

22.11.2015

08:42:56

**MEHMET
SOYLU**

3. Ulusal
Klinik Mikrobiyoloji



www.tsmid.org

HIV ilaç direnç mutasyonlarının araştırılmasında Sanger dizi analizi ve yeni nesil dizileme sonuçlarının karşılaştırılması

Rüçhan Yazan Sertöz¹, Selda Erensoy¹, Mehmet Soylu¹, Mükerrerem Bahar Başkır², Servet Uluer Biçeroğlu³, Deniz Gökengin⁴, Hüseyin Onay⁵

3. ULUSAL KLİNİK MİKROBİYOLOJİ KONGRESİ 2015

SÖZLÜ SUNUM

22.11.2015

¹Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

²Bartın Fen Fakültesi İstatistik Anabilim Dalı

³Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Kan Merkezi

⁴Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

⁵Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı

Arka plan

Uzun süreli ve etkin HIV-1 tedavisinin önündeki en büyük engellerden birisi anti retroviral ilaç direncidir

Ayrıca hastanın tedavi uyumunun kötü olması da toplumda nadir sıklıkta görülen mutasyonların gelişmesine sebep olabilir*

Henüz tedavi almamış bireylerde minör varyantlar başlanacak anti retroviral tedavi etkinliğini düşürebilmektedir*

HIV-1 genetik çeşitliliği ilaç direnci genotipleme deneylerinin performansını etkilemektedir

*Evaluation of GS Junior and MiSeq next-generation sequencing technologies as an alternative to Trugene population sequencing in the clinical HIV laboratory. Ram D ve ark. J Virol Methods. 2015 Feb;212:12-6.

Arka plan

Sanger dizi analizi altın standart

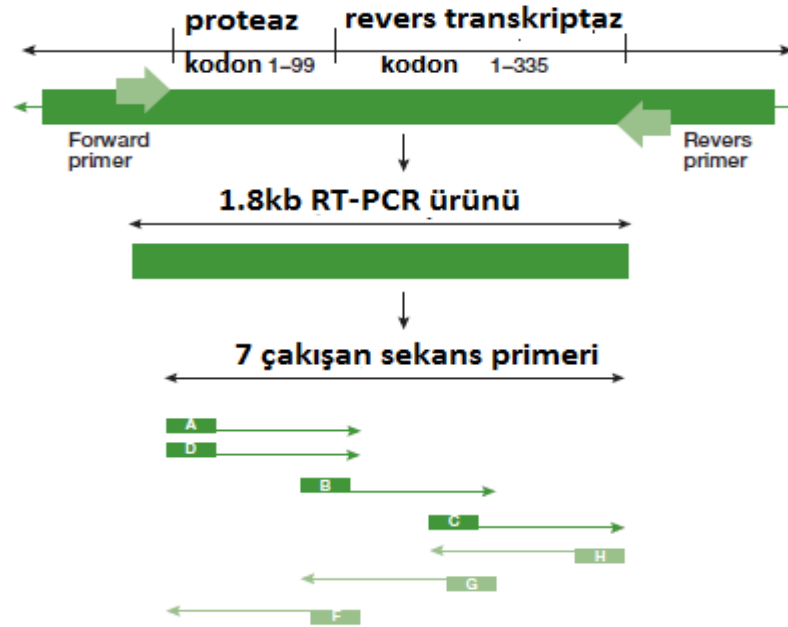
- En az % 20 viral popülasyondaki mevcut mutasyonları tespit etmedeki kısıtlı hassasiyet¹
- Sekansın ilk 15 ila 40 baz'lık bölümünde düşük kalitede sekanslama²
- Sekans esnasında oluşan DNA fragmanları 700-900 bazlık uzunluğa eriştiğinde elde edilen verinin kalitesi düşmektedir²

¹Performance assessment of the Illumina massively parallel sequencing platform for deep sequencing analysis of viral minority variants.Thys K, Verhasselt P, Reumers J, Verbist BM, Maes B, Aerssens J.J Virol Methods. 2015 Sep 1;221:29-38.

²Emerging technologies for the clinical microbiology laboratory.Buchan BW, Ledebner NA.Clin Microbiol Rev. 2014 Oct;27(4):783-822.

Arka plan

ViroSeq® HIV-1 Genotiplleme Sistemi v2.0 (Celera Diagnostics, Alameda,CA,ABD), yaygın olarak antiretroviral direnç mutasyonlarının değerlendirilmesi için kullanılmaktadır



Arka plan

HIV-1 mutasyonlarının saptanmasında yeni nesil sekanslama yöntemlerinin duyarlılığı arttırması beklenmektedir

Yeni nesil dizileme (YND) küçük varyantları saptayarak ilaç direnç mutasyonlarının saptanabilmesi için daha iyi bir alternatif olabilir mi?

- YND ile %0.5'in altında bulunan minör varyantların saptanması mümkün fakat klinik olarak %1'in altındakiler anlamlı mı? ³

³ Multi-step inhibition against HIV lifecycle-underlying the "magic" of protease inhibitors. Poveda E. AIDS Rev. 2014 Jan-Mar;16(1):52.

Yöntem

HIV direnç testi için gönderilen on üç örnek hem ViroSeq® HIV-1 Genotipleme Sistemi hem de MiSeq (Illumina, San Diego, CA) tarafından analiz edildi

Viroseq yazılım, Stanford HIVdb Sürüm 7.0 (son güncellenme 02/27/14) ve CLC GenomicsWorkbench sürüm 8.0.1 (Qiagen™) yazılımı dizileri analiz etmek için kullanıldı

YND'de dizilerin mutasyon tespit hassasiyeti için % 5'lik bir cut-off belirlendi¹⁻⁴, Coverage: 500-2920

¹Performance assessment of the Illumina massively parallel sequencing platform for deep sequencing analysis of viral minority variants. Thys K, Verhasselt P, Reumers J, Verbist BM, Maes B, Aerssens J. J Virol Methods. 2015 Sep 1;221:29-38.

⁴ Evaluation of GS Junior and MiSeq next-generation sequencing technologies as an alternative to Trugene population sequencing in the clinical HIV laboratory. Ram D ve ark. J Virol Methods. 2015 Feb;212:12-6.

Sonuçlar

İlaç duyarlılığı açısından 12 (%92) örneğin sonuçları Sanger sekanslama ile uyumlu bulundu

ViroSeq® HIV-1 Genotipleme sisteminden farklı olarak YND ile:

- Bir örnekte proteaz ve revers transkriptaz gen bölgelerinde sırasıyla proteaz inhibitörlerine(PI) ve nonnükleozid revers transkriptaz inhibitörlerine direnç (NNRTI) sebebi birer adet major mutasyon saptandı
- Bir başka örnekte proteaz inhibitörlerine direnç sebebi olabilecek proteaz gen bölgesinde bir minör mutasyon saptandı

	HASTA NO	PR%	RT%	PR MUTASYONLARI			RT MUTASYONLARI			COVERAGE
				MAJOR	MINOR	DİĞER	NRTI	NNRTI	DİĞER	
MISEQ	2332543	F(89.5%)	B(92.8%)	I54IV	T74S	K14R,I15V,L19F, E35D, M36I,R14K,R57K, I62V,L63T,E65D,L89M	YOK	K101EK	V35T,K49KR,V60I,S68G,D123E ,I135RT,K166R,D177E,R211K, F214FL K249Q,K277R,I293V,P294T,Q334E	500
SANGER		F(90.9%)	B(93.9%)	YOK	T74S	K14R, I15V, L19F, E35D, M36I, R14K, R57K, I62V, L63T, E65D,L89M	YOK	YOK	V35T, V60I, S68G, D123E, I135R, K166R, D177E, R211K, K249Q, K277R, I293V, P294T, Q334E	
MISEQ	2216042	CRF01_AE(94.9%)	CRF01_AE(94.0%)	YOK	L10I	I13V, G16E, E35D, M36I, R41K, L63N, H69K, L89M	T69NT	V106IV	E6D, K11KR, V35T, T39EK, K49KR, P55LP, V60I, K122EK, D123E, I135T, S162C, K173R, Q174K, D177E, I178IM, Q207A, R211RS, V245K, A272P, E291D, V292IV, I293V, E312T, I329V, Q334X	713
SANGER		CRF01_AE(94.9%)	CRF01_AE(96.4%)	YOK	L10I	I13V, G16E, E35D, M36I, R41K, L63T, H69K, L89M	T69N	V106IV	E6D, K11KR, V35T, T39E, V60I, K122E, D123S, I135T, S162C, K173R, Q174K, D177E, I178M, Q207A, R211S, V245K, A272P, E291D, V292IV, I293V, E312T, I329V	
MISEQ	2309888	D(89.6%)	B(93.6%)	YOK	YOK	I13V, I15V, L19F, E35D, M36IM, N37NS, R41K, R57K, I62V, L63A, E65D, K70R, L89M	YOK	YOK	I2FV, V35T, V60I, S68G, L80LP, K102E, D123E, I135R, K166R, D177E, R211K, K249Q, A272S, V276I, I293V, P294T, I329V, Q334E	1320
SANGER		F(90.6%)	B(93.9%)	YOK	YOK	I13V, K14R, I15V, L19F, E35D, M36I, R41K, R57K, I62V, L63A, E65D, K70R, L89M	YOK	YOK	V35T, V60I, S68G, K102E, D123E, I135R, K166R, D177E, R211K, K249Q, A272S, V276I, I293V, P294T, I329V, Q334E	

PI Major

- *I54IV mutasyonu* özellikle indinavir ve lopinavir direnci ile ilişkilidir fakat darunavir hariç diğer tüm proteaz inhibitörlerine de duyarlılığı azaltır

PI Minör

- *T74S mutasyonu* nelfinavire düşük düzey direnç ile ilişkilidir

HASTA NO	PR%	RT%	PR MUTASYONLARI			RT MUTASYONLARI			COVERAGE	
			MAJOR	MINOR	DiĞER	NRTI	NNRTI	DiĞER		
MiSEQ	2309911	A(89.9%)	B(86.8%)	YOK	L10FL	I15V,G15EG,L19FL, E35D, M36IV, R41K, R57KR, I62IV, L63IMT, E65DE, H69HKNQ, K70KR, V77I, L89M	YOK	YOK	K11KT, V35T, E36AE, T39X, V60IV, S68GS, K101KR, D123DE, I135IV, K166KR, K173KST, Q174KQ, D177DE, T200A, Q207A, R211S, I244V, V245Q, E248D, A272P, T286A, E291D, V292I, I293V, P294T, I326V,Q334EQ	2920
SANGER		A(94.6%)	A(93.1%)	YOK	YOK	K14KR, G16EG, E35D, M36I, R41K, L63M, H69K, V77I, L89M	YOK	YOK	K11T, V35T, E36A, T39D, K173S, Q174K, T200A, Q207A, R211S, I244V, V245Q, E248D, A272P, T286A, E291D, V292I, I293V, P294T, I326V	
MiSEQ	2309772	D(89.9%)	B(93.3%)	YOK	YOK	L19F, E35D, M36V, R41K, R57K, I62V, L63T, E65D, K70R, V77I, L89M	YOK	YOK	V35T,T391T,N54NS, V60I, S68G, K101R, D123E, I135V, K166R, D177E, I180IT, T200A, R211K, K249Q, K275KR, I293V, P294T, Q334E	779
SANGER		F (91.6%)	B (93.9%)	YOK	YOK	K14R, I15V, L19F, E35D, M36V, R41K, R57K, I62V, L63T, E65D, K70R, V77I, L89M	YOK	YOK	V35T, V60I, S68G, K101R, D123E, I135V, K166R, D177E, T200A, R211K, K249Q, I293V, P294T, Q334E	
MiSEQ	2309726	K(91.2%)	F(92.1%)	YOK	L10V	I13V, I15V, G16EG, K20R, E35D, M36I, R41K, I62V, L63T, E65D, I72V, L89M	YOK	YOK	V35T, T39A, E40D, D123E, I135L, S162C, K173GIRV, Q174K, D177E,T200A, Q207E, R211Q, V245Q, E248D	698
SANGER		K (91.9%)	F (92.8%)	YOK	L10V	I13V, I15V, G16EG, K20R, E35D, M36I, R41K, I62V, L63T, E65D, I72V, L89M	YOK	YOK	V35T, T39A, E40D, D123E, I135L, S162C, K173GIRV, Q174K, D177E, T200A, Q207E, R211Q, V245Q, E248D, A272P, V276T, K277R, T286A, E291D, V292I, I293V, P294T, E297V, D320DN, D324DE, I326V, A327V, I329V	

PI Minör

- *L10FL mutasyonu* PI özgü bir mutasyon. Atazanavir, saquinavir, tipranavir hariç tüm proteaz inhibitörlerine karşı azalmış ilaç duyarlılığından sorumludur

NNRTI

- *K101E mutasyonu* nevirapin'e orta düzey direnç (5 kat azalmış duyarlılık)
- Efavirenz, Etravirin ve Rilpivirin'e düşük düzey duyarlılık (2 kat azalmış duyarlılık)
- M184I ek mutasyonu ile birlikteliğinde rilpivirin'e duyarlılık 5 kat azalır

AÇIKLAMALAR S=SUSCEPTIBLE LLR=LOW LEVEL RESISTANCE P LLR=POSSIBLE LOW LEVEL RESISTANCE IR=INTERMEDIATE RESISTANCE

	HASTA NO	EFAVİRENZ	ETRAVİRİDİN	NEVİRAPİNE	RİLPİVİRİNE
MiSEQ	2332543	LLR	LLR	IR	IR
SANGER		S	S	S	S
MiSEQ	2216042	S	S	S	S
SANGER		S	S	S	S
MiSEQ	2309888	S	S	S	S
SANGER		S	S	S	S
MiSEQ	2309911	S	S	S	S
SANGER		S	S	S	S
MiSEQ	2309772	S	S	S	S
SANGER		S	S	S	S
MiSEQ	2309726	S	S	S	S
SANGER		S	S	S	S
MiSEQ	2310769	S	S	S	S
SANGER		S	S	S	S
MiSEQ	2633106	S	S	S	S
SANGER		S	S	S	S
MiSEQ	2632745	S	S	S	S
SANGER		S	S	S	S
MiSEQ	2633527	S	S	S	S
SANGER		S	S	S	S
MiSEQ	2633494	S	S	S	S
SANGER		S	S	S	S
MiSEQ	2674786	S	S	S	S
SANGER		S	S	S	S
MiSEQ	2674797	S	S	S	S
SANGER		S	S	S	S

AÇIKLAMALAR	S=SUSCEPTIBLE	LLR=LOW LEVEL RESISTANCE	P LLR=POSSIBLE LOW LEVEL RESISTANCE	IR=INTERMEDIATE RESISTANCE			
HASTA NO	LAMIVUDİN	ABACAİR	ZİDOVUDİN	STAVUDİN	DİDANOSİN	EMTRİCİTABİN	TENOFOVİR
MiSEQ 2332543	S	S	S	S	S	S	S
SANGER	S	S	S	S	S	S	S
MiSEQ 2216042	S	S	S	S	P LLR	S	S
SANGER	S	S	S	S	P LLR	S	S
MiSEQ 2309888	S	S	S	S	S	S	S
SANGER	S	S	S	S	S	S	S
MiSEQ 2309911	S	S	S	S	S	S	S
SANGER	S	S	S	S	S	S	S
MiSEQ 2309772	S	S	S	S	S	S	S
SANGER	S	S	S	S	S	S	S
MiSEQ 2309726	S	S	S	S	S	S	S
SANGER	S	S	S	S	S	S	S
MiSEQ 2310769	S	S	S	S	S	S	S
SANGER	S	S	S	S	S	S	S
2.RUN							
MiSEQ 2633106	S	S	S	S	S	S	S
SANGER	S	S	S	S	S	S	S
MiSEQ 2632745	S	S	S	S	S	S	S
SANGER	S	S	S	S	S	S	S
MiSEQ 2633527	S	S	S	S	S	S	S
SANGER	S	S	S	S	S	S	S
MiSEQ 2633494	S	S	S	S	S	S	S
SANGER	S	S	S	S	S	S	S
MiSEQ 2674786	S	S	S	S	S	S	S
SANGER	S	S	S	S	S	S	S
MiSEQ 2674797	S	S	S	S	S	S	S
SANGER	S	S	S	S	S	S	S

	HASTA NO	PR%	RT%	PR MUTASYONLARI			RT MUTASYONLARI			COVERAGE
				MAJOR	MINOR	DIĞER	NRTI	NNRTI	DIĞER	
MiSEQ	2310769	F (90.6%)	B (93.9%)	YOK	YOK	P9PS, K14R, I15V, L19F, K20R, M36I, R41K, R57K, I62V, L63T, E65D, K70R, L89M	YOK	YOK	V35T, E40D, V60I, S68G, D123E, K166R, D177E, R211K, V245M, K249Q, K277R, I293V, P294T, E297K, K311R, I329V, Q334E	1395
SANGER		F (90.3%)	B (93.9%)	YOK	YOK	K14R, I15V, L19F, K20R, M36I, R41K, R57K, I62V, L63T, E65D, K70R, L89M	YOK	YOK	V35T, E40D, V60I, S68G, K70*, D123E, K166R, D177E, R211K, V245M, K249Q, K277R, I293V, P294T, E297K, K311R, I329V, Q334E	
MiSEQ	2633106	CRF02_AG (93.3%)	B (91.5%)	YOK	K30I	T12A, I13V, G16E, L19I, M36I, P39L, R41K, I62K, H69K, L89M	YOK	YOK	P9PO, V35I, E36D, K49R, V60I, R78GR, K122R, I135R, Q174H, R211K, F214L, V245Q, E248D, I257L, Q269QR, Y271HY, A272P, T286A, K287R, E297A, S322T, I326V, I329V	633
SANGER		CRF02_AG (94.3%)	B (92.5%)	YOK	K30I	T12A, I13V, G16E, L19I, M36I, P39L, R41K, I62K, H69K, L89M	YOK	YOK	V35I, E36D, K49R, V60I, K122R, I135R, Q174H, R211K, F214L, V245Q, E248D, I257L, A272P, T286A, K287R, E297A, S322T, I326V, I329V	
MiSEQ	2632745	F (90.2%)	B (92.5%)	YOK	L10V	K14R, I15V, L19V, K20R, E35D, M36I, R41K, R57K, I62V, L63T, E65D, K70R, I72T, L89M	YOK	YOK	V35T, E40D, V60I, S68G, D76DE, D123E, K166R, R211K, V245IM, K249Q, K277R, Q278N, I293V, P294T, K311R, I329V, Q334E	1213
SANGER		F (90.6%)	B (93.0%)	YOK	L10V	K14R, I15V, L19V, K20R, E35D, M36I, R41K, R57K, I62V, L63T, E65D, K70R, I72T, L89M	YOK	YOK	V35T, E40D, V60I, S68G, D123E, K166R, R211K, V245IM, K249Q, K277R, Q278N, I293V, P294T, K311R, I329V, Q334E	

	HASTA NO	PR%	RT%	PR MUTASYONLARI			RT MUTASYONLARI			COVERAGE
				MAJOR	MINOR	DiĞER	NRTI	NNRTI	DiĞER	
MiSEQ	2633527	B (92.9%)	B (91.9%)	YOK	YOK	T12A, K14R, K20R, M36I, N37D, R41KR, I62V, L63Q, V77I, I93L	YOK	YOK	V8I, S68G, R83RT, Q85HQ, E89E, I22EK, D123DE, I135T, I178L, V179I, T200A, R211K, V245E, A272P, V276I, K277EKGR, T286A, E291DE, E297K, L310IL, V317A, S322A, Q334P	776
SANGER		B (93.6%)	B (95.7%)	YOK	YOK	T12A, K14R, K20R, M36I, N37D, I62V, L63Q, V77I, I93L	YOK	YOK	V8I, S68G, I135T, I178L, V179I, T200A, R211K, V245E, A272P, V276I, T286A, E291DE, E297K, L310IL, V317A, S322A, Q334P	
MiSEQ	2633494	D (90.6%)	B (92.5%)	YOK	T74S	M36I, R41K, R57K, I62V, L63T, E65D, K70R, L89M	YOK	YOK	V8IMV, K22KR, V35T, I37IM, G51EG, E53EK, V60I, S68G, K82KR, G93EG, D123E, I135RT, K166R, D177E, D185DY, R211K, K249Q, K281R, I293V, P294T, L325IL, Q334E	1006
SANGER		F (90.6%)	B (93.4%)	YOK	T74S	I15V, L19F, E35D, M36I, R41K, R57K, I62V, L63T, E65D, K70R, L89M	YOK	YOK	V8IMV, K22KR, V35T, V60I, S68G, D123E, I135RT, K166R, D177E, R211K, K249Q, K281R, I293V, P294T, Q334E	
MiSEQ	2674786	F (90.5%)	B (93.4%)	YOK	YOK	I13V, K14R, I15V, K20R, E35D, M36I, R41K, R57K, I62V, L63A, E65D, K70R, L89M	YOK	YOK	V35T, V60I, S68G, K102E, D123E, I135R, K166R, D177E, R211K, K249Q, A272S, V276I, K277R, I293V, P294T, I329V, Q334E	1432
SANGER		F (91.2%)	B (93.8%)	YOK	YOK	I13V, K14R, I15V, K20R, E35D, M36I, R41K, R57K, I62V, L63A, E65D, K70R, L89M	YOK	YOK	V35T, V60I, S68G, K102E, D123E, I135R, K166R, D177E, R211K, K249Q, A272S, V276I, K277R, I293V, P294T, I329V, Q334E	
MiSEQ	2674797	A (94.6%)	CRF01_AE (90.3%)	YOK	YOK	I13V, E35D, M36I, R41KR, H89K, I72IMV, V77IV, L89M, F99FL	YOK	YOK	K111T, V35IT, E36D, I39K, S68NS, D121HY, K122E, D123DG, I135IT, K173L, Q174K, D177E, V179IV, Q207A, R211S, V245M, E248D, 250DE, A272P, T286A, E291D, V292I, I293V, P294T, K311KR, I326V	1107
SANGER		A (94.9%)	CRF01_AE (92.1%)	YOK	YOK	I13V, E35D, M36I, H89K, I72IMV, V77IV, L89M	YOK	YOK	D121HY, K122E, I135IT, K173L, Q174K, D177E, Q207A, R211S, V245M, E248D, D250DE, A272P, T286A, E291D, V292I, I293V, P294T, I326V	

Sonuçlar

Bu çalışmada YND ile özetle;

- Bir örnekte ek major PI ve NNRTI ilaç direnci mutasyonu
- Bir başka örnekte ek minör PI ilaç direnci mutasyonu
- On örneğin RT bölgesinde 40 ekstra varyant kodon ve beş ekstra varyant kodona yeni aminoasitler eklendi
- Beş örneğin proteaz bölgesinde 18 ekstra varyant kodon ve iki ekstra varyant kodona yeni aminoasit eklendi

Tartışma

Bu veriler YND'nin minör varyantların seçiminde daha yüksek duyarlılığa sahip ve örneklerin rutin identifikasyonunda kullanışlı

Küçük varyantları tespit ederek dirençli suşların erken tanımlanması doğru tedavi seçenekleri için önemli olabilir

Cutoff değerlerinin net olarak belirlenmesi için ek çalışmalara ihtiyaç vardır

Dinlediđiniz için teŖekkürler

