

**T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**KRONİK HEPATİT C HASTALARINDA
PYROSEKANSLAMA YÖNTEMİ İLE
HEPATİT C VİRUSU (HCV)
GENOTİPLERİNİN BELİRLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Oğuzhan HANCI

2014

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

KRONİK HEPATİT C HASTALARINDA
PYROSEKANSLAMA YÖNTEMİ İLE HEPATİT C VİRUSU
(HCV) GENOTİPLERİNİN BELİRLENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Oğuzhan HANCI

TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Yasemin BULUT

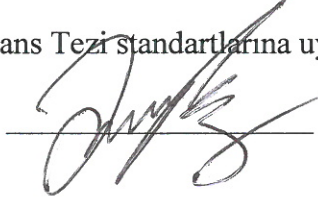
ELAZİĞ
2014

ONAY SAYFASI

Prof. Dr. Mustafa KAPLAN

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez Yüksek Lisans Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.

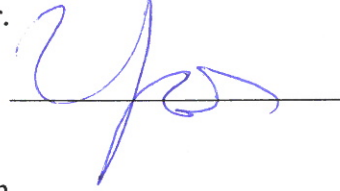


Prof. Dr. Mustafa YILMAZ

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

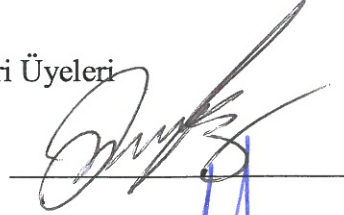
Doç. Dr. Yasemin BULUT



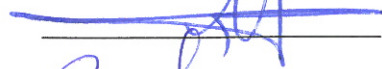
Danışman

Yüksek Lisans Sınavı Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Mustafa YILMAZ



Prof. Dr. Ayhan AKBULUT



Doç. Dr. Yasemin BULUT



TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım boyunca, emeğini, bilgisini ve desteğini sonuna kadar benden esirgemeyen, yanında çalışmaktan onur duyduğum ve ayrıca tecrübelerinden yararlanırken göstermiş olduğu hoşgörü ve sabırdan dolayı değerli hocam, tez danışmanım Doç. Dr. Yasemin BULUT'a saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca, yüksek lisans eğitimim sırasında yetişmemde önemli katkıları olan bilgi ve deneyim kazanmama olanak sağlayan değerli hocalarım; Prof. Dr. Mustafa YILMAZ, Prof. Dr. Zülal AŞÇI TORAMAN, Prof. Dr. Adnan SEYREK ve Prof. Dr. Ahmet KİZİRGİL'e teşekkür ederim.

Bir aile gibi olduğum laboratuvarıda beraber çalıştığım mesai arkadaşlarıma, örneklerimi toplarken bana destek oldukları için Aynur SÖNMEZ'e, Yüksek Lisans ve Doktora öğrencisi arkadaşlarıma, tezimi hazırlarken faydalandığım Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı literatürünün oluşumunda geçmişten günümüze kadar katkıda bulunmuş tüm Bilim İnsanlarına teşekkürlerimi borç bilirim.

TF.11.64 projemize finansman desteklerinden dolayı Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (FÜBAP)'ne teşekkürlerimi bildiririm.

Hayatımın her döneminde desteklerini, sevgilerini, dualarını esirgemeyen, kendileriyle gurur ve onur duyduğum çok değerli anne ve babama ile hayatıma renk katan kardeşlerime, en kalbi duygularımla teşekkür ederim.

Son olarak biricik oğlum Yusuf Talha'ya ve hayat arkadaşım, en iyi dostum, sevgili eşim Emine HANCI'ya sonsuz teşekkürler.

Oğuzhan HANCI

Elazığ - 2013

ÖZET

Kronik viral hepatitler, günümüzde en önemli halk sağlığı problemlerindendir. Dünyada yaklaşık olarak 170-210 milyon kişinin Hepatit C Virus (HCV) ile enfekte olduğu düşünülmektedir. Akut ve kronik hepatit, siroz ve hepatosellüler karsinoma gibi hastalıklar için en önemli risk faktörlerinden biri olan HCV, karaciğer hastalıklarının % 25-40 kadarından sorumludur. HCV, nükleotit dizileri birbirlerinden % 30'a kadar farklı olabilen 6 ana genotipe ve 80'den fazla subtip ayrılmaktadır. Genotipler, HCV enfeksiyonunun nasıl seyredeceğinin öngörüsünü sağlayamaz ancak virusun genotipleri tedaviye yanıt kriteri olarak ve tedavi süresinin belirlenmesinde yol göstericidir. HCV genotiplerinin belirlenmesinde doğrudan dizi analizi, Ters Hibridizasyon, Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP), tipe özgü Polymerase Chain Reaction (PCR), Pyrosekanslama ve Serotiplendirme gibi yöntemler uygulanmaktadır. Bunlardan Pyrosekanslama, DNA sentezi esnasında açığa çıkan pirofosfatların saptanması esasına dayanan yeni gerçek zamanlı kantitatif dizi analizi tekniğidir. Bu tezde, Pyrosekanslama yöntemi ile Elazığ ilindeki kronik hepatit C öntanısı/tanı olan hastaların HCV genotiplerinin belirlenmesi amaçlandı. Bu çalışmaya, Kronik Hepatit C ön tanısı / tanı ile takip edilen Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Merkez Laboratuvarına gönderilen 50 hastanın serum örnekleri dahil edildi. Anti-HCV yönünden pozitif olan bütün örneklerin HCV-RNA düzeyleri gerçek zamanlı PCR yöntemi (Taqman 48, Roche) ile araştırıldı. Örneklerden RNA izolasyonu üretici firmanın önerileri doğrultusunda otomatik izolasyon sistemi (EZ1, Qiagen) ile yapıldı. Örneklerde HCV genotip analizi Pyrosekanslama yöntemi ile belirlendi. HCV genotiplerinin 46 (% 92,0)'si genotip 1; 1 (% 2,0)'si genotip 3 olarak bulundu. Genotip 1 olarak bulunan 46 örneğin 41'i genotip 1b; 5'inin genotip 1a olduğu belirlenirken, 3'ünün alt tipi belirlenemedi. Sonuç olarak, hepatit C ile enfekte kronik hastalarda en yaygın genotipin 1b olduğu saptandı. Pyrosekanslama yöntemi ile HCV genotiplerinin belirlenmesi diğer DNA dizi analizi yöntemlerine kıyasla oldukça kısa sürmektedir. Bu durum ise rutin laboratuvarlarda uygulama kolaylığı sağlamaktadır. Pyrosekanslama yönteminin test birim fiyatı DNA dizi analizi yöntemlerinin test birim fiyatına yakın olup, ters hibridizasyon testlerine kıyasla ucuzdur. Fiyat ve süre açısından bakıldığında, tedaviye yanıt kriteri olarak ve tedavi süresinin belirlenmesinde önemli bir kriter olan HCV genotipleme için Pyrosekanslama yönteminin uygulanabileceği kanaatine varıldı.

Anahtar kelimeler: Hepatit C virusu, kronik hepatit C, genotip, Pyrosekans

ABSTRACT

Detection of Hepatitis C Virus (HCV) Genotypes by Pyrosequencing in Chronic HCV Patients

Chronic viral hepatitis are one of the most important public health problems. It has been predicted that 170-210 million people have been infected with Hepatitis C virus (HCV) in the world. HCV, which is one of the most important risk factors for diseases including acute and chronic hepatitis, cirrhosis, and hepatocellular carcinoma is responsible for 25-40% of the liver diseases. HCV is divided into 6 main genotypes, nucleotide sequences of which can be different up to 30%, and into more than 80 subtypes. Genotypes can not be used for predicting how the HCV infection will progress but can be an indicator of response to the treatment and can be used for determining the treatment period. HCV genotypes are determined using various methods such as Direct sequence analysis, Reverse Hybridization, Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP), type-specific Polymerase Chain Reaction (PCR), Pyrosequencing, and serotyping. Among those, pyrosequencing is a real time quantitative sequencing technique based on the detection of pyrophosphates released during the synthesis of DNA. In this thesis, it was aimed to determine HCV genotypes of the patients with prediagnosis or diagnosis of chronic hepatitis C in Elazığ by using pyrosequencing method. Serum samples of 50 patients with prediagnosis/diagnosis of chronic hepatitis C were used in this study. HCV-RNA levels of all samples that were positive for anti-HCV were determined using real time PCR (Taqman 48, Roche). RNA isolation from the samples were carried out using an automated isolation system (EZ1, Qiagen) as described by the manufacturer. HCV genotype analysis of the samples were determined by using pyrosequencing method. 46 (92%) and 1(2%) of the samples were determined as genotype 1 and genotype 3, respectively. Of 46 samples that were genotype 1, 41 were found as genotype 1b and 5 as genotype 1a whereas 3 of those were not be able to subtype. As a result, genotype 1 was found as the most common genotype in patients infected with HCV. Genotyping HCV by pyrosequencing takes quite shorter time compared to other DNA sequencing methods. In this case, pyrosequencing can be a method of choice in routine analysis laboratories due to ease of use. Unit cost of pyrosequencing is comparable to that of DNA sequencing based methods. In fact, it is cheaper than the cost of reverse hybridization method. It is

concluded that, due to the cost and required-time advantages, pyrosequencing can be used for genotyping HCV, which is an important criteria for determining the treatment response and the treatment period.

Key Words: Hepatitis C Virus, Chronic hepatitis C, genotype, pyrosequence

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	II
ÖZET	III
ABSTRACT	IV
İÇİNDEKİLER	VI
ŞEKİLLER LİSTESİ	VIII
TABLolar LİSTESİ	IX
KISALTMALAR LİSTESİ	X
1. GİRİŞ	1
2. HEPATİT C VİRUSU	3
2.1. Hepatit C Virusunun Yapısı	3
2.1.1. 5' UTR	4
2.1.2. 3' UTR	5
2.1.3. Quasispecies (Türümsü) Yapı	5
2.2. HCV Replikasyonu	7
2.3. HCV Genotipleri	8
2.4. Epidemiyoloji	10
2.4.1. Hepatit C İnfeksiyonunun Doğal Seyri, Prevalans ve İnsidansı	10
2.5. Bulaşma Yolları	12
2.6. Patogenezi	15
2.7. Doğal Seyir ve Klinik Formlar	19
2.8. Kronik Hepatit C	21
2.9. Tanı	22
2.9.1. Serolojik Testler	23
2.9.2. Moleküler Testler	25
2.9.2.1. HCV-RNA Araştırma Yöntemleri	25
2.9.2.2. Kalitatif Yöntemler	26
2.9.2.3. Kantitatif Yöntemler	26
2.9.3. Karaciğer Biyopsisi	26
2.10. Tedavi	28
3. VİRAL GENOTİPLERİ BELİRLEMEDE KULLANILAN MOLEKÜLER YÖNTEMLER	38

4. PYROSEKANSLAMA VE PRENSİPLERİ	40
4.1. Pyrosekanslama Aşamaları	40
4.2. Pyrosekans Yönteminin Kullanım Alanları	44
5. GEREÇ VE YÖNTEM	45
5.1. RT-PCR	46
5.2. PCR Protokolü	46
5.3. Pyrosekanslama	47
5.4. İstatistiksel Analizler	48
6. BULGULAR	49
7. TARTIŞMA	54
8. KAYNAKÇA	61
9. ÖZGEÇMİŞ	77

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.	<i>Flaviviridae</i> ailesindeki viruslerin filogenetik yakınlıklarını gösteren ağaç	3
Şekil 2.	HCV genom organizasyonu ve kodladığı proteinler	5
Şekil 3.	Hepatit C virusunun yaşam döngüsü	8
Şekil 4.	HCV genotipleri ve dünya genelinde dağılımı	9
Şekil 5.	2007 yılı Dünya Sağlık Örgütü verilerine göre dünyadaki ülkelerin HCV prevalansı haritası.	12
Şekil 6.	HCV Enfeksiyonunun doğal seyri	19
Şekil 7.	Düşük prevalanslı yerlerde HCV tanısı	22
Şekil 8.	Yüksek prevalanslı yerlerde HCV tanısı	23
Şekil 9.	Pyrosekans'ın birinci aşaması	40
Şekil 10.	Pyrosekans'ın ikinci aşaması	41
Şekil 11.	Pyrosekans'ın üçüncü aşaması	42
Şekil 12.	Pyrosekans'ın dördüncü aşaması	42
Şekil 13.	Pyrosekans'ın beşinci aşaması	43
Şekil 14.	Pyrosekanslama tekniğinin prensip şeması	43
Şekil 15.	Pyrosekans aşamalarının ortalama süreleri	44
Şekil 16.	Genotip genel dağılımı	49
Şekil 17.	Yaş ve cinsiyete göre dağılım	50

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1.	Farklı skorlama sistemlerine göre fibrozisin evrelendirilmesi	28
Tablo 2.	Kronik hepatit C enfeksiyonunda interferon tedavisinin kontrendikasyonları	30
Tablo 3.	Tedavinin endikasyonları	32
Tablo 4.	Tedaviye hasta temelinde karar verilmesi gereken durumlar	32
Tablo 5.	KHC tedavisine yanıtı olumlu yönde etkileyen faktörler	35
Tablo 6.	HCV Genotiplendirme Pyrosekanslama Kiti	45
Tablo 7.	RT-PCR reaksiyon kompozisyonu	46
Tablo 8.	PCR protokolü	47
Tablo 9.	Streptavidin sepharose bilyeler için miks	47
Tablo 10.	Sekans primerlerinin okuyacağı PCR reaksiyonları	48
Tablo 11.	Genotip ve alt tip genel dağılımı	49
Tablo 12.	Yaş ve cinsiyete göre dağılımı	50
Tablo 13.	Genotiplere göre ALT, AST ortalamaları	51
Tablo 14.	Genotiplere göre ALT, AST değerlendirmesi	51
Tablo 15.	Türkiye’de çeşitli merkezlerde yapılan çalışmalarda saptanan HCV genotip dağılımı	56

KISALTMALAR LİSTESİ

ALT	: Alanin aminotransferaz
Anti HCV	: Hepatit C virusu antikoru
AST	: Aspartat aminotransferaz
CDC	: Hastalık kontrol merkezi
CTL	: Sitotoksik T lenfositleri
DNA	: Deoksiribonükleik asit
ELISA	: Enzyme-linked immunosorbent assay
EVY	: Erken virolojik yanıt
HBV	: Hepatit B virusu
HCC	: Hepatosellüler karsinom
HCV	: Hepatit C virusu
HIV	: Human immunodeficiency virus
HIV	: İnsan bağışıklık yetmezlik virusu
HVR	: Hyper variable region
IFN	: İnterferon
KHC	: Kronik hepatit C
KVY	: Kalıcı viral yanıt
NANB	: Non A non B
nm	: Nanometre
NS	: Non structural
NS3	: Proteaz
NS5	: RNA polimeraz
ORF	: Open reading frame
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RE	: Restriksiyon
RFLP	: Restriction fragment length polymorphism
RIBA	: Rekombinant immunoblotting assay
RNA	: Ribonükleik asit
RT	: Reverse transkriptaz
TSY	: Tedavi sonu yanıt
SSCP	: Single-strand conformation polymorphism
CFLP	: Cleavase Fragment Length Polymorphism

1. GİRİŞ

Hepatit C virusu (HCV) *Flaviviridae* ailesindeki *Hepacivirus* cinsi içinde sınıflandırılmaktadır. HCV, Sarı humma virusu, Batı Nil virusu ve dengue virusu gibi artropod kökenli flaviviruslerle uzaktan, GB virus (GBV) tip C (hepatit G virus diye de bilinmektedir) ve pestiviruslerle ise daha yakından ilişkilidir.

Hepatit C virusu 30-60 nm çapında zarflı, tek iplikli pozitif yönelimli bir RNA virusudur. HCV genomu yaklaşık 9600 nükleotit uzunluğundadır. Genom, iyi korunmuş 5' ve 3' uçları ile 3011 aminoasitlik bir poliprotein kodlayan açık okuma çerçevesi "open reading frame (ORF)" bölgesinde oluşur. Posttranslasyonel işleme sonrasında poliprotein yapısal ve yapısal olmayan proteinlere ayrışır. Dört adet yapısal protein; özyapı (core: C), zarf 1 (ervelope 1: E1), zarf 2 (E2) ve transmembran (p7) proteininden oluşur. Altı yapısal olmayan protein (NS2'den NS5B'ye) viral replikasyon ve olgunlaşma için gerekli olup antiviral tedavi açısından çekici hedeflerdir. İyi korunmuş NS5B proteini RNA bağımlı RNA polimeraz etkinliğindedir. Antiviral tedavi alan hastalarda yapılan viral kinetik çalışmalar, HCV'nin 2 ile 3 saatlik yarılanma süresi olan, 10^{12} viryon/gün gibi yüksek bir hızda çoğaldığını düşündürmektedir (1).

Hepatit C virusu esasen insanları enfekte eder ve insan enfeksiyonlarının büyük çoğunluğu diğer insanlardan genellikle kan teması yoluyla bulaşır. Her ne kadar şempanzelerde, kalıcı enfeksiyon gerçekleşse de bunlar HCV'nin önemli bir rezervuarı değildir.

HCV'nin farklı genotipleri hastaların takip ve tedavisini belirlemede önemlidir. Genotipler, hastalığın klinik gidişatını, tedavi ve tedaviye yanıtı etkileyebildiğinden ve coğrafi dağılımda rol oynadığından, bir popülasyonda farklı genotipleri belirlemek önemlidir. HCV'nin farklı genotiplerinin olduğu ve her genotipin farklı bir klinik tablo yarattığı kaydedilmiştir (1).

Bazı araştırmacılara göre 6 (1), bazılarına göre ise 11 (1) 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; genotip 4 Orta Doğu, Mısır ve Orta Amerika'da; genotip 5 Güney Afrika'da; genotip 6 Hong Kong ve Vietnam'da sıklıkla görülmektedir (2). HCV

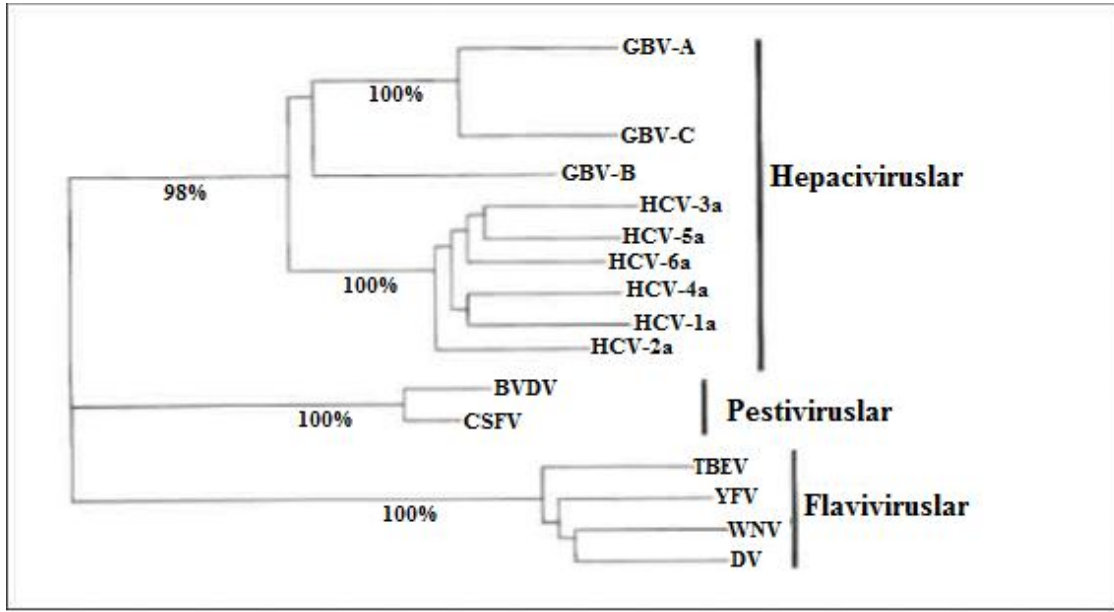
genotip 1b'de hem interferon tedavisine yanıt daha düşük oranda meydana gelmekte hem de hepatosellüler karsinoma gelişme riski daha fazla olarak bulunmaktadır (1). Ülkemizde yapılan çalışmalarda en sık olarak HCV genotip 1b'nin bulunduğu bildirilmiştir. Hepatit C virusu'nun bu yoğun genetik çeşitliliğine karşın, genotiplerle klinik özellikler, hastalığın şiddeti ve ekstrahepatik bulgular arasında kesin bir ilişki kurulamamıştır (3). Buna karşın genotipler arasında tedavi yanıtı, tedavi süresi ve kullanılan antiviral tedavinin dozu açısından önemli farklılıklar bulunduğu için her ülkenin kendi genotip dağılımını ortaya koyması önem taşımaktadır (4).

Bu çalışmada, yeni bir yöntem olan Pyrosekanslama yöntemi ile Elazığ ilindeki kronik hepatit C enfekte hastaların HCV genotip veya genotiplerini belirlemek amaçlanmıştır.

2. HEPATİT C VİRUSU

2.1. Hepatit C Virusunun Yapısı

HCV yaklaşık 50 nanometre (nm) büyüklüğünde bir virustur. Yapısı, genom özellikleri ve replikasyon siklusu flavivirislere benzer. Ancak bugün *hepacivirus* adı altında yeni bir grupta yer alır (şekil.1) (5).



Şekil 1. *Flaviviridae* ailesindeki viruslerin filogenetik yakınlıklarını gösteren ağaç

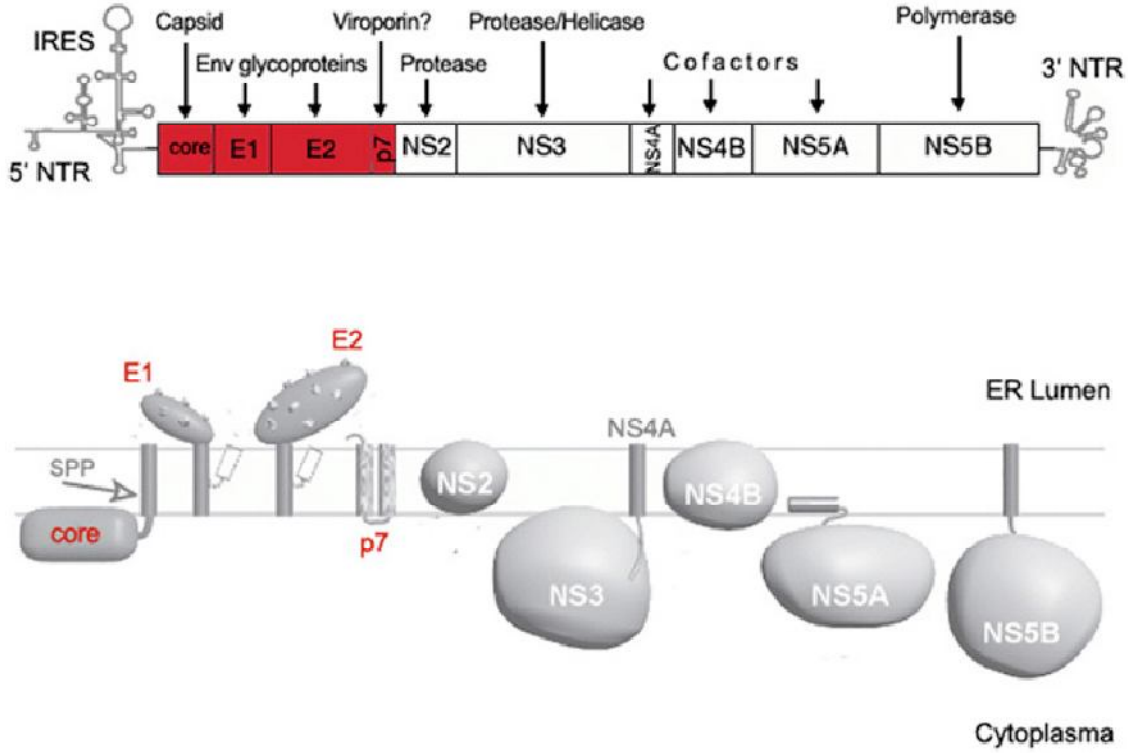
Etkili hücre kültürü olmaması nedeniyle, bu virusun yapısı ve replikasyon siklusu hala tümüyle anlaşılamamıştır (4).

Hepatit C virus genomu, yaklaşık 9600 nükleotit içeren pozitif polariteli, tek zincirli RNA'dır. Genom, 3' ve 5' uçlarda iki adet translasyona uğramayan bölge (untranslated region: UTR) bulundurulur. Bu iki uç arasında büyük bir prekürsör proteini kodlayan ve 9000'den fazla nükleotitten oluşan bir "open reading frame" (ORF) bulunur (6). ORF yaklaşık 3010 aminoasit uzunluğunda büyük bir poliprotein kodlar (7).

2.1.1. 5' UTR

Genomun 5' ucunda bulunan 341 nükleotitlik UTR bölgesi, suşlar arasında yüksek oranda korunmuş nükleotit dizisine sahiptir (6). Bu özellik, HCV viremisinin saptanması ve kantifikasyonu çalışmalarının hedef bölgesi olmuştur (7). 5' UTR, ORF'nin başlama kodonunun hemen proksimalinde, ribozomlara doğrudan bağlanmaya olanak tanıyan bir "internal ribosomal entry site (IRES)"e sahiptir. HCV IRES'inin yeri 344-354. nükleotitler olarak tanımlanmıştır (8). 5' UTR bölgesi, virus replikasyonu ve viral proteinlerin translasyonunda önemli rol oynar (6). 5' UTR bölgesi, antisens oligonükleotitlere ve ribozomlara etkili antiviral drogların geliştirilmesi için hedef teşkil etmektedir (4).

HCV, büyük tek bir polipeptit kodlar. Bunu kodlayan genler şu şekilde sıralanır: 5'-CE1-E2-p7-NS2-NS3-NS4A-NS4B-NS5A-NS5B-3' (Şekil 2). İlk kodlanan, C geni ürünü olan kor proteinidir (p22). Bu protein çok immunojenik bir proteindir. HCV ile enfekte kişilerde bu proteine karşı antikor bulunur. Bu proteine ait olduğu düşünülen biyolojik etkiler şöyle sıralanabilir: HBV replikasyonunun baskılanması, hücre siklusunun düzenlenmesi ve hücrel protoonkogenlerin transkripsiyonunun düzenlenmesinde değişiklikler yapılması, apoptozun indüksiyonu ya da baskılanması. E1 ve E2 genleri, iki zarf glikoproteini kodlarlar: gp35 ve gp70 (7). Bu glikoproteinler virus partikülünün lipid kılıfı içine gömülüdürler ve konak hücreye tutunmada gereklidirler (8). P7 proteininin işlevi bilinmemektedir. NS2 ve NS3, yapısal olmayan bölgelerin oluşumunda rol oynayan proteazları kodlar. NS4A'nın ürünü, NS3 proteaz için kofaktördür. NS4B ve NS5A'nın ürünlerinin işlevi bilinmemektedir. NS5A'nın interferona direnci belirlediği saptanmıştır. NS5B'nin ürünü RNA'ya bağımlı RNA polimeraz işlevi görür (7).



Şekil 2. HCV genom organizasyonu ve kodladığı proteinler (9)

2.1.2. 3' UTR

Bu bölge 27-54 nükleotiti kapsar. Bu bölge poly-U ya da poly-A ile sonlanır. Poly-U'dan sonra da 98 baz uzunluğunda 3'-X dizisi bulunur (7). Bu bölgenin viral genomun replikasyon başlangıcında önemli rol aldığı düşünülmektedir (6).

2.1.3. Quasispecies (Türümsü) Yapı

HCV'nin önemli özelliklerinden birisi, yüksek genetik heterojenlik göstermesidir. Yüksek heterojenlik, replikasyonda görev alan RNA bağımlı RNA polimeraz enziminin “proofreading” aktivitesinin (3' 5' ekzonükleaz düzeltici okuma etkinliğinin) olmamasıyla açıklanmaktadır (10). Bu nedenle yeni sentezlenen RNA sarmallarına yanlış girmiş bazıları uzaklaştırıcı önemli bir onarım mekanizması çalışmamaktadır. Bu yüzden HCV sürekli olarak mutasyona uğrar ve asla özdeş RNA genomlarının homojen bir topluluğu olarak in vivo bulunmaz (8).

HCV viryonlarının kandaki yarı ömrünün yaklaşık 2,5 saat olduğu kronik olarak enfekte bir kişide her gün, 1.0×10^{12} viryon oluştuğu hesaplanmaktadır. Genomun kısalığı, mutasyon oranının fazlalığı ve virus topluluğunun genişliği, enfekte kişideki virus topluluğunun bir ya da daha fazla nükleotit farklılığından oluşan, birbirinden farklı viruslerin toplamı olmasına yol açmaktadır. Bunlar “quasispecies” (türümsü) olarak adlandırılmaktadır. HCV, genom yapısının bu özelliği sayesinde yaşadığı ortama olağanüstü bir adaptasyon sağlamaktadır. Her an bir başkasından çok az farklar taşıyan virus toplulukları diğerlerine göre avantajlı duruma geçebilmekte, böylece o belli grup çoğalarak enfeksiyonu sürdürmede hakim olmakta ve enfeksiyonun sürekliliği sağlanmaktadır. Bunun tipik örneği tedaviye oluşan direnç ya da bağışıklık sisteminden kaçıştır (7).

Zarf proteinlerini kodlayan bölge, diğer bölgelere kıyasla daha fazla mutasyon oranına sahiptir. Hypervariable region 1 (HVR1)’in HCV’deki genetik mutasyonlar için en sıcak bölge olduğu bulunmuştur. HVR1, E2 zarf proteininin N-terminal aminoasitinden başlayan 27 aminoasit uzunluğundaki bölgedir. HVR1’deki önemli dizi değişikliği, onu HCV tür ayrımında marker olarak kullanma imkanını sağlamaktadır. HVR1 bütün genotiplerde bulunmasına rağmen HVR2 yalnızca genotip 1b’de bulunur. HVR2 yedi aminoasit içermektedir ve E2 zarf proteininin 91-97. pozisyonuna yerleşmiştir (11).

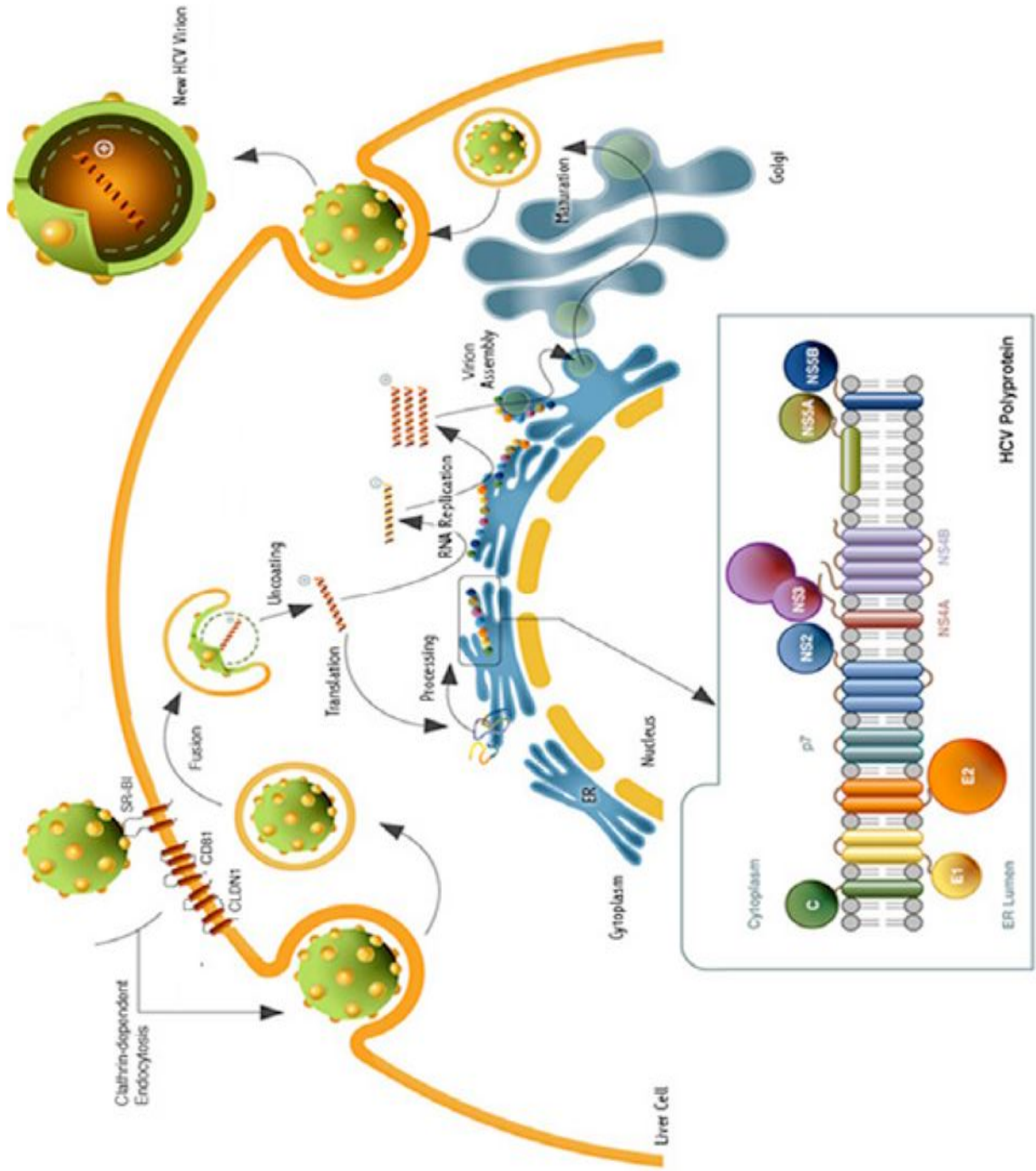
HVR1’deki mutasyon oranı serum ALT düzeyiyle pozitif ilişkilidir. HVR1’deki türümsü yapıların durumu konağın immunolojik yanıtının derecesine bağlıdır. Konak immun yanıtı baskılandığında HVR1 mutasyon oranı düşer. Türümsü yapı, 5’UTR hariç HCV genomunun her bölgesine dağılmış durumdadır. HVR1, HCV genomunda türümsü yapı gösteren en karakteristik bölgedir (11).

Türümsü yapı IFN tedavisine yanıtı etkileyen bir faktördür. HVR1’deki türümsü komplekslik ile tedaviye yanıt arasında ters ilişki mevcuttur (12). Türümsü kompleksliğin derecesi arttıkça IFN tedavisine yanıt azalır (13). Enfeksiyonun başlangıcındaki türümsü komplekslik, hastalığın son safhasına göre daha düşüktür. Buna paralel olarak akut HCV enfeksiyonlarının IFN tedavisine yanıtı, kronik enfeksiyonlardan daha iyidir (10).

Quasispecies'lerin saptanması klonlama ve ardından "sekanslama" (DNA dizi analizi) ile yapılabileceği gibi, daha basit yöntemler olan "heteroduplex gel shift" analizi (GSA), "temperature gradient gel"elektroforezi (TGGE) ve "single-strand conformational polymorphism" (SSCP) ile yapılabilmektedir (14, 15).

2.2. HCV Replikasyonu

HCV karaciğerin yanı sıra periferik kan mononükleer hücreleri, lenfoid foliküller ve kemik iliğinde de replike olmaktadır (16, 17). Virus hücreye girerken CD81, düşük dansiteli lipoprotein, C tipi lektinler CD-SGN ve L-SGN ile SR-BI gibi birden fazla reseptörle etkileşime girdiği düşünülmektedir. Tutunduktan sonra penetrasyon ve hücre içine alınması, lokal pH değişikliklerinin olması ile gerçekleşir. Bu pH değişiklikleri zarf proteinlerinin yapısını değiştirir ve endozomal membran füzyonu ile virus sitoplazmaya alınır ve viral genom mRNA olarak görev yapar. Poliprotein translasyonu gerçekleşir. Kor proteini, poliprotein peptidaz ile ayrılmasından sonra sitoplazmada kalır. E1 ve E2 proteinleri endoplazmik retikulum (ER) lümenine salınır. Burada membrana bağlı glikozillenmiş halde bulunurlar. NS3, NS4A, NS4B, NS5A ve NS5B'den oluşan replikaz kompleksi genomik RNA'nın 3' ucundaki spesifik yapı ve sekansları tanıyarak genomun negatif kopyasını sentezler. Oluşan çift zincirli RNA çok sayıda pozitif RNA kopyalanması için kalıp görevi görür. RNA'nın replikasyonu olduktan sonra viral partiküller paketlenir, viriyon olgunlaşır ve konak hücreden serbestleşir (16, 17). HCV'nin replikasyon basamakları şekil 3'te gösterilmiştir.



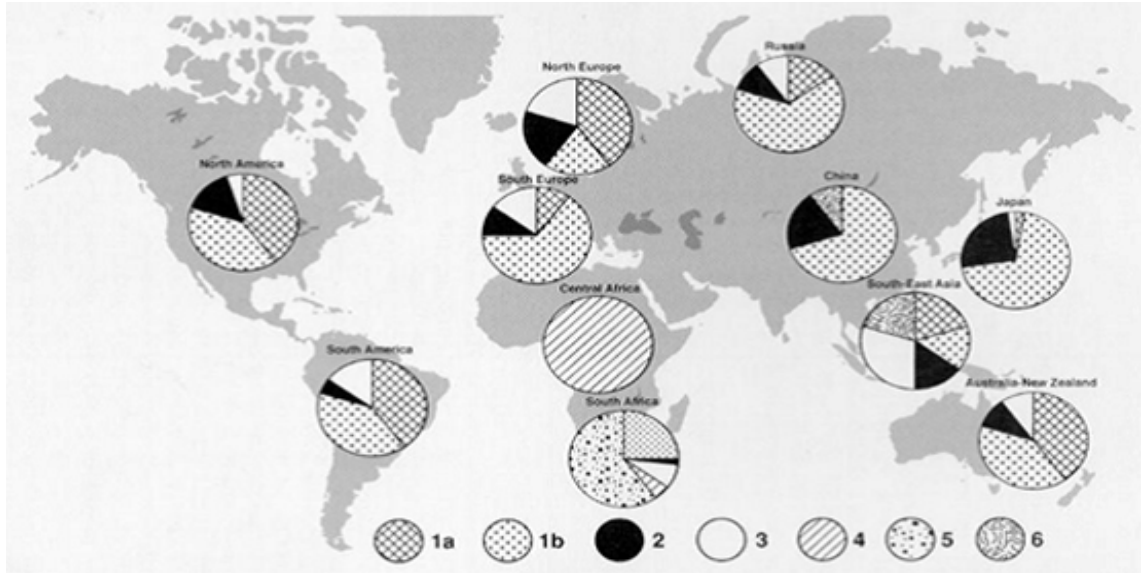
Şekil 3. Hepatit C virusunun yaşam döngüsü

2.3. HCV Genotipleri

Tüm genom dizileri belirlenmiş HCV suşları incelendiğinde, virusun genomu boyunca, hemen hemen tüm bölgeleri kapsayan, protein dizisi benzerlikleri göze çarpmış ve bunları grup ve alt gruplar halinde sınıflandırmak mümkün olmuştur. Bu sınıflandırma “genotiplerin” ortaya çıkmasına yol açmıştır (7).

HCV'nin 6 genotip ve 80'den fazla alt tipi mevcuttur. Genotipler 1'den 6'ya kadar rakamlarla, alt tipler ise a, b, c... gibi küçük harflerle ifade edilir. Genotip 1b'nin üç ana alt tipi (W: Worldwide, J: Japan ve NJ: Non-Japan) bulunmaktadır (18).

Genotip 1a ABD'de en yaygın tiptir. Batı Avrupa ve Güney Doğu Asya'da genotip 1b en fazla görülen tiptir. Genotip 2 bütün dünyada, genotip 3 çoğunlukla Hindistan, Pakistan, Avustralya ve İskoçya'da, genotip 4 Ortadoğu ve Afrika'da, genotip 5 Güney Afrika'da, genotip 6 Hong Kong'da yaygın olan tiplerdir (19). Türkiye'de en sık genotip 1b görülür. Bunu genotip 1a izler (20, 21). HCV genotiplerinin dünya genelinde dağılımı şekil 4'de görülmektedir (1, 4, 12).



Şekil 4. HCV genotipleri ve dünya genelinde dağılımı (12)

Bir toplumdaki HCV genotiplerinin frekansı, enfeksiyon alındığındaki yaş ve bulaşma yoluna bağlı olarak değişir. Önceleri genotip 1b, Batı Avrupa ve ABD'deki kan ürünlerinin transfüzyonu ile güçlü olarak ilişkili bulunurken, kan ve kan ürünlerinin taramasında duyarlılığı yüksek yöntemlerin geliştirilmesiyle kan transfüzyonuna bağlı yeni olguların oluşumunda dramatik bir düşüş gözlenmiş ve diğer genotiplerle kıyaslandığında genotip 1b ve 2'nin nisbi riskinde azalma kaydedilmiştir. Damar içi uyuşturucu kullanımına bağlı olarak gelişen HCV enfeksiyonlu yeni vakaların artmasının sonucu olarak, bu grupta çok yaygın olarak bulunan genotip 1a ve 3a'nın etken olarak görülme sıklığı artmıştır. Batı ülkelerinde, genotip 1b en yüksek prevalansı

50 yaşın üzerindeki genellikle kan transfüzyonu ve sporadik hepatitli hastalarda gösterirken, 1a ve 3a daha genç gruptaki predominant genotiplerdir (19).

Belli genotiplerin hastalığın klinik gidişi ve tedavisi ile ilgili farklılıklar içerdikleri söylenebilir. Özellikle genotip 1b ile IFN'a düşük düzeyde yanıt, siroz ve hastalığın uzun süreli gidişi arasında yakın bir ilişki bulunmuştur (11).

2.4. Epidemiyoloji

Hepatit C, kronik karaciğer hastalığı, siroz ve hepatosellüler karsinomaya yol açabilen önemli bir enfeksiyon hastalığıdır. Dünyada 130-170 milyon hepatit C virusu (HCV) ile enfekte olduğu tahmin edilmektedir. Hepatit C prevalansı ve bulaşma yolları ülkeler ve bölgeler arasında değişkenlik gösterir. Ülkemiz prevalansı % 1-1.9 arasında olan dilim içinde yer alır.

2.4.1. Hepatit C İnfeksiyonunun Doğal Seyri, Prevalans ve İnsidansı

Hepatit C virusu ilk kez 1989 yılında klonlanarak tanımlanan bir RNA virusudur. Bu tarihten önce Hepatit A ve B'den farklı bir virusun hepatit yaptığına dair epidemiyolojik veriler vardır ve bu hastalığa non-A non-B viral hepatit adı verilmiştir. İnfeksiyonu alanların yaklaşık % 70'inde (% 50-85 arası) kronik hastalık (RNA pozitif) gelişir. İnfeksiyonu 40 yaşın altında alanların % 5'ten daha az kısmında 20 sene içinde siroz gelişirken, 40 yaşın üzerinde enfekte olanlarda 20 sene içinde siroz gelişme olasılığı ise % 20'dir. Sonuçta kronik HCV hepatiti olan hastaların % 25'inde siroz oluşur ve bunların da önemli bir kısmında hepatosellüler karsinom (HSK) gelişir (22). Dünyada sirozun % 27'si, HSK'nın ise % 25'i HCV ile ilişkilidir (23).

Ülkemizde kronik hepatitlerin etiyolojisinde HCV'nin rolü son yıllarda giderek artmaktadır (24).

Dünyada HCV enfeksiyonu prevalansının yaklaşık % 2.2-3 arasında olduğu tahmin edilmektedir. Bu da dünyada yaklaşık 130 ila 170 milyon kişinin HCV pozitif olduğunu gösterir (21). Tahmini prevalansın en düşük olduğu Kuzey Avrupa'da HCV prevalansı % 1'den düşüktür, prevalansın yüksek olduğu ülkeler ise Asya ve Afrika'da yer alır. En düşük prevalans İngiltere ve İskandinav ülkelerinden (% 1'in altında), en

yüksek prevalans ise Mısır'dan (% 15-20) bildirilmiştir (1, 25). Düşük prevalansı olan ancak nüfusu büyük gelişmiş ülkelerde örneğin Almanya'da prevalans % 0.6, Kanada'da % 0.8, Fransa'da % 1.1, Avustralya'da % 1.1'dir. Düşük, fakat biraz daha yüksek prevalans oranları Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'nden (% 1.8), Japonya'dan (% 1.5-2.3) ve İtalya'dan (% 2.2) bildirilmiştir. Ülkemiz dünya haritasında prevalansı % 1-1.9 arasında olan ülkeler içinde yer almaktadır (Şekil 5.) (26, 27).

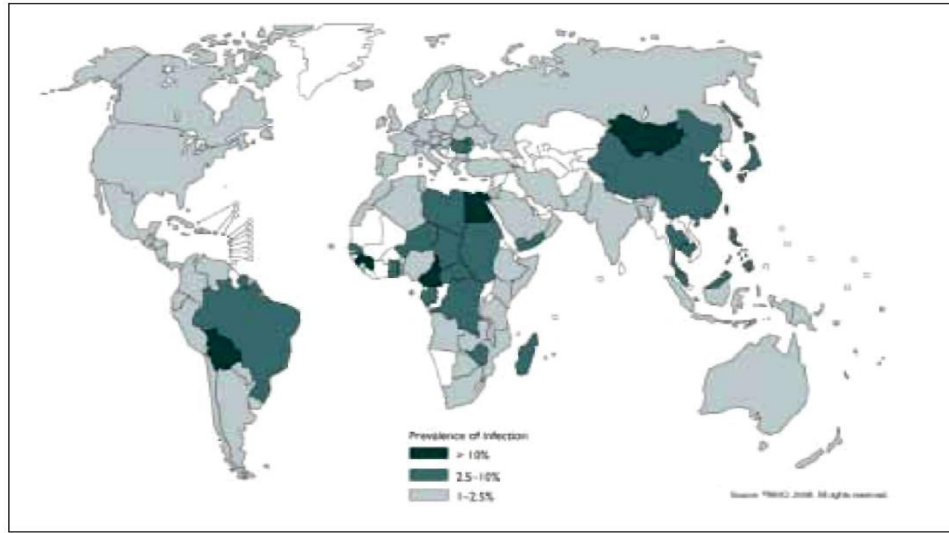
Gelişmekte olan ülkeler arasında prevalans oranları yönünden önemli farklılıklar vardır. Örneğin dünya nüfusunun beşte birini barındıran Çin'de prevalans % 3.2, bir diğer kalabalık ülke olan Hindistan'da % 0.9'dur. 70 milyonluk bir ülke olan Mısır'da ise prevalans yaklaşık % 15-20'dir (26).

Ülkemizde 2000-2006 yılları arasında farklı merkezlerdeki donör taramalarından elde edilen anti-HCV pozitiflik oranı ortalama % 0.54'tür. Bu verilere bakıldığında donörlerde anti-HCV pozitiflik oranı % 1'in üzerinde olan iller Afyon, Düzce, Erzurum, Manisa ve Samsun'dur. 90'lı yılların verisiyle 2000'li yıllarda elde edilen veriler karşılaştırıldığında donörlerdeki prevalans oranında anlamlı bir değişiklik olmadığı görülmektedir. Ülkemizde genel popülasyonda yapılan çalışmalarda ise anti-HCV pozitiflik oranı daha yüksek çıkmaktadır. Erişkinlerde 2000 yılından sonra yapılmış çalışmalara bakıldığında toplam 16160 kişideki anti-HCV pozitifliği % 1.15'tir. Erişkinlerdeki bu prevalans oranlarının yüksek olduğu illere baktığımızda Afyon'da % 1.03-1.75 arasında, Erzurum'da % 1.2, İzmir'de % 1.3 ve Tokat'ta % 2.1 olduğu görülmektedir (28, 29).

HCV enfeksiyonu coğrafyaya ve zamana göre farklılıklar gösterir. ABD, Avustralya, İspanya, İtalya ve Japonya gibi ülkeler ve Türkiye ortalama HCV prevalans oranları yönünden dünya haritasında aynı dilimde (% 1-1.9) yer almalarına karşın yaş spesifik HCV prevalans paternleri yönünden oldukça farklıdır. ABD'de en yüksek prevalans, bütün HCV-pozitif olanların üçte iki'sini tutacak şekilde 30-49 yaşları arasındadır. 20 yaşın altındaki ve 50 yaşın üstündeki gruplarda prevalans ortalamanın altındadır. Bu da Avustralya'dakine benzer şekilde, HCV bulaşının çoğunun son 20-40 yıl içinde ve daha çok genç erişkinler arasında gerçekleştiğini göstermektedir. Bu tür epidemiyolojik özellik taşıyan ABD, Avustralya ve Kuzey ve Batı Avrupa ülkelerinde

çeşitli risk faktörü taşıyan gruplar arasında prevalans yönünden büyük değişkenlikler vardır (23).

Türkiye, İspanya, İtalya, Japonya ve Çin gibi ülkelerde ise yaşa özgü prevalans yaş ilerledikçe tedrici olarak artmaktadır. Bu ülkelerde ve bizim ülkemizde anti-HCV-pozitif olanların büyük kısmı 50 yaşın üzerindedir ve bu da uzak geçmişte örneğin 40-60 yıl önce HCV enfeksiyon riskinin yüksek olduğunu göstermektedir. Bu tür paterni olan ülkelerin çoğunda coğrafi bölgeler arasında prevalans açısından büyük farklılıklar olabilir (23). Örneğin İtalya, Japonya ve Çin’de bazı hiperendemik bölgeler vardır ve bu bölgelerdeki yaşlı popülasyonda HCV prevalansı genel prevalansın 20 katına kadar çıkabilmektedir (30, 31).



Şekil 5. 2007 yılı Dünya Sağlık Örgütü verilerine göre dünyadaki ülkelerin HCV prevalansı haritası.

2.5. Bulaşma Yolları

HCV başlıca parenteral, cinsel ilişki ve perinatal yollarla bulaşır. Kan-kan ürünleri transfüzyonu, doku-organ transplantasyonu ve damar içi uyuşturucu kullanımı HCV bulaşı için en iyi tanımlanmış risk faktörlerindendir (32).

A. Parenteral bulaş: Hepatit C vakalarının 1-2/3’ünden sorumludur (32, 33).

1. Kan ve kan ürünleri transfüzyonu: 1990 yılından önce anti-HCV taramalarının yapılmadığı dönemde bu yolla sık bulaş olmuştur. HCV 1970’li yılların

sonları ile 1980'li yılların başlarında transfüzyon ile nakledilen en önemli viral etken olmuş ve bu yıllarda yapılan transfüzyonlarda olguların yaklaşık % 7-10'unda virusun bulaştığı gösterilmiştir. HCV ile kontamine kan ve kan ürünü alanların % 90'ından fazlasında HCV enfeksiyonu gelişir. Talasemi veya hemofili gibi çok sayıda transfüzyon yapılan hastalarda HCV enfeksiyon sıklığı daha yüksektir (33). Kan ve organ donörlerinde 1990'lı yılların başlarından itibaren (ülkemizde 1996 yılı) duyarlı tarama testlerinin kullanımı ile bu yollarla virusun bulaş oranı son derece azalmıştır. Hepatit C virusunun tarama yapılan kan örnekleriyle geçiş riski günümüzde 1/100.000'dir. Bu düşük orandaki bulaşın da nedeni muhtemelen donörde anti-HCV antikorları oluşmadan kan alınmasıdır (34).

2. Hemodiyaliz: Hemodiyaliz hastalarında kronik karaciğer hastalığının en sık nedeni HCV enfeksiyonudur. Bu hasta grubunda prevalans yaklaşık % 8'dir (32). Viral Hepatitle Savaşım Derneği'nin epidemiyolojik analiz sonuçlarına göre hemodiyaliz hastalarında anti-HCV pozitiflik oranı % 41,5'tir. Türk Nefroloji Derneği verilerine göre ise bu oran % 21,3'tür (35). Ayaktan peritondiyalizi yapan hastalarda anti-HCV pozitiflik oranı % 6,8 bulunmuştur. Hemodiyaliz hastalarında HCV enfeksiyonu için risk faktörleri kan transfüzyonu, transfüze edilen kan miktarı ve hemodiyaliz süresidir (36). Hemodiyaliz ünitelerindeki HCV enfeksiyonu epidemileri genellikle enfeksiyon kontrol önlemlerinin yeterli uygulanmamasından kaynaklanır. Bunlar; çeşitli alet ve ekipmanların farklı hastalara kullanılırken dezenfekte edilmemesi, medikasyonların hazırlandığı ve dağıtıldığı araçların hastalar için ortak kullanımı, birden fazla sayıda kullanım dozu içeren ilaçların çok sayıda hasta için kullanımı, hasta değişimindeki diyaliz istasyonundaki kontamine kovaların rutin olarak değiştirilmemesi veya temizlenip dezenfekte edilmemesi, diyaliz makinalarının rutin temizlik ve dezenfeksiyonunun yapılmaması, dökülen kanların hemen temizlenmemesidir (35).

3. Organ transplantasyonu: Organ transplant alıcıları HCV enfeksiyonu için ciddi risk taşırlar. Bu hastalarda enfeksiyon transplantasyondan önce mevcut olan hastalığın nüksü, transplantasyondan sırasında yapılan transfüzyon veya vericide varolan enfeksiyon sonucu gelişmektedir. İmmünsüprese organ alıcılarında antikor testleri HCV enfeksiyonunun prevalans ve bulaşını göstermede daha az değerlidir. Bu nedenle bu hastalarda HCV-RNA testi gereklidir (37).

4. Nozokomiyal bulaş: Yetersiz dezenfeksiyon ve kontamine aletlerin kullanımı ile olur. HCV enfeksiyon sıklığı hastanın kaldığı servise göre değişmekle birlikte % 2-20 arasındadır (33).

5. Damar içi uyuşturucu kullanımı: Gelişmiş ülkelerde HCV enfeksiyonunun primer bulaş yolu damar içi uyuşturucu kullanımıdır. Yeni tanı konmuş HCV enfeksiyonlu olguların çoğunda damar içi uyuşturucu kullanımı saptanmakta ve bu yol virus bulaşının yaklaşık % 60'ından sorumlu tutulmaktadır (32). 30 yaş üzerinde damar içi uyuşturucu kullanımına bağlı bulaş ABD'de % 68 ve Avusturalya'da % 80'dir. Uyuşturucu kullanımına başladıktan yaklaşık bir yıl sonra olguların % 65'i HCV ile enfekte olmaktadır. Avrupa'da da en önemli risk faktörü damar içi uyuşturucu ilaç kullanımıdır. Damar içi uyuşturucu kullananlarda Norveç'te % 67, İtalya'da % 60 oranında HCV enfeksiyonu gözlenmiştir (38).

B. Şüpheli parenteral bulaş

1. Dövme: Dövme ile HCV bulaşı olabilir. Tayvan'da yapılan bir çalışmada dövme yaptıran başka risk faktörü olmayan genç ve sağlıklı 87 kişinin % 12,6'sında anti-HCV pozitif bulunmuştur. Kontrol grubunda ise bu oran % 2,4'tür (39).

2. Akupunktur: Uygun şekilde sterilize edilmeyen iğnelerle ve deneyimsiz kişiler tarafından yapıldığında akupunktur potansiyel bir risk faktörü olabilir (32).

3. Sağlık personeli: HCV ile enfekte hastalardan sağlık personeline bulaş bilinmektedir. Genel popülasyona göre kıyaslandığında sağlık çalışanları daha çok artmış risk taşımaktadır (33, 40). Seroprevalans çalışmaları hastanede çalışanlarda anti-HCV sıklığını yaklaşık % 1 oranında göstermektedir. Bu oran genel popülasyondan farklı değildir. İğnenin tipi ile bulaş arasında yakın ilişki vardır. İçi delikli olmayan iğnelerin batması ile oluşan riske göre içi delik veya kanül batması sonucu oluşan risk daha yüksektir (33). Konjuktivaya kan sıçraması ile HCV bulaşının olduğuna dair vaka raporları olmasına karşın sağlam deri ve mukoz membranlar ile enfeksiyon gelişmemektedir (41).

C. Non-parenteral bulaş

1. Anneden bebeğe geçiş: Anti-HCV pozitif kadınlardan doğan bebeklerin yaklaşık % 5'inde perinatal bulaş olabilir. Annede HIV ile koenfeksiyon ve üçüncü

trimesterde yüksek HCV viremisi varlığında bebeğe geçiş riski 2-4 kat daha fazladır. Enfekte annelerin sütü ile beslenen bebeklerde, HCV enfeksiyon riski artmamaktadır (42, 43). Bulaş riskini arttıran diğer faktörler damar içi uyuşturucu bağımlılığı ve HCV genotipidir. Anti-HCV anneden pasif olarak bebeğe geçebildiği için yenidoğanlarda hastalığın erken tanısında HCV-RNA testi gerekir (43).

2. Cinsel yolla bulaş: HCV'nin cinsel temasla bulaş riski çok düşük olmasına rağmen semen ve tükürükte HCV-RNA pozitifliği saptanabilir. Hastalık kontrol merkezi (CDC) verilerine göre tüm hepatit C'li olguların ancak % 5'inde cinsel yol bulaştan sorumludur. Türkiye'de ise şüpheli cinsel öykü oranı % 1,5 bulunmuştur (44). Uzun süreli monogamik ilişkisi olanlarda HCV bulaş riski % 0-0,6 gibi son derece düşüktür (45). Bu sonuç, bulaş için ek risk faktörlerinin varlığının önemli olduğunu göstermektedir. Cinsel partnerin etkenin bulaşı açısından yüksek risk grubunda olması (homoseksüel veya biseksüel yaşam tarzı, damar içi uyuşturucu kullanımı), partner sayısının fazla olması, cinsel ilişki ile bulaşan başka hastalıkların varlığı HCV'nin bulaşma olasılığını artırır (32, 45). Tükürükte saptanan HCV partiküllerinin infektivite yeteneği şu ana kadar gösterilememiştir (46).

3. Aile içi bulaş: HCV'nin de HBV gibi aile içi bulaşması söz konusudur. Prevalans, temasın süresi ve özellikle indeks hastada enfeksiyonun süresi ile yakından ilgilidir (47). Ülkemizde bildirilen aile içi bulaşma oranları %0-4,2 arasında değişmektedir (48-50).

4. Diğer bulaş yolları: HCV ile enfekte kişilerin kanla kontamine olma riski olan diş fırçası, tıraş malzemeleri gibi şahsi eşyaları bulaş açısından risk taşır. HCV'nin bulaş yolları ve risk faktörleri konusunda yoğun bilgi birikimine rağmen olguların % 10-30'unda enfeksiyon kaynağı saptanamamaktadır (32).

2.6. Patogenez

Hepatit C virusunun hedefleri, hepatositler ve B lenfositleridir. Viral replikasyon çok güçlüdür. Replikasyon RNA'ya bağımlı RNA polimeraz aracılığıyla olur (51). HCV erken dönemde güçlü bir doğal ya da adaptif immün yanıt uyandırmaktan kaçmakta, konağın etkin immün yanıtını baskılayacak yollar geliştirmektedir (39). Hepatitte parankim içinde lenfositlerin olması, immün kaynaklı hasarın kanıtıdır. Virusun

eradikasyonunda hücresel bağışıklığın rolü olduğunu destekleyen bulgular mevcuttur. T helper hücreleri ve CTL tarafından virusa spesifik cevabın güçlü gelişmesi ve sürdürülmesi viral klirensle ilişkilidir. T helper hücre cevabının önemli olduğu ve bu hücrelerin kaybıyla vireminin tekrar ortaya çıkması arasında güçlü bağlantının olduğu görülmüştür. HCV ile enfekte kişilerde diğer HCV genotipleri ile süper enfeksiyonun ortaya çıkması etkisiz immünitenin varlığını desteklemektedir.

Humoral İmmünite

Patogeneizde humoral veya hücresel bağışıklığın hangisinin daha önemli yer tuttuğu kesin değildir. Gerek insanlarda gerekse şempanzelerde daha önce HCV enfeksiyonu geçirmiş olguların başka HCV suşlarıyla enfekte olabildikleri gösterilmiştir. Dolayısıyla HCV'ye karşı geliştirilen bağışıklığın zayıf olduğu anlaşılmaktadır. Diğer bir olasılık ise konağın bağışıklık mekanizmalarından kaçmasıdır. İnsanlarda HCV enfeksiyonunun yüksek oranda kronikleşmesi de bağışık yanıtın yetersizliğinin bir başka kanıtıdır. HCV enfeksiyonunda virusun antijenine karşı ilk gelişen antikor yanıtı NS3 ve kapsid proteinlerini hedeflemektedir. Daha sonra NS4 ve kılıf proteinlerine (E1 ve E2) karşı antikor gelişir. Başka virüslere karşı gelişen antikor yanıtlarına göre daha uzun bir sürede antikor gelişmektedir. Hem koruyucu bağışıklık hem immünopatogeneze açısından antikorların rolü çok iyi bilinmemektedir. Şempanzelerle yapılan çalışmalarda dolaşımda antikor varken yeni enfeksiyonlar oluşturulabilmiştir. Hepatit C virusuna karşı koruyucu bir bağışıklık oluşmamasına rağmen serumda nötralizan antikorlara rastlanmıştır. Deneyler, bu nötralizan antikorların başlıca hedefinin tüm HCV genomu içinde en değişken bölge olan HVR-1 bölgesi olduğunu göstermiştir. Bu antikorların enfeksiyon seyrini etkilediği düşünülmektedir. HCV ile enfekte kişilerin serumlarında HVR-1'e karşı gelişmiş antikorlarla virusun immün kompleksler oluşturduğuna dair kanıtlar bulunmuştur. Kronik enfeksiyon sırasında HVR varyasyon kalıbının enfeksiyonda önemli rolü olduğu düşünülmektedir. HCV enfeksiyonunda kapsid bölgesine karşı gelişen antikorlar başlıca IgG1 ve IgG3 izotiplerini kapsamakta iken diğer HCV proteinlerine karşı gelişen antikorlar IgG1 izotipindedir. Çok sayıda HVR-1 varyantı ile reaksiyon veren antikor varlığı bu antikorların korunmada etkili olmayacağını düşündürmektedir. Söz konusu sonuçlar aşı çalışmalarını olumsuz etkilemektedir (51).

Hücresel İmmünite

HCV'ye bağlı akut enfeksiyonda hem CD4+ antijene özgül helper T lenfositler hem de CD8+ sitotoksik T lenfositler son derece önemli rol oynar (52). İnsan ve şempanzelerde akut enfeksiyonun klerensi güçlü CD4+ ve CD8+ T hücre yanıtı eşliğinde gelişir. İmmünsüpresyon altında viremi düzeyindeki dalgalanmalar, HIV ile koenfekte hastalarda hastalığın kötüleşmesi, immün ilişkili mekanizmaların viral eliminasyondan sorumlu olduğunu göstermektedir. CD4+ T lenfositlerin başlıca görevi antijene özgül B hücre ve CD8+ T lenfositlerin aktivitelerini kontrol eden lenfokinleri salgılayarak düzenleyici rol oynamaktır. Tümör nekrozis faktör alfa, IFN gama, interlökin 2 gibi sitokinler birçok antiviral mekanizmayı aktive etmektedir. Akut HCV enfeksiyonunda viral klerens ile virusun yapısal olmayan proteinlerine karşı yöneltilen ve kalıcı olması gereken poliklonal, multispesifik, proliferatif CD4+ T lenfosit yanıtı arasında sıkı korelasyon gösterilmiştir. Kronik enfeksiyonda bile güçlü bir T helper 1 yanıtının, hastalığın daha az inflamatuvar seyretmesi ile ilişkili olduğu görülmüştür (51).

İyileşmiş hastalarda immün yanıt incelendiğinde, HCV'ye özel bellek CD4+ T lenfositlerin virusun yok edilmesinden sonra bile devam ettiği gösterilmiştir. Bu hücreler kronik enfekte hastalarda 10 kat daha fazladır. CD4+ T lenfositler koruyucu immünitinin gerekli ve önemli bir parçasıdır. Daha önce HCV geçirmiş şempanzelerde, CD4+ T lenfositleri toplandıktan sonra güçlü bir HCV'ye özel CD8+ T lenfosit yanıtı olmasına rağmen virus yok edilememiştir. Bu da CD4+ T lenfositlerinin yokluğunda kronik enfeksiyonun daha sık görülmesini açıklamaktadır (51).

CD8+ T lenfositler antiviral sitokinler gibi sitotoksik olmayan mekanizmaları kullanarak ve enfekte hücreleri direkt öldürerek viral eliminasyonda önemli rol alır. Akut enfekte hastalarda enfeksiyonun ilk 6 ayı içinde gelişen spesifik T lenfosit (STL) yanıtı virusun kontrolü ile ilişkilidir. STL'nin virusun eliminasyonunda büyük rolünün olduğu birçok çalışmada gösterilmesine rağmen kronik enfeksiyondaki önemi açık değildir. Kronik HCV'li hastalarda intrahepatik lenfositik infiltrasyon ve periferik kanda HCV'ye özel CD8+ STL'lerin saptanmasına rağmen virus persiste edebilir. Bu sitotoksik hücrelere rağmen süren persistans yine de açıklanamamaktadır ve hücre ölümünün virüsü elimine etmek için yeterli olmadığını göstermektedir. Karaciğer ve

kandaki güçlü poliklonal STL yanıtı daha düşük viremi düzeyi ile ilişkilidir. HCV'ye özel CD8+ STL'lerin viral temizlenmede değilse de virusun kontrolü için yeterli olduğu gösterilmiştir. Ayrıca HCV ile reenfekte şempanzelerin analizinde gösterildiği gibi, bellek CD8+ T lenfositler reenfeksiyon kontrolünde hayati rol oynar (53). Bazı deneysel şempanze modellerinde reenfeksiyona karşı korunmada hem CD4+ hem de CD8+ T lenfositlerin kritik rol oynadığı gösterilmiştir (51).

Viral Persistans

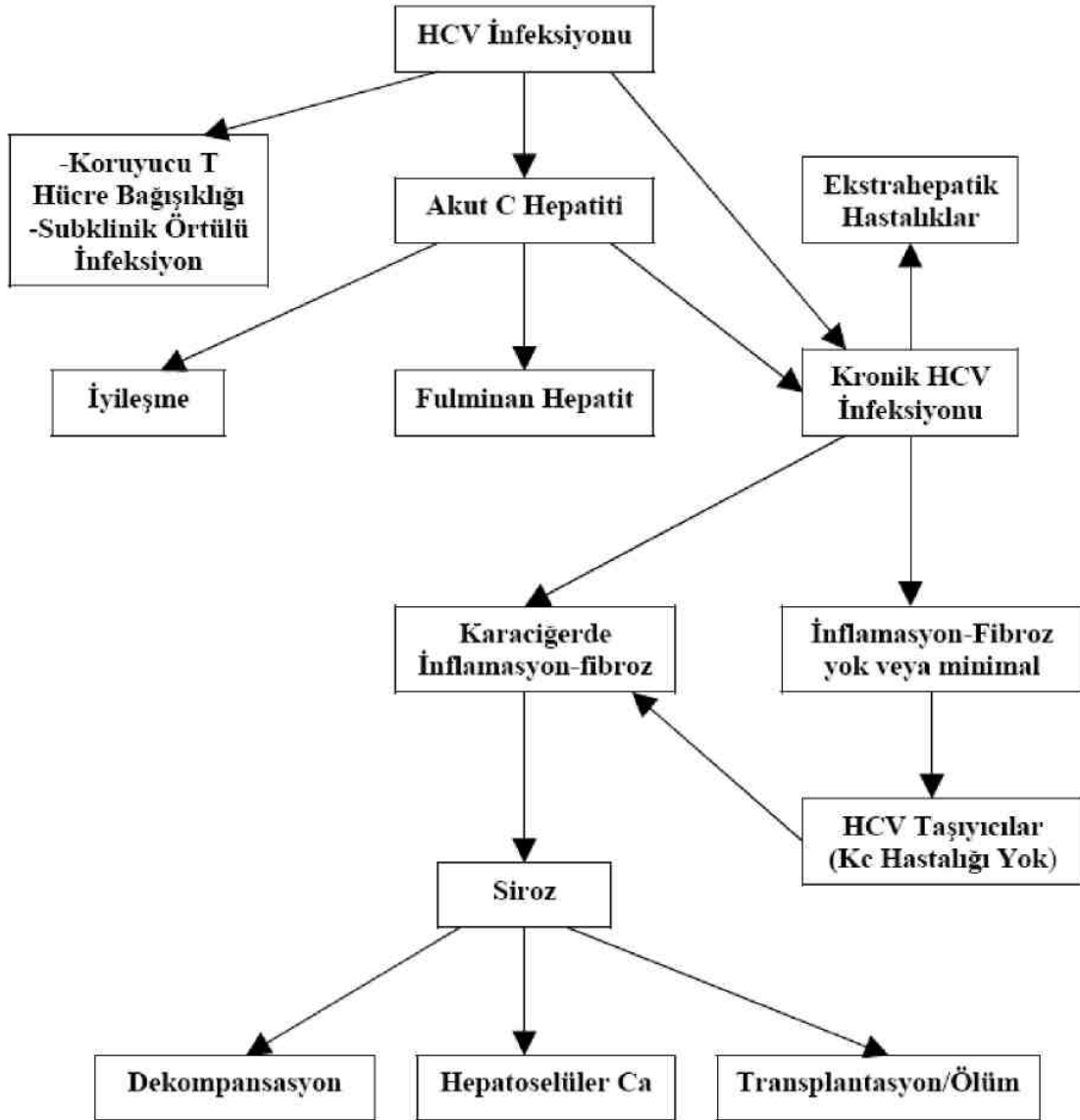
Viral persistansın olası mekanizmalarından birisi konağın enfeksiyonunun erken dönemde geliştirdiği bağışık yanıtın yetersiz olması olasılığıdır. Doğal immün yanıtın yetersizliği viral antijenlerin düşük düzeyde salınması, antijen sunan hücre tipi, bu hücrelerin HCV ile enfekte olması, T helper hücrelerin sitokin profili, nötralizan antikorların eksikliği veya yokluğu gibi adaptif yanıt uyarımının eksikliğinden veya viruse özgü sitotoksik T lenfosit aktivasyon yetersizliği, T hücre yardımının yetersizliği gibi adaptif yanıtın sürdürülememesinden kaynaklanabilir. Başka bir olasılık ise virusun bağışıklık sisteminden kaçabilmesidir (51-55).

Hepatit C virusunun konağın immün yanıtından kaçma yolları olarak T hücre varyant epitopları gibi B hücre varyantlarının da olması, lipidlerle HCV'nin ilişkisi sonucu nötralizan antikorlardan viral partiküllerin saklanması, konak immün yanıtını şaşırtmada kullanılan boş viral partiküller gibi tuzakların üretimi, konak immün yanıtının aracıları ile viral antijenlerin direkt etkileşimi, karaciğer dışı rezervuarların kullanımı ve antijen sunan hücre fonksiyonunun bozulması olasılığı olarak bildirilmektedir (55).

Hepatit C virusu antijenik epitopları için T hücreleri inaktive etme potansiyeli olan özel antagonistik peptidlerin üretilmesi immün reaksiyona rağmen persistansın olası bir açıklamasıdır. Böylesi antagonizmalar T hücre üretiminin varlığında bile virusun uzun dönem persistansını açıklayabilir. Ayrıca HCV'ye özgül T hücreler fonksiyone olmayabilir. Başka bir mekanizma da IFN sistemi ile virusun interferansıdır. Son zamanlarda enfekte kişilerin karaciğer biyopsilerinde IFN- α etkisiyle HCV interferansı doğrulanmıştır (51-56).

Hepatit C virusunun kor ve E2 proteini immünsüpresif özelliğe sahiptir. Kor proteini C1q reseptörüne bağlanır ve T hücre aktivasyonunu baskılar. CD81 reseptörüne E2 proteininin bağlanmasını hızlandıran doğal öldürücü hücreleri bu hücrelerin fonksiyonlarını inhibe eder. Kor proteini, fas ilişkili apoptozu artırarak karaciğer hasarını indükler ve periferik T hücrelerin fonksiyonunu bozar (51).

2.7. Doğal Seyir ve Klinik Formlar



Şekil 6. HCV Enfeksiyonunun doğal seyri (57)

Hepatit C virusu enfeksiyonu akut ve kronik seyirli olsa da, çoğunun anikterik ve asemptomatik seyretmesi nedeniyle hepatit C enfeksiyonunun akut dönemde tanınması oldukça güçtür (58). Akut HCV enfeksiyonu, temastan bir-üç hafta sonra kanda HCV-RNA'nın ortaya çıkması yanında, semptomatik ve ikterik vakalarda; halsizlik, iştahsızlık, hafif kas ağrıları, sarılık gibi belirtilerle seyreder. Bu belirtiler genellikle düzelir. Virus ile teması takiben olguların % 15-25'inde iyileşme gözlenirken, % 75-85'inde kronik hepatit gelişmektedir. Enfeksiyonun oluşma yaşı hastalığın kronikleşme riski ve ilerleme hızı ile ilişkili olan en önemli faktördür. Etnik köken (zenciler beyazlara göre daha fazla), erkek cinsiyet, akut enfeksiyonu klinik olarak hafif, belirtisiz, anikterik geçirme, HIV enfeksiyonu kronikleşme oranını artıran diğer faktörlerdir (58, 59). Çocuklarda ve adölesan dönemde enfeksiyonun spontan iyileşme oranı yaklaşık % 40-45'tir. Bu olguların % 2-4'ünde 20 yıl sonra siroz gelişir. Erişkinlerde ise virusun kaybolma oranı son derece düşüktür ve 20 yıl veya daha uzun sürede siroza ilerleme oranı % 10-15'tir. Siroz gelişen olgularda karaciğer dekompanseasyon oranı yılda % 4-5 ve karaciğer kanseri insidansı yılda % 1-5'tir (59).

Doğal seyir sürecinde hastaların çoğunda ilerleyici karaciğer hasarının ortaya çıkışı sinsidir. Hastaların yaklaşık 1/3'ünde 15-20 (hızlı fibrotik ilerleme), 1/3'ünde 20-30 yıl içinde (intermediate fibrotik ilerleme) ve 1/3'ünde ise 30 yıldan sonra (yavaş fibrotik ilerleme) siroz gelişir. Normal alanin-aminotransferaz (ALT)'lı kişilerde hastalığın ilerleme hızı yavaştır. İlerleyici karaciğer hastalığının gelişmesine etki eden birçok faktör vardır. Bunlar, enfeksiyonun ileri yaşta alınması (>40 yaş), kronik alkol kullanımı (erkeklerde >30 gr/gün, kadınlarda >20 gr/gün), HIV veya HBV koenfeksiyonu, erkek cinsiyet, karaciğerdeki inflamasyon ve fibrozisin derecesidir (59). Irk, şişmanlık, karaciğer yağlanması, diyabet ve immün yetmezlik HCV persistansında etkili diğer faktörlerdendir (32, 59). Serumdaki viral yük, genotip 3 dışı enfeksiyonlar, enfeksiyon etkeninin bulaş yolu ve karaciğerdeki viral yük fibrozis üzerine etkili değildir. Human lökosit antijen (HLA) tipi ile siroza ilerleme arasında ilişki vardır. HLA-B54 artmış siroz riski ile DRB1*0301 ise siroz gelişmemesi ile koreledir (42, 58).

Akut Hepatit C (AHC) ve Fulminan Hepatit C: AHC enfeksiyonunun inkübasyon süresi 3-20 hafta olup, ortalama 7-8 haftadır. % 70-80 olgu asemptomatiktir ve bu nedenle tanı koymak zordur. Olguların % 75'inden fazlası anikterik veya subikteriktir. Serum ALT düzeyi, genellikle 600 IU/L'yi aşmaz ve eğer varsa, ikter 4

hafta kadar sürer. Fulminan hepatit gelişimi çok nadirdir. AHC geçirenlerin ortalama % 25’inde iyileşme olup olay kronikleşmezken, % 25’inde karaciğerdeki harabiyet hafif düzeyde kalmakta ve ciddi bir ilerleme göstermemektedir. Hastaların yarısında ise ilerleyici bir seyir göstermektedir. Bu hastalarda ALT düzeyi ya sürekli yüksek kalmakta ya da aralıklı yükselip normal sınırlara gelmektedir. Bazı hastalarda ise serum ALT düzeyi kalıcı olarak normal sınırlar içinde olmasına rağmen, histolojik olarak ilerleme göstermektedir. Değişik ülkelerden bildirilen fulminan hepatit olgularının farklı olması, konağa ve viral suşlara ilişkin varyasyonlardan kaynaklanmaktadır (59).

AHC’nin spesifik tanı koydurucu histolojik özellikleri mevcut değildir. Makro veya mikroveziküler tipte olabilen yağlanma sıklıkla gözlenir, hafif derecededir. Asidofilik dejenerasyon ve asidofil yapılar izlenir. Belirgin sinüzoidal ve portal iltihap vardır. Safra duktus hasarı vardır, fakat duktus kaybı gözlenmez. Benekli nekroz mevcuttur (42).

2.8. Kronik Hepatit C

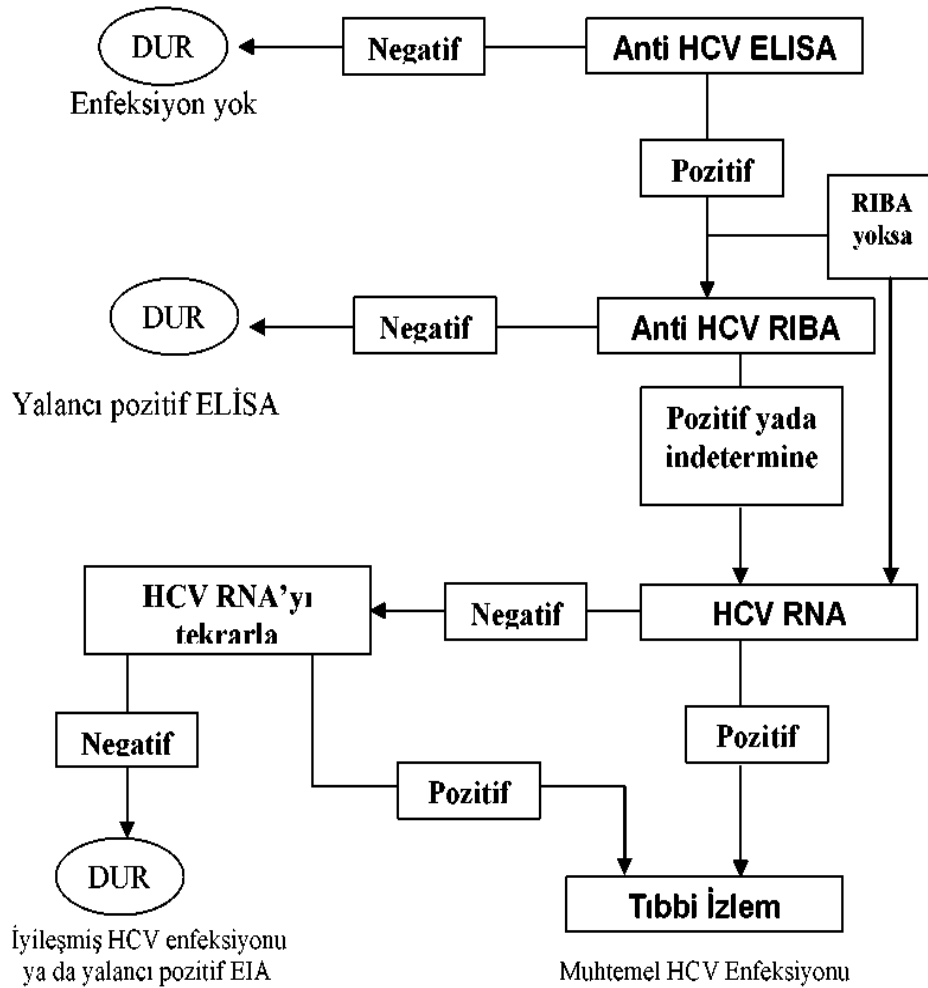
En az altı ay boyunca serumda HCV-RNA’nın saptanması KHC olarak tanımlanır (59). Kronik hepatit C hastalarında spontan temizlenme oranı her yıl için % 0,5’tir (58).

Kronik hepatit C hastalarının büyük kısmında herhangi bir yakınma olmayıp, % 70’i asemptomatik seyreder. Olguların çok az bir bölümünde halsizlik, yorgunluk, iştahsızlık gibi yakınmalar vardır. Genellikle siroz, karaciğer yetmezliği veya karaciğer kanseri ortaya çıkana kadar asemptomatik bir seyir söz konusudur. Bazı hastalarda karaciğer dışı bulgular saptanabilir. HCV-RNA düzeyi sabit seyrederken serum ALT düzeyleri semptomlardan bağımsız olarak dalgalanmalar gösterir, ancak ALT düzeyinin normal olması karaciğer hasarının olmadığını göstermez (32, 60). Kronik Hepatit C’nin istenmeyen en önemli sonucu hepatik fibrozis oluşması ve bunun sonucunda da siroz ve HCC gelişmesidir (23). Bu uzun süreli komplikasyonlar genellikle 20 yıldan uzun süren hastalıkta meydana gelir. Bununla birlikte hızlı ilerleyen olgular da vardır. Fibrozisin ilerlemesi enfeksiyonun süresi, yaş, erkek cinsiyet, alkol kullanımı, HBV koenfeksiyonu ve düşük CD4 sayısı gibi çeşitli faktörlerle ilgilidir. Obesite ve diyabet gibi metabolik bozukluklar da fibrozis oluşumunda etkili faktörlerdir (16, 61).

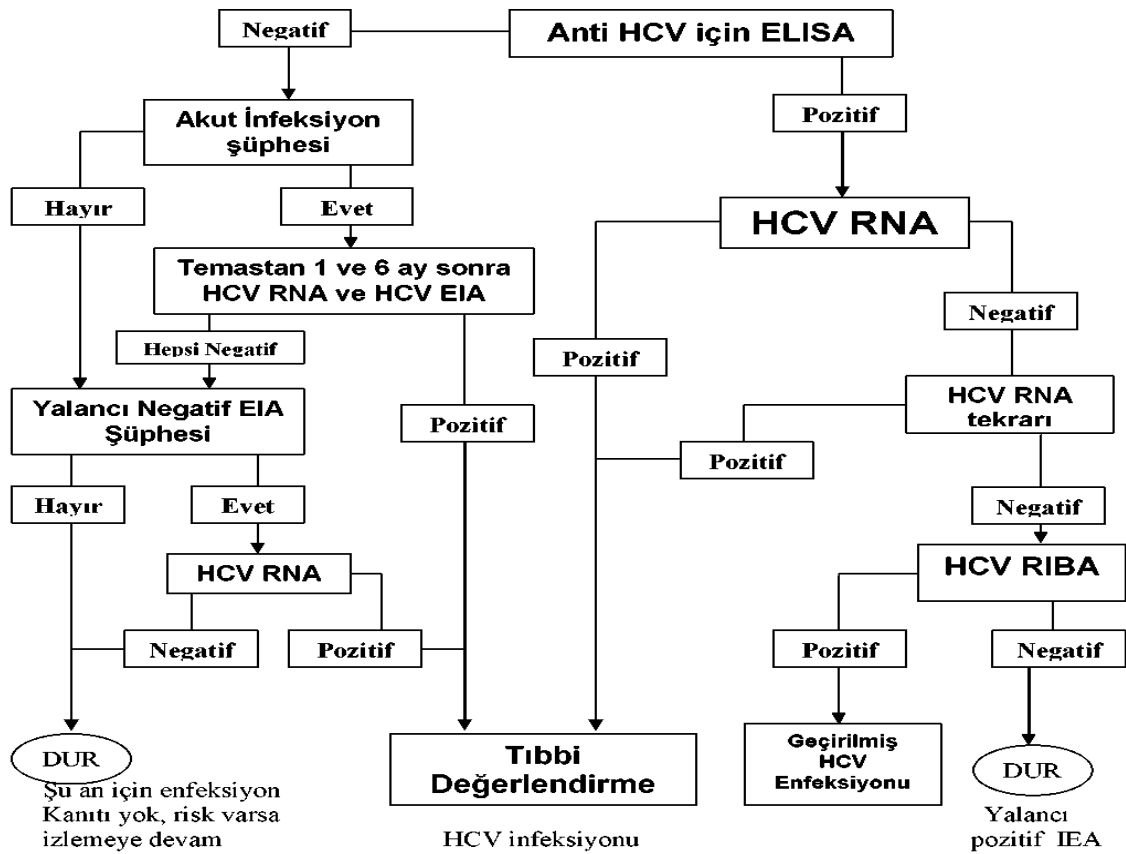
Karaciğer kanseri kronik hepatit C enfeksiyonunun geç dönem bir komplikasyonudur. Kronik hepatit C enfeksiyonu olanların % 2,5'inde ortaya çıkar. Genellikle sirotik olgularda görülür. Bazı olgular asemptomatik olabilir. Serum alfa fetoprotein düzeyi çok yüksektir. Kesin tanı karaciğer biyopsisi ile konur. Görüntüleme yöntemleri tanıda yardımcıdır (58).

2.9. Tanı

Hepatit C'nin en güvenilir tanısı vücutta virusun varlığının gösterilmesi ile konur. Bunun için en sık viral RNA gösterilmesine dayanan nükleik asit testleri kullanılmaktadır. Ancak pratikliği nedeni ile serolojik testler de kullanılmaktadır. Şekil 7.'de düşük prevalanslı yerlerde HCV tanısı, Şekil 8.'de ise yüksek prevalanslı yerlerde HCV tanısı şematik olarak gösterilmiştir (62).



Şekil 7. Düşük prevalanslı yerlerde HCV tanısı (62)



Şekil 8. Yüksek prevalanslı yerlerde HCV tanısı (62)

2.9.1. Serolojik Testler

HCV enfeksiyonu tanısı için bugün kullanılan en pratik yöntem antikor aranmasıdır. Bu amaçla, bugüne kadar dört kuşak ELISA testi kullanılmıştır. İlk kuşak testler (EIA-1), tek bir rekombinant HCV klonundan elde edilmiştir. NS3 geninin bir kısmı ile NS4 geni ürününün tamamını içermişlerdir. Duyarlılık ve özgüllükleri düşük olup, serokonversiyonu saptamada yetersiz (geç) kalmışlardır. İkinci kuşak ELISA testleri (EIA-2), kor ve NS3 bölgelerinden ek rekombinant proteinler içermektedirler (63). Üçüncü kuşak testlerde (EIA-3) NS5'ten bir rekombinant protein eklenmiştir (64). Üçüncü kuşak testlerinin duyarlılık ve özgüllüğü ikinci kuşak testlerden daha yüksek olup % 97-99'dur (65). Yeni kullanıma giren dördüncü kuşak testlerde (EIA-4) kor bölgesinden iki farklı epitop, NS3, NS4A, NS4B, NS5A gibi üçüncü kuşak testlerde kullanılan proteinler daha da çeşitlendirilerek genotip 1a,1b, 2 ve 3 virusların NS3 ve NS4 proteinleri de eklenerek duyarlılık üçüncü kuşak testlere göre % 10-20 arttırılmıştır (66). Ayrıca üçüncü ve dördüncü kuşak testler serokonversiyonu daha kısa sürede

saptaya bilmektedirler (67). Tarama testlerindeki bu gelişmeler ile kan donörlerinin taranması sonucu, transfüzyona bağlı HCV enfeksiyonu nerede ise sıfırlanmıştır. Virus alındıktan 4-10 hafta sonra antikorlar kanda tespit edilebilir. İmmüsuprese kişilerde, HIV enfeksiyonu olanlarda, hemodiyaliz hastalarında kanda antikor saptanmayabilir. Otoimmün hepatiti olan hastalarda ve Hepatit C prevalansının düşük olduğu toplumlarda yalancı pozitiflik elde edilebilmektedir (62). Böyle durumlarda RIBA (rekombinant immunoblot assay) testleri ile doğrulama yapılması önerilmiştir. Ancak ELISA'ya göre duyarlılığı daha azdır. RIBA'da kullanılan antijenlerden en az iki tanesine karşı pozitiflik oluşması, testin doğrulanması için yeterli kabul edilmektedir. Tek bir antijen pozitifliği "indetermine" denilen doğrulanamama durumudur (68). RIBA'nın özgüllüğünün yüksek, ancak duyarlılığının düşük olması sebebiyle, günümüzde ELISA sonuçlarının RIBA ile kontrol edilmesinin doğru bir yaklaşım olmadığı görüşü ağırlık kazanmaktadır. Bu nedenle artık RIBA, doğrulama testi olarak çok fazla kullanılmamaktadır (69).

Akut dönemde IgM saptanamayabildiği gibi, geç dönemde ortaya çıkabilmekte, kaybolmakta ya da uzun süre boyunca, yani herhangi bir zamanda saptanabilmektedirler (62).

Rutin olarak anti-HCV taranmasına gerek yoktur, tanımlanmış risk faktörü saptanan olgularda yapılmalıdır. EIA ile anti-HCV testi yapılması önerilenler:

- 1996 yılından önce kan ve kan ürünü transfüzyonu yapılanlar
- Kan ve kan ürünlerini sürekli kullanan hastalar (hemofili gibi)
- Human immunodeficiency virus (HIV) ve HBV enfeksiyonu olanlar
- Hemodiyaliz hastaları
- Kan, organ veya doku vericileri
- Organ transplantasyonu yapılanlar
- Başka bir nedenle açıklanamayan transaminaz yüksekliği olanlar
- İntravenöz ilaç kullanma alışkanlığı olanlar
- HCV ile enfekte anneden doğan bebekler (doğumdan 18 ay sonra)
- HCV pozitif kan ile perkütan veya mukozal teması olan sağlık çalışanları (65).

2.9.2. Moleküler Testler

Diğer bir tanı yöntemi moleküler tekniklerle HCV RNA'nın dolayısıyla vireminin tespit edilmesidir. HCV RNA tayini HCV enfeksiyonu tanısında en duyarlı yöntemdir ve altın standart olarak kabul edilmektedir (70). AHC'de aminotransferazların yükselmesi ve anti-HCV pozitifleşmesinden önce serumda tespit edilebilir. Kronik enfeksiyonu olan hastaların çoğunda viremi sürekli, bir kısmında aralıktır (9). Aminotransferazları normal asemptomatik taşıyıcıda HCV-RNA pozitif bulunabilir (70). HCV-RNA tespitinde kalitatif ya da kantitatif testler kullanılır. Kalitatif HCV-RNA testleri klasik polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), real-time (RT) PCR ya da "Transcription-Mediated Amplification" (TMA) tekniğine dayanır (71). Kalitatif PCR özellikle transaminazları normal olduğu durumlarda, karaciğer hastalığına yol açabilecek diğer nedenlerin ve HIV enfeksiyonu gibi immüsupresyonun varlığında veya antikorun henüz oluşmadığı AHC olgularında yararlıdır. Viral yükün tespit edilmesinde kantitatif PCR (kompetatif PCR veya RT-PCR) ya da branched-DNA teknikleri kullanılır. Standartizasyonu sağlamak amacıyla viral yükün internasyonal ünite (IU) olarak verilmesi önerilmektedir. Viral yük, karaciğerdeki inflamasyon ve fibrozisin şiddeti ile de korele değildir (72). Klinikte HCV-RNA, akut enfeksiyonda serokonversiyon öncesinde tanı koymada, antikor oluşturamayan kronik hepatitli hastaların ve yenidoğan enfeksiyonlarının tanısında, antikor pozitif hastalarda vireminin araştırılmasında ve antiviral tedavinin izlenmesinde kullanılır (63).

Okkült HCV enfeksiyonunda transaminazlar yüksek olmasına rağmen serumda HCV-RNA negatiftir. Böyle hastalarda karaciğer dokusunda ya da periferik mononükleer kan hücrelerinde HCV-RNA pozitif bulunur (72).

2.9.2.1. HCV-RNA Araştırma Yöntemleri

Anti-HCV pozitifliği saptanan hastada HCV-RNA'nın belirlenmesi gerekir. HCV ile enfekte hastalarda genellikle saptanabilir düzeyde HCV-RNA bulunduğu ve tedavi kararından önce viremi düzeyinin belirlenmesi gerektiğinden çoğu zaman kantitatif yöntemler kullanılır. Ancak kantitatif testlerin duyarlılığı kalitatif testler kadar yüksek olmadığından enfeksiyonun doğrulanması ya da kantitatif yöntemlerle negatif saptanan HCV-RNA'nın doğrulanması için kalitatif yöntemler kullanılabilir (73).

2.9.2.2. Kalitatif Yöntemler

HCV-RNA PCR gibi amplifikasyon yöntemleri ya da transkripsiyon aracılı amplifikasyon yöntemleri ile araştırılabilir. Gıda ve ilaç dairesi (FDA) tarafından onaylanmış PCR testleri mevcuttur: Amplicor 2. versiyon, Cobas Amplicor 2.versiyon, Ampliscreen, Versant HCV-RNA kalitatif testi, Procleix HIV-1/HCV testi (74).

2.9.2.3. Kantitatif Yöntemler

HCV-RNA düzeylerini belirlemek için kullanılabilecek testler hedef amplifikasyonuna veya sinyal amplifikasyonuna dayalı testlerdir. Kantitatif testlerde sonuçlar daha standardize olduğundan internasyonal ünite (İÜ) olarak rapor edilmelidir. FDA'nın onayladığı RT-PCR temelli testlerde alt limit 10-50 İÜ/mL arasındadır (73, 74).

HCV-RNA düzeyi tedaviye yanıt olasılığının değerlendirilmesi ve tedavi sırasındaki düzey değişikliklerinin izlenmesi için gereklidir (37, 73).

Viral Genotip Tayini: HCV genotipi ELİSA ile genotipe özgü HCV epitoplarına karşı oluşan antikorların gösterilmesi ile de serolojik olarak tespit edilebilir. Ticari olarak (Murex; 1-6 HCO2, Abbott Lab. North Chicago, Illinios) kitlerde kronik enfekte hastaların yaklaşık % 90'ında yorumlanabilir sonuçlar elde edilir. Bu ticari kitler genotip 1-6 ayrımını yapabilir, ancak alt tip ayrımını yapamaz (73).

Hepatit C virusu genotipleri direkt sekans analizleri veya revers hibridizasyon yöntemleri ile saptanabilir. Günümüzde onay almış kitlerde hatalı tiplendirme nadirdir. % 1-4 oranında karışık genotipler klinik tablodan sorumlu olabilir. HCV enfeksiyonunda tedaviye yanıt olasılığını tedavi süresini ve ribavirin dozunu belirlemek için tedavi öncesi genotip tayini yapılmalıdır (32, 74, 75).

2.9.3. Karaciğer Biyopsisi

Karaciğerde fibrozis ve nekroinflamasyonun şiddetinin belirlenmesinde altın standarttır (72, 73). Fibrozis ve nekroinflamasyon düzeyi çeşitli skorlama sistemleriyle derecelendirilmiştir. Fibrozis derecesinin belirlenmesi tedavi açısından önemlidir. ALT'si normal hastalarda da karaciğer histolojisine bakılması önerilmektedir. Çünkü bu

hastalarda ilerlemiş fibrozisin gelişebileceği gösterilmiştir (70). Ancak biyopsi sonuçlarının değerlendirilmesinde bazı sınırlamalar vardır. En önemlileri, yeterli miktarda örnek alınamaması, farklı bölgelerde farklı histolojik özelliklerinin görülebilmesi ve biyopsiye bağlı komplikasyonlardır (72). Bu nedenle nekroinflamasyon ve fibrozisi gösteren biyopsiye alternatif non-invaziv yöntemler geliştirilmeye çalışılmaktadır. Bu amaçla fibrozisi gösteren serum belirleyiciler içeren paneller oluşturulmuştur. Fibrotest-ActiTest bu panellerden biri olup haptoglobulin, alfa2-makroglobulin, gama-glutamil transpeptidaz, total bilirubin, apolipoprotein A1 ve ALT olmak üzere altı serum belirleyicisinin kantitatif sonuçlarını içerir (76). Fibrozis ve inflamasyon derecesini sonuçları rakamlarla skorlayarak kantitatif olarak verir. Fibrozis F0'dan F4'e (F4: siroz), nekroinflamasyon A0'dan A3'e (A3: şiddetli aktivite) kadar skorlanır (77). Diğer bir panel FibroSpectII, hiyalüronik asit konsantrasyonu, metalloproteinaz doku inhibitörlerinin düzeyleri ve alfa2-makroglobulin seviyesini içeren bir kombinasyondur (78). Başka bir non-invaziv yöntem de transient elastografi (FibroScan; Echosens)'dir. Pulse-eko ultrasonografi ile karaciğerin sertliğini ölçer (79). Yapılan bir çalışmada kronik HCV enfeksiyonu olan hastalarda FibroScan ve FibroTest-Actitest kombinasyonunun karaciğer biyopsi sonuçlarıyla yüksek oranda uyumlu bulunmuştur (80). Bu testler ile ileride biyopsi ihtiyacının ortadan kalkabileceği düşünülmektedir (72).

Hepatik ultrasonografi, bilgisayarlı tomografi (BT), magnetik rezonans görüntüleme (MRI) gibi görüntüleme yöntemleri ile ciddi karaciğer hastalığı bulguları ve HSK tespit edilebilir. Sirotik hastalarda alfa-feto protein (AFP) yükselmesi HSK göstergesi olabilir. HSK tespitinde AFP'in duyarlılığı ve özgüllüğü yüksektir (81).

Karaciğer biyopsisi hastalığın şiddeti, ilerlemesi ve prognozu hakkında en güvenilir bilgileri veren bir tanı yöntemidir. Biyopsi klinik tanının doğrulanmasının yanında eşlik eden diğer karaciğer hastalıklarının tanısı, nekroinflamasyonun derecelendirilmesi fibrozisin evrelendirilmesi ve izlem-tedavi kararı için son derece önemlidir. Karaciğerdek nekroinflamasyon ve fibrozisi değerlendiren değişik skorlama sistemleri kullanılmaktadır. Tablo 1'de farklı sistemlere göre fibrozis evrelendirilmesinin karşılaştırılması verilmiştir (82).

Tablo 1. Farklı skorlama sistemlerine göre fibrozisin evrelendirilmesi

Histolojik bulgu	Ishak	METAVIR	Knodell
Fibrosis yok	0	0	0
Bazı portal alanlarda fibröz genişleme	1	1	1
Portal alanların çoğunda fibröz genişleme	2	1	1
Portal alanların çoğunda fibröz genişleme ve nadir köprüleşme	3	2	1
Portal alanların çoğunda fibröz genişleme ve sık köprüleşme	4	3	3
Şiddetli köprüleşme ve nadir nodül	5	3	
Siroz	6	4	4

Tanıda kullanılan diğer yöntemler: Karaciğer biyopsisinin invazif bir işlem olması nedeniyle fibrozisi gösteren alfa-2 makroglobulin, haptoglobulin, apolipoprotein A1, gamma glutamil transferaz, hiyaluronik asit, prokollajen III peptid gibi bir çok non-invazif test tanımlanmıştır. Testler tek veya panel şeklinde yapılabilmektedir. Konuyla ilgili değişik araştırma sonuçları bildirilmektedir. Hepatik fibrojeniz ile ilgili bilgiler arttıkça bu biyolojik göstergelerin tanıdaki yeri konusunda daha net sonuçlara ulaşılabilecektir. KHC'nin siroz ve karaciğer kanseri gibi komplikasyonları açısından görüntüleme yöntemleri, alfa-fetoprotein düzeyinin saptanması gibi tanısal yöntemler kullanılmakla beraber günümüzde tanıda altın standart kabul edilen yöntem karaciğer biyopsisidir (82, 83).

2.10. Tedavi

Kronik hepatit C enfeksiyonu tedavisinde primer amaç virusun eradikasyonudur. Tedaviye yanıtı takipte HCV-RNA'nın serumdan kaybolması temel alınmaktadır. Fakat HCV-RNA'nın karaciğer dokusundan kaybolması yok denecek kadar azdır. Bundan dolayı kronik hepatitten siroza ilerlemeyi geciktirmek, karaciğerdeki inflamasyonu, karaciğer hasarı gelişme riskini, karaciğer transplantasyonu gereksinimini, karaciğer dışı belirtileri azaltmak ve bulaşı önlemek gibi sekonder tedavi hedefleri belirlenmiştir (37, 83).

İnterferon (IFN) ve ribavirin tedavide kullanılan ilaçlardır. IFN-alfa-2b 1986 yılında FDA tarafından KHC için tek ilaç olarak onaylanmıştır. 1998 yılında IFN ile birlikte ribavirin verilerek yapılan tedavinin daha etkin olduğunun saptanması üzerine kombinasyon tedavisine geçilmiştir. Son zamanlarda IFN-alfayı içeren başlangıç tedavi pegile interferon (PEG-IFN) + ribavirin kombinasyon tedavisiyle değişmiştir. Pegilasyonun amacı ilacın hem absorpsiyon hem de dağılımını iyileştirme ile etkin konsantrasyonu uzun süre sağlamaktır. Pegile (PEG) molekülleri PEG-IFN-alfa-2b'deki gibi lineer veya PEG-IFN-alfa 2a'daki gibi dallanmış olabilmektedir. IFN- α içinde yer alan konsensus IFN (alfacon 1) sentetik tip 1 IFN'dir ve KHC tedavisinde etkilidir (84).

Kronik hepatit C enfeksiyonunda viral yükteki azalmanın iki veya üç fazda meydana geldiği anlaşılmıştır. İlk hızlı faz doza bağımlı olup tedavinin ilk 48 saatinde oluşur. Bir-iki gün boyunca genotip 1 ile enfekte hastalarda yaklaşık 1-2 log ve genotip 2 ile enfekte hastalarda 3-4 log HCV-RNA düşüşü olur. İkinci eliminasyon fazı daha yavaştır. Bazı hastalarda karmaşık kinetik seyirler görülebilir. Tedaviye cevapsızlarda birinci ve ikinci fazda HCV-RNA'da yok denecek kadar az düşme olabilir veya hiç azalma olmayabilir. IFN ve ribavirin kombinasyonu alanlarda HCV-RNA azalmasının üçüncü bir fazı gösterilmiştir. Birçok çalışma kalıcı viral yanıt (KVY) ile viral klerens hızının bağlantılı olduğunu ortaya koymuştur (85, 86).

PEG-IFN'ların klasik IFN'lara göre serum klerens oranı 100 kat daha düşüktür ve terminal yarı ömrü 99 kat daha uzundur. PEG-IFN'lar da klasik IFN gibi bifazik viral düşüş sağlar (85).

İnterferonlar doğrudan etkili antiviral ajanlar değildir. Virus ile karşılaşan hücrelerden çok sayıda efektör proteinin yapımını uyarırlar. Antiviral etki virus ve hücre tipine bağlı olarak viral penetrasyonun veya tomurcuklanmanın, mRNA'nın sentez ve metilasyonunun, viral proteinlerin translasyonunun engellenmesiyle sağlanır. IFN'ların etkisiyle 2'-5' oligoadenilat sentetaz, RNA bağımlı protein kinaz ve Mx proteini salınır. 2'-5' oligoadenilat sentetaz hem hücresel hem de viral tek zincirli RNA'yı bölmek için latent hücresel endoribonükleazları aktive eden adenilat oligomerlerinin yapımına neden olur. RNA'az tüm çift zincirli RNA'ları inhibe ederek viral yükü azaltır. Protein kinaz ise viral protein sentezini inhibe eder (42, 85).

IFN- α cilt altı enjeksiyon sonrası % 80 oranında emilir. Standart IFN'nun serum seviyesi 6 saatte pik yapar, 16 saatte serumda tesbit edilemez (42). PEG-IFN'un ise yarılanma ömrü 2b'de 40 saat, 2a'da 72-96 saattir. IFN çeşitli vücut sıvılarında inaktivasyon, hücrel "uptake" ve özellikle böbrek, karaciğer, kalp, iskelet kası ve akciğer gibi organlardan metabolize edilerek atılır. IFN tedavisinin kontrendikasyonları Tablo 2'de gösterilmiştir (74).

Tablo 2. Kronik hepatit C enfeksiyonunda interferon tedavisinin kontrendikasyonları

• Ağır ve kontrolsüz depresyon • Otoimmün hepatit veya tedaviyle şiddetlenebilecek otoimmün bir durum • Tedavi edilmemiş tiroid hastalığı • Gebelik veya yetersiz kontrasepsiyon • Kontrolsüz diyabet, ciddi hipertansiyon, koroner arter hastalığı, kalp yetmezliği ve kronik obstruktif akciğer hastalığı gibi eşlik eden hastalıkların varlığı • HCV tedavisinde kullanılan ilaçlara karşı aşırı duyarlılık • 2 yaşından küçük olmak

IFN tedavisi alan hastalarda yan etkiler sık görülür. IFN ve ribavirin kombinasyon tedavisi alan hastalarda bu ilaçlardan birinin en az bir yan etkisi hastaların % 75'inde ortaya çıkar. IFN ilişkili yan etkiler; nötropeni, trombositopeni, tiroid fonksiyon bozuklukları, başağrısı, bulantı, kusma, saç dökülmesi, hafif ateş, kilo kaybı, tinnitus, irritabilite, konsantrasyon ve hafıza bozuklukları şeklinde sıralanır. Grip benzeri tablo ve depresyon PEG-IFN tedavisinde daha az gelişmektedir (87).

Ribavirin

KHC tedavisinde kalıcı viral yanıtı artırmak için kullanılan nükleozid analogudur. Viral RNA sentezinin inhibisyonu ile viral replikasyonu durdurur. IFN ile kullanıldığında HCV'ye karşı şu şekilde etkili olmaktadır: (42)

1. Viruse karşı konağın hücrel immünitesinin aktive edilmesi

2. Hücre içi guanozin trifosfat havuzunun azalması, böylece inozin monofosfat dehidrogenaz enzim blokajı yoluyla viral replikasyonun azalması

3. RNA'ya bağımlı RNA polimerazın inhibisyonu

4. HCV genomu üzerinde hatalar meydana getiren bir RNA mutajeni olarak görev yapması.

Ribavirin vücuttaki tüm hücrelere girer. Özellikle eritrositlerde kandaki konsantrasyonunun 60-70 katına ulaşır. Ribavirinin eritrositlerdeki yarı ömrü 40 gündür. Eritrositlerde defosforilasyon enzimleri olmadığından birikim ve hemoliz görülür (88).

Ribavirin ilişkili yan etkiler; hemolitik anemi, halsizlik, kaşıntı, döküntü, sinüzit, gut hastalığı ve teratojenite olarak sayılabilir. Özellikle ribavirin nedeniyle gelişebilen doğumsal anomaliler nedeniyle tedavi sırasında ve tedaviden 6 ay sonrasına kadar gebelikten korunulmalıdır. Hemodiyaliz hastalarında eritrositlerde birikmesi nedeniyle kullanılmaz. Tablo 2'de kontrendikasyonları verilmiştir. Bunlar içinde en önemlisi ve en çok tedaviyi sınırlayan hemolitik anemidir. Ribavirin tedavisi sırasında % 10 olguda doza bağımlı, geri dönüşümlü hemolitik anemi görülür. İlk 4-8 haftada hemoglobin düzeyinde 2-3 g/dL düşme olabilir. Hemoglobin düzeyi 10 g/dL'nin altına inerse doz yarıya indirilir, 8,5 g/dL'nin altına inerse tedavi kesilir (74, 88).

Tüm kronik hepatit C hastaları standart PEG-IFN ve ribavirin kombinasyon tedavisi için aday olarak düşünülmelidir. Tablo 3'de kronik hepatit C enfeksiyonu için tedavi endikasyonları, Tablo 4'de ise hasta temelinde karar verilmesi gereken durumlar gösterilmiştir (74).

Tablo 3. Tedavinin endikasyonları

• Tespit edilebilir HCV-RNA düzeyi • 18 yaş ve üzeri hasta • Karaciğer biyopsisi belirgin fibroz gösteren kronik hepatit (portal fibrozdan fazla: Metavir skoru ≥ 2, Ishak skoru ≥ 3) • Kompanse karaciğer hastalığı (total bilirubin $< 1,5$g/dL, INR$<1,5$, serum albumin $>3,4$ g/dL, trombosit sayısı $>75.000/\text{mm}^3$ ve ayrıca ensefalopati veya asit kliniğinin olmaması) • Kabul edilebilir biyokimyasal ve hematolojik değerler olması (Hemoglobin erkekte >13g/dL, kadında >12g/dL; nötrofil sayısı $>1500/\text{mm}^3$, kreatinin$< 1,5$ mg/dL) • Kontrendikasyonu olmayanlar (Tablo 2) • Tedavi olmayı arzu eden ve tedavi gereklerine uymayı kabul eden hasta

Tablo 4. Tedaviye hasta temelinde karar verilmesi gereken durumlar

• Daha önceki tedavilere (IFN ve ribavirin kombinasyonu veya IFN monoterapisi) yanıtız veya relaps gelişen olgular • Halen uyuşturucu ilaç veya alkol kullanmakta olan fakat madde bağımlılığından kurtulmak için bir programa istekli olanlar • Karaciğer biyopsisinde fibrozun olmaması • Akut hepatit C • HIV koenfeksiyonu • Hastanın 18 yaş altında olması • Hemodiyalize bağımlı veya bağımsız kronik böbrek hastalığı • Dekompanse siroz • Karaciğer transplant alıcıları
--

Tedavi verilmesi planlanan olgularda tedavi öncesi dönemde eşlik eden durumlara ilişkin değerlendirme yapılmalıdır. Hepatit A, HIV, HBV serolojileri, tiroid fonksiyon testleri, otoantikörler bakılmalıdır. Tedavi süresince ve tedavi sonrası dönemde biyokimyasal, virolojik ve tedaviye bağlı yan etkiler açısından çok iyi bir izlem gereklidir (32).

Tedavi verilen olgularda yanıtı değerlendirirken bazı tanımlamalar kullanılmaktadır; (42)

Biyokimyasal yanıt: ALT düzeylerinin normal olmasıdır.

Virolojik yanıt: HCV-RNA'nın kaybolmasıdır.

Hızlı virolojik yanıt: Tedavinin 4. haftasında HCV-RNA'nın negatifleşmesidir.

Erken virolojik yanıt (EVY): Tedavinin 12. haftasında HCV-RNA düzeyinde en az iki logaritmik azalma olması veya HCV-RNA'nın kaybolmasıdır.

Tedavi sonu yanıt (TSY): Tedavi sonunda ALT düzeyinin normal olması biyokimyasal yanıt, HCV-RNA'nın negatifleşmesi virolojik yanıt olarak tanımlanır.

Kalıcı virolojik yanıt (KVY): Hem tedavi bitiminde hem de tedaviden sonraki 24 haftalık izlem sonunda HCV-RNA'nın negatif olmasıdır.

Yanıtsızlık: Tedavi sonunda HCV-RNA'nın pozitif kalmasıdır.

Alevlenme (breakthrough): Tedavi devam ederken HCV-RNA negatifleşmiş hastada HCV-RNA'nın pozitifleşmesidir.

Relaps (nüks): Tedavi sonunda virolojik yanıt alınıp, tedavi kesildikten sonra HCV-RNA'nın yeniden pozitifleşmesidir.

Parsiyel yanıt: HCV-RNA'nın 2 log azalmasına rağmen 24. haftada pozitifliğinin devam etmesidir.

KHC enfeksiyonu tedavisinde 1990'lı yılların başından itibaren önemli ilerlemeler olmuştur. IFN- α monoterapileri ile başarı oranı % 5-15 iken, IFN- α ve ribavirin kombinasyonlarının kullanımıyla bu oran % 40'lara ulaşmıştır. PEG-IFN'lerin kullanıma girmesinin ardından yapılan uluslararası çalışmalarda, PEG-IFN-a tedavisi ile elde edilen yanıt oranlarının standart IFN- α monoterapisine göre iki kat daha fazla olduğu gözlemlenmiştir (89, 90). KHC'li hastalarda PEG-IFN- α 2a ve PEG-IFN- α 2b ile

ribavirin kombinasyonunun etkisi çok merkezli randomize klinik çalışmalarla araştırılmıştır. Manns'ın çalışmasında KHC'li olgularda PEG-IFN- α 2b 1,5 (ig/kg, haftada tek doz) + ribavirin (800 mg/gün) kombinasyonu 48 hafta süreyle uygulanmış ve KVV oranı % 54 bulunmuştur (91). Genotip 1 ile enfekte olgularda KVV oranı % 42, genotip 1 dışı enfeksiyonlarda ise % 82 oranında saptanmıştır. Çalışma verilerinin retrospektif analizi, ribavirin dozunun kiloya ayarlı uygulaması ile başarı oranının % 61'e çıktığını göstermiştir. Ayrıca tedavinin erken dönemlerinde doz azaltımının olmaması EVY olasılığını arttırmaktadır (57). Erken virolojik yanıt alınan olgularda KVV oranı % 72 iken, EVY alınamayan olgularda KVV % 0-3 bulunmuştur (92). Fried ve arkadaşlarının çalışmalarında, PEG-IFN- α 2a (180 μ g, haftada tek doz) + ribavirin (1000-1200 mg/gün) kombinasyonu ile KVV % 56 oranında bulunmuştur. Erken virolojik yanıt veren hastalarda KVV oranı % 65 iken, EVY alınamayan olgularda bu oran % 3 olarak bulunmuştur. Genotiplere göre KVV değerlendirildiğinde, genotip 1 ile enfekte olgularda oran % 46, genotip 2 ve 3 ile enfekte olgularda ise % 76 saptanmıştır (93). Günümüzdeki KHC tedavisindeki bilgilere temel oluşturan Hadziyannis ve arkadaşlarının yaptığı çok merkezli bir çalışmada genotip 1 ile enfekte kronik hepatitli olgularda 48 haftalık PEG-IFN- α 2a (180 μ g, haftada tek doz) + ribavirin (1000-1200 mg/gün) kombinasyonu ile elde edilen KVV oranının % 52 olduğu gösterilmiştir (94).

Yukarıdaki bilgiler ışığında günümüzde genotip 1 ile enfekte naif olgularda PEG-IFN- α ve ribavirin kombinasyonunun 48 hafta süreyle verilmesi önerilmektedir. PEG-IFN- α cilt altına haftada bir kez (PEG-IFN- α 2a: 180 mg veya PEG-IFN- α 2b: 1,5 mg/kg) ve ribavirin ağızdan, günde iki doz şeklinde (75 kg veya altında olanlarda toplam günlük doz 1000 mg, 75 kg'dan fazla olanlarda ise 1200 mg) verilir. Tedavinin 12. haftasında EVY alınamazsa tedavi sonlandırılır. 12. haftada erken virolojik yanıtla ancak HCV-RNA'sı pozitif kalan hastalarda tedavinin 24. haftasında HCV-RNA tekrarlanır ve eğer negatif bulunursa, yavaş virolojik yanıtla olarak isimlendirilen bu hastalarda, tedavinin 72 haftaya uzatılmasıyla özellikle düşük viremi olanlarda KVV oranının anlamlı artış gösterdiği, 72 haftalık tedavi gruplarında nüksün daha az olduğu bildirilmektedir (63-66). Tedavinin 72 haftaya uzatılmasıyla nüks oranının 48 haftalık tedaviye oranla % 64'ten % 40'a düştüğü saptanmıştır (64). Pearlman'ın çalışmasında 72 haftalık tedaviyle elde edilen KVV oranı (% 38), 48 haftalık tedavi ile elde edilene (% 18) kıyasla anlamlı derecede daha yüksek bulunmuştur (63). Genotip 2 ve 3'te ise

tedavi süresi 24 haftadır. PEG-IFN- α dozları genotip 1'deki gibidir. Ribavirinin toplam günlük dozu 800 mg'dır (66, 74). Genotip 2 ile enfekte olgularda kombine tedaviye yanıt oranları genotip 3 ile enfekte olgulara göre daha yüksektir. Bu sonucun genotip 3 enfeksiyonunda steatozun daha sık görülmesine bağlı olduğu düşünülmektedir (67). Son çalışmalarda yüksek viral yüke sahip genotip 3 ile enfekte olgularda tedavi süresinin 48 haftaya uzatılmasının daha yararlı olabileceği düşünülmektedir (62). Genotip 4 enfeksiyonunda tedavi şeması ve süresi genotip 1 ile aynıdır (74).

KHC enfeksiyonu tedavisinde KVV'yı olumlu yönde etkileyen faktörler Tablo 5'de gösterilmiştir. Tedavi öncesi döneme ilişkin faktörler 40 yaşın altında olmak, vücut ağırlığının 75 kg'dan az olması, karaciğer biyopsisinde histolojik aktivitenin hafif olması, genotip 2 veya 3 enfeksiyonu, HCV-RNA düzeyinin 600.000 IU/ml'nin altında olmasıdır. Tedavi dönemine ilişkin faktörler ise EVY alınması ve hastanın tedaviye uyumlu olması şeklinde belirlenmiştir (68-70, 91, 93).

Tablo 5. KHC tedavisine yanıtı olumlu yönde etkileyen faktörler

• Genotip 1 dışı enfeksiyon • Düşük HCV-RNA düzeyi • 40 yaş altı olmak • Düşük vücut ağırlığı • Karaciğer biyopsisinde histolojik aktivitenin hafif olması • Tedavinin uygun dozda kullanımı • Kadın / cinsiyet • İnsülin direncinin olmaması • ALT yüksekliği • Siyah ırk dışında olmak • Tedavi uyumu • Biyopside steatoz yokluğu

Farklı genetik durumlar KHC'de tedaviye yanıtı etkilemektedir. Siyah ırkta yapılan bir çok çalışmada yanıt olasılığının daha düşük olduğu gösterilmiştir. Bu hastaların Kafkas ırkından farklı gen ekspresyonu ve viral genetik seyir gösterdikleri ortaya konmuştur. Kemokin ve sitokin genlerindeki polimorfizm tedaviye yanıtı

etkilemede rol oynayabilir. IFN salınımını uyaran genlerin tedaviye yanıtı etkileme olasılığı daha fazladır. Bu genler viral replikasyonu ve yayılımını sınırlar. Genlerin polimorfizmi ve ekspresyon profili tedaviye yanıt ile bağlantılıdır (71, 72, 79).

Normal ALT düzeyli kronik hepatit C hastalarının tedavisi: Persistan normal ALT düzeyi kriteri için kabul edilmiş evrensel bir tanımlama olmamakla beraber, klinik çalışmaların çoğunda kullanılan tanımlama “ALT düzeyinin en az altı ay süresince ve en az birer ay aralıklarla en az üç kez normal sınırlar içinde olması” şeklindedir (76, 77). Burada ilk problem, ALT yaş, ırk, cinsiyet ve vücut kitlesi ile değişmektedir. Prati’nin çalışmasında ALT üst sınırının erkekler için 30 IU/L, kadınlar için 19 IU/L olarak kabul edilmesi önerilmiştir (77).

ALT düzeyi normal hastaların genel olarak daha iyi karaciğer histolojisine sahip olduğu bildirilmiştir (78, 80). Diğer yandan bazı çalışmalarda bu hasta grubunda % 1 ile % 10 oranında portal fibroz bulunduğu bildirilmiştir (76). Minimal fibrozlu hastalar nadiren ilerleyici hastalık geliştirdiği düşünülmekle beraber, ALT düzeyi sürekli normal seyreden bu hasta grubunda ilerleyici karaciğer hastalığı gelişebildiği gösterilmiştir (95). Ayrıca bu hasta grubunda kombinasyon tedavisine yanıt ALT düzeyi yüksek olan gruptan farksızdır (74).

Sonuçta KHC’li hastalarda ALT düzeyi hastalığın ağırlığını ve/veya şiddetini belirlemede zayıf bir gösterge olarak kabul edilmektedir. ALT düzeyi normal hastaların tedavi kararı için karaciğer biyopsi sonuçlarına ek olarak viral genotip, hastanın yaşı, enfeksiyona ilişkin semptom ve komplikasyonlar, hepatite eşlik eden durumlar, yaşam kalitesi ve hastanın motivasyonu gibi faktörler de dikkate alınmalıdır (80).

Tedaviye yanıtız veya relaps gelişen hastalarda tedavi: Bu olguların tedavisinde genotip, daha önceki tedavide kullanılan ilaçlar, hastanın tedaviye verdiği yanıt tipi, tedavi uyumu ve ilaçlara ilişkin yan etkiler dikkate alınmalıdır. Günümüzde klasik IFN monoterapisi, PEG-IFN monoterapisi veya klasik IFN+ribavirin tedavisine yanıtız veya relaps gelişen hastalarda PEG-IFN ve ribavirin kombinasyonu önerilmektedir. Bu hastalara tekrar tedavi verildiğinde KVV oranı % 8-42 arasında değişmektedir. Relaps gelişen hastalarda KVV oranı yanıtız hastalara göre daha yüksektir (96-98). Tedavinin ilk 12 haftasında yüksek doz (270-360µg) PEG-IFN uygulaması ile ilgili çalışmalar devam etmektedir. Ayrıca PEG-IFN veya konsensus

IFN+ ribavirin kombinasyonlarının yüksek dozları veya üçlü kombinasyonları ile çalışmalar yapılmaktadır. Yanıtsız olgularda konsensus IFN ümit verici bir ajan olarak gözükmektedir (84).

PEG-IFN ve ribavirin tedavisine yanıt alınamayan olgularda tekrar aynı kombinasyon ile KVV oranının % 5'ten daha az olduğu saptanmış olup aynı kombinasyon önerilmemektedir (99). Ancak farklı bir PEG-IFN ile tedavi denenebilir. Farklı PEG-IFN ve ribavirin kombinasyonu ile yanıtsız hastalarda % 6-7, relaps olan hastalarda ise % 32-34 KVV elde edilmiştir (100, 101). Jensen'in çalışmasında farklı bir PEG-IFN ve ribavirin kombinasyonu ile 72 haftalık tedavi sonucunda KVV oranları 48 haftalık tedaviye oranla daha yüksek bulmuştur (102). Farklı bir PEG-IFN ve ribavirin kombinasyonu ile tedavi konusunda çalışmalar sürdürülmekte olup hasta temelinde karar verilmesi önerilmektedir (74).

Yeni tedavi seçenekleri: Günümüzde PEG-IFN ve ribavirin kombinasyonu standart tedavi olarak kabul edilse de naif hastaların yaklaşık yarısında tedaviye yanıt alınamaması ve tedaviye ilişkin önemli yan etkilerin gözlenmesi yeni tedavi arayışlarının sürmesine yol açmıştır. Modifiye IFN'ler ve ribavirin, virusun yaşam siklusunu hedef alan ilaçlar (proteaz inhibitörleri, polimeraz inhibitörleri), immünmodülatör ajanlar (histamin hidroklorid, timozin alfa) , antifibrotik ajanlar (E vitamini, pirfenidon, fosfolipid deriveleri), proinflatuvar sitokinler (interlökin 2 ve 12) ve antiinflatuvar sitokinler (interlökin 10) üzerinde çalışmalar devam etmektedir (103, 104).

3.VİRAL GENOTİPLERİ BELİRLEMEDE KULLANILAN MOLEKÜLER YÖNTEMLER

Enfeksiyonun varlığını araştırmada kullanılan hibridizasyon ve nükleik asit amplifikasyon testlerinde virusun korunmuş bölgeleri hedef olarak seçilmektedir. Genotip belirlemelerinde ise genotiplere özgü ayırt edici nükleik asit dizileri bulunduran genomik bölgeler seçilir. Elde edilen dizinin filogenetik analizi ile genotip belirleme altın standart olarak kabul edilir. Ancak daha basit ve maliyeti düşük genotiplere özgü dizilerin restriksiyon enzim kesim bölgelerine göre RFLP, özgül PCR, hibridizasyon teknikleri, heterodubleks mobilite teknikleri, tek sarmallı konformasyon çeşitliliğine dayalı yöntemler, SSCP, CFLP analizleri de kullanılmaktadır (105).

Restriksiyon enzimleri kullanılarak DNA'nın farklı büyüklükteki fragmanlara ayrılması RFLP olarak adlandırılır. Bu yöntem polimorfizm çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadır. Restriksiyon enzimleri, DNA üzerinde yaklaşık 5-10 baz uzunluğunda belirli bir nükleotit dizisini tanıyarak bu noktada kesim yapar ve DNA'yı ikiye ayırır. Her DNA molekülü farklı kesim noktalarına sahip bölgeleri içerir. Bu DNA bölgeleri aynı restriksiyon enzimi kullanılarak kesildiğinde bireylerin taşıdığı mutasyonlara bağlı olarak değişik miktar ve uzunlukta parçalar elde edilebilmektedir. Yöntem PCR ürününün restriksiyon enzimleri kullanılarak kesimi ve elektroforez ile kesilen fragmanların ayrımı temeline dayanır (105).

RFLP analizinin daha kolay uygulanır olabilmesi açısından seçilen enzim büyük önem taşımaktadır. Seçilen enzimin kesilmek istenilen DNA'yı birden fazla noktada kesmesi sonucu oluşan çok sayıda ve birbirine yakın büyüklükteki fragmanlar analizi zorlaştırmaktadır. RFLP tek nokta mutasyon analizlerinde sıklıkla kullanılan bir yöntemdir. Tek nokta mutasyonları ile meydana gelen veya zarar gören enzim kesim noktaları kullanılarak bu bölgelerde oluşan mutasyonları tespit etmek mümkündür. Mutasyon noktasını çevreleyen primerler ile gerçekleştirilen PCR reaksiyonunun ardından tek nokta mutasyon bölgesinden kesen bir enzim seçilerek analiz edilir.

Inno-LIPA yönteminde HCV-RNA'nın 5'NTR bölgesi hedeflenerek 280 baz çiftlik RT-PCR ile çoğaltılır ve "line prob"ları ile genotiplendirme yapılmaktadır.

Pyrosekanslama, DNA sentezi esnasında açığa çıkan pirofosfatların saptanması esasına dayanan bir gerçek zamanlı kantitatif dizi analizi tekniğidir (3).

Genotip testlerinde kullanılan yöntemlerden altın standart nükleik asit dizi analizi olmakla birlikte rutin laboratuvarlarda kullanımı zordur. Bu amaçla ticari kitler ve sistemler geliştirilmiştir. Filogenetik analiz, türlerin evrensel olarak birbirlerine ne kadar yakın olduklarını ortaya koymak için kullanılır. Bir organizmayı oluşturan molekülleri kodlayan nükleik asitlerin incelenmesi ve başka organizmalardaki nükleik asitlerle karşılaştırılması sonucunda organizmaların birbirlerinden uzaklığı değerlendirilebilir (105).

Viral genotiplerin belirlenmesinin, epidemiyolojik verilerin yanı sıra klinik anlamda olabileceğinden tanısal viroloji laboratuvarlarında yer almaktadır. Viral yük ile birlikte tedavinin dozu ve süresini belirlemede önemlidir.

Genotipler hastalığın prognozu üzerinde önemli ölçüde değiştirdiğinden, ayrıca tedavi ve tedaviye yanıtı etkileyebildiğinden farklı genotiplerin bir populasyonda belirlenmesi önemlidir. Dünyanın farklı alanlarında yapılan HCV genotiplendirme çalışmaları HCV'nin evrimi ve yayılımının anlaşılması için değerlidir.

4. PYROSEKANSLAMA VE PRENSİPLERİ

Sanger metodunda tek bir örneğin dizi analizini yapmak için dört paralel dizi analizi reaksiyonu kullanılmakta, elektroforez aşamasını içermekte ve oldukça uzun bir sürede tamamlanabilmektedir. Bu dezavantajları ortadan kaldıracak yeni teknikler araştırılmaya başlanmış ve “Pyrosequencing” yöntemi geliştirilmiştir (106).

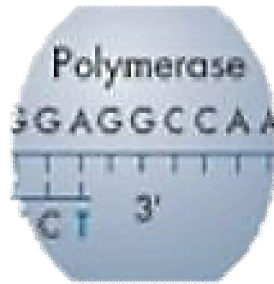
Günümüzde bir çok araştırmacı Pyrosequencing adı verilen “single-nucleotide addition” (SNA) yani tek nükleotit eklenmesi yöntemi ile DNA analizi yapmaktadırlar. Pyrosequencing yöntemi ticari olarak bulunan ve Sanger metoduna alternatif olan tek sekanslama tekniğidir. Bu yöntem ile tek bazlık bir dizi analizinden, bütün genomun dizi analizinin yapılmasına kadar geniş spektrumda dizi analizi yapılabilir (106).

Pyrosequencing sentez yaparak dizi analizi yapma prensibine dayanır. DNA sentezi sırasında açığa çıkan pirofosfatların saptanması esasına dayanan bir real-time (gerçek zamanlı) kantitatif dizi analizi tekniğidir (106).

4.1. Pyrosekanslama Aşamaları

İşlem PCR ürünlerinin tek sarmal DNA'ya (ssDNA) dönüşmesiyle başlar. Bir tek sarmal Pyrosequencing işleminde kalıp olarak kullanılmak üzere izole edilir. Her bir primer çifti genellikle biotin ile 5' ucundan işaretlenir (106).

1. Aşama:



Şekil 9. Pyrosekans'ın birinci aşaması

Sekans primeri PCR ile çoğaltılmış olan bir ssDNA kalıbı ile hibridize edilir. Enzim olarak DNA polimeraz, ATP sülfürilaz, lusiferaz ve apiraz kullanılır. Substrat olarak ise adenosin 5' fosfosülfat (APS) ve lusiferin ile inkübe edilir (106).

2. Aşama:

4-deoksiribonükleotid trifosfat'lerden (dNTP) ilki reaksiyona ilave edilir. Eğer dNTP kalıp DNA'daki baza komplementer ise ortamda bulunan DNA polimeraz, bu dNTP'nin DNA sarmalına eklenmesini katalize eder. Yani karışımda bulunan dNTP'lerden biri ki bu DNA sarmalındaki ilk nükleotitin komplementeridir, bağlayıcı enzim olan DNA polimeraz yardımı ile DNA sarmalına 3' ucundan bağlanır (106).

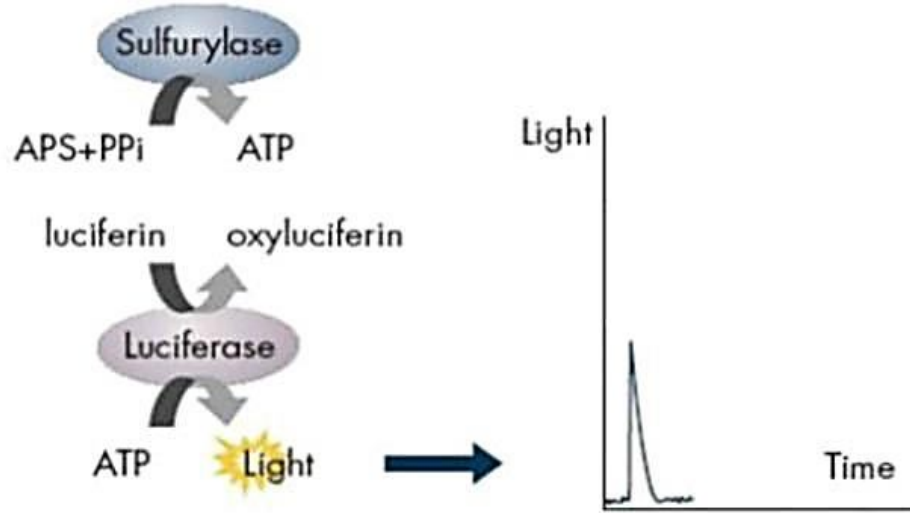
Polimeraz aracılığı ile dNTP DNA kalıbına bağlanırken dNTP üzerindeki 2 adet fosfat açığa çıkar ve ortama 2 fosfatlı bir yapı olan pirofosfat (PPi) ortama geçmiş olur. Her bir nükleotit eklenmesi ile pirofosfat (PPi) serbest kalır. Böylece eklenen nükleotit miktarı ile serbest pirofosfat'ın (PPi) miktarı orantılıdır (106).



Şekil 10. Pyrosekans'ın ikinci aşaması

3. Aşama:

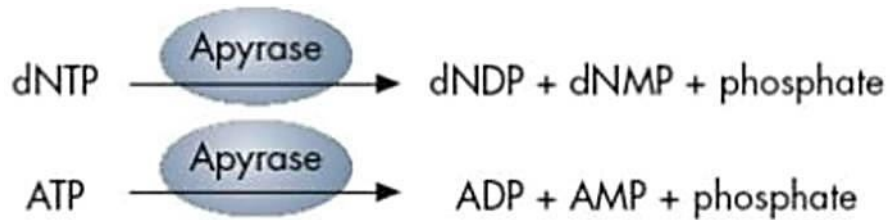
Adenosine 5' fosfosulfat (APS) varlığında ATP sulfurylase PPi'yi ATP'ye çevirir. ATP'nin ortamda bulunması lusiferin, lusiferaz enzimi aracılığı ile oksilusiferin'e dönüşür. Oksilusiferin ise görünür bir ışın yayar. Oluşan bu ışın miktarı ATP miktarı ile orantılıdır. Lusiferaz ile katalize edilmiş reaksiyon sonucu oluşan ışın CCD kamera ile tespit edilir ve bir seri tepecik şeklinde görülür. Her bir tepeciğin yüksekliği (ışık sinyali) eklenmiş olan nükleotit sayısı ile orantılıdır (106).



Şekil 11. Pyrosekans'ın üçüncü aşaması

4. Aşama:

Nükleotit parçalayan bir enzim olan apiraz (apyrase) devamlı olarak ATP'yi ve bağlanmamış olan dNTP'leri parçalar. Dolayısıyla ışık oluşumu kesilir ve reaksiyon solüsyonu yenilenmiş olur. Başka bir deyişle ortamda yeni reaksiyon oluşturacak dNTP ve ATP kalmamış olur ve ortam ikinci nükleotitin ilave edilmesine hazırlanmış olur. Bu teknoloji ile bir DNA parçacığının 100 nükleotiti kantitatif şeklide okunmuş olur (106).



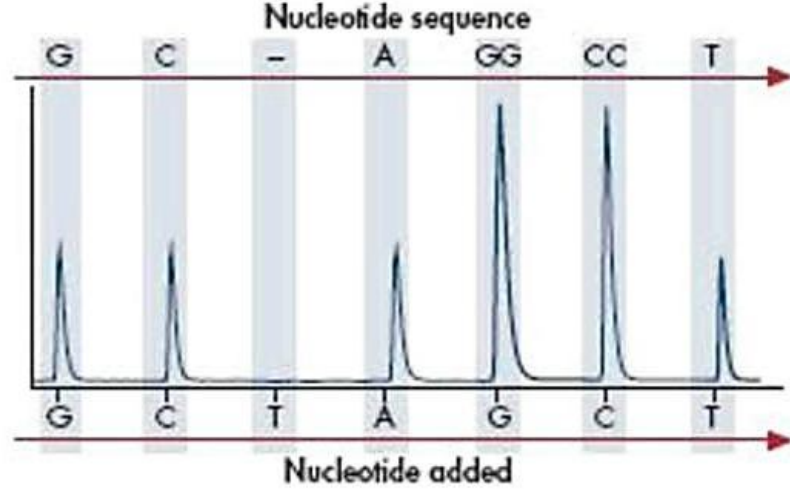
Şekil 12. Pyrosekans'ın dördüncü aşaması

Dört enzimin yer aldığı bu aşamalar kapalı bir sistemde, plakta ve tek bir kuyucukta yapılabilir. İşlemin süresi kısadır. Örneğin, 96 kuyucuklu plakta yaklaşık 60 dakikada bu işlemler tamamlanır (106).

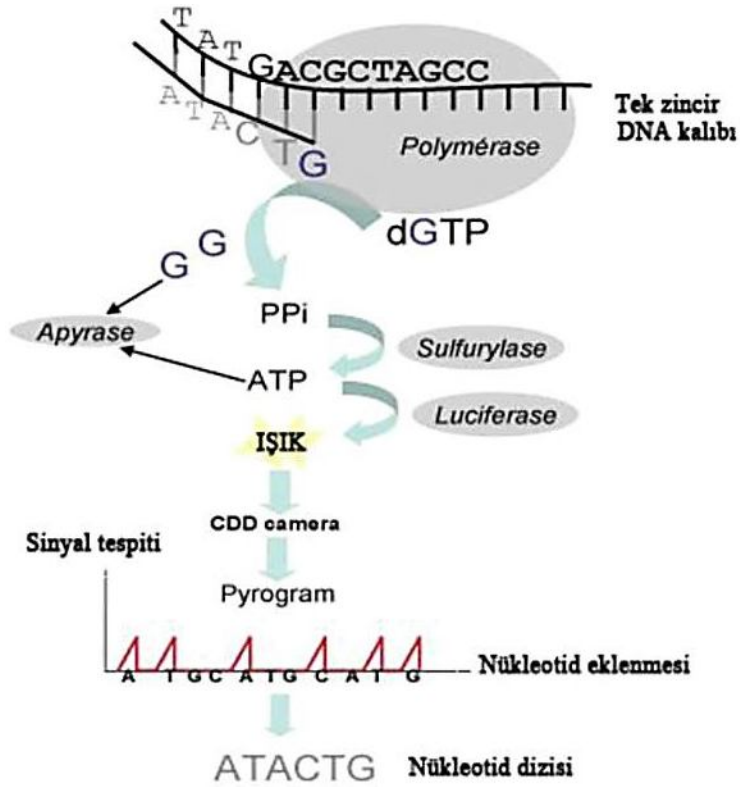
5. Aşama:

Doğal dATP yerine deoksiadenozin alfa-tio trifosfat (dATPaS) kullanılmaktadır. Çünkü DNA polimeraz tarafından en verimli şekilde kullanılmakta ancak lusiferaz

enzimi tarafından tanınmamaktadır. İşlem devam ettikçe komplementer DNA sarmalı yapılır ve nükleotit dizisi **Pyrogram**’daki sinyal tepeliklerinden saptanır. **Pyrogram**’da iki kat yükseklik gösteren tepelikler iki nükleotitin bağlanması sonucu oluşur (106).



Şekil 13. Pyrosekans’ın beşinci aşaması



Şekil 14. Pyrosekanslama tekniğinin prensip şeması

PCR aşamasından sonra Pyrosequencing, sekanslanacak baz sayısına bağlı olarak 10 dk. kadar kısa bir sürede sonuç verebilmekte ve kolaylık, eleman, zaman ve maliyet açısından da avantajlara sahiptir (106).



Şekil 15. Pyrosekans aşamalarının ortalama süreleri

Halen bir PCR ürününün dizi analizi en hızlı yapan yöntem Pyrosekans yöntemidir. Bu yöntemin tercih nedenleri uygulamasının basit, sonuçlarının değerlendirilmesinin kolay, hızlı ve real-time (gerçek-zamanlı) bir test olması, fazla sayıda örnek ile yapılacak çalışmalarda fiyat ve zaman açısından da Sanger tekniğine göre daha avantajlı olmasıdır. Ayrıca Sanger tekniğinde ki işaretli primerler, işaretli nükleotitler ve jel elektroforezine ihtiyaç olmaması bu teknolojinin diğer çok önemli avantajlarından (106).

4.2. Pyrosekans Yönteminin Kullanım Alanları

Havuz yapılmış örneklerde allel frekans analizi, metilasyon analizleri, moleküler haplotiplendirme, heteroplazmik DNA sekanslaması, adli tıp analizleri, bakteriyel tiplendirme, viral tiplendirme, fungal tiplendirme, insersiyon ve delesyon saptanmaları gibi çalışmalarında kullanılmaktadır (106). Herhangi bir örnekten elde edilmiş DNA veya RNA'ya uygulanabilir. Kan, tükürük, plazma, serum, formalinle tespit edilmiş ve parafine bloklarındaki dokular kullanılabilir. Klinik araştırmaları da kolaylaştırmakta ve hızlandırmaktadır. Virus çalışmaları hariç alzheimer hastalığı, otoimmün hastalıklar, kalın barsak hastalıkları, kardiyovasküler hastalıklar, koroner arter hastalığı, dermatoloji, diyabet, jinekoloji, hematoloji, immünoloji, nefroloji, nöroploji, obezite, onkoloji, psikiyatrik genetik vb. hastalıkların tanısında kullanıma uygun formları mevcuttur. Ayrıca bitki ve hayvan çalışmalarında kullanılmaktadır (106).

5. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmaya, Fırat Üniversitesi Hastanesi İç Hastalıkları, Gastroenteroloji Anabilim Dalı ve Enfeksiyon Hastalıkları polikliniğine 2011–2012 tarihleri arasında başvuran ve kronik hepatit C tanısı ile takip edilen 23 ile 86 yaş arası 50 hastadan elde edilen kan örneği dahil edildi Bu çalışma için, Fırat Üniversitesi Etik Kurulu onayı alınmıştır (13.05.2011/Toplantı Sayısı: 08, Karar No: 08). Çalışma grubunu oluşturacak hasta serumları, rutin olarak çalışılan HCV-RNA'sı pozitif ve anti-HCV'si pozitif (Abbott AxSYM System, Germany) serumlardan seçilmiştir. HCV-RNA düzeyleri Roche Cobas Ampliprep/Cobas Taqman HCV kiti ile çalışılmıştır. Bu kitin lineer aralığı 15 - 69.000.000 IU/ml'dir. 1 IU/ml = 2,7 copy/ml'dir. Serum örnekleri HCV genotiplendirme yönünden incelenmek üzere toplanana kadar Tıbbi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Moleküler Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na alınarak RNA izolasyonu yapıncaya kadar -80°C'de saklandı. Hastaların laboratuvar bulguları hastane otomasyonundan retrospektif olarak incelendi. Örneklerde HCV genotip analizi Pyrosequencing yöntemi ile araştırıldı. Hastaların eş zamanlı olarak çalışılan ALT ve AST düzeyleri (Olympus Optical Co. Ltd, Japan) karşılaştırıldı.

Hepatit C virusu genotiplendirme için pyrosequencing testi ile örnek başına iki PCR reaksiyonu ve dört pyrosequencing reaksiyonu tablo 6'daki gibi uygulandı. 1. 2. 3. sekans primerleri (S1, S2, S3) 5'UTR bölgesinden; 4.sekans primeri (S4) core bölgesinden hazırlandı.

Tablo 6. HCV Genotiplendirme Pyrosequencing Kiti

<i>Reaksiyon sayısı</i>	<i>48</i>
HCV PCR-1 primer çifti	24 µl x 4
HCV PCR-2 primer çifti	24 µl x 4
Sekans primeri HCV-S1	120 µl
Sekans primeri HCV-S2	120 µl
Sekans primeri HCV-S3	120 µl
Sekans primeri HCV-S4	120 µl

Örneklerden RNA izolasyonu üretici firmanın önerileri doğrultusunda otomatik izolasyon sistemi (EZ1, Qiagen) ile yapıldı.

5.1. RT-PCR

One step RT-PCR ile HCV genomunun iki ayrı bölümünün amplifikasyonu sağlandı (5'UTR ve core). Reaksiyon için "Qiagen One Step RT-PCR kiti" kullanıldı. Bu kitte reverse transkripsiyon ve PCR tek aşamada gerçekleştirildiğinden, RNA izolasyonundan sonra ayrı bir reverse transkripsiyon işlemine gerek duyulmadı. Reaksiyonu hazırlamaya başlamadan önce bütün PCR bileşenleri hafifçe vortekslendi ve santrifüjlendi.

DNA hariç bütün bileşenleri içeren, biri PCR-1, diğeri PCR-2 primer çiftini içeren iki reaksiyon miks hazırlandı (Tablo 7). Reaksiyon miksleri hazırladıktan sonra 45 µl PCR tüplerine dağıtıldı. Her bir PCR tüpüne, ilgili RNA örneğinden 5 µl ilave edildi. Toplam hacim 50 µl olacak şekilde her bir örnek için iki PCR reaksiyonu, PCR-1 ve PCR-2, hazırlandı. RT-PCR yapılışında RNA'sız negatif kontrol yapıldı. Bunun için RNA yerine aynı miktarda su kullanıldı.

Tablo 7. RT-PCR reaksiyon kompozisyonu

Bileşen	Hacim/reaksiyon
Reaksiyon miks	
5X OneStep RT-PCR buffer	10 µl
dNTP	2 µl
HCV PCR primer çifti	2 µl
OneStep RT-PCR Enzim miks	2 µl
H ₂ O	29 µl
Template RNA	5 µl
Toplam	50 µl

5.2. PCR Protokolü

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 yapılp, 72°C'de 10 dakika süren son uzama basamağından oluştu.

Tablo 8. PCR protokolü

Reverse transkripsiyon	50°C	30 dakika
Aktivasyon basamağı	95°C	15 dakika
3 aşamalı döngü:		
Denaturation	94°C	30 saniye
Annealing	58°C	30 saniye
Extension	72°C	30 saniye
Döngü sayısı: 45		
Final extension	72°C	10 dakika

5.3. Pyrosekanslama

Solüsyonlar, nükleotitler, enzim ve substrat, sekans primerleri ve PCR reaksiyonları oda sıcaklığına çıkarıldı. Streptavidin sepharose bilyelerini içeren şişe çalkalanarak homojen bir solüsyon elde edildi. Tablo 9’da gösterildiği şekilde bir miks hazırlandı.

Tablo 9. Streptavidin sepharose bilyeler için miks

Bileşen	24 reaksiyon için	
Miktar/reaksiyon		
Streptavidin sepharose bilyeler	2 µl	2 x 26 = 52 µl
Binding Buffer	40 µl	40 x 26 = 1040 µl
Ultrapure H2O	28 µl	28 x 26 = 728 µl
Toplam	70 µl	

24 kuyucuklu PCR plate’i veya kullanarak her bir kuyucuğa 70 µl miks koyuldu.

Run dosyasında tanımlandığı ve Tablo 10’da gösterildiği şekilde her bir kuyucuğa 10 µl ilgili PCR ürününü eklenildi. HCV-S1, HCV-S2, ve HCV-S3 ile okunacak kuyucuklara PCR-1 primer çifti ile yapılmış reaksiyondan, HCV-S4 ile okunacak kuyucuğa da PCR-2 primer çifti ile yapılmış reaksiyondan eklenildi.

Tablo 10. Sekans primerlerinin okuyacağı PCR reaksiyonları

Sekans primeri	PCR
HCV-S1	PCR-1
HCV-S2	
HCV-S3	
HCV-S4	PCR-2

Analiz esnasında program, pyrogramda yer alan piklere göre dizilimi belirler. Pyromark Q24 cihazında analiz işlemleri tamamlandı ve HCV genotipleri belirlendi. Bu iki bölgenin dört pyrosekanslama reaksiyonu ile okunan dizilimi Ek2’de verilmiş olan şablonla karşılaştırılarak genotiplendirme sağlandı

EK2: HCV Sekans Tablosu

	HCV-S1								HCV-S2								HCV-S3								HCV-S4							
	T	G	C	C	A	G	G	A	C	T	A	A	A	C	C	C	G	A	A	G	A	C	T	G	C	C	T	T	A	C	G	
1a											A/c		J/A					A/G										C/T		G/A		
1b											C/T		J/A					G/A										C/T		A/G		
2a					G			A					J/A				A											A/c				
2b		A/G			G		A	A									A									A/T/G		T/c				
3a	C			T	G		G	T		A/G	C/T							G/A				T	C	A			C/T		G/A			
3b	C				G			T		A	C							G				T	C	A			A		G/A			
3k	C				G		T	T		A	C	T						G/A									C		A			
4a	C				A/G			C/T			A/T/C							A/G								C/A		A/c		A/T/C		
4d	C				G			T										A/G								C/A		A/c		T		
5a					G			C/T										G										A/G				
7a					G			A			C						A	G								A		G		C		

Kaynak: HCV database

5.4. İstatistiksel Analizler

İstatistiksel analiz için SPSS 21.0 paket istatistik programı kullanıldı. Veriler ortalama $\pm$ standart deviasyon olarak ifade edildi. ortalamalar arasındaki farkın karşılaştırılmasında “bağımsız gruplarda T testi” ve her bir parametrenin diğer parametreler ile korelasyon ilişkisini belirlemek için “pearson korelasyon testi” kullanıldı. $p < 0.05$ değerleri anlamlı olarak kabul edildi.

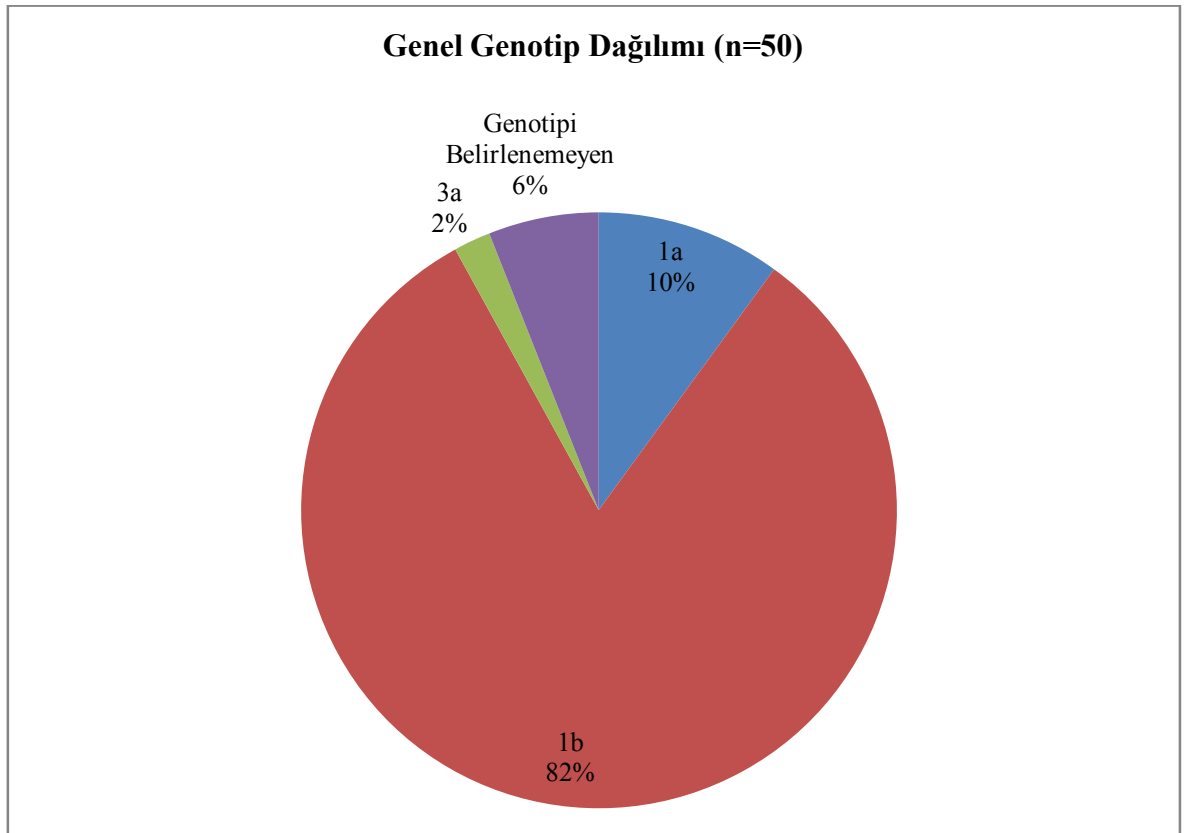
6. BULGULAR

Çalışma grubu 50 kronik hepatit C hastasından oluşmuştur. Bu hastaların % 50'si (n=25) erkek olup % 50'i (n=25'de) kadındı. Hastalarımızın yaşları 23-87 yıl arası olup yaş ortalaması 58.3 ± 16.2 yıl'dır.

Tablo 11'de HCV genotiplerinin dağılımı verilmiştir. HCV genotiplerinin 46 (% 92,0) 'si genotip 1; 1 (% 2,0)'si genotip 3 olarak bulundu. Genotip 1 olarak bulunan 46 örneğin 41'i genotip 1b; 5'inin genotip 1a olduğu belirlenirken, 3'ünün alt tipi belirlenemedi.

Tablo 11. Genotip ve alt tip genel dağılımı

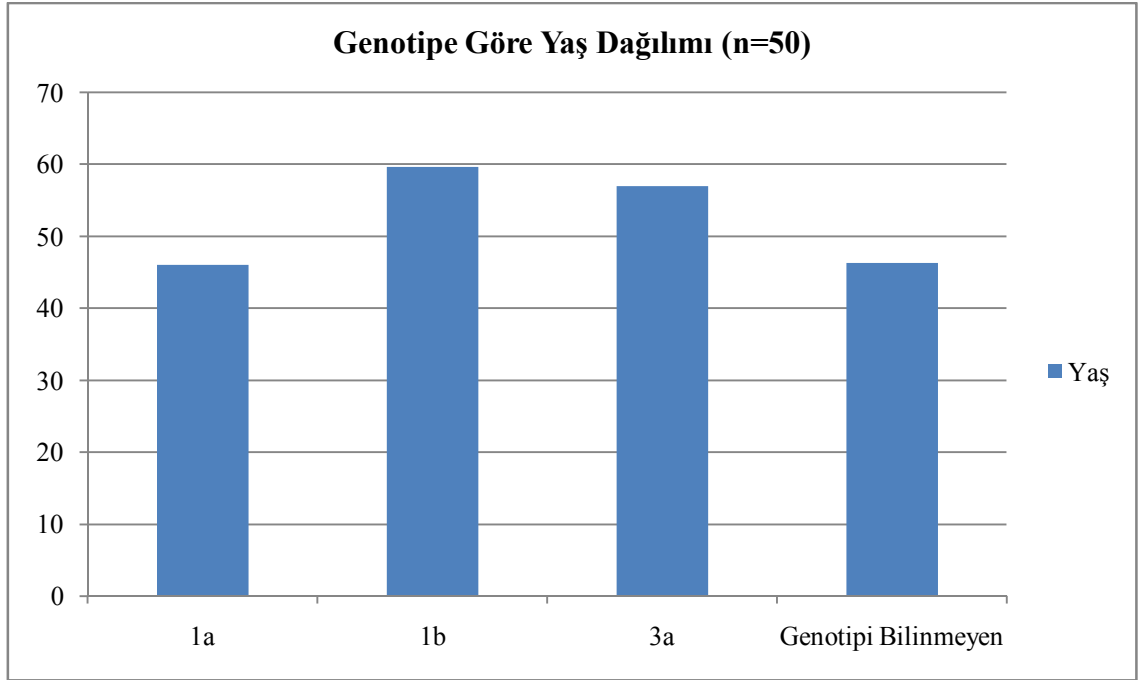
HCV Genotip ve Alt Tip	N	%
1	46	% 92
1a	5	% 11
1b	41	% 89
3	1	% 2
3a	1	% 100
Genotipi Belirlenemeyen	3	% 6



Şekil 16. Genotip genel dağılımı

Tablo 12. Yaş ve cinsiyete göre dağılımı

Genotip	Yaş Ort±SD	Kadın n (%)	Erkek n (%)
1a	46±23	4 (% 80,0)	1(% 20,0)
1b	59,69±18,31	20 (% 48,8)	21 (% 52,2)
3a	57±0	1 (% 100)	0 (% 0)
Genotipi Bilinmeyen	46,33±8,67	1 (% 33,3)	2 (% 66,6)



Şekil 17. Yaş ve cinsiyete göre dağılım

Genotipi 1a olan beş olgunun yaş ortalaması 46±23 olup; % 80'i kadın, % 20'si erkektir.

Genotipi 1b olan 41 olgunun yaş ortalaması 59.69±18.31 olup; % 48.8'ü kadın, % 52.2'si erkektir.

Genotiplere göre olguların yaş ve cinsiyet dağılımları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmamıştır ($p > 0.05$).

Hastaların ALT ve AST parametreleri incelendiğinde tablodaki sonuçlar elde edildi (Tablo 13)

Tablo 13. Genotiplere göre ALT, AST ortalamaları

	Genotip 1a	Genotip 1b	p değeri
ALT (IU/L)	42±29,54	58,9±28,87	p>0,05
AST (IU/L)	54,8±66,76	58,31±35,2	p>0,05

Genotipi 1a olan olgunun ALT ortalaması 42±29,54 olup; bu genotipin AST ortalaması ise 54,8±66,76 olarak elde edilmiştir.

Genotipi 1b olan olgunun ALT ortalaması 58,9±28,87 olup; bu genotipin AST ortalaması ise 58,31±35,2 olarak elde edilmiştir.

p>0,05 olduğu için anlamlı bir değer elde edilmemiştir.

Ayrıca genotiplere göre AST ve ALT değerleri grup 1(<40) ve grup 2 (>40) olarak farklı iki grup ile tanımlanmıştır ve değerlerimiz toplam AST grubu içindeki % dağılımları, genotip grubu içindeki % dağılımları ve toplam % dağılımları aşağıda verilmiştir. (Tablo 14)

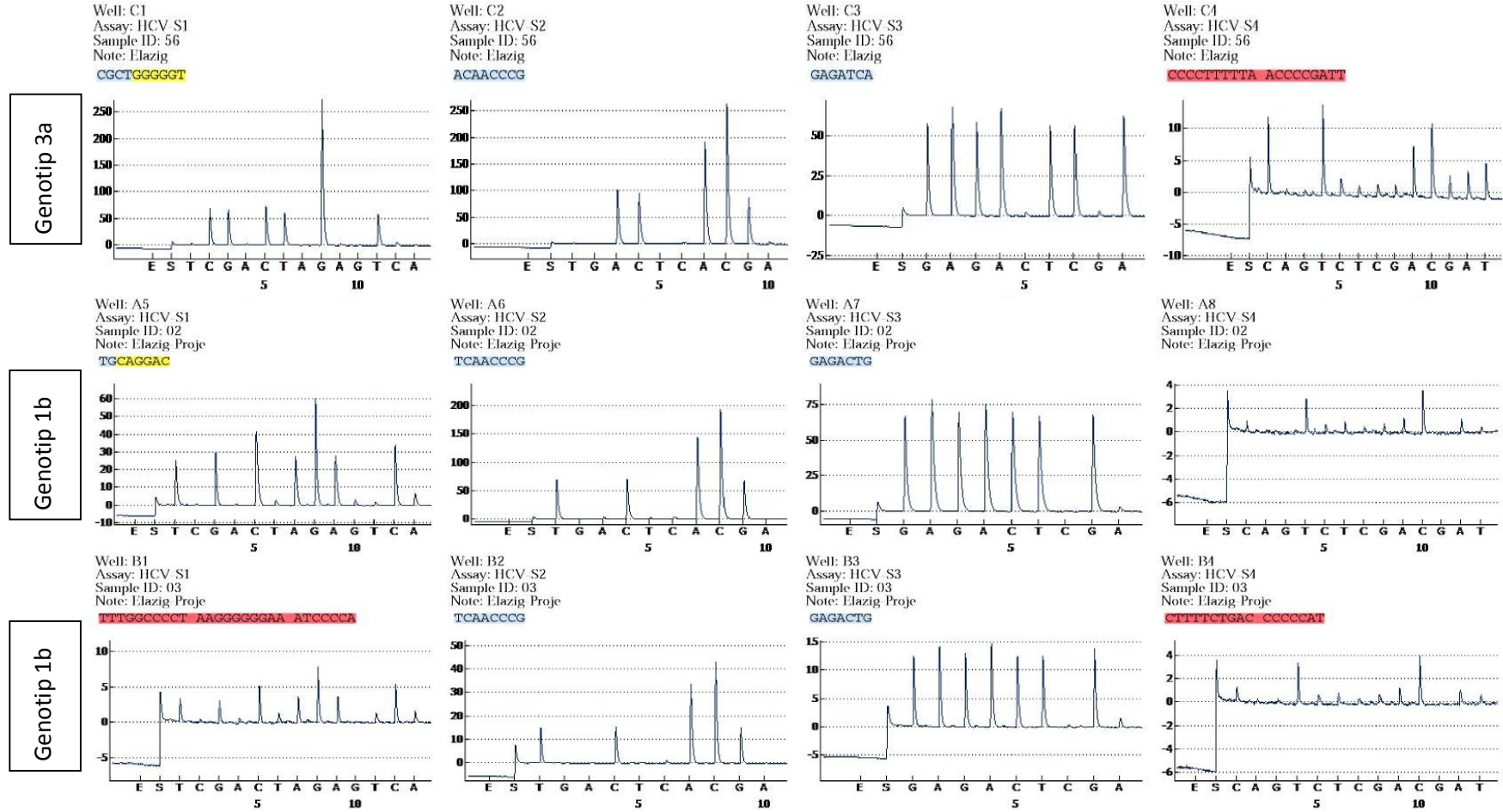
Tablo 14. Genotiplere göre ALT, AST değerlendirmesi

Genotip Grubu			AST (IU/L) grup		Total	ALT (IU/L) grup		Total
			<40	>40		<40	>40	
	1B	Sayı	16	25	41	10	31	41
		Grup içindeki %	39,0%	61,0%	100,0%	24,4%	75,6%	100,0%
		AST grubu içindeki %	80,0%	92,6%	87,2%	76,9%	91,2%	87,2%
		Toplam %	34,0%	53,2%	87,2%	21,3%	66,0%	87,2%
	1A	Sayı	4	1	5	3	2	5
		Grup içindeki %	80,0%	20,0%	100,0%	60,0%	40,0%	40,0%
		AST grubu içindeki %	20,0%	3,7%	10,6%	23,1%	5,9%	5,9%
		Toplam %	8,5%	2,1%	10,6%	6,4%	4,3%	4,3%
3A	Sayı	0	1	1	0	1	1	
	Grup içindeki %	0,0%	100,0%	100,0%	0,0%	100,0%	100,0%	
	AST grubu içindeki %	0,0%	3,7%	2,1%	0,0%	2,9%	2,9%	
	Toplam %	0,0%	2,1%	2,1%	0,0%	2,1%	2,1%	
Toplam	Sayı	20	27	47	13	34	34	
	Grup içindeki %	42,6%	57,4%	100,0%	27,7%	72,3%	72,3%	
	AST grubu içindeki %	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	
	Toplam %	42,6%	57,4%	100,0%	27,7%	72,3%	72,3%	

Genotiplere göre grup 1 ile grup 2 arasında anlamlı bir ilişki bulunmamıştır (p>0,05).

PYROSEKANSLAMA SONUÇLARI

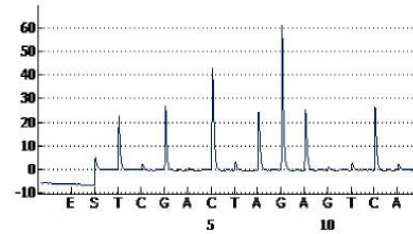
Genotip 1b çıkan 41 örnekten 3 örneğin, genotip 1a çıkan 5 örnekten 2 örneğin ve genotip 3a çıkan 1 örneğin Pyrosekanslama sonucu aşağıda gösterilmiştir.



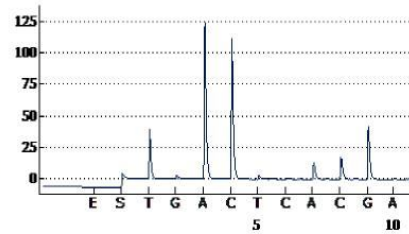
SQA Pyrogram Report Run: Elazig 02

Well: A1
Assay: HCV S1
Sample ID: 09
Note: Elazig Proje
TGCCAGGGAC

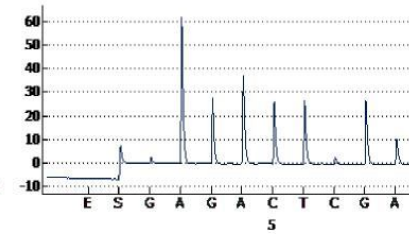
Genotip 1a



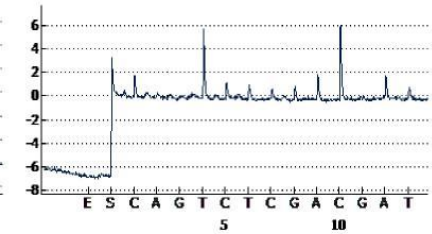
Well: A2
Assay: HCV S2
Sample ID: 09
Note: Elazig Proje
TAAACCCG



Well: A3
Assay: HCV S3
Sample ID: 09
Note: Elazig Proje
AAGACTG

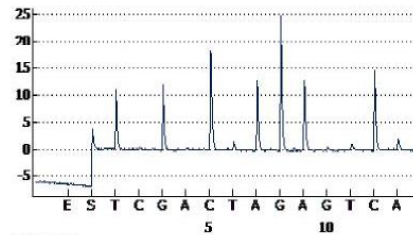


Well: A4
Assay: HCV S4
Sample ID: 09
Note: Elazig Proje

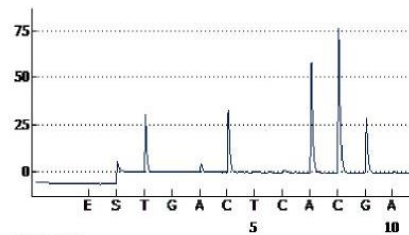


Well: A5
Assay: HCV S1
Sample ID: 10
Note: Elazig Proje
TGCAGGAC

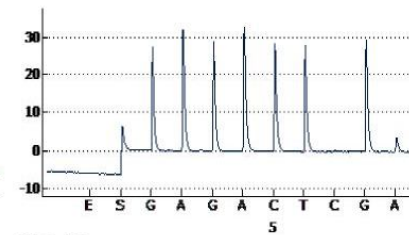
Genotip 1b



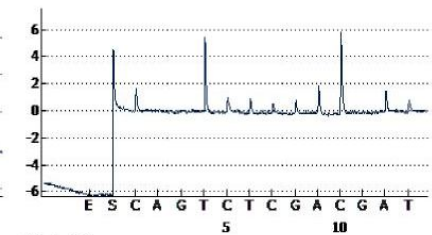
Well: A6
Assay: HCV S2
Sample ID: 10
Note: Elazig Proje
TCAACCCG



Well: A7
Assay: HCV S3
Sample ID: 10
Note: Elazig Proje
GAGACTG

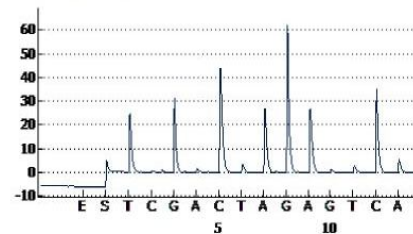


Well: A8
Assay: HCV S4
Sample ID: 10
Note: Elazig Proje
CCGTTTTTTC TGAACCCGCC CAAT

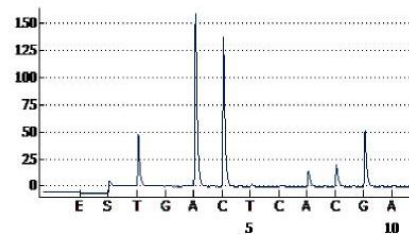


Well: B1
Assay: HCV S1
Sample ID: 12
Note: Elazig Proje
TGCCAGGGAC

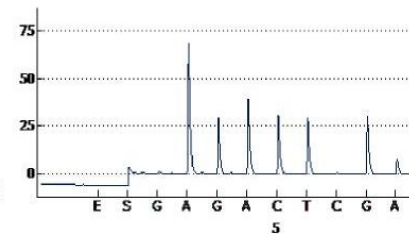
Genotip 1a



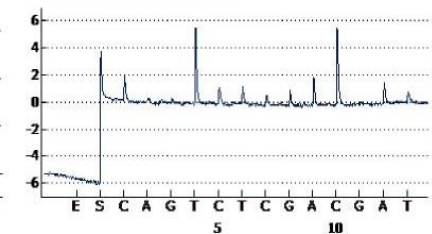
Well: B2
Assay: HCV S2
Sample ID: 12
Note: Elazig Proje
TAAACCCG



Well: B3
Assay: HCV S3
Sample ID: 12
Note: Elazig Proje
AAGACTG



Well: B4
Assay: HCV S4
Sample ID: 12
Note: Elazig Proje
CCGTTTTTTC TGAACCCGCC CAAT



7. TARTIŞMA

Dünya çapında 170 milyondan fazla insan HCV ile enfektir. Akut ve kronik hepatit, siroz ve hepatosellüler karsinoma gibi hastalıklar için en önemli risk faktörlerinden biri olan HCV, karaciğer hastalıklarının % 25-40 kadarından sorumludur. HCV 1989 yılında non-A, non-B hepatitlerin major etiyolojik ajanı olarak bulunmuştur. HCV, nükleotit dizileri birbirinden % 30 kadar farklı olabilen 6 genotipe ve 80'den fazla subtip ayrılmaktadır. Birden 6'ya kadar numaralandırılan bu genotipler kendilerine özgü coğrafik dağılım gösterirler ve klinik açıdan önemli anlamlar taşırlar (108, 109). Genotip saptanması epidemiyolojik olarak önemli olmanın yanında, klinik olarak tedaviye yanıtın değerlendirilmesinde de yararlıdır. Genotip çalışmalarına göre, belli genotiplerin hastalığın klinik gidişi ve tedavisi ile ilgili farklılıklar içerdikleri söylenebilmektedir. Özellikle hastalarda HCV genotip 1b ile enfeksiyon, IFN'a düşük düzeyde yanıt ya da yanıtızlılıkla birbirinden bağımsız faktörler olarak karşımıza çıkmaktadırlar. Bugünkü tedavi protokollerine göre genotip 2 ya da 3 ile enfekte hastaların tedavisi, genotip 1 ile enfekte olanlara göre daha kısadır (109-113). Genotipler hastalığın gidişatı üzerinde etkili olduğundan ve coğrafi olarak farklılıklar gösterdiğinden, klinik üzerinde tedavi ve tedaviye yanıtta etkisi olabilecek farklı genotiplerin bir popülasyonda belirlenmesi büyük bir önem arzetmektedir. Hepatit C virusu ile enfekte hastalarda kronik enfeksiyon gelişmesinde rol oynayan konak ve viral faktörler vardır. Bunlar hastanın yaşı, hastalığın süresi, alkol kullanımı, karaciğerin histolojik özelliği, diğer hepatit virusları ile koenfeksiyon, virusun bulaşma yolu, viral yük ve HCV'nin genotipik değişkenliğidir. HCV genotipinin, interferon tedavisine yanıtı etkileyen bağımsız bir faktör olduğu kabul edilmektedir. Bu nedenle, kronik HCV'li olgularda genotipin araştırılması, tedaviye yanıtı ve tedavi süresini belirlemede önemlidir.

Bu çalışma, insan sağlığını bu kadar etkileyen bir enfeksiyon etkeni ile mücadelede yardımcı olabilmek için bölgemizdeki HCV enfeksiyonunun prevalansını ve karakteristik özelliklerini tanımlamak amacıyla planlanmıştır.

Bazı HCV genotipleri tüm dünyaya dağılmış iken bazı genotipler belirli coğrafi bölgelerle sınırlıdır. Genotip 1, 2 ve 3 daha yaygın genotiplerdir ve çoğunlukla Avrupa, Kuzey Amerika, Çin, Japonya ve Avustralya'da gözlenmektedir. Subtip dağılımında ise daha anlamlı farklılıklar vardır. Tip 1a sıklıkla Kuzey Avrupa ve Kuzey Amerika'da

saptanırken, tip 1b Japonya, Güney ve Doğu Avrupa'daki en yaygın genotiptir. ABD'de % 71 genotip 1 bulunmuştur ve tip 2 tüm dünyada tip 1'e göre daha nadirdir (75, 114). Tip 3 değişik ülkelerde farklı dağılım göstermektedir ve özellikle İskoç kan donörlerinde, Güneydoğu Asya ülkelerinde ve genç hastalarda saptanmaktadır. Tip 1 ve 2 de bulunmakla beraber tip 4 Orta Doğu ülkeleri, Mısır ve Orta Afrika ülkelerinin baskın genotipidir. HCV genotip 5 ve 6'ya çok daha sınırlı bir alanda rastlanmaktadır. Genotip 1'in tedaviye yanıtı 2 ve 3'e göre daha zordur (114-116). Yemen, Kuveyt, Suudi Arabistan, Irak, Zaire, Gabon ve Gambia'da genotip 4 enfeksiyonların baskın olduğu bildirilmektedir (117, 118). Yine Nepal, Bangladeş, Hindistan ve Pakistan 'da tip 3a, Kuzey Afrika ve Orta Doğuda tip 4 baskın genotiplerdir (113, 119-121). Genotip 4a Mısır'da enfeksiyonların önemli birbölümünden sorumludur (113, 118, 119). Güney Afrika'da HCV genotip 5a çok yaygın iken, Hong Kong'da en sık görülen tip 6a enfeksiyonlarıdır (118, 122). Güney ve Doğu Avrupa'da ise genotip 1b enfeksiyonları daha sık görülmektedir. Genotip 2a ve 2b Kuzey Amerika, Avrupa ve Japonya'da yaygınken, tip 2c en sık İtalya, Avrupa'nın batısı ve güneyinde daha fazla görülmektedir. Genotip 3a'nın özellikle intravenöz ilaç kullananlarda Amerika ve Avrupa'da yaygın olduğu belirtilmektedir (75, 118, 123). Genotip 6 Çin'in güney bölgesine primer olarak dağılmıştır (124).

En sık görülen HCV genotiplerinin coğrafik dağılımının ayrıntılı olarak ortaya çıkarılmasından sonra viral geçiş yolları, genel popülasyondaki ve yüksek risk gruplarındaki prevalans, tip ve subtiplerin yıllarca ve yüzyıllarca süren filogenetik gelişimi hakkında daha detaylı bilgiler elde edilmiştir. Böylece HCV genotipi ile hastalığın epidemiyolojisi, kliniği, histopatolojik göstergeleri, prognozu, HSK gelişme riski ve interferon tedavisine yanıtı arasındaki ilişkinin araştırıldığı pek çok çalışma yapılmıştır (118).

Türkiye'de yapılan HCV genotip çalışmalarında (Tablo 15) HCV enfeksiyonlarının yaklaşık % 90'ı genotip 1 olarak bulunmuştur, bunların da büyük çoğunluğu tip 1b olup, tip 2, 3 ve 4 HCV enfeksiyonlarına da daha az sıklıkla rastlanmaktadır (54, 125-132, 133, 134-138).

Tablo 15.Türkiye’de çeşitli merkezlerde yapılan çalışmalarda saptanan HCV genotip dağılımı

Araştırmacı	Bölge	Yöntem	1a (%)	1b (%)	2a (%)	2b (%)	3a (%)	4 (%)	Belirlenemeyen
Şanlıdağ ve ark. (125)	Manisa	Dizi Analizi	2	90	2	-	-	5	1
Ural ve ark. (126)	Konya	Dizi Analizi	-	100	-	-	-	-	-
Altındış ve ark. (127)	Afyon	Dizi Analizi, LIP A*	3.3	96.7	-	-	-	-	-
Altındış ve ark. (128)	Kuzey Kıbrıs	LIPA*	2.8	97.2	-	-	-	-	-
Altuğlu ve ark. (55)	Batı Bölgesi	RFLP"	9.9	87.2	0.9	-	1.4	0.6	-
Selçuk ve ark. (129)	Ankara	-	24.6	68.5	-	-	-	7	-
Abacıoğlu ve ark.(53)	İzmir	RFLP"	19.1	75.3	3.4	-	-	2.2	-
Gökahmetoğlu ve ark. (130)	Kayseri	RFLP"	3.5	96.5	-	-	-	-	-
Çil ve ark.(131)	Diyarbakır	LIPA*	22.7	72.8	-	-	4.5	-	-
Bozdayı ve ark.(132)	Ankara	RFLP"	22.3	77.7	-	-	-	-	-
Yalçın ve ark. (139)	Diyarbakır	Okamota	-	100	-	-	-	-	-
Yıldız ve ark.(140)	Adana	Dizi Analizi	6	91	1.3	-	-	1.3	-
Deveci ve ark. (141)	Kayseri	Dizi Analizi	7.8	69.9	-	-	-	14	-
Kalaycı ve ark.(134)	Afyon	Dizi Analizi	20	63.3	-	-	-	13.3	-
Savaş ve ark. (135)	Gaziantep	Dizi Analizi	9.8	78.4	7.8	-	2	2	-
Türkoğlu ve ark. (136)	İstanbul	Okamota	5.8	70	3.7	-	4	2.5	9
Yarkin ve ark. (137)	Adana	Okamota	14.5	82.2	3.3	-	-	-	-
Erensoy ve ark. (138)	İzmir	Dizi Analizi	33.3	66.7	-	-	-	-	-
Şahin ve ark (142)	Malatya	LIPA*	3.45	93.1	-	-	-	-	3.45

Şanlıdağ ve ark. (125) tarafından Manisa bölgesinde sekanslama (dizi analizi) yöntemiyle genotip dağılımına bakılmıştır. Buna göre hastaların % 92'sinde genotip 1, % 7'sinde ise diğer genotipler (genotip 2 ve 4) saptanmış, % 1 hastanın (bir hasta) HCV genotipi belirlenememiştir. Genotiplerin alt tip dağılımına bakıldığında; hastaların % 90'ının genotip 1b, % 5'inin genotip 4a, % 2'sinin 1a ve % 2'sinin genotip 2a olduğu bildirilmiştir.

Ural ve ark. (126) Konya bölgesinde yapmış oldukları çalışmada Anti-HCV ve HCV-RNA pozitif olan 80 kan örneğinde HCV genotip tayini ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Perkin Elmer, ABD) aygıtı kullanılarak viral RNA sekanslama yapılmış, genotipleme yapılan tüm HCV RNA'ların tamamı (% 100) genotip 1b olarak bulunmuştur.

2006 yılında Altındış ve ark. (127) tarafından sekanslama yöntemi ile yapılan çalışmada da predominant olarak genotip 1b (% 96.7) bulunmuş, bunu genotip 1a (% 3.3) izlemiştir. Altındış ve ark.'ları (128) yaptıkları diğer bir çalışmada HCV RNA'sı pozitif 35 Türk askerinden 34'ünde (% 97.2) genotip 1b, 1'inde (% 2.8) genotip 1a; 5 Kuzey Kıbrıs kökenli askerden 4'ünde (% 80) genotip 1b, 1'inde (% 20) genotip 1a; Kıbrıslı HCV pozitif hastanın 11'inde (% 84.6) genotip 1b, 1'inde (% 7.7) genotip 1a ve 1 hastada da (% 7.7) genotip 2 saptamışlardır. Altuğlu ve ark.'larının (55) Türkiye'nin batı bölgesinde yaptıkları bir çalışmada kronik HCV enfeksiyonlu 345 hastanın 34'ünde (% 9.9) subtip 1a, 301'inde (% 87.2) subtip 1b, 5 hastada (% 1.4) genotip 3a; 3 hastada (% 0.9) genotip 2a; 2 hastada (% 0.6) genotip 4 saptanmıştır.

Ankara Başkent Üniversitesinden Selçuk ve ark. (129) HCV RNA pozitif olan toplam 130 diyaliz hastasında yaptıkları çalışmada 121 hastada genotip 1 (% 93.19) bulunmuştur. Subtip dağılımlarına göre 89 hastada (% 68.5) genotip 1b, 32'sinde (% 24.6) genotip 1a, 9 hastada (% 7) genotip 4 bulmuşlardır.

Abacıoğlu ve ark. (53) İzmir bölgesinde yaptıkları çalışmada 89 HCV'li hastanın % 75.3'ünde genotip 1b, % 19.1'inde genotip 1a, % 3.4'ünde genotip 2a, % 2.2'sinde genotip 4 saptamışlardır.

Gökahmetoğlu ve ark. (130) tarafından Kayseri'de yapılan bir çalışmada 57 hasta çalışmaya dahil edilmiştir. HCV RNA düzeyi gerçek zamanlı PCR yöntemi ile araştırılmıştır. HCV genotipleri 'Restriction Fragment Length Polymorphism' metodu

ile belirlenmiş, HCV genotiplerinin 55 (% 96.5)'i tip 1b, 2 (% 3.5)'si tip 1a ortak bulunmuştur. Bu çalışmanın sonuçları bölgedeki kronik hepatit C'li hastaların takip ve tedavisi açısından önemli bilgi sağlamaktadır.

Çil ve ark. (131) tarafından Diyarbakır'da yapılan bir çalışmada genotip 1a, genotip 1b ve 3a olmak üzere üç farklı HCV genotipine rastlanmıştır. Bu çalışma da beş hastada (% 22.7) genotip 1a, 16 hastada (% 72.8) genotip 1b ve 1 hastada (% 4.5) genotip 3a tesbit edilmiştir. Bu sonuçlar daha önceki çalışmalarla uyumlu bulunmuş ancak zamanla diğer genotiplerin ortaya çıktığı gösterilmiştir.

Bozdayı ve ark. (132) Ankara bölgesinde 94 hemodializ hastasında HCV enfeksiyonunu araştırmışlardır. Bu hastalardan 36'sında HCV RNA pozitifliği saptanmış olup, 28'i (% 77.7) genotip 1b, 8'i (% 22.3) genotip 1a olarak bulunmuştur.

Türkiye'de Bozdayı ve ark.'nın (54) 365 kronik HCV hastasını içeren çok merkezli çalışmasında, genotip 1b % 84, genotip 1a % 11, genotip 2 % 3, genotip 3 % 1 ve genotip 4 % 1 oranında bulunmuştur. Aynı çalışma içerisindeki hemodializ hastalarında da baskın genotip 1b % 78 olarak saptanmıştır. Dicle Üniversitesinden Yalçın ve ark. (133) Diyarbakır bölgesinde yaptıkları çalışmada 50 kronik HCV enfeksiyonlu hastanın 28'inde PCR ile HCV RNA pozitif saptamışlardır. Bu 28 hastanın tümünde (% 100) genotip 1b olarak rapor etmişlerdir.

Çalışmamızda 50 kronik HCV enfeksiyonlu hastanın 46'sında % 92 genotip 1'in saptanması, bölgemizde Genotip 1'in yaygın olduğunu göstermektedir. Bu sonuçlar ülkemizin diğer bölgeleriyle uyumlu olup tip 1 enfeksiyonlarının ülkemizde ve bölgemizde yaygın olarak bulunduğunu göstermektedir. Yaptığımız çalışmanın subtip değerlendirmesinde 41 hastada % 89 genotip 1b saptanmıştır. Bu sonuç da diğer çalışmalarla uyumlu olup 1b'nin baskın tip olduğu görülmektedir.

Çalışmamızda, HCV genotip 1b'nin en yaygın tip olarak belirlenmesi, hem ülkemiz hem de dünya literatürüyle uyumlu bir bulgudur. HCV genotiplerinin saptanması klinik pratikte oldukça önemlidir. HCV genotip 1, özellikle de tip 1b enfeksiyonlarında kronik aktif hepatit ve siroz gelişim riskinin daha yüksek, interferon tedavisine yanıtın tip 2 ve tip 3 HCV enfeksiyonlarına göre daha düşük olduğu belirtilmektedir. Bu nedenle tedavi protokollerinde tip 1 ve tip 4 hastalar 1 yıl süreyle ve yüksek ribavirin dozu ile tedavi edilirken, tip 2 ve tip 3 hastalarda 6 aylık süreyle ve

düşük ribavirin dozu yeterli olmaktadır. Yine tedavi başarısı düşük olan genotip1 ve genotip 4 grubunda tedavi öncesi biyopsi yapılarak inflamasyon ve fibrozis derecesine göre tedavi endikasyonu konulmakta, iyi prognozlu grupta biyopsi yapılmadan da tedavi verilebilmektedir. Genotipin belirlenmesi prognozu, tedavi endikasyonunu, tedavi doz ve süresini belirlemektedir. Tedaviye yanıtta en önemli parametre genotiptir. Ayrıca hastaların tedaviye uyumu son derece önemlidir (133).

HCV tedavisinde ilaç maliyetlerinin yüksek, yan etkilerinin oldukça fazla olduğu göz önüne alınırsa HCV genotiplerinin belirlenmesi oldukça önemlidir.

Bugün HCV'nin genotiplerinin saptanmasında en çok kullanılan yöntem, reverse dot-blot hibridizasyon prensibine dayalı olan 'line probe assay'dir. Bu amaçla geliştirilmiş kit yöntemin standart olmasını sağlamakla birlikte genotipleri kolayca saptama imkanı tanırken, maliyet olarak yüksek kalmaktadır (125). Restriction fragment length polymorphism (RFLP), türe özgü 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. Bu çalışmada da HCV genomunun sekans analizi için Pyrosekanslama yöntemi kullanıldı. Çalışmamızda tüm ön çalışmalar ve standardizasyon çalışmalarından sonra, Pyrosekanslama yöntemi ile HCV genotiplerinin belirlenmesi 2 gün sürdü. Bu süre DNA dizi analizi yöntemlerine kıyasla oldukça kısadır. Ayrıca Pyrosekanslama 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 Pyrosekanslama yönteminin rutin laboratuvarlarda uygulanabileceği kanaatine varıldı.

HCV enfeksiyonunun ilerleyici bir hastalık olması ve tedavi ile virustan kurtulma şansının bulunması, tedaviye yanıt veren hastalarda HSK'nın önlenmesi bu hastalarda erken tedaviye başlanmasını gerektirmekte ve HCV konusunda topluma dayalı iyi bir epidemiyolojik çalışmaya gereksinim oluşturmaktadır.

Sonuç olarak bu çalışmada; kronik HCV enfeksiyonu olan hastaların bölgemizdeki coğrafik dağılımı % 89 genotip 1b olarak belirlenmiş, bunun yanında % 11 oranında genotip 1a, % 2 oranlarında genotip 3, olarak belirlenmiştir. Toplam hasta

grubumuzda % 92 oranı ile genotip 1 baskın tip olarak bulunmuştur. Çalışmamızda genotip 1b'nin baskın olması ülkemizde yapılan çalışmalarla uyumludur. Buna karşın bölgemizde % 11 oranında genotip 1a saptanmış olması Kronik HCV enfeksiyonunun tedavisinde genotip tayininin gerekliliğini ortaya koymaktadır. Çalışmada elde edilen sonuçların bölgemizdeki HCV hastalarının izlenmesi ve tedavi başarısı açısından klinisyenlere yol gösterici olacağı düşünülmektedir. Mevcut tezde pyrosekanslama yöntemiyle bölgemizde görülen kronik hepatit C olgularında HCV genotiplerinin belirlenmesi başarı ile gerçekleştirilmiştir.

Ülkemizde toplumun tümünü yansıtan, güvenilir, standardize edilmiş genotip çalışmaları bulunmamakla birlikte, Türkiye'de tüm bölgeleri yansıtacak, geniş katılımlı, standart bir yöntemle yapılacak, çok merkezli çalışmalarla daha doğru sonuçlara ulaşılabilmesi mümkün görülmektedir.

8. KAYNAKÇA

1. Neumann A, Lam H, Dahari, DR, et al. Hepatitis C viral dynamics in vivo and the antiviral efficacy of interferon- α therapy. *Science* 1998; 282:103-107.
2. Lohmann V, Korner E, Koch J, et al. Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science* 1999; 285:110-113.
3. Lindenbach BD, Evans MJ, Syder AJ, et al. Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. *Science* 2005; 309:623-626.
4. Sherlock S, Dooley J. Hepatitis C Virus. Diseases of the Liver and Biliary System. Eleventh edition 2002; 305 - 316.
5. Fried MW, Shiffman ML, Reddy KR, et al. Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *N Eng J Med* 2002; 347: 975 - 982.
6. Durmaz R. HCV mutasyonları. Viral Hepatit 2005. Viral Hepatitle Savaşım Derneği 2005; 169 – 174.
7. Türkoğlu S. Hepatit C virusu: Viroloji ve seroloji. Viral Hepatit 2003. Viral Hepatitle Savaşım Derneği 2003; 186 - 198.
8. Wilke Topçu A, Söyletir G, Doğanay M. Hepatit C virusu. Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. Cilt 2. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 2002: 1377-1396.
9. Thomas DL, Lemon SM. Hepatitis C. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds. *Principles and Practice of Infectious Diseases*. 6 th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone, 2005: 1950-1981.
10. Forns X, Purcell RH, Bukh J. Quasispecies in viral persistence and pathogenesis of hepatitis C virus. *Trends in Microbiology* 1999; 7:402 - 410.
11. Kato N. Molecular virology of hepatitis C virus. *Acta Med Okayama* 2001; 55: 133 -159.

12. Grahovac B, Bingulac-popovic J, Vucelic B, et al. Dynamics of serum hepatitis C virus load and quasispecies complexity during antiviral therapy in patients with chronic hepatitis J. Clin. Vir. 2001; 20: 85 - 89.
13. Farci P, Strazzera R, Alter HJ, et al. Early changes in hepatitis c viral quasispecies during interferon therapy predict the therapeutic outcome. Proc National Academy of Sciences USA 2002; 99: 3081 - 3086.
14. Wilson JJ, Polyak SJ, Day TD, Gretch DR. Characterization of simple and complex hepatitis C virus quasispecies by heteroduplex gel shift analysis: Correlation with nukleotide sequencing. J. Gen. Vir. 1995; 76: 1763 - 1771.
15. Lu M, Funsch B, Wiese M, Roggendorf M. Analysis of hepatitis C virus quasispecies population by temperature gradient gel electrophoresis. J. Gen. Vir. 1995; 76, 881-887.
16. Petersen SV, Thiel S, Jensenius JC. The manan-binding lectin pathway of complement activation: biology and disease association. Mol. Immun. 2001;38, 133-149.
17. Eisen DP, Minchinton RB. Impact of Mannose-Binding on Susceptibility to Infectious Diseases. *CID* 2003; 37:1496-1505.
18. Nakano I, Fukuda Y, Katano Y, et al. Interferon responsiveness in patients infected with hepatitis C virus1b differs depending on viral subtype. Gut 2001; 49: 263 - 267.
19. Webster G. HCV genotypes-role in pathogenesis of disease and response to therapy. Bailliere's Clinical Gastroenterology 2000; 14: 229 - 240.
20. Erensoy S, Göksel S, Akarca US, Özkahya M, Canatan D. Hepatit C virusunun polimeraz zincir reaksiyonu ürünlerinin doğrudan dizi analizi ile genotiplemesi. Flora, 2002; 7: 104 - 111.

21. Akpınar H, Abacıoğlu YH, Tankurt E, et al. Non-A ve Non-B hepatitine bağlı olan Türk hastalardaki HCV prevalansı ve genotipleri. *Turkish J Gastroenterology* Nousbaum JB, 1998; 9: 208 - 212. 25.
22. Lavanchy D. The global burden of hepatitis C. *Liver Int.* 2009; 29 (Supl 19): 74-81.
23. Alter MJ. Epidemiology of hepatitis C virus infection. *World J Gastroenterol.* 2007; 13, 2436-41.
24. Tözün N. “HCV enfeksiyonunun Türkiye açısından önemi” Epidemiyoloji ve projeler. In: Çakaloğlu Y, ed. *Hepatit C Güncelleme Toplantısı* (11-13 Ocak 2008, İstanbul) *Konuşma Metinleri*. İstanbul: Türk Karaciğer Araştırmaları Derneği, 2008:1-3.
25. Zhu, Q., J.-T. Guo ve C. Seeger. 2003. Replication of hepatitis C virus subgenomes in nonhepatic epithelial and mouse hepatoma cells. *Virology* 77:9204-9210.
26. Frank C, Mohamed MK, Strickland GT, et al. The role of parenteral antischistosomal therapy in the spread of hepatitis C virus in Egypt. *Lancet*. 2000; 355, 887-91.
27. Shepard CW, Finelli L, Alter MJ. Global epidemiology of hepatitis C virus infection. *Lancet Infect Dis*. 2005; 5, 558-67.
28. Hepatitis C –global prevalence (update). *Wkly Epidemiol Rec*. 2000; 75, 18-9.
29. Mısıktık R. Türkiye’de viral hepatit epidemiyolojisi – Yayınların irdelenmesi. Tabak F, Balık İ, Tekeli E, eds. *Viral Hepatit 2007*. Ankara: Viral Hepatitle Savaşım Derneği, 2007: 10-50.
30. Di Stefano R, Stroffolini T, Ferraro D, et al. Endemic hepatitis C virus infection in a Sicilian town: further evidence for iatrogenic transmission. *J Med Vir*. 2002; 67, 339-44.

31. Okayama A, Stuver SO, Tabor E, *et al.* Incident hepatitis C virus infection in a community-based population in Japan. *J Viral Hepatit* 2002; 9(1): 43-51.
32. Lo Re III V, Kostman JR. Management of chronic hepatitis C. *Postgrad Med J* 2005; 81, 376-82.
33. Sünbül M. HCV enfeksiyonunun epidemiyolojisi ve korunma. Tabak F, Balık İ, Tekeli E, ed'ler. *Viral hepatit 2007*. 1. baskı, İstanbul, Viral Hepatitle Savaşım Derneği Yayını, 2005: 208-19.
34. Aygen B. Kan ve kan ürünleri transfüzyonu ile bulaşan enfeksiyonlar. Doğanay M, Ünal S, (ed'ler). *Hastane İnfeksiyonları Kitabı*. 1. baskı, Bilimsel Tıp Yayınevi Ankara 2003: 855-74.
35. Aygen B. Hemodiyaliz ünitelerinde hastane enfeksiyonu kontrolü. *Hastane İnfeksiyonları Dergisi* 2006: 10, 52-62.
36. Moreira RC, Lemos MF, Longui CA and Granato C. Hepatitis C and hemodialysis, *Braz J Infect Dis* 2005; 9: 269-75.
37. Walsh K, Alexander GJM. Update on chronic viral hepatitis. *Postgrad Med J* 2001; 77: 498-505.
38. Shepard CW, Finelli L, Alter M. Global epidemiology of hepatitis C virus infection. *Lancet Infect Dis* 2005; 5: 558-67.
39. Kaldor JM, Archer GT, Buring ML, Ismay SL, Kenrick KG, Lien AS, Purusothaman K, Tulloch R, Bolton WV, Wylie BR. Risk factors for hepatitis C virus infection in blood donors: a case-control study. *Med J Aust*. 1992; 157: 227-230.
40. Leao JC, Teo CG, Porter SR. HCV infection: aspects of epidemiology and transmission relevant to oral health care workers. *Int J.Oral Maxillofac. Surg*. 2006; 35, 295-300.

41. Sartori M, La Terra G, Aglietta M, Manzin A, Navino C, Verzetti G. Transmission of hepatitis C via blood splash into conjunctiva. *Scand J Infect Dis*. 1993; 25, 270-271
42. Thomas DL, Ray SC, Lemon SM. Hepatitis C. In Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, Eds. *Principles and practice of infectious diseases*. 6th Ed. Philadelphia, Elsevier Churchill Livingstone, 2005: 1950-81.
43. Hardikar W. Hepatitis C in childhood. *J Gastroenterol and Hepatol*. 2002; 17:476-481.
44. Karaca Ç, Çakaloğlu Y, Demir K, Özdil S, Kaymakoglu S, Badur S, Ökten A. Risk factors for transmission of hepatitis C virus infection in the Turkish Population. *Dig Dis Sci* 2006; 51, 365-9.
45. Terrault NA. Sexual activity as a risk factor for hepatitis C. *Hepatology* 2002; 36(suppl): 99-105.
46. Ferreiro MC, Dios PD, Scully C. Transmission of hepatitis C virus by saliva? *Oral Dis* 2005; 11:230-5.
47. Menedez SR, Garcia MR, Sanchez san Roman, Gonzalez SA, Navasculas A, Alvarez PR, Saez RL. Intrafamilial spread of hepatitis C virus. *Infection*, 1991; 19:341-1433.
48. Çakaloğlu Y. Hepatit C virus enfeksiyonu epidemiyolojisi. *Viral Hepatit 94* (Ed). Kılıçturgay K, Tayt Ofset. İstanbul,1994: 191-235.
49. Hafta A, Çolakoğlu S, Akkız H. Çukurova bölgesinde çeşitli risk gruplarında anti-HCV seroprevalansı. *Viral Hepatit Dergisi* 1996: 146-49.
50. Saltoğlu N, Taşova Y, Burgut R, Dünder IH. Sexual and non-sexual intrafamilial spread of hepatitis C virus: Intrafamilial transmission of HCV. *Eur J Epidemiol*, 1998; 14, 225-228.

51. Pearlman BL. Hepatitis C infection: a clinical review. *South Med J* 2004; 97:365-73.
52. Bozdayı AM. HCV genotipleri: isimlendirme, epidemiyoloji ve saptama yöntemleri. In: Çakaloğlu Y, ed. *Hepatit C Güncelleme Toplantısı* (11-13 Ocak 2008, İstanbul) *Konuşma Metinleri*. İstanbul: Türk Karaciğer Araştırmaları Derneği, 2008:47-8.
53. Abacıoğlu YH, Davidson F, Tuncer S, *et al*. The distribution of hepatitis C virus genotypes in Turkish patients. *J Viral Hepat*. 1995; 2(6): 297-301.
54. Bozdayı AM, Aslan N, Bozdayı G, *et al*. Molecular epidemiology of hepatitis B, C and D viruses in Turkish patients *Arch Virol*. 2004; 149(11): 2115-29.
55. Altuğlu I, Söyler I, Özacar T, Erensoy S. Distribution of hepatitis C virus genotypes in patients with chronic hepatitis C infection in Western Turkey. *Int J Infect Dis* 2008; 12(3): 239-44.
56. Deuffı c S, Poynard T, Valleron AJ. Correlation between hepatitis C virus prevalence and hepatocellular carcinoma mortality in Europe. *J Viral Hepat*. 1999; 6(5): 411-43.
57. McHutchison JG, Manns M, Patel K, Poynard T, Lindsay KL, Trepo C, Dienstag J, Lee WM, Mak C, Garaud JJ, Albrecht JK. Adherence to combination therapy enhances sustained response in genotype-1 infected patients with chronic hepatitis C. *Gastroenterology*, 2002; 123(4):1061-9.
58. Akhan S. Hepatit C virusu. Willke Topçu A, Söyletir G, Doğanay M, Ed'ler. *Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*. 3.baskı. Nobel Tıp Kitabevleri Yayını, İstanbul 2008: 1911-29.
59. Chen SL, Morgan TR. The natural history of hepatitis C virus (HCV) infection. *Int J Med Sci*, 2006; 3(2):47-52.

60. Puoti C, Castellacci R, Montagnese F, Zaltron S, Stornaiuolo G, Bergami N, Bellis L, Precone D, Corvisieri P, Puoti M, Minola E, Gaeta GV. Histological and virological features and follow-up of hepatitis C virus carriers with normal aminotransferase levels: the Italian prospective study of the asymptomatic C carriers (ISACC). *J Hepatol*, 2002: 37:117-23.
61. Ohto H, Terazawa S, Sasaki N, et al. Transmission hepatitis C virus from mother to infants. *The New England Journal of Medicine* 1994; 330: 744 - 750.
62. Dienstag JL, McHutchison JG. American Gastroenterological association medical position on the management of hepatitis C. *Gastroenterology*, 2006: 130:225-230.
63. Pearlman BH, Ehleban C, Saifee S. Treatment extension to 72 weeks of peginterferon and ribavirin in hepatitis C genotype-1-infected slow responders. *Hepatology*, 2007: 46:1688-94.
64. Berg T, von Wagner M, Nasser S, Saarazin C, Heintges T, Gerlach T, Buggisch P, Goeser T, Rosenack J, Pape GR, Schmidt WE, Kallinowski B, Klinker H, Spengler U, Martus P, Alshuth U, Zeuzem S. Extended treatment duration for hepatitis C virus type 1: comparing 48 versus 72 weeks of peginterferon-alfa2a plus ribavirin. *Gastroenterology*, 2006: 130(4):1086-1097.
65. Farnik H, Mihm U, Zeuzem S. Optimal therapy in genotype 1 patients. *Liver International* 2009: 29(s1):23-30.
66. Zeuzem S, Berg T, Moeller B, Hinrichsen H, Mauss S, Wedemeyer H, Sarrazin , Hueppe D, Zehnter E, Manns MP. Expert opinion on the treatment of patients with chronic hepatitis C. *Journal of Viral Hepatitis*, 2009: 16:75-90.
67. Zeuzem S, Hultcrantz R, Bourliere M, Goeser T, Marcellin P, Sanchez-Tapias J, Sarrazin C, Harvey J, Brass C, Albrecht J. Peginterferon alfa-2b plus ribavirin for treatment of chronic hepatitis C in previously untreated patients infected with HCV genotypes 2 or 3. *J Hepatol*, 2004: 40:993-9.

68. Elefsiniotis IS, Pavlidis C, Ketikoglou I, Koutsounas S, Scarmeas N, Pantazis KD, Moulakakis A, Tsianos EV. Patient's age modifies the impact of the proposed predictors of sustained virological response in chronic hepatitis C patients treated with PEG-interferon plus ribavirin. *European Journal of Internal Medicine* , 2008: 19:266-270.
69. Romero-Gomez M, Del Mar Vilorio M, Andrade RJ, Salmeron J, Diago M, Fernandez – Rodriguez CM, Corpas R, Cruz M, Grande L, Vazquez L, Munoz-De-Rueda P, Lopez-Serrano P, Gila A, Gutierrez ML, Perez C, Ruiz- Extremera A, Suarez E, Castillo C. Insulin resistance impairs sustained response rate to peginterferon plus ribavirin in chronic hepatitis C patients. *Gastroenterology* 2005: 128:636-641.
70. Puoti M, Minola E, Antonini MG, Fracasetti O, Baiguera C, Ravasio V, Manno D, Aroldi M, Mendeni M, Biasi L, Suter F, Carosi G. Older age is associated with an impaired response to combination pegylated interferon and ribavirin treatment for chronic hepatitis C. *Journal of Hepatology* 2008: 48:305.
71. Chen L, Borozan I, Feld J, Sun J, Tannis LL, Coltescu C, Healthcote J, Edwards AM, McGilvray ID. Hepatic gene expression discriminates responders and nonresponders in treatment of chronic hepatitis C viral infection. *Gastroenterology* 2005: 128:1437-44.
72. Yan YK, Guirgis M, Dinh T, George J, Dev A, Lee A, Zekry A. Treatment responses in Asians and Caucasians with chronic hepatitis C infection. *World J Gastroenterol*, 2008: 14(21):3416-3420.
73. Chevaliez S, Pawlotsky JM. Hepatitis C virus serologic and virologic tests and clinical diagnosis of HCV-related liver disease. *Int J Med Sci*, 2006: 3(2):35-40.
74. Ghany MC, Strader DB, Thomas DL, Seef LB. American Association for the Study of Liver Diseases. Diagnosis, management, and treatment of hepatitis C. *Hepatology*, 2009: 49:1335-74.

75. Zein NN. Clinical Significance of Hepatitis C Virus Genotypes. *Clin Microbiol Rev* 2000: 13:223-235.
76. Pradat P, Alberti A, Poynard T, Esteban JI, Weiland O, Marcellin P, Badalamenti S, Trepo C. Predictive value of ALT levels for histologic findings in chronic hepatitis C: a European collaborative study. *Hepatology* 2002: 36, 973-7.
77. Prati D, Tailoi E, Zanella A, torre ED, Butelli S, Vecchio ED, Vianello L, Zanusco F, Mozzi F, Milani S, Conte D, Colombo M, Sirchia G. Updated definitions of healthy ranges for serum alanine aminotransferase levels. *Ann Intern Med* 2002: 137:1-9.
78. Persico M, Perrotta S, Persico E, Terracciano L, Folgori A, Ruggeri L, Nicosia A, Vecchione R, Mura VL, Masarone M, Torella R. Hepatitis C virus carriers with persistently normal ALT levels: biological peculiarities and update of the natural history of liver disease at 10 years. *J Viral Hepat*, 2006: 13:290-6.
79. Shirakawa H, Motsumoto A, Joshita S, Komatsu M, Tanaka N, Umemura T, Ichijo T, Yoshizawa K, Kiyosawa K. Pretreatment Prediction of Virological Response to Peginterferon Plus Ribavirin Therapy in Chronic Hepatitis C Patients Using Viral and Host Factors. *Hepatology* 2008: 48(6):1753-60.
80. Baco BR. Chronic hepatitis C and normal ALT : considerations for treatment. *Am J Gastroenterol*, 2004: 99:1706-7.
81. Zhong, J., P. Gastaminza, G. Cheng, S. Kapadia, T. Kato, D. R. Burton, S. E VVieland, S. L. Uprichard, T. VVakita ve F. V. Chisari. 2005. Robust hepatitis C virus infection in vitro. *Proc. Natl Acad Sci USA* 102:9294-9299.
82. Kleiner DE. The liver biopsy in chronic hepatitis C:a view from the other side of the microscope. *Semin Liver Dis* 2005: 25:52-64.
83. Poynard T, Yuen MF, Ratziu V, Lai CL. Viral Hepatitis C. *Lancet*, 2003: 362:2095-100.

84. Melian EB, Plosker GL. Interferon alfacon-1: a review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the treatment of chronic hepatitis C. *Drugs* 2001; 61(11): 1661-91.
85. Paulon E, Naoumov NV. Individualization of antiviral treatment regimens for chronic hepatitis C. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 2006; 18: 321-5.
86. Herrman E, Lee JH, Marinos G, Zeuzem S. Effect of ribavirin on hepatitis C viral kinetics in patients treated with pegylated interferon. *Hepatology*, 2003; 37:1351-8.
87. Tahan V, Kalaycı C. Kronik Hepatit C Güncel Tedavisi. Tabak F,Balık İ, Tekeli E,(ed'ler). *Viral hepatit 2007*. Birinci baskı. Viral Hepatitle Savaşım derneği Yayını, İstanbul 2006: 26-54.
88. Sünbül M. Kronik Hepatit tedavisinde kullanılan antiviraller. Tabak F,Balık İ, Tekeli E,(ed'ler). *Viral hepatit 2005*. 1. baskı. Viral Hepatitle Savaşım derneği Yayını, İstanbul 2005: 181-98.
89. Zeuzem S, Feinman SV, Rasenack J, Heathcote EJ, Lai MY, Gane E, O'Grady J, Reichen J, Diago M, Lin A, Hoffman J, Brundo MJ. Peginterferon alfa-2a in patients with chronic hepatitis C. *N Engl J Med*, 2000; 343: 1666-72.
90. Lindsay KL, Trepo C, Heintges T, Schiffman MC, Gordon SC, Hoefs JC, Schiff ER, Goodman ZD, Laughlin M, Yao R, Albrecht JK. A randomized, double-blind trial pegylated interferon alfa-2a to interferon alfa-2b as initial treatment for chronic hepatitis C. *Hepatology*, 2001; 34: 395-403.
91. Manns MP, McHutchison JG, Gordon SC, Rustgi VK, Schiffman M, Reindollar R, Goodman ZD, Koury K, Ling M, Albrecht JK. Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment for chronic hepatitis C. A randomised trial. *Lancet*, 2001; 358: 958-65.
92. Dienstag JL, McHutchison JG. American Gastroenterological association technical review on the management of hepatitis C. *Gastroenterology*, 2006; 130:231-64.

93. Fried MW, Shiffman ML, Reddy R, Smith C, Marines G, Goncales FL, Haussinger D, Diago M, Carosi G, Dhumeaux D, Craxi A, Lin A, Hoffman J, Yu L. Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *N Engl J Med*, 2002: 347, 975-82.
94. Hadziyannis SJ, Sette H, Morgan TR, Balan V, Diago M, Marcellin P, Ramaderi G, Bodenheimer H, Berstein D, Rizzetto M, Zeuzem S, Pockros PJ, Lin A, Ackrill AM. Peginterferon-alfa 2a and ribavirin combination therapy in chronic hepatitis C. A randomized study of treatment duration and ribavirin dose. *Ann Intern Med* , 2004: 140, 346-55.
95. Hui CK, Belaye T, Montegrande K, Wright TL. A comparison in the progression of liver fibrosis in chronic hepatitis C between persistently normal and elevated transaminase. *J Hepatol* 2003: 38, 511-7.
96. Taliani G, Gemignani G, Ferrari C, Aceti A, Bartolozzi D, Blanc PL. Pegylated interferon alfa-2b plus ribavirin in the treatment of interferon-ribavirin nonresponder patients. *Gastroenterology* 2006: 130, 1098-1106.
97. Shiffman ML, Di Bisceglie AM, Lindsay KL, Morishima C, Wright EC, Everson GT, Lok AS; Morgan TR, Bonkovsky HL, Lee WM, Dienstag JL, Ghany MG, Goodman ZD, Everhart JE. Peginterferon alfa-2a and ribavirin in patients with chronic hepatitis C who failed prior treatment. *Gastroenterology*, 2004: 126, 1015-1023.
98. Jacobson IM, Gonzalez SA, Ahmed F, Lebovics E, Min AD, Bodenheimer HC Jr, Esposito SP, Brown RS, Brau N, Klion FM, Tabias H, Bini EJ, Brodsky N, Cerruli MA, Aytaman A, Gardner PW, Geders JM, Spivack JE, Rahmin MG, Berman DH, Ehrlich J, Russo MW, Chait M, Rovner D, Eldin BR. A randomized trial of pegylated interferon alpha-2b plus ribavirin in the retreatment of chronic hepatitis C. *Am J Gastroenterol*, 2005: 100, 2453-62.
99. Cheruvattath R, Rosati MJ, Gautam M, Vargas HE, Rakela J, Balan V. Pegylated interferon and ribavirin failures: is retreatment an option? *Dig Dis Sci* 2007: 52, 732-736.

- 100.** Poynard T, Schiff E, Terg R, Otero R, Flamm S, Schmidt W, Berg T, Goncales F Jr, Heathcote J, Diago M. Sustained viral response (SVR) is dependent on baseline characteristics in the retreatment of previous alfa interferon/ribavirin(I/R) nonresponders (NR): final results from the EPIC3 program. *J Hepatol* 2008: 48, 369-79.
- 101.** Jensen D, Freilich B, Andreone P, Di Bisceglie A, Brandão-Mello CE, Reddy KR, Craxi A, Martin AO, Teuber G, Messinger D, Thommes JA, Tietz A. Pegylated interferon alfa-2a (40 kD) plus ribavirin (RBV) in prior non-responders to pegylated interferon alfa-2b (12 kD)/RBV : final efficacy and safety outcomes of the REPEAT study. *Hepatology* 2007: 46:29A-2A.
- 102.** Jensen DM, Marcellin P, Freilich B, Andreone P, Di Bisceglie A, Brandao-Mello C, Reddy R, Craxi A, Martin AO, Teuber G, Messinger D, Thommes JA, Tietz A. Re-treatment of Patients With Chronic Hepatitis C Who Do Not Respond Peginterferon- α 2b. *Ann Intern Med.* 2009: 150:528-540.
- 103.** Keeffe EB. Future treatment of chronic hepatitis C. *Antivir Ther*; 2007;12:1015-25.
- 104.** Cholongitas E, Papatheodoridis GV. Review article: novel therapeutic options for chronic hepatitis C. *Aliment Pharmacol Ther* 2008; 27(10):866-84.
- 105.** Erensoy S. Virus hastalıklarının tanısında moleküler biyolojik yöntemler ve filogenetik analiz. Ustaçelebi Ş, Abacıoğlu H, Badur S. Moleküler, Klinik ve Tanısal Viroloji. Ankara: Güneş Kitabevi, 2004: 71-87.
- 106.** Makita, T, T. Pietschmann, T. Kato, T. Date, M. Miyamoto, Z. Zhao, K. Murthy, A. Habermann, H.-G. Krausslich, M. Mizokami, R, Bartenschlager ve T. J. Liang. 2005. Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat. Med.* 11:791-796
- 107.** Thomas, D. L. ve S. M. Lemon. 2000. Hepatitis C, p. 1736-1760. in G. L. Mandell, J. E. Bennett, and R. Dolin (ed.), *Principles and Practice of Infectious Disease*, 5th ed. vol. 2. Churchill Livingstone, Philadelphia, Pa.

108. Scott JD, Gretch DR.: Hepatit C ve G virüsleri, “Klinik Mikrobiyoloji,” Ed. RP. Murray, EJ. Baron, JH. Jorgensen, ML. Landry, MA. Pfaller, Cilt 2, Atlas Kitapçılık; 2009: 1437-1452,.
109. Etiz N, Türkoğlu S.: Viral Hepatitlerin Tanısında Kullanılan Testler ve Standardizasyon, Viral Hepatit 2005, Ed. F. Tabak, E. Balık, E. Tekeli, VHSD; 2005: 127-151,
110. Chevaliez S, Pawlotsky JM.: How to use virological tools for optimal management of chronic hepatitis C, Liver Int. 2009: 29, 9-14.
111. Lee CM, Hung CH, Lu SN, Changchien CS, Hepatitis C Virus Genotypes: Clinical Relevance and Therapeutic Implications, Chang Gung Med J; Jan- Feb; 2008: 31, 16-25.
112. Domiati-Saad R, Richard HS.: Nucleic acid testing for viral burden and viral genotyping, Clinica Chimica 2006: 197-205.
113. Mchutchison JG.: Understanding Hepatitis C, Am J Manag Care 2004: 21-9.
114. Barut HŞ, Günel O.: Dünyada ve Ülkemizde Hepatit C Epidemiyolojisi, Klimik Derg. 2009: 22, 38-43.
115. Ayesh BM, Zourob SS, Abu-Jadallah SY, Avni YS.: Most common genotypes and risk factors for HCV in Gaza strip: a cross sectional study, Virol J. 2009: 6, 105.
116. Yu ML, Chuang WL.: Treatment of chronic hepatitis C in Asia: WhenEast meets West, Journal of Gastroenterology and Hepatology 2009: 336–345.
117. Abacıoğlu H.: Hepatit C Virüsü, “Temel ve Klinik Mikrobiyoloji”, Ed. Ş. Ustaçelebi, Güneş Kitabevi, 1999: 881-889.
118. Arıdoğan BC.: HCV genotiplerinin biyolojik ve epidemiyolojik önemi, 3. Ulusal Viroloji Kongresi, Bursa, 2007: 137-138.

119. Waheed Y, Shafi T, Safi SZ, Qadri I.: Hepatitis C virus in Pakistan: A systematic review of prevalence, genotypes and risk factors, *World J Gastroenterol* 2009; 15, 5647-5653.
120. Chamberlain RW, Adams NJ, Taylor LA, Simmonds P, Elliott RM.: The complete coding sequence of hepatitis C virus genotype 5a, the predominant genotype in South Africa *Biochem Biophys Res Comm*; 1997: 236, 44-49.
121. Idrees M, Riazuddin S.: Frequency distribution of hepatitis C virus genotypes in different geographical regions of Pakistan and their possible routes of transmission, *BMC Infect Dis* 2008; 8, 69.
122. Nausbaurn JB.: Genomic subtypes of hepatitis C virus: epidemiology, diagnosis and clinical consequences, *Bull Soc Pathol Exot.*; 1998: 91, 29-33.
123. McOmish F, Yap PL, Dow BC, et al.: Geographical distribution of hepatitis C virus genotypes in blood donors: An international collaborative survey, *J Clin Microbiol.*; 1994: 32, 884-892.
124. Akkarathamrongsin S, Praianantathavorn K, Hacharoen N, Theamboonlers A, Tangkijvanich P, Tanaka Y, Mizokami M, Poovorawan Y.: Geographic Distribution of Hepatitis C Virus Genotype 6 Subtypes in Thailand, *J Med Virol.* 2010; 82, 257-62.
125. Şanlıdağ T, Akçalı S, Özbakkaloğlu B, Ertekin D, Akduman E, Distribution of hepatitis C virus genotypes in Manisa region, Turkey, *Mikrobiyol Bült.* 2009; 43, 613-8.
126. Ural O, Arslan U, Fındık D.: Konya bölgesinde Hepatit C Dağılımı, *Enfeksiyon Derg.* 2007; 21, 175-181.
127. Altındış M, Aktepe OM, Çetinkaya Z, Çiftçi EH.: Hepatit C virus genotiplerinin Inno-Lipa ve sekans analizi ile belirlenmesi, *Mikrobiyoloji Bült.* 2007; 41, 121-126.

128. Altındış M, Yılmaz S, Dikengil T, Acemoğlu H, Hosoglu S.: Seroprevalence and genotyping of hepatitis B, hepatitis C and HIV among healthy population and Turkish soldiers in Northern Cyprus, *World J Gastroenterol*. 2006: 12, 6792-679.
129. Selçuk H, Kanbay M, Korkmaz M, Gür G, Akcay A, Arslan H, Özdemir N, Yılmaz U, Boyacıoğlu S.: Distribution of HCV Genotypes in Patients with End-Stage Renal Disease According to Type of Dialysis Treatment, *Dig Dis Sci*. 2006: 51, 1420-1425.
130. B, Özbal Y, Soyuer I, Yıldız O.: Erciyes Üniversitesi'nde saptanan Hepatit C Virüs genotipleri, *Türk Mikrobiyol Cem Derg*. 2007: 37, 35-38.
131. Çil T, Özekinci T, Göral V, Altıntaş A.: Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde Hepatit C Virüsü Genotipleri, *Türkiye Klinikleri J Med Sci*. 2007: 27, 496-500.
132. Bozdayı G, Rota S, Verdi H, et al.: The presence of hepatitis C virus (HCV) infection in hemodialysis patients and determination of HCV genotype distribution, *Mikrobiyol Bült*. 2002: 36, 291-300.
133. Veldt BJ, Heathcote EJ, Wedemeyer H, et al.: Sustained virologic response and clinical outcome with chronic hepatitis and advanced fibrosis, *Ann Intern Med*. 2007: 147, 677-84.
134. Kalaycı R.: Afyon bölgesinde saptanan HBV ve HCV etkenlerinde genotip belirlenmesi, mutasyon ve ilaç direncinin araştırılması, Uzmanlık tezi, Afyon, 2008.
135. Savaş E.: Viral hepatit C'li hastalarda genotip tayini ve mutasyon analizi, Doktora tezi, Gaziantep, 2007.
136. Türkoğlu S, Bozacı M, Çakaloğlu Y.: İkinci kuşak "core genotipleme" ile hepatit C virus genotiplerinin araştırılması, 3. Ulusal Hepatoloji Kongresi (27-29 Mayıs 1999, İstanbul) Kongre Kitabı, İstanbul, 1999: 41.
137. Yarkin F, Hafta A.: Kronik hepatit C enfeksiyonu olan hastalarda hepatit C virus genotiplerinin dağılımı, *Viral Hepatit Dergisi* 3: 164-7, 2000.

138. 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, 104-11.
139. Yalçın K, Degertekin H, Akkız H. HCV genotypes in HCV related chronic hepatitis in Southeast Anatolia, Turkish J Gastroenterol. 1999: 10, 249-252.
140. Yıldız E, Oztan A, Sar F, Pınarbaşı E, Çetin-Atalay R, Akkız H, Öztürk M: Molecular characterization of a full genome Turkish hepatitis C virus 1b isolate (HCV-TR1): a predominant viral form in Turkey, Virus Genes; 2002: 25, 169-177.
141. Deveci M, Kayseri bölgesinde hepatit C virüsü ile enfekte bireylerin hepatit C genotiplerinin saptanması, Uzmanlık tezi, Kayseri, 2008.
142. Şahin K, Malatya'da hepatit C virüs enfeksiyon prevalansı, virüsün aile içi bulaş insidansı ve HCV genotiplerinin belirlenmesi, Doktora tezi, Malatya, 2000.

9. ÖZGEÇMİŞ

31 Mart 1978 tarihinde, Malatya iline bağlı Doğanşehir ilçesinde dünyaya geldim. 1994 Adıyaman Çelikhan Lisesi mezunuyum. 1998 yılında Hacettepe Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksek Okulu Tıbbi Laboratuvar, 2005 İnönü Üniversitesi Fen Fakóltesi’nde Biyoloji bölümünden mezun oldum. 2010 yılı Fırat Üniversitesi Tıp Fakóltesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans eğitimime başladım. Evliyim ve bir erkek çocuk babasıyım.