

Genotip 1 ile Enfekte Kronik Hepatit C Hastalarında NS3 İnhibitörü İlaçların Direnç Mutasyonlarının Belirlenmesi

Determination of Drug Resistance Mutations of NS3 Inhibitors in Chronic Hepatitis C Patients Infected with Genotype 1

Tamer ŞANLIDAĞ^{1,2}, Murat SAYAN^{2,3}, Sinem AKÇALI¹, Elmas KASAP⁴, Tahir BURAN⁴, Ayşe ARIKAN^{5,6}

¹ Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Manisa.

¹ Celal Bayar University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Manisa, Turkey.

² Yakın Doğu Üniversitesi, Deneysel Sağlık Bilimleri Araştırma Merkezi, Lefkoşa.

² Near East University, Experimental Health Sciences Research Center, TRNC.

³ Kocaeli Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi, Merkez Laboratuvarı, PCR Birimi, Kocaeli.

³ Kocaeli University Research and Practice Hospital, Central Laboratory, PCR Unit, Kocaeli, Turkey.

⁴ Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Gastroenteroloji Bilim Dalı, Manisa.

⁴ Celal Bayar University Faculty of Medicine, Department of Internal Medicine, Division of Gastroenterology, Manisa, Turkey.

⁵ Yakın Doğu Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Lefkoşa.

⁵ Near East University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Nicosia, TRNC.

⁶ Girne Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Girne.

⁶ Kyrenia University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Kyrenia, TRNC.

Geliş Tarihi (Received): 05.01.2017 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 08.03.2017

ÖZ

Kronik hepatit C (KHC) tedavisinde doğrudan etkili antiviral ajanlar (DAA)'dan NS3 proteaz inhibitörleri (PI), kullanıma giren ilk ilaç sınıfıdır. Genetik bariyeri düşük olan NS3 inhibitörleri, KHC'nin genotip 1 enfeksiyonlarında, siroz dahil kompanse karaciğer hastalığı tedavisinde, pegile interferon ve ribavirin ile birlikte kullanılmak üzere ülkemizde onaylanmış bulunmaktadır. Buna bağlı olarak, KHC'nin DAA tedavisinde ilaç direnç gelişimi önemli bir problem olarak karşımıza çıkmaktadır. NS3 dirençli varyantlar doğal olarak da meydana gelebileceğinden tedavi öncesinde saptanabilirler. Bu çalışmada, KHC'li hastalardan izole edilen hepatit C virusu (HCV)'nda, DAA tedavisi öncesinde yeni ve eski nesil NS3 inhibitörü ilaç direnci mutasyonlarının varlığını araştırmak amaçlanmıştır. 2015 yılında, Manisa ve Kocaeli şehirlerinden sağlanan HCV RNA pozitif ve DAA tedavisine ilk kez başlanan 97 hasta çalışmaya alınmıştır. HCV RNA, manyetik parçacık tabanlı izolasyon yöntemleri (QIAasympmony-Qiagen, Hilden,

İletişim (Correspondence): Prof. Dr. Tamer Şanlıdağ, Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, 45030 Manisa, Türkiye. **Tel (Phone):** +90 236 233 1920/423, **E-posta (E-mail):** trsanlidag@yahoo.com

Almanya ve COBAS Ampliprep-Roche Molecular Systems, Inc. Pleasanton, CA, ABD) ile, HCV RNA tayini ve kantitasyonu gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemleri (Artus HCV QS-RGQ-QiagenHilden, Almanya ve COBAS TaqMan HCV-Roche Molecular Systems, Inc. Pleasanton, CA, ABD) ile üretici firmaların önerileri doğrultusunda yapılmıştır. HCV NS3 genom bölgesi gerçek zamanlı PCR ile çoğaltılmış ve viral popülasyonun sekanslanması tekniği ile NS3 proteaz kodonları (kodon 32-185) ilaç direnci mutasyonları yönünden incelenmiştir. HCV genotip/alttip ve NS3 proteaz inhibitörlerinden asunaprevir, boceprevir, faldaprevir, grazoprevir, paritaprevir, simeprevir ve telaprevire dirençten sorumlu mutasyonlar Genafor/Areivir-geno2pheno programı kullanılarak belirlenmiştir. HCV, tüm hastalarda genotiplendirilmiş ve 88 hastada (n= 88/97, %91) genotip 1 bulunmuştur. HCV, genotip 1 saptanan hastalarda subtiplendirilmiş ve hastaların 8 (n= 8/97, %8.2)'inde 1a, 80 (n= 80/97, %82.4)'inde 1b genotipleri tanımlanmıştır. Çalışma grubunda toplam 39/88 (%44) hastada çeşitli aminoasit değişimleri ve direnç mutasyonları saptanmıştır. Q80L, S122C/N, S138W potansiyel aminoasit değişimi (6/88 hastada; %7) olarak tanımlanırken, R109K, R117C, S122G, I132V, I170V, N174S potansiyel dirençli (34/88 hastada; %39), V36L, T54S, V55A, Q80H dirençli (7/88 hastada; %8) ve Q80K, A156S yüksek dirençli (3/88 hastada; %3) mutasyon olarak tanımlanmıştır. Dirençli ve yüksek dirençli mutasyonlar esas alındığında 10/88 (%11) hastada klinik önemi yüksek mutasyonlar tanımlanmıştır. Çalışmamızda elde ettiğimiz veriler, KHC'li hastaların DAA tedavilerinde, tedavi öncesi HCV NS3 PI ilaç direnci analizinin gerekli olduğunu göstermektedir. Öte yandan, bulgularımız yakın gelecekte NSSA ve NSSB genom bölge mutasyonlarının analizinin de gerekli olabileceğini işaret etmektedir.

Anahtar sözcükler: Kronik hepatit C; HCV dizi analizi; genotip/subgenotip; ilaç direnci; mutasyon.

ABSTRACT

Direct-acting antiviral agents (DAA) such as NS3 protease inhibitors is the first class of drugs used for chronic hepatitis C (CHC) treatment. NS3 inhibitors (PI) with low genetic barrier have been approved to be used in the CHC genotype 1 infections, and in the treatment of compensated liver disease including cirrhosis together with pegile interferon and ribavirin. Consequently, the development of drug resistance during DAA treatment of CHC is a major problem. NS3 resistant variants can be detected before treatment as they can occur naturally. The aim of this study was to investigate new and old generation NS3 inhibitors resistance mutations before DAA treatment in hepatitis C virus (HCV) that were isolated from CHC. The present study was conducted in 2015 and included 97 naive DAA patients infected with HCV genotype 1, who were diagnosed in Manisa and Kocaeli cities of Turkey. Magnetic particle based HCV RNA extraction and than RNA detection and quantification were performed using commercial real-time PCR assay QIASymphony + Rotorgene Q/ArtusHCV QS-RGQ and COBAS Ampliprep/COBAS TaqMan HCV Tests. HCV NS3 viral protease genome region was amplified with PCR and mutation analysis was performed by Sanger dideoxy sequencing technique of NS3 protease codons (codon 32-185). HCV NS3 protease inhibitors; asunaprevir, boceprevir, faldaprevir, grazoprevir, paritaprevir, simeprevir and telaprevir were analysed for resistant mutations by Geno2pheno-HCV resistance tool. HCV was genotyped in all patients and 88 patients (n= 88/97, 91%) had genotype 1. Eight (n= 8/97, 8.2%) and 80 (n= 80/97, 82.4%) HCC patients were subgenotyped as 1a and 1b, respectively. Many aminoacid substitutions and resistance mutations were determined in 39/88 (44%) patients in the study group. Q80L, S122C/N, S138W were defined as potential substitutions (6/88 patients; 7%); R109K, R117C, S122G, I132V, I170V, N174S were described as potential resistance (34/88 patients; 39%); V36L, T54S, V55A, Q80H were characterized as resistance (7/88 patients; 8%) and Q80K, A156S were defined as high resistance (3/88 patients; 3%) mutations. Based on resistance and high resistance mutations, clinically significant mutations were defined in 10/88 (11%) of the patients. Our study shows that it is essential to analyse HCV NS3 protease inhibitors drug resistance before DAA treatment of CHC patients. On the other hand, our results pointed out that analysis of NSSA and NSSB genome region mutations may also be required in the near future.

Keywords: Chronic hepatitis C; HCV sequence analysis; genotype/subtype; drug resistance; mutation.

GİRİŞ

Hepatit C virusu (HCV) 9.6 kb büyüklüğünde tek iplikli bir RNA virusudur¹. Yüksek replikasyon kapasitesine sahiptir (10^{10-12} virion/gün) ve virusun ters transkriptaz enziminin hata düzeltme yeteneği bulunmamaktadır^{2,3}. Yedi ayrı HCV genotipi ve 90'dan fazla alttipi bulunmaktadır⁴. Global dağılımına bakıldığında HCV genotip 1, 2 ve 3 en sık karşılaşılan genotiplerdir. Ülkemizde ise genotip 1 en fazla görülmektedir⁵.

Kronik hepatit C (KHC) enfeksiyonunda pegile interferon (PEG-IFN) ve ribavirin (RBV) mevcut standart tedaviyi oluşturmaktadır. Bu tedavilerin başarısı sınırlıdır ve hasta yönetimi ilaçların önemli yan etkileri nedeniyle oldukça zor olmaktadır⁶. Son yıllarda, doğrudan etkili antiviral ajanlar (DAA)'ın ortaya çıkmasıyla KHC'nin tedavisinde yeni bir dönem başlamış bulunmaktadır. HCV'nin oluşturduğu enfeksiyonun, konak hücre genomuna entegre olmaması nedeniyle tedavide kalıcı viral yanıt (KVV) başarısının elde edilmesi mümkün görünmektedir².

HCV replikasyonu için gerekli yapısal olmayan proteinlerden NS3/4A serin proteaz, NS5A ve NS5B polimerazlar DAA için ilaç hedef bölgeleridir^{7,8}. NS3 proteaz inhibitörleri (PI)'inden telaprevir (TVR) ve boseprevir (BOC)'in HCV genotip 1 enfeksiyonunda PEG-IFN ve RBV ile kombine kullanılmak üzere 2011 yılında onay alan ilk DAA ilaçlarındandır. İlk nesil NS3 PI ilaçlarının önemli yan etkilere yol açması ve bunun hasta uyumunu zorlaştırması nedeniyle tanı-tedavi rehberlerine ikinci nesil NS3 PI tedavileri (simeprevir, asunaprevir, grazoprevir, paritaprevir) girmiş bulunmaktadır⁹.

Ülkemizde, yapılan çalışmalarda anti-HCV pozitiflik oranı %0.1-0.9 arasında bulunmuştur^{10,11}. HCV NS3 PI grubu ilaçlardan TVR ve BOC, 2013 yılından beri kullanımda bulunmaktadır. İkinci nesil NS3 PI grubu ilaçların kullanıma girmesi beklenmektedir. KHC'nin DAA tedavilerinde kullanılan antiviral ilaçlar hakkında ülke verilerimiz yeterince mevcut değildir.

Bu çalışmanın amacı, KHC'nin genotip 1 enfeksiyonlarında, NS3 PI tedavileri öncesinde ilaç direnci analizinin gerekli olup olmadığını ortaya çıkarmaktır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Hastalar ve Örnekler

Çalışma grubu, 2015 yılında, Manisa ve Kocaeli şehirlerinden sağlanan HCV RNA pozitif ve DAA tedavisine ilk kez başlanan 97 hastadan oluşturuldu. Hastaların klinik ve laboratuvar özellikleri Tablo 1'de verilmektedir.

Çalışma, Manisa Celal Bayar Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Değerlendirme Etik Kurulu onayı (Karar No: 20478486-121/05032015DÜ/2013/16-88) ile gerçekleştirildi.

Avrupa Birliği'nin Karaciğer Klinik Uygulamaları Yönergelerine göre kronik hepatit taşıyıcısı olarak kategorize edilen hastaların K_2 EDTA'lı kan örnekleri bekletilmeden santrifüj edildi ve plazma örnekleri çalışılmak üzere -80°C 'de saklandı⁹.

HCV RNA İzolasyonu ve Tayini

HCV RNA, manyetik parçacık tabanlı izolasyon yöntemleri (QIAasympmhony -Qiagen, Hilden, Almanya ve COBAS Ampliprep-Roche Molecular Systems, Inc. Pleasanton, CA, ABD) ile, HCV RNA tayini ve kantitasyonu gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemleri (Artus HCV QS-RGQ-QiagenHilden, Almanya ve COBAS TaqMan HCV-Roche Molecular Systems, Inc. Pleasanton, CA, ABD) ile üretici firmanın önerileri doğrultusunda yapıldı.

HCV NS3 Dizi Analizi

HCV proteaz bölge kodon (kodon 32-185) dizileri, Sanger dizi analizi tekniği ile belirlendi (Bosphore HCV ilaç direnci mutasyonu dizileme kiti v1.0-Anatolia Geneworks, İstanbul, Türkiye). Gerçek zamanlı, revers transkriptaz PCR (RT-PCR) ve dizileme protokolleri üretici firmanın talimatları doğrultusunda gerçekleştirildi. PCR ürünleri "Bosphore PCR Product Purification Spin Kit (Anatolia Geneworks, İstanbul, Türkiye)" kullanılarak saflaştırıldı ve dizileme "Beckman Coulter CEQ 8000 Genetic Analysis System&CEQ 8000 Genetic Analysis System Version 9 software (Beckman CoulterInc., Brea, CA, ABD)" aracılığıyla gerçekleştirildi.

HCV genotip/alttip ve NS3 Pl'lardan asunaprevir, boseprevir, faldaprevir, grazoprevir, paritaprevir, simeprevir ve telaprevirin dirençle ilişkili aminoasit değişiklikleri Geno2pheno-HCV programı kullanılarak belirlendi (Center of Advanced European Studies and Research, Bonn, Almanya, <http://hcv.geno2pheno.org/index.php>)¹². Şekil 1'de HCV NS3 inhibitörlerinin dirençle ilişkili mutasyonları referans dizi (HCV tip 1b; M58335) ile birlikte gösterildi. Ayrıca, HCV NS3 viral proteaz bölge kodonları, dirençle ilişkili mutasyonlar yönünden elektroferogramların manuel olarak incelenmesi ile doğrulandı.

BULGULAR

Çalışma grubu 51'i kadın, 46'sı erkek toplam 97 hastadan oluşmuştur. Hastaların yaş ortalaması 52, HCV RNA yükü ortalaması 8.72 + E6 IU/ml, ALT/AST ortalaması 53/44 U/L olarak saptanmıştır (Tablo I). İzole edilen tüm HCV RNA'ları genotiplendirilmiş ve buna göre 88 (%91) hastada genotip 1 tanımlanmıştır. HCV, bu hastaların 8 (%8.2)'inde 1a, 80 (%82.4)'inde 1b olarak subtiplendirilmiştir (Tablo I). Hastalarda tanımlanan genotip 2, 3 ve 4 NS3 ilaç direnci analiz çalışmasında kapsam dışı bırakılmıştır.

Çalışma grubunda toplam 39/88 (%44) hastada çeşitli aminoasit değişiklikleri ve direnç mutasyonları saptanmıştır. Q80L, S122C/N, S138W; potansiyel aminoasit değişiklikleri (6/88 hastada; %7) olarak tanımlanırken, R109K, R117C, S122G, I132V, I170V, N174S potansiyel dirençli (34/88 hastada; %39), V36L, T54S, V55A, Q80H dirençli (7/88 hastada; %8) ve Q80K, A156S yüksek dirençli (3/88 hastada; %3) mutasyon olarak tanımlanmıştır. Dirençli ve yüksek dirençli mutasyonlar esas alındığında 10/88 (%11) hastada klinik önemi yüksek mutasyonlar tanımlanmıştır. Saptanan tüm aminoasit değişiklikleri ve direnç mutasyonları Tablo II'de gösterilmiştir.

Q80K mutasyonu, çalışma grubunda yer alan alttip 1b ile enfekte hastaların hiçbirinde saptanmazken, tip 1a ile enfekte hastaların sadece 2/8 (%25)'inde saptanmıştır.

[illegible]

Şekil 1. Referans HCV suşunun (GenBank: AF009606.1) NS3 proteaz bölgesi aminoasit pozisyonlarına göre hastalarda (n= 39) saptanan direnç ilişkili aminoasit pozisyonlarının gösterilmesi. Hizalama, MutExt hizalama programında (<http://www.schuelter-gm.de/download.html>) Smith-Waterman ve Needleman-Wunsch analiz tekniğine göre yapılmıştır.

HCV suş	51	55	60	65	70	75	76	80	85	90	95	100																																										
Ref aa	V	C	W	T	V	Y	H	G	A	G	S	K	T	L	A	S	P	K	G	P	V	I	Q	M	Y	T	N	V	D	Q	D	L	V	G	W	P	A	P	Q	G	S	R	S	L	T	P	C	T	C	G				
SDU1	V	C	W	T	V	Y	H	G	A	G	S	K	T	L	A	S	P	K	G	P	V	I	Q	M	Y	T	N	V	D	Q	D	L	V	G	W	P	A	P	Q	G	S	R	S	L	T	P	C	T	C	G				
SDE2	V	C	W	T	V	Y	H	G	A	G	S	K	T	L	A	S	P	K	G	P	V	I	Q	M	Y	T	N	V	D	Q	D	L	V	G	W	P	A	P	Q	G	S	R	S	L	T	P	C	T	C	G				
SA3	V	C	W	T	V	Y	H	G	A	G	S	K	T	L	A	S	P	K	G	P	V	I	Q	M	Y	T	N	V	D	Q	D	L	V	G	W	P	A	P	Q	G	S	R	S	L	T	P	C	T	C	G				
KY4	V	C	W	T	V	Y	H	G	A	G	S	K	T	L	A	S	P	K	G	P	V	I	Q	M	Y	T	N	V	D	Q	D	L	V	G	W	P	A	P	Q	G	S	R	S	L	T	P	C	T	C	G				
AK5	V	C	W	T	V	Y	H	G	A	G	S	K	T	L	A	S	P	K	G	P	V	I	Q	M	Y	T	N	V	D	Q	D	L	V	G	W	P	A	P	Q	G	S	R	S	L	T	P	C	T	C	G				
Mu6	G	M	R	D	C	L	P	W	G	R	I	E	D	H	R	I	A	Q	G	S	H	Y	P	N	V	Y	Q	C	R	P	S	V	D	Q	D	L	V	G	W	P	A	P	Q	G	S	R	S	L	T	P	C	T	C	G
NA7	A	C	W	T	V	Y	H	G	A	G	S	K	T	L	A	S	P	K	G	P	V	I	Q	M	Y	T	N	V	D	Q	D	L	V	G	W	P	A	P	Q	G	S	R	S	L	T	P	C	T	C	G				
SER8	V	C	W	T	V	Y	H	G	A	G	S	K	T	L	A	S	P	K	G	P	V	I	Q	M	Y	T	N	V	D	Q	D	L	V	G	W	P	A	P	Q	G	S	R	S	L	T	P	C	T	C	G				
CCe9	V	C	W	T	A	Y	H	G	A	G	S	K	T	L	A	S	P	K	G	P	V	I	Q	M	Y	T	N	V	D	Q	D	L	V	G	W	P	A	P	Q	G	S	R	S	L	T	P	C	T	C	G				
HG10	V	C	W	T	A	Y	H	G	A	G	S	K	T	L	A	S	P	K	G	P	V	I	Q	M	Y	T	N	V	D	Q	D	L	V	G	W	P	A	P	Q	G	S	R	S	L	T	P	C	T	C	G				
CAK11	G	M	L	D	R	L	P	R	S	R	N	E	D	H	R	I	T	E	G	S	C	H	P	D	V	H	Q	C	G	Q	D	L	V	G	W	P	A	P	Q	G	S	R	S	L	T	P	C	T	C	G				
GSA12	A	C	W	T	V	Y	H	G	A	G	S	K	T	L	A	S	P	K	G	P	V	I	Q	M	Y	T	N	V	D	Q	D	L	V	G	W	P	A	P	Q	G	S	R	S	L	T	P	C	T	C	G				
KPu13	G	M	L	V	R	L	P	R	S	R	N	E	D	H	R	I	T	E	G	S	C	H	P	D	V	H	Q	C	G	Q	D	L	V	G	W	P	A	P	Q	G	S	R	S	L	T	P	C	T	C	G				
AH14	V	C	W	T	V	I	H	A	G	R	N	K	D	H	R	I	A	Q	G	S	C	H	P	D	V	H	Q	C	G	Q	D	L	V	G	W	P	A	P	Q	G	S	R	S	L	T	P	C	T	C	G				
AS15	V	C	W	T	V	Y	H	G	A	G	S	K	T	L	A	S	P	K	G	P	V	I	Q	M	Y	T	N	V	D	Q	D	L	V	G	W	P	A	P	Q	G	S	R	S	L	T	P	C	T	C	G				
MK16	V	C	W	T	V	Y	H	G	A	G	S	K	T	L	A	S	P	K	G	P	V	I	Q	M	Y	T	N	V	D	Q	D	L	V	G	W	P	A	P	Q	G	S	R	S	L	T	P	C	T	C	G				
AG17	V	C	W	T	V	Y	H	G	A	G	S	K	T	L	A	S	P	K	G	P	V	I	Q	M	Y	T	N	V	D	Q	D	L	V	G	W	P	A	P	Q	G	S	R	S	L	T	P	C	T	C	G				
HT18	V	C	W	T	V	Y	H	G	A	G	S	K	T	L	A	S	P	K	G	P	V	I	Q	M	Y	T	N	V	D	Q	D	L	V	G	W	P	A	P	Q	G	S	R	S	L	T	P	C	T	C	G				
MKA19	V	C	W	T	V	Y	H	G	A	G	S	K	T	L	A	S	P	K	G	P	V	I	Q	M	Y	T	N	V	D	Q	D	L	V	G	W	P	A	P	Q	G	S	R	S	L	T	P	C	T	C	G				
MKr20	V	C	W	T	V	Y	H	G	A	G	S	K	T	L	A	S	P	K	G	P	V	I	Q	M	Y	T	N	V	D	Q	D	L	V	G	W	P	A	P	Q	G	S	R	S	L	T	P	C	T	C	G				
ST21	V	C	W	T	V	Y	H	G	A	G	S	K	T	L	A	S	P	K	G	P	V	I	Q	M	Y	T	N	V	D	Q	D	L	V	G	W	P	A	P	Q	G	S	R	S	L	T	P	C	T	C	G				
ZT22	V	C	W	T	V	Y	H	G	A	G	S	K	T	L	A	S	P	K	G	P	V	I	Q	M	Y	T	N	V	D	Q	D	L	V	G	W	P	A	P	Q	G	S	R	S	L	T	P	C	T	C	G				
ZC23	A	C	L	V	H	L	S	W	R	R	L	K	D	P	S	P	A	R	R	D	Q	S	P	K	C	T	P	M	W	T	N	V	D	Q	D	L	V	G	W	P	A	P	Q	G	S	R	S	L	T	P	C	T	C	G
MY24	R	V	L	G	L	S	I	M	A	P	A	Q	R	P	A	P	A	R	R	D	Q	S	P	K	C	T	P	M	W	T	N	V	D	Q	D	L	V	G	W	P	A	P	Q	G	S	R	S	L	T	P	C	T	C	G
YY25	V	C	W	T	V	Y	H	G	A	G	S	K	T	L	A	S	P	K	G	P	V	I	Q	M	Y	T	N	V	D	Q	D	L	V	G	W	P	A	P	Q	G	S	R	S	L	T	P	C	T	C	G				
CK26	V	C	W	T	A	Y	H	G	A	G	S	K	T	L	A	S	P	K	G	P	V	I	Q	M	Y	T	N	V	D	Q	D	L	V	G	W	P	A	P	Q	G	S	R	S	L	T	P	C	T	C	G				
STo27	V	C	W	T	V	Y	H	G	A	G	S	K	T	L	A	S	P	K	G	P	V	I	Q	M	Y	T	N	V	D	Q	D	L	V	G	W	P	A	P	Q	G	S	R	S	L	T	P	C	T	C	G				
Bl28	V	C	W	T	V	Y	H	G	A	G	S	K	T	L	A	S	P	K	G	P	V	I	Q	M	Y	T	N	V	D	Q	D	L	V	G	W	P	A	P	Q	G	S	R	S	L	T	P	C	T	C	G				
NK29	V	C	W	T	V	Y	H	G	A	G	S	K	T	L	A	S	P	K	G	P	V	I	Q	M	Y	T	N	V	D	Q	D	L	V	G	W	P	A	P	Q	G	S	R	S	L	T	P	C	T	C	G				
MA30	V	C	W	T	V	Y	H	G	A	G	S	K	T	L	A	S	P	K	G	P	V	I	Q	M	Y	T	N	V	D	Q	D	L	V	G	W	P	A	P	Q	G	S	R	S	L	T	P	C	T	C	G				
SD31	V	C	W	T	V	Y	H	G	A	G	S	K	T	L	A	S	P	K	G	P	V	I	Q	M	Y	T	N	V	D	Q	D	L	V	G	W	P	A	P	Q	G	S	R	S	L	T	P	C	T	C	G				
HD32	V	C	W	T	V	Y	H	G	A	G	S	K	T	L	A	S	P	K	G	P	V	I	Q	M	Y	T	N	V	D	Q	D	L	V	G	W	P	A	P	Q	G	S	R	S	L	T	P	C	T	C	G				
EG33	V	C	W	T	V	Y	H	G	A	G	S	K	T	L	A	S	P	K	G	P	V	I	Q	M	Y	T	N	V	D	Q	D	L	V	G	W	P	A	P	Q	G	S	R	S	L	T	P	C	T	C	G				
MeA34	V	C	W	T	V	Y	H	G	A	G	S	K	T	L	A	S	P	K	G	P	V	I	Q	M	Y	T	N	V	D	Q	D	L	V	G	W	P	A	P	Q	G	S	R	S	L	T	P	C	T	C	G				
BM35	C	V	L	D	C	L	P	R	G	R	N	K	D	H	C	V	T	K	G	S	R	H	P	D	V	Y	Q	C	R	S	D	L	V	G	W	P	A	P	Q	G	S	R	S	L	T	P	C	T	C	G				
CaA36	V	C	W	T	V	F	H	G	A	G	S	K	T	L	A	S	P	K	G	P	V	I	Q	M	Y	T	N	V	D	Q	D	L	V	G	W	P	A	P	Q	G	S	R	S	L	T	P	C	T	C	G				
DKA37	V	C	G	T	V	Y	H	G	A	G	S	K	T	L	A	S	P	K	G	P	V	I	Q	M	Y	T	N	V	D	Q	D	L	V	G	W	P	A	P	Q	G	S	R	S	L	T	P	C	T	C	G				
ED38	V	C	W	T	V	Y	H	G	A	G	S	K	T	L	A	S	P	K	G	P	V	I	Q	M	Y	T	N	V	D	Q	D	L	V	G	W	P	A	P	Q	G	S	R	S	L	T	P	C	T	C	G				
KaP39	V	C	W	T	V	Y	H	G	A	G	S	K	T	L	A	S	P	K	G	P	V	I	Q	M	Y	T	N	V	D	Q	D	L	V	G	W	P	A	P	Q	G	S	R	S	L	T	P	C	T	C	G				

Şekil 1. Referans HCV suşunun (GenBank: AF009606.1) NS3 proteaz bölge aminoasit pozisyonlarına göre hastalarda (n= 39) saptanan dirençli ilişkili aminoasit pozisyonlarının gösterilmesi. Hizalama, MutExt hizalama programında (<http://www.schuelter-gm.de/download.html>) Smith-Waterman ve Needleman-Wunsch analiz tekniğine göre yapılmıştır. (devamı).

HCV suş	101	105	110	115	120	125	126	130	135	140	145	150
Ref aa	S	SDLY	LVT RH	ADVI P	VRRRG	DSRGS	L	LSPR	PI SYL	K GSSG	GPLL C	PAGH A
SDU1	S	SDLY	LVT RH	ADVI P	VRRRG	DSRGS	L	LSPR	PV SYL	K GSSG	GPLL C	PSGH A
SDE2	S	SDLY	LVT RH	ADVI P	VRRRG	DSRGS	L	LSPR	PV SYL	K GSSG	GPLL C	PSGH A
SA3	S	SDLY	LVT RH	ADVI P	VRRRG	DSRGS	L	LSPR	PV SYL	K GSSG	GPLL C	PSGH V
KY4	S	SDLY	LVT RH	ADVI P	VRRRG	DSRGS	L	LSPR	PI SYL	K GSSG	GPLL C	PAGH A
AK5	S	SDLY	LVT RH	ADVI P	VRRRG	DSRGS	L	LSPR	PV SYL	K GSSG	GPLL C	PSGH A
Mu6	L	LGPL	SGHEA	SRHP	RAPA G	DWQG Q	P	AFAP	AHFL F	ERLL G	GSAV	PRGT R
NA7	S	SDLY	LVT KH	ADVI P	VRRRG	DSRGS	L	LSPR	PV SYL	K GSSG	GPLL C	PSGH A
SER8	G	SSDL	YLVTR	TRRCY	P GAPA	EVTA G	E	AYYP	PGSP P	I GRAP	RVHC	FAPR G
CCe9	S	SDLY	LVT RH	ADVI P	VRRRG	DSRGS	L	LSPR	PV SYL	K GSSG	GPLL C	PSGH A
HG10	S	SDLY	LVT RH	ADVI P	VRRRG	DSRGS	L	LSPR	PV SYL	K GSSG	GPLL C	PSGH A
CAk11	L	LGPL	SGHEA	RRCHS	RAPA G	DSQG Q	P	AVAP	AHLL L	K GSSG	GSAV	PRG A R
GSa12	S	SDLY	LVT RH	ADVI P	VRRRG	DSQG Q	P	AVAP	PV SYL	K GSSG	GPLL C	PSGH A
KPu13	L	LGPL	SGHEA	RRCHS	RAPA G	DSQG Q	P	AVAP	AYLL L	ERLL G	GSAV	PRG A R
AH14	A	PRTF	TWSRG	TPMSF	LCAGG	VTAG A	A	CFRP	GLSL T	K KAPR	AHCC	APRDT
AS15	S	SDLY	LVT RH	ADVI P	VRRRG	DSRGS	L	LSPR	PV SYL	K GSSG	GPLL C	PSGH A
MK16	S	SDLY	LVT RH	ADVI P	VRRRG	DSRGS	L	LSPR	PI SYL	K GSSG	GPLL C	PSGH V
AG17	G	SSDL	YLVTR	HADVI	PVRRR	GDSRG	S	LLSP	QAHLL	L EGLF	GGST A	LPP Q G
HT18	L	RQLG	PLLGH	EACVC	HSGAP	AGRG Q	G	ESPL	PQACL	L SEGL	FGRST	ALP L G
MKa19	Q	LGPL	LGHEA	RRCHS	GLPAR	RQOGE	P	ALPQ	AHLL F	EGLFG	WT TAL	PLG A R
MKr20	S	SDLY	LIT RH	ADVI P	VRRRG	DSRGS	L	LSPR	PV SYL	K GSSG	GPLL C	PSGH A
ST21	A	ARTS	TWSRD	MLMSF	RCAGG	ATAGE	A	YSPQ	GPSP T	K RVLR	AVHCF	APRGT
ZT22	S	SDLL	SGHEA	CRCHP	GAPT G	PVOGD	P	ARPP	AGLL T	Y RMAR	RRI LC	PAGH A
ZC23	Q	LGPL	FGHEA	CRCHS	GAPAG	DQOGE	L	TLPQ	ACIL L	E GFFG	WSTAL	SLG A C
MY24	A	ARTF	TWSRG	MLMSC	RCAGG	ATAGG	V	RFPL	GPSP T	ANGLI	GRVHY	SST P R
YY25	S	SDLY	LVT RH	ADVI P	VRRRG	DSRGS	L	LSPR	PV SYL	K GSSG	GPLL C	PSGH A
CK26	S	SDLY	LVT RH	ADVI P	VRRRG	DSRGS	L	LSPR	PV SYL	K GSSG	GPLL C	PSGH A
STo27	S	SDLY	LVT RH	ADVI P	VRRRG	DSRGS	L	LSPR	PV SYL	K GSSG	GPLL C	PSGH A
BL28	S	SDLY	LVT KH	ADVI P	VRRRG	DSRGS	L	LSPR	PV SYL	K GSSG	GPLL C	PSGH A
NK29	S	SDLY	LVT RH	ADVI P	VRRRG	DSRGS	L	LSPR	PV SYL	K GSSG	GPLL C	PSGH A
MA30	S	SDLY	LVT RH	ADVI P	VRRRG	DSRGS	L	LSPR	PV SYL	K GSSG	GPLL C	PSGH A
SD31	S	SDLY	LVT RH	ADVI P	VRRRG	DSRGS	L	LSPR	PV SYL	K GSSG	GPLL C	PSGH A
HD32	S	SDLY	LVT RH	ADVI P	VRRRG	RQORG	L	ALPQ	ARLL F	EGLLG	WSTAL	PLG A R
EG33	S	SDLY	LVT RH	ADVI P	VRRRG	DSRGS	L	LSPR	PV SYL	K GSSG	GPLL C	PSGH A
MeA34	S	SDLY	LVT RH	ADVI P	VRRRG	DSRGS	L	LSPR	PI SYL	K GSSG	GPLL C	PSGH A
BM35	L	LGPL	PGHEA	RRCHP	RAPAR	DWRG Q	P	AFAP	AYFL P	K RLLG	GPTAM	PRGT R
CvA36	S	SDLY	LVT RH	ADVI P	VRRRG	DSRGS	L	LSPR	PV SYL	K GSSG	GPLL C	PSGH A
DKA37	S	SDLY	LVT RQ	ADVI P	VRRRG	DSRGS	L	LSPR	PI SYL	K GSSG	GPLL C	PAGH A
ED38	S	SDLY	LVT RH	ADVI P	VRRRG	DGRGS	L	LSPQ	PVSL P	T GLFG	WSAAL	PLG A C
KaP39	S	SDLY	LVT RH	ADVI P	VRRRG	DSRGS	L	LSPR	PI SYL	K GSPG	GPLL C	PSGH A

Şekil 1. Referans HCV suşunun (GenBank: AF009606.1) NS3 proteaz bölge aminoasit pozisyonlarına göre hastalarda (n= 39) saptanan dirençle ilişkili aminoasit pozisyonlarının gösterilmesi. Hizalama, MutExt hizalama programında (<http://www.schuelter-gm.de/download.html>) Smith-Waterman ve Needleman-Wunsch analiz tekniğine göre yapılmıştır. (devamı).

HCV suş	151	155	160	165	170	175	176	180																								
Ref aa	V	G	L	F	R	A	A	V	C	T	R	G	V	A	K	A	V	D	F	I	P	V	E	N	L	E	T	T	M	R	S	
SDU1	V	G	I	F	R	A	A	V	C	T	R	G	V	A	K	A	V	D	F	V	P	V	E	S	M	E	T	T	M	R	S	
SDE2	V	G	I	F	R	A	A	V	C	T	R	G	V	A	K	A	S	G	F	H	T	R	E	V	H	G	N	Y	H	A	V	
SA3	V	G	I	F	R	A	A	V	C	T	R	G	V	A	K	A	V	D	F	V	P	V	E	S	M	E	T	T	M	R	S	
KY4	V	G	I	F	R	A	A	V	C	T	R	G	V	A	K	A	V	D	F	I	P	V	E	S	L	E	T	T	M	R	S	
AK5	V	G	I	F	R	A	A	V	C	T	R	G	V	A	K	A	V	D	F	V	P	V	E	S	M	E	T	T	M	R	S	
Mu6	R	R	H	I	P	G	P	R	C	A	P	V	E	W	L	R	R	W	T	L	S	L	E	R	T	E	R	O	P	R	G	
NA7	V	G	I	F	R	A	A	V	C	T	R	G	V	A	K	A	V	D	F	I	P	V	E	S	L	E	T	T	M	R	S	
SER8	T	L	W	E	S	S	G	L	L	Y	A	P	G	G	L	L	K	R	W	T	S	Y	R	L	N	P	W	K	L	P	C	
CCe9	V	G	I	F	R	A	A	V	C	T	R	G	V	A	K	A	V	D	F	V	P	V	E	S	M	E	T	T	M	R	S	
HG10	V	G	I	F	R	A	A	V	C	T	R	G	V	A	K	A	V	D	F	V	S	L	E	R	T	E	T	T	M	R	S	
CAk11	R	R	H	I	Q	G	R	G	V	H	S	R	S	G	K	G	C	G	L	Y	P	C	G	E	P	R	D	N	H	E	I	
GSa12	V	G	I	F	R	A	A	V	C	T	R	G	V	A	K	A	V	D	F	V	P	V	E	S	M	E	T	T	M	R	S	
KPu13	R	G	H	I	Q	G	R	G	V	H	P	R	S	G	K	G	G	G	L	Y	P	C	G	E	P	R	D	N	H	E	I	
AH14	P	G	A	Y	?	E	P	R	C	V	P	V	E	W	L	R	A	G	L	Y	P	C	G	E	P	E	T	T	M	R	S	
AŞ15	V	G	I	F	R	A	A	V	C	T	R	G	V	A	K	A	V	D	F	V	P	V	E	S	M	E	T	T	M	R	S	
MK16	V	G	I	F	R	A	A	V	C	T	R	G	V	A	K	A	V	D	F	V	P	V	E	S	M	E	T	T	M	R	S	
AG17	T	L	W	A	S	S	G	L	L	C	A	P	G	G	S	P	T	G	G	G	L	R	T	P	?	E	V	Y	G	K	P	
HT18	T	R	R	G	H	F	P	G	C	C	V	Y	P	G	G	?	K	I	G	G	P	C	G	E	P	E	T	T	M	R	S	
MKa19	R	G	H	L	P	G	C	C	V	H	P	G	G	C	Q	G	G	R	L	C	T	R	R	V	Y	G	D	H	A	V		
MKr20	V	G	I	F	R	A	A	V	C	T	R	G	V	A	K	A	V	D	F	I	P	V	E	S	M	E	T	T	M	R	S	
ST21	P	G	A	S	S	G	L	L	C	A	P	G	G	L	Q	R	R	W	T	L	Y	P	L	S	L	W	K	L	P	C	G	
ZT22	V	G	A	F	R	A	A	V	C	T	R	G	V	A	K	A	V	D	F	L	S	L	E	R	T	E	T	T	M	R	S	
ZC23	C	G	H	L	P	G	C	R	V	Y	P	G	G	R	E	G	G	G	L	R	T	R	E	G	Y	G	N	Y	Y	A	V	
MY24	E	T	A	P	A	S	A	I	T	L	P	E	S	R	R	P	R	W	F	A	H	P	P	E	P	E	T	T	M	R	S	
YY25	V	G	I	F	R	A	A	V	C	T	R	G	V	A	K	A	V	D	F	I	P	V	E	E	L	E	T	T	M	R	S	
CK26	V	G	I	F	R	A	A	V	C	T	R	G	V	A	K	A	V	D	F	V	P	V	E	S	M	E	T	T	M	R	S	
STo27	V	G	I	F	R	A	A	V	C	T	R	G	V	A	K	A	V	D	F	V	P	V	E	S	M	E	T	T	M	R	S	
Bl28	V	G	I	F	R	A	A	V	C	T	R	G	V	A	Q	G	G	G	F	R	T	R	R	V	Y	G	T	T	M	R	S	
NK29	V	G	I	F	R	A	A	V	C	T	R	G	V	A	K	A	V	D	F	V	P	V	E	S	M	E	T	T	M	R	S	
MA30	V	G	I	F	R	A	A	V	C	T	R	G	V	A	K	A	V	D	F	V	P	V	E	S	M	E	T	T	M	R	S	
SD31	V	G	I	F	R	A	A	V	C	T	R	G	V	A	K	A	V	D	F	V	P	V	E	S	M	E	T	T	M	R	S	
HD32	C	R	H	L	P	G	C	C	V	H	P	G	G	C	E	G	G	G	L	C	A	C	E	V	H	G	N	H	H	A	V	
EG33	V	G	I	F	R	A	A	V	C	T	R	G	V	A	K	A	V	D	F	V	P	V	E	S	M	E	T	T	M	R	S	
MeA34	V	G	I	F	R	A	A	V	C	T	R	G	V	A	K	A	V	D	F	V	P	V	E	S	M	E	T	T	M	R	S	
BM35	R	R	H	I	Q	S	R	D	M	Y	P	W	S	G	K	A	S	G	G	L	Y	P	R	G	E	P	R	D	N	H	E	V
CeA36	V	G	I	F	R	A	A	V	C	T	R	G	V	A	K	A	V	D	F	V	P	V	E	H	M	E	T	T	M	R	S	
DKA37	V	G	I	F	R	A	A	V	C	T	R	G	V	A	K	A	V	D	F	I	P	V	E	N	L	E	T	T	M	R	S	
ED38	R	G	H	L	P	G	C	C	V	H	P	G	G	C	E	G	G	R	L	C	T	R	E	V	H	G	N	Y	Y	A	V	
KeP39	V	G	I	F	R	A	A	V	C	T	R	G	V	A	K	A	V	D	F	V	P	V	E	S	M	E	T	T	M	R	S	

Şekil 1. Referans HCV suşunun (GenBank: AF009606.1) NS3 proteaz bölge aminoasit pozisyonlarına göre hastalarda (n= 39) saptanan dirençle ilişkili aminoasit pozisyonlarının gösterilmesi. Hizalama, MutExt hizalama proramında (<http://www.schuelter-gm.de/download.html>) Smith-Waterman ve Needleman-Wunsch analiz tekniğine göre yapılmıştır. (devamı).

TARTIŞMA

Türkiye’de KHC’li hastalarda, NS3 proteaz inhibitörü ile ilişkili ilaç direnci mutasyonları görülmektedir. Bulgularımız klinik önemi yüksek olan V36L, T54S, V55A, Q80H/K ve A156T mutasyonlarının tedavi öncesinde %10 oranında bulunabildiğini göstermektedir. Bu nedenle, KHC’nin NS3 inhibitörü ile tedavisi öncesinde rasyonel hasta yönetimi için NS3 inhibitörü ilaç direnci analizi gerekli olabilir.

Tablo I. Hepatit C Virusu ile İnfekte Hasta Grubunun Demografik ve Laboratuvar Özellikleri

Karakteristik özellikler	Hasta grubu
Hastalar, n	97
Cinsiyet, K/E, n (%)	51 (%53)/46 (%47)
Yaş, ortalama yıl (yaş aralığı)	52 (21-75)
HCV RNA, ortalama IU/ml (HCV RNA aralığı)	8.72 + E6 (2.1 + E3-1.97 + E8)
ALT/AST, ortalama U/L	53 (10-107)/44 (18-89)
HCV genotip, n (%)	1a 8 (8) 1b 80 (83) 2 2 (2) 3 4 (4) 4 3 (3)

K: Kadın, E: Erkek, HCV: Hepatit C virusu, ALT: Alanin aminotransferaz, AST: Aspartat aminotransferaz.

Tablo II. Genotip 1 ile İnfekte Kronik Hepatit C Hastalarında NS3 İnhibitörleri Direnç Mutasyonları (n= 88)

İlaç grubu	Hasta, n (%)	Direnç paterni	Mutasyon paterni	Direnç katsayısı ^a	Direnç durumu
NS3	6 (7)	Potansiyel aminoasit değişiklikleri ^b	Q80L, S122C/N, S138W	-	-
	34 (39)	Olası direnç	R109K, R117C, S122G, I132V, I170V, N174S	0.5-2.1	Telaprevir, boseprevir, simeprevir dirençli
	7 (8)	Dirençli	V36L, T54S, V55A, Q80H	1.6-8.5	Telaprevir, boseprevir, simeprevir dirençli
	3 (3)	Yüksek dirençli	80K, A156S	14-24	Telaprevir, boseprevir, simeprevir, faldaprevir yüksek dirençli

^a Direnç katsayısı; fenotipik direnç analizi yönteminde, IC₅₀ değerinin hesap ortalaması ile elde edilen bir yaklaşımdır. Mutasyonlarla oluşan ilaç direnci hakkında kantitatif bir fikir vermektedir.^b Potansiyel aminoasit değişikliği; tanımlanan mutasyonların bilinen klinik etkilerinin olmaması ancak bulundukları pozisyonda klinik yansımalarının potansiyel olarak bulunmasıdır.

Yapılan çalışmalara göre, dünyada DAA tedavileri öncesinde %4-28 oranında telaprevir dirençli mutasyonların (V36L, T54A/S, V55A, Q80K/R, R155I/K/M/T, A156S, D168Q ve V170T) saptandığı bildirilmektedir¹³⁻¹⁶. Kuntzen ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada Amerika ve Avrupa popülasyonunda HCV genotip 1 ile enfekte olup tedavi alan naif hastalarda DAA dirençli varyantların oranı %8.6 olarak bulunmuştur¹⁷. Türkiye’de NS3 PI ilaç direnci analizi ilk olarak Türk Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Derneği (KLİMİK) Viral Hepatit Çalışma Grubu’nun 2013 yılında ulusal düzeyde yaptığı surveyans çalışmalarında ele alınmıştır. Henüz yayınlanmamış olan Klimik surveyansına göre telaprevir, boseprevir, simeprevir, faldaprevir direnci mutasyonları sırasıyla %15, %14, %6 ve %7 olarak tanımlanmaktadır¹⁸.

Ülkemizde HCV NS3 inhibitörleri ilaç direnci ile ilgili yeterli veri bulunmamaktadır. Ertem ve arkadaşlarının¹⁹ yaptığı bir çalışmada, PEG-IFN ve RBV tedavisine yanıtı olmayan ve telaprevirli kombinasyon tedavisinin 12. haftasında viral “rebound” gelişen bir kronik hepatit C olgusu sunulmuştur. Söz konusu çalışmada yapılan HCV NS3 direnç analiziyle T54S, Q80L A156T ve N174S mutasyonları ile paritaprevire duyarlı, telaprevir, boseprevir ve simeprevire dirençli sonuçlar saptanmıştır¹⁹. Yine PI ilaç direnci mutasyonlarıyla ilgili güncel bir çalışmada, antiviral tedavi almamış hepatit C genotip 1 ile enfekte hastalarda sırasıyla en sıklıkla tanımlanan T54S ve R109K mutasyonlarına bağlı olarak telaprevir, boseprevir, simeprevir ve faldaprevire direnç saptanmıştır²⁰. Çalışmamızda, Türkiye’de ilk kez NS3 PI ilaç grubunda yer alan yeni ajanlardan asunaprevir ve grazoprevir de değerlendirilmiş ve bu DAA ajanlarına dirençli herhangi bir mutasyon saptanmamıştır.

HCV alttip 1a enfeksiyonlarının simeprevir ile tedavisinde Q80K mutasyonunun tedavi öncesinde bulunması durumunda tedaviye hiç başlanmaması önerilmektedir^{21,22}. Yapılan çalışmalarda, HCV alttip 1a ile enfekte hastalarda Q80K mutasyon yaygınlığı %22-30, alttip 1b ile enfekte hastalarda ise %0.5-1 olarak bildirilmektedir^{21,22}. Bulgularımız, alttip 1a olgularının %25’inde Q80K mutasyonunun bulunduğunu, alttip 1b ile enfekte hastalarda ise bulunmadığını göstermektedir. Simeprevirin yakın zamanda ülkemizde de kullanıma girmesi beklenmektedir. HCV alttip 1a ile enfekte KHC’li hastaların simeprevir ile tedavileri öncesinde Q80K polimorfizminin araştırılması yararlı olacaktır.

Sonuç olarak, KHC’nin NS3 PI grubu ilaçlarla tedavileri öncesinde NS3 ilaç direnci mutasyon analizlerinin yapılması rasyonel bir hasta yönetimi için faydalı olabileceği kanısına varılmıştır. Öte yandan, benzer çalışmaların, kullanıma girmesi beklenen HCV NS5A ve NS5B inhibitörleri için de yapılmasının yararlı olabileceği düşünülmüştür.

KAYNAKLAR

1. Brownell J, Polyak SJ. Molecular pathways: hepatitis C virus, CXCL10, and the inflammatory road to liver cancer. Clin Cancer Res 2013; 19(6): 1347-52.
2. Chayama K, Hayes CN. HCV drug resistance challenges in Japan: The role of pre-existing variants and emerging resistant strains in direct-acting antiviral therapy. Viruses 2015; 7(10): 5328-42.
3. Thompson AJ, Locarnini SA, Beard MR. Resistance to anti-HCV protease inhibitors. Curr Opin Virol 2011; 1(6): 599-606.
4. Nakano T, Lau GM, Lau GM, Sugiyama M, Mizokami M. An updated analysis of hepatitis C virus genotypes and subtypes based on the complete coding region. Liver Int 2012; 32(2): 339-45.
5. Abacioglu YH, Davidson F, Tuncer S, et al The distribution of hepatitis C virus genotypes in Turkish patients. J Viral Hepat 1995; 2(6): 297-30.
6. Strader DB, Wright T, Thomas DL, Seeff LB. American Association for the Study of Liver Diseases. Diagnosis, management, and treatment of hepatitis C. Hepatology 2004; 39(4): 1147-71.
7. Kieffer TL, Kwong AD, Picchio GR. Viral resistance to specifically targeted antiviral therapies for hepatitis C (STAT-Cs). J Antimicrob Chemother 2010; 65(2): 202-12.
8. Sarrazin C, Zeuzem S. Resistance to direct antiviral agents in patients with hepatitis C virus infection. Gastroenterology 2010; 138(2): 447-62.
9. European Association for the Study of the Liver. EASL Clinical Practice Guidelines: management of hepatitis C virus infection. J Hepatol 2014; 60(2): 392-420.

10. Aygen B, Keten D, Akalin H, et al. Kronik hepatit C virüsü enfeksiyonunun yönetimi: Türk Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Derneği Viral Hepatit Çalışma Grubu Uzlaş Raporu. *Klinik Derg* 2014; 27(Suppl 1): 19-39.
11. Tozun N, Özdoğan O, Cakaloğlu Y, et al. Seroprevalence of hepatitis B and C virus infections and risk factors in Turkey: a fieldwork TURHEP study. *Clin Microbiol Infect* 2015; 21(11): 1020-6.
12. Kalaghatgi P, Sikorski AM, Knops E, et al. Geno2pheno[HCV]-A web-based interpretation system to support hepatitis C treatment decisions in the era of direct acting antiviral agents. *PLoS One* 2016; 11(5): e0155869.
13. Dierynck I, Thys K, Ghys A, et al. Deep-sequencing analysis of the gene encoding the hepatitis C virus non-structural 3-4A protease confirms a low prevalence of telaprevir-resistant variants at baseline and the end of the REALIZE study. *J Infect Dis* 2014; 210(12): 1871-80.
14. Andonov A, Kadkhoda K, Osiowy C, Kaita K. Pre-treatment resistance to hepatitis C virus protease inhibitors boceprevir/telaprevir in hepatitis C virus subgenotype 1a-infected patients from Manitoba. *J Gastroenterol* 2013; 27(7): 414-6.
15. Hoffmann L, Ramos JA, Souza EV, et al. Dynamics of resistance mutations to NS3 protease inhibitors in a cohort of Brazilian patients chronically infected with hepatitis C virus (genotype 1) treated with pegylated interferon and ribavirin: a prospective longitudinal study. *Virology* 2013; 10:57.
16. Palanisamy N, Danielsson A, Kokkula C, et al. Implications of baseline polymorphisms for potential resistance to NS3 protease inhibitors in hepatitis C virus genotypes 1a, 2b and 3a. *Antiviral Res* 2013; 99(1): 12-7.
17. Kuntzen T, Timm J, Berical A, et al. Naturally occurring dominant resistance mutations to hepatitis C virus protease and polymerase inhibitors in treatment-naïve patients. *Hepatology* 2008; 48(6): 1769-78.
18. Sayan M. Drug resistance in protease inhibitors in Turkey. *Klinik, Viral Hepatitis Study Group Workshop. Turkey Telaprevir Experience. 21 Sept 2013, Istanbul, Turkey. www.klinik.org.tr*
19. Ertem GT, Sayan M, Hekimoğlu Ş, Tülek N. Cross resistance to HCV NS3 inhibitor developing during treatment with peginterferon, ribavirin and telaprevir. *Klinik Derg* 2015; 28(2): 92-4.
20. Altunok ES, Sayan M, Akhan S, et al. Protease inhibitors drug resistance mutations in Turkish patients with chronic hepatitis C. *J Infect Dis* 2016; 50: 1-5.
21. Fried MW, Buti M, Dore GJ, et al. Once-daily simeprevir (TMC435) with pegylated interferon and ribavirin in treatment-naïve genotype 1 hepatitis C: the randomized PILLAR study. *Hepatology* 2013; 58(6): 1918-29.
22. Izquierdo L, Helle F, François C, Castelain S, Duverlie G, Brochet E. Simeprevir for the treatment of hepatitis C virus infection. *Pharmgenomics Pers Med* 2014; 14(7): 241-9.