

Hepatit C Virüs (HCV) Genotiplerinin “Reverse Hybridisation Strip Assay” ve DNA Dizi Analizi Yöntemleriyle Araştırılması

Investigation of Hepatitis C Virus (HCV) Genotypes by “Reverse Hybridisation Strip Assay” and DNA Sequence Analysis Methods

Pelin ÖZMEN¹(ID), Selma GÖKAHMETOĞLU²(ID)

¹ Nevşehir Hacı Bektaş Veli Üniversitesi, Dış Hekimliği Fakültesi, Temel Tıp Bilimleri, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Nevşehir.

¹ Nevşehir Hacı Bektaş Veli University Faculty of Dentistry, Basic Medical Sciences, Department of Medical Microbiology, Nevşehir, Turkey.

² Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kayseri.

² Erciyes University, Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Kayseri, Turkey.

*Bu çalışma, S. Ulusal Klinik Mikrobiyoloji Kongresi (KLİMUD) (28 Ekim -1 Kasım 2019, İzmir, Türkiye)'nde sözlü bildiri olarak sunulmuştur.

**Bu çalışma, Pelin Özmen'in doktora tez projesi olup Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje Kodu: TDK-2018-8251).

Makale Atfı: Özmen P, Gökahmetoğlu S. Hepatit C Virüs (HCV) genotiplerinin “reverse hybridisation strip assay” ve DNA dizi analizi yöntemleriyle araştırılması. Mikrobiyol Bul 2022;56(1):68-80.

ÖZ

Hepatit C Virüsü (HCV), tüm dünyada yaklaşık 185 milyon insanı enfekte ettiği tahmin edilen ve her yıl 350 000 kişinin ölümüne sebep olan bir virüsdür. HCV'nin yedi genotipi ve 100'den fazla alt tipi bulunmaktadır. HCV tedavisinde hedef, kalıcı virolojik yanıt (KVY) olup, KVY'yi belirleyen en önemli virolojik faktörler, genotip ve başlangıçtaki HCV-RNA düzeyleridir. Bu çalışmada, “line probe assay (LIPA)” yöntemiyle saptanan HCV genotiplerinin ve alt tiplerinin, dizi analiziyle karşılaştırılması amaçlanmıştır. Kronik hepatit C enfeksiyonu tanısı almış, HCV RNA viral yükü 10^4 IU/ml ve üzeri olan 212 hasta örneğinde LIPA (NLM analytica, İtalya) ve dizi analizi yöntemleriyle HCV genotip ve alt tipleri araştırılmıştır. LIPA yönteminde 5'UTR ve kor bölgeleri, dizi analizi yönteminde ise NS5B gen bölgesi çalışılmıştır. NS5B gen bölgesinde 340 bp'lik bölge hemi-nested polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemiyle çoğaltıldıktan sonra, dizi analizi işlemleri (ABI 3500 Genetic Analyzer, Applied Biosystems, ABD) gerçekleştirilmiştir. İstatistiksel analizler, TURCOSA Analytics programı kullanılarak yapılmıştır. Çalışmada, LIPA yöntemiyle HCV genotip ve alt tipleri araştırılan 212 hastanın 40 (%18.8)'inde Genotip 1a, 97 (%45.75)'inde genotip 1b, 7 (%3.3)'inde genotip 2, 12 (%5.6)'inde genotip 2a/c, 2 (%0.94)'inde genotip 2b, 19 (%8.96)'unda genotip 3, 16 (%7.55)'sında genotip 4, 1 (%0.47)'inde genotip 4a, 15(%7.5)'inde genotip 4c/d, 1 (%0.47)'inde genotip 4h ve 2 (%0.94)'sında genotip 5 bulunmuştur. Dizi analizi yöntemiyle değerlendirilen 212 hastanın 20 (%9.43)'sında genotip 1a, 118 (%55.6)'inde genotip 1b, 16 (%7.55)'sında genotip

İletişim (Correspondence): Dr. Öğr. Üyesi Pelin Özmen, Nevşehir Hacı Bektaş Veli Üniversitesi, Dış Hekimliği Fakültesi, Temel Tıp Bilimleri, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Nevşehir, Türkiye. **Tel (Phone):** +90 384 228 10 00, **E-posta (E-mail):** pelin.ozmen@nevsehir.edu.tr

2a, 4 (%1.89)'ünde genotip 2b, 1 (%0.47)'inde genotip 2k, 21 (%9.91)'inde genotip 3a, 2 (%0.94)'sinde genotip 4a, 28 (%13.21)'inde genotip 4d ve 2 (%0.94)'sinde genotip 5a saptanmıştır. İki yöntem arasındaki sonuç farklılığı istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.001$). Viral yük-genotip ilişkisine göre, en yüksek viral yük genotip 1a hastalarında saptanmıştır ($p < 0.001$). Sonuç olarak, çalışmamızda HCV genotip ve alt tiplerinin belirlenmesi amacıyla, LIPA ve dizi analizi yöntemleri karşılaştırılmış ve iki yöntem arasındaki genotip uyumu; genotip bazında %97.5, alt tip bazında %19 olarak saptanmıştır. Kronik HCV hastalarında direkt etkili antiviral (DEA) tedavi protokolü, genotip/alt tip tayinine göre planlandığından, rutinde yaygın olarak kullanılan LIPA yönteminde elde edilen sonuçların dizi analizi yöntemiyle uyumsuzluğu dikkate değerdir ve bu sonuçların daha fazla sayıda örnek içeren çalışmalarla desteklenmesi gerektiği kanaatine varılmıştır.

Anahtar kelimeler: HCV; revers hibridizasyon; dizi analizi; genotip; alt tip.

ABSTRACT

Hepatitis C Virus (HCV) is a virus that is estimated to infect approximately 185 million people worldwide and causes 350 000 deaths each year. The target in HCV treatment is the sustained virological response (SVR), and the most important virological factors determining SVR are genotype and baseline HCV-RNA levels. In this study, it was aimed to compare the HCV genotypes and subtypes detected by the "line probe assay (LIPA)" method with sequence analysis. HCV genotypes and subtypes were investigated by line probe assay (LIPA) (NLM analytica, Italy) and sequence analysis methods in 212 patients with chronic HCV diagnosis and with HCV RNA viral load of 10^4 IU/ml and above. 5'UTR and core regions were studied in LIPA method and NS5B gene region was studied in the sequencing method. After amplifying 340 bp region in the NS5B gene region with the hemi-nested PCR method, sequence analysis (ABI 3500 Genetic Analyzer [Applied Biosystems, USA]) was performed. Statistical analysis of the study was determined by using TURCOSA Analytics program. In the study, HCV genotypes and subtypes that were determined in 212 patients by LIPA method were; 40 (18.8%) genotype 1a, 97 (45.75%) genotype 1b, 7 (3.3%) genotype 2, 12 (5.6%) genotype 2a/c, 2 (0.94%) genotype 2b, 19 (8.96%) genotype 3, 16 (7.55%) genotype 4, 1 (0.47%) genotype 4a, 15 (7.5%) genotype 4c/d, 1 (0.47%) genotype 4h and 2 (0.94%) genotype 5. The HCV genotypes and subtypes determined in 212 patients by sequence analysis were; 20 (9.43%) genotype 1a, 118 (55.6%) genotype 1b, 16 (7.55%) genotype 2a, 4 (1.89%) genotype 2b, 1 (0.47%) genotype 2k, 21 (9.91%) genotype 3a, 2 (0.94%) genotype 4a, 28 (13.21%) genotype 4d and 2 (0.94%) genotype 5a. The difference in results between the two methods was found to be statistically significant ($p < 0.001$). According to the viral load-genotype relationship, the highest viral load was detected in genotype 1a patients ($p < 0.001$). In conclusion, in order to determine HCV genotypes and subtypes in our study, LIPA and sequence analysis methods were compared and the genotype compatibility between the two methods were determined as 97.5% on the basis of genotype and 19% on the basis of subtype. Since the direct-acting antiviral (DEA) treatment protocol in chronic HCV patients is planned according to the genotype/subtype determination, the inconsistency of the results obtained in the LIPA method, which is routinely widely used, with the sequence analysis method is remarkable, and it was concluded that these results should be supported by studies containing more samples.

Keywords: HCV; reverse hybridization; sequence analysis; genotype; subtype.

GİRİŞ

HCV, tüm dünyada yaklaşık 185 milyon insanı enfekte ettiği tahmin edilen ve her yıl yaklaşık 350 bin kişinin ölümüne sebep olan bir virüsdür. HCV ile enfekte olguların %20'sinde akut enfeksiyon, %80'inde kronik enfeksiyon tablosu gelişmekte; kronikleşen olguların %15-20'sinde siroz, sirozlu olguların ise %1-4'ünde hepatosellüler karsinoma (HSK) görülmektedir¹.

HCV, yüksek replikasyon hızına sahip bir virüs olup, genomunda "proofreading" (düzeltme) mekanizmalarının bulunmaması sebebiyle, yedi adet genotip ve 100'den fazla alt tip sahiptir².

HCV tedavisinde ana hedef KVV'dir. KVV'yi belirleyen virolojik açıdan en önemli faktörler, genotip ve başlangıçtaki HCV-RNA düzeyleridir. Genotip ve alt tip çeşitliliği, kronik HCV'li hastalarda farklı tedavi rejimlerini beraberinde getirmiştir. Bu nedenle HCV'li hastalarda, genotip ve alt tip ayrımının yapılması önerilmekte ve buna bağlı olarak DEA tedavi rejimi planlanmaktadır³.

Genotip ve alt tip ayrımını yapmak için pek çok tanı yöntemi geliştirilmiştir. Bugün HCV'nin genotip ve alt tip ayrımını yapabilen altın standart yöntemin dizi analizi olduğu bilinmektedir. Yapılan araştırmalar göstermiştir ki genotiplerdeki farklılık tüm HCV genomu boyuncadır ve bu nedenle genomun bir bölgesi üzerinden dizileme yapmak yeterli olacaktır. Burada önemli olan nokta, genotip ve alt tip tayinini yapacak doğru gen bölgesini seçmektir⁴.

Rutin laboratuvarlarda sıklıkla kullanılan revers hibridizasyon yöntemlerinden olan LIPA, virüs genomundaki 5'UTR ve/veya kor bölgesinin amplifikasyon ürünlerinin revers hibridizasyonu esasına dayalı DNA şerit teknolojisiyle hazırlanmış bir tekniktir. Ancak, 5'UTR bölgesinin genotip tayininde yetersiz kalması, özellikle genotip özgüllüğünün düşük olması, tedavinin amacına ulaşmasını engellemektedir. Genotiplemede en detaylı ve doğru sonuçlar; kor, E1 ve/veya NS5B bölgesinin PCR ile çoğaltılıp dizi analizinin yapılmasıyla elde edildiği çalışmalarda gösterilmiştir⁵.

Bu araştırmada, LIPA yöntemiyle saptanan HCV genotiplerinin ve alt tiplerinin, altın standart yöntem olan dizi analiziyle karşılaştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu onayı ile gerçekleştirildi (Tarih: 22.12.2017 ve Karar No: 2017/606). Araştırma, Erciyes Üniversitesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Viroloji Laboratuvarında ve aynı üniversiteye bağlı bir araştırma merkezinde gerçekleştirildi. Çalışmanın revers hibridizasyon testi ile hemi-nested PCR analizleri Anabilim Dalı Laboratuvarları'nda, dizi analizi işlemi Araştırma Merkezi'nde gerçekleşti.

Hastalar ve Örnekler

Kronik HCV enfeksiyonu tanısı almış, HCV RNA viral yükü 10^4 IU/ml ve üzeri olan, antiviral tedavi almamış, 114'ü kadın, 98 'i erkek toplam 212 hasta örneği prospektif olarak planlanan çalışmaya dahil edildi.

HCV genotip tayini için, revers hibridizasyon şerit yöntemi olarak LIPA ve Sanger dizi analizi yöntemleri kullanıldı.

LIPA yöntemi ile HCV Genotip Tayini

HCV RNA izolasyonu, EZ1 Advanced cihazı (Qiagen, Almanya) kullanılarak üretici firmanın ön gördüğü EZ1 Virüs Minikit v2.0 (Qiagen, Almanya) test kiti prosedürüne uygun olarak yapıldı. Revers transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) HCV RNA Real time Qualitativo 2.0 (NLM Analytica, İtalya) kiti ile çalışıldı. Genotipleme LIPA GEN-C 2.0 (NLM, İtalya) kiti ile revers hibridizasyonu esasına göre çalışıldı. HCV genomunun

5'UTR ve kor bölgesinden sentezlenen DNA ürününe, biyotin bağlanarak sabitlenmiş oligonükleotit problemlerle hibridize edilmesi sağlandı. Alkalın fosfataz enzimi bağlanmış streptavidin bileşiği, biyotinle işaretli DNA'ya eklenip kromojen madde ile etkileşerek nitroselüloz şeritler üzerinde mor-kahverengi bantlar meydana getirdi. Bantlar, üretici firmanın yorumlama kartları ile eşleştirilerek genotip ve alt tipler belirlendi.

Dizi Analizi ile HCV Genotip Tayini

HCV genotiplerinin tayininde Sanger yöntemi ile dizi analizi işlemleri yapıldı. HCV'nin genomundaki 370 baz çifti (bp) büyüklüğündeki NS5B gen bölgesine yönelik dizi analizi gerçekleştirildi. HCV genomunda NS5B gen bölgesindeki 370 kb'lık kısım iki aşamalı PCR ile çoğaltıldı. PCR ürünlerinin saflaştırılmasını takiben, dizi analizine yönelik PCR uygulandı. Dizi analizine yönelik yapılan PCR ürünlerinin saflaştırılmasının ardından, örnekler kapiller sistemli otomatik dizi analizi cihazı olan ABI 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, ABD) cihazında çalışıldı. Kullanılan primerler Tablo I'de gösterilmiştir⁶.

Dizi Analizi ile Elde Edilen Verilerin Değerlendirilmesi

Elde edilen dizilerin analizi hcv.lanl.gov/content/sequence/BASIC_BLAST/basic_blast.html ve blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi programları kullanılarak yapıldı.

İstatistiksel Analiz

Çalışmanın istatistiksel analizleri TURCOSA Analytics programı kullanılarak yapıldı. HCV genotip tayininde dizi analizi yöntemi altın standart olduğu için, dizi analizi yöntemiyle elde edilen HCV genotip sonuçları baz alınarak hastaların demografik özellikleriyle ilgili istatistiksel analiz yapıldı. Viral yük ile cinsiyet; viral yük ile genotip; yaş ile viral yük ilişkileri Mann-Whitney U testi ile değerlendirildi. Ayrıca viral yük-genotip ilişkisinde anlamlılık, Shapiro Wilk normallik testiyle belirlendi.

LIPA ile dizi analizi sonuçlarının farklılığı Pearson ki-kare, Yates ki-kare, olabilirlik oranı ve Fisher's exact testleri ile değerlendirildi.

BULGULAR

Çalışmaya HCV RNA viral yükü 104 IU/ml ve daha yukarı olan kronik HCV tanısı almış 114'ü kadın, 98'i erkek 212 hasta dahil edilmiştir. Ortalama yaş; 58.5; ortanca yaş; 55.5 olarak saptanmış, viral yük ortalaması log 6.1 IU/ml olarak bulunmuştur.

Çalışmada, LIPA yöntemiyle HCV genotip ve alt tipleri araştırılan 212 hastanın 40 (%18.8)'inde genotip 1a, 97 (%45.75)'inde genotip 1b, 7 (%3.3)'inde genotip 2, 12

Tablo I. HCV Genomu NS5B Gen Bölgesi PCR Primerleri

Primer	Polaritesi	Primer Baz Dizisi (5'-3')	Pozisyon
PR 3.1	Sense	5'-TAT GAY ACC CGC TGY TTT GAY TC-3'	8256-8278
PR 4	Antisense	5'-GCN GAR TAY CTV GTC ATA GCC TC-3'	8622-8644
PR 5	Antisense	5'-GCT AGT CAT AGC CTC CGT-3'	8619-8636

(%5.6)'sinde genotip 2a/c, 2 (%0.94)'sinde genotip 2b, 19 (%8.96)'unda genotip 3, 16 (%7.55)'sında genotip 4, birinde (%0.47) genotip 4a, 15 (%7.5)'inde genotip 4c/d, 1 (%0.47)'inde genotip 4h ve ikisinde (%0.94) genotip 5 bulunmuştur. Dizi analizi yöntemiyle değerlendirilen 212 hastanın 20 (%9.43)'sinde genotip 1a, 118 (%55.6)'inde genotip 1b, 16 (%7.55)'sında genotip 2a, 4 (%1.89)'ünde genotip 2b, birinde (%0.47) genotip 2k, 21 (%9.91)'inde genotip 3a, ikisinde (%0.94) genotip 4a, 28 (%13.21)'inde genotip 4d ve ikisinde (%0.94) genotip 5a saptanmıştır.

Buna göre, LIPA ile 40 hastada genotip 1a saptanırken, dizi analiziyle 20 hastada genotip 1a bulunmuştur. Ayrıca genotip 2 ve genotip 4 tayininde LIPA ile tiplendirilemeyen örnekler, dizi analizi ile alt tiplerine göre tanımlanmıştır. LIPA ile genotip 2a/c olarak saptanan 12 hastanın, dizi analizi ile 10'u genotip 2a, biri genotip 2b ve biri genotip 2k olarak bulunmuştur. LIPA ile alt tiplendirilememiş ve genotip 2 olarak saptanmış yedi örneğin, biri genotip 2b geri kalanı ise genotip 2a olarak dizi analiziyle belirlenmiştir.

LIPA ile genotip 4 olarak saptanan 16 örneğin, 13'ü genotip 4d, biri genotip 3a, biri genotip 4a ve biri genotip 1b olarak dizi analizinde tiplendirilmiştir. LIPA ile genotip 4c/d saptanan 15 örneğin, dizi analiziyle 13'ü genotip 4d, biri genotip 4a ve biri genotip 1b'dir. LIPA ile genotip 4h olarak saptanan örnek, dizi analizinde genotip 4d olarak saptanmıştır.

Genotip 3 örneklerinde, LIPA ile alt tiplendirmeye gidilememiş ve 19 örneğin tamamı dizi analizi ile genotip 3a bulunmuştur. Aynı şekilde genotip 5 olarak LIPA ile saptanmış iki örnek, dizi analiziyle genotip 5a olarak tiplendirilmiştir. LIPA ve dizi analizi sonuçlarına göre HCV genotip ve alt tiplerinin dağılımı Tablo II'de gösterilmiştir.

Tablo II. LIPA ve Dizi Analizi Sonuçlarına Göre HCV Genotip/Alt Tiplerinin Dağılımı

Dizi analizi sonuçları										
LIPA sonuçları	Gn 4d	Gn 3a	Gn 1a	Gn 1b	Gn2a	Gn 2b	Gn 2k	Gn 4a	Gn 5a	Toplam
Gn 1a	-	-	17	23	-	-	-	-	-	40
Gn 1b	-	1	3	93	-	-	-	-	-	97
Gn 2	-	-	-	-	6	1	-	-	-	7
Gn 2a/c	-	-	-	-	10	1	1	-	-	12
Gn 2b	-	-	-	-	-	2	-	-	-	2
Gn 3	-	19	-	-	-	-	-	-	-	19
Gn 4	13	1	-	1	-	-	-	1	-	16
Gn 4a	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1
Gn 4c/d	13	-	-	1	-	-	-	1	-	15
Gn 4h	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1
Gn 5	-	-	-	-	-	-	-	-	2	2
Toplam	28	21	20	118	16	4	1	2	2	212

Gn: Genotip; LIPA: Line probe assay.

Her iki yöntemin sonuçları karşılaştırıldığında; genotip bazında %97.5 oranında uyum görülürken bu oran alt tip bazında %19'dur. İki yöntem arasındaki sonuç farklılığı istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.001$).

Viral yük-cinsiyet ve viral yük-yaş arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır ($p > 0.001$). Dizi analizi yöntemiyle saptanan verilere göre; viral yük-genotip ilişkisi değerlendirilmiş, en yüksek viral yük genotip 1a hastalarında saptanmıştır (Shapiro Wilk normallik testi, $p < 0.001$).

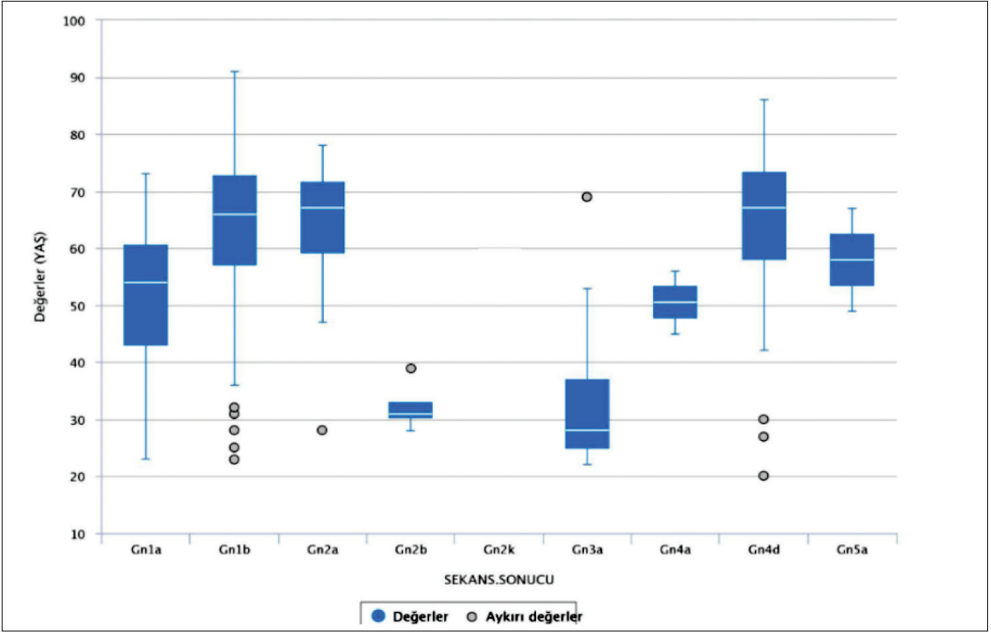
LIPA ve dizi analizi sonucuna göre HCV genotip 1a saptanan erkek hastalar 40-50 yaş aralığındayken, kadın hastalar 50-60 yaş aralığında saptanmıştır. Her iki yöntemle genotip 1b hastaları 60 yaş üstü grupta bulunmuştur. LIPA ile genotip 2 ve genotip 2a/c bulunan hastalar erkek ve kadınlarda 50-60 yaş aralığında görülürken, genotip 2b; 30 yaş altı erkeklerde görülmüştür. Genotip 3, erkeklerde 30 yaş altında, kadın hastalarda ise 40 yaş üstünde saptanmıştır. LIPA ile genotip 4 olarak bulunan hastalar, her iki cinsiyette de 50-70 yaş arasında dağılım göstermiş olup, genotip 4h bulunan bir hasta 75 yaş üstü grupta yer almıştır. Genotip 4c/d saptanan kadın ve erkek hastaların da 60 yaş altı grupta olduğu gözlenmiştir. HCV genotip 5, sadece kadınlarda saptanmıştır (Tablo III).

Dizi analizi sonucuna göre genotip 2a olarak belirlenen hastalar hem kadın, hem de erkeklerde 60 yaş üstü olarak tespit edilmiştir. Genotip 2b erkek hastalarda 35 yaş altında görülürken, genotip 2k, 60 yaş üstünde saptanmıştır. Genotip 3a, LIPA sonuçlarında olduğu gibi 30 yaş altı erkeklerde yoğun görülürken, kadın hastalarda 40-50 yaş aralığında görülmüştür. Genotip 4a ve 4d kadın hastalarda 50 yaş üstünde, erkek hastalarda 40-50 yaş aralığında gözlenmiştir. Genotip 5a saptanan her iki kadın hasta Suriye uyruklu ve 40 yaş üstü olarak belirlenmiştir. Dizi analizi ile saptanan HCV genotip ve alt tiplerinin yaşa göre dağılımı Şekil 1'de, yaş-cinsiyet-genotip ilişkisi Şekil 2'de gösterilmiştir.

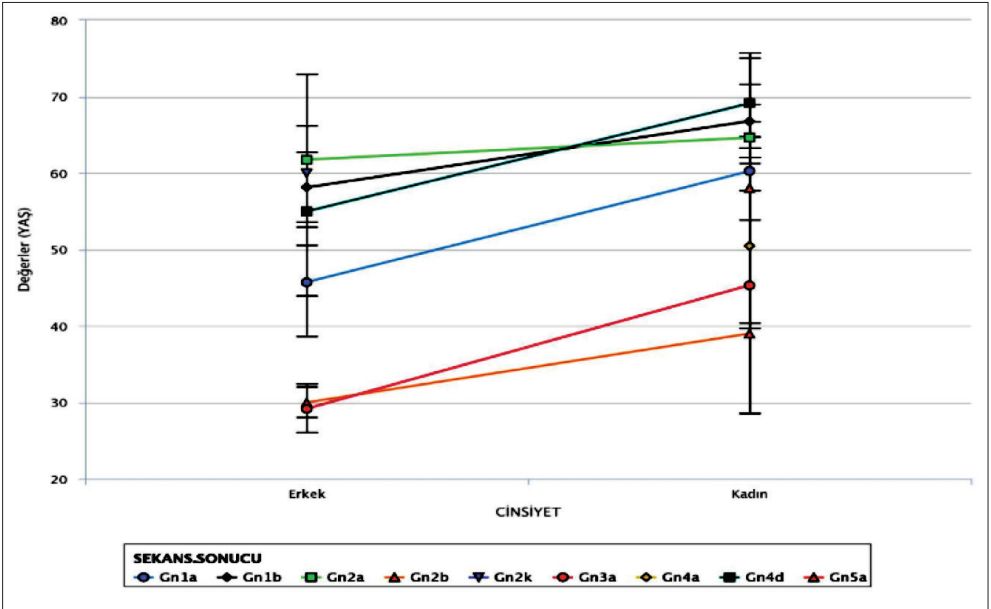
Tablo III. LIPA ve Dizi Analizi Sonuçlarına Göre Genotip/Alt Tiplerin Cinsiyet Dağılımı

LIPA ile saptanan genotipler	Kadın	Erkek	Dizi analizi ile saptanan genotipler		
			Kadın	Erkek	
Gn 1a	25	15	Gn 1a	8	12
Gn 1b	55	42	Gn 1b	71	47
Gn 2	1	6	Gn 2a	8	8
Gn 2a/c	8	4	Gn 2b	1	3
Gn 2b	0	2	Gn 2k	0	1
Gn 3	5	14	Gn 3a	6	15
Gn 4	8	8	Gn 4a	2	0
Gn 4a	1	0	Gn 4d	16	12
Gn 4c/d	8	7	Gn 5a	2	0
Gn 4h	1	0			
Gn 5	2	0			

LIPA: Line probe assay.



Şekil 1. Dizi analizi ile saptanan HCV genotip ve alt tiplerinin yaşa göre dağılımı.



Şekil 2. Dizi analizi sonucuna göre yaş-cinsiyet-genotip dağılım grafiği.

TARTIŞMA

HCV enfeksiyonu tedavisinde, ana hedef olan KVV, HCV genotip ve alt tiplerinin belirlenmesi ile özelleşen DEA tedavisiyle mümkündür. Bu nedenle, rutin laboratuvarlarda gerçek zamanlı PCR ve revers hibridizasyon yöntemleri sıklıkla uygulanmaktadır ancak altın standart yöntem dizi analizidir⁷.

Tüm dünyada en sık görülen HCV genotip 1b olup, bazı HCV genotipleri (genotip 1, genotip 2 ve genotip 3) dünyada ve ülkemizde yaygın olarak, bazı genotipler (genotip 4, genotip 5 ve genotip 6) belli coğrafyalarda bildirilmektedir. Genotip 7 hakkında bugüne kadar bildirilen tek olgu, Orta Afrikalı, Kanada'da yaşayan bir göçmen hastadır⁸. Amerika kıtasında %74.5 oranında genotip 1, %10.6 oranında genotip 3, %10.2 oranında genotip 2 görülürken; Asya'da; genotip 1 %46.6, genotip 3 %22.4, genotip 2 %18.6 ve genotip 6 %7 oranında bildirilmiştir. Sahra altı Orta Afrika'da en yaygın görülen genotip, %82.9 ile genotip 4 olup, bunu sırasıyla genotip 1 (%12.3), genotip 2 (%4), genotip 3 (%0.8) takip eder. Genotip 1, %64.4 ile Avrupa'da en yaygın görülen genotiptir. İkinci sırada %25.5 ile genotip 3 ve sonrasında %5.5 ile genotip 2 gelmektedir⁹.

Dünyadaki genotip dağılımına benzer olarak, ülkemizde de en sık görülen genotip genotip 1'dir^{10,11}. Çalışmamızda, Türkiye geneli ile uyumlu olarak LIPA (%45.75) ve dizi analizi (%55.6) yöntemleriyle genotip 1b, en yaygın görülen genotip olmuştur.

Ülkemizde genotip 2, 3 ve 4 düşük sıklıkta bildirilmektedir. Ancak çeşitli bölgelerde bu genotiplerin sıklığı değişebilmektedir. Çalışkan ve arkadaşlarının Kahramanmaraş'ta yaptığı bir çalışmada¹², HCV genotip dağılımları araştırılmış ve genotip 1b %51.7 ile ilk sırada, genotip 3 %46 ile ikinci sırada yer almıştır. Nevşehir'de yapılan bir çalışmada HCV genotip dağılımlarında en yaygın genotip %45.1 ile genotip 1 iken, ikinci genotip, genotip 2 (%14.5)'dir¹³. Kayseri bölgesinde yapılan HCV genotip tayini çalışmalarında ise sırasıyla birinci sırada genotip 1 (%62; %62.4) ikinci sırada genotip 4 (%35.6; %32) saptanmıştır^{14,15}.

Çalışmamızda, dizi analizi ile elde ettiğimiz veriler Kayseri bölgesinde yapılan çalışmaların sonuçlarıyla uyumludur. LIPA yöntemiyle HCV genotip ve alt tipleri araştırılan 212 hastanın 97 (%45.75)'sinde genotip 1b en sık görülen genotip, ikinci sırada ise 40 hastada (%18.8) saptanan genotip 1a yer almıştır. Genotip 4 ise 32 hastada (%15.09) saptanarak üçüncü en sık görülen genotip olmuştur. Dizi analizi yöntemiyle tekrar çalışılan 212 hastanın 118 (%55,6)'inde genotip 1b, 28 (%13.21)'inde genotip 4d, 20 (%9.43)'sinde genotip 1a, 16 (%7.55)'sında genotip 2a, dördünde (%1.89) genotip 2b, birinde (%0.47) genotip 2k, 21 (%9.91)'inde genotip 3a, ikisinde (%0.94) genotip 4a ve ikisinde (%0.94) genotip 5a saptanmıştır. Dizi analizi yöntemiyle saptanan HCV genotip dağılımının, daha önceden aynı bölgede yapılmış çalışmalarla benzer olması, genotiplemede dizi analizi yönteminin önemini bir kez daha ortaya koymuştur.

Görülme sıklığı Sahra altı Güney Afrika'da %35.7; Doğu Afrika'da %13, Kuzey Afrika ve Ortadoğu'da %0.3 olarak bildirilen genotip 5, dünyanın diğer bölgelerinde %0.1'in altın-

da oranlarda saptanmıştır. Ülkemizde Suriyeli göçmenleri de kapsayan hasta gruplarıyla HCV genotip çalışmaları yapılmaktadır. Adana bölgesinde yapılan bir araştırmada %0.8 oranında genotip 5a saptanmış olup, çalışmaya dahil edilen hastaların %9'unu Suriyeli mülteciler oluşturmuştur¹⁶.

Güney bölgelerimizde özellikle Suriyeli hastalar nedeniyle değişen HCV epidemiyolojisini doğrulayan bir çalışma da Cirit ve arkadaşları tarafından yapılmıştır. Çalışmaya göre, bölgedeki Suriyeli hastalar arasında en yaygın genotip; genotip 4 (%48.2) iken, genotip 1 (%41.4) ve genotip 5 (%8.7) bunu takip etmiştir¹⁷.

Çalışmamızda LIPA ile genotip 5 olarak saptanan iki hasta (%0.94) dizi analizi ile genotip 5a olarak belirlenmiş olup, hastaların Suriye uyruklu olması dünya genelindeki genotip dağılımlarına bakıldığında anlamlıdır (Tablo II). Savaş, göç gibi toplumsal olaylar bölgeimizdeki HCV epidemiyolojisini etkilemektedir.

Çalışmamızda genotip 1a LIPA ile 40 hastada, dizi analizi ile 20 hastada saptanmıştır. LIPA ile dizi analizi sonuçları karşılaştırıldığında, genotip 1a-1b ayrımı ile, genotip 2 ve genotip 4'lerin alt tiplendirilmesinde LIPA yetersiz kalmıştır (Tablo II). İki yöntem arasındaki sonuç farklılığı istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.001$).

Tedavi uygulanan hastalarda genotip 1a tedavisi için sirozlu hastalarda 24 hafta, siroz gelişmemiş hastalarda 12 hafta ribavirin+DEA tedavisi, genotip 1b hastalarında ise siroz olsun ya da olmasın ribavirin harici 12 haftalık tedavi uygulanmaktadır¹⁸. LIPA sonucu ile genotip 1a bulunan ancak dizi analizi ile aslında genotip 1b olduğu ortaya çıkan hastalara daha uzun ve daha ağır genotip 1a tedavisi uygulanması gereksiz ve risklidir. Her ne kadar rutin laboratuvarlarda deneyimli personel gerektiren, zahmetli ve uzun sürede sonuç veren dizi analizi teknikleri tercih edilmese de, tedavi rejiminin genotip 1 ile enfekte hastalarda alt tipe göre farklılık göstermesinden dolayı doğrulama testi olarak rutin kullanıma alınması gerektiği düşünülmüştür.

Peng ve arkadaşlarının çalışmasında¹⁹, genotip 1b, 50 yaş üstü hastalarda %59.9 ile en sık görülen genotip olurken, 30-40 yaş aralığındaki erkek hastalarda %75 oranında genotip 3b saptanmış, benzer bir çalışmada²⁰, genotip 1b, genotip 2 ve genotip 5 ile enfekte hastaların yaş ortalamaları; genotip 1a, genotip 3 ve genotip 4 ile enfekte hastalardan anlamlı derecede yüksek bulunmuştur.

Çalışmamızda en yüksek yaş ortalamasına sahip hastaların genotip 1b ile enfekte olması ve en genç hasta grubunun genotip 3a ve genotip 2b hastalarının olması literatürle uyumludur. Benzer olarak, Sağlık ve arkadaşlarının kronik hepatit C enfeksiyonlu hastalarda genotip dağılımını araştırdığı bir çalışmada²¹, genotip 1 ile enfekte hastaların yaş ortalaması diğer genotiplerle enfekte hastalara göre yüksek bulunmuştur. Ülkemizde HCV enfeksiyonu, çoğunlukla güvenli olmayan tıbbi girişimler sonrasında edinilmiş olup, özellikle yaş grubunun en yüksek olduğu genotip 1b hastalarında bu bulaş yolu yaygındır. Çalışmamızda hastalar, bulaş yolu açısından değerlendirilmemiştir ancak damar içi uyuşturucu (DİU) kullanıcılarında yaygın görülen genotip 3a alt tipinin 35 yaş altı genç erkeklerde ve

genotip 1b hastalarının 60 yaş üstünde saptanması, literatürle uyumlu bulunmuştur^{9,20}. Bu durum, güvenli olmayan tıbbi uygulamalar sonucu bulaşı önlemek adına özellikle kan transfüzyonu öncesindeki viral hepatitler yönünden yapılan tarama testleriyle genotip 1b insidansında azalmaya ancak genotip 2 ve genotip 3'ün DiU kullanımının yaygın olduğu gelişmiş ülkelerdeki oranlara yaklaşacağını düşündürmektedir. Ayrıca çalışmamızda düşük oranlarda saptanan (%0.94) genotip 5a'ların ilerleyen zamanlarda ülkemizdeki göçmen sayısının artmasıyla yükselebileceği de açıktır.

Viral yük ile HCV genotiplerinin ilişkisi değerlendirildiğinde, dizi analizi sonuçlarına göre genotip 1a ile enfekte hastalarda HCV RNA düzeyi en yüksek bulunmuş olup bunu genotip 1b ve genotip 4 ile enfekte hastaların viral yükleri izlemiştir. Genotip 1a, 1b ve genotip 4 hastalarında diğer genotiplere oranla daha yüksek viral yük saptanan Nemoz ve arkadaşlarının çalışması²², çalışmamızdaki sonuçlarla uyumludur. Ngoc ve arkadaşları²³, akut ve kronik hepatit C hastalarında genotip dağılımı ile viral yük parametresini değerlendirmiş ve akut hepatit C enfeksiyonu olan hastalarda viral yükün daha yüksek seyrettiğini bildirmişlerdir. Çalışmamızdaki hastaların kronik HCV enfeksiyonuna sahip olması ve genotip 1a, genotip 1b ve genotip 4 hastalarının HCV RNA düzeyleri arasında yüksek düzeyde bir farkın bulunmaması viral yükün kronik HCV'li hastalarda genotipe bağlı bir değişken olmadığını düşündürmektedir.

Rutin tanıda sıklıkla kullanılan ticari genotipleme testleri, düşük maliyetli ve hızlı sonuç veren testlerdir. Ancak bu testlerde, hedef bölge olarak son derece korunmuş olan 5'UTR bölgesi çalışılmaktadır. LIPA yönteminde önceleri tek hedef bölge olarak 5'UTR bölgesi kullanılırken, güncellenmiş versiyonlarında genotip 1a ve genotip 1b ayrımı için kor bölgesi de eklenmiştir. Buna rağmen, LIPA yönteminin özellikle genotip 1a-1b ve genotip 1-6 ayrımındaki başarısızlığı literatürde bildirilmektedir. Larrat ve arkadaşlarının çalışmasında²⁴, 5'UTR bölgesinin LIPA ile tiplendirilmesinde 41 örneğin 13 (%31.7)'ünde alınan sonuçlar, NS5B bölgesinin dizi analizi sonuçlarıyla uyumsuzdur. Genotip 1 ve genotip 6'nın ayrımında hatalı sonuçlar elde edildiği gibi, genotip 3 ve genotip 4'ün "Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)" analizlerinde de genotip ve alt tip bazında uyumsuzluk saptanmıştır. Pagani ve arkadaşları, yapmış oldukları bir çalışmada²⁵, 5'UTR bölgesi ile yapılan genotiplemede genotip 1a-1b ayrımının yapılamadığını ayrıca genotip 2a/c ile genotip 4a/c/d alt tiplendirilmesinin hatalı olduğunu; sadece genotip tayininin yeterli olduğu tarama çalışmalarında kullanılabileceğini, alt tipleme için NS5B gen bölgesinin dizilenmesi gerektiği belirtmişlerdir. LIPA yöntemiyle genotip 1a ve genotip 1b'lerin tanımlanmasındaki uyumsuzluklar, diğer genotiplerde alt tiplendirmenin yapılamaması ve bazı örneklerde genotip bazında hataların oluşması; genotip/alt tipe dayalı DEA tedavisi alan hastalar için dizi analizi yönteminin gerekliliğini ortaya koymaktadır²⁶. Çalışmamızda en ciddi uyumsuzluk, genotip 1a hastalarında saptanmış; LIPA ile genotip 1a olarak belirlenen 40 hastanın %50'sinin sekanslama ile genotip 1b olduğu ortaya çıkmıştır.

NS5B gen bölgesinin HCV genotipleme için en özgül bölge olduğu kabul edilmiştir²⁷. Goletti ve arkadaşlarının LIPA ve dizi analizi yöntemlerini kıyasladığı çalışmasında⁵, genotip 1a ve genotip 1b ayrımı ile genotip 1 ve genotip 6 tayinlerinde LIPA yönteminin

sorunlu olduğu, hedef gen bölgesi olan 5'UTR'nin bu genotip ve alt tipler için yetersiz kaldığı bildirilmiştir. Ayrıca çalışmada, LIPA ile genotipleme yapıldıktan sonra genotip 1a ve genotip 1b'nin doğrulanması ve belirsiz sonuçların aydınlatılması için NSSB gen bölgesinin dizi analiziyle genotip tayini yapılmasından çekinilmemesi gerektiği belirtilmiştir⁵.

McCormick ve arkadaşlarının araştırmasında²⁸, LIPA ile genotip 1 olarak saptanan örneklerin %46'sı alt tiplendirilememiştir. LIPA ile dizi analizi sonuçları %28.6 oranında uyumlu çıkmıştır. LIPA yönteminde hedef gen bölgesi olarak 5'UTR bölgesinin çalışılması; genotip 1 olarak tiplendirilen örneklerin alt tip ayrımını güçleştirmiştir.

Çalışmamızda HCV'nin 5'UTR bölgesinin LIPA, NSSB gen bölgesinin dizi analizi ile genotip tayini sonuçları karşılaştırıldığında; genotip bazında uyum %97.5 iken, alt tip bazında %19'dur. Benzer olarak Ar ve arkadaşlarının Mısır'da genotip 4 hastalarında yaptığı çalışmada²⁹ LIPA ve dizi analizi yöntemleriyle genotip/alt tip ayrımı yapılmış ve genotip bazında %97, alt tip bazında %3 uyum saptanmıştır.

Sonuç olarak, çalışmamızda HCV genotip ve alt tiplerinin belirlenmesi amacıyla, LIPA yöntemi ile dizi analizi yöntemi karşılaştırılmış genotip ve alt tip bazında uyumlu olmayan sonuçlar saptanmıştır. LIPA yöntemiyle özellikle genotip 1a-1b ayrımında başarısız sonuçlar elde edilmesi dikkat çekicidir. LIPA yöntemiyle elde edilen sonuçlar, altın standart yöntem olan dizi analizi yöntemiyle uyumsuzluk gösterdiğinde tedavi protokolü alt tipe bağlı olarak değişen hastalar için dikkate alınması gereken bir durumdur. Bu hastalar özellikle genotip 1a ve genotip 1b hastaları olup, doğru alt tip tayini genotip 1b hastalarının genotip 1a hastalarına kıyasla daha uzun tedavi almasını engelleyecektir. Bu nedenle, bu tip çalışmaların daha çok örnek içeren benzer çalışmalarla desteklenmesi gerektiği kanaatine varılmıştır.

ETİK KURUL ONAYI

Bu çalışma, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu onayı ile gerçekleştirilmiştir (Tarih: 22.12.2017 ve Karar No: 2017/606).

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

KAYNAKLAR

1. Kandemir Ö, Gültekin O. Kronik Hepatit C enfeksiyonlu damar içi uyuşturucu madde kullanıcılarında Hepatit C virüs genotiplerinin dağılımı. Türkiye Klinikleri 2017; 37(1): 21-6.
2. Tagnouokam Ngoupo PA, Ngoufack MN, Kenmoe S, Lissoc SF, Amougou-Atsama M, Banai R, et al. Hepatitis C virus genotyping based on Core and NSSB regions in Cameroonian patients. Virology Journal 2019; 16(101): 1214-9.
3. EASL. EASL recommendations on treatment of hepatitis C 2018. J Hepatol 2018; 69(1): 461-511.
4. Souii A, Elargoubi A, Fallecker C, Mastouri M, Drouet E. Hepatitis C genotype prevalence in Monastir region, Tunisia: correlation between 50 untranslated region (50UTR), Nonstructural 5B (NSSB), and core sequences in HCV subtyping. Curr Microbiol 2016; 73(3): 324-34.

5. Goletti S, Zuyten S, Goeminne L, Verhofstede C, Villalobos HR, Bodeus M, et al. Comparison of Sanger sequencing for hepatitis C virus genotyping with a commercial line probe assay in a tertiary hospital. *BMC Infect Dis* 2019; 19(738): 1-11.
6. Laperche S, Lunel F, Izopet J, Alain S, Dény P, Duverlie G, et al. Comparison of hepatitis C virus NS5b and 5' noncoding gene sequencing methods in a multicenter study. *J Clin Microbiol* 2005; 43(2): 733-9.
7. Uribe Noguez, LA, Mata Marín, JA, Ocaña Mondragón, A, Pompa Mera EN, Ribas-Aparicio RM, Arroyo Anduiza CI, et al. Comparison of direct sequencing of the NS5B region with the Versant HCV genotype 2.0 assay for genotyping of viral isolates in Mexico. *J Infect Chemother* 2020; 26(2): 205-10.
8. Smith DB, Bukh J, Kuiken C, Scott Muerhoff A, Rice CM, Stapleton JT, et al. Expanded Classification of Hepatitis C Virus into 7 genotypes and 67 subtypes: updated criteria and genotype assignment web resource. *Hepatology* 2014; 59(1): 318-27.
9. Petruzzello A, Marigliano S, Loquercio G, Cozzolino A, Cacciapuoti C. Global epidemiology of hepatitis C virus infection: an up-date of the distribution and circulation of hepatitis C virus genotypes. *World J Gastroenterol* 2016; 22(34): 7824-40.
10. Akgün S, Tarhan G, Sayiner HS, Akgün İ, Kök S. Adıyaman ilinde hepatit C virüsü genotip dağılımının belirlenmesi. *Ortadoğu Tıp Derg* 2016; 9(1): 1-5.
11. Erman Daloğlu A, Parkan ÖM, Erdoğan A, Peker BO, Can Sarınoğlu R, Sağlık İ, et al. Damar içi madde bağımlılığı olan ve madde bağımlısı olmayan hastalar arasında hepatit C virus (HCV) genotiplerinin dağılımı. *Mikrobiyol Bul* 2021;55(1):30-40.
12. Çalışkan A, Kirişçi O, Özkaya E, Özden S, Tümer S, Çağlar S, et al. Distribution and predominance of genotype 3 in Hepatitis C virus carriers in the province of Kahramanmaraş, Turkey. *Hepat Mon* 2015;15(4): e25142.
13. Borcak D, Çağır Ü, Yalçın A. Nevşehir ilinde Hepatit C virüs genotip dağılımı ile serum alanin aminotransferaz ve kantitatif serum HCV RNA düzeyleri ilişkisi. *ANKEM* 2015; 29(1): 36-40.
14. Gökahmetoğlu S, Atalay MA, Kılınç A. Hepatit C virüs genotiplerinin pirosekanslama yöntemi ile belirlenmesi. *Erciyes Tıp Derg* 2011; 33(2): 99-102.
15. Kayman T, Karakükçü Ç, Karaman A, Gözütok F. Kayseri bölgesinde Hepatit C virüs enfeksiyonunun genotip dağılımı. *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 2012; 42(1): 21-6.
16. Duran AÇ, Kibar F, Çetiner S, Yaman A. Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nde Hepatit C virus genotiplerinin ve HCV enfeksiyonu bulaş yollarının belirlenmesi. *Türk Hij Den Biyol Derg* 2017; 74(3): 201-10.
17. Cirit OS, Mızraklı AU, Vurupalmaz Y, Gümüş HH, Özturhan H, Barış A. Genotyping distribution of Hepatitis C Virus in Şanlıurfa province and effect of Syrian patients. *J Viral Hepat* 2019; 25(2): 62-6.
18. Aydın M, Dülger AC. Kronik Hepatit C genotip 1'de güncel tedavi. *Van Tıp Derg* 2018; 25(4): 547-51.
19. Peng J, Lu Y, Liu W, Zhu Y, Yan X, Xu J, et al. Genotype distribution and molecular epidemiology of Hepatitis C Virus in Hubei, Central China. *PLoS One* 2015; 10(9): 0137059.
20. Nutini MF, Hunter J, Giron L, Pires AF, Kohiyama IM, Camargo M, et al. HCV genotype profile in Brazil of mono-infected and HIV co-infected individuals: a survey representative of an entire country. *PLoS One* 2019; 15(1): 0227082.
21. Sağlık İ, Mutlu D, Öngüt G, İnan D, Öğünç MD, Can RS, et al. Akdeniz Üniversitesi Hastanesi'nde kronik Hepatit C enfeksiyonu olan hastalarda Hepatit C Virüs genotipleri: beş yıllık sonuçların değerlendirilmesi. *Mikrobiyol Bul* 2014; 48(3): 429-37.
22. Nemoz B, Roger L, Leroy V, Poveda JD, Morand P, Larrat S. Evaluation of the cobas® GT hepatitis C virus genotyping assay in G1-6 viruses including low viral loads and LiPA failures. *PLoS One* 2018; 13(3): 1-12.
23. Ngoc C, Thanh TT, Lan PT. Differential prevalence and geographic distribution of hepatitis C virus genotypes in acute and chronic hepatitis C patients in Vietnam. *PLoS One* 2019; 14(3): 1-20.
24. Larrat S, Poveda JD, Coudret C, Fusilier K, Magnat N, Schmuck AS, et al. Sequencing assays for failed genotyping with the versant Hepatitis C virus genotype assay (LiPA), Version 2.0. *J Clin Microbiol* 2013; 51(9): 2815-21.

25. Pagani E, Huemer HP, Paschetto V, Cemin C, Molon L, Rossi P, et. al. Comparison of hepatitis C virus subtyping by ns5b sequencing with 5'UTR based methods. *Minerva Med* 2012; 103(4): 293-7.
26. Rodriguez C, Soulier A, Demontant V, Poiteau L, Darty MM, Bouvier-Alias, M, et al. A novel standardized deep sequencing-based assay for hepatitis C virus genotype determination. *Scientific Reports* 2018; 8(4180): 1-8.
27. Tong YQ, Liu B, Liu H, Zheng HY, Gu J, Liu H, et al. Accurate genotyping of hepatitis C virus through nucleotide sequencing and identification of new HCV subtypes in China population. *Clin Microbiol Infect* 2015; 21(1): 874.e10.
28. McCormick AL, Macartney MJ, Abshir IA, Labbett W, Smith C, Irish D, et al. Evaluation of sequencing of HCV core/E1, NS5A and NS5B as a genotype predictive tool in comparison with commercial assays targeting 5'UTR. *J Clin Virol* 2015; 66(1): 56-9.
29. Ar Z, El-Din HM, Bahnassy AA, El-Shehabi AM, El-Leethy H, Omar A. TRUGENE sequencing versus INNO-LiPA for sub-genotyping of HCV genotype-4. *J Med Virol* 2005; 75(3): 412-20.