

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KAN DIŞI ÖRNEKLERDE HEPATİT C VİRUS
RNA'SININ ARAŞTIRILMASI**

TUĞÇE İŞADAM

**MİKROBİYOLOJİ VE KLİNİK MİKROBİYOLOJİ
ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

İZMİR-2012

TEZ KODU: DEU.HSI MSc/2009970114

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KAN DIŞI ÖRNEKLERDE HEPATİT C VİRUS
RNA'SININ ARAŞTIRILMASI**

**MİKROBİYOLOJİ VE KLİNİK MİKROBİYOLOJİ
ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

TUĞÇE İŞADAM

Danışman Öğretim Üyeleri: Prof. Dr. A. Arzu SAYINER

Prof. Dr. Y. Hakan ABACIOĞLU

Bu araştırma ATQ Biyoteknoloji İç ve Dış Ticaret Ltd. Şti. tarafından desteklenmiştir.

TEZ KODU: DEU.HSI MSc/2009970114

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Mikrobiyoloji Yüksek Lisans programı öğrencisi Tuğçe İşadam "Kan Dışı Örneklerde Hepatit C Virus RNA'sının Araştırılması" konulu yüksek lisans tezini 21.09.2012 tarihinde başarılı olarak tamamlamıştır.



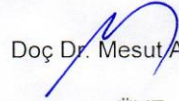
Prof. Dr. A. Arzu SAYINER

BAŞKAN



Prof. Dr. Nuran ESEN

ÜYE



Doç Dr. Mesut AKARSU

ÜYE

Doç. Dr. A. Aydan ÖZKÜTÜK

YEDEK ÜYE

Prof. Dr. Gül ERGÖR

YEDEK ÜYE

TEŞEKKÜR

Eğitimim ve tez çalışmalarım süresince benden yardımlarını ve desteğini esirgemeyen danışmanlarım Prof. Dr. A. Arzu Sayiner ve Prof. Dr. Y. Hakan Abacıoğlu'na, çalışmam sırasında her zaman bana yol gösteren Serap Aslan, Filiz Alkan ve Berrin Öztürk'e, beni yetiştiren ve her konuda bana yardımcı olan diğer tüm hocalarıma ve özellikle aileme teşekkür ederim.

Saygılarımla

Tuğçe İşadam

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER	ii
TABLolar DİZİNİ	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
KISALTMALAR	viii
ÖZET	1
SUMMARY	3
1. GİRİŞ VE AMAÇ	5
2. GENEL BİLGİLER	6
2.1. Hepatit C Virusu	6
2.1.1. Yapı ve Genom Organizasyonu	6
2.1.2. Hepatit C Virusu Yaşam Döngüsü	9
2.1.3. Hepatit C Virusu Genotipleri ve Epidemiyolojisi	10
2.1.3.1. Hepatit C Virusu Genotipleri	10
2.1.3.2. HCV Epidemiyolojisi	12
2.1.4. Bulaş Yolları	12
2.1.5. HCV Klinik Özellikleri	14
2.1.5.1. Akut Hepatit C	14
2.1.5.2. Kronik Hepatit C	15
2.1.6. HCV Türümsüleri ve HCV'nin Ekstrahepatik Tutulumları	18
2.1.7. HCV İnfeksiyonunda Tedavi ve Korunma	19
2.1.8. HCV İnfeksiyonunda Tanı	21

2.2 Polimeraz Zincir Tepkimesi (PZT).....	23
2.2.1.Ters (“ Reverse”) Transkriptaz PZT (RT-PZT)	25
2.2.2. “Real-Time” PZT	25
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	28
3.1. Araştırmanın Tipi.....	28
3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı.....	28
3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi/Çalışma Grupları	28
3.4. Çalışma Materyali	28
3.5. Araştırmanın Değişkenleri.....	29
3.6. Veri Toplama Araçları	29
3.6.1. Kullanılan gereç ve sarf malzemeleri	29
3.6.2. Yöntem	30
3.6.2.1. Real-Time Reverse Transkriptaz PZT Optimizasyonu	30
3.6.2.2. HCV RNA Ekstraksiyonu.....	31
3.6.2.2.1. Tükürük Örnekleri.....	31
3.6.2.2.2. İdrar Örnekleri	31
3.6.2.2.3. Dışkı Örnekleri	32
3.6.2.2.4. QIAamp Viral RNA Mini Kit Spin Kolon Yöntemi	33
3.6.2.3. Real Time RT-PZT Protokolü	35
3.6.2.4. HCV Genotipleme Yöntemi.....	36
3.6.2.4.1. cDNA Eldesi	36
3.6.2.4.2. Nested PZT	37

3.6.2.4.3. Agaroz Jel Elektroforezi	38
3.6.2.4.4. Restriksiyon Endonükleazlarla Kesim	39
3.6.2.4.5. Metafor Jel Elektroforezi.....	40
3.6.2.5. İstatistiksel Analiz	41
3.7. Araştırma Planı ve Takvimi.....	41
3.8. Verilerin Değerlendirilmesi.....	41
3.9. Araştırmanın Sınırlılıkları.....	42
3.10. Etik Kurul Onayı	42
4. BULGULAR.....	43
4.1. Serum Dışı Örneklerde Nükleik Asid Ekstraksiyon Yönteminin Seçilmesi	43
4.2. Hasta Örneklerinin HCV RNA Analiz Sonuçları	51
4.3. Restriksiyon Endonükleaz Enzim Analizi Bulguları	54
5. TARTIŞMA	56
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	60
7. KAYNAKLAR	61
8. EKLER.....	68

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1. Türkiye'de HCV bulaşı açısından risk faktörleri.....	14
Tablo 2. Hepatit C infeksiyonunda tanı testlerinin kullanımı	22
Tablo 3. Tükürük örneği için farklı ekstraksiyon yöntemlerinin kullanımı ile elde edilen sonuçların (HCV RNA ve internal kontrol için) Ct değerleri..	44
Tablo 4. İdrar örneği için farklı ekstraksiyon yöntemlerinin kullanımı ile elde edilen sonuçların Ct değerleri..	46
Tablo 5. Dışkı örneği için farklı ekstraksiyon yöntemlerinin kullanımı ile elde edilen sonuçların Ct değerleri	49
Tablo 6. HCV RNA pozitif olgularda plazma dışı örneklerden elde edilen viral yükler	52

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Hepatit C virusunun şematik yapısı.....	6
Şekil 2. HCV genomunun şematik yapısı.....	7
Şekil 3. HCV replikasyon döngüsü.....	10
Şekil 4. HCV genotip ve subtipleri arasındaki ilişkiyi gösteren evrim ağacı	11
Şekil 5. HCV genotiplerinin coğrafi bölgelere göre yayılımı	12
Şekil 6. Akut HCV enfeksiyonu sırasında viral göstergelerin seyri	15
Şekil 7. HCV enfeksiyonunun doğal seyri	16
Şekil 8. Kronik HCV enfeksiyonu sırasında viral göstergelerin seyri	17
Şekil 9. Kronik HCV enfeksiyonunda karaciğer patolojisi örneği	17
Şekil 10. Polimeraz zincir tepkimesinde denaturasyon aşaması.....	23
Şekil 11. Polimeraz zincir tepkimesinde öncül bağlanması aşaması	23
Şekil 12. Polimeraz zincir tepkimesinde zincir uzaması aşaması	24
Şekil 13. Polimeraz zincir tepkimesinde döngülerin ilerleyişi	24
Şekil 14. Gerçek zamanlı kantitatif PZT yönteminde standart eğri eldesi.	26
Şekil 15. QIAamp Viral RNA Mini Kit Spin Kolon yöntemi basamaklarının şematik gösterimi	35
Şekil 16. Tükürük örneği için seçilen ekstraksiyon yöntemi (yöntem 3 - 1000 IU / 140 µl) kullanılarak elde edilen HCV RNA ve internal kontrol amplifikasyon eğrileri..	45
Şekil 17. İdrar örneği için seçilen ekstraksiyon yöntemi (yöntem 3 - 250 IU / 140 µl) kullanılarak elde edilen HCV RNA ve internal kontrol amplifikasyon eğrileri.	47
Şekil 18. Dışkı örneği için seçilen ekstraksiyon yöntemi (yöntem 6 - 10000 IU / 140 µl) kullanılarak elde edilen HCV RNA ve internal kontrol amplifikasyon eğrileri.	50

Şekil 19. Bazı hastalara (Hasta1-5) ait real-time HCV RT-PZT çalışma sonuçları.....	53
Şekil 20. Nested PZT sonrası agaroz jel elektroforezinde amplikonların görüntülenmesi.....	54
Şekil 21. Bazı hastalara ait REA kesim bantlarının metafor jel elektroforezinde görüntülenmesi.....	55

KISALTMALAR

HCV: Hepatit C Virusu (Hepatitis C Virus)

HBV: Hepatit B Virusu

HDV: Hepatit D Virusu

HIV: “Human Immunodeficiency Virus”

RNA: Ribonükleikasit

DNA: Deoksiribonükleikasit

cDNA: Komplementer Deoksiribonükleikasit

ORF: Açık Okuma Bölgesi (Open Reading Frame)

UTR: Kodlanmayan bölge (Untranslated Region)

ER: Endoplazmik Retikulum

GAG: Glukozaminoglikan

LDLR: Düşük yoğunluklu lipoprotein reseptörü (Low-density Lipoprotein Receptor)

SR-B1: Çöpçü reseptörü sınıf B tip 1 (Scavenger receptor class B type 1)

CD81: Cluster of Differentiation 81

CLDN-1: Klaudin-1

OCLN: Okludin

IRES: “Internal Ribosomal Entry Site”

ALT: Alanin Amino Transferaz Enzimi

HBsAg: Hepatit B Virusu Yüzey Antijeni

PBMC: Periferik Mononükleer Kan Hücreleri

IFN: Interferon

PEG-IFN: Pegile Interferon

EIA: ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay)

RIBA: Recombinant Immunoblot Assay

PZT: Polimeraz Zincir Tepkimesi (PCR: Polymerase Chain Reaction)

REA: Restriksiyon Enzim Analizi

RT: Ters transkriptaz (Reverse Transcriptase)

Mg: Magnezyum

EDTA: Etilendiamintetraasetik asit

PBS: "Phosphate buffered saline"

BSA: Bovin Serum Albumin

CTAB: Setil trimetilamonyum bromid

TBE: Tris Borik Asit Edta

dNTP: Dinukleotid tri fosfat

UV: Ultra viyole

Ct: Eşik değerin aşıldığı PZT döngüsü (Cycle threshold)

IU: Enternasyonal ünite

Rpm: Dakika devir sayısı (Revolution per minute)

ml: Mililitre

In vitro: Canlı dışında

İK: İnternal Kontrol

ÖZET

Kan Dışı Örneklerde Hepatit C Virus RNA'sının Araştırılması

**Tuğçe İşadam, Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü,
Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı**

Hepatit C virus (HCV) enfeksiyonu kronik hepatit, karaciğer sirozu ve hepatoselüler karsinomun en önemli nedenlerinden biridir. Hepatit C, yüksek oranda (%70-80) kronikleşen ve yıllarca asemptomatik seyreden bir enfeksiyondur.

Kronik hepatit C enfeksiyonunda patogeneze ve interferon+ribavirin tedavisinde yanıtızlığa yol açan etkenler net olarak ortaya konamamıştır. Ekstrahepatik hepatit C virusu (HCV) replikasyonun bulaşmada, bağışık yanıtta kaçışta ve tedavi başarısızlığında rol oynayabileceğine ilişkin çelişkili veriler bulunmaktadır. Bu alandaki verilere katkı yapmak amacı ile planlanan çalışmada, kronik HCV hastalarından alınan farklı örneklerde (idrar, tükürük, dışkı), HCV RNA varlığı araştırıldı, pozitif bulunması durumunda kantitasyon ve HCV genotipi açısından aynı hastaya ait plazma örneğinden elde edilen sonuçlar ile karşılaştırıldı. Araştırmanın hipotezi; Hepatit C ile enfekte hastalarda vücudun farklı kompartmanlarında Hepatit C virusunun bulunduğu ve bu kompartmanlardaki viral yükler arasında bir fark olmadığıdır.

On beş adet kronik hepatit C enfeksiyonu olan kişiden alınan plazma, tükürük, idrar ve dışkı örnekleri kantitatif izlenebilir ("real-time") ters transkriptaz polimeraz zincir tepkimesi (RT-PZT) yöntemi kullanılarak HCV RNA açısından incelendi. Nükleik asit ekstraksiyonu QIAamp® Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Almanya) ile yapıldı. Plazma dışı örneklerde farklı modifikasyonlar ile duyarlılığı en iyi yöntem araştırıldı. RT-PZT işlemi artus HCV RG RT-PCR Kit (Qiagen, Almanya) kullanılarak, Rotor-Gene 3000 (Corbett Research, Avusturalya) cihazında gerçekleştirildi. Aynı hastaya ait olan plazma ve plazma dışı örneklerde pozitiflik saptanması durumunda, restriksiyon enzim analizi yöntemi kullanılarak viral genotip belirlendi.

İncelenen on beş hasta plazmasından on tanesinde HCV RNA pozitif olarak saptandı. Plazmasında viral RNA saptanan hastalardan birinde tükürük, birinde idrar

ve bir diğesinde dışkı örneğinde plazma viral yüküne eşdeğer veya daha düşük miktarda HCV RNA saptandı. Plazma örneklerindeki virus, genotip 1 olarak belirlendi. Tükürük, idrar ve dışkı örneklerinin genotiplendirmesi düşük virus miktarı nedeniyle gerçekleştirilemedi. Sonuç olarak, HCV RNA serum dışındaki örneklerde de bulunmakta ve saptanabilmektedir.

Anahtar Kelimeler: Hepatit C Virusu, Polimeraz Zincir Tepkimesi, Genotipleme

SUMMARY

Investigation of Hepatitis C Virus RNA in Samples Other Than Blood

**Tuğçe İşadam, Dokuz Eylül University, The Institute of Health Sciences,
Microbiology and Clinical Microbiology Department**

Hepatitis C virus (HCV) is the one of major causes of chronic hepatitis, cirrhosis and hepatocellular carcinoma. Hepatitis C infection becomes chronic in about 70-80% of cases and mostly do not exhibit any symptoms for years.

It is not clear how hepatitis C cause chronic infection or resists to interferon+ribavirin treatment. There are conflicting data related to role of extrahepatic HCV replication on transmission, escape from the immune response and failure of therapy. This study aimed to make a contribution on this field by investigation of presence of HCV RNA in saliva, urine and stool from patients with chronic Hepatitis C. Any positive result at saliva, urine and stool samples compared with the result of same patients' plasma for viral load and HCV genotype. Hypothesis of this study was that HCV is present on different compartments of the body of patients with chronic hepatitis C infection and there is no difference among compartments regarding the viral loads.

Plasma, saliva, urine and stool samples of 15 chronic hepatitis C patients were analyzed for the presence of HCV RNA by a quantitative real time reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) assay. Nucleic acid isolation was done by QIAamp® Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Germany) with some modifications for non-plasma samples in order to have the best sensitivity in the assay. The commercial RT-PCR (Artus HCV RG RT-PCR Kit, Qiagen, Germany) assay was performed with a Rotor-Gene 3000 (Corbett Research, Australi). When plasma and any of the non-plasma samples of the same patient were positive, HCV genotype was determined by restriction fragment length polymorphism analysis.

Ten of 15 patients' plasma samples were HCV RNA positive. Among these patients' samples, one of saliva, urine and stool samples, each belonging to a

different patient were also HCV RNA positive. Viral loads of the non-plasma samples were either equal or lower than the same patients' plasma viral load. HCV genotype of plasma samples was determined as genotype 1. Genotyping of non-plasma samples could not be completed due to the low viral load of the samples. In conclusion, it was shown that HCV RNA is present and detectable in non-plasma samples.

Key words: Hepatitis C Virus, Polimerase Chain Reaction, Genotyping

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Hepatit C virusu, zarflı ve pozitif tek iplikli bir RNA virusudur. Kronik hepatit, karaciğer sirozu ve hepatoselüler karsinomun en önemli nedenlerinden biridir. Hepatit C, tüm dünyada ortalama olarak %3 oranında görülen ve genellikle asemptomatik seyreden ancak vakaların yaklaşık %80'inde kronikleşen bir enfeksiyondur.

HCV enfeksiyonlarının kronikleşme mekanizması tam olarak bilinmemekle birlikte, kronikleşmesinde ve tedavi yanıtızlığında ekstrahepatik dokularda/hücrelerde oluşturduğu enfeksiyonun rol oynayabileceğine ilişkin bazı veriler bulunmaktadır. Bu alandaki verilere katkı yapmak amacı ile planlanan çalışmada HCV'nin plazma dışı örneklerde varlığı araştırılmıştır.

Bu çalışmada, kronik HCV hastalarından alınan farklı örneklerde (idrar, tükürük, dışkı), HCV RNA varlığı araştırılmış, pozitif bulunması durumunda kantitasyon ve genotipler açısından aynı hastaya ait plazma örneğinden elde edilen sonuçlar ile karşılaştırılmıştır.

Araştırmanın hipotezi; Hepatit C ile enfekte hastalarda vücudun farklı kompartmanlarında Hepatit C virusunun bulunduğu ve bu kompartmanlar arasında viral yükler arasında bir fark olmadığıdır.

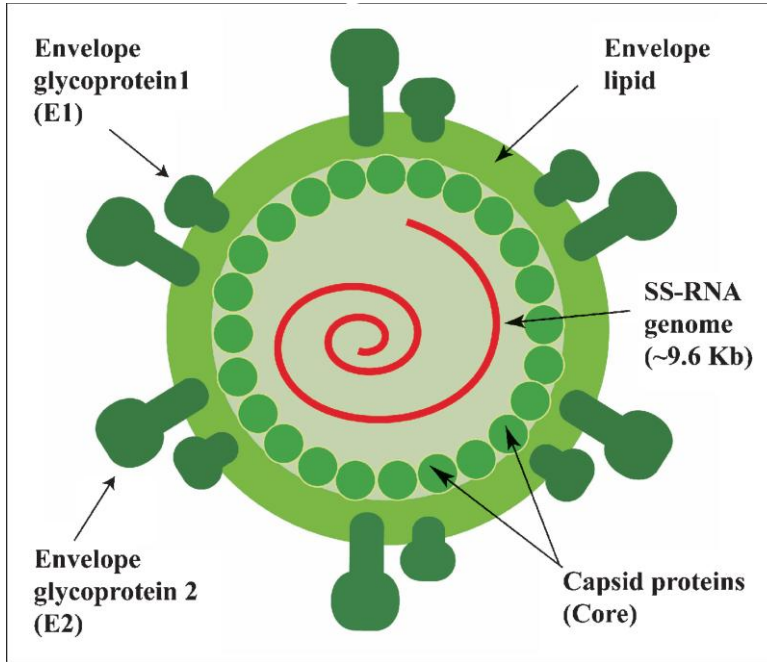
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Hepatit C Virusu

2.1.1. Yapı ve Genom Organizasyonu

Hepatit C virusu (HCV) infeksiyonu ilk olarak 1975 yılında Hepatit A ve Hepatit B olmadığı bilinen post-transfüzyon hastalarında saptanmıştır ve non-A non-B Hepatiti olarak adlandırılmıştır (1). Etken, Choo ve arkadaşları tarafından 1989 yılında Hepatit C virusu olarak tanımlanmıştır (2).

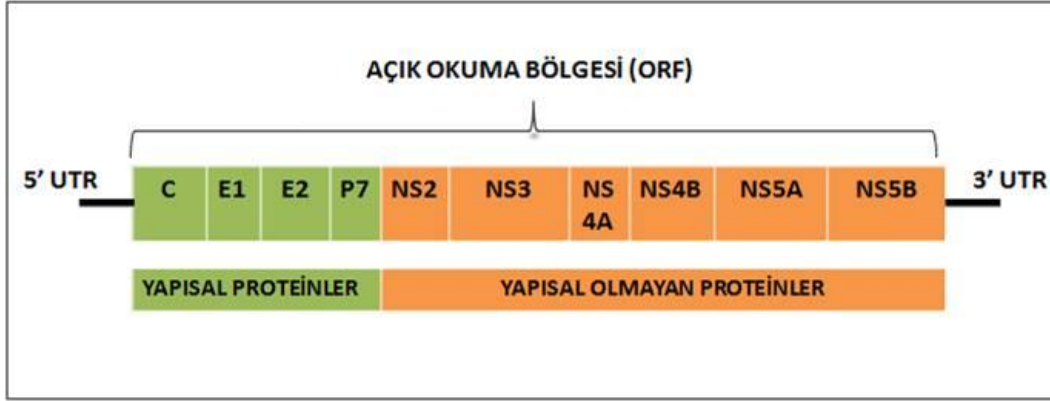
Hepatit C virusu, *Flavivirus* ailesinden *Hepacivirus* genusuna ait zarflı bir virustur (3). Hepatit C virusu 50-60 nm çapındadır (4) ve ikozahedral bir nukleokapsid içermektedir (5). Kapsidin dışında iki glikoproteinden (E1 ve E2) oluşan bir zarf bulunmaktadır (Şekil 1) (5). Virusun yoğunluğu 1.08 g/ml'dir (6).



Şekil 1. Hepatit C virusunun şematik yapısı (7)

Hepatit C virus genomu yaklaşık 10.000 nukleotitten oluşan pozitif yönelimli tek iplikli bir RNA'dan oluşmaktadır (8). Genom, tek bir uzun açık okuma bölgesi (ORF, open reading frame) içermektedir. Genomun iki ucunda 5' ve 3' protein kodlamayan bölgeler (UTR, untranslated region) bulunur. 5' UTR bölgesi daha uzun ve korunmuş bir bölgedir (5). Genom, yaklaşık 3000 aminoasitten oluşan tek bir poliprotein kodlar.

Bu poliprotein konak hücreden ve virustan gelen proteazlarla kesilerek yapısal ve yapısal olmayan proteinleri oluşturur. Yapısal proteinler; kapsid kor proteini, zarf glikoproteini olan E1 ve E2 ile P7 proteini olmak üzere dört tanedir. Yapısal olmayan proteinler ise altı tanedir (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B) (Şekil 2) (3).



Şekil 2. HCV genomunun şematik yapısı

Kapsid kor proteini: Virus tarafından oluşturulan poliproteinden Endoplazmik Retikulum (ER) içerisinde konak hücre proteazları ile işlemlenerek oluşturulur. Virus partikülünün temel yapı proteini olup birçok işlevi vardır. Kor proteinin bir bölgesi (112-152. amino asitler arası) ER ve mitokondri membranı ile ilişki kurulmasında gereklidir. Kor proteini ER'dan mitokondriye geçer ve kalsiyum düzenlenmesi ve apoptotik sinyalde görev alır. Aynı zamanda lipid damlalarıyla ilişki kurarak, karaciğer steatozisinde rol oynar (7).

Zarf glikoproteinleri (E1, E2): Virus partikülünün dış kılıfının ve spike-benzeri çıkıntıların oluşmasını sağlarlar. E1 (192 amino asit) ve E2 (363 amino asit) proteinleri, reseptör aracılı konak hücreye giriş mekanizması için gereklidir. Her ikisi de glikolize olmuş proteinlerdir (1, 6, 7).

P7 proteini: 63 amino asitlik bir proteindir. Viroporin denilen bir viral protein ailesine aittir. İyon kanallarının oluşumunda görev almaktadır. Enfeksiyöz virus partiküllerinin oluşumunda önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir. Bu yüzden de antiviral tedaviler için uygun bir hedef halini almaktadır (1, 7).

NS2 proteini: 21-23 kDa ağırlığında bir transmembran proteindir. Hidrofobik yapıdadır. Membran ile ilişkili bir sistein proteazdır. NS3 proteininin N-terminal proteazıyla birlikte NS2/NS3 birlikteliğinin ayrılmasını sağlar (1, 7).

NS3 proteini: 2 DExH/D-box helikazlar superaillesinin bir üyesidir. 69 kDa ağırlığındadır ve kristal bir yapıya sahiptir. N terminalinde bulunan serin proteaz ile kofaktörü olan NS4A'nın yardımıyla NS3/4A, NS4A/4B, NS4B/5A ve NS5A/5B birlikteliklerinin ayrılmasında görev alır. C terminalinde ise RNA helikaz/NTPaz bulundurulur. Bunlar HCV replikasyonu için önemlidir (1, 6, 7).

NS4 proteini: 54 amino asitlik bir polipeptittir. NS3'ün kofaktörü olarak görev yapmaktadır. Asidik C terminali NS5A fosforilasyonunu düzenleyerek HCV replikasyonunda rol oynamaktadır (1).

NS4B proteini: 27 kDa'luk integral ER membran proteindir. RNA replikasyonunun gerçekleştiği bölge olan membranöz ağ denilen özelleşmiş bir membran kompartmanının oluşumunu sağlamaktadır (1).

NS5A proteini: N-terminal amfipatik alfa-helix yapısındadır ve üç domaini vardır. Domain 1 en korunmuş olan bölgesidir ve RNA'nın bağlanmasını sağlayan bir oluğu bulunmaktadır. Domain 3 ise virüs üretiminde gerekli olan bir bölgedir. NS5A proteininin 56 kDa ağırlığında fosforillenmiş ve 58 kDa ağırlığında hiperfosforillenmiş iki formu mevcuttur (7).

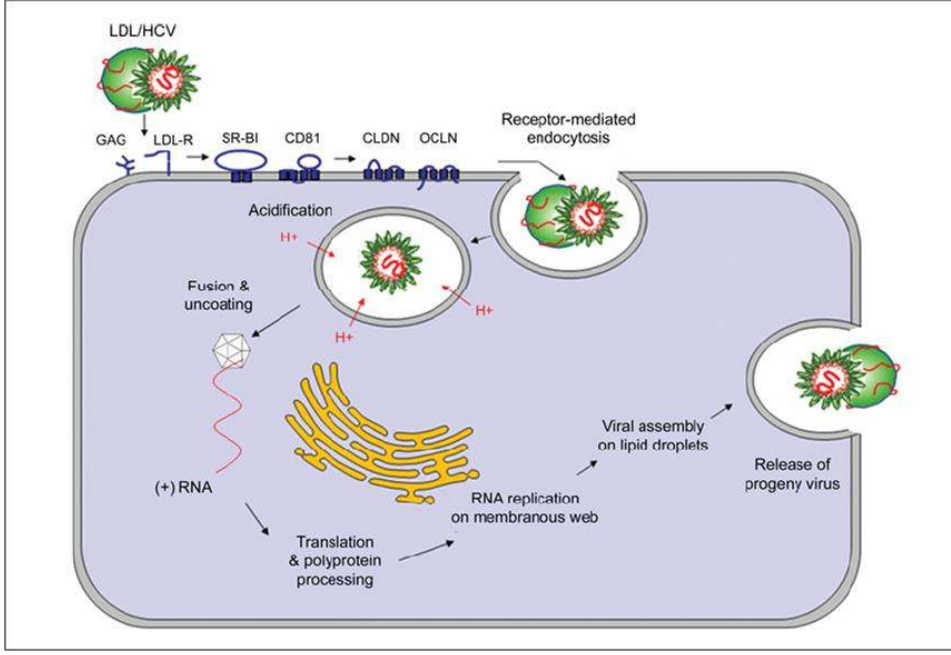
NS5B proteini: 68 kDa ağırlığındadır ve RNA'ya bağımlı RNA polimeraz (RNA-dependent RNA polymerase, RdRp) aktivitesi göstermektedir. HCV genomunu kalıp olarak kullanıp komplementer negatif iplikli HCV RNA sentezinin başlamasında görevlidir. NS5B proteininin "proof-reading" aktivitesi yoktur. Bu yüzden aktivitesi sırasında hata yapma oranı çok yüksektir. Ancak HCV genomu genellikle oldukça korunmuş bölgeler içermektedir ve korunmuş bölgelerle değişkenlik gösteren bölgeler arasındaki denge, virüsü korumaktadır (1, 7).

NS5A ile NS5B arasında fonksiyonel bir ilişki olduğu ve NS5A'nın NS5B için kofaktör olarak görev aldığı düşünülmektedir (1).

2.1.2. Hepatit C Virusu Yaşam Döngüsü

Hepatit C virusu karaciğer hücrelerine tropizm gösterir (1). HCV enfeksiyonunun ilk aşamasında, virusun konak hücre yüzeyindeki reseptörlere bağlanması gerekmektedir (1). Glukozaminoglikanların (GAG) ve düşük yoğunluklu lipoprotein reseptörlerinin (low-density lipoprotein receptors, LDLRs) ilk bağlanmada görevli olduğu düşünülmektedir. Bağlanmanın gerçekleşmesinden sonra HCV partiküllerinin içeri alınmasında SR-B1(human scavenger receptor), CD81 ve “tight junction” proteinleri kladin-1 (CLDN-1) ve oklüdin (OCLN) reseptörleri görevlidir (3, 9). Virus partikülleri reseptör aracılı endositoz ile hücre içerisine girer (1).

Virusun hücreye girişinden sonra, pH bağımlı bir safha bulunmaktadır. Bu aşamada virusu içeren endozomlardaki pH’ın düşmesi sayesinde membranlar arasında füzyon ve virusun genomunun kılıfından soyulması gerçekleşir. Konak hücre stoplazmasına salınmış olan pozitif iplikli HCV RNA translasyon aşamasına geçer. Translasyon, HCV RNA’nın cap içermeyen 5’ ucunda bulunan IRES (Internal ribosomal entry site) bölgesi sayesinde ribozoma bağlanması ile başlar (1). Oluşan poliprotein, konak ve virus proteazları ile kesilerek on proteine dönüştürülür. Bu proteinler, intraselüler membranlara bağlı kalırlar. Membranöz ağ denilen membranla ilişkili replikasyon komplekslerinde replikasyon gerçekleşir. HCV’nin yapısal olmayan proteinlerinden NS3, NS4A, NS4B, NS5A ve NS5B, RNA replikasyonuna yardımcı olurlar (9). HCV’nin birleşmesi lipid damlacıkları üzerinde gerçekleşmektedir (1). Bu birleşmede kor proteinlerinin önemli rol oynadığı düşünülmektedir. Viral nukleokapsidlerin de endoplazmik retikulum (ER) membranından tomurcuklanarak zarfı oluşturdıkları ve salgılanma yoluyla enfekte olmuş hücreden salındıkları düşünülmektedir (Şekil 3) (10).



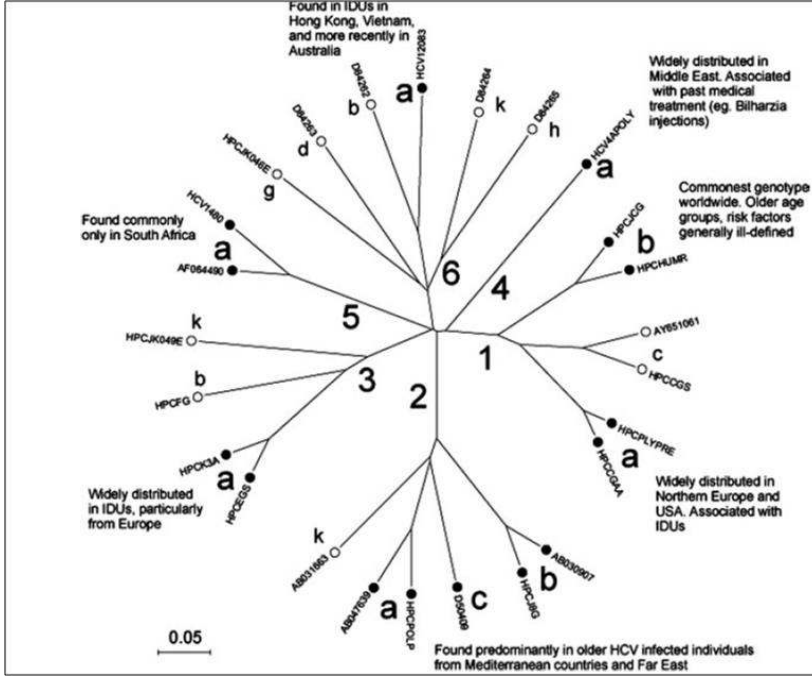
Şekil 3. HCV replikasyon döngüsü (1)

2.1.3. Hepatit C Virusu Genotipleri ve Epidemiyolojisi

2.1.3.1. Hepatit C Virusu Genotipleri

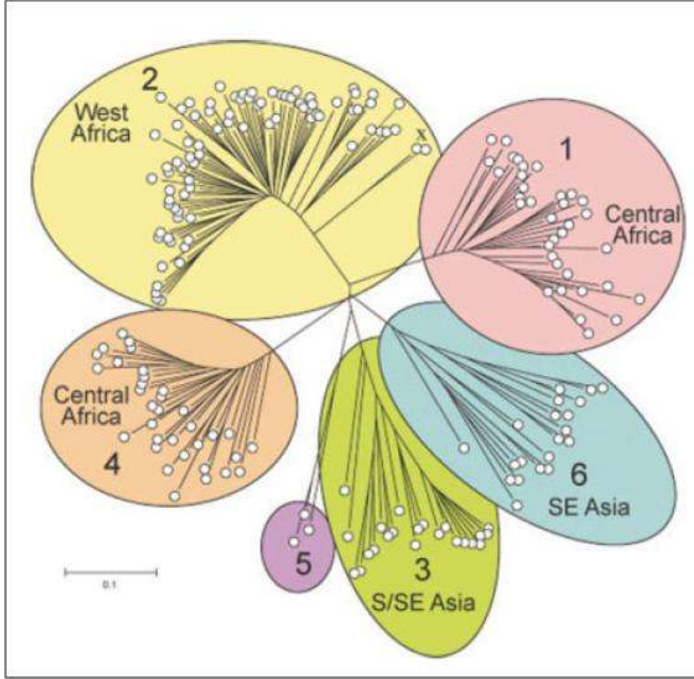
HCV, RNA'ya bağımlı RNA polimerazının çok mutasyon yapması ve virusun hızlı replikasyon özelliğinden dolayı genetik çeşitliliği fazla olan bir virustur. Buna bağlı olarak da süregiden genetik varyasyon, yarışma ve seleksiyon sonucu idantik olmayan ancak birbiriyle yakın ilişkili genomların oluşturduğu dinamik bir süreç gelişmekte ve türümsüler (quasispecies) oluşmaktadır (11).

Hepatit C virusu 6 genotip ve birçok subtip içermektedir. Genotipler rakamlarla, alt tipler ise harflerle gösterilmektedir (Şekil 4). Genotipler birbirinden nükleotit seviyesinde %31-33 oranında, subtipler %20-25 oranında farklıdır. Klinik olarak genotip 1 ve 4, genotip 2 ve 3'e göre tedaviye daha dirençlidir (12).



Şekil 4. HCV genotip ve subtipleri arasındaki ilişkiyi gösteren evrim ağacı (12)

Genotiplerin dağılımı, coğrafik bölgelere göre değişmektedir. Genotip 1, 2 ve 3 yaygın olarak görülmektedir (13). Subtipler açısından incelendiğinde, 1a Kuzey Avrupa ve Kuzey Amerika’da, 1b Japonya, Güney ve Doğu Avrupa’da daha sık gözlenmektedir (13). Tip 4 Orta Batı ve Afrika’da, Tip 5 ve 6 ise Güney Afrika ve Güney Doğu Asya’da daha yaygın olarak bulunmaktadır (Şekil 5) (14). Türkiye’de en çok gözlenen hepatit C tipi, genotip 1b’dir (15). Abacıoğlu ve arkadaşları tarafından Türkiye’deki HCV genotiplerini belirlemek amacıyla yapılan bir çalışmada hastaların %75,3’ü genotip 1b, %19,1’i genotip 1a, %3,4’ü genotip 2 ve %2,2’si genotip 4 olarak saptanmıştır (16).



Şekil 5. HCV genotiplerinin coğrafi bölgelere göre yayılımı (12)

2.1.3.2. HCV Epidemiyolojisi

Hepatit C infeksiyonu pandemik bir infeksiyondur. Dünya Sağlık Örgütü tarafından HCV prevalansı %3 olarak belirtilmiştir (17). Kronik HCV prevalansı da coğrafi bölgelere göre değişmekle birlikte %0.1-%26 arasındadır (4).

HCV prevalansı Mısır'da %15-20, Almanya'da %0.6, Kanada'da %0.8, Fransa'da 1.1, Avustralya'da %1.1, Amerika Birleşik Devletleri'nde %1.8, Japonya'da %1.5-2.3, İtalya'da %2.2, Hindistan'da %0.9, İngiltere ve İskandinav ülkelerinde %1'in altındadır (18). Kronik HCV infeksiyonu prevalansı yüksek olan ülkeler Mısır (%22), Pakistan (%4.8) ve Çin (%3.2)'dir (19). Türkiye'de HCV prevalansı ise %1-1.9 arasındadır (13).

2.1.4. Bulaş Yolları

Hepatit C virusu kan ve kan ürünleri ile, cinsel temas ile ve vertikal olarak bulaşabilmektedir (4). Hepatit C emzirme, gıdalar, su, sarılma, öpüşme gibi temaslar sonucu bulaşmaz (19).

Hepatit C bulaşında Amerika Birleşik Devletleri'nde en sık gözlenen yol, damar içi uyuşturucu kullanımıdır. Yapılan bir çalışmada, akut infeksiyon oluşumunda intravenöz ilaç kullanımı ile bulaş oranı ABD'de %68 olarak saptanmıştır (20). Türkiye'de bu yolla bulaş fazla gözlenmemektedir (21). 1996-2002 yılları arasında İstanbul Tıp Fakültesi Gastroenterohepatoloji Departmanı'na başvuran, anti-HCV pozitif 139 erkek ve 181 kadın hasta ile yapılan bir çalışmada Türkiye için en sık saptanan ilk üç risk faktörü: ameliyat, kan transfüzyonu ve dental prosedürler olarak saptanmıştır (Tablo 1) (23).

Kan yoluyla bulaş 1990 yılından önce özellikle hemofili ve talasemi hastalarında çok sık görülen bir yol iken günümüzde yeni tanı yöntemlerinin ortaya çıkması ve kan donörlerinde serolojik incelemelerin yapılmaya başlanmasından sonra oldukça azalmıştır (4, 21).

HCV bulaşındaki diğer bir etken de güvenli olmayan enjeksiyondur ancak steril enjektörlerin kullanımının yaygınlaşması ile gelişmiş ülkelerde bu sorun ortadan kaldırılmıştır. Ancak gelişmekte olan ülkelere sağlık hizmetlerindeki sorunlar HCV bulaşına yol açabilmektedir. Örneğin Mısır'da 1960-1987 yılları arasındaki şistozomiyazis tedavisi sırasında steril şırıngaların kullanılmaması nedeniyle büyük bir HCV epidemisi söz konusu olmuştur. Mısır'da kan donörleri arasında anti-HCV prevalansı %20'dir (22).

HCV bulaşında hemodiyaliz, organ transplantasyonu, perinatal ve mesleki bulaş da rol oynayabilmektedir (21).

Tablo 1. Türkiye'de HCV bulaşı açısından risk faktörleri (23)

Risk Faktörü	Prevalans
Ameliyat	%98
Kan transfüzyonu	%39.7
Dental prosedür	%27.5
Kürtaj	%21.2
Uzun süre hastanede kalma	%11.6
Hemodiyaliz	%10
Sarılık geçirmiş olmak	%4.6
İntravenöz ilaç kullanıcısı olmak	%3.1
Şüpheli cinsel ilişki	%1.5
Manikür/pedikür	%1.2
Mesleksel bulaş	%0.9
Dövme	%0.6
Akapunktur	%0.6
Toplu sünnet	%0.3
Perkutan iğne batması	%0.3

2.1.5. HCV Klinik Özellikleri

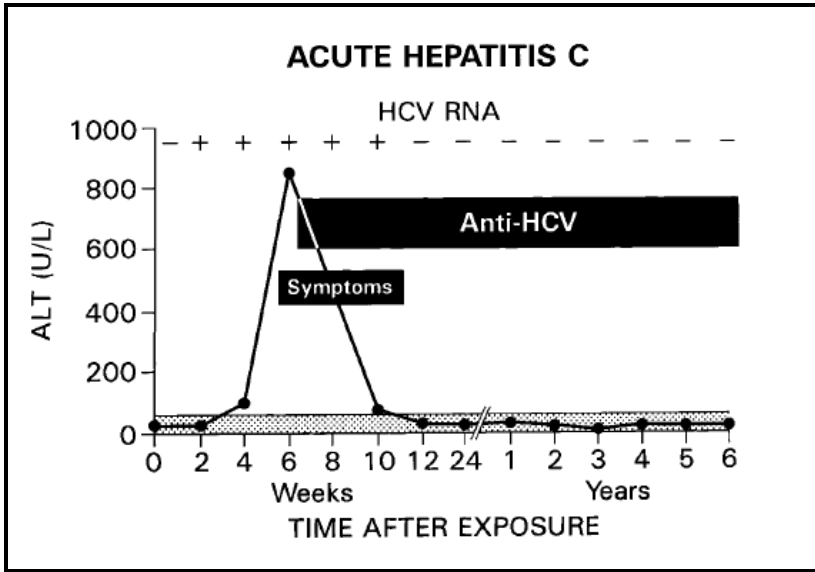
2.1.5.1. Akut Hepatit C

Akut HCV infeksiyonları genellikle asemptomatiktir. Bu yüzden “sessiz hastalık” olarak da adlandırılmaktadır (7). Hastalığın ortalama inkübasyon süresi yedi hafta

kadardır. Klinik belirti gösteren olgularda halsizlik, bulantı, sağ üst kadranda ağrı, koyu renkli idrar ve sarılık gibi klasik hepatit belirtileri gözlenir (24).

Bulaştan 1-2 hafta sonra HCV RNA serumda tespit edilebilir duruma gelir. Serumdaki HCV RNA seviyesi 10^6 - 10^8 genom/ml'ye kadar artar. Birkaç hafta sonra serum alanin aminotransferaz (ALT) enzimi seviyelerinde belirgin bir yükselme meydana gelir. Klinik belirtiler bu safhadan sonra gözlenebilir (Şekil 6) (24). Akut enfeksiyon sırasında ALT seviyeleri nadiren 1000 IU/ml'nin altına iner (25).

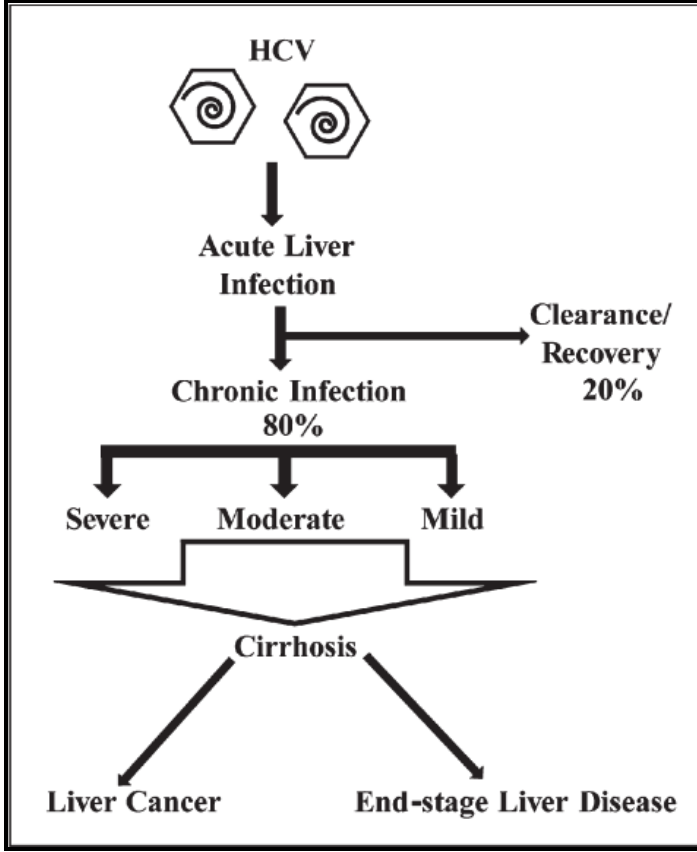
Akut HCV kendini sınırlayabilen bir hastalıktır. Akut HCV'li hastaların %10-25'i virusu spontan olarak temizleyebilirler. Virusu temizleyemeyen çoğu olguda akut enfeksiyon, kronik hale döner (1). Akut HCV'nin kronik hale dönmesinde, enfeksiyonun erken safhalarında klinik belirti göstermemesinden dolayı tedavi edilememesi de etkili olmaktadır (7).



Şekil 6. Akut HCV enfeksiyonu sırasında viral göstergelerin seyri (24)

2.1.5.2. Kronik Hepatit C

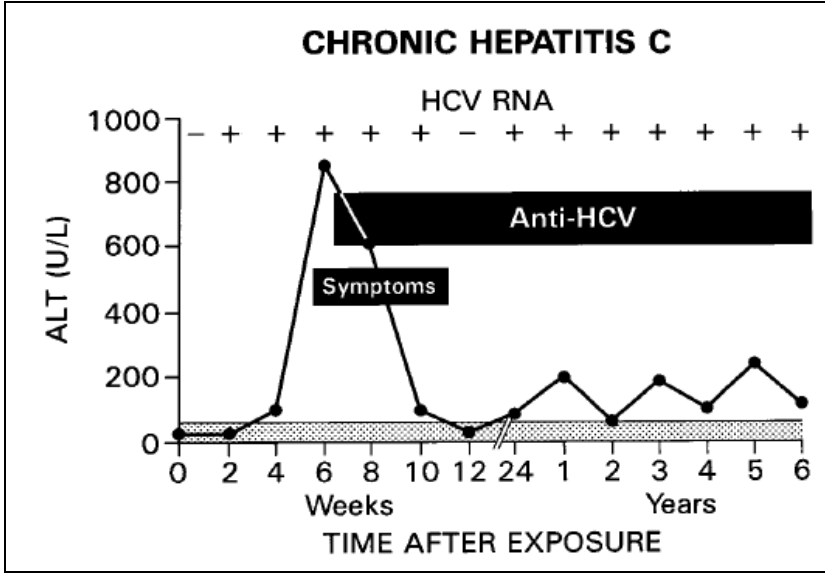
Akut HCV vakalarının %85'i kronik HCV'ye dönüşmektedir (Şekil 7). Bunun nedeni tam olarak bilinmemekle birlikte HCV'nin türümsülerinin ve değişime elverişli bir zarf genine sahip olmasının rol oynadığı düşünülmektedir. Böylece konak immün yanıtından rahatlıkla kaçabilmektedir (24).



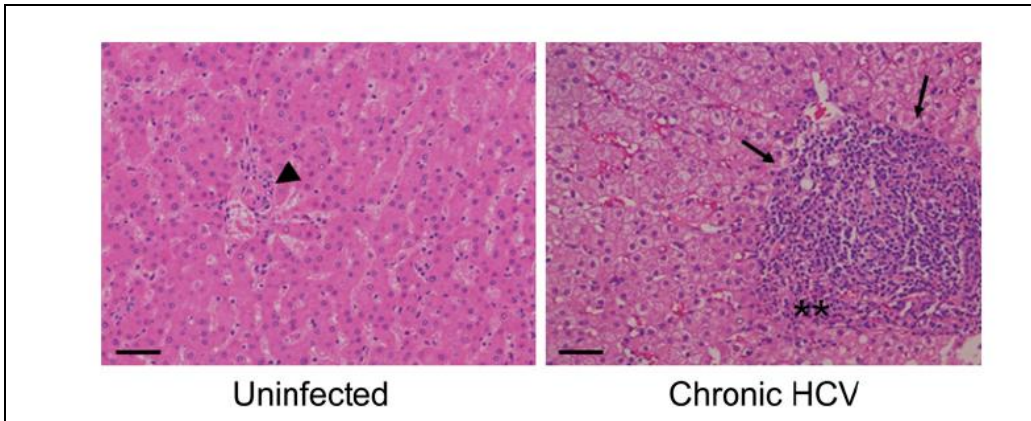
Şekil 7. HCV infeksiyonunun doğal seyri

Kronik HCV'li hastalarda da semptomlar az veya hafif görülmektedir. En sık karşılaşılan belirti yorgunluktur. Bunun dışında kaşıntı, iştahsızlık, mide bulantısı, sağ üst kadranda ağrı gibi semptomlar da gözlenebilir (24).

Kronik Hepatit C'de ALT enzimleri normal seviyenin 1,5-10 katı kadar artar ancak arada normal sınırlara da düşebilir (Şekil 8) (24). ALT enzim seviyesinin yüksekliği ile karaciğer hasarının derecesi arasında bir bağlantı bulunmamaktadır (Şekil 9) (8). Kronik HCV'li olguların %20'sinde 10-20 yıl içerisinde siroz gelişebilmektedir.



Şekil 8. Kronik HCV infeksiyonu sırasında viral göstergelerin seyri (24)



Şekil 9. Kronik HCV infeksiyonunda karaciğer patolojisi örneği (1). Soldaki fotoğrafta normal karaciğer dokusu biyopsisinde, inflamatuvar hücre infiltrasyonu içermeyen, portal ven, safra kanalı ve hepatik arter içeren portal alan okla gösterilmektedir. Sağdaki fotoğrafta kronik olarak infekte karaciğere ait biyopside portal alandaki lenfosit infiltrasyonu oklarla gösterilmektedir. Yıldızlarla gösterilen kısımda ise inflamatuvar hücrelerin periportal alana yayılımı görülmektedir.

Karaciğer fibrozu için diğer belirgin risk faktörleri, HIV veya HBV ile koinfekte olmuş HCV infeksiyonudur. HIV/HCV koinfekte hastalarda karaciğer fibrozunun daha hızlı ilerlediğine dair birçok çalışma bulunmaktadır. Daha uzun süren ALT seviyesi yükseklikleri olmakta ve hepatoselüler karsinoma için risk artmaktadır. Avrupa'da

HIV ile infekte olan kişilerdeki HCV infeksiyonu prevalansı ortalama %40 civarındadır. Bu değer şehirlerde %50-90'a kadar çıkabilmektedir (26).

HBV/HCV koinfeksiyonu da bulaş yollarının ortak olması nedeniyle oldukça sık görülmektedir. Koinfeksiyon, HBV veya HCV ile tek başına infeksiyondan çok daha ciddi sorunlara yol açmaktadır. Siroz oluşma prevalansı daha yüksektir. HCV ile koinfeksiyonlu HBV yüzey antijeni (HBsAg) taşıyıcılarının prevalansı coğrafi bölgelere göre değişmekle beraber %3-18 arasındadır (27, 28, 29).

Yüksek miktarda alkol (günde 50 gram veya daha fazla) kullanımı da HCV replikasyonunu ve dolayısıyla karaciğer fibrozunu arttırmaktadır (26).

2.1.6. HCV Türümsüleri ve HCV'nin Ekstrahepatik Tutulumları

Virusun türümsüleri, infeksiyon sırasında ve konak immün sisteminden kaçışta avantaj sağlamaktadır. HCV'nin türümsü oluşturabilme yeteneği, konağın virus spesifik adaptif yanıtından kaçabilmek için, kendi yararına olan birçok mutasyon geçirebilmesini sağlamaktadır (11). Yapılan çalışmalar sonucunda, viral infeksiyonlardan korunmada ve iyileşmede önemli olan nötralize edici antikorların, HCV türümsülerine etkili olamadığı gösterilmiştir. Bu mekanizmanın, virusun kalıcı infeksiyon oluşturmada etkili olduğu düşünülmektedir (31, 32). HCV'nin kronik infeksiyon oluşturmada etkili olduğu düşünülen mekanizmalardan biri de, türümsü oluşumu sırasında meydana gelen mutasyonların peptid işlemlenmesini etkilediği ve bu şekilde de virusun CD8+ ve CD4+ T hücre lenfositleri tarafından tanınmasının engellenmesidir (33, 34). Bazı çalışmalar HCV türümsülerinin çeşitliliğinin, kronik infeksiyonun gidişini etkilediğini ve karaciğer hastalıklarının çeşitliliğini arttırdığını göstermektedir (35, 36).

HCV hepatositlere tropizm gösteren bir virus olmasına rağmen, başka anatomik bölgelerde de virus sekanslarına rastlanabilmektedir. *Flaviviridae* familyasına ait bir virus olduğundan, zarf yapısındaki tek bir aminoasit değişimi bile virusun hücre tropizmini ve virulansını etkileyebilmektedir (11, 30).

Ekstrahepatik olarak HCV'nin en fazla gözlendiği bölgeler kan hücreleri (periferik mononükleer kan hücreleri, PBMC), lenfoid dokular, merkezi sinir sistemi, dışkı, idrar, tükürük olarak belirtilmiştir. Ekstrahepatik bölgelerde HCV'nin replikasyon ara ürünü olan negatif iplikli RNA'ları gözlenebilmektedir ancak bu durum, söz konusu bölgelerde tam ve çoğalabilme yeteneğine sahip viruslerin varlığını kanıtlamakta yetersiz kalmaktadır (37). Yine de özellikle HIV-1 ile enfekte olan veya karaciğer nakli alan hastalar gibi immün sistemi zayıf olan bireylerde HCV replikasyonunun bu bölgelerde de gerçekleşebileceği düşünülmektedir.

HCV türümsülerinin araştırma sonuçları, virusun ekstrahepatik bölgelerde replikasyonunu destekler yöndedir (11). Filogenetik analizler sonucunda serumda, karaciğerde veya periferik kan mononükleer hücrelerinde virusun çok değişkenlik gösteren bölgeleri (HCV zarf E2 bölgesi) incelendiğinde elde edilen viral popülasyonlar arasında genetik farklılıklar olduğu gösterilmiştir (38).

Virusun karaciğer dışındaki bölgelerde de bulunabilmesi birçok açıdan önemlidir. HCV'nin tükürük ve idrar gibi non-parenteral yollarla bulaşının gerçekleşebileceği düşündüren çalışmalar vardır (39, 40, 41). Lenfositlerde HCV replikasyonu kanıtlanmıştır ve dışkıda HCV RNA varlığı ile ilişkisi olabileceği düşünülmektedir. Dışkıda ve safrada bulunabilen virus formunun enfeksiyöz olup olmadığı araştırılan konular arasındadır (42, 43).

Karaciğer nakli sonrasında HCV enfeksiyonunun tekrarladığı olgularda, enfeksiyona yola açan virusun nakil öncesinde saptanan virusle aynı veya çok yakın ilişkili bir virus olduğu belirlenmiş, çıkarılan karaciğerden saçılan virionların reenfeksiyona yol açtığı düşünülmüştür (44, 45). HCV'nin ekstrahepatik replikasyonunun enfeksiyonun kalıcılığını ve tekrarlama riskini artırıp arttırmadığı konusu tartışmalıdır (11).

2.1.7. HCV Enfeksiyonunda Tedavi ve Korunma

HCV tedavisindeki amaç; virus replikasyonunu inhibe etmek, karaciğerdeki lezyonları yavaşlatmak veya engellemek, karaciğer enzim parametrelerini normal

seviyeye getirmektir. Bu amaçla tedaviden sonraki yirmi dört hafta sonunda hasta serumunda saptanabilir HCV RNA (<50 IU/ml) bulunmaması hedeflenir (4, 46).

Akut HCV nedeniyle tedavi alan vakaların %15-45'inde uzun süreli komplikasyonlar gözlenmez (47). Ancak HCV enfeksiyonu akut fazdayken nadiren tanımlanabildiğinden, tedavisi genelde gerçekleştirilememektedir. Kronik HCV'li bütün hastalar, tedavi için uygun vakalardır (48).

Kronik HCV tedavisinde pegile interferon α (PEG-IFN) ve ribavirin kombinasyonunun 24-48 hafta boyunca kullanımı önerilmektedir (49). İnterferon alfa virüslere karşı oluşan doğal bağışık yanıtta rol oynayan bir sitokindir. Ribavirin ise geniş antiviral spektruma sahip bir guanosin analogudur. IFN ile sağlanan virolojik cevabı arttırmaktadır (48). Ribavirin ve PEG-IFN tedavisinin etkinliği %37-42 arasında değişmektedir (4). HCV tedavilerinde alınan cevap, genotipe bağımlı olarak değişmektedir (19). Genotip 2 ve 3'te bu antiviral ilaç kombinasyonu ile virüsün eradikasyon oranı %75-90 arasında değişirken, genotip 1 ve 4 enfeksiyonlarında bu oran %45-52'ye düşmektedir (48).

Daha kısa zamanda tedaviyi sağlayan, daha etkili, toleransı yükseltilmiş yeni ilaçların geliştirilmesi için çalışmalar devam etmektedir. En yeni tedavi stratejisi proteaz inhibitörlerinin (telaprevir ve boceprevir) , pegile interferon ve ribavirin ile kombine halde kullanıldığı üçlü tedavidir. Bu yöntemin HCV genotip 1 ile enfekte olmuş cevap alınamayan veya naif hastalarda kullanışlı olabileceği düşünülmektedir (46).

HCV'den korunmak için alınabilecek başlıca önlemler; donör kanlarında gerekli taramaların yapılması ve potansiyel risk taşıyan kanların elimine edilmesi, illegal ilaç enjeksiyonunun engellenmesi, steril şırınga ve iğnelerin kullanımının yaygınlaşması, HCV ile enfekte kişilerle korunmasız cinsel ilişkiye girilmemesi, dövme, akupunktur, piercing gibi işlemlerde steril aletlerin kullanılması olarak sayılabilir. Henüz HCV için koruyucu bir aşı bulunmamaktadır. Sağlam kişilerin ve HCV hastalarının hepatit A ve B'ye karşı aşılanmış olması, onları karaciğer hasarı yaratabilecek ek risklerden koruması açısından önerilir (19, 20). HCV'ye karşı aşı geliştirmek için çalışmalar devam etmektedir (49).

2.1.8. HCV İnfeksiyonunda Tanı

HCV infeksiyonunun tanısı, anti-HCV antikorlarının ve HCV RNA'nın saptanmasına dayanmaktadır (46).

Anti-HCV Testleri: İlk olarak 1990 yılında serumda anti-HCV antikorlarının saptanabilmesi için duyarlılığı %46 olan birinci nesil ELISA (EIA-1) yöntemi geliştirilmiştir. 1991'de duyarlılığı %60 olan ikinci nesil ELISA (EIA-2) ve %90 duyarlılıkla RIBA-2 (ikinci nesil rekombinant immunoblot assay) testleri geliştirilmiştir. İlerleyen yıllarda duyarlılığı ve özgüllüğü %99'a kadar çıkan üçüncü nesil ELISA'ların (EIA-3) geliştirilmesiyle günümüze gelinmiştir (4).

EIA-2, kor bölgesinden C22 ve yapısal olmayan bölgelerden C33 ve C100'den elde edilen rekombinant antijenlere karşı oluşan antikorları saptamaktadır. EIA-3 yönteminde duyarlılığın ve özgüllüğün artması, bu bölgelere ek olarak yapısal olmayan bölge 5 (NS5)'ten elde edilen rekombinant antijenin de eklenmiş olmasından kaynaklanmaktadır (50).

RIBA-2 testi ise C22, C33, C100 ve C100 ile üst üste binen 5-1-1 rekombinant antijenlerine karşı oluşan antikorları saptamaya yöneliktir. RIBA-3, RIBA-2'ye ek olarak NS5, kor bölgesinden sentetik peptidler ve NS3 antijenlerine karşı oluşan antikorları da taramaktadır. Böylece yöntemin duyarlılığı yükseltilmiştir. Ancak RIBA'nın pozitif bulunması süregelen bir HCV infeksiyonunun göstergesi değildir. Çünkü infeksiyon geçirildikten sonra bile HCV antikorları yıllarda saptanabilmektedir (50).

Serolojik testler kan donörlerinin taranmasında veya klinik bulgu gösteren hastalarda HCV infeksiyonunun tanısında kullanılan testlerdir (Tablo 2) (51).

HCV RNA Yöntemleri: HCV RNA'nın araştırılmasını gerektiren durumlar; serokonversiyon öncesinde şüpheli akut hepatit C infeksiyonunun araştırılması, seronegatif hastalarda şüpheli kronik hepatit C infeksiyonu araştırılması, RIBA testinde sonucun belirsiz olması durumunda aktif infeksiyonun araştırılması, tedavi alan hastaların izlemlerinin yapılması, yüksek riskli bir kaynaktan mesleksi bulaşa

maruz kalma durumunda hepatit C infeksiyonunun araştırılması, plazma ürünlerinin güvenilirliğinin kontrol edilmesidir (51).

Hepatit C nükleik asidinin araştırılması, sıklıkla polimeraz zincir tepkimesi (PZT) olarak adlandırılan yöntemle gerçekleştirilmektedir. Kalitatif ve kantitatif olacak şekilde yapılabilir. Kalitatif PZT viral yük hakkında bilgi vermez, sadece tarama amaçlı kullanılabilir. Kantitatif PZT ile viral yük saptanabildiğinden tedavi alan hastalarda tedavi başarısının izlemi kolaylıkla gerçekleştirilebilmektedir (52).

Polimeraz Zincir Tepkimesi ile ilgili ayrıntılı bilgi 2.2 başlığı altında anlatılacaktır.

Genotipleme: Hepatit C virusunun genotipinin bilinmesi, tarama çalışmaları ve tedavinin düzenlenmesi açısından önemlidir. Ancak genotipleme yöntemi ile HCV infeksiyonu tanısının doğrulanması yapılamaz (50).

HCV genotipleri restriksiyon enzim analizi ("restriction fragment length polimorfizm", RFLP) nükleotid sekans analizi veya genotip spesifik oligonükleotit problemlerle ters hibridizasyon yöntemleri kullanılarak saptanabilmektedir. Genotip bir kez belirlendikten sonra, testin tekrar edilmesine gerek yoktur (47, 52).

Karaciğer Biyopsisi: Karaciğer biyopsisi, Hepatit C enfeksiyonu rutin tanısında kullanılan bir yöntem değildir. HCV ile enfekte olduğu belirlenen bireylerde karaciğerde oluşan inflamasyonun derecesini değerlendirmek ve oluşan fibrozun miktarını belirlemek için kullanılan bir işlemdir, bu amaçla altın standart olarak kabul edilir (8,50).

Tablo 2. Hepatit C infeksiyonunda tanı testlerinin kullanımı (8)

Kategori	Tanı Testleri			
	Anti-HCV ELISA	Anti-HCV RIBA	HCV RNA	ALT
Kronik Hepatit C	Pozitif	Pozitif	Pozitif	Yüksek
İyileşmiş HCV Enfeksiyonu	Pozitif	Pozitif	Negatif	Normal
Yalancı Pozitif Anti-HCV	Pozitif	Negatif	Negatif	Normal

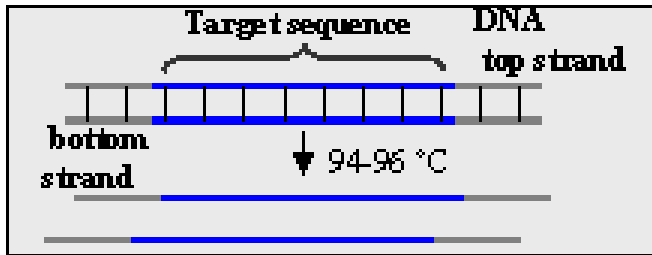
2.2 Polimeraz Zincir Tepkimesi (PZT)

Polimeraz zincir tepkimesi ("polymerase chain reaction", PCR), 1980'lerde Kary Mullis tarafından geliştirilmiş *in vitro* olarak spesifik DNA parçalarının kopyalarının enzimatik şekilde hızlıca sentezlenmesini sağlayan bir yöntemdir (53, 54).

PZT'nin gerçekleştirilebilmesi için çoğaltılması istenilen hedef DNA parçası, ısıya dayanıklı bir DNA polimeraz enzimi (sıklıkla *Thermus aquaticus*'tan elde edilen *Taq* DNA polimeraz enzimi) (55), hedef DNA parçasına özgü primerler (sense ve antisense) ile adenin, guanin, timin ve sitozinin tek ünitelerini içeren deoksinükleotit trifosfatlar (dNTPs) gereklidir (54).

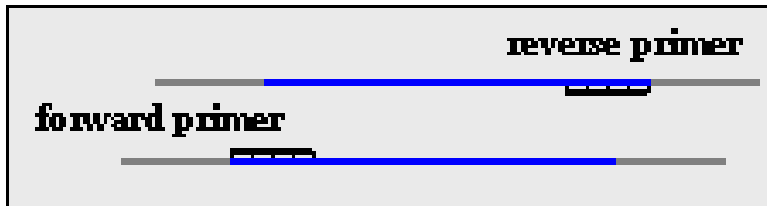
PZT denatürasyon, bağlanma ve uzama olmak üzere üç aşamadan oluşan bir reaksiyondur.

Denatürasyon: Çift iplikli DNA'nın 94-95°C'ye kadar ısıtılması ile ipliklerin birbirinden ayrılması, böylece primerlerin bağlanması için uygun hale geldiği aşamadır (Şekil 10) (56).



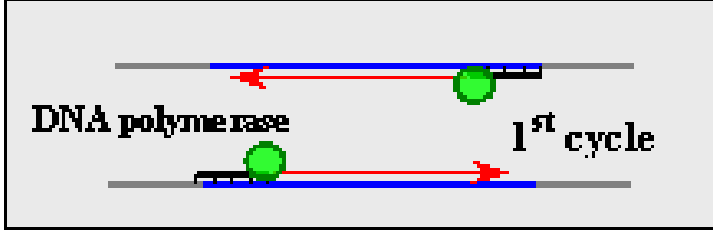
Şekil 10. Polimeraz zincir tepkimesinde denaturasyon aşaması (54)

Primer bağlanması ("Annealing"): Reaksiyon karışımı 50°C'ye kadar soğutulur. Primerler tek iplikli DNA üzerinde kendilerine uygun olan bölgelere bağlanırlar (Şekil 11) (56).



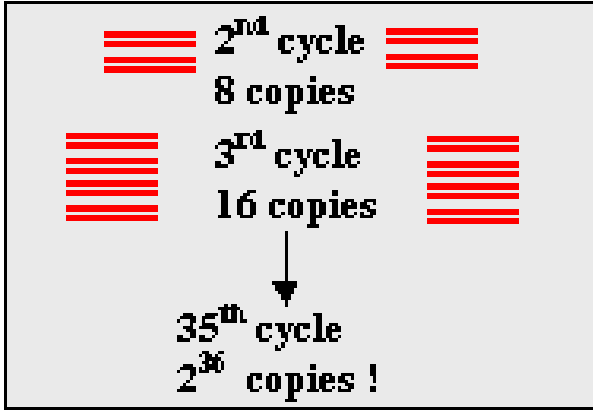
Şekil 11. Polimeraz zincir tepkimesinde öncül bağlanması aşaması (54)

Zincir uzaması (“Elongation”): Karışımın sıcaklığı 72°C’ye çıkartılır. Bu sıcaklık, DNA polimeraz enziminin çalışması için optimum değerdir. Polimeraz enzimi ile katalize edilen reaksiyon, ortamda bulunan tampon ve Mg^{+2} ’nin de yardımıyla nukleotitlerin primerlerin 3’ ucundan başlayarak DNA’nın uygun bölgesine komplementer olacak şekilde birbirlerine bağlanmalarını sağlar. Böylece yeni ipliklerin sentezi gerçekleşir (Şekil 12) (56).



Şekil 12. Polimeraz zincir tepkimesinde zincir uzaması aşaması (54)

Üç farklı ısıda gerçekleşen basamaklar bir döngüyü oluşturur. Her bir döngü, hedefin sayısının iki katına çıkmasını sağlamaktadır. Yaklaşık 30 döngü sonunda bir milyon hedef DNA parçası elde edilmiş olunur (Şekil 13) (56).



Şekil 13. Polimeraz zincir tepkimesinde döngülerin ilerleyişi (54)

PZT çeşitleri; hot start PZT, ters transkriptaz PZT, kantitatif PZT, multipleks PZT’dir (57). Klasik PZT yöntemleri, DNA’yı hedef alıp çoğaltılmasını ve daha sonra elde edilen ürünün görüntülenmesi esasına dayanırken, ters-transkriptaz PZT yöntemindeki hedef RNA’dır (58). Hepatit C virusu de bir RNA virusu olduğundan, ters-transkriptaz PZT ayrıntılı olarak anlatılacaktır.

2.2.1.Ters (“ Reverse”) Transkriptaz PZT (RT-PZT)

Ters transkriptaz, viral RNA'dan DNA elde etmek için kullanılan bir enzimdir. İnsan immun yetmezlik virusunun içinde bulunduğu retroviruslar (HIV) ve hepatit B virusunda doğal olarak bulunmaktadır. Enzim yardımıyla DNA'ya dönüştürülen viral RNA, konak genomuna entegre olabilir hale gelir. Laboratuvarda ise ters transkriptaz enzimi, viral RNA'dan komplementer DNA (cDNA) oluşturulmasını sağlayarak PZT uygulamalarında kullanılmaktadır (55).

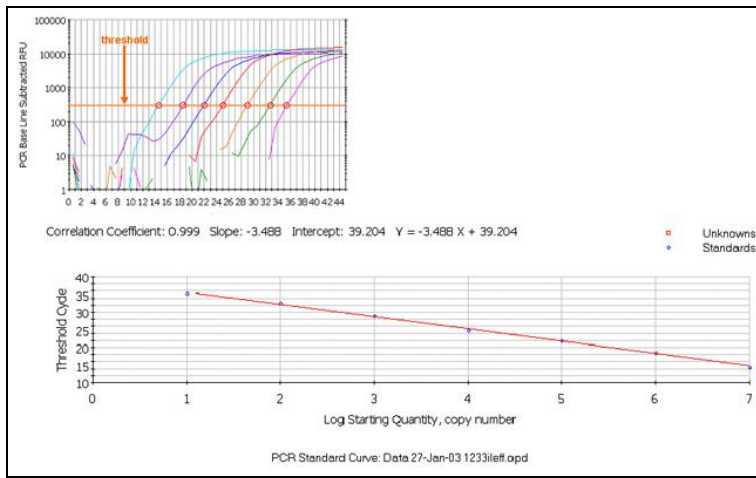
2.2.2. İzlenebilir (“Real-Time”) PZT

Gerçek zamanlı olarak DNA amplifikasyonunun izlenmesini sağlaması açısından önemlidir. Bu izlem, PZT'ye eklenen çeşitli boyalar veya işaretli probalar ile sağlanmaktadır (55). Real-time PZT için kullanılan ısı döngü cihazlarında bulunan optik kısım, boyalardan elde edilen floresan işaretin amplifikasyon boyunca izlenebilmesini sağlar. Böylece işlem sonrası ürün saptama basamağına gerek kalmaz ve ek basamakların yol açabileceği hatalar önlenmiş olur (59). Real-time PZT'de en sık kullanılan üç prob çeşidi: 5' nükleaz (TaqMan probe), moleküler “beacon” ve hibridizasyon probalarıdır (60).

Real-time PZT, kalitatif olarak da kullanılabilmeyle beraber özellikle kantitatif nükleik asid saptama amacıyla kullanılan bir yöntemdir. Geniş bir aralıkta kantitasyon yapabilmemesi, duyarlılığının yüksek olması, küçük hacimlerde bile çalışabilmesi avantajlarıdır. Ortalama varyasyon %1-2 arasında olduğundan, testin tekrarlanabilirliği (kesinliği) oldukça yüksektir. Hızlı bir yöntemdir ve kapalı bir sistem olduğu için kontaminasyonu riski düşüktür (61).

Real-time PZT yönteminde göreceli (rölatif) veya mutlak (absolü) kantitasyon yapılabilir. Her iki yöntemde de içerdiği nükleik asid sayısı belli standartlar kullanılır. Göreceli kantitasyonda hedef ile aynı tüpte reaksiyona giren iç kantitasyon standartları kullanılırken, mutlak kantitasyonda, standartların örneklerden ayrı çalışılması ile elde edilen dış kantitasyon eğrisi kullanılır. Her iki yöntemde de reaksiyon sonucu elde edilen Ct değerleri ile kullanılır. Real-time PZT yönteminde

sinyal, her PZT döngüsünde okunur ve bir bilgisayar programı yardımıyla izlenir. Böylece sinyalin, eşik değeri aştığı döngü (“threshold cycle”, Ct), reaksiyon plato fazına ulaşmadan belirlenir. Örnek içindeki nükleik asid sayısı ne kadar fazla ise, sinyal, eşik değeri o kadar erken bir döngüde aşar, yani Ct değeri düşük olur. Mutlak kantitasyonda nükleik asid miktarının belirlenmesi, dış standartlar ile elde edilen Ct sayısı ile bunun $\log_{10}$ nükleik asid karşılığını gösteren grafik kullanılarak yapılmaktadır (Şekil 14). Elde edilen linear grafikte korelasyon katsayısının 1 veya bire yakın olması istenir. İyi optimize edilmiş bir testle en az yedi - sekiz $\log_{10}$ 'luk aralıkta kantitasyon yapılabilir (61).



Şekil 14. İzlenebilir kantitatif PZT yönteminde standart eğri eldesi. Standartlardan elde edilen amplifikasyon eğrilerinin, eşik değeri aştığı siklus sayıları (Ct) belirlenir. Ct – nükleik asid miktarı eğrisi oluşturulur (62).

PZT yönteminin avantajlarının yanında sınırlılıkları da vardır. Bazı biyolojik örneklerde bulunan inhibitörlerden oldukça etkilenmektedir. Ters transkriptaz PZT ile birleştirilerek kullanılan Real-Time PZT'lerde, hedef RNA'nın saflığı da önemli bir konudur. Elde edilen RNA kaliteli olmalı, içerisinde DNA barındırmamalı ve uzun saklama süreleri boyunca degrade olmaması için nukleazlar içermemelidir (55, 63, 64).

Real-Time PZT, viral, bakteriyel veya fungal patojenlerin tanısı ve kantitasyonunda, erime ısısı analizleriyle mutasyonların saptanmasında, DNA

microarray sonuçlarının doğrulanmasında, gen ekspresyonunun kantitasyonunda, hastalık spesifik belirteçlerin saptanmasında kullanılabilen bir yöntemdir (55, 65).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Araştırmanın Tipi:

Deneysel bir araştırmadır.

3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı:

Çalışma, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıbbi Mikrobiyoloji AD'da gerçekleştirildi, Merkez Laboratuvar Moleküler Mikrobiyoloji Bölümü'nde bulunan bazı cihazlardan yararlanıldı. Araştırma Mart 2012-Haziran 2012 tarihleri arasında yapıldı.

3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi/Çalışma Grupları:

Tedavi naif veya klasik tedaviye yanıt vermeyen ve son bir yıldır tedavi almayan kronik HCV enfeksiyonu olan hastalar çalışmaya dahil edildi. Son bir yıl içinde interferon ve/veya ribavirin almış olmak, HCV'nin yanı sıra HBV, HDV, HIV (bir veya birkaçı) ile enfekte olmak dışlanma kriteri olarak kabul edildi.

Hastalardan bir kez olmak üzere alınan örnekler şunlardır:

- 10 ml EDTA'lı kan,
- Sabah kahvaltı öncesi, steril kap içine tükürmek suretiyle toplanan en az 2 ml tükürük,
- Sabah idrarı (en az 2 ml)
- Dışkı

Örnekler, kan örneği ile aynı gün veya +/- iki gün içinde alındı ve alındığı gün laboratuvara ulaştırıldı. Laboratuvarda alikotlanan örnekler, çalışma gününe dek -80°C'de saklandı.

3.4. Çalışma Materyali:

Çalışmada 15 kronik Hepatit C hastasından alınan plazma, tükürük, idrar ve dışkı örnekleri kullanıldı.

3.5.Araştırmanın Değişkenleri:

Çalışmanın bağımsız değişkeni farklı vücut kompartmanlarında (plazma, tükürük, idrar, dışkı), bağımlı değişkeni ise plazmada saptanan HCV RNA miktarıdır. Çalışma, plazma örneklerindeki HCV RNA'sı pozitif olan hastalarda yapıldığından, plazma örnekleri çalışmanın kontrolünü oluşturmaktadır.

3.6. Veri Toplama Araçları

3.6.1. Kullanılan gereç ve sarf malzemeleri

1. EZ-1 Virus Mini Kit (Qiagen 955134)
2. Buffer ATL (Qiagen, Almanya) (Cat. No. 19076)
3. Buffer ASL (Qiagen, Almanya) (Cat. No. 19082)
4. QIAGEN QIAamp® Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Almanya) (Cat. No. 52904)
5. Artus HCV RG RT-PCR Kiti (Qiagen, Almanya) (Cat. No. 4518263)
6. Etanol
7. Kloroform
8. PBS (Phosphate buffered saline)
9. Saf su
10. Bovin Serum Albumin (BSA)

%2'lik BSA stok solüsyonu hazırlama;

100 ml PBS içerisine hassas terazi ile tartılarak 2 gram BSA eklendi. BSA'nın PBS içerisinde iyice çözünmesi sağlandı. Solüsyonun bulunduğu kabın etrafı folyo ile sarılarak ışıktan korundu ve +4°C'de saklandı.

11. Setil trimetilamonyum bromid (CTAB)

1 M NaCl içerisinde %6'lık CTAB stok solüsyonu hazırlama:

100 ml saf su içerisine 5,85 gram NaCl ve 6 gram CTAB eklenerek, iyice karıştırıldı. Solüsyonun bulunduğu kabın etrafı ışık almaması için folyo ile kaplandı ve +4°C'de saklandı.

12. Etidyum Bromid (100 ml)

100 mg/ml stok solüsyonu hazırlama;

Bir gram etidyum bromid, 100 ml H₂O içerisine eklendi. İyice çözünmesi sağlandı. Elde edilen karışım +4°C'de saklandı.

13. 10 x Tris-Borik Asit-Edta (10 x TBE) (1 litre):

108 gram Tris ve 55 gram borik asit, 900 ml içerisinde çözülür. 40 ml 0,5 M Na₂EDTA (pH 8.0) eklenir ve toplam hacmi su ile 1 litreye tamamlanır. Elde edilen karışım oda sıcaklığında muhafaza edilir.

14. 10 x Fosfat Buffer Saline (10 x PBS) (1 litre):

80 gram NaCl, 2 gram KCl, 26,8 gram Na₂HPO₄-7H₂O ve 2,4 gram KH₂PO₄, 800 ml H₂O içerisinde çözülür. Gereken miktarda HCl eklenerek pH 7.4'e ayarlanır. Toplam hacmi su ile 1 litreye tamamlanır. Elde edilen karışım alikotlanır ve otoklavlanarak steril hale getirilir. Oda sıcaklığında muhafaza edilir.

3.6.2. Yöntem

3.6.2.1. Real-Time Reverse Transkriptaz PZT Optimizasyonu

Çalışmada kullanılan ticari real-time PZT testi serum / plazma örnekleri için valide edilmiştir. Çalışmamızda üretici firmanın plazma/serum için yaptığı önerilerden farklı olarak plazma dışı örneklerin ekstraksiyonunda da kullanılabilecek (ve aynı üreticiye ait) bir ekstraksiyon kiti (QIAGEN QIAamp® Viral RNA Mini Kit) tercih edilmiştir. Üretici firma ile görüşülmüş ve kullanılan ekstraksiyon kiti ile kombine edildiğinde RT-PZT kitinin plazma için yakalama alt sınırının yaklaşık 300 IU/ml olduğu öğrenilmiştir. Bu testin tükürük, idrar ve dışkı örneklerinde kullanılabilmesi için nükleik asid ekstraksiyon aşamasında sınırlılıklarının belirlenebilmesi ve en uygun

yöntemin seçilebilmesi için farklı yöntemlerin denenmesine gereksinim duyulmuştur. Optimizasyon için, anti-HCV antikorları negatif bireyden alınan tükürük, idrar ve dışkı örnekleri, HCV RNA'sı pozitif olduğu bilinen bir plazma örneği ile karıştırılarak bilinen HCV RNA yüküne sahip örnekler elde edildi. Her bir örnek tipi için farklı ön işlem ve ekstraksiyon yöntemleri uygulanarak, inhibisyonunun saptanmadığı duyarlılığı en iyi yöntem seçildi. Karşılaştırmalar için HCV RNA ve internal kontrol (İK) RT-PCR sonucu elde edilen Ct değerleri kullanıldı.

3.6.2.2. HCV RNA Ekstraksiyonu

3.6.2.2.1. Tükürük Örnekleri

Örnekler oda ısısına getirildi.

Kullanılan ekstraksiyon yöntemleri:

Yöntem 1. Doğrudan örnekten EZ-1 Virus Mini Kit prosedürü ile ekstraksiyon yapıldı (66).

Yöntem 2. Doğrudan örnekten QIAamp Viral RNA Mini Kit Spin Kolon prosedürü ile ekstraksiyon yapıldı (66).

Yöntem 3. Örneğin anti-HCV negatif olan bireyden alınmış tükürük örneği ile 1/2'lik ve 1/10'luk seyreltmelerinden sonra QIAamp Viral RNA Mini Kit Spin Kolon prosedürü ile ekstraksiyon yapıldı (66).

3.6.2.2.2. İdrar Örnekleri

Örnekler oda ısısına getirildi.

Kullanılan ekstraksiyon yöntemleri:

Yöntem 1. Doğrudan örnekten EZ-1 Virus Mini Kit prosedürü uygulandı (66).

Yöntem 2. Örneğin kloroform ile ön muamelesinden sonra EZ-1 Virus Mini Kit prosedürü uygulandı (66). Kloroform ile ön işlemden sonra, 300 µl idrar örneğinin üzerine

300 µl kloroform eklendi, vortekslendi. 12000 rpm'de 1 dakika santrifüjlendi. 140 µl supernatant ile ekstraksiyon işlemine başlandı.

Yöntem 3. Örneğin kloroform ile ön işleminden sonra QIAamp Viral RNA Mini Kit Spin Kolon yöntemi (66) ile ekstraksiyonu yapıldı ve elde edilen elüatın doğrudan ve 1/2'lik seyreltmesi ile PZT uygulamasına başlandı.

3.6.2.2.3. Dışkı Örnekleri

Örnekler oda ısısına getirildi. Yöntem 1'de 200 mg, diğer yöntemlerde ise 1 gr dışkı örneği kullanıldı.

Kullanılan ekstraksiyon yöntemleri;

Yöntem 1. Dışkı örneğine 1800 µl Buffer ASL eklendi, vortekslendi. Elde edilen karışım 10 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. Elde edilen supernatant 70°C'de 10 dakika inkübe edildi. Ekstraksiyon işlemi EZ-1 Virus Mini Kit prosedürü ile gerçekleştirildi (66).

Yöntem 2. Dışkı örneği %0,89'luk NaCl içerisinde çözüldükten sonra 0,22 µm'lik filtreden geçirilip elde edilen filtrat ile QIAamp Viral RNA Mini Kit prosedürünün uygulandı (66).

Yöntem 3. Dışkı örneği, 700 µl kloroform ile karıştırıldı. Karışım 12000 rpm'de 1 dakika santrifüjlendi. Supernatanttan 1000 µl alındı ve 4000 µl %0,89'luk NaCl ile muamele edildi. Karışım 4000xg'de 20 dakika santrifüjlendi. Supernatant 0,22 µm'lik filtreden geçirildi. Elde edilen filtratın ekstraksiyonu QIAamp Viral RNA Mini Kit prosedürü (66) ile gerçekleştirildi.

Yöntem 4. PBS içerisinde dışkı örneğinin çözülmesinden sonra 60°C'de 5 dakika inkübasyona bırakılıp 4000xg'de 20 dakika santifüjlenmesinden sonra elde edilen supernatant ile, QIAamp Viral RNA Mini Kit prosedürü (66) uygulandı.

Yöntem 5. Dışkı örneğinin PBS içerisinde çözülmesinden sonra 60°C'de 5 dakika inkübasyona bırakılıp 4000xg'de 20 dakika santrifüjü ile elde edilen supernatant, 0,22

μm 'lik filtreden geçirildi. Filtrat ile QIAamp Viral RNA Mini Kit prosedürü (66) uygulandı.

Yöntem 6. Dışkı örneklerinin üzerine 500 μl %2'lik BSA (67, 68) eklendi. Toplam hacim 5 ml olacak şekilde, üzerine 4500 μl PBS eklendi, vortekslendi. Dışkı partiküllerinin PBS ve BSA karışımı içerisinde iyice çözülmesi sağlandıktan sonra, 4000xg'de 20 dakika boyunca santrifüjlendi. Elde edilen supernatant, 0,22 μm 'lik filtreden geçirildi. Ekstraksiyon işlemi QIAamp Viral RNA Mini Kit prosedürü (66) ile gerçekleştirildi. Bu yöntemin 1/2'lik ve 1/10'luk seyreltileri kullanıldı.

Yöntem 7. Ekstraksiyon aşamasından önce dışkıya 1 M NaCl içerisinde çözünmüş %6'lık CTAB ve %2'lik BSA eklendi. Ekstraksiyon için QIAamp Viral RNA Mini Kit prosedürü (66) uygulandı. Bu yöntemin 1/2'lik ve 1/10'luk seyreltileri kullanıldı (69, 70).

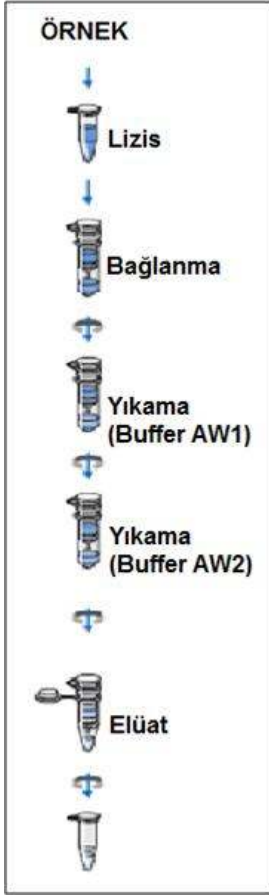
Yöntem 8. Ekstraksiyon aşamasından önce dışkının buffer ASL ile muamele edilmesi, %2'lik BSA eklenmesinden sonra QIAamp Viral RNA Mini Kit (66) ile ekstraksiyon yapılması denendi.

3.6.2.2.4. QIAamp Viral RNA Mini Kit Spin Kolon Yöntemi

Plazma, tükürük, idrar ve dışkı örneklerinin ekstraksiyonu, QIAamp Viral RNA Mini Kit Spin Kolon kullanılarak üreticinin önerileri doğrultusunda gerçekleştirildi (66).

1. Bir buçuk mililitrelik boş bir tübe, 560 μl Buffer AVL konuldu. Üzerine 5,6 μl carrier RNA ve 6 μl internal kontrol eklendi.
2. Hazırlanan karışımın üzerine 140 μl plazma/tükürük/iddar/dışkı örneği (veya yukarıda tanımlanan ön işlemlerden elde edilen ürün) eklendi. Vortekslendi.
3. On dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Tüpler kısaca santrifüjlendi.
4. Karışımın üzerine 560 μl etanol eklendi, vortekslendi. Tüpler kısaca santrifüjlendi.

5. Elde edilen karışımdan 630 µl alınıp, 2 ml'lik filtreli QIAamp Mini Spin kolonu'na aktarıldı. Kolonun kapağı kapatılıp 8000 rpm'de 1 dakika santrifüjlendi.
6. Kolon, 2 ml'lik temiz bir tübe aktarıldı. Filtratı içeren tüp atıldı. Kolona, 500 µl Buffer AW1 eklendi. Kolonu içeren tüp, 8000 rpm'de 1 dakika santrifüjlendi.
7. Kolon, 2 ml'lik temiz bir tübe aktarıldı. Filtratı içeren tüp atıldı. Kolona, 500 µl Buffer AW2 eklendi. Kolonu içeren tüp, 14000 rpm'de 3 dakika santrifüjlendi.
8. Kolon, 2 ml'lik temiz bir tübe aktarıldı. Filtratı içeren tüp atıldı. Kolonu içeren tüp, 14000 rpm'de 1 dakika santrifüjlendi.
9. Kolon, 1,5 ml'lik temiz bir tübe aktarıldı. Filtratı içeren tüp atıldı. Kolona, oda sıcaklığındaki buffer AVE'den 60 µl eklendi. Oda sıcaklığında 1 dakika inkübe edildi. .
10. İnkübasyondan sonra kolonu içeren tüp 8000 rpm'de 1 dakika santrifüjlendi.
11. Santrifüj sonunda, kolon atıldı. Tüp içerisinde toplanan, elüat, çalışma gününe kadar -80°C'de saklandı.



Şekil 15. QIAamp Viral RNA Mini Kit Spin Kolon yöntemi basamaklarının şematik gösterimi (66)

3.6.2.3. Real Time RT-PZT Protokolü

Ekstraksiyonu yapılan serum, tükürük, idrar ve dışkı örneklerinden elde edilen elüatların real time RT-PZT uygulamaları, Artus HCV RG RT-PCR Kit'i kullanılarak Rotor-Gene 3000 (Corbett Research, Avusturalya) real-time PZT cihazında gerçekleştirildi. Prosedür, üretici firma önerileri doğrultusunda uygulandı (66).

Artus HCV RG RT-PCR Kit Protokolü

1. Örnek başına Hepatit C Virus RG Master A'dan 12 µl, Hepatit C Virus RG Master B'den de 18 µl içermek üzere toplam hacmi 30 µl olan bir master miks hazırlandı.

2. Hazırlanan master mikslerin üzerine, ekstraksiyon aşamaları sonucunda elde edilmiş plazma/tükürük/idrar/dışkı elüatlarından 20 µl eklendi. Böylece PZT'ye giren toplam hacim 50 µl olmaktadır.
3. PZT için hazırlanan örnekler, Rotor-Gene 3000 real-time PZT cihazına yerleştirildi ve amplifikasyon gerçekleştirildi.

Her bir PZT uygulamasında, amplifikasyonu yapılacak örneklerin dışında 1 negatif kontrol ve 4 kantifikasyon standardı çalışmaya eklendi. Negatif kontrol olarak saf su kullanıldı. Kantifikasyon standardı olarak Artus HCV RG RT-PCR Kiti içerisinde bulunan standartlar kullanıldı. PZT sırasında standartların eklenmesi, Rotor-Gene 3000 cihazında standart eğrilerin oluşturulabilmesi için gereklidir. Standartların HCV IU/ml miktarlarını hesaplamada, aşağıdaki formül kullanıldı;

$$\text{SONUÇ (IU/ml)} = \frac{\text{Sonuç (IU/µl)} \times \text{Elüsyon hacmi (µl)}}{\text{Örnek hacmi (ml)}}$$

3.6.2.4. HCV Genotipleme Yöntemi

Yöntemin basamakları sırası ile komplementer DNA (cDNA) sentezlenmesi, cDNA'nın nested PZT ile çoğaltılması, ampliconların agaroz jel elektroforezinde saptanması ve Restriksiyon Enzim Analizi (REA) ile değerlendirilmesidir.

3.6.2.4.1. cDNA Eldesi

1. Boş bir tübe 2 µl P209 primeri konulup üzerine çalışılması istenilen örneğin ekstraksiyonu sonucu elde edilmiş elüattan 5 µl eklendi.
2. Elde edilen karışım 70°C'de 5 dakika inkübasyona bırakıldıktan sonra, buzda 3 dakika boyunca bekletildi.

3. Ayrı bir tüpte çalışılacak örnek başına 4 µl 5xbuffer, 5 µl dNTP (4mM), 0,5 µl RNase inhibitörü, 1 µl ters transkriptaz enzimi, 2,5 µl distile H₂O eklendi, vortekslendi.
4. Elde edilen 13 µl'lik karışıma, buzdan alınan örnekten 7 µl konuldu, vortekslendi.
5. Hazırlanan karışım, termal cycler cihazına kondu. cDNA eldesi 42°C'de bir saat ve 72°C'de on dakikalık bir döngü ile gerçekleştirildi.

3.6.2.4.2. Nested PZT

Nested PZT uygulamasında kullanılan primer dizileri (71);

Dış Primerler:

P209: ATA CTC GAG GTC CAC GGT CTA CGA GAC CT

P939: CTG TGA GGA ACT ACT GTC TT

İç Primerler:

P211: CAC TCT CGA ACA CCC TAT CAG GCA GT

P940: TTC ACG CAG AAA GCG TCT AG

Nested PZT Birinci Aşama

1. Boş bir tübe örnek başına 5 µl 10x buffer, 3 µl MgCl₂, 2 µl dNTP (3 mM), 1 µl P209 primeri (10 pmol/ml), 1 µl P939 primeri (10 pmol/ml), 0,5 µl Hot Start Taq Polimeraz ve 32,5 µl distile H₂O eklendi, vortekslendi.
2. Karışımın üzerine daha önce elde edilmiş olan cDNA'dan 5 µl eklendi, vortekslendi.
3. Elde edilen karışım, PZT cihazına konuldu. PZT protokolü, 95°C'de yedi dakika, 94°C'de bir dakika, 52°C'de bir dakika ve 72°C'de iki dakikayı içeren 30 siklus sonrasında 72°C'de beş dakikayı daha içermektedir.

Nested PZT İkinci Aşama

1. Boş bir tübe 5 µl 10x buffer, 3 µl MgCl₂, 2 µl dNTP (3 mM), 1 µl P211 primeri (10 pmol/Ml), 1 µl P940 primeri (10 pmol/Ml), 0,5 µl Hot Start Taq Polimeraz, 35,5 µl distile H₂O eklendi, vortekslendi.
2. Üzerine birinci PZT aşaması sonucunda elde edilmiş olan amplikondan 2 µl eklendi.
3. Elde edilen karışım, PZT cihazına konuldu. Birinci PZT aşamasındaki protokol kullanıldı.

3.6.2.4.3. Agaroz Jel Elektroforezi

1. Midi jel tankı kullanıldı. %2'lik agaroz oranını elde etmek için 75 ml Tris-Borik Asit-EDTA (TBE) içerisine 1,5 gram agaroz eklendi.
2. Agarozun çözünmesini sağlamak için ısıtma işleminden yararlanıldı.
3. Elde edilen karışımın içerisine 5 µl etidyum bromid eklendi. Karıştırıldı.
4. Hazırlanan karışım, jel tankındaki tarakları yerleştirilmiş olan tabağa döküldü ve donması için oda sıcaklığında bekletildi.
5. Jel donduktan sonra tabak, TBE ile doldurulmuş olan tank içerisine yerleştirildi. Taraklar çıkartıldı. Böylece örneklerin yüklemesi için gereken kuyucuklar elde edilmiş oldu.
6. Kuyucuklara örnekleri yüklemekten önce her bir örnekten 10 µl alınıp 2 µl loading dye (6x orange loading dye) ile karıştırıldı ve elde edilen karışım kuyucuklara aktarıldı. Eklenen loading dye, örneklerin kuyucuklar içerisine çökmesini ve jelde görünebilmesini sağladı. Kuyucuklardan ilkin marker, diğer kuyucuklara örnekler sırayla yüklendi.
7. Tankın kapağı kapatıldı, elektrotlar bağlandı. 110 volt ile 40 dakika elektroforez uygulandı. Böylece örneklerin (-) kutuptan (+) kutba doğru jel içerisinde boyutlarına bağlı olarak farklı hızlarda yürütülmeleri sağlandı.
8. Elektroforez tamamlandıktan sonra, jel tank içerisinden alındı ve UV ışığı altında görüntüleme yapıldı.
9. Jele yüklenen örneklerde amplikon olup olmadığı kalitatif olarak değerlendirildi.

3.6.2.4.4. Restriksiyon Endonükleazlarla Kesim

Agaroz jel elektroforezi sonucunda DNA varlığı saptanan örnekler, HCV genotiplerinin belirlenebilmesi için restriksiyon endonükleazlarla kesime alındı. İki farklı enzim çifti kullanıldı. Bunlar Hae3-Rsa1 enzim çifti ve Mva1-Hinf1 enzim çiftidir. Her iki enzim çifti için ayrı birer karışım hazırlandı ve nested PZT sonucunda elde edilmiş ampliconlardan belirli miktarda eklenerek kesim işlemi gerçekleştirildi. Pozitif kontrol olarak Türkiye’de en sık görülen HCV genotip 1 olduğu bilinen bir serum örneği kullanıldı.

Hae3-Rsa1 Enzim Çifti

Hae3 restriksiyon enzimi kesim bölgesi:

5' ... G G ↓ C C ... 3'

3' ... C C ↑ G G ... 5'

Rsa1 restriksiyon enzimi kesim bölgesi:

5' ... G T ↓ A C ... 3'

3' ... C A ↑ T G ... 5'

1. Boş bir tübe örnek başına 6 µl distile su, 2 µl buffer, 1 µl Hae3 enzimi, 1 µl Rsa1 enzimi eklendi, vortekslendi.
2. Karışımın üzerine örneklerin nested PZT’i sonucu elde edilen ampliconlardan 20 µl eklendi, vortekslendi.
3. 37°C’de 15 dakika boyunca bekletildi.
4. Kesim bantları metafor agar elektroforezinde değerlendirildi.

Mva1-Hinf1 Enzim Çifti

Mva1 Restriksiyon enzimi kesim bölgesi:

5' ... C C ↓ W G G ... 3'

3' ... G G W ↑ C C ... 5'

Hinf1 Restriksiyon enzimi kesim bölgesi:

5' ... G ↓ A N T C ... 3'

3' ... C T N A ↑ G ... 5'

1. Boş bir tübe örnek başına 6 µl distile su, 2 µl buffer, 1 µl Mva1 enzimi, 1 µl Hinf1 enzimi eklendi, vortekslendi.
2. Karışımın üzerine örneklerin nested PZT'i sonucu elde edilen ampliconlardan 20 µl eklendi, vortekslendi.
3. 37°C'de 15 dakika boyunca bekletildi.
4. Kesim bantları metafor agar elektroforezinde değerlendirildi.

3.6.2.4.5. Metafor Jel Elektroforezi

1. %4'lük metafor agar elde etmek için 3 gram metafor agar, 75 ml TBE içerisine aktarıldı.
2. Yarım saat oda sıcaklığında bekletildikten sonra, çözünmesini sağlamak için ısıtıldı.
3. Elde edilen karışımın içerisine 3 µl etidyum bromid eklendi, karıştırıldı.
4. Hazırlanan karışım, jel tankındaki tarakları yerleştirilmiş olan tabağa döküldü ve donması için oda sıcaklığında bekletildi.
5. Jel donduktan sonra tabak, TBE ile doldurulmuş olan tank içerisine yerleştirildi. Taraklar çıkartıldı. Böylece örneklerin yüklemesi için gereken kuyucuklar elde edilmiş oldu.
6. Kuyucuklara örnekleri yüklemekten önce her bir örnekten 10 µl alınıp 2 µl loading dye (6x orange loading dye) ile karıştırılır ve elde edilen karışım kuyucuklara aktarıldı. Kuyucuklardan ilkinde marker, diğer kuyucuklara örnekler sırayla yüklendi. Tankın kapağı kapatıldı, elektrotlar bağlandı. 110 volt kullanılarak 75 dakikada süre ile elektroforez gerçekleştirilir.
7. Elektroforez tamamlandıktan sonra jel tanktan çıkarıldı ve UV ışığı altında görüntüleme yapıldı.
8. Elde edilen kesim bantları, marker ile pozitif kontrol yardımıyla ve referans yayında belirlenen bantlar esas alınarak değerlendirildi. Örneklerdeki HCV genotipleri belirlendi (72).

3.6.2.5. İstatistiksel Analiz

Çalışmanın istatistiksel analizleri Mann-Whitney U Test (SPSS Inc, A.B.D.) ile gerçekleştirilmiştir.

3.7. Araştırma Planı ve Takvimi

YAPILAN İŞ	AYLAR		
	1	2	3
1.Örneklerin toplanması	X		
2.Real-time RT-PCR testinin optimizasyonu	X		
3. Laboratuvar çalışmaları		X	
4. Verilerin değerlendirilmesi		X	
5. Tez yazımı		X	X

3.8. Verilerin Değerlendirilmesi

15 adet kronik hepatit C enfeksiyonu olan kişiden alınan plazma, tükürük, idrar ve dışkı örnekleri kantitatif “real-time” RT-PZT yöntemi kullanılarak HCV RNA açısından incelendi. Aynı hastaya ait farklı örnekler arasında HCV RNA varlığı ve kantitasyonu açısından farklar değerlendirildi.

3.9. Araştırmanın Sınırlılıkları

Sınırlı sayıda kronik Hepatit C'li hastadan alınan örnekler araştırmaya dahil edilmiştir. Nükleik asid ekstraksiyon yöntemi seçimlerinde mali kaynak sıkıntısı nedeniyle sınırlı sayıda deneme yapılabilmektedir.

3.10. Etik Kurul Onayı

01.03.2012 tarihli ve 19-SBKAEK protokol numaralı 2012/05-07 karar numarası ile görüşülen “Kan dışı örneklerde Hepatit C Virus RNA’sının araştırılması - DEU.HSI.MSc-2009970114” konulu araştırmaya ilişkin etik kurul onayı alınmıştır.

4. BULGULAR

4.1. Serum Dışı Örneklerde Nükleik Asid Ekstraksiyon Yönteminin Seçilmesi

HCV RNA saptama ve kantitasyonu amacıyla serum / plazma için optimize edilmiş ticari bir yöntem kullanıldığı için, diğer örnek tiplerinin (tükürük, idrar, dışkı) çalışılabilmesi amacıyla testin yeniden değerlendirilmesi ve en uygun ekstraksiyon yönteminin belirlenmesi gerekti. Bu amaçla tükürük ve idrar için üç, dışkı için sekiz yöntem denendi.

Tükürük için:

Yöntem 1. Doğrudan örnekten EZ-1 Virus Mini Kit ile ekstraksiyon

Yöntem 2. Doğrudan örnekten QIAamp Viral RNA Mini Kit Spin Kolon ile ekstraksiyon

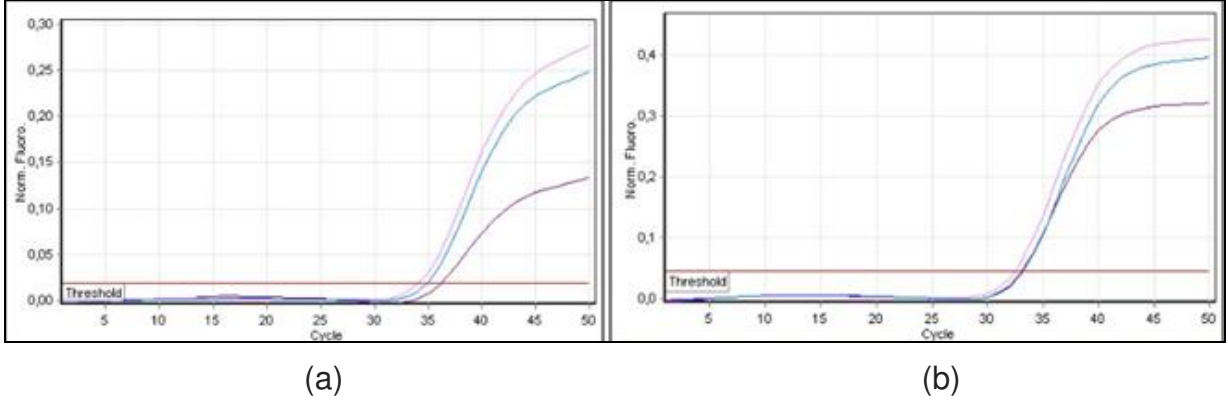
Yöntem 3. Örneğin 1/2'lik ve 1/10'luk seyreltmelerinden sonra QIAamp Viral RNA Mini Kit Spin Kolon ile ekstraksiyon denendi.

Yöntemler sıra ile uygulandı ve elde edilen sonuçlar bir sonraki yöntemin seçiminde yol gösterici oldu. Sonuç olarak QIAamp viral RNA mini kit ve 1/10 dilüsyon ile ekstraksiyon yapılmasına karar verildi. Yapılan üçlü çalışmada tekrarlanabilir sonuçların alınması ile yöntemin duyarlılığı en az 1000 IU HCV RNA / 140 µl örnek olarak kabul edildi (Tablo 3).

Tablo 3. Tükürük örneği için farklı ekstraksiyon yöntemlerinin kullanımı ile elde edilen sonuçların (HCV RNA ve internal kontrol için) Ct değerleri. Renkli kutular seçilen yöntemle ait sonuçları göstermektedir.

Örnek İçerisindeki Virus Yüğü	Yöntem-1		Yöntem-2		Yöntem-3			
	Hedef Ct	İK Ct	Hedef Ct	İK Ct	1/2 Seyreltme		1/10 Seyreltme	
					Hedef Ct	İK Ct	Hedef Ct	İK Ct
500 IU/400 µl (1.25 IU/ul)	Neg	Neg	-	-	-	-	-	-
	Neg	Neg	-	-	-	-	-	-
	Neg	Neg	-	-	-	-	-	-
1000 IU/500 µl (2 IU/ul)	Neg	Neg	-	-	-	-	-	-
5000 IU/140 µl (35,71 IU/ul)	-	-	-	-	32,35*	31,64	35,47	32,29
1000 IU/140 µl (7.14 IU/ul)	-	-	36,91	Neg	-	-	37,75	33,17
	-	-	-	-	-	-	37,98	33,47
	-	-	-	-	-	-	46,84	32,89

* Çalışmada Ct değeri elde edilmesine rağmen, amplifikasyon eğrisinde baskılanma saptandı.



Şekil 16. Tükürük örneği için seçilen ekstraksiyon yöntemi (yöntem 3 - 1000 IU / 140 µl) kullanılarak elde edilen HCV RNA (a) ve internal kontrol (b) amplifikasyon eğrileri. Grafiklerde aynı örneğin üçlü çalışılmasına ait veriler gösterildi.

İdrar örnekleri için:

Yöntem 1. Doğrudan örnekten EZ-1 Virus Mini Kit ile ekstraksiyon,

Yöntem 2. Örneğin kloroform ile ön işleminden sonra EZ-1 Virus Mini Kit ile ekstraksiyon,

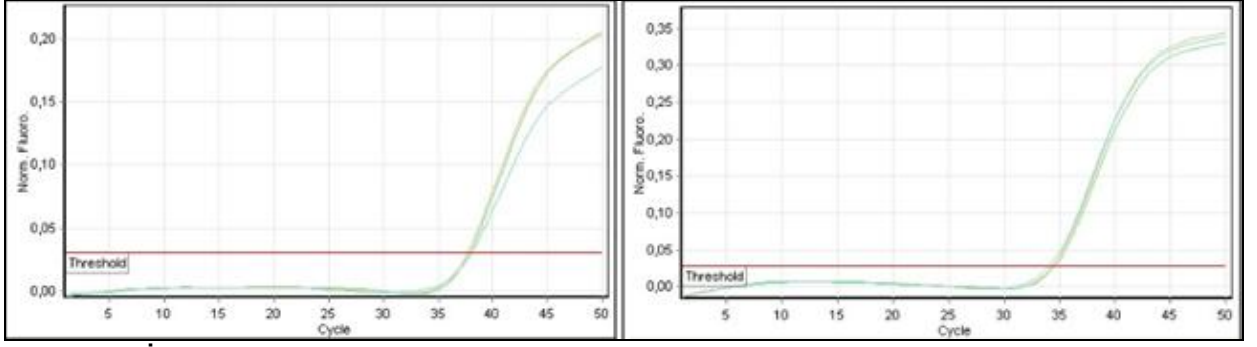
Yöntem 3. Örneğin kloroform ile ön işleminden sonra QIAamp Viral RNA Mini Kit Spin Kolon yöntemi ile ekstraksiyonu yapıldı.

Yöntemler sıra ile uygulandı ve elde edilen sonuçlar bir sonraki yöntemin seçiminde yol gösterici oldu. Sonuç olarak kloroform eklenerek QIAamp viral RNA mini kit ile ekstraksiyon ve 1/2 dilüsyon ile PZT yapılmasına karar verildi. Yapılan üçlü çalışmada tekrarlanabilir sonuçların alınması ile yöntemin duyarlılığı en az 250 IU HCV RNA / 140 µl örnek olarak kabul edildi (Tablo 4).

Tablo 4. İdrar örneği için farklı ekstraksiyon yöntemlerinin kullanımı ile elde edilen sonuçların Ct değerleri. Renkli kutular seçilen yöntemle ait sonuçları göstermektedir.

Örnek İçerisindeki Virus Yüğü	Yöntem-1		Yöntem-2				Yöntem-3			
	Hedef Ct	İK Ct	Elüat 1/2 Dilüe		Dilüe edilmemiş elüat		Elüat 1/2 Dilüe		Dilüe edilmemiş elüat	
			Hedef Ct	İK Ct	Hedef Ct	İK Ct	Hedef Ct	İK Ct	Hedef Ct	İK Ct
500 IU/400 µl (1.25 IU/µl)	Neg	Neg	-	-	-	-	-	-	-	-
	Neg	Neg	-	-	-	-	-	-	-	-
	Neg	Neg	-	-	-	-	-	-	-	-
1000 IU/500 µl (2 IU/ µl)	Neg	37	-	-	-	-	-	-	-	-
2000 IU/400 µl (5 IU/µl)	-	-	39,59*	35	38,13*	35	-	-	-	-
2000 IU/140 µl (14.28 IU/µl)	-	-	-	-	-	-	37	37	36	39
500 IU/140 µl (3.57 IU/µl)	-	-	-	-	-	-	37	34	-	-
	-	-	-	-	-	-	37	34	-	-
	-	-	-	-	-	-	36	34	-	-
250 IU/140 µl	-	-	-	-	-	-	37	34	-	-
	-	-	-	-	-	-	37	34	-	-
	-	-	-	-	-	-	38	34	-	-

* Çalışmada Ct değeri elde edilmesine rağmen, amplifikasyon eğrisinde baskılanma saptandı.



Şekil 17. İdrar örneği için seçilen ekstraksiyon yöntemi (yöntem 3 - 250 IU / 140 ul) kullanılarak elde edilen HCV RNA (a) ve internal kontrol (b) amplifikasyon eğrileri. Grafiklerde aynı örneğin üçlü çalışılmasına ait veriler gösterildi.

Dışkı örnekleri için:

Yöntem 1. Buffer ASL ile ön işlemiden sonra EZ-1 Virus Mini Kit ile ekstraksiyon,

Yöntem 2. Dışkı örneğinin %0,89'luk NaCl içerisinde çözülmesinden sonra filtrasyon ve sonrasında QIAamp Viral RNA Mini Kit ile ekstraksiyon,

Yöntem 3. Kloroform ile ön işlemiden sonra filtrasyon ve sonrasında QIAamp Viral RNA Mini Kit ile ekstraksiyon,

Yöntem 4. Dışkı örneğinin PBS içerisinde çözülmesinden sonra 60°C'de inkübasyon ve süpernatantın QIAamp Viral RNA Mini Kit ile ekstraksiyon,

Yöntem 5. Dışkı örneğinin PBS içerisinde çözülmesinden sonra 60°C'de inkübasyon, supernatantın filtrasyonu ve sonrasında QIAamp Viral RNA Mini Kit ile ekstraksiyon,

Yöntem 6. Dışkı örneğine %2'lik BSA eklenmesinden sonra QIAamp Viral RNA Mini Kit prosedürü ile ekstraksiyon,

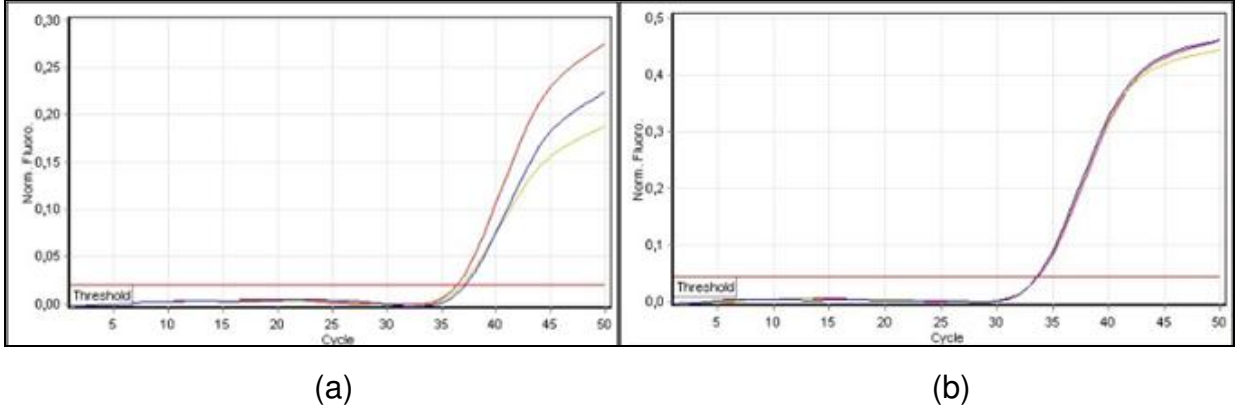
Yöntem 7. Dışkı örneğine %6'lık CTAB ve %2'lik BSA eklenmesinden sonra QIAamp Viral RNA Mini Kit prosedürü ile ekstraksiyon,

Yöntem 8. Dışkı örneğinin buffer ASL ile karıştırılması ve %2'lik BSA eklenmesinden sonra QIAamp Viral RNA Mini Kit ile ekstraksiyon yapılması denendi. (Tablo 5)

Sonuç olarak 10 000 IU/140 µl altındaki konsantrasyonlarda HCV RNA testinde tekrar edilebilir pozitiflik elde edilemedi ve/veya internal kontrolün inhibisyonu saptandı. 10 000 IU/ 140 µl konsantrasyonda 3, 4, 5 ve 6. yöntemlerde başarı elde edildi. HCV ve internal kontrol amplifikasyon eğrilerinden elde edilen floresans değ erlerinin daha yüksek olmasınedeniyle, dışkı örneğine %2'lik BSA eklenmesinden sonra QIAamp Viral RNA Mini Kit prosedürü ile ekstraksiyon yönteminin kullanılmasına karar verildi. Yapılan      çalışmada tekrarlanabilir başarı elde edilmesi nedeniyle yöntemin duyarlılığının en az 10000 IU/140 µl olduğu belirlendi (Tablo 5).

Tablo 5. Dışkı örneği için farklı ekstraksiyon yöntemlerinin kullanımı ile elde edilen sonuçların Ct değerleri

Örnek İçerisindeki Virus Yüğü	Yöntem-1		Yöntem-2		Yöntem-3				Yöntem-4				Yöntem-5		Yöntem-6		Yöntem-7		Yöntem-8	
	Hedef Ct	İK Ct	Hedef Ct	İK Ct	Elüat 1/2 Dilüe		Örnek 1/10 Dilüe		Örnek 1/2 Dilüe		Örnek 1/10 Dilüe		Hedef Ct	İK Ct	Hedef Ct	İK Ct	Hedef Ct	İK Ct	Hedef Ct	İK Ct
					Hedef Ct	İK Ct	Hedef Ct	İK Ct	Hedef Ct	İK Ct	Hedef Ct	İK Ct								
400 IU/200 µl	Neg	Neg	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
800 IU/ 200 µl	Neg	Neg	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4000 IU/1000 µl	-	-	Neg	36	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1000 IU/140 µl	-	-	-	-	Neg	37	-	-	-	-	Neg	38	-	-	-	-	Neg	33	-	-
5000 IU/140 µl	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Neg	36	-	-	41	33	Neg	34	39	34
															Neg	33	Neg	34	42	35
															41	33	Neg	33	Neg	34
10000IU/140µl	-	-	-	-	-	-	37	34	35	36	34	33	37	33	36	33	-	-	-	-
											38	34			37	33				



Şekil 18. Dışkı örneği için seçilen ekstraksiyon yöntemi (yöntem 6 - 10000 IU / 140 µl) kullanılarak elde edilen HCV RNA (a) ve internal kontrol (b) amplifikasyon eğrileri. Grafiklerde aynı örneğin üçlü çalışılmasına ait veriler gösterildi.

4.2. Hasta Örneklerinin HCV RNA Analiz Sonuçları

Çalışmada 15 kronik HCV hastasından alınan örnekler incelendi. On beş hastanın 10 tanesinde plazma HCV RNA pozitif olarak saptandı. Beş hasta, plazma HCV PZT negatif olarak saptandı. Bu hastalardan alınan plazma dışı örneklerin tümü HCV RNA negatifti (Şekil 19).

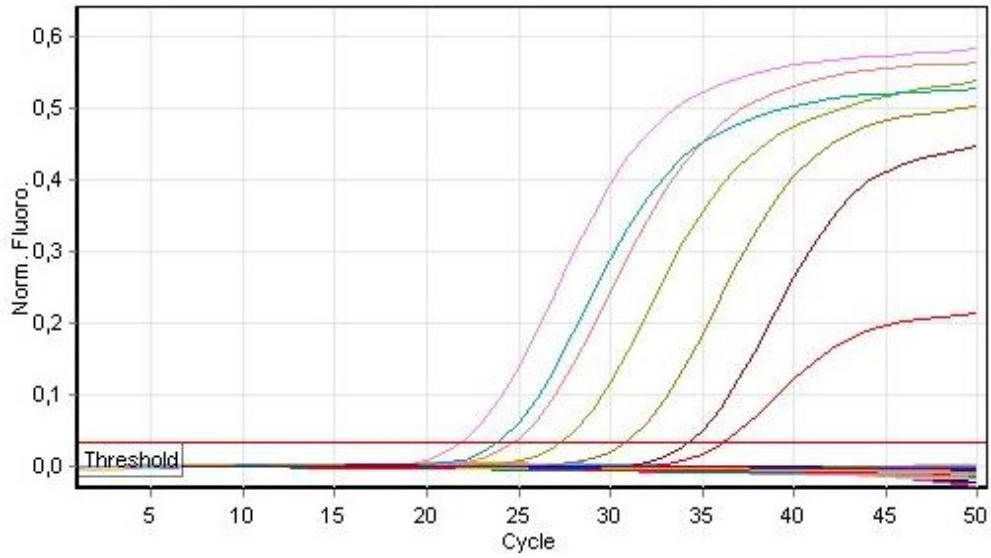
Plazma HCV RNA pozitif olarak bulunan on hastadan, bir tanesinin tükürük örneğinde(%10), bir tanesinin idrar örneğinde (%10), bir tanesinin dışkı örneğinde (%10) HCV RNA pozitif olarak bulundu. Hastalardan alınan plazma dışı örneklerde makroskopik olarak kan gözlenmedi.

Bir hastaya ait plazma ve plazma dışı örnekler aynı çalışmada değerlendirildi. Böylece viral yüklerin aynı çalışmada karşılaştırılması sağlandı. Buna göre HCV RNA pozitif saptanan olgulardan elde edilen viral yükler tablo 6'da gösterildi. Plazma viral yükü ile plazma dışı örneklerde HCV RNA saptanması arasında bir ilişki saptanmadı ($p=0.425$). İdrar ve tükürük örneklerinde viral RNA saptanan olgularda, bu örneklerdeki virus miktarı, hastanın plazma viral yükünden belirgin olarak (≥ 4 log) daha düşüktü. Dışkı örneğinde HCV RNA saptanan olguda ise dışkıdaki virus miktarı plazma virus yükünden $0.16 \log_{10}$ daha yüksek idi, ancak fark $0.50 \log_{10}$ 'dan az olduğu için anlamlı kabul edilmedi.

Tablo 6. HCV RNA pozitif olgularda plazma dışı örneklerden elde edilen viral yükler

HASTA NO.	İNCELENEN ÖRNEK *			
	IU/ml (log10 IU/ml)			
	PLAZMA	TÜKÜRÜK	İDRAR	DIŞKI
Hasta-1	1 302 (3.11)	Neg	Neg	Neg
Hasta-2	15 828 988 (7.19)	Neg	-	Neg
Hasta-3	2 482 117 (6.39)	Neg	Neg	Neg
Hasta-7	883 (2.95)	Neg	Neg	1300 (3.11)
Hasta-10	591 861(5.77)	70 (1.84)	Neg	Neg
Hasta-11	4 142 666 (6.61)	Neg	Neg	-
Hasta-12	6 691 566 (6.82)	Neg	120 (2.07)	Neg
Hasta-13	1 976 893 (6.29)	Neg	Neg	Neg
Hasta-14	12 123 611(7.08)	Neg	Neg	-
Hasta-15	252 978 (5.4)	Neg	Neg	Neg

(-) Örnek alınamamıştır.



No.	Colour	Name	Type	Ct	Given Conc (copies/ml)	Calc Conc (copies/ml)	% Var
1	Red	hasta1-serum	Unknown	36,19		1.302	
2	Yellow	hasta1-tükürük	Unknown				
3	Blue	hasta1-idrar	Unknown				
4	Purple	hasta1-dışkı	Unknown				
5	Pink	hasta2-serum	Unknown	21,94		15.828.988	
6	Cyan	hasta2-tükürük	Unknown				
7	Green	hasta2-dışkı	Unknown				
8	Orange	hasta3-serum	Unknown	24,75		2.482.117	
9	Brown	hasta3-tükürük	Unknown				
10	Black	hasta3-idrar	Unknown				
11	Black	hasta3-dışkı	Unknown				
12	Cyan	hasta4-serum	Unknown				
13	Gold	hasta4-tükürük	Unknown				
14	Light Green	hasta4-idrar	Unknown				
15	Light Blue	hasta5-serum	Unknown				
16	Dark Blue	hasta5-tükürük	Unknown				
17	Purple	hasta5-idrar	Unknown				
18	Pink	hasta5-dışkı	Unknown				
19	Pink	NK	NTC				
20	Red	Standart1	Standard	34,38	4.286	4.292	0,1%
21	Gold	Standart2	Standard	30,92	42.860	42.012	2,0%
22	Yellow	Standart3	Standard	27,35	428.600	444.273	3,7%
23	Cyan	Standart4	Standard	23,95	4.286.000	4.212.581	1,7%

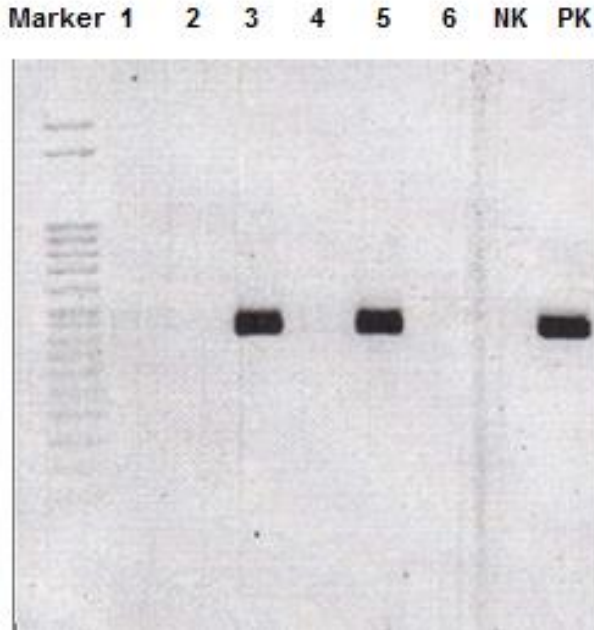
Şekil 19. Bazı hastalara (Hasta1-5) ait real-time HCV RT-PZT çalışma sonuçları

4.3. Restriksiyon Endonükleaz Enzim Analizi Bulguları

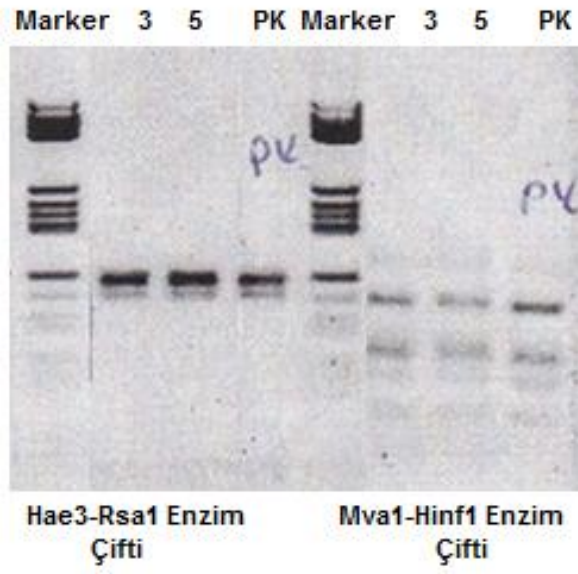
Plazma HCV RNA pozitif olan ve tükürük, idrar, dışkı örneklerinde HCV RNA saptanan örnekler, genotiplerinin karşılaştırılması amacıyla restriksiyon endonükleaz enzim analizi (REA) ile incelendi.

Plazma örneklerinin hepsinde REA için amplikon bantları elde edildi. Tükürük, idrar ve dışkı örneklerinde ise kullanılan nested PZT sonrasında amplikon elde edilemedi. REA yönteminde amplikon elde edilebilmesi için en az 1000 IU/ml HCV RNA gerekmektedir. Plazma dışı ve bazı plazma örneklerinde amplikon elde edilememesine örnekteki viral yükün düşük olmasının yol açtığı düşünüldü (Şekil 20).

Plazma örneklerinin REA ile değerlendirilmesi sonucu tümünde HCV genotipinin Türkiye’de en sık saptanan genotip 1 olduğu belirlendi (Şekil 21).



Şekil 20. Nested PZT sonrası agaroz jel elektroforezinde amplikonların görüntülenmesi. 1: Hasta 7 plazma örneği, 2: Hasta 7 dışkı örneği, 3: Hasta 10 plazma örneği, 4: Hasta 10 tükürük örneği, 5: Hasta 12 plazma örneği, 6: Hasta 12 idrar örneği, NK: Negatif Kontrol, PK: Pozitif Kontrol.



Şekil 21. Bazı hastalara ait REA kesim bantlarının metafor jel elektroforezinde görüntülenmesi 3: Hasta 10 plazma örneği, 5: Hasta 12 plazma örneği, PK: Pozitif kontrol.

5. TARTIŞMA

Hepatit C virusu, Flaviviridae ailesinden Hepacivirus genusu içerisinde bulunan, yaklaşık 9600 nukleotitli, pozitif iplikli RNA genomu içeren bir virustur. Hepatit C virusunun 6 genotipi ve birçok alt tipi bulunmaktadır. HCV infeksiyonlarının %60'ı genotip 1a ve 1b tarafından oluşturulmaktadır (73). HCV ile oluşan infeksiyonların sadece %25'i semptomatik olarak gözlenebilmektedir. HCV infeksiyonlarındaki en önemli sorun, kronik infeksiyona dönüşümün %70-80 oranında olmasıdır (74). İnfeksiyonun kronikleşmesine neden olan etkenler arasında virusun türümsüleri ve kompartmanlaşması düşünülmektedir. Türümsüler, virusun RNA'ya bağımlı RNA polimeraz enziminin hataya açık olmasından ve hata düzeltici "proof-reading" aktivitesi olmamasından kaynaklanmaktadır. Oluşan türümsüler virusun bağışık yanıttan kaçmasında ve antivirallere direnç göstermesinde etkilidir (11, 75). Yapılan çalışmalar sonucunda hepatit C virus RNA'sının karaciğer dışında, periferel kan mononuklear hücreleri, tükürük bezleri, beyin hücreleri gibi karaciğer dokusu dışındaki bölgelerde de saptanabilmesi, bu kompartmanlarda replikasyon kanıtı olarak negatif iplikli RNA'nın tespit edilebilmesi, periferel kan mononuklear hücrelerinde spesifik HCV varyantlarının bulunması (kompartmanlaşma) infeksiyonun kronikleşmesinde etkili olduğu düşünülmektedir (76). Çalışmamızda kronik hepatit C ile enfekte hastaların vücudunda farklı kompartmanlarda virusun bulunup bulunmadığının ve bu kompartmanlar arasındaki genotip farkının olup olmadığının araştırılması amaçlandı.

Çalışmada 15 kronik HCV hastasından alınan plazma, tükürük, idrar ve dışkı örnekleri HCV RNA varlığı ve kantitasyonu açısından incelendi. Beş hastada, plazmada HCV RNA saptanmadı. Benzer şekilde bu olgulardan alınan plazma dışı örneklerde de HCV RNA negatif olarak saptandı. Bu hastalar, kronik HCV tanılı olmakla birlikte, geçmişte almış oldukları tedaviye bağlı olarak vireminin silindiği olgular olarak değerlendirildi. Plazmasında HCV RNA pozitif saptanan bir hastada tükürükte, bir hastada idrarda, bir hastada da dışkıda HCV RNA saptandı. Hermida ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada plazmasında HCV RNA pozitif bulunan 61 olgunun tükürük örnekleri değerlendirilmiş ve 32'sinde (%52.4) HCV RNA pozitif

olarak saptanmıştır. Bu çalışmada duyarlılığı 10 kopya/ml olduğu belirtilen nested PZT yöntemi kullanılmış, plazma virüs yükü ile tükürükte viral RNA saptanması arasında ilişki saptanmıştır (77). Lins ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise 50 anti-HCV pozitif hastanın tükürük örnekleri HCV RNA açısından nested PZT yöntemi ile taranmış ve bütün örnekler pozitif olarak belirlenmiştir. Kullanılan PZT yönteminin duyarlılığı belirtilmemiştir. Hermida ve ark. çalışmasından farklı olarak plazma viral yükü ile tükürükte viral RNA saptanması arasında bir ilişki bulunmamıştır. Her iki çalışmada da serum-tükürük çiftlerinde aynı viral genotip saptanmıştır (78). Yapılan diğer bir çalışmada, 80 kronik Hepatit C ile enfekte hastanın tükürük ve idrar örnekleri kullanılmıştır. Tükürük örneklerinin otuz birinde (%38,8), idrar örneklerinin ise on tanesinde (%12,5) HCV RNA pozitifliği saptanmıştır. Bu çalışmada alınan tükürük santrifüjlenerek supernatani (hücre içermeyen kısmı) kullanılmıştır. Yöntem olarak nested PZT tercih edilmiştir ancak duyarlılık belirtilmemiştir (79). Başka bir çalışmada da 23 kronik HCV'li hastadan 21 gün boyunca tükürük örnekleri toplanmış ve hepatit C virusu açısından kalitatif olarak incelenmiştir. Sonuç olarak toplam 474 tükürük örneğinden 342 (%72)'sinde pozitiflik saptanmış, serum viral yükü ile tükürükte pozitiflik arasında ilişki olduğu gösterilmiştir (80). Çalışmada bir değer verilmemekle birlikte, veriler incelendiğinde $>10^6$ IU/ml viral yük taşıyan olgularda tükürükte pozitifliğin süreklilik gösterdiği, daha düşük viral yükü olan olgularda günler arası değişkenliğin daha çok olduğu izlenmektedir. Ayrıca bu çalışmada tükürük ile çalışmalarda PZT inhibisyonunun sorun olduğu, bu nedenle ekstraksiyonda örneğin dilüsyonu ve diğer ön işlemlerin gerekli olduğu belirtilmiştir. Serum için optimize edilmiş iki ticari test, tükürük için de kullanılmış, ancak tükürük için kullanımda test duyarlılıklarının değiştiği, saptamanın gerçekleşebilmesi için daha yüksek virus miktarının gerektiği (duyarlılığın daha yüksek olduğu) belirlenmiştir. Gonçalves ve arkadaşlarının çalışmasında 39 anti-HCV pozitif hastadan alınan serum ve tükürük örnekleri HCV RNA açısından incelenmiştir. Otuz dokuz hastanın 32'sinde (%82) serumda HCV RNA saptanabilirken, tükürük örneklerinin sadece 8 tanesinde (%20) HCV RNA pozitif olarak bulunmuştur. Serum ve tükürük çiftlerindeki virus genotipleri aynıdır (81). Tükürük örneklerindeki düşük pozitiflik, örneklerin santrifüjlenip hücreden arındırılarak kullanımına bağlanmış, tam tükürük kullanan çalışmalarda oranların daha yüksek olabildiği vurgulanmıştır.

Dışkıda HCV RNA saptamaya yönelik PubMed’de İngilizce yapılan tarama sonucu konuya ilişkin sadece bir adet çalışmaya ulaşılmıştır. Bu çalışmada hepatit C ile infekte olan altı hastadan alınan bir veya daha fazla dışkı örneği incelenmiş ve dört olgunun dışkısında HCV RNA pozitif olarak saptanmıştır (43). Dışkıda virus saptanması ile serumdaki viral yük arasında ilişki bulunmamıştır. Virus tipinin belirlendiği olgularda serum – dışkı çiftlerinde aynı genotip saptanmıştır.

Çalışmamızda tükürük, idrar ve dışkıda birer olguda (%10) HCV RNA pozitifliği saptanmıştır. Literatürdeki çalışmalar incelendiğinde tükürük için viral RNA pozitifliğinin çalışmalar arasında değişkenlik göstererek %20-100 arası bildirildiği saptanmıştır. İdrar ve dışkı için çalışmalar çok sınırlıdır. Çalışmamızdaki oranlar literatürde bildirilen oranlardan daha düşüktür. Bu fark, olgu sayımızın az olmasından veya yöntemler arası farklardan kaynaklanmış olabilir. Serum/plazma dışı örneklerde inhibisyonun sorun olabildiği bildirilmekle birlikte viral RNA ekstraksiyonu için ideal bir yöntem bulunmamaktadır. Nükleik asid ekstraksiyonu için, çalışmaların bir kısmında laboratuvar yapımı, bir kısmında ise ticari yöntemlerin modifikasyonları kullanılmıştır. Aynı durum kullanılan amplifikasyon yöntemi için de geçerlidir. Çalışmaların bir kısmında kan dışı örnekler için testin duyarlılığına ilişkin bilgi verilmemesi önemli bir eksiktir. Yaptığımız çalışmada tüm örneklerde nükleik asid ekstraksiyonu (QIAamp Viral RNA Mini Kit Spin Kolon) ve RT-PZT (Artus HCV RG RT-PCR Kiti) için aynı ticari yöntem kullanılmış, plazma dışı örneklerde ekstraksiyon aşamasında çeşitli modifikasyonlar denenerek en uygun yöntem belirlenmeye çalışılmıştır. Seçtiğimiz yöntemlerin ticari kitler olması, standardizasyonda kolaylık sağlamıştır. Kan dışı örnek tiplerinde yöntemin duyarlılığına ilişkin veri elde edilerek sonuçların yorumlanabilmesi sağlanmıştır. Literatürdeki çalışmalarda ekstraksiyonda kullanılan yöntemler arasında guanidin izotiyosiyanat fenol kloroform ekstraksiyon yöntemi (78, 81, 82) ve TRIZOL ile ekstraksiyon (77) bulunmaktadır. HCV RNA varlığını araştırmak için literatürdeki çalışmaların çoğunda laboratuvar yapımı nested (77, 78, 81) veya nested olmayan klasik RT-PZT yönteminin kullanıldığı görülmektedir (43, 79, 80). Az sayıdaki çalışmada ticari RT-PZT (43) veya transkripsiyon temelli amplifikasyon (TMA) yöntemi kullanılmıştır (80). Çalışmamız diğerleri ile karşılaştırıldığında, real time RT-PZT yönteminin kullanıldığı ilk çalışma olma özelliği taşımaktadır. Nested PZT yöntemi, duyarlılığı arttırmakla birlikte kontaminasyon riski

de yüksek bir yöntemdir. Bu yöntemi kullanan çalışmalarda çift amplifikasyondan ötürü elde edilen yüksek duyarlılık sayesinde daha çok örnekte pozitiflik saptamak mümkün olmuş olabilir. Diğer yandan, real-time PZT yöntemi, kapalı bir sistem olması, amplikon kontaminasyonunun önlenmesi, yüksek duyarlılık sağlaması gibi avantajlar taşımaktadır. Dilüsyon gerekmeden geniş bir aralıkta kantitasyon yapılabilmesi ve değerlendirmenin amplifikasyonun başlangıcında elde edilen sinyal ile yapılabilmesi sayesinde PZT dinamiklerindeki oynamalardan daha az etkilenmesi nedenleriyle özellikle viral yük saptamalarında tercih edilen yöntemdir.

Çalışmamızda plazma dışı örneklerde, kullandığımız testin duyarlılığının daha düşük olduğu, idrar ve tükürük için değerlerin birbirine yakın bulunduğu ama özellikle dışkıda bu farkın belirgin olarak yükseldiği saptandı. Yöntemde, örnek tipleri arasında duyarlılık farkı olması ve plazma ile aynı duyarlılığın sağlanamaması, HCV RNA pozitifliğinin gerçek orandan daha düşük belirlenmesine yol açmış olabilir.

Literatürdeki bazı çalışmalarda serum HCV RNA yükü arttıkça, HCV RNA'nın serum dışındaki örneklerde görülme olasılığının da arttığından bahsedilmektedir (77, 80). Bazı araştırmacılar ise bu tür bir ilişki saptamadıklarını belirtmektedir (43, 78, 81). Çalışmamızda hastalara ait plazma HCV yükleri geniş bir aralıkta (2.95 – 7.19 log 10 IU/ml) saptanmıştır. Plazma dışı örneklerde viral RNA bulunması ile plazma virus yükü arasında ilişki gösterilememiştir. Örneğin dışkıdaki HCV RNA pozitifliği, plazma virus yükü en düşük olguda saptanırken, plazma virus yükü en yüksek olguda diğer örnek tiplerinde pozitiflik bulunmamıştır.

Çalışmamızda HCV RNA genotipleme restriksiyon enzim analizi yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Aynı yöntem Gonçalves ve arkadaşlarının çalışmasında da kullanılmıştır. Çalışmamızda HCV RNA'sı pozitif bulunan plazma örneklerinin genotiplendirme sonuçları, Türkiye'de en çok görülen tip olan genotip 1 olarak belirlendi. Tükürük, idrar ve dışkı örneklerinin genotiplendirmelerinde ise bu örneklerdeki viral yükün düşük olması nedeniyle amplikon elde edilemedi ve tiplendirme gerçekleştirilemedi. Literatürdeki çalışmalarda, idrarla ilgili bilgi bulunmamakla birlikte aynı hastaya ait tükürük / dışkı örnekleri ile serum örneklerindeki genotiplerin identik olduğu saptanmıştır (43, 78, 81).

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızın hipotezi, hepatit C ile enfekte hastalarda vücudun farklı kompartmanlarında virusunun bulunduğu ve bu kompartmanlar arasında viral yükler açısından bir fark olmadığı idi. Elde edilen veriler sonucunda, HCV RNA'sının plazma örneklerinin yanı sıra tükürük, idrar ve dışkı örneklerinde de saptanabileceği gösterilmiştir. Plazma dışındaki örneklerde bulunan HCV RNA miktarı, serum viral yüküne yakın veya daha düşük olarak saptanmıştır. Plazmada HCV RNA bulunmayan hastalarda ise plazma dışı örneklerde de viral RNA saptanmamıştır. HCV RNA taşıyan plazma örnekleri ile tükürük, idrar ve dışkı örneklerinde bulunan virus genotiplerinin karşılaştırılması çalışması ise plazma dışı örneklerdeki virus miktarının düşük olması nedeniyle gerçekleştirilememiştir. Genotipleme yapılan plazma örneklerinin tümü genotip 1 olarak belirlenmiştir.

Plazma dışı örneklerde HCV RNA'nın saptanabilmesinin iki önemi bulunmaktadır: a) Bu örnek tipleri viremik olguların saptanmasında kullanılabilir, b) Enfeksiyonun bulaşmasında kan dışı vucut sıvıları da rol oynayabilir. Plazma dışı örnekler, hastalardan invaziv olmayan yöntemlerle kolaylıkla elde edilebilmesine karşın bu örneklerde virus RNA'sının saptanabilme olasılığı plazmaya göre daha düşüktür. Bu nedenle yöntem duyarlılığı iyileştirilmeden bu örneklerin tanıda kullanılması uygun değildir. Plazma dışı örnekler için özellikle standardize ekstraksiyon yöntemlerine gereksinim vardır.

HCV RNA'nın tükürük, idrar ve dışkıya nasıl geçtiği veya bu örneklerin enfeksiyöz olup olmaması bu çalışmanın hedefleri dışında kalmaktadır. Ancak literatürdeki çalışmalarda bu sorulara henüz net yanıtlar bulunmamaktadır. Bu alanda daha fazla çalışmaya gereksinim vardır.

7. KAYNAKLAR

1. Tang H, Grise H. Cellular and molecular biology of HCV infection and hepatitis. Clin Sci 2009; 117: 49-65
2. Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, ve ark. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. Science 1989; 244: 359-362
3. Budkowska A. Mechanism of cell infection with Hepatitis C Virus (HCV) - a new paradigm in virus-cell interaction. Pol J Microbiol 2009; 58(2): 93-98
4. Czepiel J, Biesiada G, Mach T. Viral Hepatitis C. Pol Arch Med Wewn 2008; 118(12): 734-740
5. Karataylı Ö, Bozdayı M. Hepatit C virusu virolojisi, genotipleri ve subtipleri, tanısı. Gastroenterohepatoloji 2010; 3(1); 70-76
6. Pozzetto B, Bourlet T, Grattard F, Bonneval L. Structure, genomic organization, replication and variability of hepatitis C virus. Nephrol Dial Transplant 1996; 11(4): 2-5
7. Sharma SD. Hepatitis C virus: molecular biology & current therapeutic options. Indian J Med Res 2010; 131: 17-34
8. Di Bisceglie AM. Hepatitis C. Lancet 1998; 351: 351-355
9. Rice M. New insights into HCV replication: potential antiviral targets. Top Antivir Med 2011; 19(3): 117-120
10. Bartenschlager R, Lohmann V. Replication of hepatitis C virus. J Gen Virol 2000; 81: 1631-1648
11. Farci P. New insights into the HCV quasispecies and compartmentalization. Semin Liver Dis 2011; 31: 356-374
12. Simmonds P, Bukh J, Combet C, Deleage G ve ark. Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. Hepatology 2005; 42: 962-973
13. Barut HŞ, Günal Ö. Dünyada ve ülkemizde hepatit C epidemiyolojisi. Klimik Dergisi 2009; 22(2): 38-43
14. Simmonds P. Clinical relevance of hepatitis C virus genotypes. Gut 1997; 40: 291-293

15. Yıldız E, Oztan A, Sar F, Pınarbası E ve ark. Molecular characterization of a full genome turkish hepatitis c virus 1b isolate (HCV-TR1): a predominant viral form in Turkey. *Virus Genes* 2002; 25(2): 169-177
16. Abacioglu YH, Davidson F, Tuncer S, Yap PL, ve ark. The distribution of hepatitis C virus genotypes in Turkish patients. *J Viral Hepat* 1995; 2: 297-301.
17. Fallahian F, Najafi A. Epidemiology of hepatitis C in the middle east. *Saudi J Kidney Dis Transplant* 2011; 22(1): 1-9
18. Shepard CW, Finelli L, Alter MJ. Global epidemiology of hepatitis C virus infection. *Lancet Infect Dis* 2005; 5(9): 558-67
19. http://www.searo.who.int/LinkFiles/Diarrhoea,_ARI_and_hepatitis_hepatitis-C.pdf (20 Nisan 2012 tarihinde ulaşılmıştır.)
20. Alter MJ. Prevention of spread of hepatitis C. *Hepatology* 2002; 36(5 Suppl 1): S93-8
21. Dinçer D. Hepatit C epidemiyolojisi ve patogenezi. *Gastroenterohepatol - Viral Hepatit Özel Sayısı* 2010; 3(1): 77-80
22. Frank C, Mohamed MK, Strickland GT, Lavanchy D ve ark. The role of parenteral antischistosomal therapy in the spread of hepatitis C virus in Egypt. *Lancet* 2000; 355(9207): 887-91
23. Karaca Ç, Çakaloğlu Y, Demir K, Özdil Sadakat ve ark. Risk factors for the transmission of hepatitis C virus infection in the Turkish population. *Dig Dis Sci* 2006; 51(2): 365-369
24. Hoofnagle JH. Hepatitis C: the clinical spectrum of disease. *Hepatology* 1997; 26(Suppl 1): 15S-20S
25. Blackard JT, Shata MT, Shire NJ, Sherman KE. Acute hepatitis C virus infection: a chronic problem. *Hepatology* 2008; 47(1): 321-331
26. http://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0008/78146/E90840_Chapter_6.pdf (5 Mayıs 2012 tarihinde ulaşıldı.)
27. Jamma S, Hussain G, Lau D. Current concepts of HBV/HCV coinfection: coexistence, but not necessarily in harmony. *Curr Hepat Rep* 2010; 9(4): 260-269

- 28.** Senturk H, Tahan V, Canbakan B, Uraz S ve ark. Chronic hepatitis C responds poorly to combination therapy in chronic hepatitis B carriers. *Neth J Med* 2008; 66(5): 191-195
- 29.** Liu Z, Hou J. Hepatitis B virus (HBV) and hepatitis C virus (HCV) dual infection. *Int J Med Sci* 2006; 3(2): 57-62
- 30.** Yan FM, Chen AS, Hao F, Zhao XP ve ark. Hepatitis C virus may infect extrahepatic tissues in patients with hepatitis C. *World J Gastroenterol* 2000; 6(6): 805-811
- 31.** Farci P, Shimoda A, Wong D, Cabezon T ve ark. Prevention of hepatitis C virus infection in chimpanzees by hyperimmune serum against the hypervariable region 1 of the envelope 2 protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93(26): 15394–15399
- 32.** Shimizu YK, Igarashi H, Kiyohara T, Cabezon T ve ark. A hyperimmune serum against a synthetic peptide corresponding to the hypervariable region 1 of hepatitis C virus can prevent viral infection in cell cultures. *Virology* 1996; 223(2): 409–412
- 33.** Weiner A, Erickson AL, Kansopon J, Crawford K ve ark. Persistent hepatitis C virus infection in a chimpanzee is associated with emergence of a cytotoxic T lymphocyte escape variant. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92(7): 2755–2759
- 34.** Tsai SL, Chen YM, Chen MH, Huang CY ve ark. Hepatitis C virus variants circumventing cytotoxic T lymphocyte activity as a mechanism of chronicity. *Gastroenterology* 1998; 115(4): 954–965
- 35.** Sullivan DG, Bruden D, Deubner H, McArdle S ve ark. Hepatitis C virus dynamics during natural infection are associated with long-term histological outcome of chronic hepatitis C disease. *J Infect Dis* 2007; 196(2): 239–248
- 36.** Wang XH, Netski DM, Astemborski J, Mehta SH ve ark. Progression of fibrosis during chronic hepatitis C is associated with rapid virus evolution. *J Virol* 2007; 81(12): 6513–6522
- 37.** Roque-Afonso AM, Ducoulombier D, Di Liberto G, Kara R ve ark. Compartmentalization of hepatitis C virus genotypes between plasma and peripheral blood mononuclear cells. *J Virol* 2005; 79(10): 6349-6357

38. Okuda M, Hino K, Korenaga M, Yamaguchi Y ve ark. Differences in hypervariable region 1 quasispecies of hepatitis C virus in human serum, peripheral blood mononuclear cells and liver. *Hepatology* 1999; 29: 217-222
39. Dusheiko GM, Smith M, Scheuer PJ. Hepatitis C virus transmitted by human bite. *Lancet* 1990; 336: 503-504
40. Figueiredo JF, Borges AS, Martinez R, Martinelli Ade L ve ark. Transmission of hepatitis C virus but not human immunodeficiency virus type 1 by human bite. *Clin Infect Dis* 1994; 19: 546-547
41. Akhtar S, Moatter T. Multilevel modeling of intra-household spread of hepatitis C virus infection, Karachi, Pakistan. *Am J Trop Med Hyg* 2007; 76: 446-449
42. Lerat HS, Rumin F, Habersetzer F, Berby F ve ark. In vivo tropism of hepatitis C virus genomic sequences in hematopoietic cells; influence of viral load, viral genotype and cell phenotype. *Blood* 1998; 37: 197-202
43. Beld M, Sentjens R, Rebers S, Weel J ve ark. Detection and quantitation of hepatitis C virus RNA in feces of chronically infected individuals. *J Clin Microbiol* 2000; 38(9): 3442-3444
44. Laskus T, Radkowski M, Wilkinson J, Vargas H ve ark. The origin of hepatitis C virus reinfecting transplanted livers: serum-derived versus peripheral blood mononuclear cell-derived virus. *J Infect Dis* 2002; 185(4): 417-421
45. Ramirez S, Perez-Del-Pulgar S, Carrion JA, Costa J ve ark. Hepatitis C virus compartmentalization and infection recurrence after liver transplantation. *Am J Transplant* 2009; 9(7): 1591-1601
46. EASL Clinical Practice Guidelines: Management of hepatitis C virus infection - Clinical Practice Guidelines. *J Hepatol* 2011; 55: 245-264
47. Strader DB, Wright T, Thomas DL, Seeff LB. Diagnosis, management and treatment of hepatitis C. *Hepatology* 2004; 39(4): 1147-1171
48. Ashfaq UA, Javed T, Rehman S, Nawaz Z ve ark. An overview of HCV molecular biology, replication and immune responses. *Virol J* 2011; 8: 161-171
49. Myrmel H, Ulvestad E, Åsjø B. The hepatitis C virus enigma. *APMIS* 2009; 117: 427-39
50. Lok ASF, Gunaratnam NT. Diagnosis of Hepatitis C. *Hepatology* 1997; 26 (3) (Suppl 1): 48S-56S

51. Nolte FS. Laboratory diagnosis of hepatitis C. *Immunol Invest* 1997; 26(1&2): 199-207
52. Albeldawi M, Ruiz-Rodriguez E, Carey WD. Hepatitis C virus: prevention, screening and interpretation of assays. *Clev Clin J Med* 2010; 77(9): 616-626
53. Temizkan G, Arda N. Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler. Nobel Tıp Kitabevleri. İstanbul, 2004, 99-109
54. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genome/probe/doc/TechPCR.shtml> (25 Mayıs 2012 tarihinde ulaşılmıştır.)
55. Valasek MA, Repa JJ. The power of real-time PCR. *Advan in Physiol Edu* 2005; 29: 151-159
56. Viljoen G, Nel LH, Crowther JR. Molecular diagnostic PCR handbook. Hollanda, Springer, 2005; 4-10
57. <http://pharmaxchange.info/press/2011/07/polymerase-chain-reaction-part-iii-variations-or-types-of-pcr-and-future-prospects-of-pcr/> (25 Mayıs 2012 tarihinde ulaşılmıştır.)
58. Sayiner AA. Viral yük tayinleri. In: Ustaçelebi Ş, Badur S, Abacıoğlu H, editors. Moleküler, Klinik ve Tanısal Viroloji. 2006; 289-298
59. VanGuilder HD, Vrana KE, Freeman WM. Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. *Biotechniques* 2008; 44: 619-626
60. Espy MJ, Uhl JR, Sloan LM, Buckwalter SP ve ark. Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. *Clin Microbiol Rev* 2006; 19(1): 165-256
61. Sayiner AA. Kantitatif viral nükleik asid testleri: Değerlendirme parametreleri ve yöntemler. *Moleküler Tanı Dergisi* 2007; 3(1): 59-65
62. <http://pathmicro.med.sc.edu/pcr/realtime-home.htm> (20 Temmuz 2012 tarihinde ulaşılmıştır.)
63. Bustin SA, Nolan T. Pitfalls of quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction. *J Biomol Tech* 2004; 15(3): 155-166
64. Bustin SA, Nolan T, Pfaffl MW. Quantitative real-time RT-PCR - a perspective. *J Mol Endocrinol* 2005; 34: 597-601
65. Bustin SA, Mueller R. Real-time reverse transcription PCR and its potential use in clinical diagnosis. *Clin Sci* 2005; 109: 365-379

66. www.qiagen.com (8 Ocak 2012 tarihinde ulaşılmıştır.)
67. Kreader CA. Relief of amplification inhibition in PCR with bovine serum albumine or T4 gene 32 protein. *App Environ Microbiol* 1996; 62(3): 1102-1106
68. Oikarinen S, Tauriainen S, Viskari H, Simell O ve ark. PCR inhibition in stool samples in relation to age of infants. *J Clin Microbiol* 2009; 44: 211-214
69. Abacıoğlu H, Mehr MA, Yuluğ N. An easy and rapid method for plasmid DNA isolation from encapsulated bacteria. *İnfeksiyon Dergisi* 1995; 9(1-2): 83-84
70. Hale AD, Green J, Brown DW. Comparison of four RNA extraction methods for the detection of small round structured viruses in faecal specimens. *J Virol Methods* 1996; 57(2): 195-201
71. Chan SW, McOmish F, Holmes EC, Dow B ve ark. Analysis of a new hepatitis C virus type and its phylogenetic relationship to existing variants. *J Gen Virol* 1992; 73: 1131-1141
72. McOmish F, Yap PL, Dow BC, Follett EAC ve ark. Geographical distribution of hepatitis C virus genotypes in blood donors: an international collaborative survey. *J Clin Microbiol* 1994; 32(4): 884-892
73. Aman W, Mousa S, Shiha G, Mousa SA. Current status and future directions in the management of chronic hepatitis C. *Virol J* 2012; 9: 57-67
74. Moradpour D, Cerny A, Heim MH, Blum HE. Hepatitis C: an update. *Swiss Med Wkly* 2001; 131: 291-298
75. Kumar D, Malik A, Asim M, Chakravarti A ve ark. Influence of quasispecies on virological responses and disease severity in patients with chronic hepatitis C. *World J Gastroenterol* 2008; 14(5): 701-708
76. Ramirez S, Perez-del-Pulgar S, Forns X. Virology and pathogenesis of hepatitis C virus recurrens. *Liver Transpl* 2008; 14: S27-S35
77. Hermida M, Ferreiro MC, Barral S, Laredo R ve ark. Detection of HCV RNA in saliva of patients with hepatitis C virus infection by using a highly sensitive test. *J Viro Met* 2002; 101: 29-35
78. Lins L, Almeida H, Vitvisk L, Carmo T ve ark. Detection of hepatitis C virus RNA in saliva is not related to oral health status or viral load. *J Med Virol* 2005; 77: 216-220

79. Shafique M, Ahmad N, Awan FR, Mustafa T ve ark. Investigating the concurrent presence of HCV in serum, oral fluid and urine samples from chronic HCV patients in Faisalabad, Pakistan. Arch Virol 2009; 154: 1523-1527
80. Wang CC, Morishima C, Chung M, Engelberg R ve ark. High serum hepatitis C virus RNA load predicts the presence of HCV RNA in saliva from individuals with chronic and acute HCV infection. J Infect Dis 2006; 193: 672-676
81. Gonçalves PL, Cunha CB, Busek SCU, OliveiraGC ve ark. Detection of hepatitis C virus RNA in saliva samples from patients with seric anti-HCV antibodies. Braz J Infect Dis 2005; 9(1): 28-34
82. Couzigou P, Richard L, Dumas F, Schouler L, Fleury H. Detection of HCV-RNA in saliva of patients with chronic hepatitis C. Gut 1993; suppl: S59-S60

8. EKLER

EK 1 - ETİK KURUL RAPORU

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU KARAR FORMU

KARAR BİLGİLERİ	Karar No:2012/05-07		Tarih: 01.03.2012			
	Prof.Dr.Arzu SAYINER'in sorumlusu Tuğçe İŞADAM'ın yürütücüsü olduğu "Kan Dışı Örneklerde Hepatit C Virusu RNA'sının Araştırılması -DEU.HSI.MSc-2009970114" isimli klinik araştırmaya ait başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, etik açıdan çalışmanın gerçekleştirilmesinin uygun olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir.					
	DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU					
ÇALIŞMA ESASI		Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu				
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:		Prof.Dr.Ayşegül YILDIZ				
Unvanı/Adı/Soyadı	Kurumu	Uzmanlık Alanı	Cinsiyet	Araştırma ile ilişki	Katılım *	İmza
Prof.Dr.Ayşegül YILDIZ	Psikiyatri	DEU Tıp Fakültesi Psikiyatri Anabilim Dalı	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☐ H ☐	<i>Lotkova</i>
Dr.Ecz.İskender İNCE	Biyofarmasötik ve Farmakokinetik	Ege Üniversitesi İlaç ve Farmakokinetik Arş-Uyg.Merk.	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☐ H ☐	<i>İnce</i>
Prof.Dr.Hale AKPINAR	İç Hastalıkları (Gastroenteroloji)	DEU Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☐ H ☐	<i>Haefan</i>
Prof.Dr.Caner ÇAVDAR	İç Hastalıkları (Nefroloji)	DEU Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☐ H ☐	<i>Caner Çavdar</i>
Prof.Dr.Nuray DUMAN	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları (Yeni Doğan)	DEU Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☐ H ☐	<i>Nuray Duman</i>
Prof.Dr.Hülya ELLİDOKUZ	Halk Sağlığı	DEU Onkoloji Enstitüsü Prevaltif Onkoloji A.D.	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☐ H ☐	<i>Hülya Ellidokuz</i>
Prof.Dr.Dayimi KAYA	Kardiyoloji	DEU Tıp Fakültesi Kardiyoloji Anabilim Dalı	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☐ H ☐	<i>Dayimi Kaya</i>
Prof.Dr.Murat ÖZGÖREN	Biyofizik	DEU Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☐ H ☐	<i>Lotkova</i>
Prof.Dr.Yeşim ÖZTÜRK	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları (Gastroenteroloji)	DEU Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☐ H ☐	<i>Lotkova</i>
Prof.Dr.Erol TAVMERGEN	Kadın Hastalıkları ve Doğum	Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☐ H ☐	<i>Erol Tavmergen</i>
Prof.Dr.Yeşim TUNÇOK	Farmakoloji	DEU Tıp Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☐ H ☐	<i>Yeşim Tunçok</i>
Prof.Dr.Şule KALKAN	Farmakoloji	DEU Tıp Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☐ H ☐	<i>Şule Kalkan</i>
Doç.Dr.Taner DAĞCI	Fizyoloji	Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☐ H ☐	<i>Doç.Dr.Taner Dağcı</i>
Tayfun OZANKAYA	Hukuk	Serbest	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☐ H ☐	<i>Lotkova</i>
İhsan ÇELİKDEMİR	75.Yıl Özel İlköğretim Okulu Md. Yard.	Sağlık Mesleği Mensubu Olmayan Üye	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☐ H ☐	<i>İhsan Çelikdemir</i>

* :Toplantıda Bulunma

EK 2 - ÖZGEÇMİŞ

Tuğçe İşadam

TC Kimlik No / Pasaport No:	49714281602
Doğum Yılı:	1987
Yazışma Adresi :	Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü İnciraltı-İZMİR
e-posta :	tugceisadam@gmail.com

EĞİTİM BİLGİLERİ

Ülke	Üniversite	Fakülte/Enstitü	Öğrenim Alanı	Derece	Mezuniyet Yılı
Türkiye	Ege Üniversitesi	Fen Fakültesi	Biyoloji	Lisans	2009
Türkiye	Dokuz Eylül Üniversitesi	Sağlık Bilimleri Enstitüsü	Tıbbi Mikrobiyoloji	Yüksek Lisans	Halen

Kurum/Kuruluş	Ülke	Şehir	Bölüm/Birim	Görev Türü	Görev Dönemi
Özel Kuşadası Hastanesi	Türkiye	Aydın	Mikrobiyoloji Laboratuvarı	Stajer	15.08.2007-31.08.2007
Universal Ege Sağlık Hastanesi	Türkiye	İzmir	Mikrobiyoloji ve Biyokimya Laboratuvarı	Stajer	16.06.2008-11.07.2008
Özel İlgi Polikliniği	Türkiye	İzmir	Mikrobiyoloji ve Biyokimya Laboratuvarı	Stajer	13.06.2011-24.06.2011