

Hepatit C Virüs Genotiplerinin Pirosekanslama Yöntemi ile Belirlenmesi

Determination of the Hepatitis C Virus Genotypes With 'Pyrosequencing' Method

Selma Gökahmetoğlu

Prof. M.D.
Department of Microbiology and Clinical Microbiology
Erciyes University
selmag@erciyes.edu.tr

Mustafa Altay Atalay

Specialist. M.D.
Department of Microbiology and Clinical Microbiology
Erciyes University
altayatalay@gmail.com

Aytekin Kılınc

M.D.
Department of Microbiology and Clinical Microbiology
Erciyes University
aytekinkinc@hotmail.com

The present study was presented at the XXXIVth National Microbiology Congress, 7-11, November, 2010Year, GirneCity, North Cyprus Country.

Submitted : February 04, 2011
Revised : March 30, 2011
Accepted : May 02, 2011

Corresponding Author:

Uzman Dr. Mustafa Altay Atalay
Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi,
Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı,
38039 Kayseri, Turkey

Phone : +90- 352 4374937-20204
e-mail : altayatalay@gmail.com

Özet

Amaç: HCV genotiplerinin belirlenmesi kronik hepatit C'li hastaların takip ve tedavisi açısından önemli bilgi sağlamaktadır. HCV genotip 1b'de hem interferon tedavisine yanıt daha düşük oranda meydana gelmekte hem de hepatosellüler karsinoma gelişme riski daha fazla olarak bulunmaktadır. Bu çalışmada, kronik hepatit C ön tanısı ile farklı kliniklerden gelen hastaların HCV RNA pozitif kan örneklerinde HCV genotiplerinin belirlenmesi amaçlandı.

Gereç ve Yöntemler: Çalışmaya 146 hastadan elde edilen kan örneği dahil edildi. Hastaların 98 (%67,1)'i kadın 48 (%32,9)'i erkek idi. Örneklerde HCV genotip analizi Pirosekanslama yöntemi ile araştırıldı.

Bulgular: HCV genotiplerinin 90 (% 61,7)'i genotip 1; 52 (%35,6)'si genotip 4; 4 (%2,7)'ü genotip 2 olarak bulundu. Genotip 1 olarak bulunan 90 örneğin 77'si genotip 1b; 5'inin genotip 1a olduğu belirlenirken, 8'inin alt tipi belirlenemedi.

Sonuç: Sonuç olarak, kronik hepatit C'si olan hastalarda en yaygın genotipinin 1b olduğu saptandı.

Anahtar Kelimeler: **Hepatit C virüsü; Kronik Hepatit C, Genotip.**

Abstract

Purpose: Determination of HCV genotypes in terms of management and treatment of chronic hepatitis C patients provides important information. In HCV genotype 1b, both lower rate of response to interferon treatment occurs and there is more risk for development of hepatocellular carcinoma. The purpose of this study was to investigate the distribution of HCV genotypes among patients from different clinics with the pre-diagnosis of chronic hepatitis C and positive for HCV RNA in blood samples.

Material and Methods: Blood samples of 146 patients were included in this study. Ninety-eight patients were females (67.1%) and 48 males (32.9%). HCV genotype analyses of the samples were investigated by pyrosequencing method (Qiagen, Germany).

Results: Genotype 1, genotype 4 and genotype 2 were detected in 90 (61.7 %) of patients, 52 (35.6 %) of patients and 4 (2.7 %) of the patients respectively. In genotype 1 group, genotype 1b was detected in 77 of 90 samples and genotype 1a was detected in 5 of 90 samples 1, however subgenotyping failed in 8 patients.

Conclusion: As a result, HCV genotype 1b is the most common genotype in patients with chronic hepatitis C.

Key words: **Hepatitis C virus; Chronic Hepatitis C Genotype.**

Giriş

Hepatit C virüs (HCV) enfeksiyonu tüm dünyada yaygın, oldukça ciddi bir sağlık sorunudur. Dünyada 170 milyondan fazla insan HCV ile kronik olarak enfektir. HCV enfeksiyonu kronik karaciğer hastalığından ölümlerin en sık görülen nedenlerinden biridir. HCV kronik karaciğer hastalığının en az %40'ından sorumludur (1).

HCV'nin farklı genotipleri hastaların takip ve tedavisini belirlemede önemlidir. Bazı araştırmacılara göre 6 (2), bazılarına göre ise 11 (2) ana HCV genotipi bulunmaktadır. HCV genotip 1a Kuzey Amerika ve Avrupa'da; 1b Japonya, Güney ve Doğu Avrupa'da; genotip 2a-2b Kuzey Amerika, Avrupa ve Japonya'da; genotip 3 Güney Doğu Asya'da ve damar içi uyuşturucu bağımlılarında; genotip 4 Orta Doğu, Mısır ve Orta Amerika'da; genotip 5 Güney Afrika'da; genotip 6 Hong Kong ve Vietnam'da sıklıkla görülmektedir (3). HCV genotip 1b'de hem interferon tedavisine yanıt daha düşük oranda meydana gelmekte hem de hepatosellüler karsinoma gelişme riski daha fazla olarak bulunmaktadır (2). Ülkemizde yapılan çalışmalarda en sık olarak HCV genotip 1b'nin bulunduğu bildirilmiştir (3, 4).

HCV genotiplerinin belirlenmesinde doğrudan dizi analizi, ters hibridizasyon, *restriction fragment length polymorphism* (RFLP), tipe özgü PCR, ve serotiplendirme metotları uygulanmaktadır (5). pirosekslama, DNA sentezi esnasında açığa çıkan pirofosfatların saptanması esasına dayanan bir gerçek zamanlı kantitatif dizi analizi tekniğidir (6).

Bu çalışmada, yeni bir yöntem olan *Pirosekslama* yöntemi ile Kayseri ilindeki kronik hepatit C öntanısı olan hastaların HCV genotiplerinin belirlenmesi amaçlandı.

Yöntem ve Gereçler

Çalışmaya, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Enfeksiyon Hastalıkları ve Gastroenteroloji bölümlerinde kronik hepatit C ön tanısı ile takip edilen 146 hastanın kan örnekleri dahil edildi. Hastaların özellikleri Tablo I'de gösterilmektedir. Örneklerin hepsi anti-HCV pozitif idi. Örneklerin HCV-RNA düzeyleri gerçek zamanlı PCR yöntemi (Taqman 48, Roche) ile araştırıldı.

Tablo I. Çalışmaya Alınan Tüm Hastaların (n=146) Cinsiyet, Yaş ve HCV-RNA düzeyleri.

Özellik	
Cinsiyet (erkek/kadın)	48/98
Yaş aralığı (yıl)	48-72
HCV-RNA düzeyi (IU/mL)	10 ³ -10 ⁶

Örneklerde HCV genotip analizi *Pirosekslama* yöntemi (Qiagen, Almanya) ile araştırıldı. HCV genotiplendirme için, örnek başına iki PCR reaksiyonu ve dört *Pirosekslama* reaksiyonu uygulandı. Örneklerden RNA izolasyonu üretici firmanın önerileri doğrultusunda otomatik izolasyon sistemi (EZ1, Qiagen) ile yapıldı. HCV genomunun iki bölgesi (5'UTR ve core) PCR ile çoğaltıldı. 1., 2. 3. sekans primerleri (S1, S2, S3) 5'UTR bölgesinden; 4.sekans primeri (S4) core bölgesinden hazırlandı. Revers transkriptaz PCR (RT-PCR) reaksiyon kompozisyonu Tablo II'de gösterilmektedir.

Tablo II. RT-PCR Reaksiyon Kompozisyonu.

Bileşen	Hacim/reaksiyon
5X RT-PCR buffer	10 µL
dNTP	2 µL
HCV primer çifti	2 µL
RT-PCR enzim karışımı	2 µL
Su	29 µL
RNA	5 µL
Toplam	50 µL

PCR protokolü ise 50 °C'de 30 dakika süren reverse transkripsiyon basamağı, 95 °C'de 15 dakika süren aktivasyon basamağından sonra, bir siklusu 94 °C'de 30 saniye, 58 °C'de 30 saniye ve 72 °C'de 30 saniye olmak üzere toplam 45 siklus yapıp, 72 °C'de 10 dakika süren son uzama basamağından oluştu.

PCR ürünlerinin streptavidin sepharose boncukları ile karşılaştırma işlemi üretici firmanın önerileri doğrultusunda yapıldı. Pyromark Q24 cihazında analiz işlemleri tamamlandı ve HCV genotipleri belirlendi.

Bulgular

Tablo III' de HCV genotiplerinin dağılımı verilmiştir. HCV genotiplerinin 90 (% 61,7)'i genotip 1; 52 (%35,6)'si genotip 4; 4 (% 2,7)'ü genotip 2 olarak bulundu. Genotip 1 olarak bulunan 90 örneğin 77'sinin genotip 1b; 5'inin genotip 1a olduğu belirlenirken, 8'inin alt tipi belirlenemedi.

Genotip 4 olarak bulunan 52 örneğin 13'ünün genotip 4d; 7'sinin genotip 4a olduğu belirlenirken, 32'sinin alt tipi belirlenemedi. Genotip 2 olarak bulunan örneklerin hepsinin alt tipi genotip 2a olarak bulundu.

Tablo III. HCV Genotiplerinin Dağılımı.

HCV genotip	N	%	
1	90	61,7	
1a		5	5.5
1b		77	85.5
Alt tipi belirlenemeyen genotip 1		8	9
2	4	2,7	
2a		4	100
4	52	35,6	
4a		7	13.5
4d		13	25
Alt tipi belirlenemeyen genotip 4		32	61.5

Tartışma

Hepatit C virüsü ile infekte hastalarda kronik enfeksiyon gelişmesinde rol oynayan konak ve viral faktörler vardır. Bunlar hastanın yaşı, hastalığın süresi, alkol kullanımı, karaciğerin histolojik özelliği, diğer hepatit virusleri ile koinfeksiyon, virusun bulaşma yolu, viral yük ve HCV'nin genotipik değişkenliğidir. HCV genotipinin, interferon tedavisine yanıtı etkileyen bağımsız bir faktör olduğu kabul edilmektedir (7). Bu nedenle, kronik HCV'li olgularda genotipin araştırılması, tedaviye yanıtı ve tedavi süresini belirlemede önemlidir (5, 7).

Restriction fragment length polymorphism (RFLP), allel-spesifik PCR ve *line prob assay* (LIPA) gibi teknikler Kuzey Amerika, Avrupa ve Japonya'da çok sık bulunan HCV ana ve alt tiplerini tanımlamada geniş ölçüde kullanılmaktadır. Diğer taraftan bu protokoller olası tüm alt tipleri tek başına ayırt edememektedir. DNA sekans analizi tüm viral subtipleri ayırt eden ve altın standart olarak kabul edilen yöntemdir (8). Bu çalışmada da HCV genomunun sekans analizi için *Pirosekanslama* yöntemi kullanıldı.

Sunulan çalışmada hepatit C olgularında en sık rastlanan HCV genotipi %61,7 oranı ile Tip 1 genotip idi. Bu oran, Revers transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR), Chiron RIBA 2 assay, Nested PCR veya RFLP tekniklerini kullanan diğer çalışmalarda %66,7 ile %100 arasında bulunmuştur (3, 4, 9–19). Çalışmamızda bulunan

Tip 1a oranı %5,5 iken diğer yöntemlerle yapılan çalışmalarda %3,5-%33,3 arasında bildirilmiştir (3, 4, 9–11, 13–18). Çalışmamız sonuçlarına göre ikinci sıklıkta (%35,6) Tip 4 genotipi gözlenmiştir. Bu oran benzer çalışmalarda bildirilen Tip 4 genotip oranlarından oldukça yüksektir. Diğer yöntemler ile yapılan benzer çalışmalarda Tip 4 genotip oranı %2 ile %3,7 oranındadır (4, 10, 11, 13). Yıldız ve arkadaşları (16) tarafından %1,5 oranında saptanan Tip 4c genotipi ise bizim çalışmamızda belirlenememiştir. Genotip 2 ise en seyrek saptanan HCV genotipi olmuştur. Diğer yöntemler ile yapılan çalışmalarda verilen Tip 2 genotip oranı %1,5 ile %5 arasında değişmektedir (4, 10, 13, 14, 16) ve bu oran çalışmamızda bulunan orana benzerdir. Çalışmamızda %27,3 oranındaki olguda HCV alt tiplerinin genotip belirlenememiştir. Genotip saptaması yapılamayan olgu oranı başka çalışmalarda %25 (9) ve %9 (13) olarak bulunmuştur.

Bu çalışmada *Pirosekanslama* yöntemi ile HCV genotiplerinin belirlenmesi 2 gün sürdü. Bu süre DNA dizi analizi yöntemlerine kıyasla oldukça kısadır. Bu durum rutin laboratuvarlarda uygulama kolaylığı sağlamaktadır. Ayrıca *Pirosekanslama* yönteminin test birim fiyatı DNA dizi analizi yöntemlerinin test birim fiyatına yakın olup, ters hibridizasyon testlerine kıyasla ucuzdur. Fiyat ve süre açısından bakıldığında HCV genotipleme için *Pirosekanslama* yönteminin uygulanabileceği kanaatine varıldı.

Kaynaklar

1. Akıncı E, Bodur H. HCV Enfeksiyonunda Klinik ve Tanı. In: Tabak F, Balık İ, Tekeli E., editörler. *Viral Hepatit 2007 Simpozyum Kitabı*. İstanbul: Oban Yayınevi; 2007. p. 220–226.
2. Türkoğlu S. Hepatit C Virüsü Viroloji ve Seroloji. In: Tabak F, Balık İ, Tekeli E., editörler. *Viral Hepatit 2007 Simpozyum Kitabı*. İstanbul: Oban Yayınevi; 2007. p.228–245.
3. Gökahmetoğlu S, Bozdayı M, Özbakır Ö, et al. Hepatitis C virus genotypes detected in Erciyes University. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi* 2007;37(1): 35–38.
4. Abacıoğlu YH, Davidson F, Tuncer S, et al. The distribution of hepatitis C virus genotype in Turkish patients. *J Viral Hepat* 1995; 2(6): 297–301.
5. Scott JD, Gretch DR. Hepatitis C and G viruses. In: Murray PR, Baron JE, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA, editors. *Manual of Clinical Microbiology*, 9.baskı. Washington: D.C, ASM Press; 2007. p.1437–1452.
6. Rota S. Pyrosequencing (Pyrosekanslama) ve prensipleri. *Klinik Mikrobiyolojide Pyrosekans Uygulama Kursu Kitabı*. Ankara; 2010. p.79–90.
7. Thomas DL, Lemon SM. Hepatitis C. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, editors. *Principles and Practice of Infectious Diseases*, 5th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone Determination of hepatitis C virus genotype; 2000: p.1736–1760.
8. Elahi E, Pourmand N, Chaung R, et al. Determination of hepatitis C virus genotype by Pyrosequencing. *J Virol Methods* 2003; 109(2): 171–176.
9. Sönmez E, Taşyaran MA, Kızılkaya N, Korkut H, Tombul Z, Akçam Z. Hepatit C virus ile infekte 59 hastada HCV genotiplerinin dağılımı: Çok merkezli bir çalışma. *Flora* 1996; 2(1): 92–95.
10. Tuncer S, Özkuyumcu C, Arıkan S. PCR ve hepatit C virus genotipi ile serolojik reaktivite arasındaki ilişkinin değerlendirilmesi. *Viral Hepatit Dergisi* 1996; 2(1): 10–18.
11. Akpınar A, Abacıoğlu YH, Tankurt E, Şimşek İ, Yuluğ N, Ersöz G. Non-A Non-B hepatitine bağlı kronik karaciğer hastalığı olan Türk hastalardaki hepatit C virus prevalansı ve genotipleri. *Turkish Journal of Gastroenterology* 1998; 9(3): 208–212.
12. Kendal Y, Halil D, Hikmet A. HCV genotypes in HCV related chronic hepatitis in Southeast Anatolia. *The Turkish Journal of Gastroenterology* 1999; 10(3): 249–252.
13. Türkoğlu S, Bozacı M, Çakaloğlu Y. İkinci kuşak “core genotipleme” ile hepatit C virus genotiplerinin araştırılması. 3. Ulusal Hepatoloji Kongresi Kongre Kitabı. İstanbul. 1999: 41.
14. Yarkin F, Hafta A. Kronik hepatit C enfeksiyonu olan hastalarda hepatit C virus genotiplerinin dağılımı. *Viral Hepatit Dergisi* 2000; 3(3): 164–167.
15. 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(2): 104–111.
16. Yıldız E, Oztan A, Sar F, et al. Molecular characterization of a full genome Turkish hepatitis C virus 1b isolate (HCV-TR1): A predominant viral form in Turkey. *Virus Genes* 2002; 25(2): 169–177.
17. Bozdayı G, Verdi H, Rota S ve ark. Hemodiyaliz hastalarında hepatit C virus enfeksiyon varlığının araştırılması ve HCV genotip dağılımının belirlenmesi. *Mikrobiyoloji Bülteni* 2002; 36(3): 291–294.
18. Aslan N, Bozdayı M, Çetinkaya H, et al. The mutation in ISDR of NS5A gene are not associated with response to interferon treatment in Turkish patients with chronic hepatitis C virus genotype 1b infection *Turkish Journal of Gastroenterology* 2004; 15(1): 21–26.