveyansı önemlidir^(3,4).

Çalışmamızda HIV-pozitif kişilere ait örneklerde virüs subtiplerinin belirlenmesi hedeflenmiştir.

GEREÇ ve YÖNTEM

Ankara Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezi Başkanlığı AIDS Doğrulama Merkezi'nde Türkiye doğumlu HIV/AIDS hastalarından izole edilen toplam 34 plazma örneğinde çalışılmıştır. Örnekler, Doğrulama Merkezi'ne gönderilen ve antiretroviral ilaç direncinin saptanması için yapılan hazırlık çalışmalarında kullanılan örneklerdir.

Virüsün pol geninin proteaz enzimini kodlayan kısmının tamamı ve revers transkriptaz enzimini kodlayan ilk 253 kodonluk kısmı (toplam 1056 baz) nested-PCR yöntemi ile çoğaltılarak nükleotid dizi

analizi yapılmıştır.

Viral RNA, plazma örneklerinden ticari “mini spin” kolon kiti kullanılarak üreticinin önerileri doğrultusunda elde edilmiştir (QIAamp viral RNA mini kit, Qiagen, Hilden, Almanya). Viral RNA’dan gen spesifik primer ile cDNA sentezi yapılmıştır. Sentezlenen cDNA nested-PCR yöntemi ile çoğaltılarak nükleotid dizi analizi yapılmıştır⁽⁵⁾. Nested-PCR için JA269 (outer forward-pozisyon: HxB2-2042 AGGAAGGA CACCARATGAARGA), JA272 (outer reverse-3343 GGATAAATCTGACTTGCCART), JA270 (inner forward-2248 GCTTCCCTCARATCACTCTT) ve JA271 (inner reverse-3309 CCACTAAYTTCTGTATRTCATTGAC) primerleri kullanılmıştır. Dizi analizinde, JA273 (outer forward-2252 CCCTCARATCACTCTTTGGC), JA311 (inner forward-2707 AAAA TCCATAYAAAYACTCCA), JA305 (inner reverse-2775 ATTCCTAATTGRACYTCCCA) ve JA276 (outer reverse-3303 TGTATRTCATTGACAGTCCA) primerleri kullanılmıştır. PCR ürünlerinin nükleotid dizileri big-dye terminator kiti kullanılarak cycle-sequencing yöntemi ve ABI Prism 310 Genetic Analyzer cihazı (Applied Biosystems, Foster City, ABD.) ile belirlenmiştir. Nükleotid dizileri Sequencher programı (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, ABD) yardımı ile birleştirilmiş ve değerlendirilmiştir. REGA HIV subtyping tool programı kullanılarak subtipler belirlenmiştir⁽⁶⁾. Nükleotid dizilerinin sıralanması Bioedit programı kullanılarak yapılmıştır⁽⁷⁾. Filogenetik analiz için Mega programı kullanılmıştır. Filogenetik ağaç “neighbor-joining” yöntemi ve Los Alamos veri bankasından temin edilen referans diziler ile oluşturulmuştur^(8,9).

SONUÇLAR

Örnekleri çalışılan 34 kişinin 24’ü erkek, 10’nu kadın olup, ortalama yaş 36.7 (aralık=7-52) olarak bulun-

muştur. Beş örnekte genotip A (%14.7), 21 örnekte genotip B (%61.8), dört örnekte genotip C (%11.8), üç örnekte genotip G (%8.8) ve bir örnekte CRF02_AG (%2.9) saptanmıştır. Rega HIV subtyping tool ve filogenetik analiz benzer sonuç vermiştir (Tablo 1, Şekil 1).

TARTIŞMA

Türkiye’de ilk AIDS olgusu 1985 yılında bildirilmiştir. Sağlık Bakanlığı tarafından 2011 sonu itibarıyla rapor edilen toplam HIV-pozitif kişi ile AIDS olgu sayısı 5224’tür. Diğer ülkelerin verilerine bakılarak ülkemizdeki gerçek HIV pozitif sayısının daha yüksek olduğu tahmin edilmektedir⁽¹⁰⁻¹²⁾.

Türkiye coğrafik olarak HIV enfeksiyonu ve diğer cinsel yolla bulaşan hastalıkların yüksek oranlarda görüldüğü Batı Avrupa ve Asya ülkeleri ile komşu konumundadır. Şimdiye dek ülkemizde bildirilen olguların büyük çoğunluğunda bulaşma yolu cinsel temas veya damar içi uyuşturucu kullanımıdır⁽¹⁰⁻¹²⁾.

Ankara, en fazla HIV/AIDS olgusunun saptandığı büyük şehirlerimizdendir^(10,11).

HIV-1 M grubu virüsler AIDS pandemisinden sorumludur. HIV-1 subtip B Kuzey Amerika, Avrupa, Avustralya ve diğer kıtalarda büyük şehirlerdeki epidemiden sorumludur. Subtip E en fazla Tayland ve Güney Asya’da görülür. Subtip F Brezilya ve Romanya’da daha sık bulunur. Subtip G Rusya’da yaygındır. Subtip D en fazla Afrika’da görülür. Subtip A, C, D ve CRF (özellikle CRF02_AG) daha fazla olmak üzere Sahra altı Afrika’da tüm HIV-1 subtipleri yaygın olarak bulunur. Subtip C’ye Hindistan’da da sık rastlanır. CRF01_AE Güneydoğu Asya’da yaygın olarak görülür^(3,4).

Yapılan çalışmalar, Avrupa ülkelerinde B dışındaki subtiplerin de görülme sıklığının artma eğiliminde olduğunu göstermektedir. Çalışmamızda subtip B baskın subtip görünmesine karşın diğer subtipler de saptanmıştır. HIV-1 ile enfekte 34 kişiden 21’inde subtip B (%61.8), beşinde subtip A (%14.7), dördünde subtip C (%11.8), üçünde subtip G (%8.8) ve birinde CRF02_AG (%2.9) bulunmuştur. Subtip B’nin baskın subtip olarak saptanması ülkemizde yapılan diğer çalışmalar ile uyumludur. İstanbul’da 2006 ve

Tablo 1. Örneklerde HIV-1 subtip dağılımı.

Subtip	Sayı	(%)
A (A1)	5	14.7
B	21	61.8
C	4	11.8
G	3	8.8
CRF02_AG	1	2.9
Toplam	34	100

2004-2011 yıllarında, sırasıyla 27 ve 277 örnekte yapılan iki çalışmada da sırasıyla %70.4 ve %66.8 oranları ile baskın subtip olarak B saptanmıştır. Daha az sıklıkta saptanan diğer alt tipler, subtip A (%14.8 ve %2.7), subtip C (%3.7 ve %4.69), subtip D (%3.7 ve %1.81), subtip F/F1 (%7.4 ve %5.78), subtip G (%0 ve %0.72), subtip K (%0 ve %0.36), subtip CRF01_AE (%0 ve %11.55) ve subtip CRF02_AG (%0 ve %6.14)'dir. Bu çalışmalarda daha az sıklıkta saptanan subtiplerin oranlarında ve çeşitliliğindeki farklılık, çalışmaların farklı zaman aralıklarında ve farklı örnek sayıları ile açıklanmaktadır^(13,14).

Türkiye'nin özellikle Ortadoğu ve Balkanlar'dan göç alması, Afrikalı öğrencilerin eğitim görmesi, Subtip B ve C'nin baskın olduğu kuzey komşuları ile seks ticaretinin bulunması nedeniyle B dışındaki HIV-1 subtiplerinin de saptanması olağandır^(11,12).

Subtip B'nin en sık rastlanan subtip olmasına karşın diğer subtiplerin de saptanması ve Türkiye'nin de coğrafi olarak köprü konumunda bulunması nedeniyle yurt çapında düzenli sörveyans çalışmalarına gereksinim vardır.

KAYNAKLAR

1. **Gonzales MJ, Machekano RN, Shafer RW.** Human immunodeficiency virus type 1 reverse-transcriptase and protease subtypes: classification, amino acid mutation patterns, and prevalence in a Northern California clinic-based population. *J Infect Dis* 2001; 184:998-1006. <http://dx.doi.org/10.1086/323601> PMID:11574914 PMCID:2597357
2. **Alcantara LCJ, Cassol S, Libin P, et al.** A standardized framework for accurate, high-throughput genotyping of recombinant and non-recombinant viral sequences. *Nucleic Acid Research* 2009; 37:634-42. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkp455> PMID:19483099 PMCID:2703899
3. **Geretti AM, Booth C.** HIV Virology. In: Rodger AJ, Mahungu TW, Johnson MA, eds. An Atlas of Investigation and Management of HIV/AIDS. Oxford: Clinical Publishing, 2011:3-24.
4. **Butler FI, Pandrea I, Preston MA, Apetrei C.** HIV genetic diversity: biological and public health consequences. *Current HIV Research* 2007; 5:23-45. <http://dx.doi.org/10.2174/157016207779316297> PMID:17266555
5. **Lindström A, Albert J.** A Simple and sensitive "in-house" method for determining genotypic drug resistance. *J Virol Methods* 2003; 107:45-51. [http://dx.doi.org/10.1016/S0166-0934\(02\)00188-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0166-0934(02)00188-X)
6. **REGA HIV-1 Subtyping Tool (Version 2.0).** 2011. [<http://www.bioafrica.net/subtypetool/html>].
7. **Bioedit software (Version 7.0.0).** 2011. [<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>].
8. **Mega 4 software.** 2011. [<http://www.megasoftware.net/>].
9. **HIV Sequence Compendium Los Alamos National Library NM.** 2011. [<http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/COMPENDIUM/compendium.html>].
10. **Sağlık Bakanlığı verileri.** 2011. [<http://www.saglik.gov.tr/>].
11. **UNAIDS/WHO.** AIDS epidemic update. 2010. [<http://www.unaids.org/>].
12. **Duyan V, Yıldırım G.** A brief picture of HIV/AIDS in Turkey. *AIDS Patient Care and STDs* 2003;17:373-5. <http://dx.doi.org/10.1089/108729103322277394> PMID:13678539
13. **Yılmaz G, Midilli K, Türkoğlu S et al.** Genetic subtypes of HIV-1 in Istanbul, Turkey. *International Journal of Infectious Diseases* 2006; 10:286-90. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijid.2005.06.011> PMID:16516519
14. **Midilli K, Kuşkucu MA, Ergin S, Mete B, Çelik G, Kaygusuz A.** 2004-2011 yılları arasında HIV genotiplerinin dağılımı. 4. Ulusal Viroloji Kongresi Kitabı, 23-26 Haziran 2011, İstanbul: Türkiye 2011. Sayfa 182.