

Hepatit C Virus (HCV) RNA Pozitif Olgularda Genotip Dağılımı

The Distribution Of Genotype Of The Hepatitis C Virus (HCV) RNA Positive Patients

İhsan Hakkı ÇİFTÇİ, Halil ER, Gülşah AŞIK, Orhan Cem AKTEPE, Mustafa ALTINDİŞ

Afyon Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı,

ÖZET: Amaç: Flaviviredeae ailesinden bir virus olan Hepatit C virusu (HCV) akut hepatitlerin %20'si, kronik hepatitlerin %70'inden sorumludur. HCV'nin genotip tayini tedavide ve klinik sürecin takibinde önemlidir. Çalışmamızda Afyon Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji laboratuvarına kan örnekleri gönderilen 34 HCV RNA pozitif hastada genotip dağılımının saptanması amaçlanmıştır.

Yöntem: Örneklerin genotiplendirilmesinde Geno Sen's HCV Genotyping 1/2/3/4 Real Time PCR Reagents Kiti (Corbett Research, Australia) kullanılmıştır. Hastaların viral yükleri 34×10^3 ile 17×10^6 arasında bulunmuş olup viral yük ortalamaları ise 46×10^5 olarak saptanmıştır. Çalışılan 34 örnekten 31'i genotip 1, 3'ü genotip 4 olarak bulunmuştur.

Sonuç: Sonuç olarak klinik sürecin takibi ve antiviral tedavi seçiminde genotip tayinin yol gösterici olması sebebiyle bu tip çalışmaların önemli olduğu düşünülmektedir.

Anahtar Sözcükler: Hepatit C virusu (HCV), genotip, Real Time PCR

ABSTRACT: Objective: Hepatit C virus (HCV), which is a virus from the family Flaviviredeae, is responsible for 20% of acute hepatitis and 70% of chronic hepatitis. Determination of HCV genotype is important in the treatment and the clinical follow-up process. In this study, we aimed to determine the genotype distribution of 34 HCV RNA positive patients whose sera were sent to Afyon Kocatepe University, Faculty of Medicine Microbiology laboratory.

Method: Geno Sen's HCV Genotyping 1/2/3/4 Real Time PCR Reagents Kit (Corbett Research, Australia) was used for genotype determination of those samples. Patients' viral loads were found between 34×10^3 - 17×10^6 and mean viral load was 46×10^5 . Thirty one samples, out of 34, were found genotype 1 while the other 3 samples were found genotype 4.

Results: Consequently, this type of studies are considered to be crucial since genotype determination has a guiding role in clinical follow-up process and the selection of antiviral therapy.

Key Words: Hepatit C virus (HCV), genotype, Real Time PCR

GİRİŞ

Hepatit C virusu (HCV), Flaviviredeae ailesinden zarflı tek iplikli bir RNA virusudur¹. Nükleik asit dizi analizi kullanılarak yapılan çalışmalarda HCV'nin en az 6 major genotipi ve 100 den fazla subtipi olduğu belirlenmiştir^{2,3}. Bunlardan bazıları tüm dünyada yaygın olarak görülürken diğerleri sadece bazı bölgelerde görülmektedir⁴. Akut hepatitlerin %20'si, kronik hepatitlerin ise %70'inden sorumlu tutulmaktadır⁵. Ayrıca HCV bütün dünyada siroz ve karaciğer kanserinin en önemli nedenleri arasında yer almaktadır¹.

HCV'nin hızlı replikasyon göstermesi ve bu replikasyon sırasında RNA transkripsiyonunda meydana gelen hatalar enfeksiyonun kronikleşmesinde önemli rol oynar^{6,7}. Replikasyon sırasında oluşan hatalar sonucu, kronik hepatit C'li hastalarda HCV'nin farklı genetik sekansları ile heterojen bir topluluk oluşur¹. Bu durumun mutant HCV'lerin immün sistemden kaçışına olanak sağladığı düşünülmektedir⁴.

Kronik HCV'li olguların tedavisinde interferon ve ribavirin kombinasyonu kullanılmaktadır⁵. HCV enfeksiyonlarında farklı genotiplerin, oluşacak hastalık tablosu ve tedavide farklılıklar ortaya çıkardığı bilinmektedir. Bu yüzden HCV genotiplerinin belirlenmesi klinik ve epidemiyolojik açıdan önem taşımaktadır^{4,8,9}.

Bu çalışmada Afyon Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji laboratuvarına gönderilen ve hepatit C şüphesi bulunan hastalara ait kan örneklerinden elde edilen, HCV RNA pozitif 34 serumda HCV genotip profillerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

HCV şüphesi ile laboratuvarımıza gönderilen kan örneklerinden viral RNA, ticari ekstraksiyon kiti (QIAGEN, EZ1 Virus Mini Kit v2.0) kullanılarak elde edilmiş ve aynı gün PCR kiti (HCV RG RT-PCR Kit V1) ile HCV RNA kantitasyonu Rotor-Gene RG-3000 (Corbett Research, Qiagen) cihazı yardımıyla çalışılmıştır. Çalışmada kit içerisinde bulunan Master A'dan 12 µl, Master B'den 18 µl ve HCV-RNA pozitif hasta serumlarından elde edilen ekstraksiyon ürünlerinden 20 µl kullanılarak total 50 µl olacak şekilde karışım hazırlanmıştır. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) yöntemi ile üretici firma önerileri doğrultusunda 95° C'de 15 dakikalık tek bir döngüden sonra, 95° C'de 30 saniye, 50° C'de 1 dakika ve 72° C'de 30 saniye olmak üzere 45 kez döngü gerçekleştirilmiştir.

Örneklerin genotiplendirilmesi Geno Sen's HCV Genotyping 1/2/3/4 Real Time PCR Reagents Kiti (Corbett Research, Australia) ile gerçekleştirilmiştir. Genotip 1 için CY5 ile işaretli, genotip 2 için FAM ile işaretli, genotip 3 için ROX ile işaretli ve genotip 4 için JOE ile işaretli probler kullanılmıştır. Her bir reaksiyon için 7.5 µl HCV Genotyping Super Mix, 2.5 µl HCV Genotyping Mg Solüsyon ve 15 µl hasta serumu kullanılmıştır. Rotor-Gene RG-3000 (Corbett Research, Qiagen) ile 95° C'de

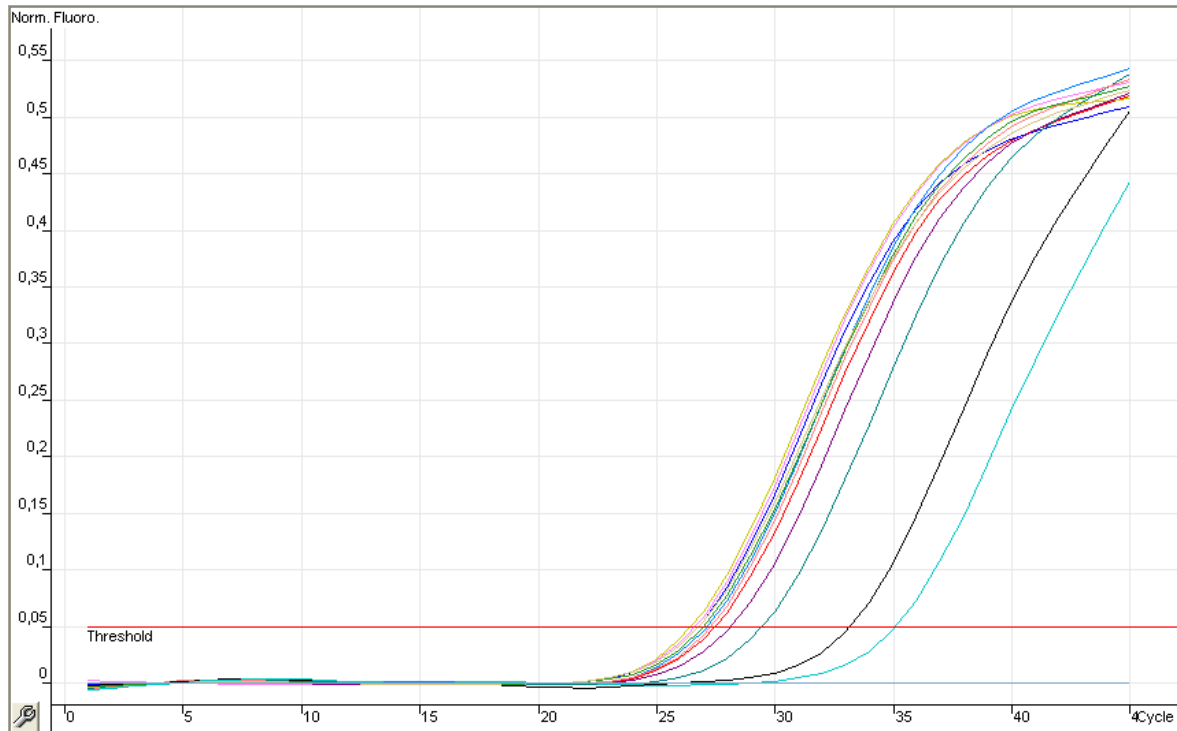
10 dakikalık tek bir döngüden sonra, 95° C'de 15 saniye, 55° C'de 20 saniye ve 72° C'de 15 saniye olmak üzere 45 kez döngü yapılmıştır.

BULGULAR

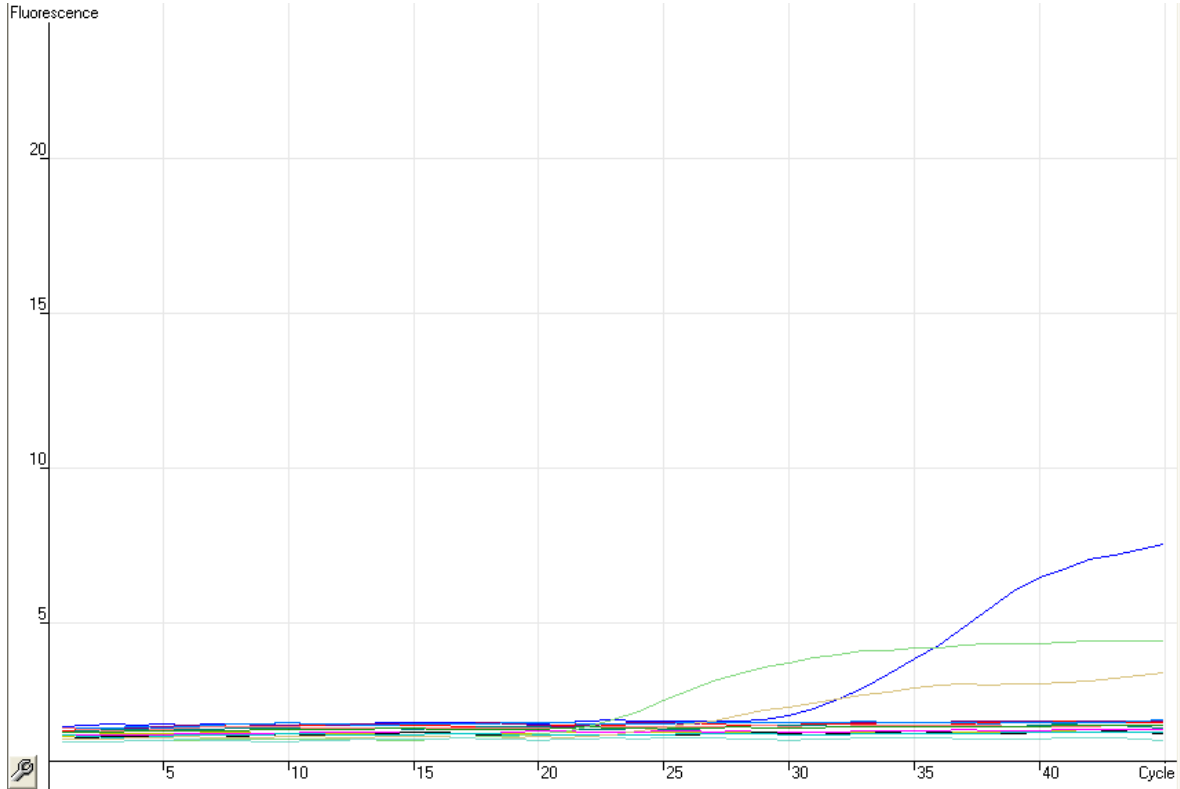
Hastalardan 21'inin kadın 13'ünün erkek olduğu, yaşlarının 27 ile 70 arasında değiştiği, yaş ortalamalarının 52.9 olduğu gözlenmiştir. Hastalara ait viral yük 34x10³ kopya/ml ile 17x10⁶ kopya/ml arasında bulunmuş, ortalama değer 46x10⁵ kopya/ml olarak saptanmıştır. Toplam 34 örneğin 31'sinin genotip 1, 3 örneğin ise genotip 4 olduğu belirlenmiştir. Genotip 1 saptanan olguların kadın erkek dağılımı 13 kadın 18 erkek, yaş ortalamaları 52.2, viral yük ortalamaları 36x10⁵ olarak bulunmuş olup, genotip 4 olan olguların ise tamamı kadın, yaş ortalamaları 59.3, viral yük ortalamaları 57x10⁵ olarak tesbit edilmiştir.(Tablo)

Tablo 1. Diagnostik Veriler ve Viral Yük Ortalamaları

	Genotip 1 (n=31)	Genotip 4 (n=3)
Erkek/Kadın	13/18	0/3
Yaş (ortalama)	52.2	59.3
Viral yük (ortalama)	36x10 ⁵	57x10 ⁵



Şekil 1. Real-Time PCR genotip 1 pozitif örnekler için grafik



Şekil 2. Real-Time PCR genotip 4 pozitif örnekler için grafik

TARTIŞMA

HCV ile infekte hastalarda hastanın yaşı, hastalığın süresi, alkol kullanımı, karaciğerin histolojik özelliği, diğer hepatit virusleri ile koinfeksiyon, virusun bulaşma yolu, viral yük ve HCV'nin genotipik değişkenliği kronik infeksiyon gelişmesinde rol oynayan faktörler olarak karşımıza çıkar^{1,4,6,7}.

Türkiye'de hepatit C'li olgularda genotip dağılımı ile ilgili Abacıoğlu ve ark.¹⁰'nin yaptığı çalışmada 89 HCV RNA pozitif olguda %75.3 tip 1b, %19.1 tip 1a, %3.4 tip 2 ve %2.2 oranında tip 4 saptanmıştır. Yarkin ve ark.¹¹'nin 2000 yılında Revers Transkriptaz-PCR tekniği kullanarak yaptığı 72 olguluk çalışmada %82.2 tip 1b, %14.5 tip 1a, %3.3 tip 2a bulurken, 2002 yılında Erensoy ve ark.¹²'nin 45 olguda yaptığı çalışmada %66.7 tip 1b ve %33.3 tip 1a saptanmıştır. Ural ve ark.¹³'nin 2007'de Konya bölgesinde yaptığı çalışmada 80 HCV RNA pozitif olgunun tamamı genotip 1b olarak bildirilmiştir.

Dündar¹⁴'ın 90 HCV RNA pozitif olguyla yaptığı çalışmada %91.1 oranında genotip 1, %7.8 oranında genotip 3 ve %1.1 oranında genotip 4 tesbit edilmiştir. Şanlıdağ¹⁵ ve ark.'nin Manisa bölgesinde

yaptığı 100 olguluk çalışmanın %90'ında genotip 1b, %2'sinde genotip 1a, %5'inde genotip 4a, %2'sinde genotip 2a saptanmış olup 1 örnekte genotip tayini yapılamamıştır.

Bölgemizde daha önce Kalaycı ve Ark.¹⁶'nin yaptığı çalışmada 30 HCV RNA pozitif olgudan %86.6'sı genotip 1, %13.1'i ise genotip 4 olarak saptanmıştır.

Türkiye'de yapılan çalışmalarda genotip 1b'nin %66.7-100 oranı ile HCV genotipleri içinde birinci sıklıkla saptanan tip olduğu görülmektedir. Bunu %5.8-33.3 oranında genotip 1a izlemektedir. Genotip 2a, 3a, 4, 4c ise daha az sıklıkla bildirildiği gözlenmektedir^{10,17}.

Lübnan'da Mahfaud ve ark.¹⁸'nin yaptığı 28 HCV RNA pozitif olguluk çalışmada %57 genotip 3, %21 genotip 1, %18 genotip 4, %4 ise genotip 1 ve 3 olarak miks genotip saptamışlardır. İtalya'da Cenci ve ark.¹⁹'nin yaptığı 915 hastalık çalışmada ise %49 ile genotip 1 ilk sırayı alırken bunu %34.8 ile genotip 2, %11.9 ile genotip 3, %3.6 ile genotip 4 izlemiştir.

Çalışmamızda elde edilen sonuçlar ülkemizde yapılan çalışmalarla ve bölgemizde önceki yıllarda yapılan 30 hastayı kapsayan çalışma sonuçları ile

benzerlik göstermektedir. Sonuçlarımız göz önüne alındığında bölgemizdeki HCV genotipinin sıklıkla genotip 1 olduğu ve nadiren de genotip 4'e rastlandığı gözlenmektedir. Bu sonuçlar HCV takibinde yol gösterici olacaktır. Zira HCV genotip 1'li olgularda gerek IFN monoterapisinde gerekse IFN- α +ribavirin tedavisinde başarı oranının diğer genotiplere göre daha düşük olduğu bildirilmiştir. Genotip 1'e sahip olgularda 12 ay süre ile tedavi önerilmektedir⁵. IFN tedavisine genotip 2 ve 3'ün daha iyi yanıt verdiği ifade edilmiştir⁴. Kronik hepatit C tedavisinde kullanılan Pegilated interferon (PEG-IFN)+Ribavirin kombinasyonu diğer genotiplerde, genotip 1'e göre daha başarılı olduğu saptanmıştır²⁰.

Sonuç olarak klinik sürecin takibi ve antiviral tedavinin seçiminde HCV'nin genotip tayini yol göstericidir. Tüm dünyada ve ülkemizde olduğu gibi çalışmamızda da en yaygın genotipin tip 1 olduğu gözlenmektedir. Bu bağlamda bölgemizde HCV enfeksiyonlarının moleküler epidemiyolojisinin belirlenmesi ve genotip profilinin takibi açısından bu tip çalışmalar önemlidir. Ancak HCV genotiplerinin yanı sıra subtiplerin de belirlenmesine yönelik çalışmalar konunun aydınlatılmasına katkı sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

1. Koff RS. Hepatitis C. In: Gorbach SL, Bartlett JG, Blacklow NR, eds. Infectious Diseases. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott Williams, 2004: 779-784.
2. Davis GL. Hepatitis C genotypes and quasispecies. Am J Med 1999; 107: 21-26.
3. Forns X, Bukh J. The molecular biology of hepatitis C virus, genotypes and quasispecies. Clinics in Liver Diseases 1999; 3: 693-716.
4. Thomas DL, Lemon SM. Hepatitis C. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds. Principles and Practice of Infectious Diseases. 5th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone, 2000: 1736-1760.
5. Sünbül M, Leblebicioğlu H. Kronik hepatit C tedavisinde PEG-interferonların kullanımı. Flora 2003; 8: 3-16.
6. Akız H. Kronik C hepatitinde tedavi. Çakaloğlu Y, Ökten A, ed. Kronik Viral Hepatitlerde Tedavi Yaklaşımları. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi, 1998: 57-62.
7. Sherlock S, Dooley J. Diseases of the Liver and Biliary System. 11th ed. London: Blackwell Publishing Ltd, 2002: 305-319.
8. Kobayashi Y, Watanabe S, Konishi M, et al. Quantitation and typing of serum hepatitis C treated with interferon-beta. Hepatology 1994; 18:1319-1325.
9. McOmish F, Yap PL, Dow BC, et al. Geographical distribution of hepatitis C virus genotypes in blood donors: An international collaborative study. J Clin Microbiol 1994; 32: 884-892.
10. Abacıoğlu YH, Davidson F, Tuncer S, et al. The distribution of hepatitis C virus genotype in Turkish patients. J Viral Hepat 1995; 2: 297-301.
11. Yarkin F, Hafta A. Kronik hepatit C enfeksiyonu olan hastalarda hepatit C virus genotiplerinin dağılımı. Viral Hepatit Dergisi 2000; 3: 164-167.
12. Erensoy S, Göksel S, Akarca US, Özkahya M, Canatan D. Hepatit C virusun polimeraz zincir reaksiyonu ürünlerinin doğrudan dizi analizi ile genotiplendirilmesi. Flora 2002; 7: 104-111.
13. Ural O, Uğur A, Fındık D. Konya Bölgesinde Hepatit C Virüsü Genotip Dağılımı. Enfeksiyon Dergisi 2007; 21:175-181
14. Dündar G. Hepatit C Virüs RNA Pozitif Olgularda HCV Genotiplerinin Araştırılması. XXXII. Türk Mikrobiyoloji Kongresi 12-16 Eylül 2006; Belek Antalya
15. Şanlıdağ T, Akçalı S, Özbakkaloğlu B, Ertekin D, Akduman E. Manisa Bölgesinde Hepatit C Virüs Genotip Dağılımı. XXXII. Türk Mikrobiyoloji Kongresi 12-16 Eylül 2006; Belek Antalya
16. Kalaycı R, Altındiş M, Gülanber C, Demirtürk N, Akcan Y, Demirdal T. Kronik Hepatit B ve Hepatit C'li Hastalarda Genotip Dağılımı ve Hepatit B Olgularında Direnç Paterninin Araştırılması. Mikrobiyol Bul. 2010; 44: 237-243
17. Yıldız E, Öztan A, Sur F, et al. Molecular characterization of a full genome Turkish hepatitis C virus 1b isolate (HCV-TR1): A predominant viral form in Turkey. Virus Gene 2002; 25: 169-177.
18. Mahfaud Z, Kassak K, Kreidieh K, Shamra S, Ramia S. Distribution of hepatitis C virus genotypes among injecting drug user in Lebanon. Virology Journal 2010, 7:96
19. Cenci M, De Soccio G, Recchia O. Prevalence of hepatitis C virus(HCV) genotypes in central Italy. Anticancer Res. 2003 Nov-Dec;23: 5129-5132.
20. McHutchison JG. Hepatitis C advances in antiviral therapy: What is accepted treatment now? J Gastroenterol Hepatol 2002; 17: 431-441.

