

**TC
OSMANGAZI ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**REAL TIME REVERSE TRANSKRİPTAZ KANTİTATİF PCR
İLE SAPTANAN HCV-RNA İLE ANTi-HCV SONUÇLARININ
KARŞILAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Nilgün Kaşifoğlu

ESKİŞEHİR 2005

İÇİNDEKİLER

KISALTMALAR	2
GİRİŞ VE AMAÇ	3
GENEL BİLGİLER	6
GEREÇ VE YÖNTEM	22
BULGULAR	26
TARTIŞMA	30
SONUÇLAR	36
ÖZET	38
KAYNAKLAR	39

KISALTMALAR

ALT	: Alanin Amino Transferaz
Anti-HCV	: Anti-Hepatit C Virüs
AST	: Aspartat Amino Transferaz
bDNA	: Branched chain Deoksiribo Nükleik Asit
cDNA	: Komplementer Deoksiribo Nükleik Asit
ELISA	: Enzim İmmün Assay
HBV	: Hepatit B Virüs
HCV	: Hepatit C Virüs
HCV RNA	: Hepatit C Virüs Ribo Nükleik Asit
LDL	: Düşük dansiteli lipoprotein
NANB	: Non-A non-B
NTPaz	: Nükleotid Trifosfataz
ORF	: Open Reading Frame
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RIBA	: Rekombinant Immunoblot Test
RNA	: Ribo Nükleik Asit
RT-PCR	: Reverse Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu
UTR	: Translate edilmeyen bölge

GİRİŞ VE AMAÇ

Hepatit C virüsü, parenteral yolla bulaşan hepatitlerin önemli nedenlerinden birisidir. Hepatit C Virüsü (HCV)'nün yol açtığı C tipi viral hepatit dünyanın başlıca sağlık sorunlarından birisidir. Yaklaşık 170 milyon kişinin Hepatit C ile infekte olduğu tahmin edilmektedir. Ülkemizde anti-Hepatit C Virüs (Anti-HCV) antikorlarının pozitifliği yaklaşık % 1 kadardır.

Hepatit C virüsü kronik karaciğer hastalığının en önemli nedenlerinden birisidir. Ancak Hepatit C'nin akut dönemde tanımlanması oldukça güçtür. Bunun önemli nedeni akut hepatit C olgularının çoğunun anikterik ve belirtisiz seyretmesidir. Akut hepatit C olgularının % 25'inden daha azında ikter görülmekte, bu da olgularda erken tanıyı geciktirmektedir. Anti-HCV antikorlarının saptanabilir düzeye ulaşması ikter başlangıcından sonra olmaktadır. HCV ile infekte olan bir kişide antikor gelişimi yaklaşık 6-8 haftayı almaktadır. Bu evredeki tanı, serumda Hepatit C Virüs Ribo Nükleik Asit (HCV RNA)'inin saptanmasıyla olanaklıdır.

Akut hepatit C geçirenlerin yaklaşık % 25'i iyileşir, % 25'inde hafif karaciğer harabiyeti olur, kalan % 50'sinde ise karaciğer harabiyeti ilerleyici seyir gösterir. Bu hastalarda serum Alanin Amino Transferaz (ALT) düzeyi ya

sürekli yüksek kalır ya da aralıklarla yükselip alçalır. Serumdaki ALT düzeylerinde dalgalanmalar görülür (fluktuasyon). Ancak bazı hastalarda serum ALT düzeyleri normal sınırlar içinde seyreder.

Kronik Hepatit C tanısı konularının yarısında ise hiçbir semptom görülmemektedir ve serum ALT düzeyleri normal sınırlardadır. Tanı tesadüfen ya da başka nedenlerle yapılan testler sonucunda konur.

Hepatit C tanısında kullanılacak testler sınıflandırılabilir:

1. Tarama testleri
2. Moleküler testler
3. Genotiplendirme testleri

Tarama testi olarak anti-HCV antikorları bakılır. Bu testle immün sistemi baskılanmış hastalarda anti-HCV antikorlarını saptamak mümkün olmayabilir.

Moleküler testlerden ise en sık olarak reverse transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) ve branched chain Deoksiribo Nükleik Asit (bDNA) testleri kullanılır. RT-PCR düşük orandaki viral materyali saptamada güçlü bir testtir. Bulaştan 7-10 gün sonra pozitifleşir. Böylece anti-HCV antikorları oluşmadan da tanıya imkan verir.

İki tür RT-PCR testi vardır: kalitatif ve kantitatif. Kalitatif test pozitif

veya negatiflik hakkında bilgi vermektedir. Kantitatif test ise virüs miktarını ölçmektedir.

Hepatit C infeksiyonunun erken evresinde hastaların seronegatif olması ya da bazı olgularda serokonversiyonun uzun sürede gerçekleşmesi nedeniyle ve tedavi altındaki hastalarda viral yük takibinin gerekli olduğu durumlarda serolojik testlerin yanında moleküler biyolojik yöntemlerle HCV RNA'nın saptanması önemlidir.

Bu çalışmada, Real Time Reverse Transkriptaz kantitatif PCR ile saptanan HCV RNA ile anti-HCV sonuçlarının karşılaştırılması hedeflenmiş; parametrelerin, hastalardaki ALT ve Aspartat Amino Transferaz (AST) düzeyleriyle ilişkili olup olmadığı incelenmiştir.

GENEL BİLGİLER

1. HEPATİT C VİRUS

1.1.Tarihçe

Tip A ve tip B hepatitlere neden olan virüslerin bulunması ve bu virüslerle oluşan infeksiyonların tanısında serolojik testlerin gelişmesinden sonra, 1970'lerde post-transfüzyon hepatitlerin çoğundan sorumlu olan üçüncü bir tip tanımlanmıştır (1). Bu üçüncü tip hepatitin tanısı hepatite neden olan diğer virüslerin dışlanmasına dayandığı için non-A non-B (NANB) hepatit olarak adlandırılmıştır. Şempanzelerdeki erken çalışmalar NANB hepatitlerinden sorumlu olan ajan hakkında bilgi edinilmesini sağlamıştır (2,3).

Yapılan çalışmalar sonucu, HCV'nin, persistan infeksiyonlara neden olması, kronik hepatit, siroz ve hatta hepatoselüler karsinoma ile ilişkili bulunması ile hepatit B virüs (HBV)'e benzediği saptanmıştır (4).

HCV'deki dönüm noktası, 1989'da Houghton ve arkadaşlarının NANB hepatit ile deneysel olarak infekte edilmiş bir şempanzenin serumunda, viral komplementer deoksiribonükleik asit (cDNA) klonunu izole etmesidir (5). Bu cDNA, hastaların antikorları ile reaksiyona giren küçük bir protein fragman kodlar. Bu keşif HCV genomunun ilk identifikasyonunu sağlamıştır ve böylece anti-HCV için serolojik çalışmaların gelişmesinde başlangıç olmuştur (6). Tanıda ve kan donörlerinin HCV açısından taranmasında basit

ve güvenli bir test olan anti-HCV için enzim immün assay (ELISA) geliştirilmiştir. Daha sonra HCV'nin tek iplikli pozitif polariteli Ribo nükleik asit (RNA) virüsü olduğu gösterilmiş, Flaviviridae familyasında sınıflandırılmıştır.

HCV'nin ilk kez tanımlanmasından sonra virüsün moleküler yapısını belirlemede pek çok gelişme olmuştur. Altı major genotip tanımlanmış ve HCV quasispecies özelliklerinin, ilerleyici ve kronik karaciğer hastalığı ile ilişkisi araştırılmıştır (7).

1.2. Virüs Yapısı

HCV hakkında bilinen şeylerin çoğunluğu genomunun cDNA kopyalarının moleküler yolla klonlanmış analizlerinden elde edilmiştir. Bu çalışmalar göstermiştir ki HCV tek iplikli pozitif polariteli RNA virüsü olup genom uzunluğu yaklaşık olarak 9.4 kb'dir (8). HCV'nin yer aldığı Flaviviridae familyası yaklaşık 35-50nm çapında sferik, lipit zarflı virüslerdir. HCV, Flaviviridae familyasında sınıflandırılan pestivirüslere yakın benzerlik gösterir. HCV, flavivirüsler ve pestivirüslerin genomlarının yapısal ve organizasyon benzerlikleri baz alınarak; HCV, Flaviviridae familyasında üçüncü, bağımsız bir genus olarak sınıflandırılmıştır.

HCV genomu büyük, tek bir open-reading frame (ORF) içerir. ORF yaklaşık 3000 aminoasitten oluşan bir poliprotein kodlar. Yapısal proteinler 5' ucundan, yapısal olmayan proteinler ise 3' ucundan kodlanır. ORF'nin 5'

ve 3' uçlarında translate edilmeyen bölgeler bulunur (UTR). Bu bölgeler, viral proteinlerin translasyonunda ve viral genomun replikasyonunda gereklidir (9). 5' UTR virüs translasyonunu kontrol etmede kritik bir rol oynar ve HCV infeksiyonunun patogeneğinde önemli olabilir. ORF'nin kodladığı poliproteinin ilk bölgesi 21-kD'luk core (nükleokapsit) protein (C) ve iki zarf glikoproteini (E1 ve E2)'nden oluşan yapısal proteinleri kapsar. Bu proteinler, endoplazmik retikulumda bulunan sinyal peptidaz yoluyla poliproteinden ayrılır. HCV'nin C proteini endoplazmik retikulumun sitoplazmik tarafında kalır ve hepatit B'nin kor proteinine benzeyen internal viral yapısal protein olarak görünür. Virus replikasyonu esnasında ek proteolitik işlemlerden geçebilir. E1 ve E2 endoplazmik retikulum içerisine transloke olur ve golgi aparatosa geçerken glikozile hale gelir. Bu glikoproteinlerin HCV partikülünün lipid zarfında bulunduğu düşünülür (4,10).

HCV'nin çeşitli yapısal olmayan proteinleri viral replikasyon için gerekli enzimatik aktiviteyi sağlarlar. Bu proteinler NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B'dir. HCV'lerde flavivirüslerde bulunan NS1 bölgesi bulunmaz. HCV'nin yapısal olmayan proteinlerinin çoğunun yapısı ve fonksiyonu tanımlanmıştır (9):

NS2 polipeptidi, kısa, 23-kD'luk transmembran proteindir ve fonksiyon görebilmesi için çinkoya ihtiyaç duyan bir metalloproteazdır (11).

NS3 bölgesi iki ayrı ve önemli enzimatik aktivitesi olan 67-kD'luk bir proteini kodlar. N terminal ucu 181 amino asitlik proteaz, C terminal ucu 465 amino asitlik helikaz ve nükleotid trifosfataz (NTPaz)'dır. Proteaz ve helikaz domainlerinin her ikisi de antiviral aktivite için potansiyel hedef bölgeleridir.

NS4 proteini iki ürüne ayrılır; 6 kD ağırlığında NS4A ve 27 kD ağırlığında NS4B. NS4A, NS3 proteaz aktivitesinde kofaktördür. NS4B'nin fonksiyonu bilinmemekle beraber yakın zamanda NS5A'nın fosforilasyonunda kofaktör olduğu gösterilmiştir.

NS5 proteini de NS5A ve NS5B olarak iki parçaya ayrılır. NS5A'nın fonksiyonu bilinmemektedir, bununla birlikte bu bölgedeki mutasyonların replikasyonları arttırdığı görülmüştür. NS5B 68kD'luk RNA-bağımlı RNA polimerazdır ve virusun replikasyonundan sorumludur. NS5B de antiviral bileşiklerin potansiyel hedefidir (9).

1.3. Virüsün Replikasyonu

HCV replikasyonu moleküler düzeyde henüz tam olarak anlaşılamamıştır ve elde edilen bilgiler genellikle diğer flavivirüslere ait çalışmalardan kazanılmıştır. HCV karaciğerde replike olur. Replikasyondaki ilk basamak HCV'nin hücre yüzey reseptörlerine bağlanması ve ardından hepatosit içine alınıp viral genomun serbest kalmasıdır. HCV için reseptör tam olarak tanımlanmamış olmasına rağmen iki aday, CD81 ve düşük dansiteli lipoprotein (low density lipoprotein-LDL) reseptörüdür. CD81, C terminal

ucundaki E2'ye bağlanır (9,12,13). LDL reseptörünün in vitro olarak HCV partiküllerine bağlandığı gösterilmiştir ancak hücrelere virüs girişindeki rolü açık değildir (13).

Asidik endozomların içerisinde viral zarf ve nükleokapsit açılarak RNA serbest kalır. Viral enzimlerin replikatif kompleksleri sentezlendikten sonra HCV RNA molekülleri viral polimeraza bağlanır ve negatif iplikli RNA molekülleri sentezlenir. Negatif iplikli RNA molekülleri pozitif iplikli RNA sentezi için kalıp olarak kullanılır. Kor proteinden oluşan nükleokapsid pozitif iplikli viral RNA'ya bağlanır ve virion biraraya gelmiş olur. Endoplazmik retikulum membranındaki zarf proteinleri nükleokapsitle birleşir. Virion tamamen biraraya geldikten sonra konak hücresinden ekzositoz yoluyla dışarı salınır (9).

1.4.HCV'de Hücre Kültürleri

HCV'nin doku kültürlerinde üremesi halen mümkün değildir. HCV'nin memeli hücrelerinde belirli bir sayıya kadar ürettiği rapor edilmiş, ancak bu sistemlerdeki replikasyon düzeyinin replikatif siklusun doğru analizine imkan veremeyecek kadar az olduğu görülmüştür. Fakat yeni ve önemli bir avantaj HCV replikonların tanımlanmasıdır. Replikon memeli hücrelerinde otonom replikasyon yeteneği olan inkomplet HCV genomlarıdır (14). Bu replikonlar HCV'nin yapısal bölgelerinden yoksundurlar, ancak yapısal olmayan bölgelerini ve her iki 5' ve 3' UTR bölgelerini içerirler. Replikon

sistemi HCV replikasyonunu araştırmada kullanılabilir. Ayrıca HCV'ye karşı antiviral ajanların değerlendirilmesinde önemlidir. Bu sistem üzerindeki ileri alışmalar HCV için doku sistemlerinin gelişmesine katkıda bulunabilirler (15,16).

1.5. HCV Genotipleri, Quasispecies ve Viral Heterojenite

Bir ok RNA virüsünde olduğu gibi HCV'nin de genom düzeyinde değişkenliği fazladır. Bunun nedeni, RNA'ya bağımlı RNA polimerazların proofreading (düzeltme) aktivitelerinin olmamasıdır (17). HCV, aynı RNA sekansı ile tek bir virion türü yerine ayrı, fakat yakın ilişkili RNA sekansları topluluğu olarak dolaşır. Bu değişkenliğe quasispecies (türümsü) denir. Sekans değişkenliği viral genomun herhangi bir bölgesinde oluşabilse de bazı bölgeler korunur (5' ve 3' UTR ve core bölgesi). Bazı bölgeler de daha fazla değişkendir (E2'nin HVR1 ve HVR2 bölgeleri) (9).

Tüm genom dizilimleri belirlenmiş HCV suşları incelendiğinde, virusun genomu boyunca hemen hemen tüm bölgeleri kapsayan DNA veya protein dizisi benzerlikleri görülmüştür. Böylece grup ve alt gruplar halinde sınıflandırma yapılmıştır. Bu sınıflandırmaya göre de genotipler ortaya çıkmıştır. % 30'dan fazla sekans değişkenliği farklı genotipi gösterir. Genotipler 1 ile 6 arasındaki rakamlarla gösterilir. %10 ila % 30 değişiklik ise HCV'nin farklı subtiplerinin özelliğidir, bunlar da genotipten sonra küçük latin harfleri ile gösterilir. HCV'nin elliden fazla subtipi tanımlanmıştır. %1-

ila % 5'lik değişkenlik ise tek bir infekte hastada bulunan quasispecies farklılığının özelliğidir (9,17).

HCV'nin genotip ve subtiplerinin sınıflandırılması filogenetik analizlere dayanır (18). Çok sayıda genotip ve subtipler ile infeksiyon ortaya çıkabilir. Farklı genotiplerin dağılımında coğrafik değişiklikler görülür. Genotip 1 ve 2, dünyanın her yerinde görülür. Genotip 3 Hindistan'da ve Güney Asya'da, genotip 4 Afrika ve Ortadoğu'da, genotip 5 Güney Afrika'da ve genotip 6 Hong Kong ve Vietnam'da daha sıktır. Türkiye kaynaklı HCV suşlarının genotiplendirilmesi ile ilgili yapılmış çalışmalardan en sık olarak genotip 1b'nin görüldüğü tespit edilmiştir (17).

Viral farklılık ve sekans değişikliği HCV infeksiyonunun seyrinde büyük rol oynayabilir. Ancak bu faktörlerin rolü tam olarak açıklık kazanmamıştır. Quasispecieslerin değişkenliği HCV infeksiyonunun persistansında etkili olabilir. Ancak bu, kronik infeksiyonun nedeninden çok sonucudur (19).

1.6. Patogenez

Çoğu infekte bireyde, immün sistemin efektif antiviral yanıtı oluşturamaması nedeniyle HCV infeksiyonu persistan kalabilir. Yapılan çalışmalara göre hastalığın akut fazı süresince infekte bireylerin en az yüzde ellisi, hatta yüzde yetmiş ila doksanı virüsü dolaşımdan temizleyememektedir (4, 20). İnfeksiyondan sonra immün sistemin virüsü temizlemedeki başarısızlığının nedeni henüz bilinmemektedir.

İnfekte bireylerde genellikle core (C) proteinine ve pek çok yapısal olmayan protein antijenine karşı antikorlar gelişir. Ancak HCV'nin zarf glikoproteinlerini tanıyan antikorlar hakkında yeterli bilgi yoktur ve nötralizan (koruyucu) antikorlar tanımlanamamıştır. Çoğu enfeksiyona karşı immün yanıt erken doğal yanıt ve geç adaptif yanıt olarak ikiye ayrılabilir. Erken doğal yanıtta sitokinler, nötrofiller, makrofajlar ve natural killer hücreler yer alır. Adaptif yanıt ise virüse özgül yanıtları içerir ve B, T hücre yanıtları, antiviral antikor üretimi ile antijene özgül hücresel sitotoksisiteyi kapsar (9).

Akut hepatit C'nin erken immünolojik yanıtları deneysel olarak HCV ile enfekte edilmiş şempanzelerde araştırılmıştır. İnokülasyondan sonraki ilk hafta içerisinde serumda HCV RNA saptanabilmiştir. Aynı zamanda karaciğerde gen ekspresyonunda değişiklikler gözlenmiş, bu da doğal immün yanıtın aktivasyonunu yansıtmıştır (21).

1.7.HCV'de Hümmoral İmmünite

Akut hepatit C'nin seyri sırasında hastaların % 90'dan fazlasında anti-HCV oluşur ancak bazı durumlarda antikor oluşumu geç olabilir. HCV enfeksiyonlu hastaların iyileşmesi için anti-HCV gerekli değildir, çünkü agamaglobülinemili, akut hepatit C enfeksiyonundan iyileşen hastalar rapor edilmiştir (22). Ayrıca bazı hastaların hiç antikor geliştirmedeği ancak hafif ve kendini sınırlayan enfeksiyon geçirdikleri gözlenmiştir. Akut iyileşen

hepatit C infeksiyonu olan hastalardan farklı olarak, kronik infeksiyon gelişenlerde anti-HCV titreleri akut döneminin sonlarında artış gösterir. İyileşen hastaların uzun süreli takipleri, infeksiyondan yıllar sonra anti-HCV düzeylerinin düştüğünü, hatta saptanamayacak düzeylere geldiğini göstermiştir (23). Ancak kronik hepatit C'li hastaların çoğunda anti-HCV düzeyleri yüksek kalır. Bununla birlikte titre, hastalığın şiddeti ile korelasyon göstermez (9).

Anti-HCV, hepatit C'ye karşı tam koruyucu görünmemektedir. Deneysel olarak infekte edilmiş şempanzelerde ve çoklu maruz kalmış insanlarda anti-HCV varlığına rağmen reinfeksiyonlar gösterilmiştir (24,25).

1.8. Hepatit C'de Hücresel İmmünite

Hepatit C'nin seyrinde hücresel immünite ve T hücreleri, humoral immünite ve B hücrelerinden daha önemli rol oynar. Şempanzelerdeki ve insanlardaki akut hepatit C infeksiyonunun iyileşmesi CD8 sitotoksik T lenfosit yanıtı ile ilişkilidir (26). Hepatit C infeksiyonunda CD4 T hücre yanıtı da önemlidir. Yapılan çalışmalarda akut hepatit C'den iyileşen hastalarda güçlü T hücre proliferatif yanıtı görülmüş , kronik infeksiyon geliştirenlerde ise daha zayıf CD4 yanıtı saptanmıştır (27).

1.9. Prevelans ve insidans

HCV tüm dünyada yaygın olmakla birlikte ülkelere göre prevelans farklılıkları gösterir. Özellikle Ortadoğu ve Afrika ülkelerinde % 5'e yakın prevelans rapor edilmektedir. Kuzey Avrupa ve Amerika'da prevelans % 0,01-0,05 civarında olup ülkemizde kan donörlerinde sıklık % 0,3-1,8'dir (17). Genel popülasyonda HCV infeksiyonunun tam prevelansını değerlendirmek güçtür. Çünkü çoğu çalışma HCV infeksiyonu için yüksek veya düşük risk taşıyan seçilmiş gruplarda yapılmıştır.

Akut hepatit C infeksiyonlarının insidansını belirlemek ise yetersiz tanı ve raporlamaya bağlı olarak oldukça güçtür.

2. HEPATİT C İNFEKSİYONUNUN KLİNİK ÖZELLİKLERİ

2.1. Akut Hepatit C İnfeksiyonu

Akut hepatit C klinik olarak akut viral hepatitlerin diğer nedenlerinden ayrılamaz. Akut hepatit C infeksiyonunun seyri dört faza bölünebilir: inkübasyon, preikterik dönem, ikterik dönem ve iyileşme dönemi. Akut hepatit C'nin inkübasyon periyodu yaklaşık altı haftadır (15-75 gün). Başlangıç semptomları hepatit A veya hepatit B'den daha hafif olabilir. Hepatosellüler disfonksiyonun biyokimyasal göstergeleri olan serum ALT düzeyi ve bilirubin yükseklikleri hepatit C'de hepatit A veya B'den daha düşük olabilir (4). Transfüzyon alıcılarında yapılan prospektif çalışmalar,

akut hepatit C infeksiyonlarının % 75'ten fazlasının anikterik olduğunu göstermiş, ALT yükseklikleri için dikkatli inceleme yapılmazsa % 50 veya daha fazlasının gözden kaçabileceğini vurgulamıştır (28).

Akut hepatit C infeksiyonunun inkübasyon periyodu boyunca ve virüse maruz kaldıktan sonra bir ila iki hafta içerisinde serumda HCV RNA saptanabilir duruma gelir ve kademeli olarak artar. Sonraki dört ila on hafta içerisinde 10^5 - 10^7 genom / ml düzeylerinde pik yapar. Bu dönemde anti-HCV genelde saptanamaz (29). Preikterik faz serum aminotransferaz düzeylerinin artışı ile başlar. Semptomlar genellikle nonspesifiktir; yorgunluk, güçsüzlük, iştahsızlık, bulantı, subklinik ateş, sağ üst kadran ağrısı görülebilir. Akut hepatit C infeksiyonunda ekstrahepatik bulgular sık değildir. Semptomlar koyu renk idrarla başlayıp sarılıkla kendini gösterir. Semptomatik döneme geçildiğinde çoğu hasta HCV RNA pozitifdir, fakat sadece % 50-70 hastanın anti-HCV'si saptanabilir. Bu da akut hepatit C tanısında anti-HCV testinin göreceli olarak güvenilirliğini azaltır. İkterik fazın süresi ve şiddeti değişkendir. Sıklıkla klinik olarak iyileşme gözükür. Hepatit C sonucu fulminan hepatit nadirdir. İyileşme döneminde semptomlar sonlanır. HCV RNA saptanamaz düzeye geldikten sonraki birkaç hafta içerisinde serum transaminazları normale düşer, anti-HCV titreleri artar.

2.2.Fulminan Hepatit

HCV'nin direk olarak fulminan hepatite yol açtığına dair az sayıda kanıt vardır. Fulminan hepatitli hastalarda HCV enfeksiyonu varlığı nadiren gösterilmiştir. HCV ile ilişkili görünen fulminan hepatitler HCV genotipleri arasındaki virulans farklılığı nedeniyle olabilir (4).

2.3.Kronik Hepatit C İnfeksiyonu

Olay dekompanze siroz veya hepatoselüler karsinoma aşamasına gelmemişse, kronik hepatit C tanısı herhangi bir nedenle yapılan tetkikler sonucunda konmaktadır. Yani kronik hepatit C tanısı konulanların çoğunda yakınma yoktur. Tesadüfen saptanan anti-HCV pozitifliklerinin yarısından fazlasında serum ALT düzeyi normal sınırlar içindedir. ALT düzeyi normal olanların yarısından fazlasında ise serumda HCV RNA negatiftir (30).

Kronik hepatit C enfeksiyonu gelişen hastaların yaklaşık üçte birinde, hastalığın başlangıcında, akut hepatit C enfeksiyonuna benzer klinik semptomlar görülebilir. Bu dönemde hastaların kronik enfeksiyon geliştirip geliştirmeyeceği konusunda yardımcı olabilecek klinik ve biyokimyasal özellik yoktur. Kronik viremi gelişen hastalarda, hastalığın akut fazı boyunca HCV RNA titreleri yüksek seviyelere ulaşır ancak HCV RNA'nın kantitatif çalışmalarındaki değişkenlikler ve vireminin spontan dalgalanma göstermesi nedeniyle sonuçlar gidişatı tahmin etmede yardımcı olmayabilir

(29,31). Akut infeksiyonun geç fazlarında hastalarda viremi olmasına rağmen geçici HCV RNA negatiflikleri görülebilir.

2.4.Hepatoselüler Karsinoma

Yapılan çalışmaların çoğunda hepatit C'ye bağlı hepatoselüler karsinomanın ileri derecede karaciğer hastalığı olan vakalarda geliştiği gösterilmiştir. HCV'nin direk karsinojenik olduğu konusunda kesin bir veri yoktur (32).

HCV genotipleri ile hepatoselüler karsinoma gelişme riski arasında bir ilişkinin olduğu bildirilmektedir. Çalışmalarda, genotip 1b HCV ile kronik infeksiyonda risk daha fazla bulunmuştur. Ülkemizde yapılan çalışmalarda da HCV'ye bağlı hepatoselüler karsinomalı hastaların tümünde genotip 1b bulunmuştur (33).

3. HEPATİT C İNFEKSİYONUNUN TANISI

3.1.Serolojik Testler

HCV infeksiyonlarında infekte dokularda veya serumda direkt saptamak için yeterli miktarda viral antijen bulunamayabileceğinden, HCV infeksiyonu tanısı diğer viral hepatit tiplerinden değişkenlik gösterir. Anti-HCV saptanması amacıyla en çok kullanılan testler ELISA yöntemleridir. Birinci kuşak ELISA yöntemleri bakteriyel süperoksid dismutaz (c100-3 antijeni)'a

bağlanmış, primer olarak NS4 sekansını içeren rekombinant füzyon proteinine karşı antikoları ölçmekteydi (6). İkinci kuşak ELISA yöntemleri ek sentetik antijenler içerir ve c100-3'e olduğu kadar core (C) proteinine (c22-3 antijeni) ve yapısal olmayan protein NS3 (c33-C veya c200 antijenleri)'e karşı antikoları saptar (34). Core proteini yapısal bir protein olmasına rağmen bu ELISA yöntemleri virüs yüzeyine karşı oluşmuş antikoları saptamaz. Bu testler enfeksiyonu ölçer, ancak immüniteyi göstermezler.

Üçüncü kuşak ELISA yöntemleri HCV genomunun yapısal olan ve yapısal olmayan proteinlerine karşı oluşmuş antikoları saptamaya yöneliktir. Antijen olarak HCr43, c200, c100-3 ve NS5 içerir. HCr43 *Escherichia coli* bakterisinde eksprese edilmiş, rekombinant HCV proteindir. HCV core yapısal proteinini ve yapısal olmayan NS3 protein sekanslarını içerir. HCr43, HCV poliprotein amino asitlerinden 1-150 ve 1192-1457yi içeren füzyon proteindir. c200 *Saccharomyces cerevisiae* mayasında eksprese edilmiş rekombinant HCV proteindir. HCV genomunun NS3 ve NS4 bölgelerini kodlayan 1192-1931. aminoasitleri içerir. c200 süperoksit dismutazın 154 amino asitini içeren kimerik füzyon proteindir (5). c100-3 *Saccharomyces cerevisiae* mayasında eksprese edilmiş rekombinant HCV proteindir. HCV'nin yapısal olmayan proteinlerinden NS3 ve NS4 sekanslarını içerir. c100-3 süperoksit dismutazın 154 amino asiti, beş bağlayıcı amino asit, HCV poliproteininin 1569-1931. amino asitleri ve C terminal ucunda beş

bağlayıcı aminoasiti içeren kimerik füzyon proteinidir. NS5 *Saccharomyces cerevisiae* mayasından eksprese edilmiş rekombinant HCV proteinidir. HCV'nin yapısal olmayan proteinlerinden NS5 sekanslarını içerir. NS5 süperoksid dismutazın 154 amino asiti ve HCV poliproteininin 2054-2995. amino asitlerinden oluşan kimerik füzyon proteinidir. Solit fazda yukarıdaki antijenler kullanılarak serum örneklerinde anti-HCV aranır. Serum örneklerindeki anti-HCV, viral antijenlere bağlanır ve enzim işaretli anti-human IgG kullanılarak saptanır. Eklenen substrat ile enzim reaksiyona girer ve oluşan renkli ürün spektrofotometrede ölçülür. Örneğin optik dansitesinin negatif kontrollerle kıyaslanması ile anti-HCV miktarı ile ilişkili olan bir oran ortaya çıkar.

Birinci kuşak ELISA testlerinde yalancı pozitiflik oranı yüksekti. Düşük riskli hastalara uygulandığında pozitif prediktif değeri kötüydü. Yalancı pozitif testler özellikle otoimmün hastalığı olanlarda ve uzun süre saklanmış serum örneklerinde sık görülüyordu. İkinci kuşak ELISA testlerinin geliştirilmesi ile duyarlılık ve özgüllüğün her ikisi de artmış oldu. Birinci kuşak ELISA testleri ile kıyaslandığında ikinci kuşak testler akut hepatit C infeksiyonunda daha erken tanı sağlamıştır, çünkü C ve NS3 antijenlerine karşı oluşan antikorlar c100-3'e karşı oluşan antikorlardan daha erken saptanabilir (35). Ancak yapılan çalışmalara göre semptomların başlangıcından sonraki altı hafta içerisinde hastaların sadece % 70'de hepatit

C antijenlerine karşı antikorlar saptanabilmiştir (20). İkinci kuşak testlerden sonra geliştirilen üçüncü kuşak testlerle testlerin özellikleri geliştirilmiştir..

Düşük risk popülasyonlarına uygulanan ELISA testlerinde yalancı pozitif sonuçların sık olması nedeniyle HCV'ye spesifik antikorların nonspesifik reaktiviteden ayrılmasını sağlamak amacı ile bir strip testi geliştirilmiştir (RIBA- rekombinant immunoblot test). Bu test pozitif ELISA sonuçlarının doğrulanmasında kullanılmıştır. Bu testin birinci ve ikinci kuşak jenerasyonları ELISA'da kullanılan her bir antijenin bant olarak bulunduğu plastik striplerdir (36). Bu testler ELISA için tam olarak doğrulama testi olarak adlandırılmayabilir, çünkü ELISA'daki aynı rekombinant ve sentetik antijenleri içerir (4).

3.2.Moleküler Testler

HCV için rutin kültür metodları mümkün olmadığı için serumda viral RNA'nın saptanması virüsün kendisini temsil eder. Viral RNA'nın miktar olarak belirlenmesi hastalığın seyrini ve antiviral tedavinin etkinliğini değerlendirmede önemlidir (37). HCV RNA'nın test edilmesi aktif hepatit C infeksiyonunu göstermede direk yöntemdir (38). HCV RNA ölçümü için en sık kullanılan iki moleküler test reaksiyonu RT-PCR ve bDNA testleridir (39).

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda retrospektif olarak yapılmıştır.

Çalışmada, Ocak 2002 ile Aralık 2004 tarihleri arasında Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi'nin farklı servislerinden 508 sayıdaki hastadan istenen 690 sayıdaki test değerlendirilmiştir. Hastaların eş zamanlı olarak bakılan anti-HCV, HCV RNA durumları ile Aspartat Amino Transferaz (AST) ve ALT değerleri incelenmiştir.

Çalışmaya alınan bireylerin 258'i kadın, 250'si erkektir. Ortalama yaş 36.3 ± 1.8 yıldır. Hastalık süreleri ve aldıkları tedaviler araştırılmamıştır. Hastaların diğer viral hepatitlere ait markerları bakılmamıştır.

Mikrobiyolojik inceleme için kan örnekleri Beckton Dickinson (BD) Vacutainer marka hazır jelli tüplere alınmıştır. Alınan örnekler Heraeus Megafuge 1.0 R santrifüj cihazında 3000 devirde 5 dakika santrifüj edilerek serum örneği ayrılmıştır.

AST, ALT için kanlar, Beckton Dickinson (BD) Vacutainer marka hazır jelli tüplere alınarak, serumları ayrılmış; Roche/ Hitachi Modular marka cihazda, Roche marka kitler kullanılarak çalışılmıştır.

Anti-HCV bakılacak serum örnekleri, alındığı gün, Abbott AxSYM System cihazında, Abbott AxSYM System HCV version 3.0 (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL USA) kiti kullanılarak çalışılmıştır. Rekombinant HCr 43, c200, c100-3, NS5 HCV antijenleri içeren bu ELISA kiti ile olan çalışma, üretici firmanın önerilerine göre gerçekleştirilmiş, test sonuçları kalitatif olarak pozitif veya negatif şeklinde değerlendirilmiştir.

HCV RNA çalışılacak serum örnekleri ayrıldıktan sonra ekstraksiyon yapılana kadar -70°C 'de saklanmıştır. Viral RNA her bir serum örneğinin 140 μl 'sinden QIAamp viral RNA pürifikasyon protokolü (Qiagen) ile ekstrakte edilmiş, RNase içermeyen 50 μl su içerisinde çözündürülmüştür. RNA'lar çalışılana kadar -70°C 'de saklanmıştır. HCV RNA saptanırken Taqman teknoloji (Roche) ve ABI Prism 7700 (Perkin Elmer, USA) real-time sekans saptama sistemi kombine edilerek kullanılmıştır.

HCV'nin 5' UTR bölgesinin kantitasyonunun yapılması için Taqman teknoloji (Roche Molecular Diagnostics Systems) ile tek tüp RT-PCR kullanılmıştır. RT-PCR'da enzim olarak AmpliTaq DNA polimeraz

kullanılmıştır. PCR primerlerinin kalıba bağlanmasında dual işaretli florogenik hibridizasyon probu kullanılmıştır. Prob 5' ucunda floresan raporlayıcı (6-karboksiflorosein [FAM]) ve 3' ucunda floresan quencher (6-karboksitetrametilrodamin [TAMRA])'dan oluşmuştur. Prob intakt haldeyken raporlayıcı quencher tarafından baskılanmıştır. Hibridizasyon probunun nükleaz degradesyonu, raporlayıcıyı serbest hale getirmiş, floresan emisyonunda artış ortaya çıkmıştır. Sekans dedektörü kullanılarak (ABI Prism 7700) PCR amplifikasyonu boyunca artan floresan emisyon artışı ile amplifiye olmuş ürünün ölçümü yapılmıştır. Örneklerden alınan floresan, dedektörler tarafından saptanarak monitöre yansıtılmıştır (Şekil 1 ve 2).

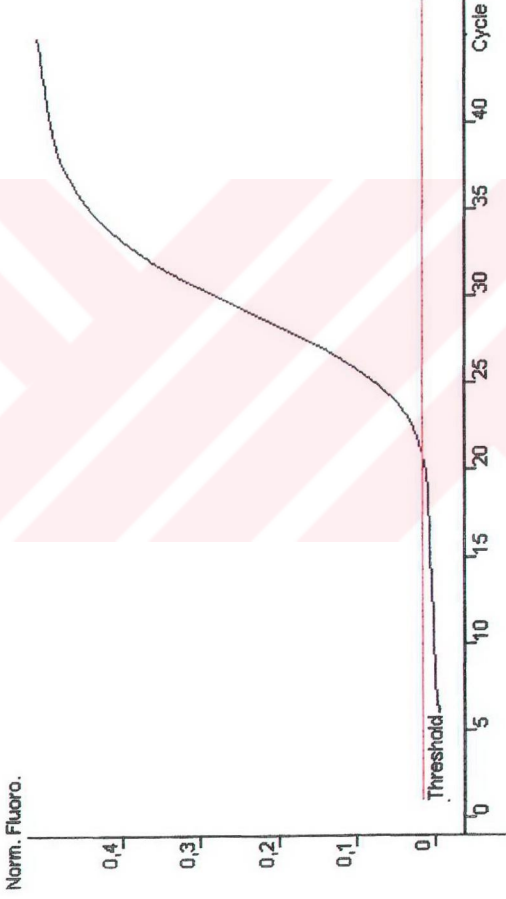
RT-PCR için reaksiyon karışımı tek bir tüpte şu şekilde hazırlanmıştır:

1X buffer A (50 mM KCL, 10mM Tris-HCl, 0.01mM EDTA, 60 nM Pasif Referans 1 [pH 8.3]), 5 mM MgCl₂ , 20 pmol primer C-149, 20 pmol primer C-342, her biri 0.3 mM konsantrasyonda dNTP'ler, 0.4 U/ µl RNaz inhibitörü, 0.4 U/ µl reverse transkriptaz, 0.025U/ µl *Taq* Gold polimeraz (enzimler ve buffer Perkin Elmer'dan edinilmiştir). PCR karışımına son konsantrasyonu 150 nM olacak şekilde florogenik prob [FT-275 5'-(FAM)CACCTATCAGGCAGTACCACAAGGCC(TAMRA)-3'] eklenmiştir. 10 µl serumdan elde edilmiş RNA veya dilüe edilmiş RNA standardı önceden 90°C'de 90 saniye denatüre edilmiş, bunların bulunduğu PCR tüplerine 40 µl reaksiyon karışımı ilave edilmiştir. HCV RNA, cDNA'ya reverse transkripte

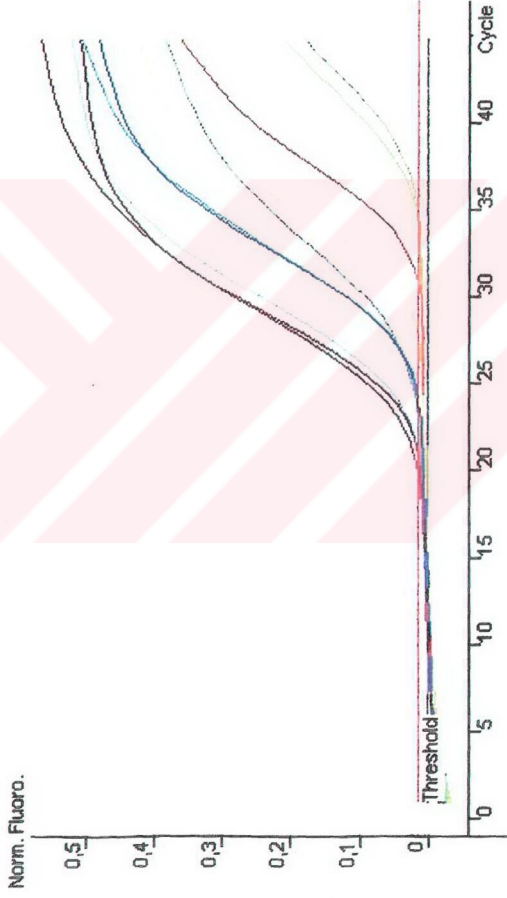
edilmiş (42°C’de 30 dakika), tek tüpte, spesifik oligonükleotidlerle (C-149 [sense primer], 5’-TGCGGAACCGGTGAGTACA-3’ ve C-342 [antisense primer], 5’-CTTAAGGTTTAGGATTCGTGCTCAT-3’) 40 siklus süresince (94°C’de 15 saniye ve 60°C’de 1 dakika) PCR’la amplifiye edilmiştir.

PCR kontaminasyonunu en aza indirmek amacıyla bazı önlemler alınmıştır: biri HCV RNA ekstraksiyonunun, diğeri PCR karışım hazırlanması ve diğeri işlemlerin yapıldığı iki ayrı oda kullanılmıştır. Ayrıca amplifiye olmuş ürün tekrar kullanılmamış, tüpün kapağı açılmadan atılmıştır.

İstatistiksel değerlendirme Fakültemiz Biyoistatistik Anabilim Dalında SPSS 11.5 paket programı kullanılarak yapılmıştır. Değerlendirmelerde Pearson Chi-Square, Linear-by-Linear Association ve General Loglinear testleri kullanılmıştır.



Şekil 1. Tipik amplifikasyon plot. Yatay eksen siklus sayısını, dikey eksen reportere gelen floresan sinyal düzeyindeki artışı gösterir.



Şekil 2. Birden fazla pozitif örneğin bulunduğu test grubunda amplifikasyon plotun görünümü.

BULGULAR

Çalışmaya dahil edilen 508 hastanın 690 örneğinden 455 (% 65.9)'inde anti-HCV pozitifliği belirlenmiştir. Bu 690 örneğin 235 (% 34.1)'inde ise anti-HCV negatif olarak bulunmuştur. Çalışmaya dahil edilen örneklerde anlamlı olarak daha fazla sayıda anti-HCV pozitifliği saptanmıştır ($p<0.001^{***}$).

Anti-HCV'si pozitif 455 örneğin 235 (% 51.6)'inde HCV RNA pozitif, 220 (% 48.4)'sinde negatif bulunmuştur. Anti-HCV'si negatif olan 235 örneğin 20 (% 8.5)'sinde HCV RNA pozitif olarak saptanmıştır. Bu 235 örneğin 215 (% 91.5)'inde anti-HCV negatif olarak bulunmuştur. Anti-HCV'si negatif olan 235 örnekte, anlamlı olarak daha fazla anti-HCV negatifliği görülmüştür ($p<0.001^{***}$)(Tablo 1).

Tablo 1. Ocak 2002- Aralık 2004 yılları arasında OGÜ Tıp Fakültesi'nde çeşitli bölümlerde takip edilen hastaların HCV RNA ve anti-HCV sonuçlarının karşılaştırılması

	Anti-HCV(+)	Anti-HCV(-)	Toplam
HCV RNA (+)	235	20	255
HCV RNA (-)	220	215	435
Toplam	455	235	690

Anti-HCV ve HCV RNA pozitif 235 örneğin 23 (% 9.8)'ünde, tek başına anti-HCV'si pozitif 220 örneğin 14 (% 6.4)'ünde, ikisi de negatif 215 örneğin 20 (% 9.3)'sinde tek başına ALT yüksekliği saptanmıştır.

Tek başına AST yüksekliği, anti-HCV ve HCV RNA pozitif 235 örneğin 8 (% 3.4)'inde, sadece anti-HCV pozitif 220 örneğin 5 (% 2.3)'inde, sadece HCV RNA pozitif 20 hastanın 2 (% 10)'sinde , ikisi de negatif olan 215 örneğin 8 (% 3.7)'inde saptanmıştır.

Her iki transaminazın da yüksek olduğu örnek sayısı, anti-HCV ve HCV RNA'nın pozitif olduğu 235 örnekte 137 (% 58.3), sadece anti-HCV'nin pozitif olduğu 220 örnekte 46 (% 20.9), sadece HCV RNA'nın pozitif olduğu 20 örnekte 10 (% 50), ikisinin de negatif olduğu 215 örnekte 79 (% 36.7) olarak bulunmuştur.

Anti-HCV ve HCV RNA'sı pozitif 235 örneğin 67 (% 28.5)'sinde, anti-HCV'si pozitif ancak HCV RNA'sı negatif 220 örneğin 155 (% 70.4)'inde, sadece HCV RNA'sı pozitif olan 20 örneğin 8 (% 40)'inde, her ikisi de negatif olan 215 örneğin 108 (% 50.3)'inde, karaciğer transaminazları normal olarak bulunmuştur (Tablo 2).

Tablo 2. Hastaların HCV markerları ile transaminaz düzeylerinin karşılaştırılması

	Anti HCV (+)		Anti HCV (-)		Toplam
	HCV RNA (+)	HCV RNA (-)	HCV RNA (+)	HCV RNA (-)	
Sadece ALT Yüksek	23	14	0	20	57
Sadece AST Yüksek	8	5	2	8	23
ALT ve AST Yüksek	137	46	10	79	272
Normal	67	155	8	108	338
Toplam	235	220	20	215	690

Anti-HCV'si pozitif olan toplam 455 örnekten 37'sinde tek başına ALT yüksekliği, 13'ünde sadece AST yüksekliği, 183'ünde her iki transaminazın yüksekliği görülürken, 222 örnekte transaminazlar normal olarak bulunmuştur. Her iki transaminazın yüksekliği veya normal görülmeleri, ALT veya ALT'nin tek başına yüksekliklerinden anlamlı olarak fazla bulunmuştur ($p < 0.001^{***}$).

HCV RNA pozitif 255 örnekten 23'ünde ALT yüksekliği, 10'unda AST yüksekliği, 147'sinde her iki transaminazın da yüksekliği saptanırken 75'inde normal sınırlar içinde transaminaz saptanmıştır. HCV RNA pozitif örneklere transaminaz yükseklikleri açısından anlamlı bir fark bulunamamıştır.

Anti-HCV'si ve HCV RNA'sı pozitif 235 örnekten 23'ünde ALT yüksekliği, 8'inde AST yüksekliği, 137'sinde ALT ve AST yüksekliği, 67'sinde normal transaminaz değerleri saptanmıştır. ALT ve AST yüksekliği, diğer gruplarla karşılaştırıldığında anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p < 0.01^{**}$).

TARTIŞMA

Dünyada, hepatit C virüs, siroz ve hepatoselüler karsinomaya yol açabilen kronik hepatitlerin major etyolojik ajanıdır (44). HCV infeksiyonlarının % 70-80'i kronikleşmekte, kronikleşen olguların da % 20-30'unda siroz ve hepatoselüler karsinoma ortaya çıkmaktadır (45).

Hepatit C'ye bağlı infeksiyonlarda rutin serolojik, biyokimyasal ve moleküler testler kullanılır (17). Hastalardaki anti-HCV pozitifliği hastalığın akut veya kronik ayrımını yapamamakta, vireminin prognozunu belirleyememektedir. Ayrıca hastalığın başlangıcında, henüz serokonversiyon gelişmeden bir süre negatif kalmaktadır (45).

Anti-HCV pozitifliğine dayanılarak yapılan çalışmalarda ülkeler ve bölgeler arasında farklılıklar bulunmuştur (46). Ülkemizde kan donörleri arasında bildirilen anti-HCV sıklığı % 1 civarındadır (32). Erden ve ark.'ın yaptığı çalışmaya göre rastgele seçilmiş 1157 kişide anti-HCV pozitiflik oranı % 2.4 olarak bulunmuştur (47). İtalya'da 3577 serum üzerinde yapılan bir çalışmaya göre ise, serumların 95 (% 2.7)'inde anti-HCV pozitifliğine rastlanmıştır (48).

Bu çalışmada 690 serum örneğinden 455 (% 65.9) 'inde anti-HCV pozitif bulunmuştur. Bu da özellikle seçilmiş hasta grubunda çalışılmış olmasından kaynaklanabilir.

HCV infeksiyonlarında anti-HCV antikorları hem tamamen iyileşen hem de kronikleşen hastalarda saptanabilir. Bu nedenle sadece bu laboratuvar bulgusuyla, geçirilmiş bir infeksiyonla aktif infeksiyon ayrımı yapılamaz. Ayrıca bazı olgularda antikor yanıtı geç oluşmakta ya da hiç oluşmamaktadır (49).

Anti-HCV pozitif olgularda HCV RNA incelemesi yapılarak hastaların viremik olup olmadıkları incelenebilir. HCV RNA miktarının değerlendirilmesi, özellikle kronik HCV infeksiyonlu hastalarda hastalığın seyri ve tedavi takibinde önemlidir (17).

Bununla birlikte HCV RNA negatifliği HCV infeksiyonunu tamamen dışlayamaz; çünkü HCV infeksiyonu sırasında viremi dalgalanmalar gösterir ve viremi olmayan dönemlerde bakılan HCV RNA sonuçları negatif olarak değerlendirilir (50). Bu yüzden hepatit olguları tek bir örnekle değerlendirilmemeli, aralıklarla izlenmelidir (45).

Biz, yaptığımız çalışmada, 455 anti-HCV pozitif örnekten 235 (%51.6)'inde HCV RNA'yı pozitif bulduk. Bu 455 örneğin 220 (% 48.4)'sinde ise HCV RNA negatifti. Gökahmetoğlu ve ark., anti-HCV pozitif 189 hastanın 69 (% 36.5)'unda HCV RNA'yı pozitif, 120 (% 63.5)'sinde negatif olarak bulmuştur. Çolak ve ark. anti-HCV pozitif olarak saptanan 58 örneğin 42 (%72.4)'sinde HCV RNA'yi pozitif bulmuşlardır (51). Sönmez ve ark. anti-HCV pozitif 100 serumun % 66'sında HCV RNA'yı pozitif bulmuşlardır (52).

Yapılan çalışmalarda, kronik hepatitli ve persistan anti-HCV antikorları olan hastalarda, dolaşımda, PCR ile saptanabilen HCV RNA'nın bulunabileceği gösterilmiştir, ancak yukarıda da değinildiği gibi bazı olgularda vireminin dalgalanma göstermesi nedeniyle aralıklı HCV RNA pozitiflikleri görülebileceği belirtilmiştir (4). Bu nedenle anti-HCV'si pozitif ancak HCV RNA'sı negatif olgular, iyileşmiş veya viremisi dalgalanma gösteren olguları temsil edebilir (45).

Çalışmamızda anti-HCV negatif bulunan 235 örneğin 20 (% 8.5)'sinde HCV RNA'yı pozitif, 215 (% 91.5)'inde negatif bulduk. Us ve ark.'ın yaptığı bir çalışmada, 202 serum örneği değerlendirilmiş, anti-HCV'si negatif olan 55 örneğin 15 (% 27.3)'inde HCV RNA pozitif, 40 (% 72.7) örnekte negatif bulunmuştur (49). Hepatit C infeksiyonu olan hastalarda, seronegatif evrede, tek başına anti-HCV testinin yeterli olmadığı görülmüştür. Hastalığın

başlangıcından antikor gelişene kadarki süre bazı olgularda 70 güne kadar uzayabilir(53). Ayrıca hastaların immünolojik sistemindeki değişikliklere bağlı olarak antikor oluşumunda gecikme ya da hiç antikor oluşturamama görülebilir (54). Bu nedenle hepatit C infeksiyonu düşünülen olgularda anti-HCV bakılmasının yanı sıra HCV RNA'nın da bakılması faydalı olabilir.

Bu çalışmada anti-HCV negatif olan 235 hastanın 215'inde HCV RNA da negatif bulunmuştur. Bu viremi ve antikor yanıtı olmayan hastaları gösterir. Bu hastalar hepatit C virüsü ile hiç karşılaşmamış olabilirler. Ancak,son yıllarda yapılmış olan bir çalışmada, HCV RNA'nın karaciğerde saptandığı ancak dolaşımda negatif olduğu ve anti-HCV'nin negatif olduğu okült hepatit C infeksiyonlarından bahsedilmektedir (54). Bu bilgi de HCV RNA açısından negatif bulunan hastalarda aktif HCV infeksiyonunu dışlayamayacağımızı gösterebilir.

Hepatit C virüsüne bağlı akut infeksiyonda karaciğer enzimlerinden ALT artışı çok fazla olmayabilir. Kronik hepatit C infeksiyonunda da sessiz dönemde ALT değerleri normal veya normale çok yakın olabilir. Bu nedenle normal ALT düzeyleri kronik hepatit C infeksiyonlarını dışlayamaz (55). Serum ALT düzeyi hepatit C'ye bağlı kronik karaciğer hastalığının şiddeti ile yakından ilişkili olmayabilir. Zira biyopsi ile doğrulanmış hepatit C'ye bağlı ağır karaciğer

hastalığı olanlarda bile normal ya da normale yakın ALT düzeyleri saptanmıştır (4).

Kronik hepatit C infeksiyonu olan hastalarda serum HCV RNA'sı ve ALT düzeyleri arasındaki ilişkiye bakan pek çok çalışma birbiriyle çelişen sonuçlar vermiştir (56). Serumda HCV RNA saptanmasına rağmen, hepatit C'ye bağlı kronik hepatit geliştirenlerin yaklaşık % 30'unda ALT düzeyleri normal olarak seyretmiştir (57,58).

Yapılan bir çalışmada HCV RNA'sı pozitif olan 85 hastanın 78'inde ALT düzeyleri bakılmış, bunların 32 (% 41)'sinde ALT düzeyi normal bulunurken, 46 (% 59) olguda ALT düzeyi yüksek olarak bulunmuştur (59). Sönmez ve ark. HCV RNA pozitif olguların çoğunda ALT ve AST düzeylerini yüksek bulmuştur (52). HCV RNA pozitif olgularda ALT düzeylerini normal bulan çalışmalar da mevcuttur (60).

Bizim yaptığımız çalışmada da, anti-HCV pozitifliği olan 455 örnekten 222 (% 48.8)'sinde transaminazlar normal olarak bulunmuştur. Ancak bu örneklerin 67 tanesinde HCV RNA pozitif bulunmuştur.

ALT ve AST'nin her ikisinin de yüksek olduğu 272 örneğin 79'unda anti-HCV ve HCV RNA negatifti. Çalışmamız retrospektif olduğu için hastalarda

HCV dışı viral hepatit varlığı, hepatotrop diğer virusların varlığı, karaciğer yağlanması ve ilaç kullanımına ait bilgiler elde edilememiştir.

Çalışma örneklerimiz içinde anti-HCV'si ve HCV RNA'sı pozitif olan 235 örneğin 137 (% 58.3)'sinde hem ALT'yi hem de AST'yi yüksek olarak bulduk. Bu rnekler hepatit C'ye bağlı infeksiyonda karaciğer hasarı olan grubu yansıtır.

Sonuç olarak bizim çalışmamız, anti-HCV'si negatif olan bazı olgularda HCV RNA'nın dolaşımda olabileceğini ve hepatit C'ye bağlı infeksiyonda karaciğer transaminazlarının normal değerlerde bulunabileceğini göstermiştir.

SONUÇLAR

1. Retrospektif olarak taranan örneklerden, anti-HCV pozitif örneklerin sayısı negatif örneklerin sayısından fazlaydı.
2. Retrospektif olarak taranan örneklerden, HCV RNA negatif örneklerin sayısı pozitif örneklerin sayısından fazlaydı.
3. ALT ve AST'nin beraber yüksek saptandığı örnek sayısı, tek başına AST veya ALT yüksekliği olan örnek sayısından daha fazla saptandı.
4. Anti-HCV pozitif olup HCV RNA'sı pozitif olan örnek sayısı, anti-HCV pozitif HCV RNA negatif olan örnek sayısından, anti-HCV negatif olup HCV RNA pozitif olan örnek sayısından, anti-HCV negatif olup HCV RNA negatif olan örnek sayısından yüksek bulunmuştur.
5. Anti-HCV pozitif olan örneklerden ALT ve AST'nin birlikte yüksek olduğu örnek sayısı, tek başına ALT veya AST yüksekliği olan örnek sayısından daha fazlaydı.
6. Anti-HCV pozitif olan örneklerden tek başına ALT veya AST yüksekliği olanların sayıları yönünden fark bulunamamıştır.

7. Anti-HCV pozitif olan örneklerden, karaciğer enzimleri normal olanların sayısı, tek başına ALT veya AST yüksekliği olanların sayısından ve ALT ve AST yüksekliği olanların sayısından daha fazla bulunmuştur.

8. HCV RNA pozitif olan örneklerden tek başına ALT veya AST yüksekliği olanlar, ALT ve AST yüksekliği olanlar ve transaminaz düzeyleri normal olanlar arasında farklılık olmadığı saptanmıştır.

9. Anti-HCV'si pozitif olup HCV RNA'sı da pozitif olan örnekler arasında ALT ve AST birlikte yüksekliği saptananlar, tek başına ALT veya AST yüksekliği saptananlardan ve transaminaz düzeyleri normal olanlardan daha fazla bulunmuştur.

ÖZET

Bu çalışmada, Real Time Reverse Transkriptaz kantitatif PCR ile saptanan HCV RNA ile anti-HCV sonuçları karşılaştırılmış; parametrelerin, hastalardaki ALT ve AST düzeyleriyle ilişkili olup olmadığı incelenmiştir.

Çalışmada, Ocak 2002 ve Aralık 2004 tarihleri arasında, Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi'nin farklı servislerinden 508 sayıdaki hastadan istenen 690 sayıdaki test değerlendirilmiştir. Hastaların eş zamanlı olarak bakılan anti-HCV, HCV RNA durumları ile AST ve ALT değerleri incelenmiştir.

Çalışma grubumuzda anti-HCV pozitif örnek sayısı anti-HCV negatif örnek sayısından daha fazla bulunmuştur.

Karaciğer enzim yüksekliği olan grup incelendiğinde her iki enzimin yüksek olduğu grup tek başına ALT veya AST yüksekliklerinden daha fazla bulunmuştur.

HCV RNA pozitif olan örneklerden, tek başına ALT veya AST yüksekliği olanlar, ALT ve AST yüksekliği olanlar ve transaminaz düzeyleri normal olanlar arasında farklılık olmadığı saptanmıştır.

Anti-HCV negatif olan örnekler içinde % 8.5 oranında HCV RNA pozitifliği saptanmıştır.

Anti-HCV negatif viremik hastaların bulunabileceği; özellikle şüpheli ve serokonversiyon gelişmeyen olguların değerlendirilmesinde PCR'in önemli bir test olabileceği düşünülmüştür.

KAYNAKLAR

1. Feinstone SM, Kapikian AZ, Purcell RH, et al. Transfusion-associated hepatitis not due to viral hepatitis type A or B. *N Engl J Med.* 1975;292:767-70.
2. Alter HJ, Holland PV, Purcell RH, et al. Transmissible agent in non-A, non-B hepatitis. *Lancet.* 1978;1:459-63.
3. Tabor E, Gerety RJ, Durucker JA, et al. Transmission of non-A, non-B hepatitis from man to chimpanzee. *Lancet.* 1978;1:463-6.
4. Lemon SM, Brown EA. Hepatitis C Virus. In Mandell, Bennett, Dolin, eds. *Principles and Practice of Infectious Diseases* 4th ed. New York, Churchill Livingstone, 1995; 1474-86.
5. Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, et al. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 244:359-362, 1989.
6. Kuo G, Choo QL, Alter HJ, et al. An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A, non-B hepatitis. *Science* 244:362, 1989.
7. Simmonds P: Variability of hepatitis C virus. *Hepatology* 21:570-583, 1995.
8. Ogata N, Alter MJ, Miller RH, et al. Nucleotide sequence and mutation rate of the H strain of hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1991;88:3392-6.
9. Hoofnagle JH, Heller T. Hepatitis C In Zakım, Boyer, eds. *Hepatology.* 4th ed. Philadelphia, Pennsylvania, Saunders, 2003; 1017-1062.

10. Hijikata M, Kato N, Ootsuyama Y, et al. Gene mapping of the putative structural region of the hepatitis C virus genome by *in vitro* processing analysis. Proc Natl Acad Sci USA. 1991;88:5547-51.
11. Santolini E, Pacini L, Fipaldini C, et al: The NS2 protein of hepatitis C virus is a transmembrane polypeptide. J Virol 69:7461-7471,1995.
12. Pileri P, Uematsu Y, Campagnoli S, et al: Binding of hepatitis C virus to CD81. Science 282:938-941, 1998.
13. Wunschmann S, Medh JD, Klinzmann D, et al: Characterization of hepatitis C virus (HCV) and HCV E2 interactions with CD81 and the low-density lipoprotein receptor. J Virol 74:10055-10062,2000.
14. Lohmann V, Korner F, Koch J, et al: Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. Science 285:110, 1999.
15. Blight KJ, Kolykhalov AA, Rice CM: Efficient initiation of HCV RNA replication in cell culture. Science 290:1972, 2000.
16. Krieger N, Lohmann V, Bartenschlager R: Enhancement of hepatitis C virus RNA replication by cell culture-adaptive mutations. J Virol. 75:4614-4624, 2001.
17. Türkoğlu S. HCV İnfeksiyonu: Viroloji ve Seroloji. Kılıçturgay K, Badur S ed. Viral Hepatit 2001 1. baskı. İstanbul, Viral Hepatitle Savaşım Derneği, 2001; 182-192.
18. Bukh J, Miller RH, Purcell RH: Genetic heterogeneity of hepatitis C virus: quasispecies and genotypes. Semin Liver Dis 15:41-63, 1995.

19. Ray SC, Wang YM, Laeyendecker O, et al: Acute hepatitis C virus structural gene sequences as predictors of persistent viremia: hypervariable region 1 as a decoy. *J Virol* 73:2938-2946, 1999.
20. Alter MJ, Margolis HS, Krawczynski K, et al. The natural history of community-acquired hepatitis C in the United States. *N Eng J Med.* 1992;327:1899-1905
21. Bigger CV, Brasky KM, Lanfort RE: DNA microarray analysis of chimpanzee liver during acute resolving hepatitis C virus infection. *J Virol* 75:7059, 2001.
22. Adams G, Kuntz S, Rabalais G, et al: Natural recovery from acute hepatitis C virus infection by agammaglobulinemic twin children. *Pediatr Infect Dis J* 16:533, 1997.
23. Takaki A, Wiese M, Maertens G, et al: Cellular immune responses persist and humoral responses decrease two decades after recovery from a single-source outbreak of hepatitis C. *Nat Med* 6:578-582, 2000.
24. Farci P, Alter HJ, Govindarajan S, et al: Lack of protective immunity against reinfection with hepatitis C virus. *Science* 258:135-140, 1992.
25. Lai ME, Mazzoleni AP, Argiolu F, et al: Hepatitis C virus in multiple episodes of acute hepatitis in polytransfused thalassasemic children. *Lancet* 343:388-390, 1994.
26. Cooper S, Erickson AI, Adams EJ, et al: Analysis of a successful immune response against hepatitis C virus. *Immunity* 10:439-449, 1999.

27. Gerlach JT, Diepolder HM, Jung MC, et al: Recurrence of hepatitis C virus after loss of virus-specific CD4(+) T cell response in acute hepatitis C. *Gastroenterology* 117:933-941, 1999.
28. Aach RD, Stevens CE, Hollinger FB, et al: Hepatitis C virus infection in postransfusion hepatitis-an analysis with first- and second-generation assays. *N Eng J Med.* 1991;325:1325-9.
29. Alter HJ, Sanchez-Pescador R, Urdea MS, et all: Evaluation of branched DNA signal amplification for the detection of hepatitis C virus RNA. *J Viral Hepat* 2: 121-132, 1995.
30. Mert A, Şentürk H, Tabak F, ve ark. Anti-HCV pozitifliği saptanan kan donörlerinin değerlendirilmesi.2. Ulusal Hepatoloji Kongresi Kitapçığı 1997: 14 (P54).
31. Thimme R, Oldach D, Chang KM, et al: Determinations of viral clearance and persistance during acute hepatitis C virus infection. *J Exp Med* 194: 1395-1406,2001.
32. Akkız H. *Epidemiyoloji ve Korunma*. Kılıçturgay K, Badur S ed. *Viral Hepatit 2001*. 1. Baskı. İstanbul, Viral Hepatitle Savaşım Derneği, 2001; 193-208.
33. Akkız H, Çolakoğlu S, Ergün Y, ve ark. Hepatoselüler karsinomalı hastalarda anti-HCV seroprevalansı. *Ulusal Gastroenteroloji Kongresi 1993*, Bursa.

34. Alter HJ. New kit on the block: Evaluation of second-generation assays for detection of antibody to the hepatitis C virus. *Hepatology*. 1992; 15: 350-3.
35. Farci P, London WT, Wong DC, et al: The natural history of infection with hepatitis C virus (HCV) in chimpanzees: comparison of serologic responses measured with first- and second-generation assays and relationship to HCV viremia. *J Infect Dis*. 1992; 165:1006-11
36. van der Poel CL, Cuypers HTM, Reesink HW, et al. Confirmation of hepatitis C virus infection by new four-antigen recombinant immunoblot assay. *Lancet*. 1991;337:317-9.
37. Wilber J.hepatitis C and G Viruses. In Murray, Baron, Pfaller, Tenover, Tenover, eds. *Manuel of Clinical Microbiology*. 7th ed. Washington, ASM Press, 1999; 1043-1052.
38. Gretch DR: Diagnostic tests for hepatitis C. *Hepatology* 26:43S-47S, 1997.
39. Ustaçelebi Ş, Ergünay K: Hepatit C virüsü, Moleküler, Klinik ve Tanısal Viroloji, 1.baskı, s:203 Güneş Kitabevi, Ankara, 2004.
40. Erlich HA. PCR Technology. *Molecular Biology and Biotechnology*. (Edit. by Robert A. Meyers), VCH Publishers USA, 641-648, 1990.
41. Newton CR, Graham A. PCR, Bios Scientific Publishers Limited, Oxford UK, 1994.
42. Arı Ş: DNA'nın polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile çoğaltılması. *Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler*, Temizkan G, Arda N. 2. baskı, s:101-120 Nobel Tıp Kitapevleri, 2004.

43. Shindo M, Di Bisceglie AM, Cheung L, et al: Decrease in serum hepatitis C viral RNA during α -interferon therapy for chronic hepatitis C. *Ann Intern Med.* 1991; 115: 700-4.
44. Hanuka N, Sikuler E, Tovbin D, et al: Hepatitis C virus infection in renal failure patients in the absence of anti-hepatitis C virus antibodies. *J Viral Hepat.* 2002;9:141-145.
45. Gökahmetoğlu S, Aygen B, Gürsoy Ş, ve ark: Anti-HCV pozitif hastalarda HCV RNA varlığının değerlendirilmesi. *Viral Hepatit Derg.* 2002 ;1: 444-446.
46. Di Biceglie AM. Hepatitis C. *Lancet* 1998; 251: 351-355.
47. Erden S, Buyukozturk S, Calangu S, et al: A study of serological markers of hepatitis B and C viruses in Istanbul, Turkey. *Med Princ Pract.* 2003 Jul-Sep; 12(3):184-8.
48. Ansaldi F, Bruzzone B, Salmaso S, et al: Different seroprevalence and molecular epidemiology patterns of hepatitis C virus infection in Italy. *J Med. Virol.* 2005 Jul; 76 (3): 327-32.
49. Us T, Akgün Y, Kural M: RT-PCR ve üçüncü kuşak ELISA yöntemleri ile saptanan HCV RNA ve anti-HCV sonuçlarının karşılaştırılması. *Viral Hepatit Derg.* 2001; 2: 298-301.
50. Freucht HH, Zöllner B, Polywka S, et al: Study on reliability of commercially available hepatitis C virus antibody tests. *J Clin Microbiol* 1995,33:620-624.

51. Çolak D, Ögünç D, Gültekin M, et al: Hepatit C virüs (HCV) infeksiyonu tanısında Enzim Immunoassay (EIA), Immunoblot (IB) ve Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) yöntemlerinin karşılaştırılması. *Viral Hepatit Derg.* 1998;1:5-8.
52. Sönmez E, Kızılkaya N, Taşyaran MA ve ark: Hepatit C virusu RNA pozitifliğinin karaciğer fonksiyon testleri ile ilişkisi. *Klimik Derg.*,1996;9:44-46.
53. el-Sayed Zaki M, el-Adrosy H: Recent approach for diagnosis of early HCV infection. *Egypt J Immunol.* 2004; 11(1): 123-9.
54. Castillo I, Pardo M, Bartolome J, et al: Occult hepatitis C virus infection in patients in whom the etiology of persistently abnormal results of liver-function tests is unknown. *J Infect Dis* 2004; 189:7-14.
55. Rumi MG, Colombo M, Gringeri A, et al: High prevalence of antibody to hepatitis C virus in multitransfused hemophiliacs with normal transaminase levels. *Ann Intern Med.* 1990; 112:379-380.
56. Ghany MG, Chan TM, Sanchez-Pescador R, et al: Correlation between serum HCV RNA and aminotransferase levels in patients with chronic HCV infection. *Dig Dis Sci.* 1996 Nov; 41(11): 2213-8.
57. Leone N, Rizzetto M: Natural history of hepatitis C virus infection: from chronic hepatitis to cirrhosis, to hepatocellular carcinoma. *Minerva Gastroenterol Dietol.* 2005 Mar; 51(1):31-46.
58. Hoofnagle JH: Course and Outcome of Hepatitis C. *Hepatology*; 36:5 S21-S29, 2002.

59. Alberti A, Noventa F, Benvegnú L, et al: Prevalence of liver disease in a population of asymptomatic persons with hepatitis C virus infection. *Ann Intern Med.* 2002; 137:961-964.

60. Silini E, Bono F, Cerino A, et al: Virological features of hepatitis C virus infection in hemodialysis patients. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 2913-2917.

