

Antiviral Direnç Monitorizasyonu ve Klinik Yararı

Emine Sönmez

Giriş

Antiviral direnç, antiviral ilaçlara duyarlılığın azalmasıdır ve bunun in vitro testlerle ölçülmesi mümkündür. Antiviral direnç testleri, moleküler tekniklerin ve hücre kültürlerinin gelişmesi ile önem kazanmıştır. Bu moleküler teknikler, temelde nükleik asitlerin in vitro çoğaltılmasına dayanır ve üç ana grupta toplanır. [1] Hedef çoğaltma: Bunun üç örneği, polimeraz zincir reaksiyonu (PZR); transkripsiyona dayalı teknikler (TDT), yani nükleik asid temelli amplifikasyon ("nucleic acid sequence based amplification", NAS-BA) ile "self-sustained sequence replication" (3 SR) ve "standard displacement amplification" (SDA)'dır. [2] Prob çoğaltma: Bu amaçla "QB replicase" ve ligaz zincir reaksiyonu (LZR) kullanılır. [3] Sinyal çoğaltma: Bu da birleşik prob ve dallanmış prob ("branched DNA", bDNA) olarak uygulanır (1).

Son zamanlarda bu teknikler daha da geliştirilmiş olup çeşitli modifikasyonları kullanıma girmiştir. Bu testler ile virus genomunda amino asid ve kodon değişikliği, yabancıl ("wild") tipler karşılaştırılarak ilaç direncinin boyutu, aynı grup ilaçlarda çapraz direnç ve in vitro-in vivo uyum olup olmadığı araştırılır. Antiviral duyarlılık testleri iki gruptur: fenotipik testler ve genotipik testler.

Fenotipik Testler

Hastadaki tüm virus popülasyonunda antiviral ilacın inhibitör etkisini ölçen in vitro testlerdir. İlacın inhibitör konsantrasyonu IC₅₀ veya IC₉₀ (virus topluluğunun %50 veya %90'ını inhibe eden ilaç konsantrasyonu) ile ifade edilir. Antiviral ilaçlara çoklu dirençlerin klinik sonuçlarını göstermek için uygundur; fakat pahalı, zor, virusun üretilmesini gerektiren zaman alıcı testlerdir. Bu testler şunlardır: [1] plak redüksiyon deneyi ("plaque reduction assay", PRA); [2] boya tutulumu deneyi ("dye uptake", DU); [3] DNA hibridizasyonu; [4] enzim immunoassay (EIA); [5] "yield" redüksiyon deneyi ("yield reduction assay", YRA); [6] periferik kan mononükleer hücre kültürleri ("peripheral blood mononuclear cells cultures", PBMC); [7] "flow" sitometri; [8] plak otoradyografi (2,3).

Plak Redüksiyon Deneyi (PRA)

PRA yeni metodların karşılaştırıldığı standard bir metodur. "National Committee for Clinical Laboratory Standards" (NCCLS), herpes simpleks virusu (HSV) için standard PRA testi geliştirdi. Varisella-zoster virusu (VZV), CMV için de kullanılan bu testte IC₅₀ değeri plak formasyonunu %50 inhibe eden antiviral ajan konsantrasyonudur (2,4). PRA diğer testlere göre yorucu, daha fazla "reagent" tüketen bir testtir. Az sayıdaki izolatları test etmede uygundur.

Testte HSV, CMV, AD169, VZV Oka, Ellen gibi suşlar

kontrol suşu olarak eşzamanlı çalışılır. Modifiye PRA'da Vero/CV-1 hücre kültürü kullanılır. *Escherichia coli*'nin *lacZ* geni ile transforme edilir. Hücreler HSV ile infekte edilince *E. coli* β-galaktosidaz ekspres eder. Bu enzim histo-kimyasal boyalarla tespit edilebilir (5).

Boya Tutulumu (DU) Testi

DU testi HSV duyarlılık testi olarak kullanılır. Bu test sadece canlı hücrelerin tuttuğu bir vital boya olan nötral kırmızısının hücreler tarafından tutulması esasına dayanır. Viral litik aktivitenin boyutu HSV ile infekte hücrenin boyayı bağlama kapasitesi ile doğru orantılıdır (2). IC₅₀ viral litik aktivitenin %50'sini inhibe eden ilaç konsantrasyonudur. Düşük dirençli suşları tespit için uygun bir testtir (2,6). HSV asiklovir direnci ölçümünde IC₅₀ "cut off" değeri > 3 µg/ml olan suşlar için uygundur.

Yarı otomatik olarak kullanılabilen bir testtir. Çok sayıda izolat çalışılmasına uygundur. PRA'ya göre daha düşük orandaki dirençli suşları tespit edebilir. Pahalı olması, testin okunmasında kişiye ve tekniğe bağlı hataların olması dezavantajlarıdır.

DNA Hibridizasyonu

DNA hibridizasyon deneyleri, DNA sentezinde farklı antiviral bileşiklerin etkilerini ölçmek üzere kullanılmış olup "dot blot" hibridizasyon deneyleri CMV için uygulanmıştır. PRA ile "dot blot" hibridizasyon arasında iyi bir korelasyon mevcuttur. Ticari olarak HSV, CMV, VZV hibridizasyon duyarlılık kitleri geliştirilmiştir. Bu kitlerde infekte hücreleri içeren çukurlara antiviral ajan dilüsyonları konur, inkübe edilir. Hücre lizisi sonrası viral ve selüler DNA içeriği kapiler bir işlemle membrana transfer edilir. Virusa spesifik prolarla hibridizasyon yapılır; bu işlemde kullanılan radyoaktivite, gamma sayıcı ile ölçülür (7,8). IC₅₀ antiviral ajan ilavesinden sonra çukurcuktaki virus sayısını %50 azaltan ilaç konsantrasyonudur. Ticari kitlerde test süresi 4 saattir. Bu testlerin dezavantajı radyoizotop kullanımı, prob raf ömrünün kısa olması, çok sayıda izolat test edildiğinde pahalı olmasıdır.

"Yield" Redüksiyon Testi

Testin PRA'dan farkı ilacın plak formasyonu inhibisyonundan ziyade virusun üremesini inhibe etme yeteneğini ölçmesidir. Herpes grubu viruslar ve influenza virusları için uygulanmıştır (2).

Enzim "Immunoassay" (EIA)

Bu testler HSV, VZV, influenza A virusunun duyarlılıklarını ölçmek için geliştirilmiştir. Bu teknikte spektrofotometrik analizler ile viral aktivitenin kantitatif ölçümü mümkündür. IC₅₀ kontrol suşunun %50'sinin absorpsiyonunu azaltan antiviral ajan konsantrasyonu olarak kabul edilir. EIA, PRA ve DU'e göre rutin tanı laboratuvarları için daha uygun bir metodur (2,9,10).

PRA testi, influenza A virusu için zor uygulanan bir test olup EIA daha uygundur. Kolay ve çok izolatu aynı anda çalışmak mümkün olabilir. Bu testte influenza A virusunun hemaglutininine karşı oluşan antikorlar kullanılır. Viral hemaglutininler viral çoğalma ile doğru orantılıdır (10). HSV ve VZV için test sonuçları da PRA ile uyumludur.

“Flow” Sitometri

Bu test HSV ve CMV için uygulanmıştır. Otomatize bir test olup PRA'ya göre daha objektif ve kısa sürede sonuç verir. İlaça duyarlı suşlarla dirençli suşları diğer testlere göre daha kolay ayırır (11,12).

Plak Otoradyografi

HSV ve VZV'nin timidin kinaz aktivitelerinin ölçülmesine dayanan bir testtir. Asiklovire direnç varsa timidin kinaz aktivitesi azalır. Bu testle timidin kinazı olan ve olmayan karışık virus popülasyonunda bu enzimi kalitatif ve kantitatif ölçmek mümkündür (13).

Periferik Kan Mononükleer Hücre Kültürleri (PBMC)

Nükleozid revers transkriptaz (RT)'a karşı HIV-1 izolatlarının duyarlılıklarını ölçmek üzere kullanılmış fenotipik testlerdir. AIDS Klinik Çalışma Grubu tüm klinik HIV-1 izolatlarının üremesine müsaade eden PBMC'sini geliştirmiştir. HIV-1'in p24 antijenini ölçerek kantitatif sonuç verebilir.

Bu teknik-yoğun çalışma, pahalı olması, deneyi etkileyen faktörlerin çeşitliliği ve standardizasyonunun güçlüğü, haftalar içinde sonuç vermesi, infekte ve non-infekte PBMC'lerin eşzamanlı yapılması gerekliliği nedeniyle birçok dezavantaja sahiptir (14).

Rekombinan virus deneyleri (“recombinant virus assay”, RVA) bu problemleri kısmen çözmüştür. Bu tekniklerde hastanın PBMC veya PBMC kokültürleri ile elde edilen RT veya proteaz kodlayan gen diziliminin PZR ile amplifikasyonu uygulanır. İn vivo fenotipik dirençli suşların 10 gün içinde tespitine imkan sağlar. Kombine kullanılan ilaçların duyarlılıkları bu yöntemle bakılabilir (15).

Genotipik Testler

Antiviral ilaç direncine neden olan spesifik mutasyonları araştıran viral nükleik asid analizleridir. Fenotipik testlere göre daha ucuz, daha kısa sürede sonuç veren testlerdir; fakat seçilmiş hedefler dışında mutasyonları saptayamaz. Öncelikle sitomegalovirus (CMV) ve “human immunodeficiency virus-1” (HIV-1) için uygulanmışlardır (2). CMV için “restriction digestion PCR” amplifikasyonu uygulanmış olup HIV-1 için uygulanan teknikler aşağıda sıralanmıştır: [1] otomatize DNA dizi analizi (“automated sequencing DNA analysis”), [2] otomatize yüksek hızlı DNA dizi analizi (“automated high-speed DNA sequencing”), [3] matriks hibridizasyon, [4] “line probe assay”, [5] LZR, [6] 3 SR, [7] nokta mutasyonu testleri.

CMV İçin “Restriction Digestion PCR Amplification”

Gansiklovire dirençli mutant CMV izolatlarını göstermek amacıyla kullanılmıştır. UL97 (phosphotransferase) ve UL54 (polymerase) mutasyonları bu yöntemle tespit edilmiş olup birincisinde %89 gansiklovir direnci varken ikincisinde tama yakın dirençler mevcuttur (16,17). Bu yöntemle virus popülasyonunun %10'unu oluşturan mutantlar tanınabilir. Hastanın direkt olarak kan ve BOS'undan test yapma imkanı verir.

HIV-1 Testleri

Otomatize DNA Dizi Analizi: Proteaz ve revers transkriptaz kodlayan gen diziliminde ilaç direnci ile ilgili mutasyonları tespit etmede kullanılır (2,18).

Yüksek Hızlı DNA Dizi Analizi: Visible Genetics Inc. tarafından geliştirilen bu teknikle saatler içinde RT ve proteaz gen analizi aynı anda yapılabilir.

Matriks Hibridizasyon: Bu yöntemle HIV-1'in *gag*, *pol*, *pro* bölgelerinin değişmiş dizilimleri tespit edilir.

“Line Probe Assay”: Bir membran şeritte immobilize proba uygulanan hibridizasyon ve PZR amplifikasyonu ile RT gen analizi sağlanmıştır.

Bunlar dışında LZR, “self-sustained sequence replication amplification”, nokta mutasyonları da genotipik analizler için kullanılmıştır.

Bu metodların hepsi düşük oranda mutant varyantları ve kısa dizimli varyantları tespit edemez. Rutin tanı laboratuvarları için uygun değildir. Sadece bilinen mutasyonlarla birlikte olan dirençleri tespit edebilirler. Bu nedenle tedaviyi takipte HIV-1 RNA yükü hâlâ önemli kriterdir. HIV-1 RNA için RT-PZR, NASBA, bDNA teknikleri yaygın olarak kullanılmaktadır. Tedavi süresince HIV-1 RNA yükünün azalması tedaviye yanıtın iyi olduğunu gösterir (2,19).

HIV-1 direnç testlerinde mutlak IC₅₀ değerleri tanımlanamamıştır. IC₅₀ tek mutasyonlarda 2-10 kat artarken çoklu mutasyonlarda bu oran 100 kat artabilir. Antiretroviral tedavi başarısızlığı gerçek ilaç direnci dışında kombine ilaç kullanımı, ilaç antagonizması, hasta uyumsuzluğu, malabsorpsiyon, ilacın yetersiz penetrasyonu gibi başka faktörlere de bağlı olabilir (2,20). Olumsuzluklarına rağmen bu testlerin ilaca direncin genetik tanımı, ilacı etkileyen ardışık mutasyonların tanımı, kombine tedavilerde ilaç direncine neden olan mutasyonların saptanması ve yeni ilaçların test edilmesi için yapılması gerekir.

Antiviral Direncin Kliniğe Yansıması

Anti-HIV-1 İlaçlar ve Direnç

Nükleozid Analogu RT İnhibitörleri (NRTI): Bu grupta kullanılan ilaçların hemen hepsine direnç gelişmiştir. Zidovudin (ZDV) direnci yavaş gelişir. Yüksek düzeyde ZDV direnci için birden fazla mutasyon gerekir. Lamivudin (3TC)'de tek nokta mutasyonu bile yüksek düzeyde dirence neden olur. Didanozin (ddI), zalsitabin (ddC) ve stavudin (d4T) “d” ilaçlar olarak adlandırılır. Bunlar hep düşük seviyede fenotipik direnç gösterirler. Bunun anlamı meydana gelen genotipik direnç ilacı tamamen etkisiz hale getirmişdir. Bu nedenle “d” ilaçlar başlangıç tedavileri için önerilebilirler (19-22).

Non-Nükleozid Analogu RT İnhibitörleri (NNRTI): Nevirapin tek nokta mutasyonu ile yüksek düzeyde dirence neden olabilir. O nedenle başlangıç tedavilerinde kullanılmamalıdır. Yüksek düzeyde nevirapin direnci grubun diğer üyelerine karşı da çapraz dirence neden olur. Fakat NRTI ile NNRTI arasında çapraz direnç yoktur. Bu özellik kombine tedavi planlanırken göz önünde bulundurulur (2,23,24).

Proteaz İnhibitörleri: Bu grup ilaçlarda direnç gelişiminde ilacın dozu, hastanın uyumu önemlidir. Örneğin 7200 mg/gün sakınavir alan grupta 3600 mg/gün alan gruba göre direnç daha düşük düzeydedir. Doz aralığı da direnci etkiler. Sakınavir-ritonavir-indinavir arasında çapraz direnç olup bunlara dirençli suşlar nelfinavire duyarlı kalır. Tedaviyi planlarken bu göz önünde tutulmalıdır (2,23,25-27). İki

RT inhibitörü + bir proteaz inhibitörü şeklinde üçlü kombinasyonlar direnci azaltır ve tedavide başarıyı sağlayabilir.

Hepatitler İçin Kullanılan İlaçlar ve Direnç

İnterferon: Kronik hepatit B virusu (HBV) ve hepatit C virusu (HCV) enfeksiyonu tedavilerinde interferona karşı direnç gösterilememiştir. Ancak bu ilaca karşı nötralizan antikorlar gelişerek ilacın etkisini azaltabilirler (24).

Lamivudin: HBV enfeksiyonunda lamivudin direnci in vitro duyarlılığın 40-104 kez azalması demektir. 552 ve 528 no'lu kodonlardaki mutasyonlar lamivudin duyarlılığının azalması ile sonlanır ve bu HBV DNA polimerazın YMDD motifindeki değişiklik ile beraberdir. Lamivudin tedavisinden altı ay sonra mutant tipler görülmeye başlar, tedavi süresi ile bu oranlar artmaya başlar. Bir yıl sonra %16'dan %32'e kadar yükselebilir. Klinikte tedaviye yanıtın olmaması (HBV DNA artışı ve ALT yükselmesi) ile kendini belli eder. Bu ilaç tedavisinde ilacın indüklediği kaçak mutantlar ciddi karaciğer hastalığına neden olur. Yine ilacın kesilmesi ile "rebound" gelişir. HBeAg serokonversiyonu gelişmeden bu ilaç kesilmemelidir (24,28,29).

HBV küçük bir virus olup polimeraz ile yüzey antijeninin (HBsAg) gen kodonları üst üste binmiştir. Bu nedenle polimerazdaki ilaca dirençli mutasyonlar aynı zamanda HBsAg'nin yapısında değişikliklere neden olur. Bu mevcut HBV aşılıları için olumsuz bir gelişmedir. Yüzey epitoplara karşı antikor geliştiren aşılılar, mutant HBV enfeksiyonlarını önlemez (28).

Ribavirin: HCV'de bu ilaca direnç henüz gösterilememiştir (24).

Herpes Grubu Viruslar ve Direnç

Asiklovir, valasiklovir, famsiklovir HSV ve VZV enfeksiyonlarında kullanılır. İlaç direnci genellikle immün yetmezliği olan hastalarla sınırlıdır. AIDS'li ve kemik iliği transplantı alıcısı hastalarda HSV'ye dirençli suş prevalansı %5-10 iken immün sistemi normal olan hastalarda bu oran %0.5'tir. HSV latent bir virus olup latent dönemde dirençli mutantların yabancı tipe döndüğü kabul edilir (13,24,30-32).

CMV ve Direnç

CMV izolatlarının gansiklovir direnci, inhibitör konsantrasyonlarının in vitro 2-3 µg/ml üzerine çıkması olarak tanımlanır. UL97 geni tarafından kodlanan fosfotransferazda delesyon/nokta mutasyonu veya intraselüler gansiklovir fosforilasyonunun azalması/DNA polimeraz nokta mutasyonu şeklinde iki mekanizma ile meydana gelebilir. İmmün yetmezliği olan hastalarda ciddi tablolara neden olur (16, 20,24,33-35).

İnfluenza Virusları ve Direnç

Amantadine dirençli suşlara oldukça sık rastlanır ve bu direnç kuşaktan kuşağa aktarılır. Bu epidemiyolojik açıdan önemlidir. Rimantadin ile çapraz direnç gösterir (4,24).

Direnç Testlerinde Problemler

Bu testlerde standard değerler henüz tanımlanmamıştır. Test sonuçları teknikten tekniğe, laboratuvarın laboratuvara değişebilir. Ayrıca in vitro duyarlı/dirençli sonuçlar in vivo tedavi cevabıyla doğru orantılı olmayabilir. Hastanın klinik cevabı, immünolojik durumu, ilacın farmakokinetiği (dozu, vürülüş yolu vb.) gibi değişik faktörlere bağlıdır. Örneğin immün yetmezliği olan HSV ile infekte hastalarda vidarabin veya

asiklovire karşı IC₅₀ değeri duyarlı gibi görünse de klinik cevap kötü olabilir. Tersine immün sistemi normal olan bir hastada asiklovir IC₅₀ 2 µg/ml'den büyük olsa bile hasta iyileşebilir. Bu nedenle in vitro duyarlılık testinde yüksek IC₅₀ değeri virusun dirençli olduğunu söylemeye yeterli değildir. Bu nedenle dirençli küçük popülasyonlarda IC₉₀, IC₅₀'ye göre klinik cevabı daha iyi yansıtılabilir (2,9,10,14,24).

Kullanılan teknikler test sonuçlarını etkileyebilir. HSV'ye asiklovir ve pensiklovirin etkisini değerlendirmek üzere Vero hücre kültürüne PRA testi uygulandığında asiklovir daha etkili bulunmuştur. Aynı izolatlar için SCC25 hücreleri kullanıldığında pensiklovir daha etkili bulunmuştur. MRC-5 ve A549 hücrelerinin kullanımında ise eşit etki göstermişlerdir (2).

Bu testlerin standardizasyonu için çok sayıda virus izolatları ile yapılacak çok merkezli ve in vitro-in vivo cevabın uyumunu gösteren prospektif çalışmalara ihtiyaç vardır.

Antiviral Dirençle İlgili Çalışmalar

HIV ilaçları direnç testleri, tedavisi başarısız olan hastalara, gebe kadınlara, akut primer HIV-1 enfeksiyonlulara, "naive" hastalara önerilir. Fenotipik ve genotipik testlerde henüz standardizasyon sağlanamamıştır. Farklı bölgelerdeki HIV subtipleri "clades" olarak sınıflandırılır. Avrupa ve Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'ndeki suşlar subtip B grubunda olup bunlar için geliştirilen testler diğer bölge izolatları ve HIV-2 için uygun olmayabilir (19).

VIRADAPT genotipik bir çalışma olarak Avrupa'da yapılmıştır. Buna göre 10 000 kopya/ml HIV RNA yükü bulunan tedavisi başarısız olmuş 108 AIDS'li hasta çalışmaya alınmıştır. Birinci gruba genotip direnç testlerine göre tedavi planlanmış olup 6 ay sonra %32'sinde viral yük negatifliği sağlanmıştır. İkinci grupta standard tedavi uygulanmış, aynı sürede viral yük negatifliği %14 bulunmuştur. Bir yıl sonra iki grup arasında istatistiksel anlamda fark bulunmayıp birinci grupta başarı oranı daha yüksek tespit edilmiştir. ABD'de yapılan bir genotipik çalışma olan GART'ta ise 27 000 kopya/ml HIV RNA yükü bulunan 153 tedavisi başarısız olmuş hasta çalışmaya alınmıştır. Birinci grupta genotipik direnç testlerine göre tedaviye başlanmıştır. On iki hafta sonra viral yük negatifliği %33 olup standard tedavi alan ikinci grupta bu oran daha düşük bulunmuştur (19).

274 hasta içeren bir fenotipik test çalışma sonucu da şöyledir: birinci grupta fenotipik direnç testlerine göre tedaviden 4 ay sonra başarı oranı %38, ikinci standard tedavi alan grupta %23'tür (19).

Üç çalışmada irdelenen 418 hastada genotipik/fenotipik testler yapılmış; ZDV direnci bulunan hastalarda prognoz kötü seyirli olup çoğu ölümlerle sonlanmıştır. İki çalışmanın 118 hastasında ise sakonavir/ritonavire duyarlı olanların tedavisi yanıtının daha iyi olduğu saptanmıştır (19).

Özetle HIV ilaçları direnç testlerinin tedavide yanıtı belirleyebileceği, fakat duyarlılığın her zaman yeterli yanıt anlamına gelmeyeceği; HIV RNA yükü ve CD4+ lenfosit sayısının tedavide başlamada ve değiştirmede önemli kriterler olduğu, hücre içi ilaç düzeyi ve hücre içi ilaç direnci ile ilgili çalışmalara ihtiyaç olduğu kabul edilmektedir (19).

Harrigan ve arkadaşları (36)'nın çalışmasında 76 HIV-1'li hasta 10 farklı ilaca karşı hem fenotipik (VircoAntivirogram), hem genotipik (VircoGen) direnç yönünden araştırılmıştır Ritonavir/sakinavire dirençli olgularda kombine te-

davi başarısızlıkla sonuçlanmıştır. Bu iki ilaç direnç testlerinin yapılmasının optimal tedaviyi düzenlemede kullanılabilmesi vurgulanmıştır.

Pellegrin ve arkadaşları (37) stavudin + didanozin ile kombine tedavi alan “naive” hastalarda HIV-1 RT geninde değişiklikler ve ZDV direncini araştırmışlardır. Otuz dokuz hastada bu tedaviden 24-48 hafta sonra %46 oranında ZDV direnci, %10 oranında çoklu dirençli mutasyonlar tespit edilmiştir. Bu tedavinin başlangıç tedavisi olarak verilmesi gerektiğini vurgulamışlardır.

Garcia- Lerma ve arkadaşları (38)’nin yaptığı çalışmada çoklu dideoksinükleozid dirençli HIV-1 suşları araştırılmıştır. Bunlarda Q151 mutasyonu tespit edilmiş olup suşların ZDV, ddI ve ddC’ye karşı yabancılık tipine göre 6-8 kat daha dirençli oldukları tespit edilmiştir.

İtalya’da Balotta ve arkadaşları (39) tedavide başarısız olunan 177 hastayı çoklu direnç yönünden araştırmışlar; Q151M kompleks mutasyonlarının çoklu dideoksinükleozid direnci (“multiple dideoxynucleosid resistance”, MddNR)’ne neden olduğu tespit edilmiş ve MddNR oranı İtalya’da %3.4 oranında bulunmuştur. Avrupa’da bu direnç oranları %3.4- 6.5 arasında değişmektedir.

Chaix ve arkadaşları (40) VIRADAPT çalışması içinde ilaç dirençlerinin genotipik tayininin ekonomik açıdan değerlendirilmesini yapmışlardır. Altı ay süreyle 64 hastaya genotipik testler rehberliğinde, 43 hastaya standard protokoller rehberliğinde tedaviler uygulanmıştır; birinci grupta yıllık ücret 18 000 US \$, ikinci grupta 20 000 US \$ olarak tespit edilmiştir. Bu çalışmada proteaz inhibitörlerinin kullanımının azalması ile elde edilen ekonomik kazancın test ücretlerini telafi edeceği vurgulanmıştır.

Kellam ve arkadaşları (41) ZDV tedavisi alanlarda yüksek düzeyde ZDV direncini araştırmışlar, bunun 4-5 mutasyona bağlı olduğunu, yeni virus popülasyonunun replikasyon kinetiğinin değişmediğini vurgulamışlardır.

Harrigan ve Cote (42) direnç testlerine dayanan tedavi rejimlerinde virolojik cevabın standard tedavilere göre daha iyi olduğu vurgulanmıştır.

Matsushita (43) HIV-1 tedavisinde en az üçlü kombinasyonların verilmesi gerektiğini vurgulamıştır. Yüksek aktif antiretroviral tedavi (“highly active antiretroviral therapy”, HAART) olarak tanımlanan bu tedavi ile AIDS’te morbidite ve mortalitenin azaldığını, 1.-2.-3. kuşak HAART için çok fazla seçenek olmadığını, yeni antivirallerin geliştirilmesi gerektiğini rapor etmiştir.

Niesters (28)’in raporunda lamivudin direnci araştırma sonuçları verilmiştir. Lamivudini tek ilaç olarak kullanan hastalarda %14-39 oranında YMDD motifi denen polimerazla ilgili DNA diziliminde mutasyona bağlı direnç gözlenmiştir. YVDD motifli diğer lamivudin direncinin aynı zamanda famsiklovir direnci ile birlikte olduğu vurgulanmıştır. Lamivudin direnci olmadığı halde tedavide viral yükün azalmadığı olgular olduğu ve bunlarda muhtemelen hepatosit içi ilaç düzeyinin yetersiz kaldığı rapor edilmiştir. Lamivudin direncini ölçen genotipik testler olarak DNA dizi analizi, RFLP, nokta mutasyonu, “line probe assay”, “specific molecular beacons” gibi tekniklerin uygulanabileceği vurgulanarak tedaviyi takipte HBV DNA yükünün daha önemli olduğu söylenmiştir.

Kantitatif HBV DNA ölçümünde hedef amplifikasyon, signal ampifikasyon (örneğin, bDNA, “hybrid capture tech-

nique”) kullanılabilmesi; signal amplifikasyonun 500-100 kopya/ml arasında varyantları tanıyabileceği bu incelemede belirtilmiştir. Aynı makalede “TaqMan” teknoloji, “real-time” PZR ile HBV DNA çalışmalarının daha çabuk rutine uygulanabilir şekilde yapılabileceği kaydedilmiştir.

Fontaine ve arkadaşları (29) böbrek transplantı yapılmış hastalar ve hemodiyalize giren hastalardan HBV enfeksiyonu olanlarda lamivudine dirençli olguları araştırmışlardır. Lamivudin ile tedavi edilen 26 böbrek hastasının 8’inde ve hemodiyalize giren 5 hastanın 2’sinde tedaviden ortalama 16.5 ay sonra HBV DNA serumda tekrar gözlenmiştir. Buna “breakthrough” tanımlaması getirilmiş, bu hastalardan birinde YMDD motifli mutasyon gözlemlenmiştir.

Emery ve arkadaşları (44) 5 mg/kg/gün İV gansiklovir alan CMV’li hastalarda virolojik yanıtı %91.5; dirençli suşlarda %62 olarak tespit etmişlerdir. Buna karşılık 1 gr/gün oral gansiklovir alan CMV’li hastalarda virolojik yanıt %46.5, dirençli suşlarda %35 olarak bulunmuştur. Bu çalışmaya göre dirençli CMV suşlarında gansiklovire cevabı önceden tahmin etmenin mümkün olacağı rapor edilmiştir.

Limaye ve arkadaşları (45) solid organ transplantı yapılan, semptomlu CMV enfeksiyonu gelişen ve gansiklovir verilen 240 hastayı direnç yönünden araştırmışlardır. Gansiklovir tedavisi başarısız olan verici-pozitif/alıcı-negatif olan 67 hastanın 5’inde (%7) ciddi komplikasyonlarla giden gansiklovir direncini tespit etmişler ve bunlarda UL97 dizi mutasyonlarını belirlemişlerdir.

Bu veriler göstermektedir ki, antiviral direnç testlerinin standardizasyonuna ihtiyaç vardır. Bu testlerin rutinde uygulanabilmesi için kolay, ucuz ve kısa sürede sonuç veren testler olarak geliştirilmesi gerekir. Bu koşullar yerine getirilirse bu testler optimal antiviral tedaviyi düzenlemede klinisyene faydalı olacaktır.

Kaynaklar

1. Ustaçelebi Ş. Viral enfeksiyonlarda tanı yöntemleri. In: Ustaçelebi Ş, ed. *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji*. Ankara: Güneş Kitabevi, 1999; 783-9
2. Swierkosz EM, Hodinka RL. Antimicrobial agents and susceptibility tests. In: Murray RP, Baron E, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH, eds. *Manual of Clinical Microbiology*. 7th ed. Washington, DC: ASM Press, 2000; 1624
3. Hertogs K, De Bethune MP, Miller V, et al. A rapid method for simultaneous detection of phenotypic resistance to inhibitors of protease and reverse transcriptase in recombinant human immunodeficiency virus type 1 isolates from patients treated with antiretroviral drugs. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42:269-76
4. Hayden FG, Cote KM, Douglas GD. Plaque inhibition assay for drug susceptibility testing of influenza viruses. *Antimicrob Agents Chemother* 1980; 17:865-70
5. Tebas P, Stabel EC, Olivo PD. Antiviral susceptibility testing with a cell line which expresses β -galactosidase after infection with herpes simplex virus. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39:1287- 91
6. Swierkosz EM, Biron KK. Antiviral susceptibility testing. In: Lennette EH, Lennette DA, Lennette ET, eds. *Diagnostic Procedures for Viral, Rickettsial and Chlamydial Infections*. 7th ed. Washington, DC: American Public Health Association, 1995; 139-54
7. Baldanti F, Underwood MR, Stanat SC, et al. Single amino acid changes in the DNA polymerase confer foscarnet resistance and slow-growth phenotype, while mutations in the UL 97-encoded phosphotransferase confer ganciclovir resistance in there double-resistant human cytomegalovirus strains recovered from patients with AIDS. *J Virol* 1996; 70:1390-5

8. Dankner WM, Scholl D, Stanat SC, Martin M, Sonke RL, Spector SA. Rapid antiviral DNA-DNA hybridization assay for human cytomegalovirus. *J Virol Methods* 1990; 28:293-8
9. Hill EL, Ellis MN, Nguyen-Dinh P. Antiviral and antiparasitic susceptibility testing. In: Balows A, Hausler WJ, Herrmann HD, Isenberg HD, Shadomy HJ, eds. *Manual of Clinical Microbiology*. 5th ed. Washington, DC:ASM Press, 1991:1184
10. Hodinka RL. What clinicians need to know about antiviral drugs and viral resistance. *Infect Dis Clin North Am* 1997; 11:945-67
11. McSharry JM, Lurain NS, Drusano GL, et al. Flow cytometric determination of ganciclovir susceptibilities of human cytomegalovirus clinical isolates. *J Clin Microbiol* 1998; 36:958-64
12. Lipson SM, Soni M, Biondo FX, Shepp DH, Kaplan MH, Sun T. Antiviral susceptibility testing- flow cytometric analysis (AST-FCA) for detection of cytomegalovirus drug resistance. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1997; 28:123-9
13. Martin JL, Ellis MN, Keller PM, et al. Plaque autoradiography assay for the detection and quantitation of thymidine kinase- deficient and thymidine kinase-altered mutants of herpes simplex virus in clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 1985; 28:181-7
14. Japour AJ, Mayers VA, Johnson DR, et al. Standardized peripheral blood mononuclear cell culture assay for determination of drug susceptibilities of clinical human immunodeficiency virus type 1 isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 1993; 37: 1095-101
15. Shi C, Mellors JW. A recombinant retroviral system for rapid in vivo analysis of human immunodeficiency virus type 1 susceptibility to reverse transcriptase inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41:2781-5
16. Boivin G, Chou S, Quirk MR, Erice A, Jordan MC. Detection of ganciclovir resistance mutations and quantitation of cytomegalovirus (CMV) DNA in leukocytes of patients with fatal disseminated CMV disease. *J Infect Dis* 1996; 173:523-8
17. Chou S, Marousek G, Guentzel SE, et al. Evolution of mutations conferring multidrug resistance during prophylaxis and therapy for cytomegalovirus disease. *J Infect Dis* 1997; 176:786-9
18. Larder BA, Kohli A, Kellam P, Kemp SD, Kronick M, Henfrey RD. Quantitative detection of HIV-1 drug resistance mutations by automated DNA sequencing. *Nature* 1993; 365:671-3
19. Hirsch MS, Brun-Vezinet F, D'Aquila R, et al. Antiretroviral drug resistance testing in adult HIV-1 infection: recommendations of the International AIDS Society-USA panel. *JAMA* 200;283:2417-26
20. Chong KT, Pagano PJ. In vitro combination of PNU-140690, a human immunodeficiency virus type 1 protease inhibitor, with ritonavir against ritonavir- sensitive and -resistant clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41:2367-73
21. Persing DH, Rellman DA, Tenover FC. Genotypic detection of antimicrobial resistance. In: Persing DH ed. *PCR Protocols for Emerging Infectious Diseases*. Washington DC:ASM Press 1996: 43-7
22. Iverson AK, Shafer KW, Wehrly MA, et al. Multidrug-resistant human immunodeficiency virus type 1 strains resulting from combination antiretroviral therapy. *J Virol* 1996; 70:1086-90
23. Deminie CA, Bechtold CM, Stock D, et al. Evaluation of reverse transcriptase and protease inhibitors in two-drug combinations against human immunodeficiency virus replication. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40:1346-51
24. Hayden FG. Antiviral drugs (other than antiretrovirals). In: Mandell LG, Bennett JE, Dolin R, eds. *Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*. 5th ed. Philadelphia:Churchill Livingstone, 2000: 460-91
25. Schinazi RF, Larder BA, Mellors JW. Mutations in HIV-1 reverse transcriptase and protease associated with drug resistance. *Int Antivir News* 1997;5:129-34
26. Shafer RW, Winters MA, Mayers AJ, et al. Interlaboratory comparison of sequence-specific PCR and ligase detection reaction to detect a human immunodeficiency virus type 1 drug resistance mutation. *J Clin Microbiol* 1996; 34:1849-53
27. St.Clair MH, Martin JL, Tudor-Williams G, et al. Resistance to ddI and sensitivity to AZT induced by a mutation in HIV-1 reverse transcriptase. *Science* 1991; 253: 1557-9
28. Niesters HGM. Resistance testing in hepatitis management. Diagnostic Technologies in the Management of HIV/AIDS and Other Life-Threatening Coinfectious Diseases: An IAPAC Symposium (October 10, 1999, Vienna, Austria). *J Int Assoc Physicians AIDS Care* 2000;6(2):38-41
29. Fontaine H, Thiers V, Chretien Y, et al. HBV genotypic resistance to lamivudine in kidney recipients and hemodialyzed patients. *Transplantation* 2000; 69:2090-4
30. Safran S, Crumpacker PC, Davis R, et al. A controlled trial comparing foscarnet with vidarabine for acyclovir-resistant mucocutaneous herpes simplex in the acquired immunodeficiency syndrome. *N Engl J Med* 1991; 325:551-5
31. Tebas P, Scholl D, Jollick J, McHarg K, Arens M, Olivo PD. A rapid assay to screen for drug-resistant herpes simplex virus. *J Infect Dis* 1998; 177:217-20
32. Kost RG, Hill EL, Tigges M, Straus SE. Recurrent acyclovir resistant genital herpes in an immunocompetent patient. *N Engl J Med* 1993; 329:1777-82
33. Smith IL, Cherrington JM, Jiles RE, Fuller MD, Freeman WR, Spector SA. High-level resistance of cytomegalovirus to ganciclovir is associated with alterations in both the UL97 and DNA polymerase genes. *J Infect Dis* 1997; 176:69-77
34. Spector SA, Hsia K, Wolf D, Shinkai M, Smith I. Molecular detection of human cytomegalovirus and determination of genotypic ganciclovir resistance in clinical specimens. *Clin Infect Dis* 1995; 21:170-3
35. Wolf DG, Smith IL, Lee DJ, Freeman WR, Flores-Aguilar M, Spector SA. Mutations in human cytomegalovirus UL97 gene confer clinical resistance to ganciclovir and can be detected directly in patient plasma. *J Clin Invest* 1995; 95:257-63
36. Harrigan PR, Hertogs K, Verbiest W, et al. Baseline HIV drug resistance profile predicts response to ritonavir-saquinavir protease inhibitor therapy in a community setting. *AIDS* 1999; 13:1863-71
37. Pellegrin I, Izopet J, Reynes J, et al. Emergence of zidovudine and multidrug-resistance mutations in the HIV-1 reverse transcriptase gene in therapy-naive patients receiving stavudine plus didanosine combination therapy. STADI Group. *AIDS* 1999; 13:1705-9
38. Garcia-Lerma JG, Gerrish PJ, Wright AC, Qari SH, Heneine W. Evidence of a role for the Q151L mutation and the viral background in development of multiple dideoxynucleoside-resistant human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 2000; 74:9339-46
39. Ballotta C, Violin M, Monno L, et al. Prevalence of multiple dideoxynucleoside analogue resistance (MddNR) in a multicenter cohort of HIV-1-infected Italian patients with virologic failure. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2000; 24:232-40
40. Chaix C, Grenier-Sennelier C, Clevenbergh P, et al. Economic evaluation of drug resistance genotyping for the adaptation of treatment in HIV-infected patients in the VIRADAPT study. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2000; 24:227-31
41. Kellam P, Boucher CA, Tijnagel JM, Larder BA. Zidovudine treatment results in the selection of human immunodeficiency virus type 1 variants whose genotypes confer increasing levels of drug resistance. *J Gen Virol* 1994; 75:341-51
42. Harrigan PR, Cote HC. Clinical utility of testing human immunodeficiency virus for drug resistance. *Clin Infect Dis* 2000; 30:117-22
43. Matsushita S. Current status and future issues in treatment of HIV-1 infection. *Int J Hematol* 2000; 72:20-7
44. Emery VC, Griffiths PD. Prediction of cytomegalovirus load and resistance patterns after antiviral chemotherapy. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97:8039-44
45. Limaye AP, Corey L, Koelle DM, Davis CL, Boeckh M. Emergence of ganciclovir-resistant cytomegalovirus disease among recipients of solid-organ transplants. *Lancet* 2000; 356:645-9