

T.C.
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ
MERAM TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

HCV KOR ANTİJENİNİN TANI DEĞERİNİN ANTİ HCV VE HCV RNA İLE
KIYASLANARAK ARAŞTIRILMASI

DR.MEHMET EMİN DEMİRCİLİ

UZMANLIK TEZİ

KONYA 2013

T.C.
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ
MERAM TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

HCV KOR ANTİJENİNİN TANI DEĞERİNİN ANTİ HCV VE HCV RNA İLE
KIYASLANARAK ARAŞTIRILMASI

DR.MEHMET EMİN DEMİRCİLİ

UZMANLIK TEZİ

Danışman: PROF.DR. BÜLENT BAYSAL

KONYA 2013

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım Anabilim Dalı Başkanımız ve tez danışmanım Prof. Dr. Bülent BAYSAL'a, tez çalışmamda ve her konuda yardımlarını esirgemeyen; Prof. Dr. Mahmut BAYKAN'a, Doç. Dr. Mehmet ÖZDEMİR'e, Yrd. Doç. Dr. Bahadır Feyzioğlu'na, meslek hayatıma katkılarından dolayı; Prof. Dr. İnci TUNCER'e, tezimin istatistiksel verilerinin oluşturulmasında emeği geçen Prof. Dr. Şükrü İNAL ve Doç. Dr. Mustafa Garip'e, Nükleer Tıp rotasyonum sırasında yardımlarından dolayı Yrd. Doç. Dr. Güngör TAŞTEKİN ve Yrd. Doç. Dr. Mustafa SERDENGEÇTİ'ye, tezimi 121518006 no'lu proje ile destekleyen Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne, birlikte çalıştığım asistan arkadaşlarıma, tüm mikrobiyoloji laboratuvarı teknisyen ve personeline, hayatıma vesile ve şu andaki bilgi ve tecrübemin temel taşı olan, benden desteğini, şefkatini ve anlayışını hiçbir zaman esirgemeyen kıymetli aileme, asistanlığım süresince yanımda olan çok değerli ablam Semine ALTINIŞIK ve eşi Cengiz ALTINIŞIK'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

10.02.2013

Mehmet Emin DEMİRCİLİ

ÖZET

HCV KOR ANTİJENİNİN TANI DEĞERİNİN ANTİ HCV VE HCV RNA İLE KIYASLANARAK ARAŞTIRILMASI MEHMET EMİN DEMİRCİLİ

UZMANLIK TEZİ

KONYA-2013

Amaç: HCV kor antijen testinin tanı değerinin Anti-HCV antikor testi pozitif veya negatif olan hastalarda HCV RNA testi ile kıyaslanarak araştırılmasıdır.

Yöntem: Bu çalışmaya Aralık 2010-Şubat 2012 tarihleri arasında Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi'ne başvuran HCV enfeksiyonu açısından şüpheli olarak düşünülen 189 hastanın serum örneği alındı. Bu örneklerle yeterli miktarda ve uygun koşullarda saklanarak anti-HCV, HCV kor antijen, SIT (Strip İmmun Blot Test), HCV RNA testleri uygulandı. HCV RNA testi pozitif bulunan örneklerin amplikonlarından genotipleme yapıldı.

Bulgular: Anti-HCV antikor, SIT, HCV kor antijen testleri sensitivite ve spesifiteyi sırasıyla; %98,7 ve %36,6, %90,8 ve %100, %96,2 ve %100 olarak tespit edildi. Genotipleme yapılan 65 örneğin 59'u genotip 1b, 2'si genotip 1a/1b, 1'er adet genotip 3a, genotip 4, genotip 2a/2c ve genotip 1a olarak belirlendi.

Sonuç: HCV kor antijen testinin yüksek sensitivite ve spesifiteye sahip, güvenilir, tekrarlanabilir, uygulaması kolay ve maliyet etkin bir test olduğu sonucuna varıldı. HCV enfeksiyonunun tanısında tarama testi olarak ve anti-HCV antikor test sonuçlarının konfirmasyonunda ve tamamlayıcı test uygulamalarında yararlı olabilir.

Anahtar Kelimeler: HCV, kor antijen, HCV RNA, SIT

BAP; Proje no: 121518006

ABSTRACT

COMPARATIVE EVALUATION OF DIAGNOSTIC VALUE OF HEPATITIS C VIRUS CORE ANTIGEN IN REFERANCE OF ANTI HCV AND HCV RNA

MEHMET EMİN DEMİRCİLİ

Objective: It is aimed to investigate diagnostic value of HCV core antigen test in anti-HCV positive or negative patients by comparison HCV RNA assay.

Methods: In this study, sera samples were obtained from 189 patients who is considered to be suspicious for hepatitis C virus infection were collected, between December 2010-February 2012. Sufficient amount of the samples were stored under suitable conditions. Anti-HCV assay, HCV core antigen, SIT (Immun-Blot Test Strip) and HCV RNA tests were performed. Genotyping was performed positive for HCV RNA in the samples.

Results: The diagnostic sensitivity and specificity of the anti-HCV assay, SIT and HCV core antigen test were 98,7%, 90,8%, 96,2%, and 36,6%, 100%, 100%, respectively. From 65 samples which were genotyped, HCV genotype 1b, genotype 1a/1b, genotype 3a, genotype 4, genotype 2a/2c and genotype 1a were detected in 59, 2, 1, 1, 1 and 1 of the samples, respectively.

Conclusion: It was concluded that HCV antigen assay is highly specific, sensitive, reliable, reproducible, easy to perform and cost-effective. It may be applicable as a screening test for the diagnosis of hepatitis C virus infection and may be useful for supplemental, and confirmatory test in anti-HCV assays.

Key words: HCV, core antigen, HCV RNA, SIA, genotype

BAP; Project no: 121518006

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
TEŞEKKÜR.....	iii
ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
TABLO DİZİNİ	viii
ŞEKİL DİZİNİ.....	ix
RESİM DİZİNİ.....	x
KISALTMALAR VE SİMGELER.....	xi
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1 HCV'nin Tanımı ve Özellikleri	2
2.2 Epidemiyoloji.....	5
2.3 HCV İnfeksiyonu	7
2.3.1 Bulaş	7
2.3.2 Hücreye giriş	8
2.3.3 Protein translasyonu.....	8
2.3.4 Replikasyon.....	8
2.3.5 Bir araya gelme ve salınma.....	9
2.3.6 Klinik.....	9
2.4 Laboratuvar Tanısı.....	12
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	21
3.1 HCV Kor Antijen Testi	21
3.2 Strip İmmunblot Testler (SIT).....	22

3. 3 Kantitatif HCV RNA Testi.....	25
3. 4 HCV Genotipleme Testi.....	30
3.5 İstatiksel Analiz	34
4. BULGULAR.....	34
5. TARTIŞMA.....	37
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	48
7. KAYNAKLAR.....	52

TABLÖLAR

Tablo 2.1: HCV'nin coğrafi bölgelere göre dağılımları.....	6
Tablo 2.2: Anti-HCV testlerinin karşılaştırılması	13
Tablo2.3: Anti-HCV'yi tespit etmede kullanılan bazı ticari otomatize sistemler ve özellikleri.....	14
Tablo 2.4: HCV tanı testlerinin değerlendirilmesi	19
Tablo 2.5: Akut hepatit C'de test sonuçlarının değerlendirilmesi.....	20
Tablo 3.1: LIA test sonuçlarının değerlendirilmesi.....	24
Tablo 3.2: HCV RNA titrasyonları ve açıklamaları.....	30
Tablo 3.3 : Strip üzerinde bulunan prob bölgeleri ve karşılığı olan HCV genotipleri.....	31
Tablo 4.1: HCV RNA, SIT, HCV kor antijen, anti-HCV testi sonuçları	34
Tablo 4.2: HCV RNA viral yük düzeyi –HCV kor antijen sonuç karşılaştırması	35
Tablo 4.3: Çalışmada kullanılan testlerin yanlış pozitif, yanlış negatif sayıları ile sensitivite ve spesifite yüzdeleri	35
Tablo 4.4: Anti-HCV, SIT ve kor antijeni NPD, PPD, doğruluk değerleri	35
Tablo 4.5: Çalışmamızın genotip dağılımı sayı ve yüzdeleri.....	35
Tablo 6.1: HCV kor antijen testi çalışmaları.....	50
Tablo 6.2: Anti-HCV EIA , HCV RNA testi , SIT sonuçlarının karşılaştırılması.....	50
Tablo 6.3: Farklı çalışmalarda elde edilen genotiplerin dağılımı	51

ŞEKİLLER

Şekil 2.1. HCV genom yapısı	3
Şekil 2.2: HCV infeksiyon serolojisi.....	10
Şekil 2.3: HCV'ye maruziyetten sonra klinik progresyon	11
Şekil 2.4: HCV infeksiyonunun seyri	18
Şekil 4.1: HCV kor antijen/HCV RNA korelasyon eğrisi.....	36

RESİMLER

Resim 3.1: Test striplerinin 16 saat (overnight) inkübasyonu.....	23
Resim 3.2: Test striplerinin pozitif ve negatif kontrollerle beraber değerlendirilmesi.....	24
Resim 3.3: Stripler.....	33
Resim 3.4: Yorumlama kartı.....	33

KISALTMALAR VE SİMGELER

CDC: Center for Disease Control Prevention

FDA: Food and Drug Administration

HCV: Hepatit C Virus

IRES: Internal Ribosomal Entry Site

IU: International Unit

NAT: Nükleik Asit Testi

NPD: Negatif Prediktif Değer

PPD: Pozitif Prediktif Değer

SIT: Strip İmmunblot Test

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Hepatit C virus (HCV) *Flaviviridae* ailesindeki *Hepacivirus* cinsi içinde sınıflandırılmaktadır. HCV 30-60 nm çapında zarflı, tek iplikli pozitif polariteli RNA virusudur. Hepatit C araştırmalarında en büyük engellerden biri virusun hücre kültüründe üretilmemesi olmuştur. HCV infeksiyonları tüm dünyada giderek büyüyen önemli bir sağlık sorunudur. Ülkemizde 600 bin, dünya çapında ise 200 milyon insan bu virüs ile infektidir. HCV ile ilişkili hastalıklardan her yıl 10.000'den fazla insan ölmektedir ve transplantasyon gerektiren karaciğer yetmezliklerinin en önde gelen nedenidir. HCV ile infekte bireylerin ortalama olarak %70'inde kronik karaciğer hastalığı meydana gelmektedir.

İnfeksiyonun geçişi başlıca infekte kan ürünlerinin kullanımı ve intravenöz madde bağımlılarında infekte ürünlerle olmaktadır. Daha az oranda ise seksüel ve vertikal geçiş bildirilmiştir.

HCV infeksiyonunun akut fazı sırasında nadiren tanı konulabilmektedir. Klinik belirtiler HCV'ye maruziyetten 7-8 hafta sonra ortaya çıkmakta ve bu sırada çoğu kişide herhangi bir bulgu oluşmamaktadır. Bu da hastalığın bulaş riskini arttırmaktadır.

Günümüzde Hepatit C infeksiyonunun tanısında tarama testi olarak ucuz olması, kullanım kolaylığı, yinelenebilirliği ve otomatize olması nedeniyle enzim immun analiz (EIA) yöntemi ile HCV antikor testi yapılmaktadır. HCV antikor testi, yeni kazanılmış akut infeksiyon ile kronik, aktif infeksiyonu (viremik) ayırt etmede yetersizdir. Ayrıca; HCV infeksiyonu ve serokonversiyon arasında ki 45-68 günlük uzun pencere dönemi nedeniyle bu dönemde yalancı negatif sonuçlar beklenmektedir. Aynı zamanda testin %35 gibi öngürülen bir yalancı pozitiflik oranı da vardır.

Bu nedenle; anti HCV sonuçlarını doğrulamak amacıyla immun blot analiz yöntemleri, nükleik asit test yöntemleri ve son olarak HCV kor antijenini saptamaya yönelik EIA yöntemleri geliştirilmiştir. Yapılan çalışmalarda HCV kor antijen düzeyinin serum HCV RNA düzeyi ile korele olduğu ve HCV RNA'yı tespit eden moleküler yöntemlere bir alternatif olarak gösterilmiştir.

Bu çalışmanın amacı; HCV infeksiyonu laboratuvar tanısında son yıllarda kullanım alanı bulan Hepatit C virus kor antijen testinin HCV RNA testi ile karşılaştırılarak sensitivite ve spesifitesinin belirlenmesi, HCV RNA ile korelasyonunun varlığının araştırılmasıdır. Aynı zamanda HCV infeksiyonu tanısında kullanılan anti HCV,

HCV kor antijen, immun blot ve moleküler test sonuçları incelenerek bu testlerin maliyet-etkin kullanımına katkıda bulunmaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

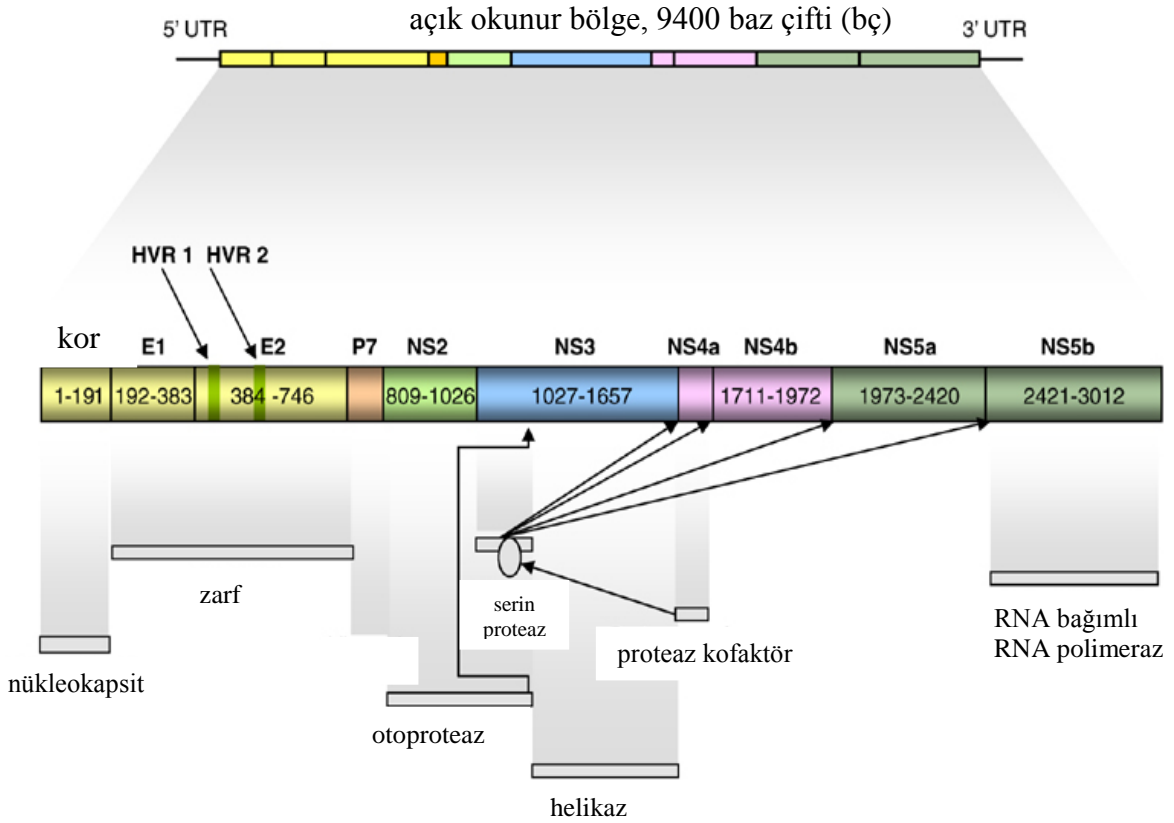
2.1 HCV'nin Tanımı ve Özellikleri

1970'li yılların sonlarında Hepatit A virüs ve Hepatit B virüs için spesifik tanı testlerinin kullanım alanına girmesiyle kan transfüzyonunun ardından gelişen hepatitlerin tamamen elimine edilmesi beklenirken durum böyle olmamıştır. Bu virüs infeksiyonunu belirleyen testlerin varlığına rağmen hepatit olguları önemli oranda devam etmiş ve bunlar non-A, non-B hepatiti (NANBH) olarak adlandırılmıştır. NANBH olgularının etkeni ilk tanımlamadan sonraki 10 yıl süresince belirlenememiştir (Murray 2007). Sonrasında, 1989 yılında Choo ve arkadaşları rekombinant cDNA tekniği kullanarak non-A, non-B hepatitli insan kanları (kontamine faktör-VIII konsantresi) ile infekte edilen şempanzelerden bir viral genom klonladılar ve buna HCV adını verdiler (Işıksal 2003).

HCV GB virüs B (Hepatit G virüs olarak da bilinir) ile birlikte Flaviviridae ailesinden Hepacivirus cinsi içinde sınıflandırılmaktadır. Sarıhumma virüsü, Batı Nil virüsü, Dank virüsü ile uzaktan, GB virüs ve pesti virüslerle yakından ilişkilidir (Murray 2007).

Hepatit C virüsü pozitif polariteli tek iplikli bir RNA virüsüdür. Genomu 9.6-kb uzunluğundadır. Genom 5' ve 3' uçlarından iyi korunmuş ve tranlasyona uğramayan dizilimlerle (UTR) çevrelenen yaklaşık 3000 amino asitlik bir poliproteini kodlayan açık okunur bölge (ORF) içerir (Şekil 2.1) (Suzuki 2012, Murray 2007).

Şekil 2.1 HCV genom yapısı (Lloyd 2007)



ORF'nin 5' ve 3' uçlarında bulunan UTR'ler virüs proteinlerinin translasyonunda ve replikasyonda görev alırlar. 5' UTR 341 nükleotid (nt) uzunluğundadır ve internal ribosomal entry site (IRES) bölgesini içerir. IRES bölgesi viral genomun ökaryotik ribozumun 40S alt ünitesine tutunduktan sonra başka bir translasyon başlatıcı sinyale gerek duymaksızın ribozom tarafından okunmasını sağlar (Ustaçelebi 2004, Suzuki 2012).

3' UTR 200 ile 235 nt uzunluğu arasında değişmekte olup RNA replikasyonu için kritik öneme sahip, kısa değişken bir bölge olan 80 nt uzunluğunda bir poly (U/UC) traktı ve iyi korunmuş değişmez 98 nt'lik X- kuyruk bölgesi içerir. 3' UTR'nin geri kalan bölgeleri replikasyonun etkinliğinin arttırmaktadır. 5' UTR ve 3' UTR'nin X kuyruk bölgesi viral genomun en iyi korunmuş bölgeleridir (Ustaçelebi 2004, Suzuki 2012).

ORF'nin kodladığı 3000 amino asitlik poliproteinden co- ve posttranslasyonel işlemler sonrasında yapısal ve yapısal olmayan 11 viral protein üretilir. Yapısal HCV proteinleri; kor (core: C), zarf 1 (envelope 1: E1), zarf 2 (E2) ve transmembran (p7) proteininden oluşur. Kor bölgesi aynı zamanda alternatif ORF proteinini ve günümüzde fonksiyonu bilinmeyen F proteinini kodlar. Yapısal ve yapısal olmayan genler arasındaki bölge virüsün üretimi için gerekli olan integral katyon membran kanal protein p7'yi kodlar. HCV altı adet yapısal olmayan proteine sahiptir. Bunlar; NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A

ve NS5B'dir. NS2, NS2-NS3 otoproteolitik ayrılmasından sorumlu serin proteazdır ve enzimatik aktivitesi için NS3 1/3 aminoterminal ucuna ihtiyaç duyar. NS3 hem serin proteaz hem RNA helikaz ve nükleozid trifosfataz (NTPaz) aktivitesi olan multifonksiyonel bir proteindir. NS4A, NS3 proteaz fonksiyonları için esansiyel bir kofaktördür. NS3'ün hücrel membranlara tutturulmasını sağlar. Günümüzde NS4B proteininin fonksiyonları hakkında çok az bilgi vardır. Fakat HCV RNA'nın replikasyonunun gerçekleştiği yer olduğu öne sürülen 'membranöz ağ' oluşumuna katkıda bulunur (Sillanpaa 2009) .

NS5 tarafından kodlanan bölüm NS3 serin proteaz aktivitesi ile NS5A ve NS5B olmak üzere iki viral protein haline gelir. NS5A çok fonksiyonlu bir serin fosfo proteindir. Fosforile ve hiper fosforile olmak üzere iki tipi vardır. NS5A'nın HCV replikasyonu ve patogenezi ile ilişkili birçok mekanizmada görevli olduğu düşünülmektedir. Bu proteinin hücrel proteinlerle etkileşime girerek konak hücrede sinyal ileti yollarının kontrolü, apoptoz baskılanması, hücre büyüme ve farklılaşmasının etkilenmesi, lipid metabolizmasının hasara uğratılması ve transkripsiyonun kontrolü ile konak hücrenin kontrolünün virüs etkisi altına girmesine aracılık eder. Aynı zamanda interferonlara karşı virüs direncinde görev alır. NS5B, HCV replikazın merkezi katalitik enzimi olan RNA bağımlı RNA polimerazı kodlar. NS5B HCV poliproteininin karboksil ucunda yer alan en son proteindir. (Sillanpaa 2009, Ustaçelebi 2004)

HCV nükleotid dizileri birbirinden farklı 6 ana genotipe ve 80'den fazla subtipi ayrılmaktadır (Murray 2007). 1991'de Choo ve ark. tüm HCV genomu belirlemişlerdir. Daha sonra Dünya'nın farklı bölgelerinden HCV izolatları elde edilmiş ve bunların genetik dizileri belirlenmiştir. Ortaya konulan HCV genetik dizilerinin karşılaştırılması belirli birkaç tipte tüm genomun birbirinden %33 kadar farklı olduğunu belirlemesini sağlamıştır. Dizi değişkenliği çok iyi korunmuş 5' UTR, kor bölgesi ve çok değişken zarf E bölgesi dışında tüm genom boyunca eşit olarak dağılmıştır. İkinci Uluslar Arası HCV ve İlişkili Virüsler Konferansı'nda gelecekteki çalışmalarda kullanılması amacıyla HCV genotip ve alt tiplerinin ortak bir terminolojisi olması için fikir birliğine varılmıştır. Bu sınıflandırmada genotipler 1'den 6'ya kadar olan rakamlar ile bunların içinde bulunan subtipler ise keşif sırasına göre harfler ile gösterilmiştir (Zein 2000).

Her bir bireydeki genetik varyantlar türümsü olarak adlandırılır. HCV'de türümsülerin oluşumu konaktaki viral replikasyon sırasında oluşan mutasyonların birikiminden meydana gelir (Zein 2000). Önemli olarak bu viral çeşitlilik viral gücü, hücre tropizmini, immün sistemden kaçışı ve antiviral ilaç direnci etkiler (Blackard 2012).

2.2 Epidemiyoloji

Dünya genelinde yaklaşık olarak 200 milyon HCV ile infekte birey bulunmaktadır. Gelişmiş ülkelerde etkili önlemlerin alınmasıyla hastalığın prevalansı düşmektedir. Buna rağmen gelişmekte olan ülkelerde bu oran hala yüksektir. Bununla beraber HCV hem gelişmiş hem de gelişmekte olan ülkelerde karaciğer hastalıklarının en önemli nedeni olarak kabul edilmektedir. HCV akut hepatit olgularının %20'sinden, kronik hepatit olgularının %70'inden, siroz olgularının %40'undan, hepatoselüler karsinomaların %60'undan, Avrupa'da karaciğer transplantasyonu yapılan infeksiyon hastalıklarının %30'undan sorumludur (Alavian 2012).

Ülkemizde de 600 bin kişinin HCV ile infekte olduğu tahmin edilmektedir. HCV prevalansı dünyada %0,5- 2 arasında değişmektedir. Türkiye'de ki durum ise raporlara göre farklılık göstermekle beraber kan donörlerinde %0,3–0,5, sağlık personelinde ise %1,6 olarak bildirilmektedir (İnci 2009).

Hastanemizde 1993–2003 yılları arasında kan donörlerinde yapılan çalışmada (Özdemir 2005) anti-HCV pozitiflik yüzdeleri yıllara göre 1997'de %0,24; 1998–99 döneminde %0,25; 2000'de %0,23; 2001'de %0,10; 2002'de %0,20ve 2003 yılının ilk altı ayında %0,15 bulunmuştur.

HCV infeksiyonundan korunma ve alınması gereken önlemlerde epidemiyolojik çalışmalar önemli rol oynar. HCV genotipleri ve subtipleri; epidemiyolojik problemler, aşı çalışmaları ve kronik HCV infeksiyonunun yönetimi ile ilgili olduğu için klinik açıdan çok önemlidir (Yan 2012).

HCV genotipleri farklı coğrafik dağılım göstermektedirler (Gökahmetoğlu 2011, Barut 2009).

Tablo 2.1: HCV'nin coğrafi bölgelere göre dağılımları

Bölge	Genotip
Kuzey Amerika ve Avrupa	1a, 2a-2b
Japonya	1b, 2a-2b
Güney ve Doğu Avrupa	1b
Güney Doğu Asya	3
Orta Doğu, Mısır ve Orta Amerika	4
Güney Afrika	5
Hong Kong ve Vietnam	6
Türkiye	1b

HCV genotip 1b'de hem interferon tedavisine yanıt daha düşük oranda meydana gelmekte hem de hepatosellüler karsinoma gelişimi açısından daha fazla risk taşımaktadır (Gökahmetoğlu 2011).

HCV prevalansı ülkenin gelişmişlik derecesine bağlı olarak coğrafik dağılımında büyük farklılıklar gösterir. Afrika ve Asya'da yüksek prevalansda bulunurken buna karşılık Kuzey Amerika, kuzey ve batı Avrupa ve Avustralya gibi sanayileşmiş ülkelerde bu oran düşüktür. Dünya Sağlık Örgütü'ne göre Brezilya'da görülme sıklığı %2,5–4,9 arasındadır (Paraboni 2012).

Kore'de 40 yaşından büyüklerde anti-HCV antikor prevalansı %1,29'dur. Kan donörleriyle yapılan çalışmada ise anti-HCV pozitiflik oranı %0,1 olarak bulunmuştur. Genotip olarak ise Kore'li hastalarda HCV genotip 1 ve 2 (subtip 1b ve 2a) en yaygın olanlardır (Oh 2012).

ABD'de HCV prevalansı %1,6'dır. Bu oran toplam 4,1 milyon kişinin anti-HCV pozitif olduğunu göstermektedir. Bunlarında yaklaşık olarak %80'i viremiktir. ABD'de karaciğer hastalıkları ile ilgili ölümlerin ve karaciğer transplantasyonunun en başta gelen sebebidir (Ghany 2009).

Almanyada anti-HCV pozitiflik oranı %0,4 ile %0,6 arasında değişmektedir. Bu hastaların %70-%80'inde kronik hepatit C gelişir. Almanya da 400 000–500 000 kronik hepatit C'li olgu olduğu tahmin edilmektedir (Hofmann 2012). Suudi Arabistan'da 15 323 kişi ile yapılan bir çalışmada ise Abdel-Moneim ve arkadaşları (2012) anti-HCV pozitiflik

oranını %7,3 olarak tespit etmiştir. Şanlıurfa ilinde Aslan ve ark'nın (2001) sağlıklı popülasyonda yaptıkları anti-HCV antikör taramasında pozitiflik oranı %2,6 bulunmuştur. Kölgeliler ve ark. (2003) Erzurumda benzer bir çalışmada popülasyonun %1,2'sinde anti-HCV seropozitifliği saptanmıştır.

Türkiye'de kan donörleri arasında yapılan farklı çalışmalarda anti-HCV seropozitifliği %0,07- % 0,44 arasında tespit edilmiştir. (Öztürk 2001, Güzelant 2008, Acar 2010, Bulut 2012, Kaya 2009).

Kayseri'de sağlık personelinde yapılan bir çalışmada anti-HCV pozitiflik oranı %0,9 belirlenmiştir (İnci 2009). Sönmez ve arkadaşları (1996) Malatyada tıp fakültesi sağlık personelinde yaptıkları taramada anti-HCV pozitiflik oranını %0,5 olarak tespit etmişlerdir.

İzmir'de preoperatif dönemde olan 32 614 hastanın kan örneği incelenmiş. Anti-HCV testinde seropozitiflik %1,93 olarak belirlenmiştir (Yurtsever 2009).

Sağlıklı popülasyonda HCV infeksiyonunu seroprevalansı %2,2 civarında olup, hemodiyaliz tedavisi alan hastalarda bu oran %4–70 arasında ülkeler arası farklılık göstermektedir (Kurtoğlu 2006). Türkiye'de hemodiyaliz hastalarında yapılan çalışmalarda anti-HCV pozitifliği %19-%52 arasında bulunmuştur (Kurtoğlu 2006, Balat 1998, Tekerekoğlu 2001). Bu yüksek oranlar hemodiyaliz ünitelerinin yüksek risk taşıyan birimler olduğunu göstermektedir.

2. 3 HCV İnfeksiyonu

2. 3. 1 Bulaş

HCV'nin bulaşında en etkin yol tekrarlayan biçimde veya büyük miktarlarda HCV infekte kanla maruziyettir. Kan transfüzyonu ve organ transplantasyonu bu bulaşın başlıca yollarıdır. Bulaşta daha az riski olanlar ise kaza ile iğne batması gibi küçük miktarlarda perkütan maruziyet ya da kan veya serum gibi diğer vücut sıvıları ile mukozal temastır. İnfekte bir anneden doğum ve infekte partner ile cinsel ilişki bu şekilde bulaşa örnektir (Alter 2007).

Faktör konsantrelerini çok sık alan hemofili hastaları ve İV ilaç bağımlılarında diğer çalışma gruplardan daha yüksek oranda anti-HCV pozitifliği belirlenmiştir. Günümüzde tarama testleri ile infekte donörlerin dışlanması sayesinde transfüzyon ile HCV bulaşı azalmıştır. Şu anda transfüzyon ilişkili HCV infeksiyonu, transfüzyonu yapılan her bir ünite başına %0,1- %0,001 arası değiştiği hesaplanmaktadır. Pıhtılaşma

faktörü konsantrelerinin viral inaktivasyonu hemen hemen HCV infeksiyonu kaynağı olarak bu kan ürünlerinin riskini ortadan kaldırmıştır (Alter 1997).

Bunlara ek olarak çevrenin virüs için bir rezervuar olabildiğini gösteren kanıtlar da vardır. Kontamine iğne ve şırıngalar, çok kullanımlık ilaç şişeleri, infüzyon torbaları, injeksiyon ilaçlarda kullanılan malzemeler HCV'yi bulaştırabilir (Alter 2007).

2. 3. 2 Hücreye giriş

HCV'nin konak hücreye giriş mekanizması tam net olmamakla beraber reseptör bağımlı endositoz veya benzeri bir yolla olduğu tahmin edilmektedir. Reseptörün ligandı olarak HCV'nin E2 glikoproteininin görev aldığı düşünülmektedir (Ustaçelebi 2004).

İnsan CD 81 reseptörleri HCV E2 proteininin doğrudan bağlanabildiği virüsün hücre içine girişi için gerekli olan reseptörlerdir. CD 81 reseptörleri hepatositler, B-lenfositleri, T lenfositleri ve doğal öldürücü hücreler gibi çeşitli hücre tipleri üzerinde geniş bir dağılım alanı bulunan farklı moleküler komplekslerin katıldığı hücre yüzey proteinidir. HCV'nin CD 81 reseptörünü kullanarak sadece hepatosit invazyonu değil aynı zamanda konağın immun yanıtını modüle ettiği ileri sürülmüştür (Forghieri 2012).

HCV temel olarak karaciğerde hastalığı neden olan hepatotropik bir virüstür. Fakat HCV sadece hepatositlerde değil aynı zamanda B hücreleri, T hücreleri, monositler, dendritik hücreler ve periferik kan mononükleer hücrelerinde de replike olur. HCV suşlarında lenfosit tropizminin varlığı B ve T hücrelerinin HCV'nin rezervuarı olarak görev yaptığını düşündürmektedir (Carcamo 2012).

2. 3. 3 Protein translasyonu

HCV genomunun 5' ucunda kep bulunmamaktadır. Bu nedenle translasyona kep bağımlı mekanizma olan AUG kodonu aracılık etmez. Bunun yerine bu işlem 5' UTR bölgesinde bulunan IRES bölgesi ile olur. Ribozom 40S alt ünitesi IRES bölgesine bağlanır ve translasyon için herhangi ek bir translasyon faktörüne ihtiyaç duymaz. IRES aracılığı ile granüllü endoplazmik retikulumda protein translasyonu olur. Daha sonra viral proteinazlar ve konak hücre sinyalleri ile ko- ve posttransyasyonel modifikasyonlar meydana gelir (Bartenschlager 2000).

2. 3. 4 Replikasyon

HCV replikasyonunun temel mekanizmaları virüsün doku kültürlerinin olmaması nedeniyle çok net değildir. En son subgenomik gelişmeler ve HCV replikasyonunun ve

HCV proteinlerinin sentezinin gerçekleştiği tüm HCV genomunun insan hepatoma hücre deriveleri olan Huh-7 hücrelerine stabil şekilde transfer edilmesi antiviral ilaçların etkinliğinin ve HCV replikasyonu sırasında meydana gelen hücresel olayların araştırılmasını kolaylaştırmıştır (Kapadia 2003).

Replikasyonda NS5A ve NS5B gibi viral proteinlerle etkileşen çok sayıda hücresel faktör vardır. NS5A ile etkileşen FKBP8, VAP, FBL2, SRCAP, karyoferin b3, Raf-kinaz ve NS5B ile etkileşen siklofilin B, p68, nükleolin ve hnRNP A1 bunlardandır. HCV'nin lipit metabolizması ile ilgisi vardır. ER'da oluşan VLDL ekzositozla hücre dışına salınmaktadır. HCV'nde VLDL bağlanarak ya da VLDL'nin yapısına katılarak hücre dışına çıktığı düşünülmektedir. HCV'nin lipit metabolizması ile bir diğer ilişkisi de mevolanat yolağı ile ilişkilidir. Mevolanat yolağı asetil KoA'dan kolesterol sentezi ve proteinlerin geranilasyonunda görev alır. Lovastatin gibi ilaçlarla kolesterol sentezinde görev alan HMG-KoA redüktaz inhibe edildiğinde HCV replikasyonunda inhibe olduğu tespit edilmiştir (Ustaçelebi 2004, Ye 2003).

2. 3. 5 Bir araya gelme ve salınma

Nükleokapsit oluşumu kapsit proteinin oligomerizasyonu ve RNA'nın enkapsidasyonu ile gerçekleşir (Ustaçelebi 2004). Viral nükleokapsit ER membranından tomurcuklanma ile çıkarken zarf edinir. Virüs sekretuar yollar aracılığı ile hücre dışına salınır (Bartenschlager 2000).

2. 3. 6 Klinik

HCV enfeksiyonu hastalığın akut fazı sırasında herhangi bir belirti vermez. Bu nedenle hastalığa bu dönemde nadiren tanı konur. Akut enfeksiyonda hastalığın klinik belirtileri etkene maruziyetten yaklaşık 7–8 hafta sonra ortaya çıkabilir, fakat çoğu hastada semptomlar yoktur veya hafiftir. Hastalığın genel belirtileri sarılık, kırıklık ve mide bulantısıdır (Jonas 2005).

Prospektif çalışmalarda hastaların %60-90'ında ALT anormallikleri gözlenirken, taşıyıcı durumda olan %10–40 hasta grubunda ise ALT seviyelerinin normal seviyelerde olduğu gösterilmiştir (Morales 2000).

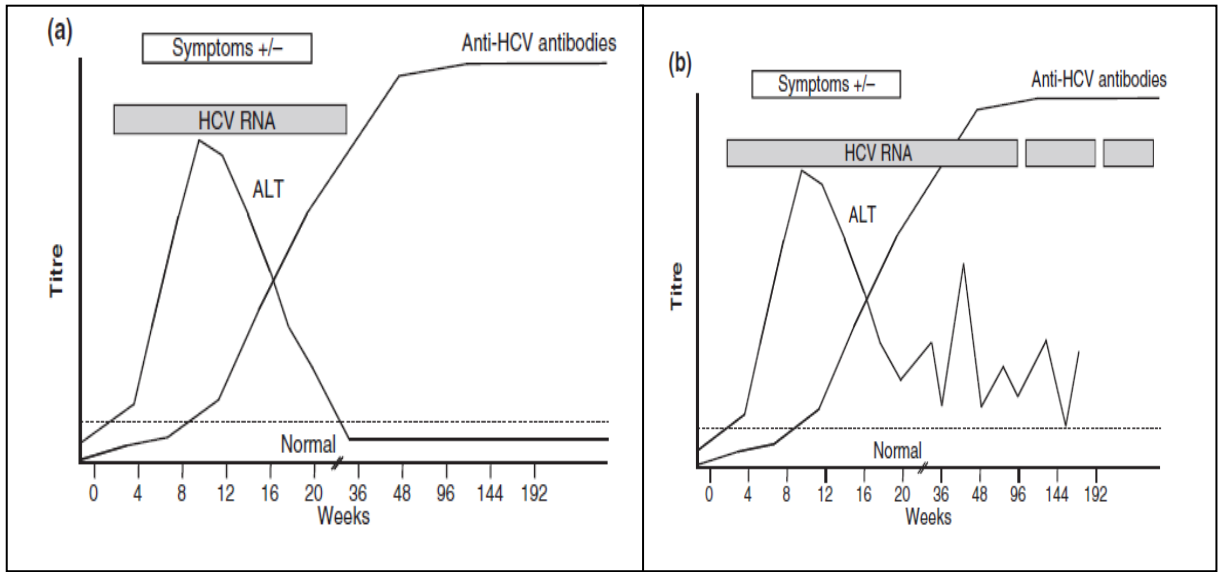
HCV karaciğer hastalıklarının en önemli nedenidir. Kronik hepatit ve fibrozis ve bunun sonucunda siroz ve HCC'ya neden olan karaciğer hasarlanmasına neden olur. Hastalığın son dönem karaciğer hastalığına doğru olan bir progresyonu vardır. Bu progresyonda hastalığı pozitif yönde etkileyen çeşitli faktörler bulunmaktadır. Bunlar; cinsiyet (progresyon erkeklerde daha kötüdür), enfeksiyona yakalanma yaşı, aşırı alkol

tüketimi, obezite ve HCV'nin HBV ve HIV ile olan ko-infeksiyonu. Bazı retrospektif çalışmalar da kronik HCV infeksiyonu ile karaciğerde var olan steatozis arasında ilişki olduğu bildirmiştir (Depla 2012).

HCV genelde kronik infeksiyon ile sonuçlanır ve kronik infeksiyonu olan hastaların %30'unda kronik karaciğer hastalığı gelişir (Abdel-Moneim 2012). Kronik infeksiyonda HCV ile kronik infekte olan hastalarda 5 yılda HCC gelişme riski %5'dir (Murray 2010).

Akut HCV infeksiyonu ve kronik HCV infeksiyonunun serolojisi şekilde gösterilmiştir (Chevaliez 2011).

Şekil 2. 2: HCV infeksiyon serolojisi

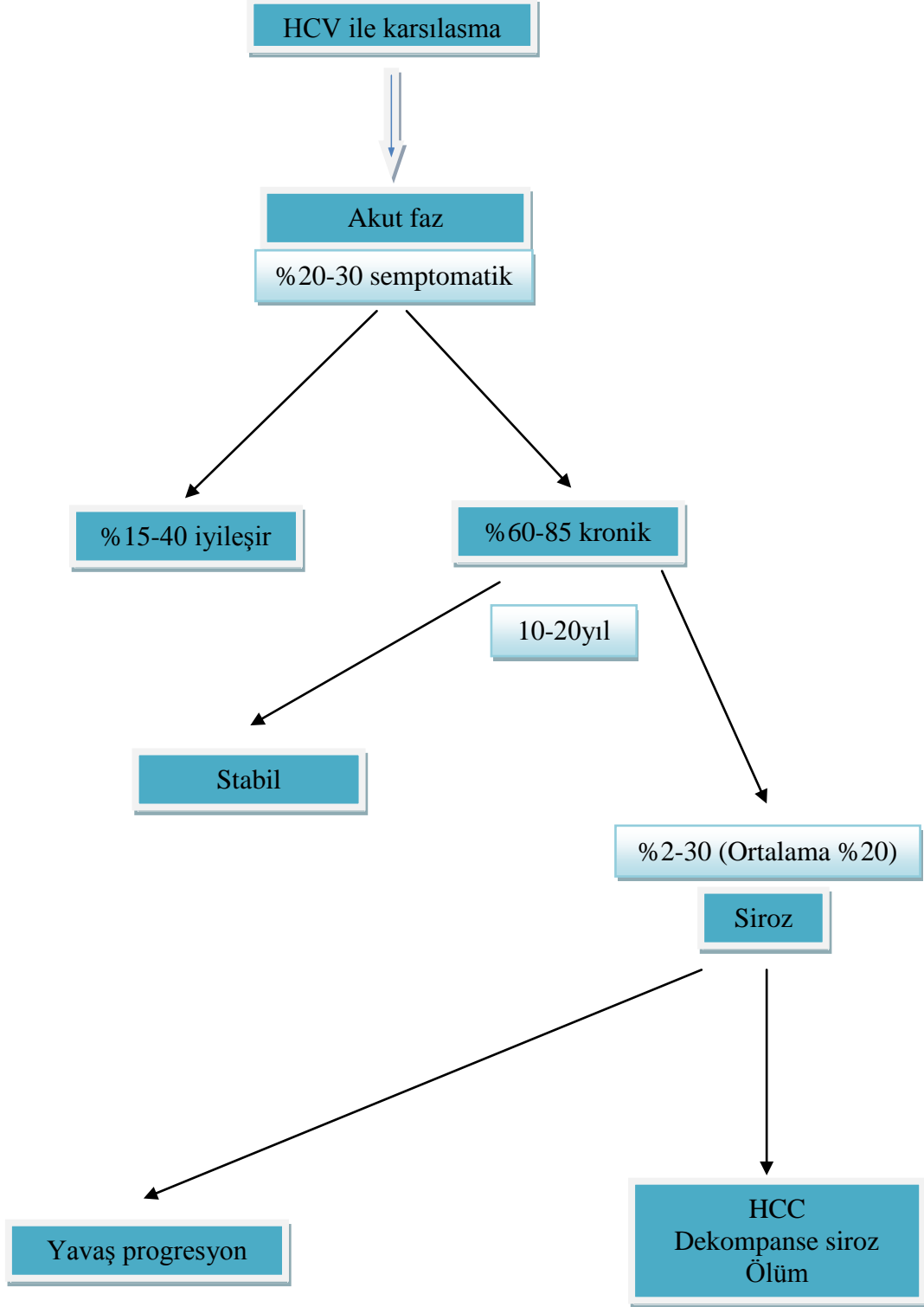


a) Akut HCV infeksiyonu serolojisi

b) Kronik HCV infeksiyonu serolojisi

HCV'ye maruziyetten sonra klinik progresyon şekilde gösterilmiştir (Holland 2010).

Şekil 2. 3: HCV'ye maruziyetten sonra klinik progresyon (Holland 2010)



2. 4 Laboratuvar Tanı

HCV tanısında kullanılan yöntemler;

- a) HCV enfeksiyonunun tanısında kullanılan testler;
 - Anti-HCV testleri
 - Strip immunblot testler
 - HCV kor antijen testi
 - HCV RNA testleri
- b) Kullanım amacına göre;
 - Tarama testleri (EIA (Enzim immün test) tabanlı Anti-HCV testleri)
 - Tamamlayıcı (supplemental) testler (Strip immunblot testler)
 - Konfirmasyon testleri (HCV RNA)
- c) İdentifikasyon metoduna göre;
 - İndirek testler (Anti-HCV ve Strip immunblot testler)
 - Direk testler (HCV RNA, HCV kor antijen, HCV genotipleme testleri ve HCV genomu sekanslama testleri) (Kesli 2012) .

a) Anti-HCV Testi

Kemilüminesan İmmün Test (Chemiluminescence immunoassay, CIA) ve EIA, HCV enfeksiyonunda tarama testi olarak kullanılmaktadır (Murray 2007). Bu yöntemlerle tespit edilen Anti-HCV antikörleri IgG tipindedir (Sandra 2002).

EIA testinde örnek sinyalinin eşik değere oranlanmasıyla elde edilen anti-HCV'nin birimi S/Co (sample OD/internal control OD) olarak verilir. Bu testte, örnekler bir standart ile karşılaştırılır ve laboratuvar kullanımına uygun bir optik dansite değeri oluşturulur. S/Co, örnek absorbanasının önceden belirlenmiş eşik absorbanasına kıyaslanması olup pozitif okumaların negatiflerden ayırt edilmesini sağlar. $S/Co \geq 1$ ise sonuç pozitif, oran 1'in altında ise negatif olarak bildirilir (Murray 2007).

Günümüze kadar üç farklı jenerasyon Anti-HCV antikör testi üretilmiştir. **Birinci jenerasyon HCV EIA'ler** NS4 proteininin epitopu olan c100-3'ü kullanır. Bu testlerin sensitivite oranları yüksek prevalanslı olan gruplar için düşüktür. Düşük prevalanslı gruplarda ise yanlış pozitiflik oranı %70 gibi oldukça yüksektir (Sandra 2002). **İkinci jenerasyon HCV EIA'ler** de ise NS3 (c33c) bölgesi, kor (c22-3)bölgesi (yapısal) ve NS4 proteininin 5-1-1 olarak adlandırılan c100-3 epitopunun bir bölümü kullanıldı (Kesli 2011, Sandra 2002). Bu test FDA (Food and Drug Administration) tarafından 1992'de onaylandı. İkinci jenerasyon kitler birinci jenerasyona göre akut HCV enfeksiyonunda

%20, kronik HCV infeksiyonunda ise %10 daha fazla sayıda hasta saptayabilmektedir. Aynı zamanda hastada oluşan HCV antikorları birinci jenerasyon kitlere göre 30 ile 90 gün daha önceden tespit edebilmekte ve EIA 1.0'larda 16 hafta olan pencere dönemini 10 haftaya düşürmüştür. EIA 2.0'ın yüksek prevelanslı gruplarda sensitivitesi ise %95'tir. 1996'da üçüncü jenerasyon EIA'lar FDA tarafından onay almıştır. **Üçüncü jenerasyon kitlerde** ek olarak NS5 proteini bulunmaktadır. Bu grup testler HCV antikorlarını EIA 2.0'a göre yaklaşık 26 gün daha erken tespit edebilmektedir. Yüksek prevelanslı gruplarda sensitivitesi biraz daha yüksektir (%97) (Sandra 2002, Alter 1995). Bu üç farklı jenerasyon kitin sensitivite ve pozitif prediktif değerleri tabloda verilmiştir (Tablo 2.2) (Gretch 1997).

Tablo 2.2: Anti-HCV testlerinin karşılaştırılması

Test	Sensitivite* (%)	Pozitif prediktif değer ** (%)	
		Düşük prevelanslı grup	Yüksek prevelanslı grup
1. Jenerasyon EIA	70–80	30–50	70–85
2. Jenerasyon EIA	92–95	50–61	88–95
3. Jenerasyon EIA	97	25	-

* Klinik bulgular ve HCV RNA tespitine dayanılarak

**RIBA ile karşılaştırma

Günümüz EIA'lar ile HCV spesifik antikorlarının tespit edilebilirliği ve pencere dönemi hastadan hastaya değişebilmektedir. Serokonversiyon hastalığın başlangıcından ortalama 7–8 hafta sonra oluşmaktadır. Anti-HCV, hastaların %50-70'inde hastalığın başlangıcında, geri kalan kısmında ise daha sonra tespit edilebilir. Antikorlar hemodiyaliz hastalarında ve yüksek düzey immunsupresyonu olan hastalarda, tespit edilemeyerek yanlış negatif sonuçlara neden olabilmektedir (Pawlotsky 2002).

Anti-HCV'yi tespit etmede kullanılan bazı ticari otomatize sistemler verilmiştir (Tablo 2.3).

Tablo 2.3: Anti-HCV'yi tespit etmede kullanılan bazı ticari otomatize sistemler ve özellikleri (Pawlotsky 2002)

Test	Üretici Firma	Teknik	Antijenler	FDA onayı (2002 Haziran itibariyle)
Ortho HCV 3.0 ELISA Test Sistemi	Ortho-Clinical Diagnostics, Raritan, NJ	EIA, mikrolept	Kor, NS3, NS4, NS5	Onaylı
Vitros anti-VHC	Ortho-Clinical Diagnostics, Raritan, NJ	EIA, otomatize Vitros ECI cihazı ile	Kor, NS3, NS4, NS5	Onaylı
Abbott HCV EIA 2.0	Abbott Diagnostic, Chicago, IL	Kemilüminesan İmmun Test	Kor, NS3, NS4	Onaylı
Abbott HCV EIA 3.0	Abbott Diagnostic, Chicago, IL	Kemilüminesan İmmun Test	Kor, NS3, NS4, NS5	Onaylı değil
IMx HCV 3.0	Abbott Diagnostic, Chicago, IL	EIA, otomatize IMx cihazı ile	Kor, NS3, NS4, NS5	Onaylı değil
AxSYM HCV 3.0	Abbott Diagnostic, Chicago, IL	EIA, otomatize AxSYM cihazı ile	Kor, NS3, NS4, NS5	Onaylı değil
Monolisa anti-HCV Plus version 2	Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France	EIA, mikrolept	Kor, NS3, NS4	Onaylı değil
Access HCV Ab Plus	Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France	EIA, otomatize Access cihazı ile	Kor, NS3, NS4	Onaylı değil
Innotest HCV Ab IV	Innogenetics, Ghent, Belgium	EIA, mikrolept	Kor, NS3, NS4, NS5	Onaylı değil

b) Strip immunblot testler

İmmunblot testler spesifik antikörleri tespit eder. Bu testlerde HCV viral antijenleri ile kaplı nitroselülöz striplerler kullanılır. Pozitif reaksiyon strip üzerinde belirli alanlarda renkli bantların görülmesi ile karakterizedir. Sonucun değerlendirilmesi otomatize sistemle veya gözle olabilir (Pawlotsky 2002).

Tamamlayıcı (supplemental) test olarak kullanılır. Günümüzde iki farklı Strip immunblot test (SIT) kullanılır. Bunlar, RIBA (recombinant immunblot assay) HCV 3.0 (Chiron Corporation, Emeryville, CA, USA) ve INNO LIA™ HCV Score (Innogenetics N. V. Ghent, Belgium) (Kesli 2011 a).

RIBA HCV 3.0 SIA rekombinant antijenler ve sentetik peptidler içerir. Rekombinant antijenler c33c ve NS5, sentetik peptidler ise 5-1-1, c100 ve c22'dir (Keşli 2011 a). INNO-LIA HCV Ab III ise kor antijenleri (C1 ve C2), E2/NS1-, NS3-, NS4- ve NS5 olmak altı antijen içermektedir (Dussaix 1994).

c) HCV kor antijen testi

HCV kor antijeni, moleküler ağırlığı 21 kDa olan 191 amino aside sahip bir proteindir. HCV poliproteinin translasyonu sırasında yeni oluşan polipeptid ilk olarak konak endoplazmik retikulum membranına yönelir. Konak sinyal peptidazları tarafından kesilen poliproteinden C terminal ucunda E 1 sinyal sekansını içeren immatür kor protein şekli oluşur. Bu sinyal peptidi konak sinyal peptidazı tarafından daha ileri işlemlere tabi tutulur ve matür kor proteini oluşur. Kor proteinin çoğu sitoplazmadadır. Bunlar sitoplazmada endoplazmik retikuluma bağlı veya lipid damlacıkları yüzeyinde lokalizedir. Aynı zamanda kor proteinin az bir kısmı infekte hücrelerin nükleusunda da bulunabilir (Seme 2005).

HCV kor antijeni HCV RNA'nın serumda ortaya çıkışından yaklaşık 1–2 gün sonra ve anti HCV antikorlarının oluşumundan daha önce tespit edilebilir. Bunun sonucu olarak da HCV kor antijen testleri HCV enfeksiyonunu HCV antikor tarama testlerinden daha erken, 38–50 gün içinde saptayabilmektedir. Pencere dönemi ise ortalama 23,9 gündür. Pencere dönemi antikor testinde ise 7–8 haftaya uzayabilmektedir (Hosseini-Moghaddam 2012).

HCV ile infekte bireylerin kanında HCV kor antijeni tespit edilebilmektedir. Farklı kor antijen testleri ile yapılan çalışmalar da HCV kor antijen düzeyinin HCV RNA düzeyi ile anlamlı derecede ilişkili olduğu gösterilmiştir. HCV kor antijen testi HCV RNA'nın moleküler teknikler ile ölçümüne bir alternatif olarak gösterilmektedir. Bunun nedeni; moleküler tekniklere göre çapraz reaksiyon riskinin daha az olması, ucuz, testin ölçüm şekli ve kolay uygulanabilir olmasıdır (Chevaliez 2011).

İlk olarak 10 yıl önce kullanılmaya başlanan HCV kor antijen testinin yapılan çalışmalar sonucunda HCV RNA ile korele, kolay uygulanabilir, ucuz ve daha kısa sürede sonuç verebilen bir test olduğu tespit edilmiştir. **1. jenerasyon** kor antijen testleri kor antijen-monoklonal antikor reaksiyonunu engellememesi için serumda kor antijene karşı oluşan antikorların eliminasyonu amacıyla bir santrifüj basamağı bulundurmaktaydı. Daha ileri çalışmalarda testin sensitivitesi arttırmak amacıyla serumda oluşan HCV kor antijen-antikor kompleksini ayırmak için deterjanlar kullanılmıştır. **2. jenerasyon testlerde** ise 1. jenerasyon testlerde kullanılan 2 antikora ek olarak kor antijene karşı oluşan dört yeni antikor bulunmuş ve bunlar yeni nesil testlerde kullanılmıştır (Hosseini-Moghaddam 2012). İlk versiyon testlerde testlerde 1,5 pg / ml olan ve yaklaşık 10.000–50.000 IU / ml (International Unit/ml) HCV-RNA düzeyine karşılık gelen alt saptama sınırı rutin klinik kullanım için uygun değildir. Yakın zamanda önceki HCV kor antijen testleri ile

karşılaştırıldığında sensitivitesi yüksek bir kor antijen testi kullanım alanı bulmuştur (Abbott Laboratories, Diagnostics Division, Abbot Park, IL, USA). Bu test ile saptama sınırı yaklaşık 100 kat artarak 0,06 pg / ml ((3 fmol / l)) olmuş ve işlem süresi 3,5 saatten 40 dakikaya indirilmiştir. Aynı zaman da genotipten bağımsız olarak HCV RNA düzeyi ile iyi korelasyon göstermektedir (Vermehren 2012). Çalışmamızda da kor antijeni ölçümü için bu test kullanılmıştır.

Architect HCV antijen testi (Abbott Laboratories, Diagnostics Division, Abbott Park, IL, USA) sensitif, spesifik, güvenilir, uygulaması kolay, tekrarlanabilir ve maliyet etkin bir testtir. Tarama testi olan anti-HCV antikortesti için pre-konfirmasyon testi olarak uygulanabilir. Bu test Architect® i2000SR CIA sistemi (Abbott Laboratories, Diagnostics Division, Abbott Park, IL, USA) ile otomatize olarak çalışılmaktadır. Architect HCV antijen testi insan serum veya plazmasında iki basamaklı kemüliminesan mikropartikül immun deney yöntemi ile HCV kor antijen kantitasyonu yapmaktadır. 110 µl örnek ile çalışmakta ve işlem 36–40 dakika sürmektedir. Cutt-off değeri 3.00 fmol/litre (0.06 pg/mL)'dir. Bu değer altındakiler (<3.00 fmol/l) non reaktif, üzerindeki değerler (≥3.00 fmol/l) reaktif kabul edilir. ≥3.00 fmol/l ve <10.00 fmol/l arasında ki değerler tekrarlanmalıdır. Her iki testte nonreaktif çıkan örnekler HCV kor antijeni açısından nonreaktif, tekrarlanan testlerden bir veya ikisi ≥3.00 fmol/l ise test reaktif kabul edilir (Kesli 2011 a).

d) Moleküler Yöntemler (HCV RNA ve HCV Genotipleme)

Üçüncü jenerasyon HCV antikor testleri önceki HCV antikor testlerinden daha spesifik ve sensitif olmasına rağmen hala yanlış pozitiflik oranları yüksektir. Bu nedenle yanlış pozitif sonuçları elemek için HCV RNA testleri ile konfirmasyona ihtiyaç vardır. Bu özellikle anti-HCV'nin düşük titreli pozitif sonuçlarında önemlidir. CDC (Centes for Disease Control and Prevention) yanlış pozitif HCV sonuçlarını en düşük seviyeye çekmek için HCV RNA veya SIT ile konfirmasyonunu tavsiye etmektedir (Kesli 2012).

HCV RNA, enfeksiyonun en erken göstergesi ve viral replikasyonun direk bir belirtecidir. HCV RNA enfeksiyondan 1–2 hafta sonra, anti-HCV antikorları ortaya çıkmadan ve karaciğer enzimlerinde herhangi bir değişiklik olmadan tespit edilebilir (Kesli 2011 a)

HCV RNA hastalık spontan olarak iyileşmeden önce genellikle pik bir değere ulaşır. Fakat kronik hastalığa ilerleyenlerin çoğunda HCV RNA artışı kademeli olarak azalır ve sonra stabil hale gelir. Kronik hastalarda düzeyi stabildir. HCV RNA karaciğer

hastalığının şiddetinden etkilenmez. Fakat son dönem karaciğer hastalarında düşük düzeyde olabilir veya tespit edilemeyebilir (Pawlotsky 2002).

HCV RNA analiz sistemleri kalitatif ve kantitatif olarak iki gruba ayrılabilir.

a) Kalitatif HCV RNA Testleri:

Kalitatif testler pozitif/negatif, tespit edildi/edilemedi şeklinde sonuç veren testlerdir. Bunlar pozitif olan EIA testlerinin konfirmasyonu için ve antiviral tedavinin sonucunu izlemek için kullanılır. Kalitatif testler ilk kullanılan kantitatif testlerden sensitivitesi daha yüksektir ve saptama sınırı 5–10 IU/ml'dir. Bu yüksek sensitivite özellikle tedaviye yanıtın belirlenmesi için çok önemlidir. Çünkü küçük miktarda virüs varlığı bile viral replikasyonu göstermektedir (Holland 2010).

Bu testte RNA ekstraksiyonu sonrası, hedef bölgenin ya TMA (transkripsiyon aracılı amplifikasyon) ya da PCR (polimeraz zincir reaksiyonu) ile amplifikasyonu yapılır. Günümüzde HCV RNA'yı kalitatif olarak tespit etmek için iki ticari kit kullanılmaktadır. Bunlardan biri PCR temelli olan ve saptama sınırı 50 IU / ml olan Cobas Amplicor HCV 2.0 (Roche Molecular Systems, USA)'dir. Diğeri ise saptama sınırı 5- 50 IU / ml olan bir TMA testi Versant™ HCV RNA Qualitative Assay (Siemens Healthcare Diagnostics, Germany)'dir. Her iki testinde spesifitesi %100'e yakındır (Forns 2006, Keşli 2012).

b) Kantitatif HCV RNA Testleri:

Kantitatif ölçümlerin kullanım amacı başlangıçta veya tedavi öncesi sirkülasyonda olan virüs miktarını belirlemektir ve tedavi sırasında virüs miktarındaki değişiklikleri izlemektir. Bu nedenle kantitatif testlerde her ml başına virüs miktarı verildiği için viral yük testleri olarak da adlandırılır. İlk versiyon testlerin sensitivitesi kalitatif HCV RNA testleri kadar olmamışken son geliştirilen yeni kantitatif testler daha yüksek sensitivite göstermektedir (Holland 2010) .

FDA onaylı testler; Cobas Amplicor™ HCV Monitor (Roche Diagnostics), Siemens Molecular Diagnostic' için ürünü olan VERSANT HCV RNA 3.0 Assay (HCV RNA tespiti için dallı DNA(bDNA) teknolojisini kullanmaktadır) ve COBAS AmpliPrep / COBAS TaqMan HCV Test (Roche Diagnostics)'dir. Bu tam otomatize real-time PCR (qRT-PCR) testidir (Holland 2010, Kesli 2011 a).

HCV RNA düzeyi ile serum ALT düzeyi arasında korelasyon yoktur. HCV RNA ile karaciğer histolojisi arasındaki korelasyon ise tam net değildir. Bazı çalışmalarda korelasyon gösterilemezken, düşük düzeyde HCV RNA'ya sahip olan hastalarda daha ileri

düzeyde karaciğer hastalığının olduğu veya bunun tam tersinin gösterdiği çalışmalar vardır. Karaciğer hastalığının farklı evrelerinde olan hastalar arasında serum HCV RNA düzeylerinde örtüşme olmadığından, serum HCV RNA düzeyleri ölçülmesi karaciğer hastalığının ciddiyetinin tahmininde yardımcı olmaz (Lok 1997).

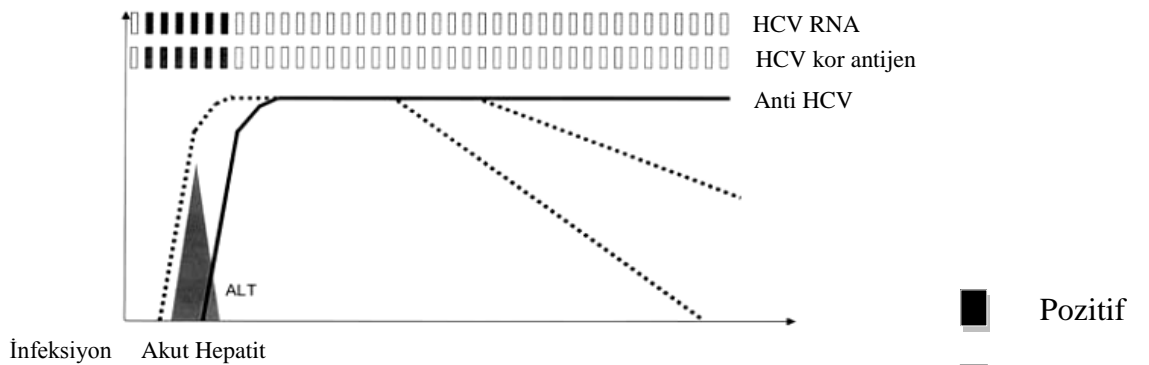
Bazı durumlarda anti-HCV pozitif iken HCV RNA saptanamayabilir. Benzer sonuçlar başka bir nedenli karaciğer hastalığı olanlarda veya iyileşmiş Hepatit C hastalarında görülebilir. Yine de bu sonuçlarda HCV RNA testi birkaç hafta sonra tekrarlanmalıdır. Çünkü HCV RNA testi vireminin olmadığı döneme rast gelebilir. Kronik replikasyon başlamadan önce HCV RNA geçici olarak kaybolmuş olabilir (Pawlotsky 2002, Chevaliez 2007). HCV RNA testlerinin diğer dezavantajları ise pahalı, zaman alıcı, kontaminasyon nedeniyle yanlış pozitif sonuçlar verebilen, yoğun emek isteyen, teknik beceriler isteyen testlerdir (Krajden 2004, Morota 2009).

Sonuç olarak tüm olumlu ve olumsuz yönleriyle beraber kalitatif ve kantitatif HCV RNA testleri anti-HCV EIA, HCV kor antijen ve SIT'lerin hepsinin confirmasyonunda kullanılacak olan tek testtir (Kesli 2012, Hosseini-Moghaddam 2012).

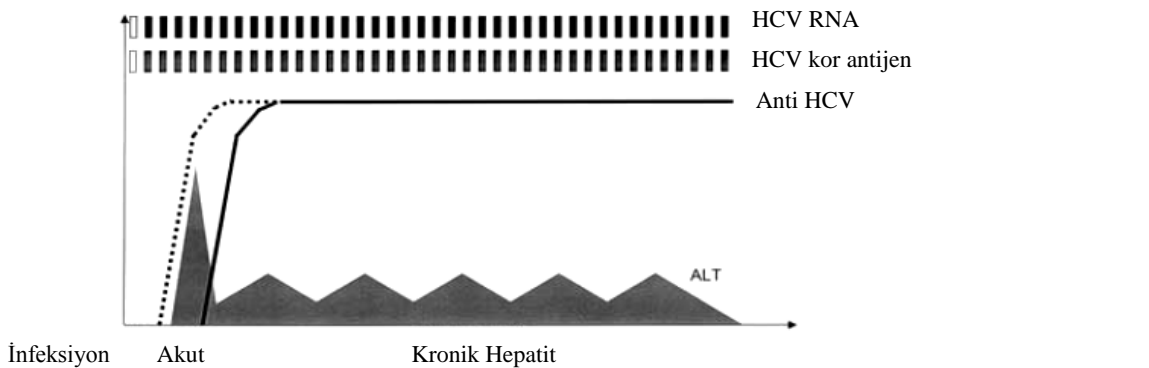
Akut hastalığın iyileşmesi ve akut hastalığın kronik HCV hastalığına dönüşmesi durumunda HCV belirteçleri arasındaki ilişki grafiklerle gösterilmiştir (Şekil 2.4) (Pawlotsky 2002).

Şekil 2. 4: HCV infeksiyonunun seyri

a) Akut Hepatit ve İyileşmesi



b) Akut Hastalık ve Kronik Hepatite Gidiş



HCV infeksiyonunun tanısında kullanılan testlerin test sonuçlarına göre değerlendirilmesi tabloda gösterilmiştir (Tablo 2.4). (Ghany 2009, Lok 1997)

Tablo 2. 4: HCV tanı testlerinin değerlendirilmesi

ANTI-HCV(EIA)	HCV RNA(NAT)	TAMAMLAYICI TESTLER	HCV DURUMUNUN DEĞERLENDİRİLMESİ
Negatif	Çalışmaz	Çalışmaz	HCV infeksiyonu yok
Pozitif	-	-	Bilinemez, pozitif tarama testi sonucu için konfirmasyona ihtiyaç var
Pozitif	Pozitif	Pozitif/ -	Aktif HCV infeksiyonu
Pozitif	Negatif	-	Bilinemez, tek negatif HCV RNA sonucu infeksiyon durumunu belirleyemez, yanlış pozitif tarama testi sonucunu dışlamak için SIT yapılmalı
Pozitif	Negatif	Pozitif	HCV ile infektedir, HCV RNA düzeyleri fluktuasyon gösterdiğinden aktif infeksiyonu dışlamak için HCV RNA tekrar test edilmeli
Pozitif	-	Pozitif	HCV ile infektedir, HCV RNA için testler yapılmalı, şu anki infeksiyon durumu için karaciğer enzimleri bir belirteçtir
Pozitif	-/ negatif	Negatif	HCV ile infeksiyon yok

Akut hepatit C şüphesinde anti-HCV ve HCV RNA test sonuçlarının değerlendirilmesi şu şekildedir (Tablo 2.5) (Kesli 2011a).

Tablo 2. 5: Akut hepatit C’de test sonuçlarının yorumlanması

ANTI-HCV(3. jenerasyon EIA)	HCV RNA(NAT) *	YORUM
Negatif	Negatif	Akut hepatit C yok
Negatif	Pozitif	Akut hepatit C
Pozitif	Negatif	Muhtemelen akut hepatit C yok ^{**}
Pozitif	Pozitif	Kronik hepatitten ayırımı zordur ^{***}

* Alt saptama sınırı ≤ 50 IU/ml olan HCV RNA testleri

** HCV infeksiyonu iyileşmiş olan bireylerde görülebilir. SIT yapılmalıdır. Bir pozitif SIT ile iki veya daha fazla pozitif HCV RNA testi ile infeksiyon kararı verilir. Negatif SIT yanlış pozitif EIA’yı gösterir ve daha ileri tetkik yapmaya gerek yoktur.

*** Bu durumlarda akut hepatiti kronik hepatitin akut alevlenmesinden veya kronik hepatitli hastaların başka nedenli akut hepatitten ayırmak zordur.

c) HCV genotipleme testleri

HCV infeksiyonunun varlığının bilinmesine ek olarak HCV genotipinin belirlenmesinin klinik önemi giderek artmaktadır. Genotiplerin saptanması epidemiyolojik çalışmaların yanı sıra viral transmisyon çalışmalarında da faydalıdır. Birçok çalışmada viral genotip ile interferon tedavisine cevap, hastalığın progresyonu ve hepatoselüler karsinom gelişme olasılığı arasında ilişki gösterilmiştir (Germer 1999).

HCV altı genotipe ve çok fazla sayıda subtipte ayrılmaktadır (Gretch 1997). HCV genotipleri serolojik olarak veya moleküler yöntemlerle belirlenebilir. HCV genotipini serolojik olarak belirleme tip spesifik antikorların EIA yöntem ile saptanmasına dayanır. Murex HCV Serotyping 1-6 Assay (Murex Diagnostics, Dartford, İngiltere) bu testlerden biridir. Bu testler kronik hepatitli immun immünkompetan hastalarda iyi sonuçlar verirken hemodiyaliz hastalarında ve immundeprese hastalarda sensitivitesi düşmektedir. Bu testler altı genotipi seçebilirken subtipleri ayırt edememektedir (Pawlotsky 2002).

HCV genotipinin moleküler olarak saptanmasında altın standart NS5B veya E1 bölgesinin direk sekanslamasıdır. Bu yöntemler moleküler epidemiyolojik çalışmalarda kullanılmaktadır. Pratik uygulamada ise farklı ticari kitler bulunmaktadır. 5’ UTR bölgesinin direk sekans analizini yapan (Trugene® 5’NC HCV Genotyping Kit, Bayer

HealthCare, Diagnostics Division, Tarrytown, New York) veya 5'UTR bölgesinin revers hibridizasyonunu yapan (INNO-LiPA HCV II, Innogenetics (Ghent, Belçika) veya Versant® HCV Genotyping Assay, Bayer HealthCare(New Jersey, ABD) ticari kitler kullanılır. Bu kitlerle yanlış tiplendirme hataları çok azdır (Chevaliez 2006, Pawlowsky 2002).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmaya Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulundan 2011/065 no'lu kararı ile onay alındı. 121518006 no'lu proje ile Necmettin Erbakan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından desteklendi.

Bu çalışmaya Aralık 2010-Şubat 2012 tarihleri arasında merkez mikrobiyoloji laboratuvarına Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi'ne başvuran HCV enfeksiyonu açısından şüpheli olarak düşünülen 189 hastanın serum örneği alındı.

Çalışmaya alınan serum örneklerinden 3 ml hacimde tüplere konularak çalışılincaya kadar -20°C'de saklandı. Çalışma yapılacağı zaman örnekler oda ısısında çözdürülerek yapılacak testler için uygun hacimlere ayrıldı (Anti-HCV antikor testi için 500 µl, HCV kor antijen testi için 500 µl, SIT için 500 µl ve HCV RNA çalışması için 1500 µl serum kullanıldı).

Anti-HCV antikor testi kemilüminesans mikropartikül immunoassay teknolojisi ile çalışan ticari Architect® i2000SR CIA system (Abbott Laboratories, Diagnostics Division, Abbott Park, IL, ABD) 2. jenerasyon anti-HCV testiyle çalışıldı.

HCV korantijen testi Architect® i2000SR CIA system (Abbott Laboratories, Diagnostics Division, Abbott Park, IL, ABD) kullanılarak, üretici firmanın önerileri doğrultusunda çalışıldı.

Tamamlayıcı (supplemental) test olarak (Strip immunblot testler) ticari INNO LIA™ HCV Score (Innogenetics N. V. Ghent, Belgium) kiti kullanıldı.

3. 1 HCV Kor Antijen Testi

Çalışmamızda insan serum veya plazma örneklerinde HCV kor antijenini kantitatif ölçen iki basamaklı kemilüminesans mikropartikül immun analiz teknolojisini kullanan ticari Architect i2000SR CLIA system (Abbott Laboratories, Diagnostik Birimi Abbott Park, IL) ve Architect HCV kor antijen test kiti kullanılarak yapıldı. Bu test sıvı fazda akridinyum işaretli rodent anti-HCV antikorlarını ve katı faz olarak monoklonal anti-HCV kaplı paramanyetik mikropartikülleri kullanmaktadır.

Çalışma da her bir örnekten 110 µl hacminde kullanıldı. Her bir örnek için test süresi 36–40 dakikaydı. Kit prosedürüne göre Cut off değeri 3.00 fmol/litre (0.06 pg/ml) idi. Okuma değeri <3.00 fmol/ litre non reaktif, 3.00 fmol/litre ve üzeri değerler reaktif kabul edildi. ≥ 3.00 fmol/li < 10 fmol/litre arasında ki sonuçlar ikinci kez çalışıldı. Her iki testte nonreaktif çıkan örnekler HCV kor antijeni açısından nonreaktif, tekrarlanan testlerden bir veya ikisi ≥ 3.00 fmol/l ise test reaktif kabul edildi (Kesli 2011 a).

≥ 3.00 fmol/litre— < 10 fmol/litre arasında elde edilen 8 sonuç için test tekrar edildi.

3. 2 Strip İmmunblot Testler (SIT)

Tamamlayıcı (supplemental) test olarak (Strip immunblot testler) ticari INNO LIA™ HCV Score (Innogenetics N. V. Ghent, Belgium) kiti kullanıldı.

INNO-LIA™ HCV Score; kor bölgesi, E2 çok değişken bölgesi (HVR), NS3 helikaz bölgesi, NS4A, NS4B ve NS5A bölgelerinden elde edilen HCV antijenlerini kullanan 3. jenerasyon line immunotesttir. Antijenler, naylon strip üzerindeki 6 farklı bölgeye bağlanmışlardır. Ayrıca, strip üzerinde dört kontrol bölgesi bulunmaktadır: streptavidin kontrol çizgisi, 3+ pozitif kontrol (anti-human Ig) çizgisi, 1+ pozitif kontrol (human IgG) ve \pm cut-off çizgisi (human IgG).

Test örneği, test stripi ile birlikte oluklarda inkübe edildi. Eğer örnekler içinde HCV antikoru var ise striplerdeki HCV antijen çizgileri ile birleşti. Daha sonra, alkaline fosfataz işaretli anti-human IgG konjugatı eklendi ve spesifik HCV antijen/antikor kompleksine bağlanması sağlandı. Enzim substrat ile inkübasyonu kestane-benzeri bir renk oluşturdu. Oluşan rengin şiddeti örnek içinden yakalanan HCV spesifik antikollarının miktarı ile orantılıdır. Stop solüsyonu (Sülfirik asit) reaksiyon durduruldu.

Test şu şekilde yapılmıştır.

Test 16 saat (overnight) inkübasyon ile yapıldı.

Pozitif ve negatif kontrolleride kapsayacak şekilde her örnek için birer oluk hazırlandı.

Test oluklarını kontrol ve örnekler olarak ayırdıktan sonra tabla içine yerleştirildi. Her bir test oluğuna 1 ml Örnek Diluent ardından 10 µl örnek ya da kontrol (pozitif ve negatif) eklendi. Oluk sayısınınca test stripi hazırlandı ve herbir test oluğuna bir strip tamamen sıvıya gömülecek şekilde yerleştirildi.(Cımbız yardımı ile test striplerinin membran tarafları yukarıya doğru olacak şekilde yerleştirildi.). Oluklar yapışkan kaplayıcı ile kaplandı. Tablalar shaker üzerine konuldu ve 16 ± 2 saat oda ısısında ($18 - 25^{\circ}\text{C}$) çalkanarak inkübe edildi.

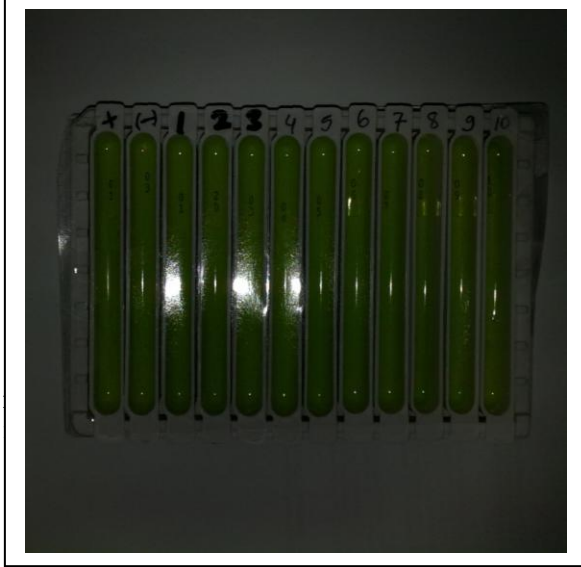
İnkübasyondan sonra yapışkan kaplayıcı dikkatlice çıkarıldı ve yıkamaya geçildi. Her bir stripi 5 kez 1 ml Yıkama Solusyonu ile yıkandı ve daha sonra her bir test oluğuna 1 ml Konjugat Solusyonu eklendi. Tablalar tekrar shaker üzerine konuldu ve 30 dakika oda ısısında (18 – 25°C) inkübe edildi.

İnkübasyondan sonra her bir strip 5 kez 1 ml Yıkama Solusyonu ile yıkandı ve bu işlemin ardından her bir test oluğuna 1 ml Substrat Solusyonu eklendi. İnkübasyon için tablalar shaker üzerinde 30 dakika oda ısısında (18 – 25°C) çalkandı.

Bu işlemde sonra oluklardaki sıvı aspire edildi ve reaksiyonun durması için her bir test oluğuna 1 ml Stop Solusyonu eklendi. Tablalar tekrar shaker üzerine konularak inkübasyon için 10–30 dakika süresince oda ısısında (18 – 25°C) sallandı. Süre sonunda Stop Solüsyonu aspire edildi.

Cımbız yardımı ile stripleri oluklardan alındı ve kurutma kağıdı üzerine membran tarafı yukarı bakacak şekilde koyuldu. Stripler tamamen kurduğunda sonuçlar yorumlandı. Kuruma aşaması oda ısısında yapıldı.

Resim 3.1: Test striplerinin 16 saat (overnight) inkübasyonu



3. 3 Kantitatif HCV RNA Testi

Serumda HCV RNA kantitasyonunda insan serumu veya plazmasında HCV RNA kantitasyonu için bir nükleik asit amplifikasyon testi olan ticari COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV Testi (Roche Molecular Systems, ABD) kullanıldı. Örneğin hazırlanması COBAS® AmpliPrep Cihazı kullanılarak, amplifikasyon ve deteksiyon COBAS® TaqMan® 48 Analizörü Cihazı (Roche Molecular Systems, USA) kullanılarak otomatik olarak yapıldı.

Bu test 3 aşamada gerçekleştirildi. (1) HCV RNA'nın izole edilmesi için örneğin hazırlanması; (2) hedef RNA'dan tamamlayıcı DNA'yı (cDNA) oluşturmak için ters transkripsiyonu işlemi ve (3) eş zamanlı olarak hedef cDNA'nın PCR amplifikasyonu ve hedefe spesifik çift işaretli oligonükleotid ölçüm probunun saptanması.

Kit İçinde Bulunan Malzemeler

Reaktifler

COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV Testi

HCV Manyetik Cam Partikülleri Reaktif Kaseti	1 x 48
Manyetik cam partikülleri %93 İzopropanol	
HCV Lizis Reaktif Kaseti	1 x 48 Test
Sodyum sitrat dihidrat, % 42,5 Guanidin tiosiyanat, < % 14 Polidokanol, %0,9 Ditiyotreitil	
HCV Çoklu-Reaktif Kaseti şunları içerir:	1 x 48 Test
Proteinaz Solüsyonu	1 x 3,8 mL
Tris tamponu, < %0,05 EDTA, Kalsiyum klorür, Kalsiyum asetat, ≤ %7,8 Proteinaz, Gliserol	
Elüsyon Tamponu	1 x 7,0 mL
Tris-baz tamponu %0,2 Metilparaben	

HCV Test Spesifik Reaktif Kaseti	1 x 48 Test
HCV Kantitasyon Standardı	1 x 3,6 mL
Tris tamponu, EDTA	
%0,002 Poly rA RNA (sentetik)	
%0,001 HCV primer bağlanma sekansları ve benzersiz bir prob	
bağlama bölgesi içeren Armored HCV RNA yapısı (MS2 bakteriyofajda	
bulaşıcı olmayan RNA)	
%0,05 Sodyum azid	

HCV Master Karışım	1 x 2,5 mL
Trisin tamponu, Potasyum asetat, Potasyum hidroksit, < %20 Dimetilsülfoksit, Gliserol	
%0,004 dATP, dCTP, dGTP, dUTP	
%0,002 HCV 5' UTR bölgesine yukarı yönde ve aşağı yönde HCV primerleri	
%0,001 HCV ve HCV Kantitasyon Standardı için spesifik floresan işaretli oligonükleotid	
problar	
%0,001 Oligonükleotid aptamer	
%0,05 Z05 DNA Polimeraz (mikrobiyal)	
%0,1 AmpErase (urasil-N-glikosilaz) enzimi (mikrobiyal)	
%0,09 Sodyum azid	

CAP/CTM Manganer Solüsyonu	1 x 19,8 mL
%0,5 Manganer asetat, Glasiyal asetik asit, %0,09 Sodyum azid	

HCV Yüksek Pozitif Kontrol	4 x 1,0 mL
%0,001 HCV sekansları içeren Armored HCV RNA yapısı (MS2	
bakteriyofajda bulaşıcı olmayan RNA) Negatif İnsan Plazması, HCV	
antikoru, HIV-1/2 antikoru, HIV p24 antijeni ve HBsAg testleriyle reaktif	
değil; PCR yöntemleriyle saptanamayan HIV-1 RNA, HCV RNA ve HBV DNA	
%0,1 ProClin® 300 koruyucu madde	

HCV Düşük Pozitif Kontrol %0,001 HCV sekansları içeren Armored HCV RNA yapısı (MS2 bakteriyofajda bulaşıcı olmayan RNA) Negatif İnsan Plazması, HCV antikorunu, HIV-1/2 antikorunu, HIV p24 antijeni ve HBsAg testleriyle reaktif değil; PCR yöntemleriyle saptanamayan HIV-1 RNA, HCV RNA ve HBV DNA %0,1 ProClin 300 koruyucu madde	4 x 1,0 mL
---	------------

COBAS® TaqMan® Negatif Kontrol (İnsan Plazması) Negatif İnsan Plazması, HCV antikorunu, HIV-1/2 antikorunu, HIV p24 antijeni ve HBsAg testleriyle reaktif değil; PCR yöntemleriyle saptanamayan HIV-1 RNA, HCV RNA ve HBV DNA %0,1 ProClin 300 koruyucu madde	4 x 1,0 mL
--	------------

(HCV Yüksek Pozitif Kontrol Barkod Klipsi)	1 x 4 Klips
--	-------------

HCV Düşük Pozitif Kontrol Barkod Klipsi	1 x 4 Klips
---	-------------

HCV Negatif Kontrol Barkod Klipsi	1x 4 Klips
-----------------------------------	------------

COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® Yıkama Reaktifi 1 x 5,1 L Sodyum sitrat dihidrat < %0,1 N-Metilizotiyazolon-HCl

Gerekli Olan Ancak Kit İçinde Bulunmayan Sarf Malzemeler

- Numune işleme üniteleri SPU'lar
- Barkod klipsleriyle numune giriş tüpleri (S-tüpler)
- K-ucu rakları
- K-tüpü Kutusu 12 x 96

Gerekli Olan Ancak Kit İçinde Bulunmayan Diğer Malzemeler

- Numune Rakı (SK 24 rak)
- Reaktif Rakı
- SPU rakı
- K-tüpu kapak aleti, motorlu

Gerekli Olan Ancak Kit İçinde Bulunmayan Diğer Malzemeler

- K-tüpu kapak aleti
- K-taşıyıcısı
- K-taşıyıcısı Transporteri
- K-taşıyıcısı rakı
- Aerosol bariyerli veya pozitif yer değiştirmeli RNaz içermeyen uçlu pipetörler (1000 µL kapasiteli)
- Tek kullanımlık tozsuz eldivenler
- Vorteks karıştırıcı

Test Prosedürü

COBAS® AmpliPrep Cihaz Kurulumu

Bölüm A. Bakım ve Prime İşlemi

AMPLILINK yazılımı veri istasyonu açıldı

Bölüm B. Reaktif Kasetlerinin Yüklenmesi

NOT: Tüm reaktif kasetleri 2–8°C’de saklanan buzdolabından çıkarıldı ve COBAS AmpliPrep Cihazına yüklendi. Ortam sıcaklığına gelmeleri için en az 30 dakika cihaz üzerinde bırakıldı.

1. HCV CS1’i reaktif rakına ve HCV CS2, HCV CS3 ve HCV CS4’ü ayrı bir reaktif rakına yerleştirildi.
2. HCV CS1 içeren reaktif rakı COBAS® AmpliPrep Cihazında rak pozisyonu A’ya yüklendi.
3. HCV CS2, HCV CS3 ve HCV CS4 içeren reaktif rakı COBAS® AmpliPrep Cihazında rak pozisyonu B, C, D veya E’ye yüklendi.

Bölüm C. Tek Kullanımlık Malzemelerin Yüklenmesi

1. SPU'ları SPU rak(lar)ına yerleştirildi ve rak(lar)ı COBAS® AmpliPrep Cihazının J, K veya L rak pozisyonuna yüklendi.
2. Kullanılan konfigürasyona bağlı olarak dolu K-tüpü rak(lar)ını COBAS® AmpliPrep Cihazının M, N, O veya P rak pozisyonuna yüklendi.
3. Dolu K-ucu rak(lar)ını COBAS® AmpliPrep Cihazının M, N, O veya P rak pozisyonuna yüklendi.
4. COBAS® TaqMan® 48 Analizörünü kullanan 3 ile 5 arasındaki konfigürasyonlar için, K-taşıyıcısı rak(lar)ındaki K-taşıyıcılarını COBAS® AmpliPrep Cihazının M, N, O veya P rak pozisyonuna yüklendi.

Bölüm D. Örnek İsteminin Yapılması ve Örneklerin Yüklenmesi

1. Her bir örnek ve kontrol [CTM (-) C, HCV L(+)C ve HCV H(+)C] 3–5 saniye boyunca vortekslendi.
2. Her örnek ve kontrolden [CTM (-) C, HCV L(+)C ve HCV H(+)C] 1000–1500 µL'yi aerosol mikropipetör kullanarak uygun barkod etiketli Giriş S-tüpüne aktarıldı.
4. Giriş S-tüpleri ve K-tüpleri (her bir S-tüpü için bir tane, Giriş S-tüplerinin yanındaki sağ pozisyona yüklenmiş) olan numune raklarını, COBAS® AmpliPrep Cihazında F, G veya H rak pozisyonlarına yüklendi.

Bölüm E. COBAS® AmpliPrep Cihazında Çalışmanın Başlatılması

COBAS® AmpliPrep Cihazı başlatıldı.

Bölüm F. COBAS® AmpliPrep Cihazında Çalışmanın Sonu ve COBAS® TaqMan® 48 Analizörüne Aktarılması

Konfigürasyona bağlı olarak numune raklarında bulunan işleme tabi tutulmuş örnekleri ve kontrolleri COBAS® AmpliPrep Cihazından çıkarıldı.

Bölüm G. İşleme Tabi Tutulmuş Örneklerin Yüklenmesi

K-tüplerini COBAS® TaqMan® 48 Analizörüne aktarmak için K-taşıyıcıları K-taşıyıcısı Transporteri kullanılarak COBAS® TaqMan® 48 Analizörüne manuel olarak aktarıldı.

Bölüm H. COBAS® TaqMan® Analizörü veya COBAS® TaqMan® 48 Analizöründe Çalışmanın Başlatılması

Termal döngü kapağı açıldı, K-taşıyıcısı termal döngüye yüklendi ve kapağı kapatıldı. COBAS® TaqMan® 48 Analizöründe çalışma başlatıldı.

Bölüm I. COBAS® TaqMan® Analizörü veya COBAS® TaqMan® 48 Analizöründe Çalışmanın Sonlandırılması

Çalışma tamamlanınca Sonuç Raporu yazdırıldı.

Sonuçlar

COBAS® TaqMan® 48 Analizörü, örnekler ve kontroller için HCV RNA konsantrasyonunu otomatik olarak belirlemektedir. (HCV RNA konsantrasyonu Uluslararası Birimde (International Units) IU /mL olarak ifade edilir).

Sonuçların Yorumlanması:

Sonuçlar üretici firmanın talimatlarına göre yorumlandı (Tablo 3.2).

Tablo 3.2: HCV RNA titrasyonları ve açıklamaları

Titre Sonucu	Açıklama
Hedef Saptanmadı	HCV için Ct* değeri test çalışması sınırının üzerindedir. Rapor "HCV RNA saptanmadı" şeklinde verilir.
< 1,50E+01 IU/mL	Hesaplanan IU/mL, test çalışması Ölçüm Sınırının altındadır. Rapor, " HCV RNA saptandı, 15 HCV RNA IU/mL'den düşük " şeklinde verilir.
≥ 1,50E+01 IU/mL ve < 4,30E+01 IU/mL	Hesaplanan IU/mL sonuçları testin lineer aralığının alt sınırından daha düşüktür. Bu sonuçlar yüksek derecede değişkenliğe sahiptir ve bu nedenle doğru olarak kabul edilemez. Bu sonuçlar dikkatle yorumlanmalıdır.
≥ 4,30E+01 IU/mL ve ≤ 6,90E+07 IU/mL	43 IU/mL'ye eşit veya daha büyük ve 6.90E+07 IU/mL'ye eşit veya daha küçük olarak hesaplanan sonuçlar, test çalışmasının lineer aralığının içindedir.
> 6,90E+07 IU/mL	Hesaplanan IU/mL test çalışması aralığının üzerindedir. Rapor, "6,90E+07 HBV RNA IU/mL'den yüksek" şeklinde sonuçlanır. Kantitatif sonuç isteniyorsa orijinal örnek HCV-negatif insan EDTA plazma ile seyreltilmeli ve tekrar test edilmelidir. Raporlanan sonucu dilüsyon faktörüyle çarpılır.

*Spesifik floresan sinyallerinin görünümü

3. 4 HCV Genotipleme Testi

HCV RNA pozitif örneklerde HCV genotiplemesi revers hibridizasyon metoduna dayanan ticari Ampliquality HCV-TS kiti (AB ANALITICA, Padova, İtalya) ile yapıldı. Yöntem 5'UTR bölgesinin biyotin işaretli amplikonunun HCV genotip spesifik problemlerle strip

üzerinde hibridizasyonu esasına dayanır. Strip üzerinde HCV genotipleri ile örtüşen prob bölgeleri vardır (Tablo 3.3).

Tablo 3.3 : Strip üzerinde bulunan prob bölgeleri ve karşılığı olan HCV genotipleri

Prob	Tanım
Prob N1	Ortak sekans (Evrensel sekans)
Prob N2	Genotip 1
Prob N3	Genotip 1
Prob N4	Genotip 1b
Prob N5	Genotip 1b
Prob N6	Genotip 1a
Prob N7	Genotip 2
Prob N8	Genotip 2
Prob N9	Genotip 2
Prob N10	Genotip 3
Prob N11	Genotip 3
Prob N12	Genotip 4
Prob N13	Genotip 4
Prob N14	Genotip 5
Prob N15	Genotip 6

Kit içeriği

- Spesifik problemler bağlı Nitroselüloz stripler (HCV-TS STRIP)
- Denatürasyon solüsyonu (<math><2\%</math> NaOH içeren) (DEN) 2X1 mL
- Hibridizasyon solüsyonu (HYB-2) 1X25 mL
- Konjugat dilüent solüsyonu (CON-D1) 2X25 mL
- Streptavidin-Alkalen fosfataz konjugat (CON) 1X15 μ L
- Yıkama solüsyonu (RIN) 1X 50 μ L
- Substrat: Suda çözülen tabletler halinde NBT/BCIP ((NBT/BCIP) 4 tablet
- Kullanıma hazır stop solüsyonu (Sitrik asit <math><0,5\%</math>)(STOP) 1X25 ml
- Her bir hibridizasyon için 8'li tek kullanımlık tablalı(tray) pleytler 3 adet
- Sonuçların okunması ve yorumlanması için şeffaf film 1 adet
- Hibridizasyon aktivasyon reaktifi (HYB ACT) 1X70 ml

Prosedür

Ön Hazırlık

- HYB ACT ve pozitif kontrol -20C'den alınarak sıcaklıkları oda ısısına getirildi.
- Su banyosu 50°C 'ye ayarlandı ve tüm deney boyunca sıcaklık 50°C'de sabit tutuldu
- Çalışma sırasında tablanın içine su banyosundan su sıçramamasına dikkat edildi.
- 50°C de su banyosunda Hibridizasyon solüsyonu (HYB-2) ve Konjugat dilüent solüsyonu (CON-D1) ısıtıldı.

Bu çalışmada Taqman Roche amplikonu kullanıldı. Bu nedenle hibridizasyon basamağına geçmeden önce 10µl Taqman Roche amplikonu, 20 µl DEN solüsyonu ve 2,5 µl HYB ACT solüsyonu karıştırıldı ve oda ısısında 5 dakika inkübe edildi.

Hibridizasyon

- Stripler kutularından penset yardımı ile çıkarıldı.
- Su banyosuna kullanılacak olan tabla yerleştirildi
- 1ml önceden ısıtılmış olan HYB-2 solüsyonu tabla üzerindeki her bir kanala eklendi. Bir penset yardımı ile stripler bu kanallara yerleştirildi. Penset yardımıyla striplerin solüsyon içine tamamen batması ve doğru pozisyonda kalması sağlandı.
- Önceden hazırlanmış olan amplikonlar her bir kanala koyuldu.
- 60 dakika 50C°de 80 rpm'de sallanarak inkübe edildi.

Boyama protokolü

- İnkübasyonun sonlanmasından hemen önce streptavidin-alkalin fosfataz konjugat (CON solüsyonu) dilüe edilerek aşağıdaki formüle göre bir karışım hazırlandı.

Örnek sayısı X 0,5 µl CON solüsyonu + örnek sayısı X önceden ısıtılmış olan CON-D1 solüsyonu

- İnkübasyon işlemi bittikten sonra kanallardaki sıvı (hibridizasyon sıvısı) aspire edildi ve 1 ml önceden ısıtılmış olan CON-D1 solüsyonu ilave edildi. 2 dk 50C°de bırakıldı. Bu sıvı da aspire edildikten sonra hazırlanan karışımdan birer ml striplerin bulunduğu kanallara koyularak 50C° 15 dk inkübe edildi.
- Bu sırada 1 NBT/BCIP tableti 10 ml distile su ile çözülerek boya solüsyonu hazırlandı. Bu çözeltinin etrafı alüminyum folyo ile kapatılarak ışığa maruziyeti önlendi.
- İnkübasyon sonunda kanallardaki sıvı aspire edildi ve 1ml RIN solüsyonu (Yıkama solüsyonu) eklendi. Oda ısısında 2 dk shaker de sallandı.

- RIN solüsyonu aspire edildi ve 1ml önceden hazırladığımız boya solüsyonu kanallara koyuldu. 15 dk, karanlık, oda ısısında sallanarak inkübe edildi.
 - İnkübasyon sonunda boya solüsyonu aspire edildi ve boyama reaksiyonunun bitmesi için stripler 2 dk 1ml stop solüsyonu ile muamele edildi.
 - Daha sonra stop solüsyonu da aspire edilerek 2 dk distile su ile yıkandı.
 - Stripler penset ile dikkatli bir şekilde kanallardan çıkartıldıktan sonra kağıt havlu arasında kurutuldu. Kuruma bittikten sonra değerlendirme yapılabilmesi için değerlendirme kağıtlarına yapıştırıldı (Resim 3.5).
- Sonuçlar yorumlama kartına göre değerlendirildi (Resim 3.6).

Resim 3.3: Stripler



Resim 3.4: Yorumlama kartı

HCV-TS Interpretation Chart		GENOTYPE 1					GENOTYPE 2			GENOTYPE 3		GENOTYPE 4		GENOTYPE 5			GENOTYPE 6			n. strip	
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20		
1	x	x			x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	1
2	x	x	x	x																	2
3	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x							3
4	x				x	x	x	x	x												4
5					x	x	x	x													5
6	x	x	x		x	x															6
7										x	x	x	x	x							7
8										x	x										8
9										x	x	x	x								9
10																					10
11																					11
12																					12
13																					13
14																					14
15																					15

3.5 İstatiksel Analiz

İstatistiksel analizler için istatistik programı, SPSS 16.0 (SPSS Inc, ABD, IL) Sürümü kullanıldı ve p değeri <0.05 ise anlamlı kabul edildi. Sensitivite, spesifite, pozitif prediktif değer (PPD) ve negatif prediktif değerleri (NPD) McNemar testi kullanılarak hesaplandı. HCV kor antijen ve HCV RNA arasındaki korelasyon ilişkisi ise Spearman korelasyon katsayısı ile hesaplandı. Nonparametrik Mann-Whitney U testi ile HCV RNA (IU / ml) ve HCV Ag (fmol / litre) arasındaki oransal ilişki analiz edildi.

4. BULGULAR

Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Merkez Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na Aralık 2010-Şubat 2012 tarihleri arasında çeşitli poliklinik, klinik ve yoğun bakım ünitelerinden elde edilen toplam 189 serum örneği çalışmaya alındı.

Bu hastaların 80'i erkek, 109'u kadın hastadır. Hasta yaş ortalaması 51.37 olarak hesaplandı.

Bu örneklerin 148'i anti-HCV açısından reaktif, 41'i negatif olarak tespit edildi.

Anti-HCV, HCV kor antijen, SIT (LIA) pozitif, HCV RNA sonucu negatif olan iki örnek, 3 hafta sonra yeni bir serum örneği ile tekrar edildiğinde (Chevaliez 2007) HCV RNA sonucu pozitif elde edildi.

Çalışma sırasında ≥ 3.00 fmol/litre—<10 fmol/litre aralığında elde edilen 8 örneğe ait test sonuçları tekrar edildiğinde 6'sı non reaktif, 2'si reaktif olarak değerlendirildi.

SIT (LIA) test sonuçları ise; 189 örneğin 78'i pozitif, 103'i negatif ve 8 örnek şüpheli (indeterminant) olarak bulundu. Şüpheli sonuç elde edilen 8 örneğin HCV RNA'sı pozitif tespit edildi.

189 serum örneği için çalışılan tüm yöntemlere ait sonuçlar tabloda verilmiştir (Tablo 4.1).

Tablo 4.1: HCV RNA, SIT, HCV kor antijen, anti-HCV testi sonuçları

Test sonucu	Anti-HCV	HCV RNA	HCV kor antijen	SIT
Pozitif	148	80	77	79
Negatif	41	109	112	102
Şüpheli	—	—	—	8

HCV kor antijeni test sonuçlarının HCV RNA viral yükü ile aralarındaki ilişki tabloda verilmiştir (Tablo 4.2)

Tablo 4.2: HCV RNA viral yük düzeyi –HCV kor antijen sonuç karşılaştırması

HCV RNA viral yük (IU/ml)	HCV KOR ANTİJEN	
	Negatif	Pozitif
15–20,000	3	10
20,000–100,000	0	4
100,000–500,000	0	14
500,000–800,000	0	9
>800,000	0	40
Toplam	3	77

SIT, HCV kor antijen ve anti-HCV' nin HCV RNA'ya göre hesaplanan yanlış pozitif, yanlış negatif, sensitivite ve spesifite sonuçları verilmiştir (Tablo 4.3).

Tablo 4.3: Çalışmada kullanılan testlerin yanlış pozitif, yanlış negatif sayıları ile sensitivite ve spesifite yüzdeleri

Test	Yanlış Pozitif(%)	Yanlış Negatif	Sensitivite	Spesifite
SIT(LIA)	0(Sıfır)	1	%90,8	%100
HCV Kor Antijen	0(Sıfır)	3	%96,2	%100
Anti-HCV	69(%46)	1	%98,7	%36,6

HCV RNA'ya göre hesaplanan anti-HCV, SIT ve kor antijeni NPD, PPD, doğruluk sonuçları tabloda verilmiştir (Tablo 4. 4).

Tablo 4.4: Anti-HCV, SIT ve kor antijeni NPD, PPD, doğruluk değerleri

	NPD	PPD	Doğruluk
Anti-HCV	%97,5	%53,3	%62,9
SIT	%92,7	%100	%95,7
HCV kor antijen	%97,3	%100	%98,4

Yapılan HCV genotipleme çalışma sonuçları verilmiştir (Tablo 4.5)

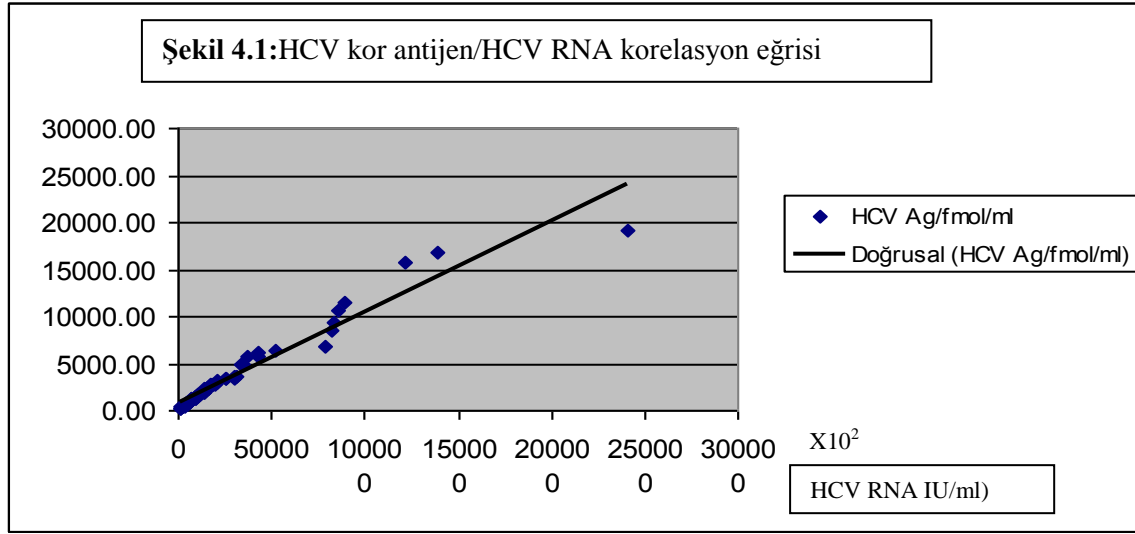
Tablo 4.5: Çalışmamızın genotip dağılımı sayı ve yüzdeleri

Genotip1b	Genotip 1a/1b	Genotip 1a	Genotip 2a/2c	Genotip 3a	Genotip 4	Toplam
59 (%91)	2 (%3)	1 (%1,5)	1 (%1,5)	1 (%1,5)	1 (%1,5)	65

HCV kor antijen ve HCV RNA arasındaki korelasyon ilişkisi için Spearman korelasyon katsayısı 0,874 olarak hesaplandı ($p < 0.01$).

Çalışmamızda 10^5 IU/ml üzeri HCV RNA konsantrasyonlarıyla kor antijeni arasındaki korelasyon 10^5 IU/ml altında olan değerlere göre daha anlamlı bulundu ($p < 0,005$).

HCV RNA düzeyi ile HCV kor antijeni düzeyi arasındaki ilişki grafik ile gösterilmiştir (Şekil 4. 1).



5. TARTIŞMA

Hepatit C virüsü, Dünya genelinde hepatitin en önemli etiyolojik ajanlarından biridir. Özellikle orta doğuda kan yolu ile bulaşan infeksiyonların en önemlisidir (Abdel-Moneim 2012).

HCV bulaşı açısından en riskli gruplar doğrudan veya dolaylı olarak intravenöz ilaç ekipmanlarını ortak kullanan intravenöz ilaç bağımlıdır. Risk faktörleri bilinen HCV olguları arasında %50-60'ı bu yolla olmaktadır (Asher 2010). Ayrıca dövme, piercing ve akupunktur uygulamalarında kullanılan iğneler HCV için risk faktörüdür. Kişisel jilet, diş fırçası, tırnak makası gibi eşyalar bulaş için daha az risk taşımaktadırlar (Alan 2008).

HCV Amerika Birleşik Devletleri'nde her yıl yaklaşık 8.000 ila 10.000 kişinin ölümünden sorumludur ve yeterli önlemler alınmaz ise önümüzdeki 10–20 yıl içinde bu sayının üçe katlanacağı tahmin edilmektedir (Zein 2000). Aynı zamanda HCV infeksiyonu ABD'de kronik hepatit, siroz ve hepatosellüler karsinomun en önemli sebebidir ve yetişkin karaciğer nakillerinin en yaygın sebebidir (Jesudian 2012).

Günümüzde HCV bulaşını önlemek amacıyla kan ve kan ürünlerinde HCV için tarama testi olarak uygulanan HCV'ye karşı antikoru tespit eden anti-HCV testleri kullanılmaktadır. Bu tarama testleri hepatit C riskini azaltmada son derece etkili olmasına rağmen, HCV infeksiyonuna ait klinik ya da laboratuvar bulguları olmayan bazı kişilerde de yanlış pozitif test sonuçları verebilmektedirler (Gretch 1997).

CDC klavuzlarına göre anti-HCV S/Co $\geq 3,8$ olan değerlerde SIT testi (RIBA) ≥ 95 olasılıkla pozitif tespit edilmektedir. Anti-HCV S/Co $< 3,8$ ise tamamlayıcı bir teste ihtiyaç vardır (Kim 2009).

Acar ve arkadaşlarının (2010) kan donörleri arasında yaptığı çalışmada 72,695 donör taranmış, bunların 360'ı anti-HCV açısından pozitif tespit edilmiştir. Bu çalışma da anti-HCV pozitifliğini doğrulamak için SIT (LIA) kullanılmış. 360 anti-HCV pozitif örneğin 54'ü LIA ile doğrulanmış ve buna göre Anti-HCV yanlış pozitiflik oranı % 85 olarak hesaplanmıştır.

Dufour ve arkadaşları (2003) bir askeri hastanede yaptıkları çalışmada anti-HCV pozitif olan 2986 serum örneğini kullanmışlardır. Bunlardan anti HCV S/Co $\leq 3,7$ olan 490 örnek düşük pozitif olarak kabul edilmiştir. RIBA, anti HCV S/Co $\leq 3,7$ olan 263 numune üzerinde gerçekleştirilmiş ve bunların 31'i (% 12) RIBA şüpheli, 4'ü (% 2) RIBA pozitif bulunmuştur. Şüpheli RIBA sonucu olan ve HCV RNA'sına bakılan 12 örneğin sadece 1'inin RNA'sı pozitif tespit edilmiştir. Anti HCV S/Co $\leq 3,7$ olan 140 serumun 16'sında RNA pozitif iken, anti-HCV S/Co $> 3,7$ olan 1435 örneğin 1297'sinde HCV RNA pozitif

bulunmuştur. Bu çalışmada HCV'ye maruz kalan bireylerde ilk yapılması gereken testin SIT (RIBA) olması gerektiği, HCV RNA'nın ise şüpheli veya pozitif olgular için yapılması gerektiği vurgulanmıştır.

Anti-HCV antikor pozitifliği, hastaların veya kan donörlerinin viremi durumu hakkında herhangi bir bilgi verememektedir. Bundan dolayı immün blot testler (RIBA) persistant HCV enfeksiyonunun gösterilmesinde kullanılmaktadır. Bu testlerden elde edilen şüpheli (indeterminant) sonuçların RNA ile doğrulanması gerekir. Hindistan'da Thakur ve arkadaşlarının (2003) 3. jenerasyon EIA kiti ile yaptıkları çalışmaya 1926 kan donöründen anti-HCV'si pozitif tespit edilen 34 örnek ve 16 kronik karaciğer hasta serumu dahil edilmiştir. Bu örnekleri anti-HCV S/Co 1-3, 4-6 ve >6 olmak üzere gruplandırmışlar. Bu çalışmada anti-HCV'nin SIT ve HCV RNA'ya göre uyumsuz sonuçlarının özellikle kan donörlerinde anti-HCV düzeyi 1-3 arasında olan serumlarda olduğu tespit edilmiştir. Anti-HCV S/Co 1-3 olan 26 örneğin 23'ü SIT (LIA) negatif, 3'ü şüpheli tespit edilmiş ve hiçbirinde HCV RNA pozitifliği bulunamamıştır. Anti-HCV S/Co 4-6 arasında 7 örneğin 5'i SIT şüpheli, 2'si negatif bulunurken HCV RNA'ya göre 5'i pozitif, 6'dan daha büyük anti-HCV değerinde olan 1 örnek SIT ile reaktif, HCV RNA'ya göre de pozitif tespit edilmiştir. Kronik karaciğer hastalarında ise anti-HCV S/Co 1-3 arasında olan 5 örneğin 3'ü SIT şüpheli, 2'si reaktif, HCV RNA'ya göre 5'i de pozitif; 4-6 arasında olan 6 örneğin 2'si şüpheli, 4'ü reaktif, HCV RNA'ya göre 6'sı da pozitif; >6 olan 5 örneğin tümü SIT pozitif, HCV RNA'ya göre de pozitif bulunmuştur. Sonuç olarak 3. Jenerasyon EIA'ın kronik karaciğer hastalarında sensitivitesi ve spesifitesi oldukça iyi, fakat özellikle düşük düzey anti-HCV değerine sahip olan kan donörlerinde sensitivitesinin ve spesifitesinin az olduğu, anti-HCV düzeyi arttıkça yanlış pozitiflik oranının azaldığı belirtilmiştir. Kan donörlerinde yüksek düzey anti-HCV titresi var ise (>3) HCV RNA tespitine gidilmesi gerektiği kanaatine varılmıştır.

Carneiro ve arkadaşlarının (2001) Brezilya'da 428 kan donörü ile yaptıkları çalışmada anti-HCV pozitifliği tespit edilen 185 hastanın SIT (LIA) ile konfirmasyonu yapılmıştır. 167 örnek (%90,3) pozitif olarak tespit edilmiş ve buna göre anti-HCV prevalansı %39 olarak hesaplanmıştır. Diğer 18 hastanın 4'ü negatif, 14'ü ise SIT ile şüpheli olarak değerlendirilmiştir. Anti-HCV antikoru pozitifliği SIT ile konfirme edilen 167 örneğin 106'sında (%63,5), 243 anti-HCV negatif örneğin 25'inde (%10,3) HCV RNA pozitifliği bulunmuştur. Aynı zamanda SIT negatif 1, SIT şüpheli 7 örnekte de HCV RNA pozitifliği tespit edilmiştir. Bu sonuçlar özellikle HCV antijenlerine karşı yetersiz antikor yanıtı olan hastalarda, moleküler tanı yöntemlerinin bir avantajı olarak yorumlanmıştır.

SIT'lerin tamamlayıcı test olarak kullanılmasıyla beraber; çalışma zorluğu, şüpheli sonuçların fazlalığı ve yüksek maliyet gibi dezavantajları da vardır. İlimizde bir eğitim ve araştırma hastanesinde Keşli ve arkadaşlarının (2009) üç ayrı ticari anti-HCV antikor kiti ile yaptıkları çalışmada 7156 hasta serumu incelenmiştir. En yüksek sayıda 136 serumda pozitif sonuç tespit eden kitin örnekleri SIT (RIBA) ve NAT ile incelenmesi sonucunda 65'i hem SIT hem de HCV RNA açısından pozitif, SIT'a göre şüpheli değerlendirilen 23 örneğin ise HCV RNA'sı negatif bulunmuştur.

Bizim çalışmamızda anti-HCV pozitif olan 8 örneğin SIT testi şüpheli bulundu. Şüpheli sonuç elde edilen 8 örneğin HCV RNA'sı negatif tespit edildi. Şüpheli sonuç elde edilen serumların anti-HCV S/Co 4,39 ve altı değerlerdi. İmmun blot testin (INNO LIA™ HCV Score) sensitivitesi %90,8, spesifitesi ise %100 olarak hesaplandı. Bu sonuçlar bize anti-HCV pozitif, SIT şüpheli çıkan örneklerin HCV RNA ile doğrulanması gerektiğini göstermektedir. Aynı zamanda bu serumların HCV Kor antijen test sonuçları da non-reaktif tespit edildi. Kor antijen testinden elde ettiğimiz bu sonuçlar, şüpheli değerlendirilen immün blot testlerin konfirmasyonunda kor antijen testinin HCV RNA'ya alternatif olabileceği kanaatini vermiştir.

Meksika'da Sosa-Jurado ve arkadaşlarının (2010) kan donörleriyle yaptıkları bir çalışmada 61553 kişinin 515'inde anti-HCV (%0,84) pozitifliği saptanmıştır. Bunlardan anti-HCV S/Co 1,0-2,0 olanların %14'ünde, 2,1-3,0 olanların %44'ünde, 3,1-4,0 olanların %50'sinde 4,1-16 olanların %87,5'inde, 39 ve üzeri değerlerde %100 HCV RNA pozitifliği belirlenmiştir. Anti-HCV EIA pozitif, HCV RNA negatif elde edildiği durumların; HCV enfeksiyonunun iyileşmesine, enfeksiyonun çok yeni olması nedeniyle viral yükün NAT saptama sınırının altında olmasına ve takip gerektirdiğine, anti-HCV antikor testinin başka antikorlarla çapraz reaksiyon verebileceğine bağlamışlardır.

Pakistan'da Ali ve arkadaşlarının (2010) çalışmasında 254 anti-HCV pozitif örneğin HCV RNA'larına bakılmış ve anti-HCV antikor testinde %16,92 oranında yalancı pozitiflik saptanmıştır. ELISA yönteminin HCV enfeksiyonunu doğrulamak için tek araç olamayacağı, moleküler yöntemlerin hastanın enfeksiyon durumunu belirlemek ve antiviral tedavi öncesi kullanılması gereken testler oldukları sonucuna varılmıştır.

Sayan ve arkadaşlarının (2006) retrospektif olarak yaptıkları bir çalışmada ise hem anti-HCV hem de HCV RNA testleri beraber çalışılan 368 örneği değerlendirmişler ve anti-HCV S/Co oranının 3,8 altında kalan hiçbir olguda HCV RNA pozitifliği saptanmamıştır.

Bizim çalışmamız da 148 anti-HCV pozitif örneğin HCV RNA temel alınarak 69'u (%47) yalancı pozitif olarak tespit edildi. Bu yalancı pozitif örneklerin 49'u (%71) anti-HCV S/Co <3,7'nin altındaki değerler olduğu tespit edildi. Bununla beraber anti-HCV'si pozitif olan ve HCV RNA testi ile pozitifliği doğrulanan 4 örneğin anti-HCV S/Co <3,7 olduğu görüldü. HCV RNA'sı pozitif olan serumların %95'inde anti HCV S/Co oranı >3,7 idi. Çalışmamızda HCV RNA' göre anti-HCV testinin sensitivitesi %98,7, spesifitesi %36,6 olarak hesaplanmıştır. Anti-HCV pozitifliğini değerlendirirken özellikle düşük değerlerde yanlış pozitiflik oranının arttığı görülmektedir ve bu sonuçlarımız diğer çalışmalarla da uyumludur. Yine bu değerlere göre anti-HCV antikor testinin HCV infeksiyonunun belirlenmesinde için iyi bir tarama testi olduğunu, fakat kesin tanı için tamamlayıcı testlere ihtiyaç duyduğunu düşünüyoruz.

Anti-HCV negatif olup, HCV RNA'nın pozitif saptanabildiği durumlar da vardır. Bunlar derin immunsupresyonu olan hastalar, hemodiyaliz hastaları ve agammaglobulinemik bireylerdir (Kesli 2012, Mederacke 2009)

Chamie ve arkadaşları (2007) tarafından HIV hastalarında seronegatif kronik HCV infeksiyonunun HIV ile aralarında olan ilişkisi araştırılmıştır. HIV infeksiyonu olanlarda HCV RNA'sı pozitif olanlarda anti-HCV antikoruna negatifliği saptanmıştır. Bu durumun özellikle ALT düzeyleri yüksek, intravenöz ilaç kullanım öyküsü olan ve CD4 düzeyi <200 olan bireylerde olduğu görülmüştür. Bu çalışmanın sonucunda da HIV infeksiyonu olup anti-HCV'si negatif olanlarda ve özellikle anormal ALT düzeyleri, intravenöz ilaç kullanım öyküsü ve CD4 düzeyi <200 olan bireylerde HCV RNA tespitinin yapılması önerilmiştir.

Bizim çalışmamızda kronik karaciğer hastası ve anti-HCV'si negatif (0,12) olan bir hasta serumunda HCV RNA ($5,2 \times 10^6$ IU/ml) ve HCV kor antijen ($1,58 \times 10^4$ fmol/L) değerleri pozitif bulunmuştur. Bu hasta örneğinin aynı zamanda SIT (LIA) test sonucu da negatif olarak değerlendirilmiştir. Bu sonuç ve diğer çalışmalar ışığında serumda antikor tespitine dayalı testlerin özellikle kronik karaciğer hastalığı, HIV infeksiyonu gibi immun sistemin zayıfladığı durumlarda negatif sonuçlanabileceğini hastalığın tanı ve takibi açısından bilmemiz gerektiğini, bu durumlarda HCV RNA ve HCV kor antijen testlerinin daha kullanılabilir testler olduğunu düşündürmüştür.

Geçtiğimiz on yılda HCV nükleokapsid protein korunmuş epitoplarına karşı yönlendirilmiş monoklonal antikorlar aracılığıyla HCV-kor antijeninin tespit edilmesi ve ölçülmesi ile HCV replikasyon konfirmasyonunun mümkün olduğu ortaya konulmuştur. 2000 yılı başlarında bir HCV-kor antijen testi (trak-C, Ortho Clinical Diagnostics, Raritan,

NJ, ABD) çalışılmaya başlandı. Bu HCV-kor antijen testinin saptama sınırı 1,5 pg/mL ve HCV enfeksiyonu tanısında ek bir tanı aracı olduğu, farklı HCV RNA testleri ile korele olduğu görülmüştür. Yakın zamanda HCV kor antijeninin tespiti için yeni bir tam otomatize kemilüminesans mikropartikül immunotest (Architect HCV Ag, Abbott, Almanya) geliştirilmiştir. Bu testin saptama sınırı 0.06 pg/mL (3 fmol/L)'dir. Bu yeni testinde HCV RNA düzeyi ile korele olduğu görülmüştür (Mederacke 2009).

HCV kor antijeni muhtemelen hem tam virionlar da hem de RNA'dan bağımsız kor protein yapıları olarak enfekte bireylerin serumunda bulunmaktadır. Çeşitli HCV kor antijen testleri ile yapılan çalışmalar HCV kor antijen kinetiğinin enfeksiyon tüm aşamalarında HCV RNA'daki ile benzer ve HCV kor antijen ve HCV RNA konsantrasyonlarının korele olduğunu göstermiştir. Aynı zamanda HCV kor antijeni ile yapılan çalışmalar bu testin kronik enfeksiyonu olan hastalarda antiviral tedavinin takibinde de kullanılabilir olduğunu göstermiştir (Miedouge 2010).

HCV RNA'nın moleküler yöntemlerle tespiti, HCV enfeksiyonunun saptanması için günümüzde altın standart olarak kabul edilmektedir. HCV RNA'yı tespit etmek ve ölçmek için yeni moleküler teknikler mevcuttur ve pek çok çalışmada viral yük, hastalık şiddeti ve hastalığın progresyonu arasında bir ilişki kurulmuştur. Avrupa kan bankalarında HCV bulaşma riskini en aza indirmek için HCV kor antijen veya HCV RNA ile her kan ve plazma donörünün test edilmesi 2 Ocak 2002 yılında zorunlu hale getirilmiştir. HCV kor antijen testi ile yapılan çalışmalarda HCV RNA'ya göre HCV enfeksiyonunun serokonversiyonunu 1 gün daha geç tespit ettiği, bunun yanında testin sensitivitesinin tek donör HCV RNA testi ile aynı olmadığı görülmüştür. Fakat tek donör için yapılan HCV RNA tespiti yüksek maliyeti, altyapı ve özel eğitilmiş personel gereksinimi nedeniyle uygun bir seçenek değildir. Bu nedenle birçok gelişmiş ülke maliyeti azaltmak için havuz test yöntemi kullanmaktadır, böylece nükleik asit testleri (NAT) kan bankalarında kullanım alanı bulmuştur. Fakat havuz yöntemi tek test yapılmasına göre daha az duyarlı bir yöntemdir. Dolayısıyla kor antijeni daha ucuz olması, özel altyapı ve eğitilmiş personel gerektirmemesi ve tek örnekte çalışılabilmesi açısından NAT'e bir alternatif olarak kabul edilmektedir (Daniel 2007).

HCV kor antijen test stabilitesi ile ilgili çeşitli çalışmalar yapılmış, bunlardan birinde stabilitesi HCV RNA ile karşılaştırılmıştır. Çalışma sonunda 37°C'de 96 saate kadar kor antijeninin stabilitesini koruyabildiği görülmüş, buna karşılık HCV RNA düzeylerinde önemli derecede azalma tespit edilmiştir. HCV kor antijenini stabilitesini koruyabildiğinden kısıtlı imkanları olan, transport için uygun sıcaklık koşullarını

sağlayamayan kırsal bölgelerde HCV RNA'ya göre uygun bir seçenek olarak gözükmemektedir (Mederacke 2009).

Saito ve arkadaşlarının (2003) Lumispot EIKEN HCV antijen test kitini (Eiken Chemical, Tokyo, Japonya) kullanmışlardır. 155 kronik hepatitli hasta serumunda HCV-kor antijen düzeyi ile HCV RNA düzeyleri karşılaştırılmıştır. HCV RNA düzeyleri ile HCV kor antijen düzeyleri arasındaki korelasyonun anlamlı olduğu görülmüştür HCV RNA düzeyleri 1000, 1100 ve 1700 IU/ml olan üç serum örneği HCV kor antijen testinin saptama sınırı altında kalmıştır. Bu çalışmada hastaların IFN'a yanıtları da bu iki test ile bakılmış ve yedi hastanın altısında HCV core antijeni düzeyleri ile HCV RNA düzeylerinin paralel olduğu görülmüştür. Sonuç olarak HCV kor antijen testinin hepatit C'li hastalarda viral yük düzeyinin takibi için HCV RNA'ya alternatif olabilecek bir gösterge olduğu düşünülmüştür.

Bouvier-Alias ve arkadaşlarının (2002) Total HCV kor antijen testi (Ortho-Clinical Diagnostics) ile yaptıkları çalışmada Dünya Sağlık Örgütü'nün uluslar arası standartlara uygun, HCV RNA 50 IU /mL, 500 IU/mL, 5,000 IU/mL, 50,000 IU/mL, 200,000 IU/mL, 500,000 IU/mL ve 2.000.000 IU/mL olan serumlar ve 392 infekte hasta serumu kullanılmıştır. Kontrol grubu olarak 124 anti-HCV negatif, HCV RNA negatif örnek çalışılmıştır. 392 infekte serumun HCV RNA ve HCV kor antijen testlerinin her ikisi ile pozitif belirlenen 293'ünde HCV RNA ve kor antijen düzeylerine bakılmış ve aralarındaki ilişki önemli bulunmuş, testin spesifitesi %99,2 olarak hesaplanmıştır. Sonuç olarak HCV kor antijen testinin klinik uygulamalarda HCV replikasyonunu göstermede uygun bir test olduğu belirtilmiştir. Bununla birlikte bu testin 20.000 IU/mL HCV RNA düzeylerinin altında viral replikasyon için kullanılamayacağı vurgulanmıştır. Çalışmamızda 10^5 IU/ml üzeri HCV RNA konsantrasyonlarıyla kor antijeni arasındaki korelasyon 10^5 IU/ml altında olan değerlere göre daha anlamlı bulunmuştur. Bu da bize serumdaki HCV RNA konsantrasyonunun artışı ile kor antijen testinin daha doğru sonuçlar verdiğini düşündürmektedir.

Cano ve arkadaşlarının (2003) kan donörlerinde kor antijen testi (Ortho Clinical Diagnostics) ile yaptıkları çalışmaya anti-HCV testi pozitif olan 257 örnek alınmıştır. Bu pozitif örneklerin doğrulanması amacıyla SIT (RIBA) testi kullanılmış ve bununla da pozitif değerlendirilen örneklerle HCV RNA testi çalışılmıştır. Ayrıca HCV RNA'sı pozitif belirlenen 80 örneğin genotiplemesi yapılmıştır. SIT ile doğrulanan 137 örneğe HCV RNA ve HCV kor antijen testleri uygulanmıştır. 137 serumun 114'ünde HCV RNA, 111'inde de (%97,37) HCV kor antijeni pozitif tespit edilmiştir. HCV RNA pozitif olduğu halde kor

antijeni negatif olan serumlarda RNA düzeyleri $3,0 \times 10^3$, $6,2 \times 10^3$ ve $1,3 \times 10^4$ IU/mL olacak şekilde düşük düzeyde olduğu görülmüştür. RIBA pozitif, HCV RNA negatif olan 23 örnek HCV kor antijen testi ile negatif saptanmıştır. Genotiplere göre yapılan çalışmada ise 2 adet (genotip 1a ve 3a) HCV RNA pozitif, kor antijen negatif olan serumların HCV RNA düzeylerinin düşük seviyede ($1,3 \times 10^4$ ve $6,2 \times 10^3$ IU/mL) olduğu görülmüştür. HCV RNA ile HCV kor antijen arasındaki ilişki anlamlı bulunmuş ve kor antijen testinin spesifitesi %99,63 olarak hesaplanmıştır. Sonuç olarak bu çalışmada HCV kor antijen testinin kor antijenini geniş bir aralıkta ölçebildiği, genotipten etkilenmediği, kan donörleri için kabul edilebilir bir spesifiteye (%99,63) sahip olduğu kanaatine varılmıştır. Bizim çalışmamızda da HCV RNA pozitif, HCV antijen negatif üç örnek tespit edildi. HCV kor antijen testi negatif sonuçlanan bu serumların diğer çalışmalara benzer olarak HCV RNA düzeylerinin düşük olduğu görülmüştür (HCV RNA düzeyleri $1,5 \times 10^1$, $2,7 \times 10^1$ ve $2,57 \times 10^3$). Bu da bize diğer çalışma verileriyle beraber bakıldığında kor antijen testinin özellikle düşük seviyede HCV RNA'sı olan hasta serumlarında yanlış negatiflik ile sonuçlanabileceğini düşündürmüştür.

İtalyada Valcavi ve arkadaşları test validasyonu çalışmalarını kan donörlerinde (2004) trak-C (Ortho Clinical Diagnostics) ile yapmışlardır. 1009 anti-HCV pozitif örneğin 405'inde HCV RNA negatif, bunların 403'ü kor antijeni açısından negatif bulunmuş ve spesifite %99,5 hesaplanmıştır. HCV RNA pozitif 604 örneğin 572'sinde kor antijenide pozitif tespit edilmiş ve sensitivite %94,7 hesaplanmıştır. HCV RNA pozitif /kor antijeni negatif olan 28 olgu uyumsuz sonuçlar olarak değerlendirilmiştir. Bunların 8 tanesinin ise viral yükleri $1,26 \times 10^4$ – $6,87 \times 10^4$ IU/mL arası, 11'inin HCV RNA'ları $8,18 \times 10^2$ – $9,73 \times 10^3$ IU/mL arası, 9'u 600 IU/mL'nin altında bulunmuştur. Bu uyumsuz sonuçlar; total serbest antijen miktarının düşük olmasına, var olan veya yeni oluşan immun kompleksler ile serbest antijenin parçalanmasına, örneklerde bulunan yüksek afiniteye sahip anti-kor antikörlerin varlığına bağlı olabileceği bildirilmiştir.

Özbekistanda bir çalışmada (Agha 2004) ise asemptomatik, HCV RNA'sı pozitif olan 246 örnek kullanılarak Ortho Clinical Diagnostics (Tokyo, Japonya) kiti ile HCV kor antijen testi çalışılmıştır. Bunların genotip dağılımları ise 91 adet genotip 1, 24 adet genotip 2, 15 adet genotip 3 ve 116 adet genotip 4 şeklindedir. Örneklerin 234'ü (%95,1) HCV kor antijen testi ile pozitif bulunmuş ve HCV RNA ve HCV kor antijen serum konsantrasyonları arasında korelasyon saptanmıştır. HCV genotipleri arasında HCV kor antijen testinin karşılaştırılmasında tanı açısından anlamlı fark görülmemiştir. Sonuç olarak HCV kor antijen testinin genotipten bağımsız olarak HCV infeksiyonunun tanısında

kullanılabilecek yeterli sensitivite, spesifiteye sahip olduğu kanatine varılmıştır. Mederacke (2009) ve arkadaşlarının yaptığı benzer bir çalışmada HCV kor antijeninin (Architect HCV Ag, Abbott, Almanya) genotipten bağımsız olarak HCV RNA ile korele olduğu saptanmıştır. 118 HCV RNA pozitif örnekten 6'sı antijen negatif bulunmuş ve bunlarda diğer çalışmalarda olduğu gibi düşük düzey HCV RNA konsantrasyonlarında 4300 IU/mL bir ve 5 adet <15 – 350 IU/mL arası örnekler olduğu görülmüştür. Bu çalışmada ilgi çekici olarak HCV RNA infeksiyonu için antiviral tedavi alan iki hasta serumunda, saptama sınırı <15 IU/mL HCV RNA testi ile negatif tespit edilmiş ve bunlarda düşük düzeyde (3.27 ve 3.81 fmol/L) kor antijen pozitifliği tespit edilmiştir. Bizim çalışmamızda iki hasta örneğinin HCV kor antijen testi pozitif, HCV RNA'sı ise negatifti. Bu örneklerin SIT'leri de pozitif olarak değerlendirildi. Bunların HCV RNA testi 3 hafta sonra tekrarlandı ve pozitif sonuç elde edildi. Bu durum, HCV infeksiyonunda virüsün viremi döneminde olmadığına bağlandı.

Daniel ve arkadaşları (2007) çalışmasında trak-C (Ortho Clinical Diagnostics) antijen testiyle HCV infeksiyonu için tedavi almakta olan 61 hastadan 167 örnek çalışılmıştır. Bunların 95'inin HCV RNA'sı pozitif, 72'sinin RNA'sı negatif bulunmuştur. 95 RNA pozitif örneğin 81'i (% 85,3) HCV kor antijen pozitif ve 14'ü (% 14,7) HCV kor antijen negatif bulunmuştur. 72 RNA negatif örneğin 69'u (% 95,8) HCV kor antijen negatif, 3'ü ise (% 4,2) pozitif bulunmuştur. Çalışmada testin sensitivitesi %85,3 spesifitesi ise %95,8, pozitif prediktif %96,4, negatif prediktif değeri değeri %83,1 hesaplanmıştır. HCV RNA ile aralarındaki korelasyon anlamlı bulunmuştur.

Miedouge ve arkadaşları (2010) Fransada hemodializ hastalarında Architect HCV antijen kiti (Abbott, Almanya) kullanarak yaptıkları çalışmada HCV RNA ile aralarındaki korelasyonu araştırmak için 98 HCV RNA pozitif örnekle çalışmışlardır. Bunların 90'ında HCV antijeni pozitif tespit edilmiştir. Viral yüke göre pozitif tespit edilen kor antijen test yüzdeleri ise; 0–2000 IU/mL olanların %53,8'ü, 2001–6000 IU/mL olanların %88,2'si, 6000 IU/mL ve üzeri HCV RNA konsantrasyonuna sahip olan örneklerin %100'ünde kor antijen testi pozitif saptanmıştır. HCV RNA pozitif 90 örnekle HCV kor antijen arasındaki korelasyon anlamlı bulunmuştur. 2752 anti-HCV negatif örnek bu iki testle çalışıldığında 21 örnek HCV kor antijen pozitif, HCV RNA negatif tespit edilmiş ve bu örneklerin tümü kor antijen 0.06–0.2 pg/mL aralığında bulunmuştur. Bu çalışmada testin sensitivitesi %100, spesifitesi %99,2 olarak hesaplanmıştır. Çalışmamız sırasında ≥ 3.00 fmol/litre – <10 fmol/litre arası olan ve kit çalışma prosedürüne göre yeniden test edilen 8 örneğin 6'sı <3,00 fmol/litre olduğu için non reaktif, 2'si ≥ 3.00 fmol/litre olduğu için reaktif kabul

edildi. Reaktif olarak değerlendirilen iki örneğin de HCV RNA'ları pozitif (6,5x10³ ve 5,8x10⁴).

İlimizde Keşli ve arkadaşları (2011 b) Architect HCV Ag (Abbott, Almanya) kiti ile yaptıkları çalışmada 212 serum örneğinden HCV RNA'sı negatif olan 52'sinin HCV kor antijenini negatif tespit etmişlerdir. HCV RNA'sı pozitif olan 160 örneğin 6'sında kor antijen tespit edilememiştir. Bu serumların HCV RNA düzeylerinin diğer çalışmalarda olduğu gibi düşük seviyede olduğu görülmüştür (5 örneğin HCV RNA düzeyi 75 ile 249 IU/ml arasında, bir örneğin ise 6,562 IU/ml'dir). Kor antijeni pozitif tespit edilen 154 örneğin tümünde anti-HCV'de pozitif bulunmuştur. Anti-HCV antikor testinde toplam olarak 38 adet yalancı pozitif bulunmuştur. Yalancı pozitif sonuçların anti-HCV antikor S/Co oranına göre dağılımları ise 22 örnek 1,3–2,54, 6 örnek 3,02–5,47, 7 örnek 6–8 ve 3 örneğin 12–16 arasında olduğu tespit edilmiştir. HCV kor antijen testinin sensitivitesi %96,3, spesifitesi %100, pozitif prediktif değeri 100%, negatif prediktif değeri %89,7 olarak hesaplanmıştır. HCV kor antijeni ile HCV RNA düzeyleri arasındaki korelasyonun anlamlı olduğu görülmüştür. Çalışmada kor antijen testinde yanlış pozitiflik tespit edilmemiştir. Sonuç olarak da HCV kor antijen testinin HCV virüs infeksiyonunun tanısında anti-HCV antikor test sonuçlarının confirmasyon ve tamamlayıcı test uygulamalarında kullanılacak, sensitivitesi ve spesifitesi yüksek, kolay uygulanabilir, maliyet-etkin, güvenilir bir test olduğu kanaatine varılmıştır.

Yüksel ve arkadaşlarının (2011) 123 HCV RNA pozitif, 48 HCV RNA negatif örnekle yaptıkları çalışmada HCV kor antijen testinin (Abbott Diagnostics, Germany) sensitivitesini %94,3, spesifitesini %97,9, pozitif prediktif değeri %99,1, negatif prediktif değeri %87 olarak tespit etmişlerdir. Ankara'da benzer bir çalışmada (Ergünay 2011) 272 örneği HCV RNA ve HCV kor antijen açısından değerlendirmeye almışlar. 211 örnek HCV RNA pozitif, 163 örnek HCV kor antijen pozitif tespit edilmiştir. Kor antijen pozitif tespit edilen 163 örneğin 160'ının HCV RNA'sının pozitif olduğu görülmüştür. Bu çalışmada da HCV RNA'sı pozitif olup, kor antijeni negatif belirlenen örneklerin HCV RNA düzeyleri düşük seviyede (17,1–775 IU/mL) saptanmıştır. Kor antijen sensitivitesi %75,8, spesifitesi %95,1 olarak hesaplanmıştır.

Bizim çalışmamızda HCV Kor Antijen testinin sensitivitesi 96,2% spesifitesi %100, pozitif prediktif değeri 100%, negatif prediktif değeri %97,3 olarak hesaplandı. HCV kor antijen testi ile HCV RNA düzeyleri arasındaki korelasyon anlamlı bulundu ($r=.874$, $p<0.01$). Yapılan benzer çalışmalarla uyumlu olan bu verilerimizin sonucu olarak; HCV kor antijen testinin yüksek oranda olan sensitivitesi, spesifitesi, pozitif prediktif

değeri ve negatif prediktif değeri ile anti-HCV antikör testinin confirmasyonunda moleküler testlerin çalışılmadığı merkezlerde HCV RNA'ya alternatif olabileceği kanaatindeyiz. HCV kor antijeninin bir diğer avantajı da testin HCV RNA'ya göre çok daha kısa sürmesidir (Test süresi ise 36–40 dakikadır). Fiyat olarak da HCV kor antijen testinin yaklaşık maliyeti 10\$, HCV RNA testi ise 30\$ civarındadır. Bu bakımdan maliyet etkin görünmektedir.

HCV genotip ve subtipleri ile HCV ilişkili hastalık patogenezi ve epidemiyolojisi arasında yakın ilişki vardır (Pawlotsky 1997, Çelik 2010). HCV genotiplerinin çeşitliliğinin ilk önce belli coğrafyalarda virüsün genomunda meydana gelen mutasyonlarla oluştuğu, daha sonra bunun geniş toplumlara yayıldığı düşünülmektedir. HCV 1'den 6'ya kadar 6 ana genotip içinde sınıflandırılmaktadır. Her bir tip içinde bulunan subtipler küçük harflerle keşfedilme sırasıyla verilmiştir. İnfeksiyonun kaynağı ile genotipi arasında da ilişki gösterilmiştir (Pawlotsky 1997). Özellikle genotip 1b şiddetli karaciğer hastalığı ve hastalar da interferon alfa tedavisine kötü cevap veren kronik hepatit ile sonuçlanmaktadır (Gökahmetoğlu 2011, Pawlotsky 1997). Genotipleme çalışmaları daha çok araştırma amaçlı kullanılmaktadır. Çünkü bu testler pahalı, zaman alıcı, spesifik moleküler biyoloji ekipmanları ve deneyimine ihtiyaç duyan testlerdir (Pawlotsky 1997).

Genotip tedaviye yanıtı ve süreyi belirleyen en önemli parametredir. Ülkemizde HCV ile infekte olan olgularda en sık görülen genotip ise HCVgenotip 1b'dir. Çelik ve arkadaşlarının (2010) yaptığı çalışmada 178 HCV RNA pozitif örneğin genotiplemesi yapılmıştır. Örneklerin 157'sinde (%88,2) genotip 1b, 16'sında (%8,99) genotip 1a, 3 örnekte (%1,69) genotip 3 ve 2'sinde (%1,12) genotip 2a tespit edilmiştir. Sonuç olarak genotip dağılımında en yüksek oranda genotip 1b bulunmuş ve bunun Türkiye'deki diğer çalışmalarla uyumlu olduğu görülmüştür.

Kayseri'de gerçekleştirilen genotipleme çalışmasında ise (Gökahmetoğlu 2011) 146 örnek çalışılmıştır. Bunların 90'ı (% 61,7) genotip1 (genotip 1'lerin 77'si genotip 1b; 5'i genotip 1a, 8'inin alt tipi tespit edilememiş.), 52'si (%35,6) genotip 4; 4'ü (% 2,7) genotip 2 olarak bulunmuştur. Hastanemizde daha önceki yıllarda yapılan çalışmada anti-HCV pozitif ve HCV RNA pozitif 80 örneğin genotiplemesi yapılmıştır. Tüm örneklerin genotipi genotip 1b tespit edilmiştir (Ural 2007). İstanbulda kronik karaciğer hastaları ile yapılan çalışmada 108 hasta örneği incelemeye alınmış ve genotipleri belirlenmiştir. Bunlardan 82'si genotip 1b, altısında 1a, altısında 3a, dördünde 2a/2c, üçünde 2a, birinde 4c/4d genotipleri belirlenmiş. Altı hastada ise mikst genotipe rastlanmış. Bunların 3'ü

genotip 1a+1b, ikisi genotip 1b+4a, biri ise genotip 1b+2a olarak belirlenmiştir (Keskin 2010).

Kore’de kan donörlerinde yapılan çalışmada (Oh 2012) 748 örneğin genotip tayini yapılmış ve bu hastalardan 357 (%47,7)’si genotip 1b, 262’si (%35,0) genotip 2a/2c ve diğerleri 129 (%17,2) olarak belirlenmiştir. Yan ve arkadaşlarının (2012) Çinde yaptıkları çalışmada ise HCV subtip 1b %32,9 oranı ile en sık görülen tip, ikinci sıklıkta subtip 3b (%18,9) ve daha sonra subtip 6a (%18) görülmüştür. Mısır’da Shemis ve arkadaşları (2012) çalışmalarında genotip 1a %1,43; genotip 1b %1,43; genotip 3a %4,28 ve genotip 4 (a-h) %92,86 oranlarını bulmuşlardır. İtalyada Marascio ve arkadaşları (2012) 11 yıl süren 2153 HCV RNA pozitif hasta ile yaptıkları çalışmada ise % 49,2 (1059) ile en yüksek oranda genotip 1b’yi tespit etmişlerdir. Daha sonra sırayla %22,4 (482) genotip 2a/2c, %7,4 (160) genotip 3 edilmiştir.

Bizim çalışmamızda toplam olarak 80 HCV RNA pozitif örneğin 65’inin genotiplemesi yapıldı. Bunlardan 59 örnek tip 1b, 2 örnek tip1a/1b, 1 örnek tip 3a, 1 örnek tip 4, 1 örnek tip 2a/2c ve 1 örnekte tip 1a bulundu. Tüm örnekler içinde tip 1b oranı %91’di. Çalışmamızdan sık belirlediğimiz genotip 1b Türkiye’de yapılan diğer çalışmalarla uyumlu bulunmuştur.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda elde edilen veriler ile vardığımız sonuçları şu şekilde sıralayabiliriz:

1. Günümüzde kan donörlerinde ve HCV şüpheli hastalarda kullanılan ve bir EIA yöntemi olan anti-HCV antikor testi yüksek sensitivitesi, birçok laboratuvarında çalışılması, ucuz olması, çok fazla teknik beceri gerektirmemesi ve testin kısa sürmesi nedenleriyle HCV enfeksiyonunda tarama testi olarak tercih edilecek bir yöntemdir.

2. Tarama testi olarak Anti-HCV antikor tespitinin sensitivitesi yüksek olsada spesifitesinin düşük olması, özellikle belli değerler altında yanlış pozitiflik oranı artması nedeniyle tamamlayıcı bir teste ihtiyaç duyulmaktadır. Günümüzde bu amaç için kullanılan immun blot testlerin spesifiteleri yüksektir. Fakat bu testlerden elde edilen şüpheli (indeterminant) sonuçların RNA ile doğrulanması gerekmektedir. SIT'lerin çalışma zorluğu, şüpheli sonuçların fazlalığı ve yüksek maliyet gibi dezavantajları vardır.

3. Anti-HCV EIA ve SIT negatif, HCV RNA'nın pozitif olduğu durumlarda yalancı negatif sonuçları; derin immunsupresyon, hemodiyaliz, agammaglobulinemi gibi hastalıklardır. Bu nedenle antikor üretiminin azaldığı durumlar antikor tabanlı testlerin yorumlanmasında sorunlara neden olmaktadır.

4. HCV RNA'nın tespiti, HCV enfeksiyonunun belirlenmesi açısından günümüzde altın standart olan yöntem olarak geçerliliğini korumaktadır. Önemli bir diğer avantajı da bu test ile saptanan viral yük ile hastalık şiddeti ve hastalığın progresyonu arasında bir ilişkinin mevcut olmasıdır.

5. HCV RNA'nın tespitinin dezavantajları ise; maliyetinin yüksek olması, zaman alıcı olması, yüksek teknik donanım ve teknik becerili personel gerektirmesidir. Ek olarak hepatit C virüsünün replikasyonun olmadığı dönemlerde yanlış negatif sonuç verebilmesidir.

6. Bu çalışmada bizim temel olarak tanı değerini araştırdığımız HCV kor antijen testi bir EIA yöntemidir. Bu test HCV RNA'ya hem tanı hem de hastalığın takibi açısından moleküler testlerin çalışılmadığı merkezlerde alternatif olabilir.

7. HCV kor antijen testi yüksek sensitivite ve spesifiteye sahiptir. Çalışmamızda HCV RNA negatif tespit edilip üç hafta sonra pozitifleşen iki hasta örneğinin kor antijeni reaktif olarak tespit edilmiştir. Kor antijen testinin bir diğer avantajı da maliyetidir. Kısa sürede tamamlanması, yüksek düzey teknik beceri ve eleman gerektirmemesi, birçok laboratuvarında uygulanabilmesi bu testin ek avantajlarıdır.

8. Kor antijen testinin özellikle düşük HCV RNA konsantrasyonu olan örneklerde yanlış negatif sonuçlar verebilmesi dezavantajdır.

9. HCV kor antijen testi; HCV enfeksiyonunun tanısı sırasında anti-HCV EIA pozitif test sonuçlarının konfirmasyonunda kullanılabilecek, sensitivitesi ve spesifitesi yüksek, kolay uygulanabilir, maliyet-etkin, güvenilir bir testtir.

10. HCV enfeksiyonunda genotipin belirlenmesi tedaviye yanıtın ve sürenin ve hastalığın progresyonunun en önemli belirteçlerindedir. Bu testlerin dezavantajları pahalı, zaman alıcı, spesifik moleküler biyoloji ekipmanları ve deneyimine ihtiyaç duyan testler olmasıdır.

11. Tüm bu sonuçlar beraber değerlendirildiğinde HCV enfeksiyonunun tanısında kullanılan testlerin yorumlanmasında; tüm yöntemlerin göz önünde bulundurulması, avantaj ve dezavantajlarının bilinmesi, hangi testin hastalığın hangi döneminde ve tanıda hangi aşamada kullanılması gerektiğinin iyi bilinmesi gerekmektedir.

Bu çalışmada kullanılan yöntemlerin verileri ülkemizde ve yurt dışında yapılan diğer benzer çalışmaların sonuçlarıyla beraber özetlenmiştir (Tablo 6.1, Tablo 6.2, Tablo 6.3).

Tablo 6.1: HCV kor antiijen testi calısmaları ve sonucları

Yıl	Araştırıcı	Yer	Toplam çalışılan örnek	HCV RNA Pozitif	HCV Kor Antiijen Pozitif	Sensitivite %	Spesifite %	PPD %	NPD %	Viral yük* IU/ml
YURT DIŐI										
2003	Saito	Japonya	155	155	152					<1700
2002	Bouvier- Alias	İsrail	124				99,2			<20.000
2003	Cano	İspanya	257	114	111	97,37	99,63			<13000
2004	Valcavi	İtalya	1009	604	572	94,7	99,5			<68700
2004	Agha	Özbekistan	246	246	234	94,3	95			
2009	Mederacke	Almanya	118	118	112		95			<4300
2007	Daniel	Hindistan	167	95	81	85,3	95,8	96,4	83,1	<10000
2010	Miedouge	Fransa	98	98	90	100	99,2			<6000
TÜRKİYE										
2011	Keşli	Konya	212	160	154	96,3	100	100	89,7	<6562
2008	Yüksel	İstanbul	171	123	116	94,3	97,9	99,1	87	<33,200
2010	Ankara	Ergünay	272	163	160	75,8	95,1			<775
2013	Çalışmamız	Konya	189	80	77	96,2	100	100	97,3	<2570

*Çalışılan örneklerde HCV kor antiijenin saptanabildiği en küçük RNA konsantrasyonu

Tablo 6.2: Anti-HCV EIA, HCV RNA testi, SIT sonuclarının karşılaştırılması

Yıl	Araştırıcı	Yer	Anti-HCV (+) örnek		HCV RNA(+)	SIT
			Sayı	S/Co	Sayı (%)	Sayı (%)
YURT DIŐI						
2003	Dufour	ABD	263	≤3,7		4(%2)
			140	>3,7	16(%11)	
2003	Thakur	Hindistan	34(KD)		6(%17)	9(%26)
			16(KKH)		16(%100)	16(%100)
2001	Carneiro	Brezilya	185		106(%57,3)	167(90,3)
TÜRKİYE						
2010	Acar	İstanbul	360			54(%15)
2009	Keşli	Konya	136		65(%47)	65(%47)
2012	Bizim çalışmamız	Konya	148		80(%54)	79(%53)

KD: Kan donörü **KKH:** Kronik karaciğer hastası

Tablo 6.3: Farklı çalışmalarda elde edilen genotiplerin dağılımı

Yıl	Araştırmacı	Yer	Çalışılan örnek	Tespit edilen genotip / sayı(%)						
				1a	1b	2a/2c	3a	3b	6a	4
YURT DIŐI										
2012	Oh	Kore	748		357 (%47,7)	262 (%35)				
2012	Yan	Çin	1137		398(%32,9)			228(%18,9)	218(%18)	
2012	Shemis	Mısır	72		1(%1,4)		3(%4,2)			38(%52,8)
2012	Marascio	İtalya	2153		1059(%49,2)	482(%22,4)				
TÜRKİYE										
2011	Gökahmetoğlu	Kayseri	146	5(%3)	77(%52)					52(%35,6)
2007	Ural	Konya	80		80(%100)					
2010	Keskin	İstanbul	108	6(55)	82(%75)		6(%5)			
2010	Çelik	Sivas	178	16(%8,99)	157 (%88,2)					
2012	Bizim çalışmamız	Konya	65	1 (%1,5)	59 (%91)	1 (%1,5)	1(%1,5)			1 (%1,5)

7. KAYNAKLAR

- Abdel-Moneim AS, Bamaga MS, Shehab GM, Abu-Elsaad AA, Farahat FM. HCV infection among Saudi population: high prevalence of genotype 4 and increased viral clearance rate. *PLoS One*. 2012;7(1):e29781
- Acar A, Kemahli S, Altunay H, Kosan E, Oncul O, Gorenek L, Cavuslu S. HBV, HCV and HIV seroprevalence among blood donors in Istanbul, Turkey: how effective are the changes in the national blood transfusion policies? *Braz J Infect Dis*. 2010; 14(1):41–6.
- Agha S, Tanaka Y, Saady N, Kurbanov F, Abo-Zeid M, El-Malky M, Khalaf et al. Reliability of hepatitis C virus core antigen assay for detection of viremia in HCV genotypes 1, 2, 3, and 4 infected blood donors: a collaborative study between Japan, Egypt, and Uzbekistan. *J Med Virol*. 2004; 73(2): 216–22.
- Alan F. HCV Transmission and Prevention. *HCSP*. 2008; 2(1)
- Alavian SM, Aalaei-Andabili SH. Lack of Knowledge About Hepatitis C Infection Rates Among Patients With Inherited Coagulation Disorders in Countries Under the Eastern Mediterranean Region Office of WHO (EMRO): A Meta-Analysis. *Hepat Mon*. 2012; 12(4): 244–52
- Ali A, Lal A. False positivity of serological tests for hepatitis C virus. *J Ayub Med Coll Abbottabad*. 2010; 22(2): 43–5.
- Alter HJ. To C or Not To C: These Are the Questions. *The Journal of The American Society of Hematology*. 1995;85(7): 1681-95
- Alter MJ. Epidemiology of hepatitis C. *Hepatology*. 1997; 26(3 Supply 1):62S-65S.
- Alter MJ. Epidemiology of hepatitis C virus infection. *World J Gastroenterol*. 2007; 13(17): 2436–41.
- Asher A, Page K. Can hepatitis C (HCV) transmission be prevented? *Fact Sheet*. 2010;35
- Aslan G, Ulukanlıgil M, Seyrek A. Şanlıurfa İlinde Hbsag, Anti-Hbs ve Anti-HCV Seroprevalansı. 2001; 7(3)
- Balat A, Durmaz B, Turgut M, Otlı B, Büyükberber S, Şavlı H ve ark. Kronik Hemodiyaliz Hastaları ile Bu Ünitelerde Çalışanlarda Hepatit B, C, D ve E Serolojik Göstergeleri. *Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi*. 1998; 2: 92–96
- Bartenschlager R, Lohmann V. Replication of hepatitis C virus. *Journal of General Virology*. 2000; 81: 1631–48.
- Barut HŞ, Günel Ö. Dünyada ve Ülkemizde Hepatit C Epidemiyolojisi. *Klimik Dergisi*. 2009; 22(2): 38–43.

- Blackard JT, Ma G, Welge JA, Martin CM, Sherman KE, Taylor LE, et al. Analysis Of A Non-Structural Gene Reveals Evidence of Possible Hepatitis C Virus (HCV) compartmentalization. *J Med Virol.* 2012; 84(2): 242–52.
- Bouvier-Alias M, Patel K, Dahari H, Beaucourt S, Larderie P, Blatt L, Hezode C, Picchio G, Dhumeaux D, Neumann AU, McHutchison JG, Pawlotsky JM. Clinical utility of total HCV core antigen quantification: a new indirect marker of HCV replication. *Hepatology.* 2002; 36(1): 211–8.
- Bulut N, Yenişehirli G, Bulut Y. Tokat İli Kan Donörlerinde Hepatit B, Hepatit C, HIV ve Sifiliz Seroprevalansı. *Viral Hepatit Dergisi* 2012; 18(1): 11–4
- Cano H, Candela MJ, Lozano ML, Vicente V. Application of a new enzyme-linked immunosorbent assay for detection of total hepatitis C virus core antigen in blood donors. *Transfus Med.* 2003; 13(5): 259–66.
- Carcamo WC, Nguyen CQ. Advancement in the development of models for hepatitis C research. *J Biomed Biotechnol.* 2012
- Carneiro MA, Martins RM, Teles SA, Silva SA, Lopes CL, Cardoso DD, et al. Hepatitis C prevalence and risk factors in hemodialysis patients in Central Brazil: a survey by polymerase chain reaction and serological methods. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2001; 96(6): 765–9
- Chamie G, Bonacini M, Bangsberg DR, Stapleton JT, Hall C, Overton ET, et al. Factors associated with seronegative chronic hepatitis C virus infection in HIV infection. *Clin Infect Dis.* 2007; 44(4): 577–83.
- Chevaliez S, Pawlotsky JM. Hepatitis C virus serologic and virologic tests and clinical diagnosis of HCV-related liver disease. *Int J Med Sci.* 2006;3(2): 35–40.
- Chevaliez S, Pawlotsky JM. Hepatitis C virus: virology, diagnosis and management of antiviral therapy. *World J Gastroenterol.* 2007 ;13(17): 2461-6.
- Chevaliez S. Virological tools to diagnose and monitor hepatitis C virus infection. *Clin Microbiol Infect.* 2011; 17: 116–21
- Çelik C, Bakıcı MZ, Kaygusuz R, Ertürk R. Sivas Yöresindeki HCV Genotip Dağılımlarının Araştırılması. *Viral Hepatit Dergisi.* 2010; 16(3): 106–10
- Daniel HD, Vivekanandan P, Raghuraman S, Sridharan G, Chandy GM, Abraham P. Significance of the hepatitis C virus (HCV) core antigen as an alternative plasma marker of active HCV infection. *Indian J Med Microbiol.* 2007; 25(1): 37–42.
- Depla M, d'Alteroche L, Le Gouge A, Moreau A, Hourieux C, et al. Viral Sequence Variation in Chronic Carriers of Hepatitis C Virus Has a Low Impact on Liver Steatosis. *PLoS ONE.* 2012; 7(3): e33749
- Dufour DR, Talastas M, Fernandez MD, Harris B, Strader DB, Seeff LB. Low-positive anti-hepatitis C virus enzyme immunoassay results: an important predictor of low likelihood of hepatitis C infection. *Clin Chem.* 2003; 49(3): 479–86

- Dussaix E, Charnaux N, Laurent-Puig P, Chopineau S, Laurian Y, Buffet C. Analysis of sera indeterminate by Ortho-HCV RIBA-2 by using three confirmatory assays for anti-hepatitis C virus antibody. *J Clin Microbiol.* 1994; 32(9): 2071-5
- Ergünay K, Sener B, Alp A, Karakaya J, Haşçelik G. Utility of a commercial quantitative hepatitis C virus core antigen assay in a diagnostic laboratory setting. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2011; 70(4): 486-91
- Forghieri F, Luppi M, Barozzi P, Maffei R, Potenza L, Narni F, Marasca R. Pathogenetic mechanisms of hepatitis C virus-induced B-cell lymphomagenesis. *Clin Dev Immunol.* 2012
- Forns X, Costa J. HCV virological assessment. *J Hepatol.* 2006; 44(1): 35-9.
- Germer JJ, Rys PN, Thorvilson JN, Persing DH. Determination of hepatitis C virus genotype by direct sequence analysis of products generated with the Amplicor HCV test. *J Clin Microbiol.* 1999; 37(8): 2625-30.
- Ghany MG, Strader DB, Thomas DL, Seeff LB. American Association for the Study of Liver Diseases. Diagnosis, management, and treatment of hepatitis C: an update. *Hepatology.* 2009; 49(4):1335-74
- Gökahmetoğlu S, Atalay MA, Kılınç Aytekin. Hepatit C Virüs Genotiplerinin Pirosekanslama Yöntemi ile Belirlenmesi. *Erciyes Tıp Dergisi.* 2011; 33(2): 99-102
- Gretch DR. Diagnostic tests for hepatitis C. *Hepatology.* 1997; 26(3 S): 43S-47S.
- Güzelant A, Kurtoğlu MG, Kaya M, Keşli R, Baysal. Kan Vericilerinde ve Bir Ağız-Diş Sağlığı Merkezi Çalışanlarında Hepatit B, Hepatit C Ve HIV Seroprevalansı ile Vericilerde Risk Faktörlerinin Araştırılması. *İnfeksiyon Dergisi.* 2008; 22 (4): 189-95
- Hofmann WP, Sarrazin C, Zeuzem S. Current standards in the treatment of chronic hepatitis C. *Dtsch Arztebl Int.* 2012;109(19): 352-8
- Holland CA, Pribyl TM. *Molecular Diagnostics: Techniques and Applications for the Clinical Laboratory* 1 ed. *Molecular Diagnostics for the Hepatitis C Virus.* 2010. 263-75.
- Hosseini-Moghaddam SM, Iran-Pour E, Rotstein C, Husain S, Lilly L, Renner E, Mazzulli T. Hepatitis C core Ag and its clinical applicability: potential advantages and disadvantages for diagnosis and follow-up? *Rev Med Virol.* 2012; 22(3): 156-65.
- Işıksal YF. Hepatit C Virüs Genotiplerinin Klinik Önemi. *Arşiv* 2003; 12: 378
- İnci M, Aksebzeci AT, Yağmur G, Kartal B, Emiroğlu M, Erdem Y. Hastane Çalışanlarında HBV, HCV ve HIV Seropozitifliğinin Araştırılması. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi.* 2009; 66(2): 59-66

- Jesudian AB, Gambarin-Gelwan M, Jacobson IM. Advances in the treatment of hepatitis C virus infection. *Gastroenterol Hepatol (N Y)*. 2012; 8(2): 91–101.
- Jonas G, Pelzer C, Beckert C, Hausmann Mi, Kapprell HP. Performance characteristics of the ARCHITECT® Anti-HCV assay. *Journal of Clinical Virology*. 2005; 34: 97–103
- Kaya S, Alanoğlu G, Polat M, Sipahi T. Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Kan Merkezi'nin 2000–2007 Yılları Tarama Test Sonuçları. *S.D.Ü. Tıp Fak. Derg.* 2009;16(2): 13-15
- Kapadia SB, Brideau-Andersen A, Chisari FV. Interference of hepatitis C virus RNA replication by short interfering RNAs. *PNAS*. 2003; 100(4):2014-8.
- Keskın F, Çıftçı S, Türkoğlu S, Badur S. Transmission routes of chronic hepatitis C and their relation to HCV genotypes. *Turk J Gastroenterol*. 2010; 21(4): 396-400.
- Kesli R, Ozdemir M, Kurtoglu MG, Baykan M, Baysal B. Evaluation and comparison of three different anti-hepatitis C virus antibody tests based on chemiluminescence and enzyme-linked immunosorbent assay methods used in the diagnosis of hepatitis C infections in Turkey. *J Int Med Res*. 2009; 37(5): 1420–9.
- Kesli R. Evaluation of assay methods and false positive results in the laboratory diagnosis of hepatitis C virus infection. *iMedPub Journals*. 2011; 2 (4): 1
- Kesli R, Polat H, Terzi Y, Kurtoglu MG, Uyar Y. Comparison of a newly developed automated and quantitative hepatitis C virus (HCV) core antigen test with the HCV RNA assay for clinical usefulness in confirming anti-HCV results. *J Clin Microbiol*. 2011; 49(12): 4089–93.
- Kesli R. An overview of the laboratory assay systems and reactives used in the diagnosis of hepatitis C virus (HCV) infections. In Abuelzein E ed. *Trends in Immunolabelled and Related Techniques*. InTech Publishing House, Rijeka, Croatia; 2012. p:339-350.
- Kim HS. Anti-HCV signal-to-cutoff ratio in predicting hepatitis C viremia. *Korean J Intern Med*. 2009; 24(4): 299–301.
- Kölgelier S, Ertek M, Erol S, Taşyaran MA. Erzurum ve Çevresinde Hepatit C Seroprevalansı. *Viral Hepatit Dergisi*. 2003; 8(3): 166–170
- Krajden M, Shivji R, Gunadasa K, Mak A, McNabb G, Friesenhahn M, et al. Evaluation of the core antigen assay as a second-line supplemental test for diagnosis of active hepatitis C virus infection. *J Clin Microbiol*. 2004; 42(9): 4054–9
- Kurtoğlu MG, Bozkurt H, Keşli R, Berktaş M. Hepatit C Virüs Seroprevalansının Yaş, Cinsiyet ve Hemodiyaliz Süresi ile İlişkisi. *Viral Hepatit Dergisi*. 2006; 11(3): 142–7

- Lloyd AR, Jagger E, Post JJ, Crooks LA, Rawlinson WD, Hahn YS, Ffrench RA. Host and viral factors in the immunopathogenesis of primary hepatitis C virus infection. *Immunol Cell Biol.* 2007; 85(1):24–32
- Lok ASF, Gunaratnam NT. Diagnosis Of Hepatitis C. *Hepatology Vol.* 1997; 26(3): 48–56
- Marascio N, Matera G, Quirino A, Giacotti A, Barreca GS, Lamberti AG, et al. Eleven-year distribution pattern of hepatitis C virus in southern Italy. *J Pathog.* 2012
- Mederacke I, Wedemeyer H, Ciesek S, Steinmann E, Raupach R, Wursthorn K, et al. Performance and clinical utility of a novel fully automated quantitative HCV-core antigen assay. *J Clin Virol.* 2009; 46(3): 210–5
- Miedouge M, Saune K, Kamar N, Rieu M, Rostaing L, Izopet J. Analytical evaluation of HCV core antigen and interest for HCV screening in haemodialysis patients. *J Clin Virol.* 2010; 48(1): 18–21.
- Morales JM, Campistol JM. Transplantation in the Patient with Hepatitis C. *J Am Soc Nephrol.* 2000; 11: 1343–53.
- Morota K, Fujinami R, Kinukawa H, Machida T, Ohno K, Saegusa H, Takeda K. A new sensitive and automated chemiluminescent microparticle immunoassay for quantitative determination of hepatitis C virus core antigen. *J Virol Methods.* 2009; 157(1): 8–14
- Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA. *Klinik Mikrobiyoloji. 9. Baskı. 2. Cilt.* Ankara: Atlas Kitapçılık; 2007
- Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. *Tıbbi Mikrobiyoloji. 6. Baskı.* Ankara: Atlas Kitapçılık; 2010
- Oh DJ, Park YM, Seo YI, Lee JS, Lee JY. Prevalence of hepatitis C virus infections and distribution of hepatitis C virus genotypes among Korean blood donors. *Ann Lab Med.* 2012; 32(3):210–5.
- Özdemir M, Baykan M. Kan Merkezine Başvuran Gönüllü Donörlerde Hepatit B, Hepatit C ve HIV Seroprevalansı. *Selçuk Tıp Derg.* 2005; 21: 1–4
- Öztürk C, Delialioğlu N. Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Kan Merkezi Donörlerinin Hbsag, Anti-HCV, Anti-HIV ve RPR Sonuçları. *Genel Tıp Derg.* 2001; 11(1): 29-31.
- Paraboni ML, Sbeghen MD, Wolff FH, Moreira LB. Risk factors for infection with different hepatitis C virus genotypes in southern Brazil. *Scientific World Journal.* 2012
- Pawlotsky JM, Prescott L, Simmonds P, Pellet C, Laurent-Puig P, Labonne C, et al. Serological determination of hepatitis C virus genotype: comparison with a standardized genotyping assay. *J Clin Microbiol.* 1997; 35(7): 1734–9.

- Pawlotsky JM. Use and interpretation of virological tests for hepatitis C. *Hepatology*. 2002; 36(5):65–73
- Richter SS. Laboratory Assays for Diagnosis and Management of Hepatitis C Virus Infection. *J. Clin. Microbiol.* 2002; 40(12):4407–12
- Sayan M, Meriç M, Mutlu B, Celebi S, Willke A. [Low positive anti-HCV microparticle enzyme immunoassay results: do they predict hepatitis C virus infection?]. *Mikrobiyol Bul.* 2006; 40(1–2): 81–4.
- Saito R, Yokota H, Takahashi E, Mashige F, Yoneyama A, Nakahara K, Okamura N. Performance of an automated system for quantitation of hepatitis C virus core antigen. *J Virol Methods.* 2003;112(1–2): 93–7.
- Seme K, Poljak M, Babic DZ, Mocilnik T, Vince A. The role of core antigen detection in management of hepatitis C: a critical review. *J Clin Virol.* 2005; 32(2): 92–101.
- Shemis MA, El-Abd DM, Ramadan DI, El-Sayed MI, Guirgis BS, Saber MA, et al. Evaluation of multiplex nested polymerase chain reaction for routine hepatitis C virus genotyping in egyptian patients. *Hepat Mon.* 2012; 12(4): 265–70.
- Sillanpaa M, Melen K, Porkka P, Fagerlund R, Nevalainen K, Lappalainen M, et al. Hepatitis C virus core, NS3, NS4B and NS5A are the major immunogenic proteins in humoral immunity in chronic HCV infection. *Virol J.* 2009; 6: 84
- Sosa-Jurado F, Santos-López G, Guzmán-Flores B, Ruiz-Conde JI, Meléndez-Mena D, Vargas-Maldonado MT, et al. Hepatitis C virus infection in blood donors from the state of Puebla, Mexico. *Virol J.* 2010; 7: 18.
- Sönmez E, Durmaz B, Tayfun E, Çınar Y, Şahin K, Aksüllü N. Turgut Özal Tıp Merkezi Çalışanlarında HBV, HCV ve HIV Serolojik Göstergeleri. *Turgut Özal Tıp Merkezi Dergisi.* 1996; 3(3): 151–4
- Suzuki T. Morphogenesis of infectious hepatitis C virus particles. *Front Microbiol.* 2012;3: 38
- Thakur V, Guptan RC, Arankale V, Sarin SK. Low Specificity of the Third Generation ELISA for HCV Detection in Voluntary Blood Donors in India. *EJIFCC.* 2003; 14(1)
- Tekerekoğlu MS, Ay S, Özerol İH, Bulut Y, Durmaz R. Malatya’da Hepait Şüpheli Kişiler ve Hemodiyaliz Hastalarında Hepatit C Virüsü Antikorlarının Seroprevalansı. *İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi.* 2001; 8(4): 205–7
- Ural O, Arslan U, Fındık D. Konya Bölgesinde Hepatit C Virusunu Genotip Dağılımı. *İnfeksiyon Dergisi.* 2007; 21 (4): 175–181
- Ustaçelebi Ş, Abacıoğlu H, Badur S. *Moleküler Klinik ve Tanısal Viroloji.* İstanbul: Nobel Kitabevi; 2004

- Valcavi P, Medici MC, Casula F, Arcangeletti MC, De Conto F, Pinardi F, et al. Evaluation of a total hepatitis C virus (HCV) core antigen assay for the detection of antigenaemia in anti-HCV positive individuals. *J Med Virol.* 2004; 73(3): 397–403
- Vermehren J, Susser S, Berger A, Perner D, Peiffer KH, Allwinn R, et al. Clinical utility of the ARCHITECT HCV Ag assay for early treatment monitoring in patients with chronic hepatitis C genotype 1 infection. *J Clin Virol.* 2012; 55(1): 17–22.
- Yan Z, Fan K, Wang Y, Fan Y, Tan Z, Deng G. Changing pattern of clinical epidemiology on hepatitis C virus infection in southwest china. *Hepat Mon.* 2012; 12(3):196–204.
- Ye J, Wang C, Sumpter R, Brown MS, Goldstein JL, Gale M. Disruption of hepatitis C virus RNA replication through inhibition of host protein geranylgeranylation. *PNAS.* 2003; 100 (26): 15865–70
- Yurtsever S, Güngör S, Afşar İ, Şener AG, Kurultay N, Türker M. Preoperatif Dönemdeki Hastalarda Hbsag, Anti-HCV, Anti-HIV Pozitiflik Oranları. *Nobel Med.* 2009; 5(1): 33–5
- Yuksel P, Caliskan R, Ergin S, Aslan M, Celik DG, Saribas S, Ziver T, Yalciner A, Kocazeybek B. New approaches to in vitro diagnosis of hepatitis C infection a reason for post transfusion hepatitis: Diagnostic value of determination of hepatitis C virus core antigen. *Transfus Apher Sci.* 2011;45(3): 247–50
- Zein NN. Clinical significance of hepatitis C virus genotypes. *Clin Microbiol Rev.* 2000; 13(2): 223–35.