

# Kronik Hepatit C Virüs İnfeksiyonlu Hastalarda Polimeraz Zincir Yöntemiyle HCV-RNA Tayini ve Klinik Önemi

## *Determination of HCV-RNA by Polymerase Chain and Its Clinical Importance in Patients with Chronic Hepatitis C Virus Infection*

Mesude Falay Yılmaz\* Doğan Cengiz\*\* Gülsevrim Saydam\*\*

\* Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Hematoloji Lab, Ankara, Türkiye

\*\* Türkiye Yüksek İhtisas Hastanesi, Biyokimya Lab, Ankara, Türkiye

**Başvuru Tarihi:** 30 Nisan 2019

**Kabul Tarihi:** 09 Mayıs 2019

### ÖZET

**Amaç:** Hepatit C Virus (HCV) tüm dünyada yaygın olarak, kronik hepatit, siroz ve hepatosellüler karsinomun (HCC) etiyojisinde önemli rolü olan bir virüstür. HCV asemptomatik taşıyıcılıktan akut hepatit, kronik hepatit, siroz ve HCC' ye kadar değişen farklı patolojilere sebep olan ve yüksek oranda kronikleşme eğilimi gösteren bir hastalıktır. HCV enfeksiyon tanısında laboratuvar rutin olarak serum ALT düzeyi ve Anti-HCV testleri kullanılmaktadır. Fakat bu testlerin sınırlamaları bulunmaktadır. Bu nedenle bu çalışmada serum Anti-HCV'si pozitif kronik HCV enfeksiyonlu olgularda vireminin var olup olmadığını göstermek için HCV-RNA'nın PCR yöntemiyle araştırılmasını ve serum ALT düzeyleriyle korelasyonunu araştırmayı amaçladık.

**Gereç ve Yöntem:** Türkiye Yüksek İhtisas Hastanesinde Kronik HCV enfeksiyonu tanısı konulmuş, herhangi bir tedavi başlanmamış toplam 95 Kronik HCV enfeksiyonlu olguları serum ALT düzeyleri, Anti-HCV ve HCV-RNA pozitiflikleri açısından retrospektif olarak inceledik.

**Bulgular:** Anti-HCV pozitif kronik hepatit C enfeksiyonlu 95 olgudan 60 olguda (%64) HCV-RNA pozitifken 35 (%36) olguda negatifti. ve ALT 76 olguda (%80) 41 U/L'nin üzerindeyken, 19 olguda (%20) < 41 U/L idi. HCV-RNA pozitif 60 olgunun %89' da ALT yüksekliği mevcuttu ( $p = 0.05$ ).

**Sonuç:** Kronik HCV enfeksiyonu tanısında ve hastalığın takibinde anti-HCV ve serum ALT düzeyleri yetersiz kalmaktadır. HCV enfeksiyonu iyileşmiş olsa bile pozitifliği devam etmektedir. Bu nedenle tarama testi olarak anti-HCV'si pozitif olgularda hastalığı doğrulamak için PCR ile HCV-RNA'nın mutlaka gösterilmesi lazımdır.

**Anahtar Sözcükler:** HCV-RNA, PCR, Hepatit C enfeksiyon

Mesude Falay Yılmaz : <https://orcid.org/0000-0001-7846-3476>

**Yazışma adresi:** Mesude Falay Yılmaz  
Ankara Numune Eğitim ve Araştırma  
Hastanesi Hematoloji Lab, Ankara  
E-mail: mesudey@gmail.com

## ABSTRACT

**Aim:** Hepatitis C Virus (HCV) is a worldwide common virus that has an important role in the etiology of chronic hepatitis, cirrhosis and hepatocellular carcinoma (HCC). HCV is a disease that causes different pathologies ranging from asymptomatic carriage to acute hepatitis, chronic hepatitis, cirrhosis and HCC. Serum ALT levels and Anti-HCV tests are routinely used in the diagnosis of HCV infection, but these tests have limitations. In this study, we aimed to investigate HCV-RNA levels in patients with chronic HCV infection who were anti-HCV positive and to establish a correlation with serum ALT levels

**Materials and Methods:** At Türkiye Yüksek İhtisas Hospital, a total of 95 patients diagnosed with chronic HCV infection that have not started any treatment, have been examined for serum ALT levels, anti-HCV and HCV-RNA positivity, retrospectively.

**Results:** Of the 95 cases with anti-HCV-positive chronic hepatitis C infection, 60 (64%) had HCV-RNA positive results while 35 (36%) had negative and ALT was above 41 U / L (80%) in 76 cases, and <41 U / L in 19 cases (20%). Of the 60 patients with HCV-RNA positive, 89% had high ALT (p =0.05).

**Conclusion:** Anti-HCV is insufficient in the diagnosis of chronic HCV infection and follow-up of the disease. Even if the HCV infection is healed, its positivity continues. For this reason, in anti-HCV positive screened patients, HCV-RNA existence by PCR should be done for confirmation.

**Key words:** HCV-RNA, PCR, Hepatitits C

## GİRİŞ

Hepatit C Virus (HCV) tüm dünyada yaygın olarak, kronik hepatit, siroz ve hepatosellüler karsinom (HCC) etiyolojisinde önemli rolü olan bir virüstür (1). 1989 yılına kadar parenteral NonANonB Hepatitlerden (NANBH) sorumlu tutulan etkenin serolojik tanısı yapılamamıştır (2). 1989'da Choo ve ark. NANBH'lerin %95'inin nedeni olan ve hücre kültürü ile üretilmeyen bir virusun genomunu moleküler teknikleri kullanarak, klonlama yöntemiyle karakterize etmişler ve bu virüsü HCV olarak tanımlamışlardır (3,4).

HCV asemptomatik taşıyıcılıktan akut hepatit, kronik hepatit, siroz ve HCC'ye kadar değişen farklı patolojilere neden olmaktadır (5). HCV enfeksiyonu klinik olarak hafif seyretmektedir, ancak hastalık %85 oranında kronikleşmektedir (6). Kronik HCV enfeksiyonu tanısı konulan hastaların yarısından fazlasında bu tanı ya kan bağıışı esnasında ya da kontrol amacıyla yapılan tetkikler sırasında konulabilmektedir (5,6).

HCV enfeksiyonunun tanısında kullanılan yöntemler serum Alanin Amin Transferaz (ALT) ölçümü, histopatolojik yöntemler, enzimimmunoassay (EIA) ile Anti-HCV ve

moleküler tekniklerden polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile HCV-RNA tayinidir (6). 1989'da HCV genomunun klonlanması ve dizi analizlerinin gerçekleştirilmesi sonucu, rekombinant antijen ve sentetik peptidler elde edilerek EIA yöntemi ile çeşitli anti-HCV kitleri üretilmiştir (7). Anti-HCV tayini sero-epidemiyolojik taramalarda yaygın olarak kullanılsa da HCV enfeksiyon tanısında yetersiz kalabilmektedir ve kronik enfeksiyonla iyileşen enfeksiyonu birbirinden ayırmamaktadır (8). Anti-HCV testlerinin yetersiz kaldığı bu durumlarda virüsün kendisi ile ilgili direkt tanı olanağı viral genomu tayin eden PCR'dir. Serumda HCV-RNA'nın gösterilmesi HCV replikasyonunu gösterirken kaybolmasının ise kronik hepatit remisyonu bakımından güvenilir bir gösterge olabileceği saptanmıştır (7). HCV-RNA tayini kronik HCV enfeksiyonunda hastalığın seyri ve tedavinin takibinde önemlidir. (7,8)

Biz bu çalışmada serum Anti-HCV' si pozitif kronik HCV enfeksiyonlu olgularda vireminin var olup olmadığını göstermek için HCV-RNA'nın PCR yöntemiyle araştırılmasını ve serum ALT düzeyleriyle korelasyonunu araştırmayı amaçladık.

## GEREÇ VE YÖNTEMLER

### Hasta Grubu

Ankara Türkiye Yüksek İhtisas Hastanesi Biyokimya PCR Laboratuvarına HCV-RNA testi için kanları gelen 23-67 yaş arasında (ortalama  $49.6 \pm 10.7$ ) 50 erkek (yaş ortalaması  $50.3 \pm 10.2$ ) ve 45 kadın (yaş ortalaması  $48.8 \pm 11.3$ ) olan ve Kronik HCV enfeksiyonu tanısı konulmuş, herhangi bir tedavi başlanmamış toplam 95 Kronik HCV enfeksiyonlu olgular retrospektif olarak incelendi.

### Kan Örnekleri

Kan örnekleri 12 saat açlığı takiben sabah ön kol veninden antikoagülsüz vakumlu tüplere alındı. Kanlar 3000 X G' de 10 dakika santrifüj edildi. Serum ALT düzeyi ve anti-HCV testi aynı gün çalışıldı. HCV-RNA testi için serumlar 500 µL'lik ependorf tüplere alınarak çalışma gününe kadar (en fazla 7 gün) -70 C° de saklandı.

### Yöntem

Serum ALT ölçümü Hitachi 911 otoanalizöründe Randox kiti (Kat no: 41131) ile fotometrik olarak çalışıldı. Anti-HCV Abbot AxyM MEIA cihazında aynı firmanın anti-HCV kiti (kat no: 06C3701) ile çalışıldı. PCR testi için Techne marka Progene model thermal Cycler, Hettich marka EBA 12R model soğutmalı santrifüj, EC marka 135 model Elektroforez cihazı, Vilber Lournet marka ultraviyole cihazı, polaroid marka MP4+ model 44-16 fotoğraf makinası kullanıldı.

PCR testi ile HCV-RNA araştırılmasında Promega firmasının RT-Nested PCR yöntemi kullanıldı. Her bir çalışma için bir negatif kontrol, bir pozitif kontrol kullanıldı. Çalışılacak örnek sayısı kadar ependorf tüpe 600 µL carrier RNA içeren RAV1 (Promega) ilave edildi. Bunun üzerine de 150 µL hasta serumu ilave edilerek oda ısısında 5-10 dakika inkübe edildikten sonra her bir tüpe 600 µL ethanol ilave edilerek vortexlendi. Elde edilen karışımdan 700 µL nükleospin kolonlarına pipetlendi ve 60 saniye 6000 X g' de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası RNA

kolonda kaldığı için tüplerin altında kalan sıvı atıldı. Daha sonra 500 µL RAV3 (Promega) nükleospin kolonuna ilave edilerek 60 saniye 8000Xg'de santrifüj edildi. Bu aşamadan sonra RNA'nın elüsyonu için nükleospin kolonları yeni 2 mL'lik tüplere yerleştirilerek 50 µL RNAaz içermeyen sıcak su ilave edilerek 60 saniye 8000 Xg'de santrifüj edilerek HCV-RNA elde edildi.

Daha sonra HCV-RNA revers transkriptazla (RT) cDNA'ya çevrilerek nested PCR' a geçildi.

Bunun için kullanılan primerler:

Primer CP1:

5'CTGTGAGGAACTACTGTCTT 3'

Primer CP2:

5'ATACTCGAGGTGCACGGTCTACGAGACCT 3'

Primer CP3:

5'TTCACGCAGAAAACGGTCTAG 3'

Primer CP4:

5' CACTCTCGAGCACCCCTATCAGGCAGT 3'

PCR ürün uzunluğu: 248 bp (base pair)

Nested PCR 1. Tur amplifikasyonu için master mix hazırlandı. (RNAasfree su 240 µL, RT Access Buffer 5 X 100 µL, MgSO<sub>4</sub> 30 µL, dNTP Mix 10 µL, Primer CP1, Primer CP2, Amv Revers Transkriptaz 10 µL, Tfl DNA polimeraz 10 µL) Master mixten ependorf tüplere 40 µL pipetlenderek daha önce elde edilen RNA pelletinden her bir tüpe 10 µL pipetlendi. Daha sonra tüpler thermal cycler' a yerleştirilerek amplifiye edildi. Sensitivite ve spesifiteyi artırmak için 1. Turda elde edilen HCV-RNA'nın cDNA'sı ikinci kez Primer CP3 ve Primer CP4' ün olduğu ikinci bir master mixle tekrar amplifiye edildi. İkinci tur da bittikten sonra elde edilen ürünler agaroz jel elektroforezi ile değerlendirildi. Elektroforez bittikten sonra jel UV üzerinde değerlendirildi. Sonuçlar 248 bp uzunluğunda sarı-turuncu bant varlığına göre pozitif ya da negatif olarak değerlendirildi.

### İstatistik

SPSS for Windows programı ile Student's t testi yapıldı. p < 0.05 değerleri anlamlı olarak kabul edildi.

## BULGULAR

Anti-HCV pozitif kronik hepatit C enfeksiyonlu 95 olgudan 60 olguda (%64) HCV-RNA pozitifken 35 (%36) olguda negatif ve ALT 76 olguda (%80) yüksekken ( $>41$  U/L) 19 olguda (%20)  $< 41$  U/L idi (Tablo 1). HCV-RNA pozitif 60 olgunun sadece %89'da ALT yüksekliği mevcuttu (Tablo 2). HCV-RNA pozitif ve negatif olan olguların serum ALT düzeyleri arasında anlamlı bir ilişki tespit etmedik ( $p = 0.05$ ) (Tablo 3).

**Tablo 1.** Anti-HCV pozitif kronik hepatit C enfeksiyonlu hastalarda HCV-RNA ve ALT düzeylerinin yüzde dağılımı.

**Table 1.** Percent distribution of HCV-RNA and ALT levels in patients with anti-HCV positive chronic hepatitis C infection.

	Anti-HCV (+) n=95
	%
HCV-RNA (+) n=60	64
HCV-RNA (-) n=35	36
ALT $> 41$ U/L n=76	80
ALT $< 41$ U/L n=19	20

**Tablo 2.** Anti-HCV pozitif kronik hepatit C enfeksiyonlu HCV-RNA (+) ve HCV-RNA (-) hastalardaki normal ve yüksek serum ALT düzeylerinin yüzde dağılımı.

**Table 2.** Percent distribution of normal and high serum ALT levels in HCV-RNA (+) and HCV-RNA (-) patients with anti-HCV positive chronic hepatitis C infection.

HCV-RNA (+) n=60		HCV-RNA (-) n=35	
ALT $> 41$ U/L n=53	ALT $< 41$ U/L n=7	ALT $> 41$ U/L n=23	ALT $< 41$ U/L n=12
%	%	%	%
89	11	65	35

**Tablo 3.** Kronik hepatit C enfeksiyonlu HCV-RNA (+) ve HCV-RNA (-) olan hastaların serum ALT düzeylerinin student-t testi ile karşılaştırılması.

**Table 3.** Comparison of serum ALT levels of patients with HCV-RNA (+) and HCV-RNA (-) with chronic hepatitis C infection by student-t test.

	HCV-RNA (+) n=60	HCV-RNA (-) n=35	p
ALT U/L ( $X \pm SD$ )	115.538 $\pm$ 110.239	63.771 $\pm$ 33.657	0.05

## TARTIŞMA

HCV tüm dünyada yaygın olarak görülen bir virüstür. HCV enfeksiyonunun tanısında kullanılan yöntemlerden EIA ile Anti-HCV tayininin HCV enfeksiyon tanısında yetersiz kalabildiği ve kronik HCV enfeksiyonu ve iyileşen enfeksiyonu birbirinden ayıramamaktadır (8). Bu nedenle PCR ile viral genomun tayini önem arz etmektedir. HCV enfeksiyonunda genelde düşük titrelili viremi söz konusu olduğundan nested PCR ile viral RNA'nın araştırılması geçerli bir yöntemdir (8-10).

Kronik HCV'li olgularda yapılan birçok çalışmada anti-HCV pozitifliği ve HCV-RNA arasındaki ilişki araştırılmıştır (10-13). Bu

çalışmalarda da bizim çalışmamızda olduğu gibi anti-HCV pozitif olguların hepsinde HCV-RNA pozitifliği tespit edilmemiştir. Bunun nedenini ise vireminin intermitant oluşu, yanlış negatif PCR sonucu ya da yanlış pozitif anti-HCV sonucu veya hastaların iyileşmiş olabilecekleri ile açıklamışlardır. Hastalığın iyileşmesi durumunda anti-HCV sonucu ne olursa olsun PCR ile HCV-RNA negatifleşmektedir (9,12). Biz de çalışmamızda anti-HCV pozitif 95 olgunun %64' de PCR ile HCV-RNA'yı pozitif, %36' sında ise negatif tespit ettik.

Karaciğer ve böbrek dokusunda yüksek miktarda bulunan ALT'nin intrasellüler yerleşimi sitozoliktir. Serum ALT düzeyinde

artış hepatic sitolizin bir işaretidir. ALT düzeyinin akut viral hepatitiden sonra yüksek olarak seyretmesi hastalığın iyileşmediğini ve kronik hepatit gelişme riskinin fazlalığını düşündürür. Kronik hepatitlerde transaminaz artışı orta düzeyde olup hücre nekrozu ve parankim zedelenmesini yansıtır (15,16,17). Kronik HCV infeksiyonlu hastalarda anti-HCV pozitifliği ile ALT düzeyleri arasındaki ilişkiyi araştırmak için yapılan çalışmalarda hastaların bir kısmında serum ALT düzeyleri normal bulunmuştur (13,15,18). Bizim çalışmamızda da %20 olguda ALT'yi normal tespit ettik. Bunun olası nedeni ise virüsün düşük sitopatik etkisi, ekstrahepatik HCV infeksiyonu ve replikasyonu, asemptomatik taşıyıcılık yani subklinik HCV infeksiyonu ve hastalık seyri sırasındaki serum ALT düzeyindeki dalgalanmalardır (13,15,16,18)

Kronik HCV infeksiyonlu hastalarda serum HCV-RNA ile ALT düzeyi arasındaki ilişkinin araştırıldığı çalışmalarda, HCV-RNA ile ALT düzeyi arasında ilişki bulunmamıştır (13,16, 17,18). Nitekim bizim çalışmamızda da böyle bir ilişki tespit etmedik ( $p=0.05$ ). Serum ALT düzeyi viremiyi göstermemektedir (19,20) bu nedenle sadece destekleyici bir test olarak karaciğer patolojisi ile ilişkili bir test olarak kullanılmalıdır.

Çalışmamızda Kronik HCV infeksiyonu tanısında ve hastalığın takibinde anti-HCV ve serum ALT düzeylerinin yetersiz kaldığı gösterilmiştir. HCV infeksiyonu iyileşmiş olsa bile anti-HCV pozitifliği devam etmektedir. Bu noktada, PCR yöntemiyle HCV-RNA tayini hastalarda önemlidir. Bu nedenle tarama testi olarak anti-HCV'si pozitif olgularda hastalığı doğrulamak için PCR ile HCV-RNA'nın mutlaka gösterilmesi gereklidir.

#### KAYNAKLAR

1. Booth, J. C. L. Chronic hepatitis C: the virus, its discovery and the natural history of the disease. *Journal of viral hepatitis* 1998;5 (4); 213-222
2. Choo, Q. L., Kuo, G., Weiner, A. J., Overby, L. R., Bradley, D. W., & Houghton, M. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science*, 1989; 244 (4902); 359-362
3. Di Bisceglie, Adrian M. Hepatitis C and hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 1997;26 (S3); 34S-38S
4. Lok, A. S., Seeff, L. B., Morgan, T. R., Di Bisceglie, A. M., Sterling, R. K., Curto, T. M. et al. Incidence of hepatocellular carcinoma and associated risk factors in hepatitis C-related advanced liver disease. *Gastroenterology* 2009; 136(1);138-148
5. Gretch, David R. Diagnostic tests for hepatitis C. *Hepatology* 1997; 26 (S3) 43-47
6. Hoofnagle, Jay H. Hepatitis C: the clinical spectrum of disease. *Hepatology* 1997;26 (S3) 15-20
7. Rodger, Alison J., et al. The impact of diagnosis of hepatitis C virus on quality of life. *Hepatology* 1999; 30 (5); 1299-1301
8. Prince, A. M., J. W. Scheffel, and B. Moore. A search for hepatitis C virus polymerase chain reaction positive but seronegative subjects among blood donors with elevated alanine aminotransferase. *Transfusion* 1997;37(2) 211-214
9. Cristiano, Karen, et al. Hepatitis C viral RNA in serum of patients with chronic non A, non B hepatitis: detection by the polymerase chain reaction using multiple primer sets. *Hepatology* 1991;14 (1) ;51-55
10. Natov, S. N., Lau, J. Y., Bouthot, B. A., Murthy, B. V., Ruthazer, R., Schmid, C. H., et al. Serologic and virologic profiles of hepatitis C infection in renal transplant candidates. *New England Organ Bank Hepatitis C Study Group. American journal of kidney diseases* 1998;31(6); 920-927
11. Garinis, G., Spanakis, N., Theodorou, V., Gorgoulis, V., Manolis, E., Karameris, A et al. Comparison of the enzyme linked immunosorbant assay III, recombinant immunoblot third generation assay, and polymerase chain reaction method in the detection of hepatitis C virus infection in Haemodialysis patients. *Journal of clinical laboratory analysis* 1999;13(3);122-125.
12. Zaaijer, H. L., Cuypers, H., Reesink, H. W., Winkel, I. N., Lelie, P. N., & Gerken, G. Reliability of polymerase chain reaction for detection of hepatitis C virus. *The Lancet* 1993;341(8847); 722-724
13. Alter, H. J., Sanchez Pescador, R., Urdea, M. S., Wilber, J. C., Lagier, R. J., Di Bisceglie et al . Evaluation of branched DNA signal amplification for the detection of hepatitis C virus RNA. *Journal of viral hepatitis* 1995; 2(3); 121-132
14. Barrera, J. M., Bruguera, M., Ercilla, M. G., Gil, C., Celis, R., Gil, M. P & Ordinas, A. Persistent hepatitis C viremia after acute self-limiting posttransfusion hepatitis C. *Hepatology* 1995; 21(3); 639-644

15. Naito, M., Hayashi, N., Hagiwara, H., Hiramatsu, N., Kasahara, A., Fusamoto, H., & Kamada, T. Serum hepatitis C virus RNA quantity and histological features of hepatitis C virus carriers with persistently normal ALT levels. *Hepatology* 1994;19(4):871-875
16. Silini, E., Bono, F., Cividini, A., Cerino, A., Bruno, S., Rossi, S., et al. Differential distribution of hepatitis C virus genotypes in patients with and without liver function abnormalities. *Hepatology* 1995;21(2):285-290
17. McCormick, S. E., Goodman, Z. D., Maydonovitch, C. L., & Sjogren, M. H. Evaluation of liver histology, ALT elevation, and HCV RNA titer in patients with chronic hepatitis C. *American Journal of Gastroenterology* 1996; 91(8):1516-1522
18. Kato, N., Yokosuka, O., Hosoda, K., Ito, Y., Ohto, M., & Omata, M. Quantification of hepatitis C virus by competitive reverse transcription-polymerase chain reaction: Increase of the virus in advanced liver disease. *Hepatology* 1998;18(1); 16-20
19. Gretch, D., Corey, L., Wilson, J., Dela Rosa, C., Willson, R., Carithers Jr, R., et al. Assessment of hepatitis C virus RNA levels by quantitative competitive RNA polymerase chain reaction: high-titer viremia correlates with advanced stage of disease. *Journal of Infectious Diseases* 1994;169(6);1219-1225
20. Kumar, U., Thomas, H. C., & Monjardino, J. Serum HCV RNA levels in chronic HCV hepatitis measured by quantitative PCR assay; correlation with serum AST. *Journal of virological methods* 1994; 47(1-2); 95-102

