



ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

TEMEL BİYOTEKNOLOJİ  
YÜKSEK LİSANS TEZİ

HCV VİRAL YÜKÜNÜN SAPTANMASINDA REAL TIME PZR TEMELİNDE BİR  
YÖNTEM GELİŞTİRİLMESİ

Abbas Ali HUSSEİNİ

Danışman Öğretim Üyesi

Prof.Dr.Mithat BOZDAYI

Ankara

2013

ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

TEMEL BİYOTEKNOLOJİ  
YÜKSEK LİSANS TEZİ

HCV VİRAL YÜKÜNÜN SAPTANMASINDA REAL TIME PZR TEMELİNDE BİR  
YÖNTEM GELİŞTİRİLMESİ

Abbas Ali HUSSEİNİ

Danışman Öğretim Üyesi

Prof.Dr.Mithat BOZDAYI

Ankara

2013

## **ETİK BEYAN**

Bu tez çalışmasının; akademik kural ve etik ilkelere bağlı kalınarak hazırlandığını, çalışmada yararlanılan ve bu çalışma ürünü olmayan bütün bilgiler için kaynak yayınlara atıfta bulunulmuş olduğunu beyan ederim.

Abbas Ali HUSSEINI

İmzası

Prof. Dr. Mithat BOZDAYI danışmanlığında, Abbas Ali HUSSEINI tarafından hazırlanan bu çalışma 29/08/2013 Tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr.Mithat BOZDAYI

İmza:

Üye : Prof. Dr. Ramazan İdilman

İmza:

Üye : Yrd.Doç.Dr. Senem Ceren KARATAYLI

İmza:

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Aykut ÖZKUL

Enstitü Müdürü

# HCV VİRAL YÜKÜNÜN SAPTANMASINDA REAL TIME PZR TEMELİNDE BİR YÖNTEM GELİŞTİRİLMESİ.

## ÖZET

Hepatit C Virüsü (HCV), kronik karaciğer hastalığı, siroz ve hepatosellüler karsinomaya yol açabilen önemli bir enfeksiyon etkenidir. Dünya nüfusunun yaklaşık %3'ünün HCV ile enfekte olduğu ve hastaların %30'unun da sonunda ileri karaciğer hastalığı geliştirdiği tahmin edilmektedir. Virüs, 9.6 kilo baz (kb) uzunluğunda tek iplikli ve pozitif anlamlı bir RNA'ya sahiptir. Hepatit C tanısı vücutta virüsün varlığının gösterilmesi ile konur. Bunun için en sık antikor gösterilmesine dayalı serolojik testler, viral RNA gösterilmesine dayanan nükleik asit testleri ve karaciğer biyopsisi kullanılmaktadır. HCV RNA tayini HCV enfeksiyonu tanısında en duyarlı yöntemdir ve altın standart olarak kabul edilmektedir. Viral yükün tespit edilmesinde kantitatif PZR (kompetatif PZR veya RT-PZR) tekniği kullanılır. HCV RNA'nın plazmada belirlenmesiyle HCV replikasyonu en iyi şekilde değerlendirilebilir. "Real Time" PZR sistemi amplifikasyon ürünlerinin miktarlarının belirlenmesinde hızlı bir sistemdir, yüksek duyarlılık ve kesinlikte sonuçlar alınabilmektedir. Çalışmada 'Ligth Cyler 480 Real Time' PZR cihazını kullanarak farklı primer-prob setlerini Taqman EZ-RT PZR Kiti ile çalışarak denedi ve HCV-RNA'yı kantitatif olarak saptamaya yönelik en uygun, yüksek kesinlik ve duyarlılıkta tek aşamalı 'Real Time' PZR koşullarını belirlemeyi amaçlandı.

Çalışmada farklı HCV izolatları Mega 3.1 yazılımı ile karşılaştırılarak HCV genomunun korunmuş bölgeleri belirlendi ve bu bölgelere özgü, Primer Express 3.0.1 yazılımı ile primer-prob tasarımı yapıldı( set 1, 4, 5 ve 6 ). Ayrıca Ronald E Engleand ve arkadaşları 'Development of a TaqMan Assay for the Six Major Genotypes of Hepatitis C Virus: Comparison With Commercial Assays' çalışmasında tasarlandığı primer prob seti ( set 2) de kullanıldı.

Laboratuvarımızda daha önce ‘COBAS® AmpliPrep’ cihazında çalışan ve yüksek viral yüke ( $10^7$  kopya/ $\mu$ l) sahip olan plazma örnekleri seçilerek ve DNA\RNA’sız insan plazması (CTM(-) C Human plasma roch molecular system) kullanarak 1/10 şeklinde seri seyreltme ile  $10^{2^2}$ e kadar yapıldı. Yapılan denemeler sonucunda 5’UTR bölgesini hedef alan üç farklı primer-prob seti ( set 1, set 2 ve set 3 ) ‘Light Cyler Real Time’ PZR sisteminde sırayla 1000, 100 ve 1000 kopya/ $\mu$ l’ye kadar, saptanabildiği gözlemlendi.

Set 1 primer prob sistemi (taqman prob), ‘COBAS® AmpliPrep’ cihazın sonucuna göre kantifikasyonu bir log düşük hesaplandı ve tekrarlanabilirliği sağlanamadı. Set 2 ve set 3 primer-prob sistemlerinin (MGB’li prob) tekrarlanabilirliğini göstermek amacıyla, sırayla  $10^7$  ile  $10^2$  ve  $10^7$  ile  $10^3$  arası seri seyreltmeye sahip standartların deney içi ve deneyler arası Ct değerinin değişkenliği değerlendirildi. Set 2 için CV değeri deney içi 0.02 ile 6.49 ve deneyler arası 0.21 ve 4.39 arasında değişebilmektedir. Set 3 ise Ct değerinin CV değeri deney içi 0.50 – 6.99 ve deneyler arası 1.85 - 4.29 arasında değişebilmektedir. Set 2 ve 3 Ct değerini karşılaştırılması sonucunda deney içi ve deneyler arası set 2 primer-prob sistemi set 3’e göre tekrarlanabilirliği daha fazlaydı. Metodun verimliliği (“efficiency”) yaklaşık olarak sırasıyla %100 ve %90 olarak hesaplandı. Optimum koşullarda set 2 primer-prob sistemi set 3’e göre daha duyarlı ve daha spesifiktir.

Sonuç olarak çalışmada set 2 (HCV Con259F, HCV Con312R ve HCV-278MGB) ile Taqman EZ-RT PZR Kiti kullanarak ‘Light Cyler 480 Real Time’ PZR cihazında yüksek özgünlük, yüksek duyarlılık ve yüksek verimliliğe sahip olan ve 100 kopya/ $\mu$ l’e kadar HCV RNA virüsü saptanabilen bir yöntem geliştirildi. Geliştirildiği yöntem ile farklı HCV genotipleri başarılı bir şekilde yakalanıp kantitatif olarak saptanabilmektedir.

2013, 82 sayfa

**Anahtar Kelimeler:** Hepatit C Virüsü, HCV, Real Time PZR, MGB’li prob

## DEVELOPMENT OF A NEW METHOD BASED ON REAL TIME PCR FOR ASSESSMENT OF HCV VIRAL LOAD.

### **ABSTRACT**

Hepatitis C virus (HCV) infection is a significant infectious disease, which may cause chronic liver disease, cirrhosis and hepatocellular carcinoma. It infects nearly 3% of the world's population and it is estimated that 30% of patients eventually develop end stage liver disease. HCV genome is a positive single strand RNA being 9.6 kilo bases in length. Hepatitis C diagnosis is made by demonstrating the existence of the virus in the body. The most common tests used on HCV diagnosis are antibody-based serological tests, viral RNA-based nucleic acid tests and liver biopsy. Determination of HCV RNA, considered as the most sensitive method and the gold standard for diagnosis of HCV infection. Quantitative PCR (competitive PCR or RT-PCR) techniques are the most reliable methods to detect HCV viral load. Replication of HCV can be evaluated rightly with determination of HCV RNA in plasma samples. Real-time PCR system is a rapid system that determines the amplification with high sensitivity and specificity.

In this study, improving an HCV quantification method had been aimed, which is more convenient and sensitive, by using various primer probe systems. Experiments were performed using Taqman EZ-RT PCR kit based on light cycler 480 real time PCR systems.

In the study, different HCV isolates had been aligned by Mega 3.1 software and highly conserved primers and probes were designed by using Primer Express 3.0.1 software (set 1, 4, 5 and 6 ). In addition, the primer-probe system, designed by Ronald E Engleand and his colleagues on their study (Development of a TaqMan Assay for the Six Major Genotypes of Hepatitis C Virus: Comparison With Commercial Assays) had been tested (set 2).

High viral load samples ( $10^7$  copies/ $\mu$ l) have been selected that were routinely studied at our laboratory by using COBAS ® AmpliPrep system. Ten fold serial dilutions of the samples was obtained from  $10^7$  to  $10^2$  by using viral DNA/RNA free plasma samples

Results of the experiments showed that three different primer-probe systems (set 1, set 2 and set 3) that targets the 5' UTR of HCV genome could detect HCV RNA up to 1000, 100 and 1000 copies/ $\mu$ l, respectively. According to the results, HCV viral load has been calculated one log lower than the results from COBAS ® AmpliPrep when the set 1 (TaqMan probe) primers and probes were used. In addition to its low sensitivity the results were not reproducible.

To demonstrate the reproducibility of the set 2 and the set 3 primer-probe systems (MGB probe), the variability of Ct value of the standards with serial dilution was evaluated. The CV value of intra- and inter-assay of experiments varies between 0.02 - 6.49 and 0.21 - 4.39 respectively for set 2 primer-prob system. The CV of the intra-assay and inter assay of Ct value can vary from 0.50 to 6.99 and 1.85 up to 4.29 in experiments with set 3 of primer-prob system. By comparing the Ct value of the Set 2 and 3 primer-prob systems, intra-assay and inter assay reproducibility on the set 2 primer-probe was more high then set 3. The efficiency of the method, had been calculated 100% and 90%, respectively. At optimum conditions set 2 primer probe system showed results with more sensitivity and specificity when compared to the set 3 primer-probe system.

In conclusion, by using HCV Con259F, HCV Con312R and HCV-278MGB probe system with EZ-RT PZR Kit based on light cycler 480 real-time PZR system a high specificity, high sensitivity up to 100 copies/ $\mu$ l and high efficiency was achieved. This method was also shown to be sensitive for different HCV genotypes.

2013, 82 pages

**Key Words:** Hepatitis C virus, HCV, Real-Time PCR, MGB probe



## **ÖNSÖZ ve/veya TEŞEKKÜR**

Tez çalışmalarım boyunca bana yardım ve desteğini esirgemeyen, Ankara Üniversitesi Hepatoloji Enstitüsü'ne sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ankara, 2013

Abbas Ali HUSSEİNİ

## İÇİNDEKİLER

ETİK BEYAN .....	iii
ONAYSAYFASI .....	iv
ÖZET .....	v
ABSTRACT .....	vii
ÖNSÖZ ve/ veya TEŞEKKÜR .....	ix
İÇİNDEKİLER .....	x
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	xii
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	xiv
SİMGELER DİZİNİ .....	xvi
1. GİRİŞ .....	1
1.1. HCV Epidemiyolojisi .....	1
1.2. Bulaşma yolları .....	4
1.3. HCV Morfolojisi ve Fizikokimyasal özellikleri .....	6
1.4. HCV genome yapısı .....	6
1.5. HCVnin yaşam döngüsü .....	7
1.6. Quasispecies (türümsü) yapı .....	9
1.7. TANI .....	9
1.7.1. Serolojik testler .....	10
1.7.2. Moleküler testler .....	11
1.8. HCV Viral Yük Testin Türleri .....	11
1.8.1. Qualitative (Nitel) viral yük testleri .....	12
1.8.2. Quantitative (Sayısal) viral yük testleri .....	12
1.9. HCV Viral Yük Testinde kullanılan teknolojiler .....	13
2. KURAMSAL TEMELLER .....	16
3. GEREKÇE VE AMAÇ .....	19
4. MATERYAL VE YÖNTEM .....	20

<b>4.1. Materyal</b> .....	20
<b>4.1.1. Kimyasal maddeler</b> .....	20
<b>4.1.2. Tampon ve çözeltiler</b> .....	20
<b>4.1.3. Kullanılan cihazlar</b> .....	21
<b>4.1.4. Deney'da kullanılan malzemeler</b> .....	22
<b>4.1.5. Kullanılan kitler</b> .....	22
<b>4.1.6 HCV Plazma Örnekleri</b> .....	22
<b>4.2. Yöntem</b> .....	23
<b>4.2.1. Viral RNA izolasyonu</b> .....	23
<b>4.2.2. Kullanılan primer ve problemlerin tasarımı ve dizileri</b> .....	24
<b>4.2.3. HCV RNA kantitasyonu için standart oluşturulması</b> .....	30
<b>4.2.4. HCV RNA'nın 'real time' PZR ile gösterilmesi</b> .....	30
<b>4.2.4.1 Taqman EZ-RT PZR Kit</b> .....	31
<b>4.2.4.2 LightCycler ® RNA Master HybProbe kiti</b> .....	31
<b>5. ARAŞTIRMA BULGULARI</b> .....	32
<b>5.1. Set 1 primer-prob sistemi (HCV F1, HCV R1 ve HCV PR)</b> .....	32
<b>5.2. Set 2 primer-prob sistemi (HCV Con259F, HCV Con312R ve MGB prob) ....</b>	37
<b>5.3. Set 3 primer-prob sistemi (HCV F1, HCV Con312R ve MGB prob)</b> .....	48
<b>6. TARTIŞMA VE SONUÇ</b> .....	51
<b>KAYNAKLAR</b> .....	55
<b>EKLER</b> .....	61
<b>EK1:</b> .....	61
<b>EK2:</b> .....	62
<b>ÖZGEÇMİŞ</b> .....	63

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Coğrafi bölgeye göre HCV enfeksiyonu tahmini prevalansı.....	2
Şekil 1.2. HCV global genotip dağılımı.....	4
Şekil 1.3. HCV genom yapısı .....	7
Şekil 1.4. HCVnin yaşam döngüsü.....	8
Şekil 4.1. HCV izolatların hizalanması ve tasarlanan primer problemlerin dizini ve genom üzerinde yeri.....	26
Şekil 5.1. HCV RNA'nın 'Light Cycler 480 Real Time' PZR cihazında set 1 primer-prob sistemi ile Taqman EZ-RT PZR Kiti temelinde çoğaltılması .....	33
Şekil 5.2. HCV RNA'nın 'Light Cycler 480 Real Time' PZR cihazında set1 primer-prob sistemi ile Taqman EZ-RT PZR Kiti temelinde çoğaltılması .....	33
Şekil 5.3. Hasta örneklerinin 'Light Cycler 480 Real Time' PZR cihazında Taqman EZ-RT PZR kiti ile kantitasyonu .....	35
Şekil 5.4. HCV RNA'nın 'Light Cycler 480 Real Time' PZR sisteminde set 2 primer prob seti ve Taqman EZ-RT PZR Kit ile çoğaltılması. ....	39
Şekil 5.5. Oluşturulan standart örneklerinin 'Light Cycler 480 Real Time' PZR sisteminde Set 2 primer prob seti ve taqman EZ RT PZR kit ile kantitasyonu .....	39
Şekil 5.6. HCV RNA'nın 'Light Cycler 480 Real Time' PZR cihazında, Taqman EZ-RT PZR kit ile yapılan çalışmada GAPDH primer-prob sistemi iç kontrol olarak kullanılması .....	40
Şekil 5.7. Set 2 primer-prob ve Taqman EZ-RT PZR Kit ile oluşturulan standartların 'Real Time' PZR ürünlerinin %2'lik agaroz jelde gösterilmesi .....	42

<b>Şekil 5.8.</b> Farklı HCV alttipin ‘Light Cycler 480 Real Time’ PZR sisteminde	
set 2 primer-prob seti ve Taqman EZ-RT PZR Kit ile saptanması ve kantitasyonu. ....	43
<b>Şekil 5.9.</b> ‘COBAS AmpliPrep’ cihazında çalışılmış hastaların ‘Light cycler 480 Real Time’	
PZR sisteminde set 2 primer-prob seti ve Taqman EZ-RT PZR Kit ile	
saptanması ve kantitasyonu .....	43
<b>Şekil 5.10.</b> HCV RNA’nın ‘Light cycler 480 Real Time’ PZR sisteminde Hibridizasyon	
probu ve LightCycler RNA Master HybProbe kiti ile çoğaltılması. ....	46
<b>Şekil 5.11.</b> ‘Light Cycler 480 Real Time’ PZR cihazında hibridizasyon problemleri ve	
LightCycler RNA Master HybProbe kiti ile hastaların viral yükünün	
saptanması ve kantitasyonu.....	46
<b>Şekil 5.12.</b> Hastaların viral yükü set 2 primer-prob sistemi ve Taqman EZ-RT PZR kiti ile	
saptanması ve kantitasyonu. ....	47
<b>Şekil 5.13.</b> HCV RNA’nın ‘Light Cycler 480 Real Time’ PZR sisteminde set 3 primer-prob	
seti ve Taqman EZ-RT PZR Kit ile çoklu şekilde çoğaltılması. ....	48
<b>Şekil 5.14.</b> Oluşturulan standartların ‘Light Cycler 480 Real Time’ PZR sisteminde HCV F1,	
HCV Con312R ve HCV-278MGB seti ve Taqman EZ-RT PZR Kit ile kantitasyonu. ....	49
<b>Şekil 5.15.</b> Set 3 primer-prob seti ve Taqman EZ-RT PZR Kit ile oluşturulan standartların	
‘Real Time’ PZR ürünlerinin %2’lik agaroz jelde gösterilmesi .....	49

## ÇİZELGELER DİZİNİ

<b>Çizelge 4.1.</b> Tasarlanan primer-prob sistemleri ve üzerindeki modifikasyonları. ....	25
<b>Çizelge 5.1.</b> EZ-RT PZR Kiti temelinde set 1 primer-prob sistemi için kullanılan PZR sıcaklık döngü ve süreleri .....	34
<b>Çizelge 5.2.</b> ‘Light Cyler 480 Real Time’ PZR cihazında, set 1 primer-prob sistemi için kullanılan EZ-RT PZR Kit substrat konsantrasyon ve miktarları .....	34
<b>Çizelge 5.3.</b> Çalışmamızda katılan hastaların farkı cihazlarda ve farklı primer prob sisteminde alınan sonuçların karşılaştırılması. ....	36
<b>Çizelge 5.4.</b> Set 1 primer prob seti ile yapılan deneylerin, deneyler arası Ct değeri ve varyasyonu .....	36
<b>Çizelge 5.5.</b> EZ-RT PZR Kiti temelinde set 2 ve set 3 primer-problar sistemi için kullanılan PZR sıcaklık döngü ve süreler .....	37
<b>Çizelge 5.6.</b> ‘Light Cyler 480 Real Time’ PZR sisteminde, set1 ve set2 primer-problar sistemi için EZ-RT PZR Kit kullanılan substrat konsantrasyon ve miktarları .....	38
<b>Çizelge 5.7.</b> Set 2 primer-prob seti ve Taqman EZ-RT PZR Kit ile yapılan deneylerin deney içi ve deneyler arası döngü eşik değerlerin varyasyonu .....	41
<b>Çizelge 5.8.</b> Set 2 primer-prob seti ve Taqman EZ-RT PZR Kit ile yapılan deneylerin deney içi ve deneyler arası Verimlilik, Slop ve Hata oranı değerlerin varyasyonu .....	41
<b>Çizelge 5.9.</b> Çalışmamızda kullanılan plazma örneklerinin farklı cihazlarda alınan sonuçların karşılaştırılması.....	44

<b>Çizelge 5.10.</b> ‘Light Cyclers 480 Real Time’ PZR sisteminde, rutin çalışmaları için LightCycler RNA Master HybProbe kiti kullanılan substrat konsantrasyon ve miktarları .....	45
<b>Çizelge 5.11.</b> LightCycler RNA Master Hybprobe kiti temelinde rutin çalışmaları için kullanılan PZR sıcaklık döngü ve süreleri .....	45
<b>Çizelge 5.12.</b> Çalışmada kullanılan plazma örneklerinin farklı cihazlardan alınan HCV miktarlarının karşılaştırılması. ....	47
<b>Çizelge 5.13.</b> Set 3 primer-prob seti ve Taqman EZ-RT PZR Kit ile yapılan deneylerin, deney içi ve deneyler arası döngü eşik değerlerin varyasyonu .....	50
<b>Çizelge 5.14.</b> Set 3 primer-prob seti ve Taqman EZ-RT PZR Kit ile yapılan deneylerin deney içi ve deneyler arası Verimlilik, Slop ve Hata oranı değerlerin varyasyonu .....	50

## SİMGELER DİZİNİ

µl	Mikrolitre
aa	Amino asit
bDNA	Branch DNA
CD-81	“Cluster of Differentiation <b>81</b> ”
cDNA	Komplementer DNA
Ct	“Cycle threshold”(Döngü eşik değeri)
CV	Varyasyon katsayısı
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
dATP	Deoksiadenozin trifosfat
dGTP	Deoksiguanozin trifosfat
dk	Dakıka
dNTP	Deoksinükleotit trifosfat
dTTP	Deoksitimidin trifosfat
dUTP	Deoxyüridin trifosfat
E1	Zarf proteini 1
E2	Zarf proteini 2
EDTA	Etilen Diamin Tetra-Asetik asit
EIA-1	İlk kuşak testler
EIA-2	İkinci kuşak testler



EIA-3	Üçüncü kuşak testler
EIA-4	Dördüncü kuşak testler
ELISA	Enzim ilintili immün test
FAM	6-karboksifloresan
FRET	Floresan rezonans enerji transferi
GAPDH	Gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz
HBV	Hepatit B Virüsü
HCV	Hepatit C Virüsü
HIV	İnsan Bağışıklık Yetmezlik Virüsü
IRES	“İnternal ribosomal entry site” (iç ribozomal giriş yeri)
IU	Uluslararası birimi
Kb	Kilobaz
KC	Karaciğer
LDL-R	Düşük yoğunluklu lipoprotein reseptör
MGB	“Minor groove binder” (küçük oluk bağlayıcı)
mM	Milimol
Mn	Manganez asetat
nm	Nanomol
NS1	Yapısal olmayan proteini 1
NS2	Yapısal olmayan proteini 2
NS3	Yapısal olmayan proteini 3

NS4A	Yapısal olmayan proteini 4 A
NS4B	Yapısal olmayan proteini 4 B
NS5A	Yapısal olmayan proteini 5 A
NS5B	Yapısal olmayan proteini 5 B
ORF	Açık okuma çerçevesi
pmol	Pikomol
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RIBA	Rekombinant immunublot test
RNA	Ribonükleik asit
RT-PZR	Ters Transkripsiyon-Polimeraz Zincir Reaksiyonu
S	Saniye
SNP	Tek nükleotit polimorfizmi
SR-B1	“ Scavenger receptor class B type 1” Çöpçü reseptör sınıf B, tip I
TAE	Tris-Asetik asit- EDTA
Tm	Erime sıcaklığı
TMA	Transkripsiyon aracılı amplifikasyon
UNG	Urasil N-Glikozilaz
UTR	Translasyon olmayan bölge

## 1. GİRİŞ

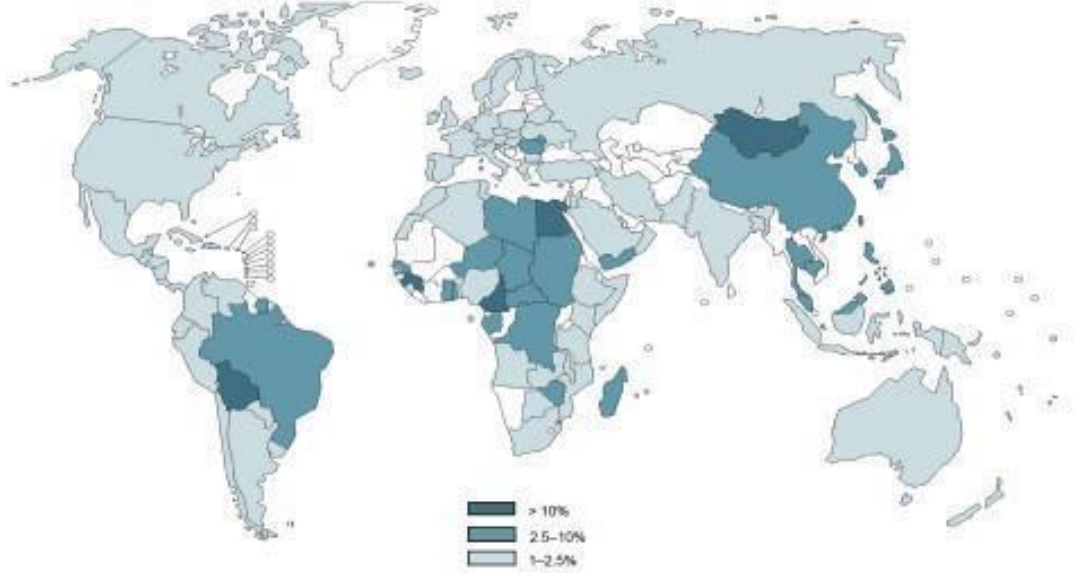
Hepatit C Virüsü (HCV), kronik karaciğer hastalığı, siroz ve hepatosellüler karsinomaya yol açabilen önemli bir enfeksiyon etkenidir. Dünya nüfusunun yaklaşık %3'ünün HCV ile enfekte olduğu ve hastaların %30'unun da sonunda ileri karaciğer hastalığı geliştirdiği tahmin edilmektedir<sup>1,2</sup>. HCV ilk kez 1989 yılında Choo ve arkadaşları tarafından şempanzede klonlanarak tanımlanan bir RNA virüsüdür. Bu tarihten önce Hepatit A ve B'den farklı bir virüsün de hepatite yol açtığına dair epidemiyolojik veriler bulunmuş ve bu hastalığa non-A non-B viral hepatit adı verilmiştir<sup>1</sup>.

Virüs, 9.6 kilo baz (kb) uzunluğunda tek iplikli ve pozitif anlamlı bir RNA'ya sahiptir. Yapısı, genom özellikleri ve replikasyon döngüsü flavivirüslere benzer ve bugün *hepacivirüs cins* adı altında yeni bir grupta yer almaktadır<sup>3,4</sup>. Etkili hücre kültürü olmaması nedeniyle yapısı ve replikasyon döngüsü halen tümüyle anlaşılamamıştır<sup>5</sup>.

### 1.1 HCV Epidemiyolojisi

Dünya sağlık örgütüne göre dünyada 130-170 milyon kişinin hepatit C virüsü ile enfekte olduğu tahmin edilmektedir<sup>6</sup>. Dünyada HCV enfeksiyonu prevalansının yaklaşık %2.2-3 arasında olduğu tahmin edilmektedir. Bölgeye özgü tahmini prevalansın en düşük olduğu Kuzey Avrupa'da bu rakam %1'den düşüktür<sup>7</sup>. Prevalansın yüksek olduğu ülkeler ise %3.55 prevalans ile Asya'da ve %5.17 ile Afrika'da yer alır. En düşük prevalans İngiltere ve İskandinav ülkelerinden (%1'in altında), en yüksek prevalans ise Mısır'dan (%15-20) bildirilmiştir<sup>7-9</sup>. Düşük prevalansı olan ancak nüfusu büyük gelişmiş ülkelerde örneğin Almanya'da prevalans %0.6, Kanada'da %0.8, Fransa'da %1.1, Avustralya'da %1.1'dir.

Düşük, fakat biraz daha yüksek prevalans oranları Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'nden (%1.8), Japonya'dan (%1.5-2.3) ve İtalya'dan (%2.2) bildirilmiştir. Türkiye dünya haritasında prevalansı %2-2.9 arasında olan ülkeler içinde yer almaktadır<sup>10,11</sup> (şekil 1.1).



Şekil 1.1. Coğrafi bölgeye göre HCV enfeksiyonu tahmini prevalansı. (Kaynağı: Dünya Sağlık Örgütü- 2007).

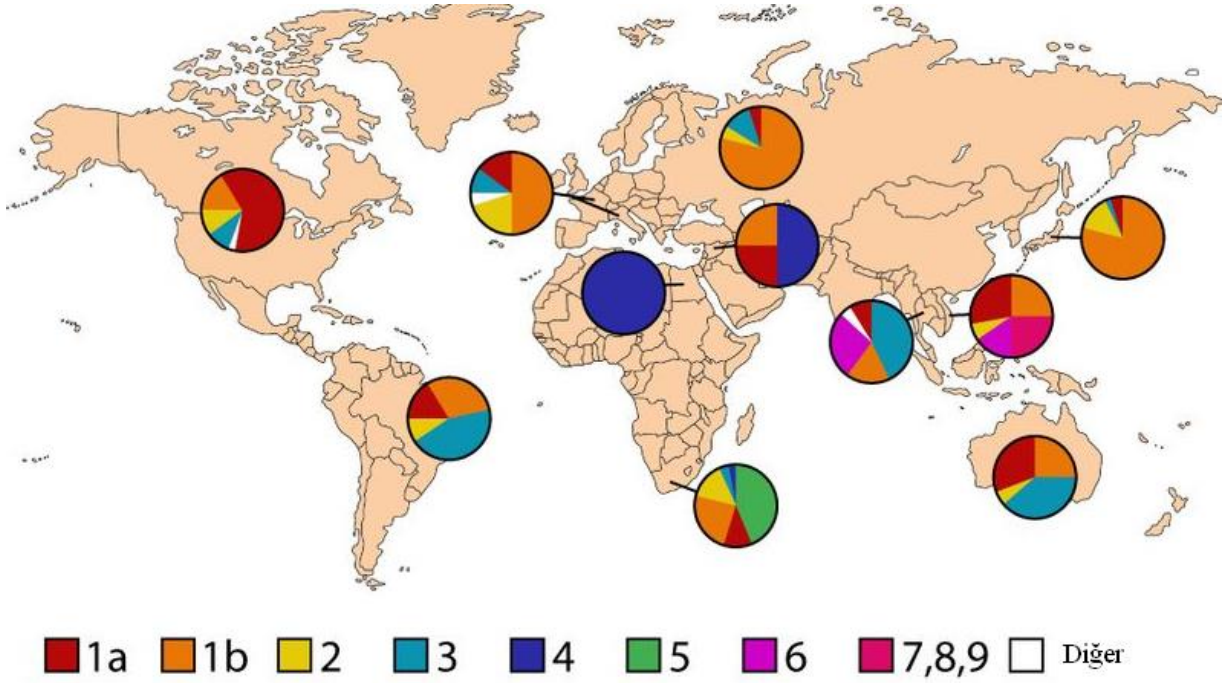
HCV enfeksiyonu coğrafyaya ve zamana göre farklılıklar gösterir. ABD'de en yüksek prevalans, bütün HCV-pozitif olanların 2/3'ünü tutacak şekilde 30-49 yaşları arasındadır. Yirmi yaşın altındaki ve 50 yaşın üstündeki gruplarda prevalans ortalamasının altındadır. Türkiye, İspanya, İtalya, Japonya ve Çin gibi ülkelerde ise yaşa özgü prevalans yaş ilerledikçe derece derece artmaktadır. Dünyadaki en yüksek HCV prevalansının görüldüğü Mısır da ise prevalans yaşla birlikte artar, ancak bütün yaş gruplarında prevalans yüksektir<sup>7</sup>.

Hepatit C virüsünün kan transfüzyonu sonrasında hepatitlerin %90'ından sorumlu olması, çalışmaların kan vericilerine yoğunlaşmasına neden olmuştur<sup>12</sup>. Türkiye'de 2000-2006 yılları arasında farklı merkezlerdeki donör taramalarından elde edilen anti-HCV pozitiflik oranı

ortalama %0.54'tür. Doksanlı yılların verisiyle 2000'li yıllarda elde edilen veriler karşılaştırıldığında donörlerdeki prevalans oranında anlamlı bir değişiklik olmadığı görülmektedir ve Türkiye'de genel popülasyonda yapılan çalışmalarda ise anti-HCV pozitiflik oranı daha yüksek çıkmaktadır. Erişkinlerde 2000 yılından sonra yapılmış çalışmalara bakıldığında toplam 16.160 kişideki anti-HCV pozitifliği %1.15'tir<sup>1,13</sup>.

Türkiye'de yaşa özgü prevalansın incelendiği çalışmalarda özellikle 50 yaşından sonra prevalansın arttığı görülmektedir<sup>13,14</sup>. HCV insidansının en sık olduğu yaş 20-39'dur. Kronik HCV hastaları ise en sık 30-49 yaş grubunda görülmektedir<sup>8</sup>.

Nükleik asit dizi analizi kullanılarak yapılan çalışmalarda HCV'nin en az 6 major genotipi ve 100 den fazla subtipi belirlenmiştir<sup>3,15</sup>. HCV'nin genotip tayini tedavide ve klinik sürecin takibinde önemlidir<sup>16</sup>. HCV genomu, genotipler arasında birbirinden yaklaşık %30, subtipler ise birbirinden yaklaşık %20 oranında bir farklılık göstermektedir<sup>17</sup>. Genotip 1, 2 ve 3 daha yaygın genotiplerdir ve çoğunlukla Avrupa, Kuzey Amerika, Çin, Japonya ve Avustralya'da gözlenmektedir. Subtip dağılımında ise daha anlamlı farklılıklar vardır. Tip 1a sıklıkla Kuzey Avrupa ve Kuzey Amerika'da saptanırken, tip 1b Japonya, Güney ve Doğu Avrupa'daki en yaygın genotiptir. ABD'de %71 oranında genotip 1 bulunmuştur ve tip 2 tüm dünyada tip 1'e göre daha nadirdir. Tip 3 değişik ülkelerde farklı dağılım göstermektedir ve özellikle İskoç kan donörlerinde, Güneydoğu Asya ülkelerinde ve genç hastalarda saptanmaktadır. Tip 1 ve 2 de bulunmakla beraber tip 4 Orta Doğu ülkeleri, Mısır ve Orta Afrika ülkelerinin baskın genotipidir. HCV genotip 5 ve 6'ya çok daha sınırlı bir alanda ve genelde Güney Afrika ve Güney Doğu Asya'da rastlanmaktadır. Genotip 1'in tedaviye yanıtı 2 ve 3'e göre daha azdır<sup>18,19</sup>.



Şekil 1.2. HCV global genotip dağılımı. <http://ocw.jhsph.edu/> Johns Hopkins Bloomberg halk sağlığı okulu.

Türkiye’de yapılan çalışmalarda genotip 1b’nin %66.7-100 oranı ile HCV genotipleri içinde birinci sıklıkla saptanan tip olduğu görülmektedir. Bunu %5.8-33.3 oranında genotip 1a izlemektedir. Genotip 2a, 3a, 4, 4c ise daha az sıklıkla bildirildiği gözlenmektedir <sup>16</sup>.

## 1.2 Bulaşma Yolları

HCV bulaşması en belirgin şekilde ya büyük miktarda ya da tekrarlayan perkütan temaslar sonucunda gerçekleşir. HCV ile ilişkili başlıca risk faktörleri, kan ve kan ürünleri transfüzyonu, infekte donörden solid organ transfüzyonu, damar içi uyuşturucu kullanımı, güvenli olmayan terapötik enjeksiyonlar, iğne batması gibi mesleki perkütan temaslar, infekte anneden bebeğine bulaş, infekte partnerle ve çoklu partnerle cinsel ilişkidir. Bunlar arasında en önemlileri taraması yapılmayan donörden kan transfüzyonu, damar içi uyuşturucu

kullanımı ve güvenli olmayan terapötik injeksiyondur <sup>7,18</sup>. Gelişmiş ülkelerde HCV infeksiyonlarının başlıca kaynağı damar içi uyuşturucu kullanımıdır <sup>20</sup>. Gelişmekte olan ülkelerde ise güvenli olmayan terapötik injeksiyonların ve transfüzyonun başlıca geçiş yolu olduğu tahmin edilmektedir <sup>11,21</sup>.

Dünya Sağlık örgütü verilerine göre gelişmekte olan ülkelerde kan bankalarındaki donör kanlarının %43'ünün HCV açısından uygun şekilde test edilmemektedir, Türkiye'de ise kan transfüzyonu önemli bir risk faktörü olsa bile vericilerin sadece 1/4'ü HCV ile infektir <sup>18,22</sup>. Dünyada kontamine injeksiyona bağlı yılda yaklaşık 2 milyon yeni HCV infeksiyonunun geliştiği ve bunun tüm HCV infeksiyonlarının %40'ını teşkil ettiği hesaplanmıştır <sup>23</sup>. Güvenli olmayan injeksiyona ek olarak hastanelerde ve dış tedavi ünitelerinde kullanılan alet ve ekipmanların yetersiz temizlik ve dezinfeksiyonu da HCV bulaşmasında önemli risk faktörleridir. Türkiye'de önemli perkütanöz risk faktörleri; majör veya minör cerrahi girişim, kan transfüzyonu, sık dış tedavisi ve dış çekimidir <sup>21</sup>.

ABD'de akut HCV infeksiyonlarındaki risk faktörlerine bakıldığında damar içi uyuşturucu kullanımına bağlı %68, tıbbi müdahale sırasında sağlık personeline bulaşma %4'lük, iyatrojenik, nozokomiyal veya perinatal bulaşmalar ise sadece %1'lik kısmını oluşturmaktadır. Türkiye'de ise damar içi uyuşturucu alma yoluyla HCV geçişi çok nadirdir; bir çalışmada kronik hepatit C hastalarında damar içi uyuşturucu kullanım oranı %3.1 bulunmuştur <sup>24</sup>.

Mesleki bulaşma daha çok kontamine iğnenin sağlık çalışanına batması sonucu olmaktadır ve bunun serokonversiyon insidansı yaklaşık %1.8'dir. HCV'nın perinatal geçiş oranı %4-7 arasındadır. Seksüel aktivite ile ise ne derece bulaşabildiği ve hangi koşullarda bulaştığı tartışmalı konulardan biridir. HCV yukarıda bahsedilenler dışında birçok yolla da bulaşabilir. Bunlar arasında; dövme, intranazal uyuşturucu kullanımı, sünnet, akupunktur veya dövme gibi dini veya kültürel uygulamalar sayılabilir <sup>7</sup>.

### 1.3 HCV Morfolojisi ve Fizikokimyasal Özellikleri

HCV partikülü 40-70 nm çapında, genomunu içeren bir zarflı nükleokapsidden oluşup hücre içinde endoplazmik retikulumdan elde edilen membranlar ile toplanır<sup>17,25,26</sup>. Hastaların plazmasında bulunan parçacıklar morfolojik olarak immünglobulin veya çok düşük dansiteli lipoproteinler ile ilişkisi nedeniyle heterojen olabilir<sup>25</sup>.

HCV'nin zarfı, karbonhidrat ve proteinlerle (glikoprotein) birleşmiş lipidlerden oluşur ve çift katlıdır. Zarfın lipid komponentinin %60'ı fosfolipid geri kalanın da çoğu kolesteroldür. Peplomer denilen çıkıntılar vardır ve bunlar konakçı hücrelerine yapışmasını kolaylaştırır. HCV'nin peplomerindeki, yapışma olayında rol oynayan proteinlerden biri CD-81 olarak isimlendirilmiştir<sup>17</sup>.

Zarf, iki zarf proteininden, E1 ve E2, oluşur, bunlar virion üzerinde uzantılar ("spikes") oluştururlar<sup>27</sup>. Zarfın içinde nükleokapsid bulunur ve genellikle ikozahedral şeklindedir<sup>27</sup>. HCV öz proteini, muhtemelen viral nükleokapsidi oluşturan bir RNA bağlama proteindir. Bu proteinin biyokimyasal özellikleri nispeten zayıf bir şekilde karakterizedir ve yapısı bilinmemektedir<sup>28</sup>.

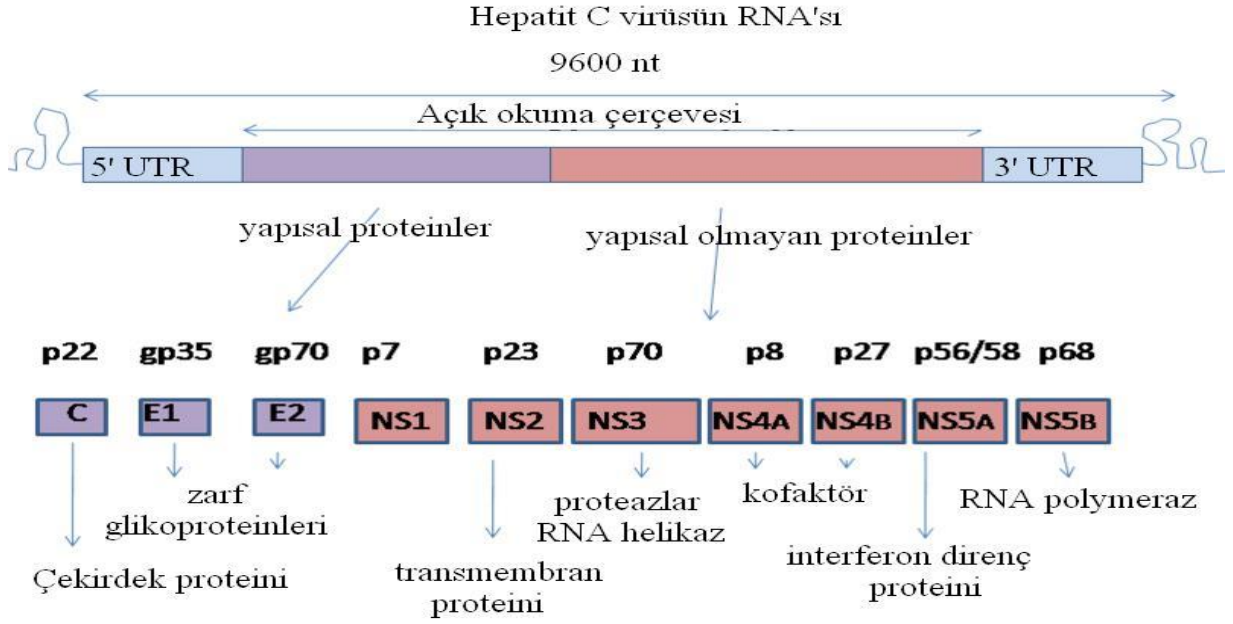
### 1.4 HCV Genom Yapısı

HCV genomu 9.6 kb uzunluğundadır ve bir 5' kodlama yapmayan bölge (5' UTR), uzun bir açık okuma çerçevesi (ORF), ve bir 3' UTR bölgesinden oluşmaktadır. HCV açık okuma çerçevesi yaklaşık 3000 amino asit (aa)'lik bir poliproteini kodlar ve bu poliprotein hücrel ve viral proteazlar tarafından 10 farklı ürün olarak parçalanır<sup>29,30</sup>.

Genomun 5' ucunda bulunan 341 nükleotidlik UTR bölgesi, HCV suşları arasında yüksek oranda korunmuş nükleotid dizisine sahiptir<sup>31</sup>. Bu özellik, HCV viremisinin saptanması ve



kantifikasyonu çalışmalarının hedef bölgesi olması sonucunu doğurmuştur <sup>32</sup>. 5'UTR çok sayıda 'stem-loop' ve pseudoknot içeren, I ile IV numaralı dört yüksek yapısal domain içerir. II, III ve IV domainleri, kor kodlama bölgesinin ilk 12-30 nükleotiti ile birlikte, ribozomlara doğrudan bağlanmaya olanak tanıyan bir "internal ribosomal entry site, IRES, oluşturmaktadır.

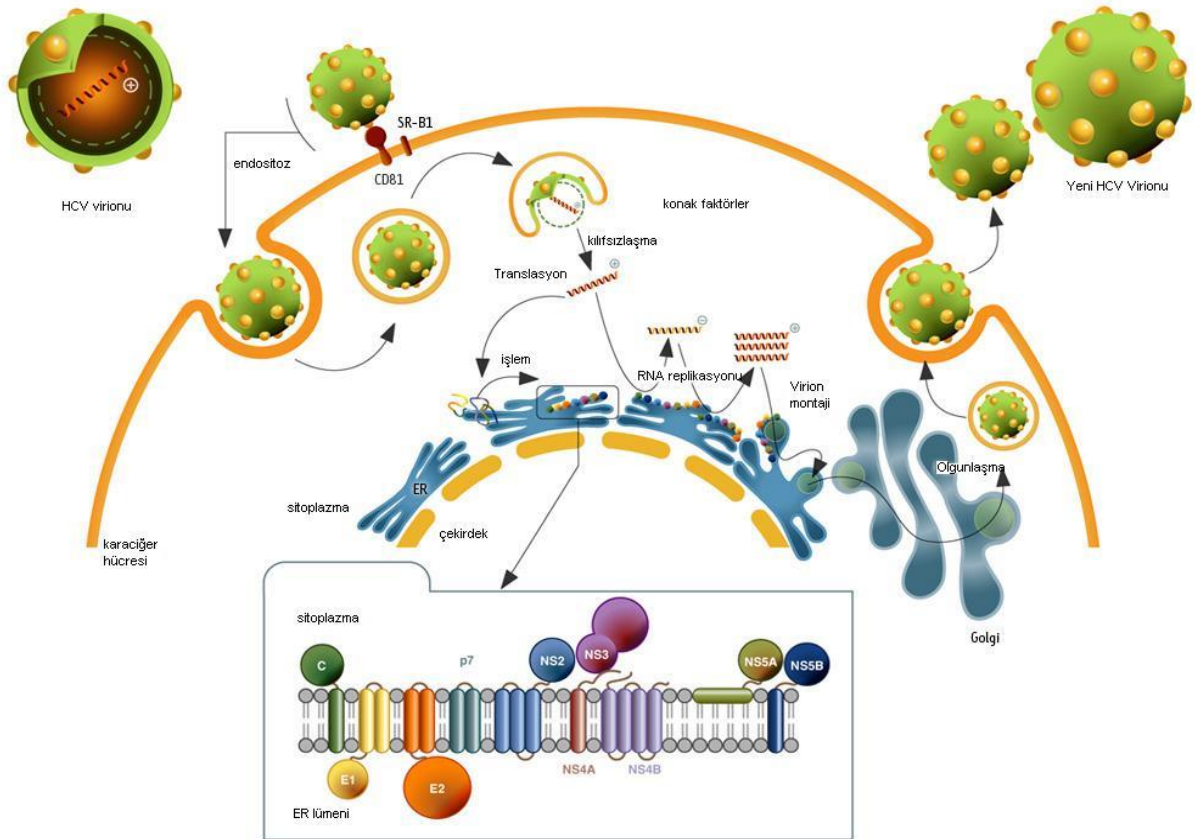


Şekil 1.3. HCV genom yapısı

### 1.5 HCV'nin Yaşam Döngüsü

HCV'nin replikasyonu hakkında bilinenler yetersizdir. Virüsün hücreye bir yüzey molekülüne bağlanarak girdiği düşünülmekte ve bu molekülün de çok büyük bir olasılıkla (E2'nin bağlandığı) CD81 molekülü olduğu sanılmaktadır <sup>33</sup>. HCV'nin tek replikasyon yeri karaciğer (KC) değildir. Periferik kan mononükleer hücreleri, lenfoid foliküller ve olasılıkla kemik iliğinde de replike olmaktadır <sup>34,35</sup>. HCV, "Human Immunodeficiency Virüs" (HIV) gibi replikasyon hızı yüksek bir virüstur. Yarılanma ömrü 2.7 saat olup, günlük virion yapım ve klirensi  $1 \times 10^{12}$  dir <sup>36</sup>. Virüsün olası reseptörleri arasında CD81, SR-B1 ("Scavenger receptor

class B type 1”)’e LDL-R (“Low density lipoprotein receptor”) yer alır <sup>37</sup>. Virüsün kltrin aracılı endositozis ile hücre içine alındığı varsayılmaktadır <sup>26,38</sup>. Soyulma ardından serbest kalan viral genom, 5’ ucunda bulunan IRES (“Internal ribozomal entry site”) sayesinde ribozoma bağlanır ve translasyon başlar. Bu aşamada özyapı, E1, E2 ve p7 konak proteazları tarafından kesilerek polipeptinden ayrılır. Kalan diğer proteinlerde viral proteazlar tarafından kesilir. NS4B endoplazmik retikulum membranını değişikliğe uğratar ve veziküler replikasyon kompleksleri oluşur <sup>29</sup>. Replikasyon bu komplekslerin içinde gerçekleşir <sup>39</sup>. Sentezlenen RNA varlığında özyapı proteini oligomerize olur <sup>40</sup>. Membranın dış kısmına bakan E1 ile özyapı proteinleri arasında bulunan birsinyal dizisi sayesinde enkapsidasyon gerçekleşir ve virion oluşur <sup>41</sup>. Virion endoplazmik retikulum membranından tomurcuklanır ve ekzositozla salınır <sup>42</sup>.



Şekil 1.4. HCVnin yaşam döngüsü

## 1.6 Quasispecies (türümsü) Yapı

HCV'nin önemli özelliklerinden birisi, yüksek genetik heterojenlik göstermesidir. Yüksek heterojenlik, replikasyonda görev alan RNA bağımlı RNA polimeraz enziminin doğrulama ("proofreading") aktivitesinin yani 3'→ 5' ekzonükleaz düzeltici okuma etkinliğinin olmamasıyla açıklanmaktadır<sup>43</sup>. Bu nedenle yeni sentezlenen RNA sarmallarına yanlış girmiş bazları uzaklaştırıcı önemli bir onarım mekanizması çalışmamaktadır. Bu yüzden HCV sürekli olarak mutasyona uğrar ve asla özdeş RNA genomlarının homojen bir topluluğu olarak *in vivo*da bulunmaz<sup>44</sup>.

Genomun kısalığı, mutasyon oranının fazlalığı ve virüs topluluğunun genişliği, infekte kişideki virüs topluluğunun bir ya da daha fazla nükleotid farklılığından oluşan, birbirinden farklı virüslerin toplamı olmasına yol açmaktadır. Bunlar "quasispecies" (türümsü) olarak adlandırılmaktadır. HCV, genom yapısının bu özelliği sayesinde yaşadığı ortama olağanüstü bir adaptasyon sağlamaktadır. Her an bir başkasından çok az farklar taşıyan virüs toplulukları diğerlerine göre avantajlı duruma geçebilmekte, böylece o belli grup çoğalarak enfeksiyonu sürdürmede hakim olmakta ve enfeksiyonun sürekliliği sağlanmaktadır. Bunun tipik örneği tedaviye karşı gelişen direnç ya da bağışıklık sisteminden kaçıştır<sup>32</sup>.

## 1.7 Tanı

Hepatit C tanısı vücutta virüsün varlığının gösterilmesi ile konur. Bunun için en sık antikor gösterilmesine dayalı serolojik testler, viral RNA gösterilmesine dayanan nükleik asit testleri ve karaciğer biyopsisi kullanılmaktadır.

### 1.7.1 Serolojik testler

HCV enfeksiyonu tanısı için bugün kullanılan en pratik yöntem antikor aranmasıdır. Bu amaçla, bugüne dek dört kuşak ELISA testi kullanılmıştır. İlk kuşak testler (EIA-1), tek bir rekombinant HCV klonundan elde edilmiştir. NS3 geninin bir kısmı ile NS4 geni ürününün tamamını içermişlerdir. Duyarlılık ve özgüllükleri düşük olup, serokonversiyonu saptamada yetersiz kalmışlardır. İkinci kuşak ELISA testleri (EIA-2), kor ve NS3 bölgelerinden rekombinant proteinler içermektedirler<sup>45</sup>. Üçüncü kuşak testlerde (EIA-3) bunlara ek NS5'ten bir rekombinant protein eklenmiştir<sup>46</sup>. Üçüncü kuşak testlerinin duyarlılık ve özgüllüğü ikinci kuşak testlerden daha yüksek olup % 97-99'dur<sup>47</sup>. Yeni kullanıma giren dördüncü kuşak testlerde (EIA-4) kor bölgesinden iki farklı epitop, NS3, NS4A, NS4B, NS5A gibi üçüncü kuşak testlerde kullanılan proteinler daha da çeşitlendirilerek genotip 1a, 1b, 2 ve 3 virüslerin NS3 ve NS4 proteinleri de eklenerek duyarlılık üçüncü kuşak testlere göre % 10-20 arttırılmıştır<sup>48</sup>. Ayrıca üçüncü ve dördüncü kuşak testler serokonversiyonu daha kısa sürede saptayabilmektedirler<sup>49</sup>.

ELISA testleri ile enfeksiyon sonrası 4-10 hafta içerisinde antikorlar belirlenebilir. ELISA testini doğrulamak için rekombinant immunoblot test (RIBA) kullanılır<sup>50</sup>. Bu testte başlıca, ELISA'da da kullanılan antijenler kullanılmakta farklı olarak, her antijene karşı oluşmuş antikor ayrı ayrı saptanabilmektedir. Bu testlerde katı faz, ELISA'dan farklı olarak, nitroselüloz bir banttır. Pozitif testte iki bantta reaksiyon saptanır; tek banttaki reaksiyon tanımlanamayan ('indeterminate') sonuç olarak belirlenir. ELISA'dan daha duyarlı değil, ancak daha özgül olduğundan risk grubu dışındaki kişilerde ELISA pozitifliğinin doğrulanması amacıyla geçmişte önerilmiştir. ELISA'dan farklı olarak, nitroselüloz bir banttır. Pozitif testte iki bantta reaksiyon saptanır; tek banttaki reaksiyon tanımlanamayan sonuç olarak belirlenir. ELISA'dan daha duyarlı değil, ancak daha özgül olduğundan risk grubu dışındaki kişilerde ELISA pozitifliğinin doğrulanması amacıyla geçmişte önerilmiştir<sup>51</sup>.

## 1.7.2 Moleküler testler

Diğer bir tanı yöntemi moleküler tekniklerle HCV RNA'nın dolayısıyla vireminin tespit edilmesidir. HCV RNA tayini HCV enfeksiyonu tanısında en duyarlı yöntemdir ve altın standart olarak kabul edilmektedir<sup>52</sup>. AHC'de aminotransferazların yükselmesi ve Anti-HCV pozitifleşmesinden önce plazmada tespit edilebilir. Kronik enfeksiyonu olan hastaların çoğunda viremi sürekli, bir kısmında aralıktır.

HCV-RNA tespitinde kalitatif ya da kantitatif testler kullanılır. Kalitatif HCV-RNA testleri klasik Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR), 'Real-Time' (RT) PZR ya da "Transcription-Mediated Amplification" (TMA) tekniğine dayanır<sup>53</sup>. Viral yükün tespit edilmesinde kantitatif PZR (kompetatif PZR veya RT-PZR) ya da "branched" DNA teknikleri kullanılır. Standardizasyonu sağlamak amacıyla viral yükün internasyonal ünite (IU) olarak verilmesi önerilmektedir. Viral yük, karaciğerdeki inflamasyon ve fibrozisin şiddeti ile de korele değildir<sup>54</sup>.

Viral yük testleri kandaki HCV ribonükleik asit ölçüm testidir. Viral RNA'nın varlığı, virüsün aktif olarak replike olduğunu göstermektedir. Viral yük testi genellikle bir kişinin HCV antikör test sonucu pozitif ise yapılır. Bir kan örneği alınır ve bir mililitre kanda HCV RNA miktarı ölçülür. Viral yük testleri bir kişinin aktif olarak HCV ile infekte olup olmadığının göstergesidir. Viral yük test sonuçları daha önce kopya sayısı olarak ölçülmekteydi. Ancak şimdi mililitrede Uluslararası Birimler (IU/mL) biriminde bildirilmektedir<sup>55</sup>.

## 1.8 HCV Viral Yük Testinin Türleri

HCV viral yük testleri iki kategoriye ayrılır;

### **1.8.1 Kalitatif (Nitel) viral yük testleri**

Bu testler ile kandaki HCV RNA'nın varlığı belirlenir. Bu tür testler genellikle HCV ile kronik enfeksiyonu onaylamak için kullanılır. Viral RNA tespit edilirse pozitif bir sonuç rapor edilir, viral RNA tespit edilmezse test sonucu negatiftir.

### **1.8.2 Kantitatif (Sayısal) viral yük testleri**

Bu testler, kanın bir millilitresinde olan virüs miktarını ölçer. Geçmişte viral yük seviyesi, HCV tedavisine yanıt şansı ile ilişkiliydi. *Pegile interferon ribavirin* tedavisine HCV proteaz inhibitörlerinin eklenmesi çok daha yüksek olan viral yükün olumsuz etkilerinin üstesinden geldiler.

Yaygın HCV viral yük testi için kullanılan üç test bulunmaktadır:

*Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR)* - PZR testleri, etkin enfeksiyonu gösteren kandaki HCV RNA tespitidir. Bu tür kantitatif PZR testi çok hassastır ve 5-10 IU/mL' ye kadar ölçüm yapabilir.

*bDNA* - bDNA yöntemi kantitatif viral yük testi, çok sayıda olan örnekler için kullanılır. Çünkü daha kolay ve ucuzdur, ama yalnızca viral yükü 615 IU/ml 'den daha yüksekse ölçebilir. Yani bir kişi 615 IU/ml altında bir viral yüke sahipse, HCV kanda mevcuttur ama bu test ile tespit edilememiştir. Test yüksek viral yük aralıkları algılar bu yüzden HCV tedavisine başlarken bu test çok faydalı olmaktadır.

*Transkripsiyon aracılı amplifikasyon (TMA)*- TMA teknolojisi kandaki nükleik asit'in amplifikasyonu ile saptamaya izin verir. Bu test ile 5-10 IU/mL kadar az ölçüm yapılabilir. Bu yeni testin kullanımı daha kolay ve daha ucuz, işlem düzenli ve tutarlı, güvenilir ve daha hızlı sonuçlar üreten bir test gibi görünmektedir.

PZR ve TMA testleri, bDNA testinden çok daha düşük viral yük saptanabilir. Viral yük test sonuçları bir kan örneği nasıl saklandığını bağlı olarak değişebilir. Ayrıca test sonuçları laboratuvaradan laboratuvara da değişebilir. Bu nedenle, çoğu uzman kişi viral yük testini her zaman aynı laboratuvarada yapılmasını önerilmektedir, böylece sonuçlar daha karşılaştırılabilir olmaktadır<sup>56</sup>.

### **1.9 HCV Viral Yük Testinde kullanılan teknolojiler.**

Gerçek zamanlı kantitatif PZR, günümüzde nükleik asit miktarlarının belirlenmesinde kullanılan bir metottür. "Real-Time" PZR'da oluşan ürün miktarı, reaksiyon boyunca oluşan ürün miktarıyla orantılı olarak artan floresan boya ve problemlerin verdiği sinyalin izlenmesiyle anlaşılır ve amplifikasyonun devir sayısı belirli miktardaki DNA moleküllerinin elde edilmesi açısından da gereklidir. Çift zincirli DNA'ya bağlanan "SYBR-Green I" floresan boya en basit metottür. "SYBR-Green I" boya işaretleme çok iyi işleyen bir metottür fakat reaksiyon ortamında herhangi bir çift zincirli DNA bulunduğunda da floresan ışımaya yapabilir. Bu çift zincir primer-dimer oluşumu da olabilir. Bu yöntem (SYBR\_Green) maliyet açısından ucuzdur. Bunda başka güvenilir bir şekilde kullanılan üç adet floresan ışımaya yapabilen işaretli prob vardır. Bunlar "TaqMan ® probe" veya *hidroliz prob*, moleküler boncuk yöntemi ve hibridizasyon problemleri "dır<sup>57</sup>.

Moleküler boncuk yönteminin en fazla kullanıldığı alanlar; genetik tarama, SNP çalışmaları, farmakogenetik çalışmalardır. Bu yöntemde prob dizaynı çok önemlidir ve optimal şartlar sağlanmadığında özellikle uygun sıcaklık bulunamamışsa probun saç tokası yapısı değişmeyeceğinden ortamda hedef DNA dizisi bulunsa bile floresan ışımada elde edilemeyebilir<sup>58,59</sup>.

Hibridizasyon problemlerinin ise üç avantajı vardır:

- 1- Floresan, doğrudan iki bağımsız prob hibridizasyonunun sonucu olduğu için çok yüksek bir özgüllük ile sonuçlanır.
- 2- Gelen floresan ışımada, ( polimerazın ekzonükleaz faaliyeti ) probun geri dönüşü olmayan bir bölünmesine bağlı değildir.
- 3- Hibridizasyon problemlerinin tasarımı, sentez ve optimizasyonu kolaydır<sup>60</sup>.

“TaqMan® probe” yöntemi, mutasyon tespiti ile birlikte sayısal değerlere de ulaşılabilirdiğinden araştırmacılar için avantaj sağlar. Bu yöntemin standart bir protokolü ve kolay bir tasarımı olduğu için ve çok az bir optimizasyonla gerçekleştiği için hem allelik diskriminasyon hem de ekspresyon profilinin çıkartılmasında kolaylıkla kullanılır<sup>61</sup>.

“Minor groove binder” ( MGB) prob denilen taqman problemleri daha kısa ve son derece stabil problemlerdir .Bu probun en önemli özelliği, MGB probunun bağlandığı bölgede bir ya birkaç yanlış eşleşme varken bile özgünlüğünü arttıran bir prob olmasıdır<sup>62</sup>.

Bugün birçok araştırma ve tanı laboratuvarlarında Real-Time PZR cihazları mevcuttur. Bu cihazlar, reaksiyon sayılarının kapasiteleri, eksitasyon-emisyon dalga boylarındaki farklılıkları, hızları ve kanal sayıları ile birbirinden ayrılırlar. Ticari olarak satılan Real-Time



PZR cihazları; “Stratagene M x 3000p, M x 3005p ve M x 4000”, “Applied Biosystems 7300 ve 7500”. En fazla kullanılanlar ise “Chromo4”, “Smart Cyclers”, “Rotor- Gene”, “LightCycler” dır<sup>63</sup>.

Bu çalışmanın amacı , farklı taqman problemleri (MGB dahil) kullanarak LightCycler cihazında, Hepatit C virüsünün altı büyük genotipleri için spesifik ve duyarlı bir kantitatif Taqman yöntemi geliştirmektir.

## 2. KURAMSAL TEMELLER

'Real Time' PZR sistemi ile amplifikasyon ürünlerinin miktarlarının belirlenmesinde, yüksek duyarlılık ve kesinlikte sonuçlar alınabilir<sup>64</sup>. 'Real Time' PZR 7-8 lik logaritmik geniş bir dinamik aralığı, yüksek teknik hassasiyet (< 5 kopya) ve yüksek doğruluk(< 2% standart sapma) ile karakterizedir. Bu yöntemin diğer bir avantajı, PZR sonrası hiç bir adım gerektirmez ve bu da çapraz kirlenme olasılığından kaçındırmaktadır. Yüksek verimlilik ve multipleks PZR imkanı da diğer avantajları sayılır<sup>65</sup>.

Yapılan HCV RNA'yı saptamaya yönelik 'Real Time' PZR sisteminin kullanıldığı çalışmalarda farklı teknolojiler ve farklı cihazlarda çalışılmıştır.

Shuang Meng ve Jinming Li yaptığı çalışmada HCV dizileri hizalayarak, 2 set primer-prob ve bir armored RNA yı iç kontrol olarak kullanarak bir çift yönlü eş zamanlı ters transkriptaz-polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PZR) ABI PRISM (applied biosystems, America) sisteminde geliştirdi. Her 2 Probların 5' ucunda, aynı fluorofor, 6-karboksifloresan (FAM), ile etiketlenmiş bu problar, karşılıklı olarak kombine olup test gücünü artırmaktadır. Çift yönlü primer-prob yönteminin tespit limiti 38.99 IU/ml idi. Özgünlüğü etkilenmese de, bu yöntemin hassasiyeti önemli ölçüde iyileşmiştir. Nükleik Asit Amplifikasyon Teknikleri, tüm HCV genotiplerinde uygulanabilir<sup>66</sup>.

S J Read beş nükleik asit ekstraksiyon kitlerinin etkinliğini karşılaştırdı. HBV DNA ve HCV RNA'sının kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) analizleri viral nükleik asitlerin nispi konsantrasyonlarının saptanması için çeşitli protokoller tarafından Light Cycler<sup>TM</sup> cihazı üzerinde yapıldı. HBV ve HCV için kullanılan beş farklı kitlerin( high pure viral nucleic acid, QIAamp viral RNA, QIAam blood DNA, NucleoSpin virus ve High pure viral RNA) arasında high pure viral nucleic acid kiti en verimli olarak belirlenmiştir<sup>67</sup>.

Kiana Shahzamani ve arkadaşları ise QIAamp Viral RNA ekstraksiyon kitinden yararlanarak light cycler sisteminde ( Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) FRET hybridizasyon probuyle HCV altı genotipi için 50IU/mL'e kadar bir duyarlılık ve 10<sup>3</sup> -10<sup>6</sup> IU/mL arası dinamik aralığa sahip ticari kitlere göre daha ucuz maliyetli bir RT-PZR'a optimize etmektedir<sup>68</sup>.

Manabu Abe, Corinne Klett ve arkadaşları HCV teşhis stratejisini geliştirmek ve bunun sonucunda reaktif maliyetlerini azaltmak amacıyla QIAamp DSP viral vacuum kiti ve hybridizasyon probuyle aynı anda hepatit C virüsü RNA miktarı ve genotiplendirmede LightCycler cihazında bir iki adımlı eş zamanlı PZR yöntemi geliştirmişler. Kuantifikasyon testi dünya sağlık örgütünün 96/790 standartına karşı kalibre edildi. Buluş sınırı 30 IU/ml olup 500.000.000 IU/ml'e kadar dinamik aralığı oldu. Deney içi ve deneyler arası tekrarlanabilirliği sırasıyla% 1.2 ve % 1.9 (n = 10) idi. HCV RNA eş zamanlı PZR yöntemi ile elde edilen değerleri Cobas Amplicor HCV monitör test ile elde edilen sonuç yüksek korelasyonu vardır (P <0.001 r = 0,992). Genotipleme erime sıcaklığı analizi ile yapıldı <sup>69</sup>.

Ji-hong Yang, Jian-Ping Lai ve arkadaşları HCV altı genotipleri için ABI Prism 7700 dizisi algılama sistemi üzerinde reaksiyon başına 1000 RNA kopyaya kadar bir duyarlılık ve 10<sup>3</sup> ve 10<sup>7</sup> RNA kopya arasında buluş dinamik aralığa sahip olan bir eş zamanlı RT-PZR geliştirdiler. Deney içi ve deneyler arası Ct değerlerin varyasyon katsayısı sırasıyla %1.37 ve %4.66 dan daha azdı ve klinik tanı için yüksek duyarlılık ve %100 özgünlüğünü göstermişler <sup>70</sup>.

Tomoko Takeuchi ve arkadaşları ABI Prism 7700 dizi detektör sistemin üzerine Taqman probuyle ve Isogen-Ls RNA ekstraksiyon kiti ve EZ rTth RNA PZR kiti kullanarak HCV genomunun 10 kopya kadar tespit edilmiş olup kuantifikasyon aralığı 10<sup>1</sup> ile 10<sup>8</sup> kopya arası bir PZR yöntemi geliştirdiler. Bu sistem, Amplicor monitor sistemden 10-100 kat daha fazla duyarlıydı. Genom tanımlamasında kuantifikasyon aralığı deney içi hassasiyet ve deneyler arası tekrarlanabilirlik Varyasyon katsayısı değeri sırasıyla %0.37-%2.00 ve %0.88-%4.66 idi.

Sistem, hepatit C virüsünün antikorunu var olan hastalarda, kronik hepatitlilerde % 98, Karaciğer sirozlu hastalarda % 95.8 ve hepatosellüler karsinom hastalarda % 100, genomu algılayabildi; ancak antikor olmayan hastalarda genom algılayamadı <sup>71</sup>.

Ronald E. Engle ve arkadaşları ise quantitative amplicor HCV Monitor TM test version 2.0 üzerinde MGBlı taqman probe ve QIAamp Viral RNA mini ekstraksiyon kiti kullanarak HCV'nın altı genotipi için  $10^{2.6} - 10^{6.5}$  IU/ml dinamik aralığı ve deney içi ve deneyler arası hassasiyeti sırasıyla 3% CV ve <2% CV sahip olan bir real time PZR yöntemi geliştirdi <sup>3</sup>

### 3. GEREKÇE VE AMAÇ

'Real Time' PZR sisteminde tek aşamada (ters transkripsiyon ve polimerizasyon aynı tüp içerisinde) HCV RNA'nın kontaminasyon riski ve zaman kaybı da azaltılmış olmakla beraber kantitatif olarak yüksek duyarlılık ve yüksek özgünlük ile belirlenmesi rutin çalışmalarda kullanışlı olabilir.

Taqman EZ-RT PZR Kit içeriğindeki rTth DNA Polymerase enzimi RNA'nın cDNA'ya çevrilmesi (ters transkripsiyon) ve DNA'nın çoğaltılması aşamalarının tek tüp içinde yapılmasına imkân sağlamaktadır. Ayrıca AmpErase ® UNG enzimi de, bir amplikon kirlenme kontrol sistemi olup kontaminasyonu önler.

Çalışmada Taqman EZ-RT PZR Kiti daha ekonomik bir şekilde kullanarak "Light Cycler 480 Real Time" PZR cihazı temelinde farklı primer-prob sistemleri deneyerek HCV-RNA'yı kantitatif olarak saptamaya yönelik en uygun, yüksek kesinlik ve duyarlılıkta 'Real Time' PZR koşullarını belirlemeyi amaçlandı.

## 4. MATERYAL VE YÖNTEM

### 4.1 Materyal

#### 4.1.1 Kimyasal maddeler

Mutlak Etil Alkol %99.5	Crystalline chemical industries ltd. Pakistan
DESCOSEPT AF Alkol bazlı yüzey dezenfektanı	DR. Schumacher G mBH Almanya
Agarose low EEO	AppliChem GmbH Ottoweg 4 D-64291 Darmstadt Germany
Etidyum bromür	Sigma, Almanya
Glasiyal asetik asit	Sigma, Almanya
Tris base	Sigma, Almanya
EDTA	Quantum, Amerika
Bromofenol mavisi	Sigma, Almanya
Fikol	Biochrom, Almanya
Ksilen siyanol	Sigma, Almanya
Yükleme boyası	

#### 4.1.2 Tampon ve çözeltiler

Tris-asetik asit- EDTA Tamponu (TAE)

0,2 M Tris base, 0,09 M Glasiyal asetik asit, 0,05 M EDTA.

#### Agaroz jel yukleme tamponu

% 0,05 Bromofenol mavi, % 15 Fikol, % 0,05 Ksilen siyanol.

### **4.1.3 Kullanılan cihazlar**

Soğutmalı Santrifüj ( Mikro 200R- Hettich Germany)

Plate santrifüj ( SİGma labratuvary centrifuge 4-15 C)

Light cycler 480 II Real Time PZR Cihazı (Roche Applied Science, Almanya)

Cobas Ampliprep (Roche Applied Science, Almanya)

Su filtresi ( Gesellschaft für laborotechnik mbH D-30938 Burgwedel Germany)

Otoklave ( medsan Tek Ltd.co)

Biogüvenlik kabını

Vorteks ( VELP scientifica Italy, 45W 50 Hz)

CL\_1000 ultraviolet crosslinker UVP

Hassas terazi (Sartorius, Türkiye),

Jel görüntüleme sistemi (UVP Jel dökümantasyon sistemleri, Olympus 40X kamerası,  
Japonya)

Jel tankı

High pure spin filter tubes

High pure collection tubes

#### 4.1.4 Deneyde kullanılan malzemeler

rTth DNA Polymerase enzimi 2.5U/μl (0.5 μl)

AmpErase ® UNG enzimi 1U/μl (0.1 μl)

5X PZR Tamponu (750 mM Tris-HCl (25°C'de pH 8.8), 200 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, % 0,1) ( 3 μl)

Mn(OAc)<sub>2</sub> (manganez asetat) 25 mM ( 2.5 μl)

dNTP (her biri 10 mM olan dATP, dUTP, dGTP, dCTP) (0.7 μl)

GAPDH primerleri ( her biri 10 pmol olan ileri ve geri primerler ) (0.6 μl)

GAPDH probu 5 pmol (0.6 μl)

Set 1( HCV F1, HCVR1) veya set 2 (HCV Con259F, HCV Con312R) veya set 3 ( HCV F1, HCV Con312R) ileri ve geri primerleri ( her biri 10 pmol ) (0.6 μl)

Set 1'in taqman probu veya set 2 ve 3'un MGBlı prob ( her biri 5 pmol) ( 0.6 μl)

HCV RNA

0,2 ml'lik PZR tüpleri (Greiner Bioone, Avusturya).

CTM (-) C Human plazma Cobas taqman test Roch molecular system. Branch burg NJ USA

#### 4.1.5 Kullanılan kitleler

High pure viral RNA kiti ( Roche Diagnostics GmbH mannheim-Germany)

Taqman EZ-RT PZR Kiti ( Applied Biosystems Roche Molecular systems )

LightCycler ® RNA Master HybProbe kiti (Roche Diagnostics GmbH –Germany)

#### 4.1.6 HCV Plazma Örnekleri



Çalışmada, laboratuvarımızda daha önce COBAS ® AmpliPrep cihazı ile HCV RNA'sının pozitif olduğu hastalardan alınmış ve HCV genotipi de belirlenmiş 5 farklı genotipe (1a, 3a, 4a, 1b ve 2b ) ait plazma örnekleri kullanılmıştır. Ayrıca COBAS ® AmpliPrep viral yükü  $10^1$  kopya/ml'ye kadar düşük olan 6 hasta plazması ve daha önce 'Light Cycler 480 Real Time' PZR cihazında hibridizasyon primer-prob sistemi ile rutinde çalışılan 3 hasta plazması da deneylere dahil edildi.

## **4.2 Yöntem**

### **4.2.1 Viral RNA izolasyonu**

HCV RNA, 200 µl plazma örneğinden High pure viral RNA Kit (Roche Diagnostics GmbH mannheim-Germany) kullanılarak üretici firma önerilerine göre izole edildi. Buna göre her örnek için 400 µl binding Buffer ve 4,4 µl poli A falkon içine eklendi, el yardımıyla çok iyi karıştırıldı. Ardından bu karışımdan 1.5 ml'lik ependorf tüpün içine 200 µl plazma örneğinin başına 400µl eklendi ( toplam hacim 600 µl) ve vorteks yardımıyla iyice karıştırıldı. High pure spin filter tüpe aktarılıp ve 11000 rpm'de 15 saniye santrüfuj(Mikro 200R- Hettich Germany) edildi, alttaki sıvı kısım atıldı, filtreli tüpü başka bir High pure collection tüpe alıp üzerine 500 µl inhibitor buffer eklendi ve 11000 rpm'de 1 dakika santrüfuj(Mikro 200R- Hettich Germany) edildi, alttaki sıvı kısım atıldı, filtreli tüpü başka bir collection tüpe alıp yıkama işlemi için üzerine 450 µl wash buffer eklendi ve yine 11000 rpm'de 1 dakika santrüfuj edildi, alttaki sıvı kısım tekrar atıldı, filtreli tüpü başka bir collection tüpe alıp yıkama amacıyla aynı işlem tekrar edildi, ardından 15000 rpm'de 15 saniye boş olarak santrüfuj yapıp üzerine 50 µl Elution buffer eklendi ve yine 11000 rpm'de 1 dakika santrüfuj edildi, alttaki HCV RNA içeren 50 µl sıvıyı alıp bölerek -80 °C'de saklandı.

#### 4.2.2 Kullanılan primer ve problemlerin tasarımı ve dizileri

Çalışmada HCV RNA'nın 'Real Time' PZR ile kantitatif analizi için Mega v3.1 programı kullanılarak farklı bölgelere ait 6 genotip ve subtip izolatların 35 tam HCV genomun dizileri karşılaştırıldı. Genom üzerinde bütün genotipler için en korunmuş bölge 5' UTR olarak belirlendi. Daha sonra bu korunmuş bölgeler hedef alınarak Primer Express v2.0 programı kullanılarak primer ve prob tasarımı yapıldı.

Tasarlanan primer ve problemler, TIB MOLBIOL (TIB MOLBIOL Syntheselabor, Almanya) tarafından sentezlenmiştir ve primer, prob dizileri ve üzerlerindeki modifikasyonlar Çizelge 4.1'de verilmiştir.

Bunun yanısıra Ronald E. Engle ve arkadaşları "Development of a taqman assay for the six major genotypes of hepatitis C virus: comparison with commercial assays" adı altında yaptığı çalışmada tasarlanan primer ve MGBlı probu da kullanıldı.

Ayrıca farklı genotiplerin izolatlarına ait tüm genom HCV dizileri üzerine, tasarlanan primer ve prob dizileri yerleştirilerek bunların genom üzerindeki dizilimi de gösterilmiştir(Şekil 4.1).

çizelge 4.1. Tasarlanan primer-prob sistemleri ve üzerindeki modifikasyonları.

Primer probe adı ve seti		Primer dizisi (5'→3')	Modifikasyon
Set 1	HCV F1	GACCGGGTCCTTTCTTGGAT	
	HCV R1	GCACCTATCAGGCAGTACCA	
	HCV PR	TAGCCGAGTAGYGTTGGGTYGCGAAA	5'FAM,3'TAMRA işaretli C→Y
Set 2	HCV Con259F	AGYGTTGGGTYGCGAAAG	C→Y T→Y
	HCV Con312R	CACTCGCAAGCYCCCT	C→Y
	HCV-278MGB PR	CCTTGTTGGTACTGCCTGA	5'FAM,3'TAMRA işaretli 3'MGB
Set 3	HCV F1	GACCGGGTCCTTTCTTGGAT	
	HCV Con312R	CACTCGCAAGCYCCCT	C→Y
	HCV-278MGB PR	CCTTGTTGGTACTGCCTGA	5'FAM,3'TAMRA işaretli 3'MGB
Set 4	HCV F2	GACYGGGTCCTTTCTTGGAT	C→Y
	HCV R2	AGCACCTATCAGGCAGTACCA	
	HCV PR	TAGCCGAGTAGYGTTGGGTYGCGAAA	5'FAM,3'TAMRA işaretli C→Y
Set 5	HCV F3	GACYGGGTCCTTTCTTGGATA	C→Y
	HCV R3	CCCTATCAGGCAGTACCACAAG	
	HCV PR	TAGCCGAGTAGYGTTGGGTYGCGAAA	5'FAM,3'TAMRA işaretli C→Y
Set 6	HCV S R	CTGGAGGCTGCACGACACT	
	HCV S F	GGGCGACACTCCACCATAGA	
	HCV S PR	CTCCCCTGTGAGGAACTACTGTCTT	5'FAM,3'TAMRA işaretli
Hibridizasyon problemleri	Primer 1	TCGCAAGCACCTATCAGG	
	Primer 2	CTGTGAGGAACTACTGTCTT	
	Prob 1	AGTGGTCTGCGGAACCGGTGAGTA--FL	
	Prob 2	LC640-CGGAATTGCCAGGACGACCGGGTC--PH	

```

|
#M67463_la CGG TGA GTA CAC CGG AAT TGC CAG GAC CAC CGG GTC CTT TC- -TT GGA TAA A-C CCG CTC AAT GCC TGG AGA TTT GGG [ 234]
#D10749_la ... ..> ... .. [ 234]
#M62321_la ... .. HCV F1 ... .. [ 234]
#D10934_lb ... .. [ 234]
#H_CV_lb_LB ... .. [ 234]
#H_CV_lb ... .. [ 234]
#HCV_lb_HCV-TR1 ... .. [ 234]
#D14853_lc ... .. [ 234]
#AY051292_lc ... .. [ 234]
#AY651061_lc ... .. C ... .. [ 234]
#AM910652_lg ... .. C. ... .. A. ... .. [ 234]
#AJ851228_ohtrs_1 ... .. C. A. ... .. T. ... .. [ 234]
#D00944_2a ... .. .G. .A. T. ... .. .A ... T. ... C. TC. ... [ 234]
#AB047639_2a ... .. .G. .A. T. ... .. .A ... T. ... C. CC. ... [ 234]
#D10988aa_2b ... .. .A. .G. A.A T. ... .. .A ... T. .T. C. TC. ... [ 234]
#D10988_2b ... .. .A. .G. A.A T. ... .. .A ... T. .T. C. TC. ... [ 234]
#AB047639_2b ... .. .A. .G. A.A T. ... .. .A ... T. .T. C. TC. ... [ 234]
#AY232731_2b ... .. .G. .A. T. ... .. .A ... T. ... C. TC. ... [ 234]
#D50409_2c ... .. .G. .A. T. ... .. .A ... T. ... C. CC. ... [ 234]
#AB031663_2k ... .. .G. .A. T. ... .. .A ... T. ... C. CC. ... [ 234]
#D17763_3a ... .. C. TG. GT ... .. GC- .A. ... .. A. CA. A. ... [ 234]
#D49374_3b ... .. C. .G. .T ... .. AC- .A. ... .. C. .A. ... [ 234]
#FJ407092_3I ... .. C. .G. .GT ... .. ACC .A. ... .. A. C. .A. ... [ 234]
#D63821_3K ... .. C. .G. .TT ... .. AC- TA. ... .. C. .A. ... [ 234]
#Y11604_4a ... .. C. .G. .T ... .. T. .- ... .. C. .A. ... [ 234]
#DQ418782_4a ... .. C. .G. .T ... .. C. .- ... .. C. .A. ... [ 234]
#FJ025854_4b ... .. C. .G. ... .. C. .A. ... [ 234]
#FJ462436_4C ... .. C. .G. .G. ... .. C. .- ... .. A. C. .A. ... [ 234]
#FJ462437_4D ... .. C. .G. .T ... .. C. .A. ... [ 234]
#DQ418786_4D ... .. C. .G. .T ... .. C. .A. ... [ 234]
#AF064490_5A ... .. .G. .T ... .. C. ... [ 234]
#Y12083_6A ... .. .T ... .. C A. ... C. A. ... [ 234]
#DQ480512_6A ... .. .T ... .. C A. ... C. A. ... [ 234]
#D84262_6B ... .. .C A. ... C. A. ... [ 234]
#EF108306_7A ... .. .G. .A ... T. ... .. C. .- .A ... T. ... C. ... [ 234]

#M67463_la CGT GCC CCC GCA AGA CTG CTA GCC GAG TAG TGT TGG GTC GCG AAA GGC CTT GTG GTA CTG CCT GAT AGG GTG CTT GCG [ 312]
#D10749_la ..C ... ..< ... .. [ 312]
#M62321_la ... .. HCV prob dizisi ... .. HCV R1 ... .. [ 312]
#D10934_lb ... .. .G ... .. [ 312]
#H_CV_lb_LB ... .. .G ... .. [ 312]

```

```

|
#M67463_1a      CCG TGA GTA CAC CGG AAT TGC CAG GAC GAC CGG GTC CTT TC- -TT GGA TAA A-C CCG CTC AAT GCC TGG AGA TTT GGG [ 234]
#D10749_1a      .....>..... [ 234]
#M62321_1a      .....<..... [ 234]
#D10934_1b      .....<..... [ 234]
#H._CV_1b_LB    .....<..... [ 234]
#H._CV_1b       .....<..... [ 234]
#HCV_1b_HCV-TR1 .....<..... [ 234]
#D14853_1c      .....<..... [ 234]
#AY051292_1c    .....<..... [ 234]
#AY651061_1c    .....<..... [ 234]
#AM910652_1g    .....<..... [ 234]
#AJ851228_ohtrs_1 .....<..... [ 234]
#D00944_2a      .....<..... [ 234]
#AB047639_2a    .....<..... [ 234]
#D10988aa_2b    .....<..... [ 234]
#D10988_2b      .....<..... [ 234]
#AB047639_2b    .....<..... [ 234]
#AY232731_2b    .....<..... [ 234]
#D50409_2c      .....<..... [ 234]
#AB031663_2k    .....<..... [ 234]
#D17763_3a      .....<..... [ 234]
#D49374_3b      .....<..... [ 234]
#FJ407092_3I    .....<..... [ 234]
#D63821_3K      .....<..... [ 234]
#Y11604_4a      .....<..... [ 234]
#DQ418782_4a    .....<..... [ 234]
#FJ025854_4b    .....<..... [ 234]
#FJ462436_4C    .....<..... [ 234]
#FJ462437_4D    .....<..... [ 234]
#DQ418786_4D    .....<..... [ 234]
#AF064490_5A    .....<..... [ 234]
#Y12083_6A      .....<..... [ 234]
#DQ480512_6A    .....<..... [ 234]
#D84262_6B      .....<..... [ 234]
#EF108306_7A    .....<..... [ 234]

#M67463_1a      CGT GCC CCC GCA AGA CTG CTA GCC GAG TAG TGT TGG GTC GCG AAT GGC CTT GCG GTA CTG CCT GAT AGG GTG CTT GCG [ 312]
#D10749_1a      ...C .....<..... [ 312]
#M62321_1a      .....<..... [ 312]
#D10934_1b      .....<..... [ 312]
#H._CV_1b_LB    .....<..... [ 312]

```

```

#M67463_1a      CGG TGA GTA CAC CGG AAT TGC CAG GAC GAC GGG GTC CTT TC--TT GGA TAA A-C CCG CTC AAT GCC TGG AGA TTT GGG [ 234]
#D10749_1a      .....>..... [ 234]
#M62321_1a      .....<..... [ 234]
#D10934_1b      .....<..... [ 234]
#H._CV_1b_LB    .....<..... [ 234]
#H._CV_1b       .....<..... [ 234]
#HCV_1b_HCV-TR1 .....<..... [ 234]
#D14853_1c      .....<..... [ 234]
#AY051292_1c    .....<..... [ 234]
#AY651061_1c    .....<..... [ 234]
#AM910652_1g    .....<..... [ 234]
#AJ851228_ohters_1 .....<..... [ 234]
#D00944_2a      .....<..... [ 234]
#AB047639_2a    .....<..... [ 234]
#D10988aa_2b    .....<..... [ 234]
#D10988_2b      .....<..... [ 234]
#AB047639_2b    .....<..... [ 234]
#AY232731_2b    .....<..... [ 234]
#D50409_2c      .....<..... [ 234]
#AB031663_2k    .....<..... [ 234]
#D17763_3a      .....<..... [ 234]
#D49374_3b      .....<..... [ 234]
#FJ407092_3I    .....<..... [ 234]
#D63821_3K      .....<..... [ 234]
#Y11604_4a      .....<..... [ 234]
#DQ418782_4a    .....<..... [ 234]
#FJ025854_4b    .....<..... [ 234]
#FJ462436_4C    .....<..... [ 234]
#FJ462437_4D    .....<..... [ 234]
#DQ418786_4D    .....<..... [ 234]
#AF064490_5A    .....<..... [ 234]
#Y12083_6A      .....<..... [ 234]
#DQ480512_6A    .....<..... [ 234]
#D84262_6B      .....<..... [ 234]
#EF108306_7A    .....<..... [ 234]
|
#M67463_1a      CGT GCC CCC GCA AGA CTG CTA GGC GAG TAG TGT TGG GTC GCG AAG GGC GTT GTG GTA CTG CCT GAT AGG GTG CTT GCG [ 312]
#D10749_1a      .....<..... [ 312]
#M62321_1a      .....<..... [ 312]
#D10934_1b      .....<..... [ 312]
#H._CV_1b_LB    .....<..... [ 312]

```

```

#M67463_1a      GCC AGC CCC CTG ATG GGG GCG ACA CTC CAC CAT GAA TCA CTC CCC TGT GAG GAA CTA CTG TCT TCA CGC AGA AAG CGT [ 78]
#D10749_1a      ... .. [ 78]
#M62321_1a      ... .. HCV S.PROB [ 78]
#D10934_1b      ... .. .GA T.. GG GCG ACA CTC CAC CAT AGA [ 78]
#H._CV_1b_LB    ... .. .GA T.. .. AG [ 78]
#H._CV_1b       ... .. .GA T.. HCV S.F .. AG. [ 78]
#HCV_1b_HCV-TR1 ----- ..C [ 78]
#D14853_1c      ... .. .G. [ 78]
#AY051292_1c    ... .. AG. [ 78]
#AY651061_1c    ... .. .G. [ 78]
#AM910652_1g    ----- ..G. [ 78]
#AJ851228_others_1 ----- .. [ 78]
#D00944_2a      -A. CCG ... ..A ..A ... .. .G. ... .. C. [ 78]
#AB047639_2a    -A. CTG ... ..A ..A ... .. .G. ... .. ..C [ 78]
#D10988aa_2b    ... C. ... .. .G. [ 78]
#D10988_2b      ----- .. [ 78]
#AB047639_2b    ----- .. [ 78]
#AY232731_2b    -A. CCG ... ..A ..AA ... .. .G. ... .. [ 78]
#D50409_2c      TG. CCG ... ..A .AT ... .. .G. [ 78]
#AB031663_2k    TG. CCG ... ..A .AT ... .. .G. [ 78]
#D17763_3a      --A CCT G.. TCT TAC .A. ... .. .G. ... .. .T ... .. G.. ..C [ 78]
#D49374_3b      --A CCT G.. TCT T.C .A. ... .. .T ... .. G.. [ 78]
#FJ407092_3I    --A CCT G.. TCT TAC .A. ... .. .G. ... .. .T ... .. G.. ..C [ 78]
#D63821_3K      --A CCT G.. TCT T.C .A. ... .. .T ... .. G.. [ 78]
#Y11604_4a      ----- .. [ 78]
#DQ418782_4a    ----- .. [ 78]
#FJ025854_4b    -A. CTG .T. TCT ... ..A.A ..A ... .. C.G [ 78]
#FJ462436_4C    ----- .. [ 78]
#FJ462437_4D    -A. CTG .T. TCT ... ..A.A ..A ... .. C.G [ 78]
#DQ418786_4D    -A. CTG .T. TCT ... ..A.A ..A ... .. C.G [ 78]
#AF064490_5A    ----- .. [ 78]
#Y12083_6A      ----- ..T. ... .. [ 78]
#DQ480512_6A    ----- .. [ 78]
#D84262_6B      -G. CAG ... ..T .AC ... .. [ 78]
#EF108306_7A    ----- ..C ... ..C. ... ..C [ 78]

#M67463_1a      CTA GCC ATG GCG TTA GTA TGA GTG TCG TGC AGC CTC CAG GAC CCC CCC TCC CGG GAG AGC CAT AGT GGT CTG CGG AAC [ 156]
#D10749_1a      ... .. [ 156]
#M62321_1a      ... .. HCV S.R. [ 156]
#D10934_1b      ... .. [ 156]
#H._CV_1b_LB    ... .. [ 156]
#H._CV_1b       ... .. .T. [ 156]

```

## HCV Con259F, HCV Con312R ve MGBIı prob dizisi



Şekil 4.1. HCV izolatların hizalanması ve tasarlanan primer problemlerin dizisi ve genom üzerinde yeri

### 4.2.3 HCV RNA kantitasyonu için standart oluşturulması

HCV RNA kantitasyonu için standart oluşturma amacıyla daha önce COBAS® AmpliPrep cihazında çalışan ve yüksek log ( $10^7$  yada  $10^6$ )'a sahip olan plazma örnekleri seçildi ve DNA\RNA'sız plazma (roche molecular system) kullanarak 1/10 şeklinde seri seyreltme  $10^2$ 'ye kadar yapıldı.

### 4.2.4 HCV RNA'nın 'Real Time' PZR ile gösterilmesi

HCV RNA'yı 'Real Time' PZR yöntemi ile gösterebilmek için farklı primer-prob setleri ile **Taqman EZ-RT PZR Kit'** kullanıldı. Farklı reaksiyon koşulları denenerek HCV RNA'yı saptamak için optimum PZR koşulları belirlendi. İzlenen yöntem ve kullanılan kitler aşağıda özetlenmiştir.



#### **4.2.4.1 Taqman EZ-RT PZR kiti**

Taqman EZ-RT PZR Kiti (Applied Biosystems, Fostercity, ABD) RNA tespiti ve analizi için bir sistem sağlar. İçeriğindeki enzim nedeniyle RNA'nın cDNA'ya çevrilmesi (ters transkripsiyon) ve DNA'nın çoğaltılması aşamalarının tek tüp içinde yapılmasına imkân sağlamaktadır.

Bu kit AmpErase® UNG, bir ampikon kirlenme kontrol sistemi içerir. AmpErase UNG nakil etmiş PZR ürünleri, reamplifikasyonu önleyebilir. Bu yöntem, PZR reaktif karışımı içinde dTTP yerine dUTP kullanır ve amplifikasyondan önce reaksiyon ile uracil N-glikozilazı tepkimeye tabi tutar. dUTP PZRda bir dNTP substrat olarak dTTP yerine geçtiği zaman, AmpErase UNG 50 µl reaksiyon başına önceki amplifiye ürününü 200.000 kopyaya kadar kaldıracaktır.

TaqMan EZ RT-PZR Kiti (P/N N808-0235) 200 reaksiyon (reaksiyon başına 50 µl) için yeterlidir. Deneylerde toplam reaksiyon hacimi 16 µl olmaktadır ve ekonomik olarak kitin önerdiği protokole göre daha ekonomik olur.

#### **4.2.4.2 LightCycler® RNA Master HybProbe kiti**

LightCycler® RNA Master HybProbe kiti tek aşamalı RT-PZR için tasarlanan bir kittir. Tth DNA polimeraz enzimi, aptamerler ile kombine halinde kullanılır. Tth DNA polimeraz ısıya dayanıklı bir enzimdir. Bu enzim ayrıca RNA'ya bağlı ters transkriptaz aktivitesi ve DNA'ya bağlı polimeraz aktivitesi ile RT ve PZR aşamalarını tek tüp'te gerçekleştirebilir.

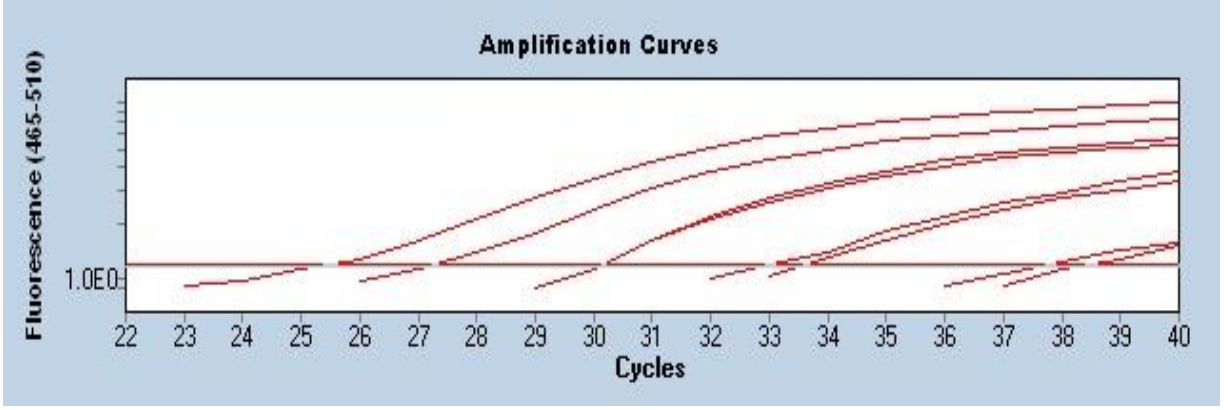
## 5. ARAŞTIRMA BULGULARI

Bu çalışmada Taqman EZ-RT PZR Kiti temelinde bütün primer-prob sistemleri denenmiştir. Elde edilen sonuçlar, kullanılan her primer-prob seti başlığı altında verilmiştir.

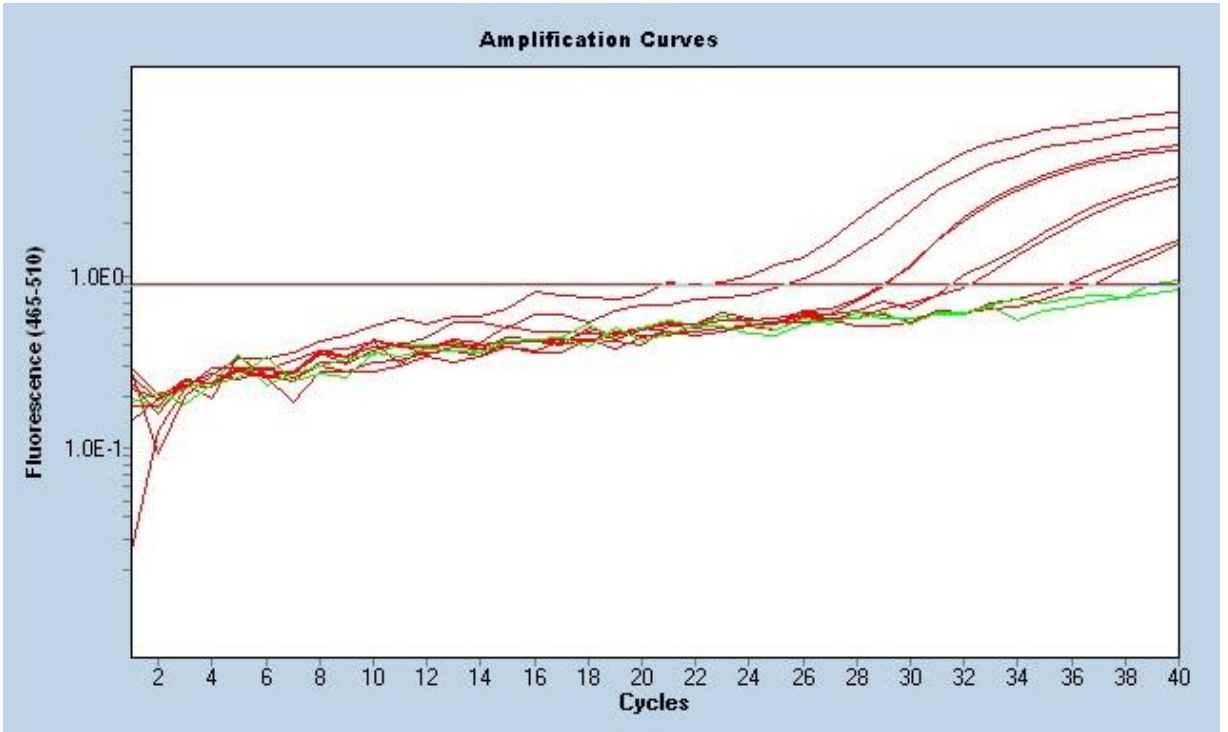
### 5.1 Set 1 primer-prob sistemi (HCV F1, HCV R1 ve HCV PR)

Taqman EZ-RT PZR Kiti kullanılarak Taqman hidroliz primer-prob setleri ( set 1, 4, 5 ve 6); ‘Light Cyler 480 Real Time’ PZR cihazında farklı bağlanma sıcaklıkları (55°C ile 65°C arasında değişen), farklı HCV RNA, Mangan ve primer-prob konsantrasyonları, ve farklı enzim unite miktarları ile denendi.

Sonuç olarak, HCV RNA, bu primer-prob setler arasındaki set1 primer-prob seti ( HCV F1- GACCGGGTCCTTTCTTGGAT, HCV R1- GCACCCTATCAGGCAGTACCA ve HCV PR 5’FAM- TAGCCGAGTAGYGTGGGTYGCGAAA-TAMRA) ile , ‘Light Cyler 480 Real Time’ PZR cihazında çizelge 5.1 ve 5.2 deki koşullar altında çoklu tekrarlar şeklinde çoğaltıldı. (Şekil 5.1 ve 5.2)



Şekil 5.1 HCV RNA'nın 'Light Cycler 480 Real Time' PZR cihazında set1 primer-prob sistemi ile Taqman EZ-RT PZR Kiti temelinde çoğaltılması ( $10^6$  ile  $10^3$  arası seri seyreltme örneklerin her biri çift çalışılmıştır).



Şekil 5.2 HCV RNA'nın 'Light Cycler 480 Real Time' PZR cihazında set1 primer-prob sistemi ile Taqman EZ-RT PZR Kiti temelinde çoğaltılması ( $10^6$  ile  $10^3$  arası seri seyreltme örneklerin her biri çift çalışılmıştır).

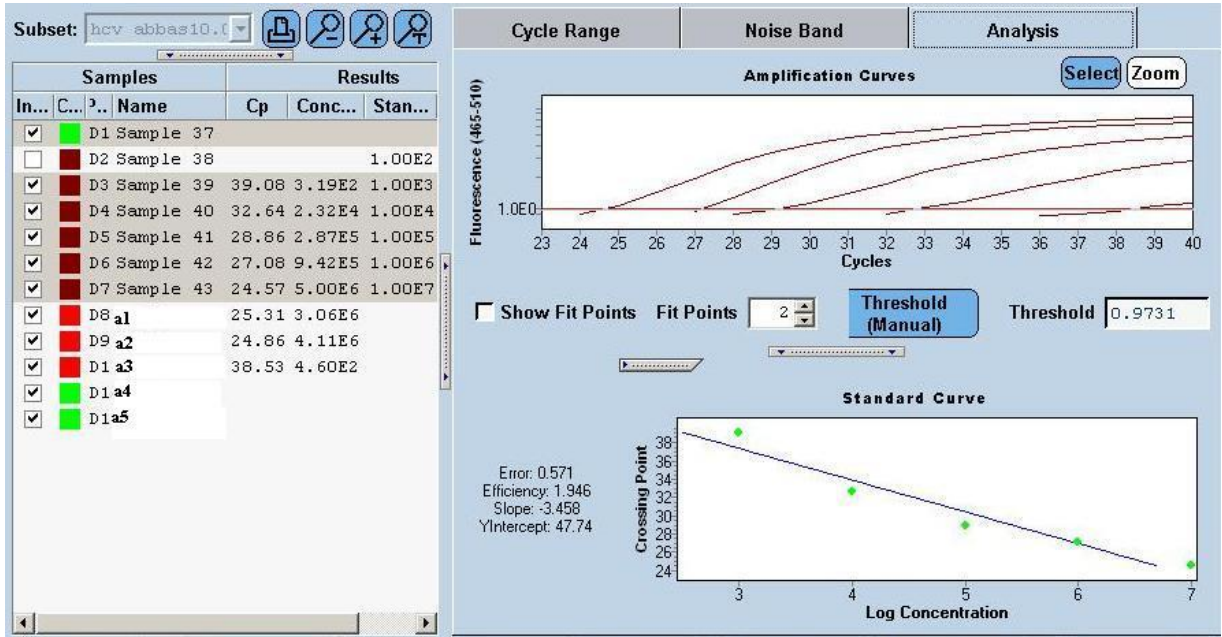
Çizelge 5.1 EZ-RT PZR Kiti temelinde set 1 primer-prob sistemi için kullanılan PZR sıcaklık döngü ve süreleri (\*: diğer taqman primer-prob setleri için bağlanma sıcaklığı farklı olabilir).

aşama	UNG aktivasyonu	Ters transkripsiyon	Denaturasyon	Amplifikasyon	soğutma
sıcaklık	50 °C	60 °C	95 °C	95 °C 60 °C	40 °C
zaman	2 dk	30 dk	5 dk	20 s 1 dk	30 s
döngü	1	1	1	40	1

Çizelge 5.2 'Light Cycler 480 Real Time' PZR cihazında, set 1 primer-prob sistemi için kullanılan EZ-RT PZR Kit substrat konsantrasyon ve miktarları

Substrat	Konsantrasyon	Miktar
Su		2 µl
5X Taqman EZ buffer	5X	3 µl
Mn(OAc) <sub>2</sub> (manganez asetat)	25mM	2 µl
dATP	10mM	0.5 µl
dCTP	10mM	0.5 µl
dGTP	10mM	0.5 µl
dUTP	10mM	0.5 µl
İleri primer	10 pmol	0.6 µl
Geri primer	10 pmol	0.6 µl
Prob	5 pmol	0.6 µl
GAPDH ileri primer	10 pmol	0.6 µl
GAPDH geri primer	10 pmol	0.6 µl
GAPDH prob	5 pmol	0.6 µl
Amperase UNG	1 U/ µl	0.1 µl
rTth DNA polimeraz	2.5 U/ µl	0.5 µl
Kalıp RNA		2.5 µl

Daha sonra sistemimizi test etmek amacıyla aynı primer ve probu kullanarak laboratuvarımızda daha önce yapılan COBAS® AmpliPrep cihazı ile HCV RNA'sının pozitif olduğu belirlenen 5 hastanın HCV RNA izolasyonu yapıldı . Daha sonra 'Light Cyler 480 Real Time' PZR sisteminde yukarıda oluşturulan standartlar kullanılarak aynı hastaların HCV RNA viral yükleri hesaplandı (Şekil 5.3). Deneyde kontaminasyonu kontrol etmek amacıyla, araya DNA/RNA'dan arındırılmış steril su içeren negatif kontrol konularak çalışıldı.



Şekil 5.3 1/10 seri seyreltme ile oluşturulan standartların ve hasta örneklerinin 'Light Cyler 480 Real Time' PZR cihazında Taqman EZ-RT PZR kiti ile kantitasyonu.

Örneklerin Cobas sonucu sırasıyla; a1:  $5,2 \times 10^6$ , a2:  $1,7 \times 10^7$ , a3:  $1,3 \times 10^4$ , a4:  $1,4 \times 10^2$  kopya/ $\mu$ l ve a5: negatifti. Yapılan deney sonucu değerlendirilen hastaların viral yükleri ise sırasıyla a1:  $3,06 \times 10^6$ , a2:  $4,11 \times 10^6$ , a3:  $4,6 \times 10^2$  kopya/ $\mu$ l , a4 ve a5: negatif olarak bulunmuştur.

Çizelge 5.3. çalışmamızda katılan hastaların farkı cihazlarda ve farklı primer prob sisteminde alınan sonuçların karşılaştırılması.

	A1	A2	A3	A4	A5
<b>COBAS® AmpliPrep</b>	5,2x10 <sup>6</sup>	1,7x10 <sup>7</sup>	1,3x10 <sup>4</sup>	1,4x10 <sup>2</sup>	-
<b>Light Cycler 480+ Taqman prob</b>	3.06x10 <sup>6</sup>	4.11x10 <sup>6</sup>	4,6x10 <sup>2</sup>	-	-

Daha sonra deneyin duyarlılığını ve tekrarlanabileceğini belirlemek için HCV genomunu içeren 1\10 seri seyreltme oranındaki standart örnekleri oluşturularak, ‘Light Cycler 480 Real Time’ PZR cihazında çoklu denemeler yapıldı ve bu örneklerin döngü eşik değerleri (CT: cycle threshold) kaydedildi (çizelge 5.4).

Çizelge 5.4 HCV F1, HCV R1 ve HCV PR primer- prob seti ile yapılan deneylerin deneyler arası döngü eşik değerleri ve varyasyonu

Örnek	Deneyler arası Ct değeri			Deneyler arası varyasyon	
	1.Deney	2.Deney	3.Deney	Deneylerin ortalama Ct değeri ve varyasyonu	
	CT	CT	CT	Orta.CT± S.D	CV(%)
10 <sup>7</sup>	24.57	-	-	-	-
10 <sup>6</sup>	27.08	25.84	29.95	27.62± 2.10	7.63
10 <sup>5</sup>	28.86	27.86	31.57	29.43± 1.91	6.52
10 <sup>4</sup>	32.64	31.37	34.69	32.90± 1.67	5.09
10 <sup>3</sup>	39.08	36.24	34.40	36.57± 2.35	6.44
10 <sup>2</sup>	-	-	-	-	-

## 5.2. Set 2 primer-prob sistemi (HCV Con259F, HCV Con312R ve HCV-278MGB )

Taqman EZ-RT PZR Kiti ile HCV Con259F-AGYGTTGGGTYGCGAAAG, HCV Con312R-CACTCGCAAGCYCCCT ve HCV-278MGB-6FAM CCTTGTGGTACTGCCTGA prob kullanılarak 'Light Cyler 480 Real Time' PZR sisteminde çizelge 5.5 ve 5.6 koşullar altında HCV RNA'nın çoğalma optimizasyonu yapıldı. Daha sonra HCV RNA bakımından negatif olduğu bilinen kontrol plazma örneği kullanılarak HCV RNA'sının pozitif olduğu bilinen hasta plazmasından 1/10, 1/100, 1/1000, 1/10000, 1/100000 ve 1/1000000 seri seyreltme oranlarındaki standartlar hazırlandı ve internal kontrol olarak GAPDH primer – prob seti kullanılarak Taqman EZ-RT PZR Kiti ile 'Light Cyler 480 Real Time' PZR cihazında standartlar çoklu olacak şekilde çalışıldı (şekil 5.4 ve 5.5).

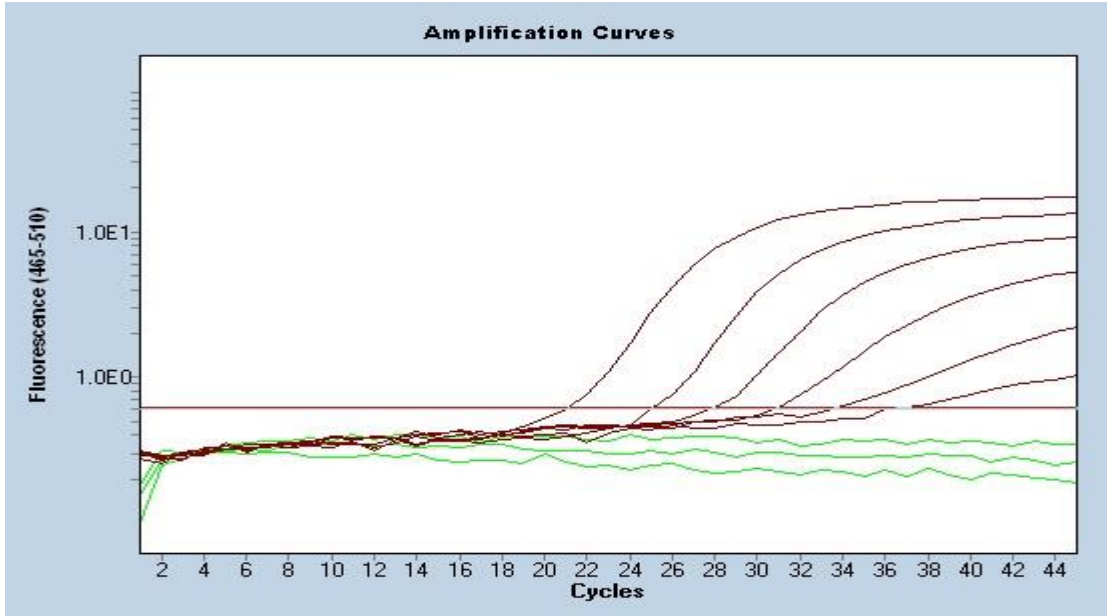
Çizelge 5.5. EZ-RT PZR Kiti temelinde set 2 ve set 3 primer-problar sistemi için kullanılan PZR sıcaklık döngü ve süreler

aşama	UNG aktivasyonu	Ters transkripsiyon	Denaturasyon	Amplifikasyon	soğutma
sıcaklık	50 °C	75°C 60 °C	95 °C	95 °C 60 °C	40 °C
zaman	2 dk	1 dk 30 dk	5 dk	20 s 1 dk	30 s
döngü	1	1	1	45	1

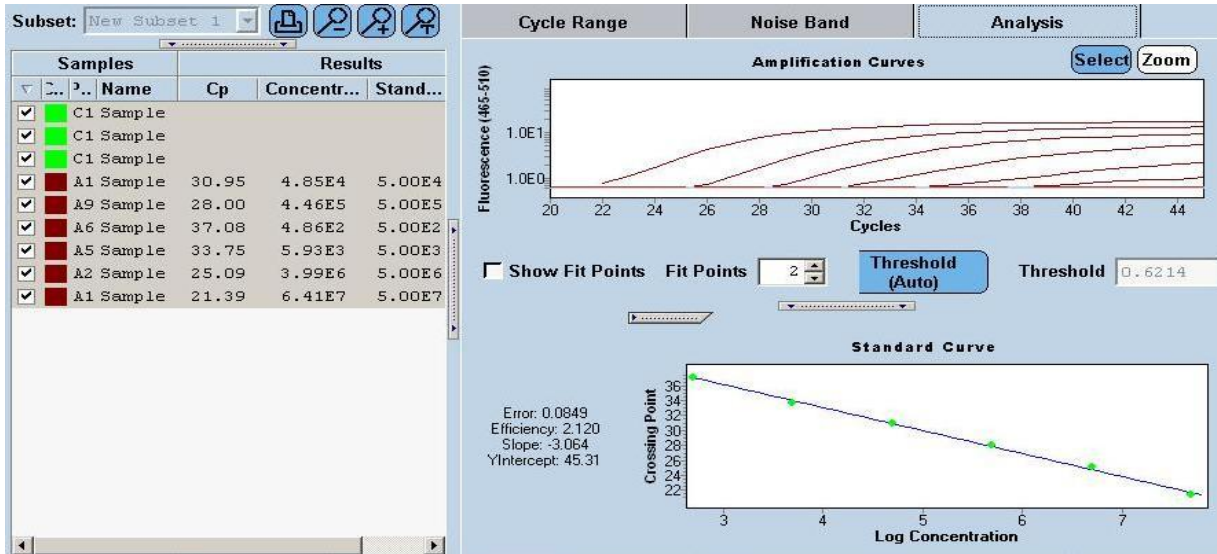
Çizelge 5.6 ‘Light Cyler 480 Real Time’ PZR sisteminde, set1 ve set2 primer-problar sistemi için EZ-RT PZR Kit kullanılan substrat konsantrasyon ve miktarları

substrat	Konsantrasyon	Miktar
Su		0.5 µl
5X Taqman EZ tamponu	5X	3 µl
Mn(OAc) <sub>2</sub> (manganez asetat)	25mM	2.5 µl
dATP	10mM	0.7 µl
dCTP	10mM	0.7 µl
dGTP	10mM	0.7 µl
dUTP	10mM	0.7 µl
Ileri primer	10 pmol	0.6 µl
Ters primer	10 pmol	0.6 µl
Prob	5 pmol	0.6 µl
GAPDH Ileri primer	10 pmol	0.6 µl
GAPDH Geri primer	10 pmol	0.6 µl
GAPDH prob	5 pmol	0.6 µl
Amperase UNG	1 U/µl	0.1 µl
rTth DNA polimeraz	2.5 U/µl	0.5 µl
Kalıp RNA		2.8 µl

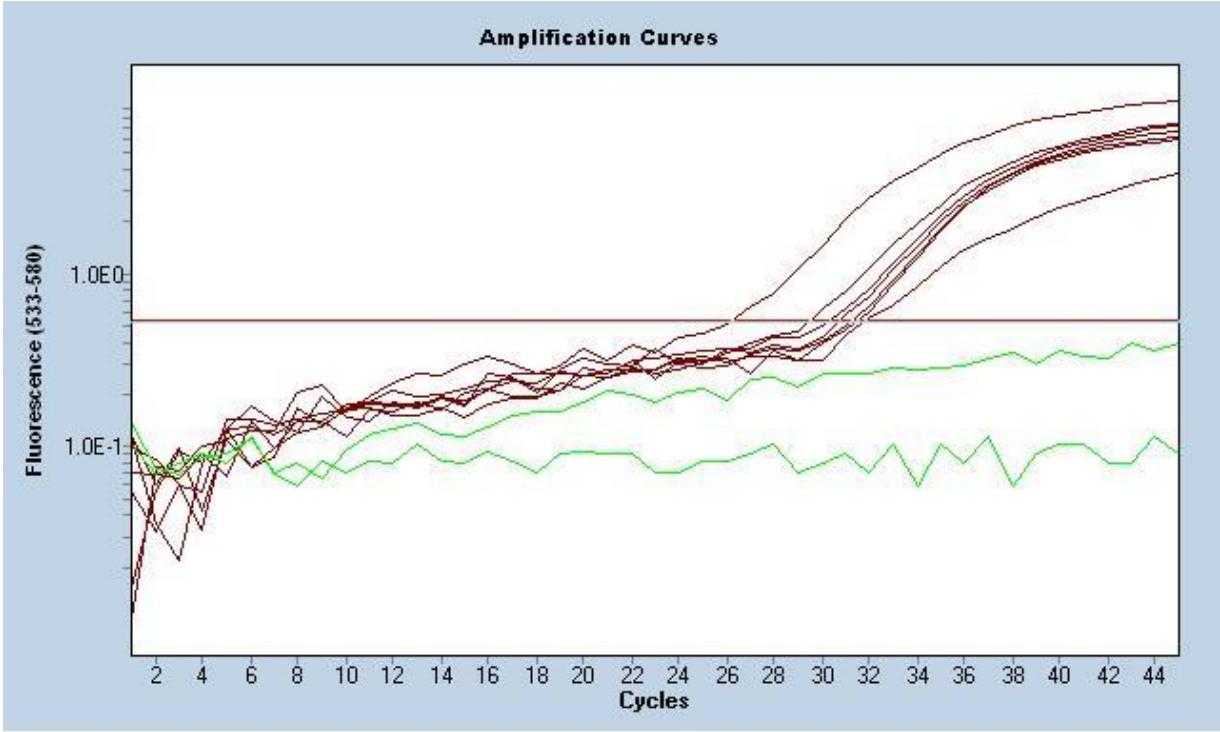




Şekil 5.4. HCV RNA'nın 'Light Cycler 480 Real Time' PZR sisteminde HCV Con259F, HCV Con312R ve HCV-278MGB prob seti ve Taqman EZ-RT PZR Kit ile çoğaltılması.



Şekil 5.5 1/10 oranındaki seri seyreltme ile oluşturulan standart örneklerinin 'Light Cycler 480 Real Time' PZR sisteminde HCV Con259F, HCV Con312R ve HCV-278MGB prob seti ve Taqman EZ-RT PZR Kit ile kantitasyonu.



Şekil 5.6. HCV RNA'nın 'Light Cyler 480 Real Time' PZR cihazında, Taqman EZ-RT PZR Kit ile yapılan çalışmada GAPDH primer-prob sistemi iç kontrol olarak kullanılması.

Daha sonra deneyin duyarlılığını ve tekrarlanabilirliğini belirlemek için HCV genomunu içeren 1\10 seri seyreltme oranındaki standart örnekleri oluşturulup 'Light Cyler 480 Real Time' PZR sisteminde çoklu denemeler yapıldı ve bu örneklerin döngü eşik değerlerine (CT: cycle threshold) kayıt edildi (çizelge 5.7).

Deneilerin verimlilik, hata oranı ve slop değerleri çizelge 5.8'de verilmiştir.

Çizelge 5.7 HCV Con259F, HCV Con312R ve HCV-278MGB prob seti ve Taqman EZ-RT PZR Kit ile yapılan deneylerin deney içi ve deneyler arası döngü eşik değerlerin varyasyonu

Örnek	Deney içi varyasyon						Deneyler arası varyasyon	
	1.Deney		2.Deney		3.Deney			
	Orta.CT±S.D	CV(%)	Orta.CT± S.D	CV(%)	Orta.CT± S.D	CV(%)	Orta.CT± S.D	CV(%)
10 <sup>7</sup>	21.81±0.07	0.32	22.69±0.29	1.3	21.26±0.23	1.09	21.92±0.72	3.29
10 <sup>6</sup>	25.50±0.88	3.46	24.52±0.62	2.5	25.41±0.53	2.08	25.14±0.54	2.15
10 <sup>5</sup>	28.00±0.57	2.07	27.88±0.04	0.17	27.95±0.007	0.02	27.94±0.06	0.21
10 <sup>4</sup>	31.28±1.15	3.68	30.61±1.18	3.85	30.28±0.89	2.94	30.72±0.5	1.65
10 <sup>3</sup>	33.71±0.82	2.43	34.15±0.53	1.55	35.28±2.29	6.49	34.38±0.8	2.35
10 <sup>2</sup>	36.15±1.65	4.57	39.23±0.4.45	11.35	36.7±0.15	0.42	37.36±1.64	4.39

Çizelge 5.8 HCV Con259F, HCV Con312R ve HCV-278MGB prob seti ve Taqman EZ-RT PZR Kit ile yapılan deneylerin deney içi ve deneyler arası Verimlilik, Slop ve Hata oranı değerlerin varyasyonu

İndeks	Deney içi varyasyon						Deneyler arası varyasyon	
	1.Deney		2.Deney		3.Deney			
	Orta.± S.D	CV(%)	Orta.± S.D	CV(%)	Orta.± S.D	CV(%)	Orta.± S.D	CV(%)
Hata oranı	0.159.±0.039	24.84	0.172.±0.042	24.66	0.333.±0.18	55.6	0,2213±0.09	43.79
Verimliliği	2.255.±0.152	6.741	2.13.±0.016	0.78	2.094.±0.06	2.87	2.16±0.084	3.916
Slop	-2.845.±0.23	-	-3.04.±0.03	-	-3.11.±0.12	-	-3.002±0.14	-
Y	44.2.±2.093	4.73	47.96.±0.21	0.44	45.69.±1.25	2.75	45.95±1.89	4.120

Ayrıca her örnek, ‘Real Time’ PZR’den sonra kontrol amaçlı olarak agaroz jel elektroforezinde jel görüntüleme sistemi (UVP Jel dökümantasyon sistemleri, Olympus 40X

kamerası, Japonya) kullanılarak görüntülendi ve her biri 53 bç olan bantlar gözlendi (şekil 5.6).



Şekil 5.7 HCV Con259F, HCV Con312R ve HCV-278MGB prob seti ve Taqman EZ-RT PZR Kit ile oluşturulan standartların  $5,0 \times 10^7$  kopya/ $\mu$ l'den  $5,0 \times 10^2$  kopya/ $\mu$ l'ye kadar olan 'Real Time' PZR ürünlerinin %2'lik agaroz jelde gösterilmesi (M: HaeIII işaretleyicisidir).

Daha sonra Cobas AmpliPrep ile çalışılarak kantitatif olarak RNA kopya sayısı belirlenmiş 6 hasta ve 5 farklı HCV alttiplere ait örnekler denendi ve başarılı bir şekilde bütün bu farklı izolatlarda saptanabildi (şekil 5.8 ve 5.9)

Sonuçlar çizelge 5.9'da karşılaştırıldı.



Çizelge 5.9. HCV viral yük sonuçlarının karşılaştırılması.

	1b	2b	1a	3a	4a	X1	X2	X3	X4	X5	X6
<b>COBAS® AmpliPrep</b>	$9.2 \times 10^5$	$4.0 \times 10^7$	$7.8 \times 10^5$	$1.4 \times 10^5$	$2.5 \times 10^6$	$1.8 \times 10^2$	$1.0 \times 10^2$	$1.2 \times 10^2$	$6.9 \times 10^1$	$4.1 \times 10^2$	$6.8 \times 10^6$
<b>Light Cycler 480+MGB prob</b>	$3.64 \times 10^5$	$1.59 \times 10^7$	$5.76 \times 10^5$	$1.98 \times 10^5$	$3.06 \times 10^6$	$9.4 \times 10^2$	$4.16 \times 10^3$	$2.05 \times 10^2$	-	$9.91 \times 10^1$	$5.5 \times 10^5$

Ardından laboratuvarımızda hibridizasyon problemleri kullanarak “Light Cycler 480 Real Time” PZR cihazında HCV RNA miktarı rutin olarak saptamada kullanılan protokol ile 3 örnek, çalışıldı ve kıyaslamak amacı ile aynı örnekler set 2 primer-prob sistemi ile de aynı cihazda çalışıldı (şekil 5.9 ve 5.10).

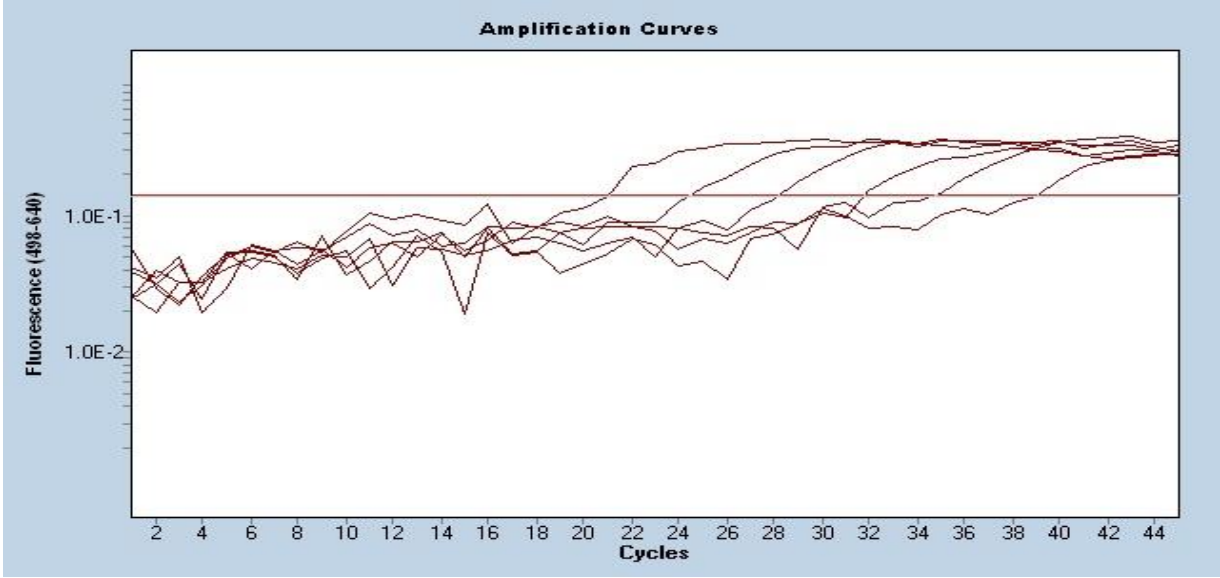
Rutin çalışmalarında kullanılan protokol ve PCR koşulları aşağıda çizelge 5.10 ve 5.11' de verilmiştir.

Çizelge 5.10 ‘Light Cycler 480 Real Time’ PZR sisteminde, rutin çalışmaları için LightCycler ® RNA Master HybProbe kiti kullanılan substrat konsantrasyon ve miktarları

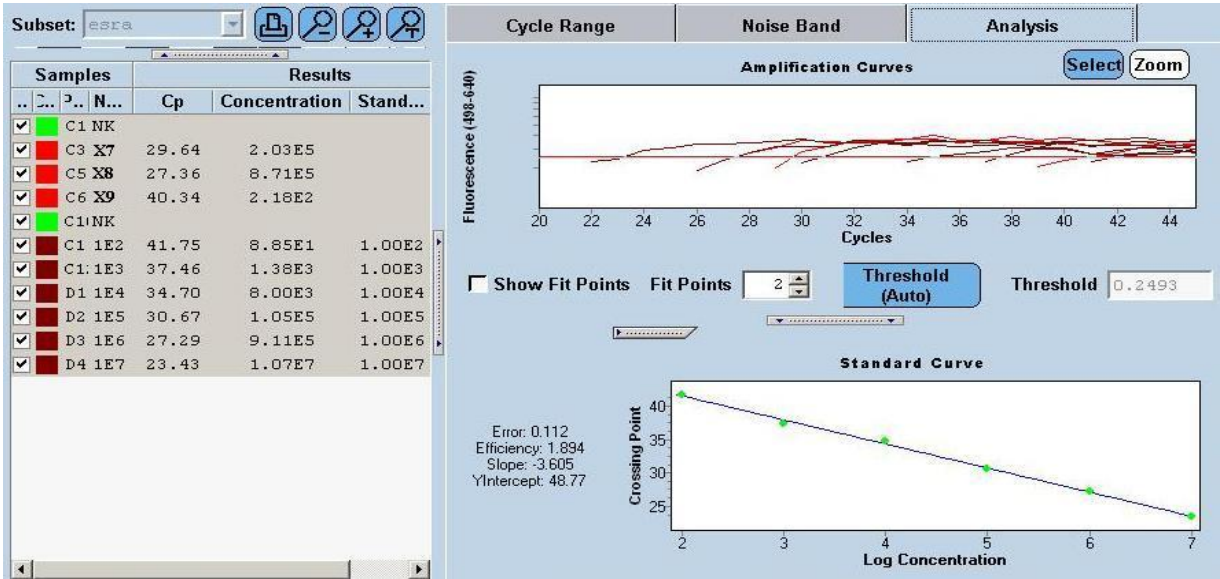
substrat	Konsantrasyon	Miktar
Su		1.65 µl
Mn(OAc) <sub>2</sub> (manganez asetat)	25mM	0.98 µl
Primer 1	10mM	0.75 µl
Primer 2	10mM	0.75 µl
Prob 1	10mM	0.75 µl
Prob 2	10mM	0.75 µl
Master mix		5.6
Kalıp RNA		4

Çizelge 5.11 LightCycler ® RNA Master HybProbe kiti temelinde rutin çalışmaları için kullanılan PZR sıcaklık döngü ve süreler

Aşama	Sıcaklık	zaman	Döngü
<b>Ters transkripsiyon</b>	61°C	20 dk	1
<b>Denaturasyon</b>	95 °C	2 dk	1
<b>Amplifikasyon</b>	95 °C	5 s	45
	55 °C	10 s	
	72 °C	11 s	
<b>Soğutma</b>	40 °C	30 s	1

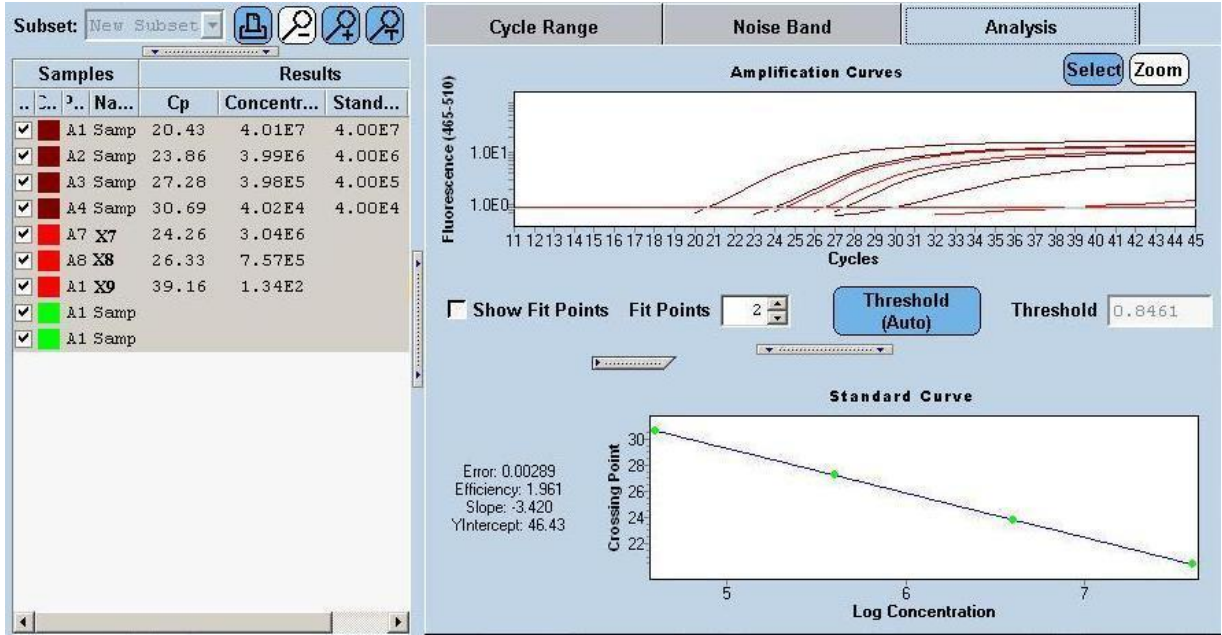


Şekil 5.10. HCV RNA'nın 'Light cycler 480 Real Time' PZR sisteminde rutin çalışmalarda Hibridizasyon probu ve LightCycler ® RNA Master HybProbe kiti ile çoğaltılması.



Şekil 5.11. Rutin çalışmalarda 'Light Cycler 480 Real Time' PZR cihazında hibridizasyon problemleri ve LightCycler ® RNA Master HybProbe kiti ile hastaların viral yükünün saptanması ve kantitasyonu.





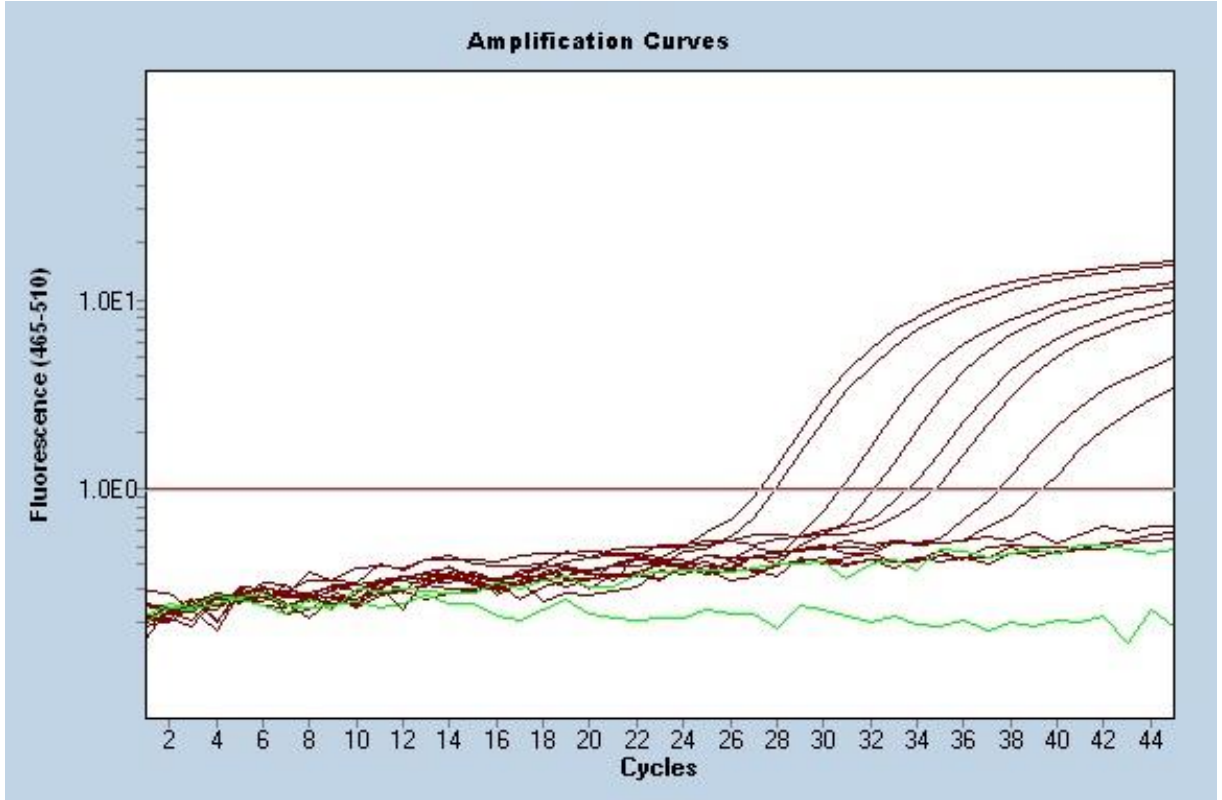
Şekil 5.12. Plazma örneklerin viral yükü set 2 primer-prob sistemi ve Taqman EZ-RT PZR kiti ile saptanması ve kantitasyonu.

Çizelge 5.12. Çalışmada kullanılan plazma örneklerinin farklı cihazlardan alınan HCV miktarlarının karşılaştırılması.

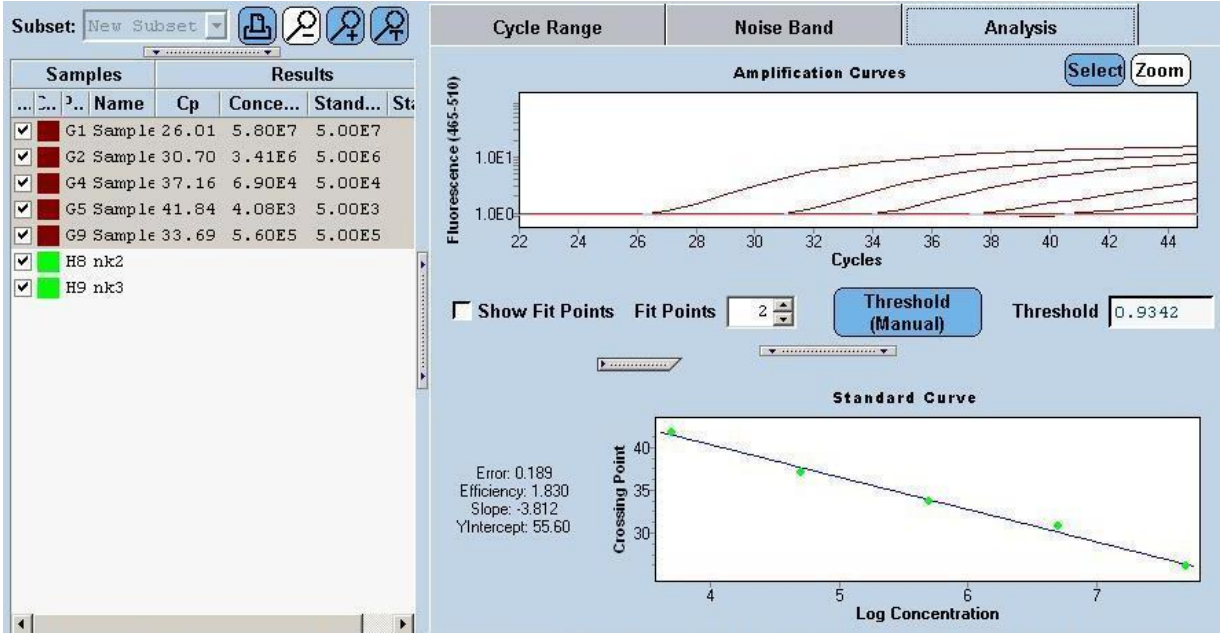
	X7	X8	X9
Light Cycler 480+ Hibridizasyon prob+ LightCycler © RNA Master HybProbe kiti	$2.03 \times 10^5$	$8.71 \times 10^5$	$2.18 \times 10^2$
Light Cycler 480+ HCV-278MGB prob+ Taqman EZ-RT PZR kiti	$3.04 \times 10^6$	$7.57 \times 10^5$	$1.34 \times 10^2$

### 5.3 Set 3 primer-prob sistemi (HCV F1, HCV Con312R ve HCV-278MGB prob )

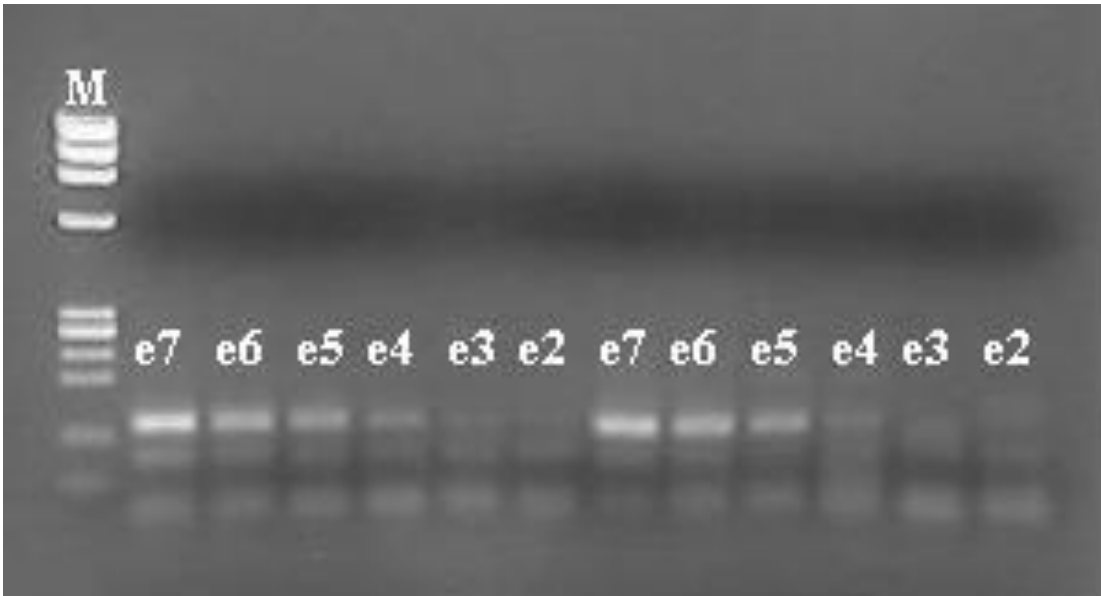
HCV Con259F, HCV Con312R ve HCV-278MGB prob ile yaptığımız aynı deney HCV F1-GACCGGGTCCTTTCTTGGAT, HCV Con312R-CACTCGCAAGCYCCCT ve HCV-278MGB-6FAM CCTTGTGGTACTGCCTGA prob ile aynı koşullarda çoklu şekilde yapıldı. Elde ettiğimiz sonuçlar kayıt edildi ve şekil 5.13, 5.14 ve 5.15 ve çizilge 5.10 ve 5.11 özetlendi.



Şekil 5.13 HCV RNA'nın 'Light Cycler 480 Real Time' PZR sisteminde HCV F1, HCV Con312R ve HCV-278MGB seti ve Taqman EZ-RT PZR Kit ile çoklu şekilde çoğaltılması.



Şekil 5.14 1/10 seri seyreltme ile oluşturulan standartların 'Light Cycler 480 Real Time' PZR sisteminde HCV F1, HCV Con312R ve HCV-278MGB seti ve Taqman EZ-RT PZR Kit ile kantitasyonu.



Şekil 5.15 HCV F1, HCV Con312R ve HCV-278MGB prob seti ve Taqman EZ-RT PZR Kit ile oluşturulan  $5,0 \times 10^7$  kopya/ $\mu$ l'den  $5,0 \times 10^2$  kopya/ $\mu$ l'ye kadar olan standartların 'Real Time' PZR ürünlerinin %2'lik agaroz jelde gösterilmesi (M: HaeIII işaretleyicisidir).

Çizelge 5.13 HCV F1, HCV Con312R ve HCV-278MGB prob seti ve Taqman EZ-RT PZR Kit ile yapılan deneylerin , deney içi ve deneyler arası döngü eşik değerlerin varyasyonu

Örnek	Deney içi varyasyon						Deneyler arası varyasyon	
	1.Deney		2.Deney		3.Deney			
	Orta.CT±S.D	CV(%)	Orta.CT± S.D	CV(%)	Orta.CT± S.D	CV(%)	Orta.CT± S.D	CV(%)
10 <sup>7</sup>	29.2±0.49	1.69	27.78±0.14	0.50	27.05±1.47	5.43	28.01±1.09	3.90
10 <sup>6</sup>	33.07±1.97	5.98	32.14±0.33	1.05	31.30±0.85	2.73	32.17±0.88	2.75
10 <sup>5</sup>	34.09±1.03	3.02	35.26±0.36	1.02	34.22±0.75	2.21	34.52±0.64	1.85
10 <sup>4</sup>	40.24±0.00	0.00	38.03±2.05	5.35	39.09±2.73	6.99	39.12±1.10	2.82
10 <sup>3</sup>	40.66±0.00	0.00	43.96±0.37	0.85	41.06±1.10	2.68	41.89±1.80	4.29
10 <sup>2</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-

Çizelge 5.14 HCV F1, HCV Con312R ve HCV-278MGB prob seti ve Taqman EZ-RT PZR Kit ile yapılan deneylerin deney içi ve deneyler arası Verimlilik, Slop ve Hata oranı değerlerin varyasyonu

İndeks	Deney içi varyasyon						Deneyler arası varyasyon	
	1.Deney		2.Deney		3.Deney			
	Orta.± S.D	CV(%)	Orta.± S.D	CV(%)	Orta.± S.D	CV(%)	Orta.± S.D	CV(%)
Hata oranı	0.156.±0.17	110.2	0.35±0.24	67.94	0.39.±0.29	74	0.29±0.125	41.90
Verimliliği	2.05.±0.17	8.33	1.81±0.019	1.08	1.90.±0.11	5.88	1.92±0.121	6.31
Slop	-3.22±0.37	-	-3.85±0.06	-	-3.58.±0.32	-	-3.55±0.316	-
Y	54.36.±3.84	7.07	57.45±0.74	1.30	53.78±2.57	4.78	55.19±1.97	3.57

## 6. TARTIŞMA VE SONUÇ

Hepatit C virüsü ( HCV ) genellikle sessiz katil olarak adlandırılıyor ve çoğu zaman herhangi bir belirti göstermeden hastalık ilerler ve hastalar ancak hastalığını ileri aşamalarına ulaşınca anlaşılmaktadır. Pek çok ülkede doğru tanımak amacıyla uygun ve yeterli imkânlar bulunmamaktadır. Genelde HCV antikoru veya anti-HCV ELISA testleri ile HCV enfeksiyonu taranmaktadır; ancak bu gibi serolojik testler yeterince duyarlı olmadığı için hata oranı çok fazladır, bu yüzden HCV'nin saptanmasında daha duyarlı ve kesin sonuç almak için moleküler metotlar ve PZR temelli yaklaşımlar çok önem kazanmaktadır <sup>72,73</sup>.

HCV, doğru teşhis için direkt saptama gerektiren hastalıklarından biridir. Diğer in vitro sistemlere göre RT-PZR, teşhis amacıyla daha fazla potansiyele sahiptir <sup>74</sup>. HCV virüsü kanda düşük kopyalarda olduğu zaman rutin serolojik testler bütün örneklerde HCV genomunu saptayabilecek kadar duyarlı olmayabilir. Nükleik asit temelli amplifikasyon metotlar ise HCV nin direkt bulunabilmesine imkân vermektedir. RT-PZR ile enfeksiyon durumunun değerlendirmesinde, seropozitif hastaların viral replikasyonun saptanmasında ve immün bozukluğu olan veya pencere döneminde olan hastalarda enfeksiyonun tanısına imkân sağlamaktadır <sup>75,76</sup>.

Çalışmamız, Light cycler 480 Real Time PZR cihazı temelinde yapılmış olup kullandığımız Taqman oligoprobları, 5' ve 3' ucunda floresan özellikli madde içeren dizi spesifik standart hidroliz oligoproblar ve MGBlı oligoproblardır. DNA polimeraz enzimi ilgili DNA ipliği üzerinde ilerlerken hibridize olmuş oligoproba geldiğinde onu 5'-3' nükleolitik aktivitesiyle keser. Böylece “5' reporter” floresan madde eksitasyon enerjisini ‘3' quencher’ moleküle transfer edemez ve eksitasyon enerjisini alet tarafından eş zamanlı olarak monitorize edilebilen belli bir dalga boyunda salar. Bu dalga boyu, ‘quencher’ molekülün yayımladığından farklıdır. Taqman ‘Real Time’ PZR sistemi PZR ürünlerinin miktarının

belirlenmesinde oldukça duyarlı ve hızlı bir sistemdir ve yüksek duyarlılık ve kesinlikle kantitatif analizinde başarılı bir biçimde uygulanmıştır.

MGB gruplarına sahip oligoproblar tek sarmal DNA amplikonu ile çok kararlı dupleksler oluşturur ve böylece hibridizasyon temelli sistemlerde daha kısa problemlerin kullanılmasına imkan verir. MGB'li problemlerin modifiye olmayan DNA problemlere göre erime sıcaklığı (T<sub>m</sub>) daha yüksektir. MGB gruplarının sağladığı diğer özelliklerden biri ise hedef amplikonda yanlış eşleşme olsa dahi probun bağlanma özgünlüğünü artırmasıdır. Ayrıca, floresan söndürme özelliği ile arka plan ışınmaları azaltır ve probun duyarlılığını artırır. MGB'li probun yapısı A/T oranı yüksek iken G/C oranı yüksek olan bir proba göre daha kararlı bir yapı oluşturmaktadır. Bu özellik probun T<sub>m</sub> derecesinin ayarlanması ve tasarlanması konusunda kolaylık sağlamaktadır <sup>62</sup>.

Bizim çalışmamızda da bu ön bilgiler ışığında yola çıkılarak farklı bölgelere ait HCV izolatları dizileri karşılaştırılmış ve HCV genomu üzerinde korunmuş olan 5'UTR bölgesi hedef alınarak primer-prob sistemleri tasarlanmıştır.

Ayrıca çalışmamızda Ronald E. Engle ve arkadaşlarının kendi çalışmasında ( Developmet of a Taqman assay for the six major genotypes of hepatitis C virus: comparison with commercial assays) tasarladığı primer prob'ları da kullanarak optimizasyon sağlandı.. Bu kaynaktan seçilen probun en önemli özelliği tasarlanmasında 6 genotipe ait 186 HCV genomunun hizalanmış olması ve bunların 5' UTR bölgeleri karşılaştırılarak en yüksek korunmuş bölgesinin seçilmiş olmasıdır. Seçilen bölge 260-313 bazları arasındaydı ve 53 bç amplikon uzunluğuna sahipti. 261, 267, 276, 280, 284, 309 ve 312. baz pozisyonlarındaki yanlış eşleşmeler, subtip başına 2 izolattan fazlasında görülmemesi nedeniyle primer-prob tasarımında göz ardı edilmiştir. Bunun yanı sıra 2a, 2b, 3a ve 6a genotiplerinde 262(T/C), 270(C/T) ve 302(T/C). pozisyonunda baz farklılıkları göz önüne alınmıştır ve bu pozisyonlarda

dejenere bazlar kullanılmıştır. Primer-prob tasarlanmasında hizalanan HCV izolatlarının sayısı, genotip ve subtipleri şekil 1.4'e verilmiştir.

Tasarlanan ve kullanılan toplam 6 primer prob setinden set 1 (HCV F1, HCV R1 ve HCV PR), set 2 (HCV Con259F, HCV Con312R ve HCV-278MGB) ve set 3 (HCV F1, HCV Con312R ve HCV-278MGB) HCV RNA'nın kantitasyonu için optimize edildi. Bu primer prob setleri arasında en tutarlı sonuçları veren set 2 (HCV Con259F, HCV Con312R ve HCV-278MGB) ve set 3'ü (HCV F1, HCV Con312R ve HCV-278MGB) kullandığımızda sırasıyla  $5 \times 10^7$ - $5 \times 10^2$  ve  $5 \times 10^7$  ile  $5 \times 10^3$  arası seri dilüsyonlu standartlar ile standart eğrileri hesaplandı. Bunun için de her amplikonun Ct değeri ve standart dilüsyonun log kopya sayısı arasında lineer regresyon analizi yapıldı. Standart eğrilerinin slop değerleri deneyler arası hesaplandığında sırasıyla  $-3.002 \pm 0.14$  ve  $-3.55 \pm 0.31$  olarak bulundu. Metodun verimliliği ("efficiency") yaklaşık olarak sırasıyla %100 ve %90 olarak hesaplandı. Deneyin özgünlüğünü onaylamak amacıyla agaroz jel elektroforezde örnekler yürütüldü ve örneklerin bç sayısına bakıldı. Böylece çoğaltılan bölgenin özgünlüğü gözlemlendi. Agaroz jel elektroforez sonucuna göre 2. primer-prob setinin, optimum koşullarda daha özgün bir sonuç verdiği gözlemlendi ve set 2 ve set 3 PCR ürünlerinin sırasıyla ~53 ve 114 bazlık beklenen bantları gözlemlendi.

Deneylerin tekrarlanabilirliğini göstermek amacıyla set 2 ve set 3 primer problemlerinin kullanılarak oluşturulan sırasıyla  $10^7$  ile  $10^2$  ve  $10^7$  ile  $10^3$  arası standartların deney içi ve deneyler arası Ct değerlerinin değişkenliği (CV%) değerlendirildi. Set 2 için CV% değeri deney içi 0.02 ile 6.49 ve deneyler arası 0.21 ve 4.39 arasında değişebilmektedir. Set 3 ise Ct değerinin CV% değeri deney içi 0.50 – 6.99 ve deneyler arası 1.85 - 4.29 arasında değişebilmektedir. Set 2 ve 3 Ct değerinin değişkenliği (CV%) karşılaştırılması sonucunda deney içi ve deneyler arası set 2 primer-prob sistemi set 3'e göre tekrarlanabilirliği daha fazla olduğu görüldü. Optimum koşullarda set 2 primer-prob sistemi set 3'e göre daha duyarlı ve daha özgündür. HCV tespit limiti ise set 2 için  $10^2$  ve set 3 için  $10^3$  olarak bulundu.

Cobas Taqman sonuçları ile karşılaştırdığımızda yüksek viral yüke sahip olan örneklerde Light Cycler'da MGB'li problarla yapılan deneyde de hemen hemen aynı viral yükler gözlemlendi. Ancak düşük viral yüke sahip örnekler ( $10^2$ ) bir log değişiklik gösterebildi ki bu da örneğin saklanma koşullarına bağlı olarak değişkenlik göstermiş olabilir. Hibridizasyon problemlerinin kullanıldığı rutin çalışmalarımız ile karşılaştırıldığında sonuçlar duyarlılık açısından benzer olup MGB'li prob kullanılarak EZ-RT kiti ile yaklaşık 15 µl'lik son hacimle optimize edilen deneyler çok daha ekonomik, tekrarlanabilirliği ve duyarlılığı yüksek sonuçlar vermiştir.

Sonuç olarak çalışmamızda HCV Con259F, HCV Con312R ve HCV-278MGB seti ile Taqman EZ-RT PZR Kiti kullanarak light cycler 480 real time PZR cihazında yüksek özgünlük, yüksek duyarlılık ve yüksek verimliliğe sahip olan ve 100 kopya/µl'ye kadar HCV RNA virüsü saptanabilen bir yöntem geliştirildi. Geliştirdiğimiz yöntem ile farklı HCV genotipleri başarılı bir şekilde yakalanıp kantitatif olarak saptanabilmektedir.



## KAYNAKLAR

1. Yildirim B, Barut S, Bulut Y, et al. Seroprevalence of hepatitis B and C viruses in the province of Tokat in the Black Sea region of Turkey: A population-based study. *Turk J Gastroenterol.* 2009;20(1):27-30.
2. Joyce MA, Tyrrell DL. The cell biology of hepatitis C virus. *Microbes and infection / Institut Pasteur.* Apr 2010;12(4):263-271.
3. Engle RE, Russell RS, Purcell RH, Bukh J. Development of a TaqMan assay for the six major genotypes of hepatitis C virus: comparison with commercial assays. *Journal of medical virology.* 2008;80(1):72-79.
4. Mandell GL. Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases. 2005.
5. Sherlock S DJ. *Hepatitis C Virus.* Vol Eleventh edition 2002.
6. Mauss Stefan BT, Rockstroh Jürgen, Sarrazin Christoph, Wedemeyer Heiner. Short guide to hepatitis C. *Flying publisher.* 2012.
7. Alter MJ. Epidemiology of hepatitis C virus infection. *World Journal of Gastroenterology.* 2007;13(17):2436.
8. Elmi Ş. HIV/AIDS, HBV, HCV, Sifiliz ve Genital Herpes 'in Toplumda ve Riskli Davranış Modeli Gösteren Seks İşçilerinde Karşılaştırılması. *Uzmanlık tezi. TC Sağlık Bakanlığı Haseki Eğitim ve Araştırma Hastanesi Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği. İstanbul.* 2007:25-54.
9. Frank C, Mohamed MK, Strickland GT, et al. The role of parenteral antischistosomal therapy in the spread of hepatitis C virus in Egypt. *The Lancet.* 2000;355(9207):887-891.
10. Hepatitis C- global prevalence(update). *Wkly Epidemiol Rec.* 2000( 75(3)):18-19.
11. Shepard CW, Finelli L, Alter MJ. Global epidemiology of hepatitis C virus infection. *The Lancet infectious diseases.* 2005;5(9):558-567.
12. Baykan M, Ertugrul Ö. Türkiye'de HBV ve HCV enfeksiyonlarının durumu.

13. Mıstık R. Türkiye’de viral hepatit epidemiyolojisi yayınların irdelenmesi. *Viral hepatit*. 2007;1:10-50.
14. Kurt H, Battal İ, Memikođlu O, Yeşilkaya A, Tekeli E. Ankara bölgesinde sağlıklı bireylerde HAV, HBV, HCV seropozitifliğinin yaş ve cinsiyete göre dağılımı. *Viral Hepatit Derg* 2003; 8: 88. 2003;96.
15. Michael A. Joyce DLJT. The cell biology of hepatitis C virus. *Elsevier Masson SAS*. 2010.
16. ÇİFTÇİ İH, ER H, AŞIK G, AKTEPE OC, ALTINDİŞ M. Hepatit C virusu (HCV) RNA pozitif olgularda genotip dağılımı. *Kocatepe Tıp Derg*. 2009;10:21-24.
17. Sunnen GV. Hepatitis C and Ozone therapy. *Ozone in Medicine*. 2001.
18. Barut Hüseyin Şener GÖ. Dünyada ve Ülkemizde Hepatit C Epidemiyolojisi. *Klinik Dergisi*. Vol 222009:38-43.
19. Franciscus A. HCV Genotype and Quasispecies. *HCSP*. 2013;VERSION 6.
20. Alter MJ. Prevention of spread of hepatitis C. *Hepatology*. 2002;36(5B):s93-s98.
21. Yildirim B, Tahan V, Ozaras R, et al. Hepatitis C virus risk factors in the Turkish community. *Digestive diseases and sciences*. 2005;50(12):2352-2355.
22. Organization WH. Global database on blood safety: summary report 1998–1999. *Blood Transfusion Safety*. World Health Organization, Geneva. URL [http://www.who.int/bloodsafety/publications/en/\[accessed on 26 November 2006\]](http://www.who.int/bloodsafety/publications/en/[accessed on 26 November 2006]). 2001.
23. Hauri AM, Armstrong GL, Hutin YJ. The global burden of disease attributable to contaminated injections given in health care settings. *International journal of STD & AIDS*. 2004;15(1):7-16.
24. Karaca Ç, Çakalođlu Y, Demir K, et al. Risk factors for the transmission of hepatitis C virus infection in the Turkish population. *Digestive diseases and sciences*. 2006;51(2):365-369.
25. Andre P, Perlemuter G, Budkowska A, Brechot C, Lotteau V. Hepatitis C virus particles and lipoprotein metabolism. Paper presented at: Seminars in liver disease2005.
26. Moradpour D, Penin F, Rice CM. Replication of hepatitis C virus. *Nature Reviews Microbiology*. 2007;5(6):453-463.

27. ERGÜL DAA. Hepatit Virüslerinin Moleküler Biyolojisi. *Güncel Gastroenteroloji*. 2003.
28. Tan S-L. *Hepatitis C viruses: genomes and molecular biology*. The Publisher; 2006.
29. Kato N. Molecular Virology of Hepatitis Virus. *Acta Med Okayama*. 2001;55:133-159.
30. Merz A, Long G, Hiet M-S, et al. Biochemical and morphological properties of hepatitis C virus particles and determination of their lipidome. *Journal of Biological Chemistry*. 2011;286(4):3018-3032.
31. Durmaz R. HCV mutasyonları. *Tabak F, Balık İ, Tekeli E, (eds). Viral hepatit 2005. Birinci baskı. Viral Hepatitle Savaşım Derneği Yayını, İstanbul 2005*. 2005:170-174.
32. S T. Hepatit C virüsü: Viroloji ve seroloji. *Viral Hepatit*. 2003:186 - 198.
33. Thomas DL LS. *Principles and Practice of Infectious Diseases*. Churchill Livingstone; 2000.
34. Moradpour D, Blum HE. A primer on the molecular virology of hepatitis C. *Liver International*. 2004;24(6):519-525.
35. Thomas DL RS, Lemon SM. *Principles and practice of infectious diseases*. 6th ed ed. Philadelphia: Elsevier Churchill Livingstone; 2005.
36. Lauer GM, Walker BD. Hepatitis C virus infection. *New England Journal of Medicine*. 2001;345(1):41-52.
37. Pawlotsky J-M. Pathophysiology of hepatitis C virus infection and related liver disease. *Trends in microbiology*. 2004;12(2):96-102.
38. Blanchard E, Belouzard S, Goueslain L, et al. Hepatitis C virus entry depends on clathrin-mediated endocytosis. *Journal of virology*. 2006;80(14):6964-6972.
39. Gosert R, Egger D, Lohmann V, et al. Identification of the hepatitis C virus RNA replication complex in Huh-7 cells harboring subgenomic replicons. *Journal of virology*. 2003;77(9):5487-5492.
40. Kunkel M, Lorinczi M, Rijnbrand R, Lemon SM, Watowich SJ. Self-assembly of nucleocapsid-like particles from recombinant hepatitis C virus core protein. *Journal of virology*. 2001;75(5):2119-2129.
41. Roingard P, Hourieux C, Blanchard E, Brand D, Ait- Goughoulte M. Hepatitis C virus ultrastructure and morphogenesis. *Biology of the Cell*. 2004;96(2):103-108.

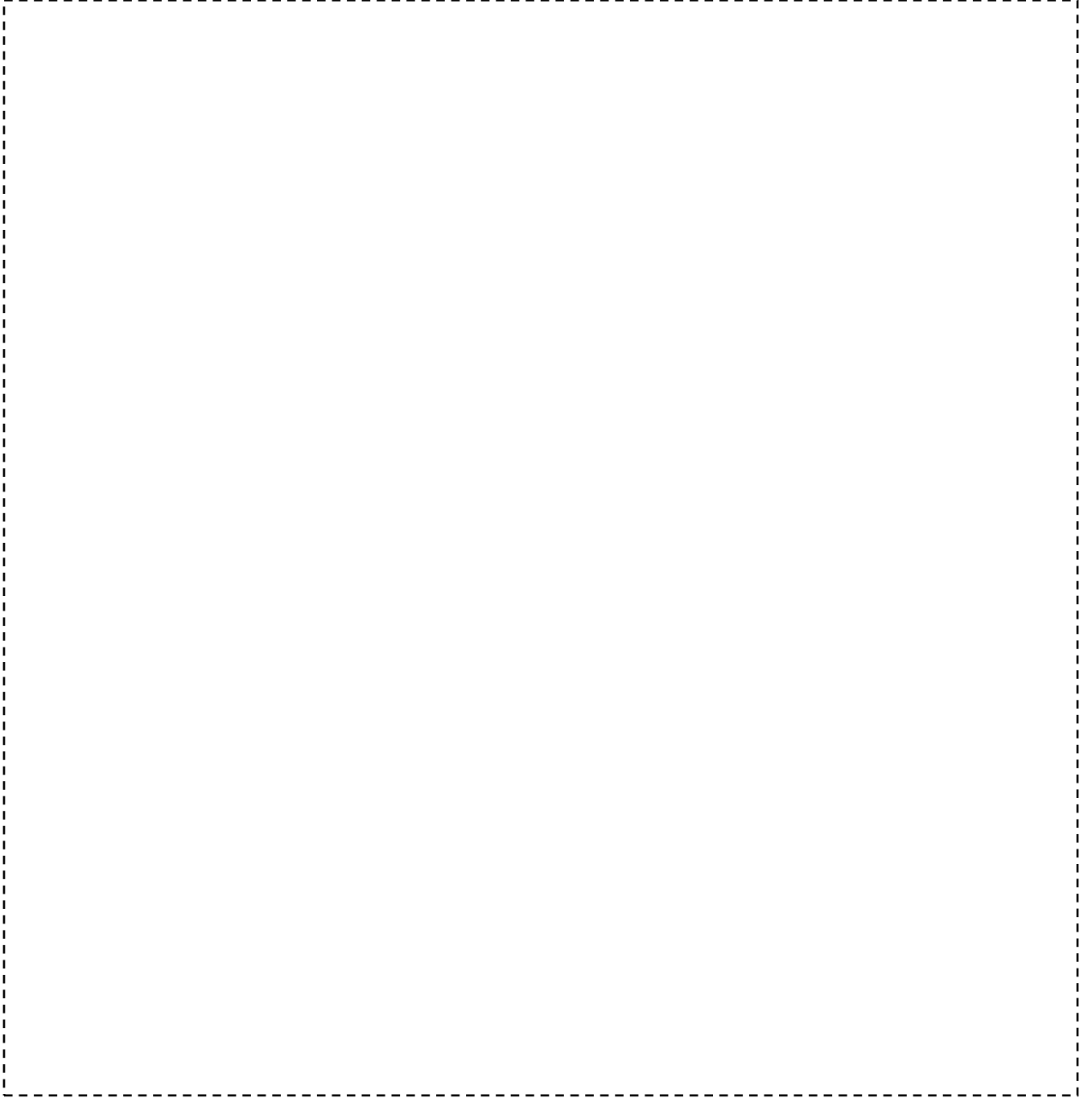
42. Bartenschlager R, Lohmann V. Replication of hepatitis C virus. *Journal of General Virology*. 2000;81(7):1631-1648.
43. Forns X, Purcell RH, Bukh J. Quasispecies in viral persistence and pathogenesis of hepatitis C virus. *Trends in microbiology*. 1999;7(10):402-410.
44. Wilke Topçu A SG, Doğanay M. . *Hepatit C virüsü. infeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*. Vol Cilt 2.: Nobel Tıp Kitabevleri 2002.
45. Etiz N, Türkoğlu S. Viral hepatitlerin tanısında kullanılan testler ve standardizasyon. *Viral Hepatit*. 2005;1:128-150.
46. Barrera J, Francis B, Ercilla G, et al. Improved Detection of Anti- HCV in Post- Transfusion Hepatitis by a Third- Generation ELISA. *Vox sanguinis*. 1995;68(1):15-18.
47. Chevaliez S, Pawlotsky J-M. Hepatitis C virus serologic and virologic tests and clinical diagnosis of HCV-related liver disease. *International journal of medical sciences*. 2006;3(2):35.
48. Maertens G, Vorsters A, Royens B, Dekeyser F, Zrein M. A fourth generation assay for the screening of HCV Antibodies. Paper presented at: Poster presented at the European Association for the Study of the Liver, 34th Annual Meeting, Naples (Italy)1999.
49. Colin C, Lanoir D, Touzet S, Meyaud- Kraemer L, Bailly F, Trepo C. Sensitivity and specificity of third- generation hepatitis C virus antibody detection assays: an analysis of the literature. *Journal of viral hepatitis*. 2001;8(2):87-95.
50. Leblebicioğlu H. Viral Hepatitler. *İnfeksiyon Hastalıkları Ders Notları*.5.
51. H. ADKİL. *Hepatit C tanısı. Kronik hepatitlerin tanı ve tedavisinde güncel yaklaşımlar*. Ankara 2009.
52. Dienstag JL IK, : Hauser K, Longo B, Jameson F eds. . *Chronic Hepatitis In, Harrison's Principles of Internal Medicine*,. 16th ed. ed. New York, McGraw-Hill 2005.
53. Pawlotsky J-M. Molecular diagnosis of viral hepatitis. *Gastroenterology*. 2002;122(6):1554-1568.
54. Poynard T, Yuen M-F, Ratzin V, Lai CL. Viral hepatitis C. *The Lancet*. 2003;362(9401):2095-2100.

55. H. EHKİL. *Karaciğer İğne Biyopsisi.Kronik hepatitlerin tanı ve tedavisinde güncel yaklaşımlar* Ankara2009.
56. Franciscus. A. HCSP FACT SHEET A publication of the Hepatitis C Support Project.: HCSP; May 2012.
57. GÜNEL T. Gen Anlatımının Kantitatif Analizi. *Turkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences*. 2007;27(5):763.
58. Bustin SA. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of molecular endocrinology*. 2000;25(2):169-193.
59. Tyagi S, Kramer FR. Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization. *Nature biotechnology*. 1996;14(3):303-308.
60. Brian Erich Caplin RPR, Philip S. Bernard, and Carl T. Wittwer. The most direct way to monitor PZR amplification for quantification and mutation detection. . Vol No. 1 n ROCHE MOLECULAR BIOCHEMICALS. BIOCHEMICA 1999.
61. Gut M, M Leutenegger C, B Huder J, C Pedersen N, Lutz H. One-tube fluorogenic reverse transcription-polymerase chain reaction for the quantitation of feline coronaviruses. *Journal of virological methods*. 1999;77(1):37-46.
62. Kutuyavin IV, Afonina IA, Mills A, et al. 3'-minor groove binder-DNA probes increase sequence specificity at PCR extension temperatures. *Nucleic Acids Research*. 2000;28(2):655-661.
63. Kubista M ASA, Bar T. Light-up probe based real-time Q-PZR. In: Raghavachari R, Tan W, eds. *Genomics and Proteomics Technologies*. 1st ed. ed2001:53-58.
64. çelik Y. *HEPATİT DELTA VİRÜSÜ (HDV) TANISINDA 'REAL TIME' PZR TEMELİNDE YENİ BİR YÖNTEM GELİŞTİRİLMESİ. : TEMEL BİYOTEKNOLOJİ ANKARA ÜNİVERSİTESİ; 2009.*
65. Klein D. Quantification using real-time PCR technology: applications and limitations. *Trends in molecular medicine*. 2002;8(6):257-260.
66. Meng S, Li J. Research A novel duplex real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay for the detection of hepatitis C viral RNA with armored RNA as internal control. 2010.

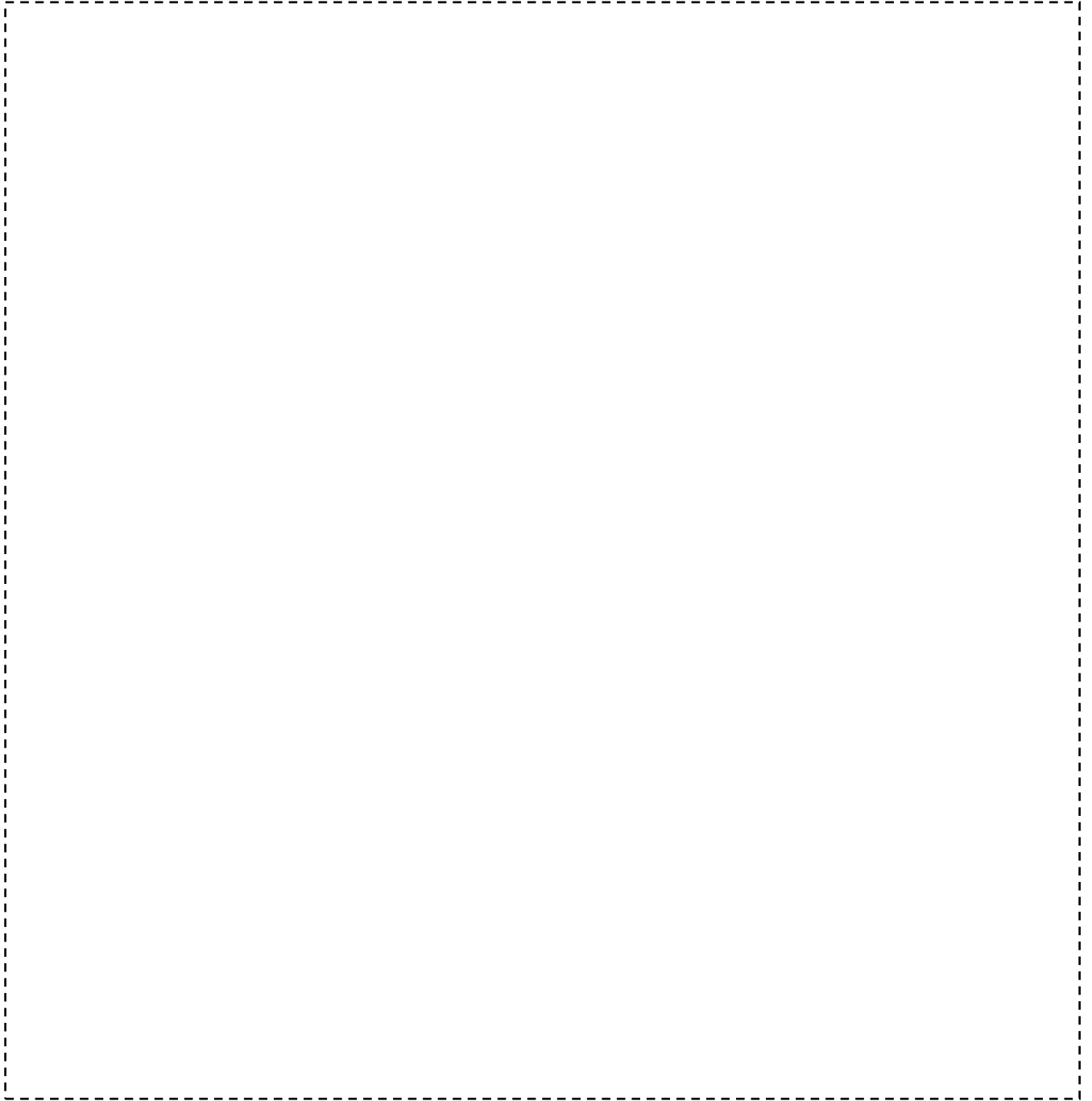
67. Read S. Recovery efficiencies of nucleic acid extraction kits as measured by quantitative LightCycler™ PCR. *Molecular Pathology*. 2001;54(2):86-90.
68. Shahzamani K, Merat S, Rezvan H, et al. Development of a low-cost real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction technique for the detection and quantification of hepatitis C viral load. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. 2010;48(6):777-784.
69. Manabu Abe CK, Eberhard Wieland, Sascha Gille, Olfert Landt Simultaneous quantification and genotyping of hepatitis C virus RNA by a two-step real-time PZR assay on the LightCycler instrument. *Folia Medica*. 2010;52(3):21-30.
70. Yang J-H, Lai J-P, Douglas SD, Metzger D, Zhu X-H, Ho W-Z. Real-time RT-PCR for quantitation of hepatitis C virus RNA. *Journal of virological methods*. 2002;102(1):119-128.
71. Takeuchi T, Katsume A, Tanaka T, et al. Real-time detection system for quantification of hepatitis C virus genome. *Gastroenterology*. 1999;116(3):636-642.
72. Li JS, Tong SP, Vitvitski L, Trépo C. Single- step nested polymerase chain reaction for detection of different genotypes of hepatitis C virus. *Journal of medical virology*. 1995;45(2):151-155.
73. Nasir.A. *a study of hepatitis C virus and its molecular epidemiology in the local population of the faisalabad region*. Pakistan, university of Aricultur; 2004.
74. Albadalejo J, Alonso R, Antinozzi R, et al. Multicenter evaluation of the COBAS AMPLICOR HCV assay, an integrated PCR system for rapid detection of hepatitis C virus RNA in the diagnostic laboratory. *Journal of clinical microbiology*. 1998;36(4):862-865.
75. Alter H. To C or not to C: these are the questions. *Blood*. 1995;85(7):1681-1695.
76. Tedeschi V, Seeff LB. Diagnostic tests for hepatitis C: where are we now? *Annals of internal medicine*. 1995;123(5):383-385.

EKLER

**EK1:**Başlık 1



**EK2:Başlık 2**





## ÖZGEÇMİŞ

**Adı Soyadı:** Abbas Ali HUSSEINI  
**Doğum Yeri:** AFGANISTAN  
**Doğum Tarihi:** 5.11.1984  
**Medeni Hali:** Bekar  
**Yabancı Dili:** İngilizce, Farsça

**Eğitim Durumu** Temel Biyoteknoloji-Yüksek lisans

**Lisans:** Halk sağlığı-Kaşan Tıp Üniversitesi

### İş Tecrübesi

<b>Kurumu:</b>	<b>Görevi:</b>	<b>Yılları:</b>
Rah-e-Farda Radio ve TV istasyonu	Sağlık bölümü programcısı	2006-2008

### Yayınlar

INTERLEUKIN-28 GENE POLYMORPHISMS MAY AFFECT THE NATURAL COURSE OF HEPATITIS B and DELTA VIRUS INFECTIONS.

### SCI'da Yer Alan Makaleler:

**Hakemli Dergilerde Yer Alan Makaleler:**

**Uluslararası Kongrelerde Sunulan Bildiriler:**

**Ulusal Kongrelerde Sunulan Bildiriler:**