

T.C.
AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**TÜRKİYE’DE, HEPATİT C ENFEKSİYONUNUN
LABORATUVAR TANISINDA KULLANILAN
İMMUNOASSAY METODUNA DAYALI FARKLI ANTİ-HCV
KİTLERİNİN TANI DEĞERLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Arş. Grv. Dr. Özgül ÇETİNKAYA

DANIŞMAN
Doç. Dr. Recep KEŞLİ

AFYONKARAHİSAR 2015

T.C.
AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Tez Başlığı : Türkiye’de, Hepatit C Enfeksiyonunun Laboratuvar Tanısında Kullanılan İmmunoassay Metoduna Dayalı Farklı Anti-HCV Kitlerinin Tanı Değerlerinin Araştırılması

Tezi Hazırlayan : Arş. Grv. Dr. Özgül ÇETİNKAYA

Tez Savunma Tarihi: 10.12.2015

Tez Kabul Tarihi : 10.12.2015

Tez Danışmanı : Doç. Dr. Recep KEŞLİ

İş bu çalışma jürimiz tarafından Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı’nda Tıpta Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

BAŞKAN

Doç. Dr. Recep KEŞLİ

ÜYE

Doç. Dr. Gülşah AŞIK

ÜYE

Doç. Dr. Aynur GÜLCAN

ONAY

DEKAN

Prof. Dr. Ahmet SONGUR

Bu çalışma 14.TUS.13 nolu projeyle Afyon Kocatepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından desteklenmiştir.

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım Anabilim Dalı Başkanımız ve tez danışmanım Doç. Dr. Recep KEŞLİ'ye, meslek hayatıma katkılarından dolayı Doç. Dr. Gülşah AŞIK'a, Yrd. Doç. Dr. Merih ŞİMŞEK'e, tezimin yazım aşamasına katkılarından dolayı Doç. Dr. Aynur GÜLCAN'a ve eğitimimin ilk iki yılını tamamladığım Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı hocalarımız Prof. Dr. Arzu SAYINER, Prof. Dr. Aydan ÖZKÜTÜK, Prof. Dr. Hakan ABACIOĞLU, Prof. Dr. Hüseyin BASKIN, Prof. Dr. İsmail Hakkı BAHAR, Prof. Dr. Mehmet Ali ÖKTEM, Prof. Dr. Mine DOLUCA DERELİ, Prof. Dr. Nuran ESEN, Prof. Dr. Özlem YILMAZ, Prof. Dr. Zeynep GÜLAY, Doç. Dr. Alpay ÖZBEK, Doç. Dr. Cem ERGON, Doç. Dr. Meral KARAMAN, Yrd. Doç. Dr. Yavuz UÇAR'a ve istatistiksel verilerimin yapılmasında emeği geçen Doç. Dr. Nurhan DOĞAN ve Arş. Grv. Dr. Hasan Nadir RANA'ya ve eğitimim boyunca birlikte çalıştığım tüm asistan arkadaşlarıma ve mikrobiyoloji laboratuvarlarının tüm çalışanlarına teşekkürlerimi sunarım.

Sonsuz desteklerini her zaman yanımda hissettiğim çok değerli eşim Ersan ÇETİNKAYA'ya ve aileme en içten teşekkürlerimi sunarım.

Özgül ÇETİNKAYA

İÇİNDEKİLER

KISALTMALAR.....	IV
TABLOLAR ÇİZELGESİ.....	VI
ŞEKİLLER ÇİZELGESİ.....	VII
I-GİRİŞ.....	1
II-GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. HCV VİROLOJİK ÖZELLİKLERİ.....	2
2.2. HCV GENOTİPLERİ.....	5
2.3. HCV EPİDEMİYOLOJİSİ.....	6
2.4. HCV YAŞAM SİKLUSU.....	7
2.4.1. VİRÜSÜN HÜCREYE GİRİŞİ.....	8
2.4.2. TRANSLASYON VE POLİPROTEİN ÜRETİMİ.....	8
2.4.3. REPLİKASYON.....	9
2.4.4. HÜCREDEN SALINMA.....	9
2.5. PATOGENEZ VE BAĞIŞIK YANIT.....	9
2.6. HCV ENFEKSİYONU VE KLİNİĞİ.....	10
2.7. HCV BULAŞ YOLLARI VE KORUNMA.....	11
2.8. HCV ENFEKSİYONUNUN TANISI.....	12
2.8.1. İNDİREK TANI YÖNTEMLERİ.....	12
2.8.1.1. ANTİKOR TESTLERİ.....	12
2.8.1.2. DESTEKLEYİCİ TESTLER.....	15
2.8.1.3. HIZLI, HASTABAŞI (POINT-OF-CARE,POC) TARAMA TESTLERİ.....	16
2.8.2. DİREK TANI YÖNTEMLERİ.....	17
2.8.2.1. HCV CORE ANTİJEN TESTİ.....	17
2.8.2.2. MOLEKÜLER HCV TESTLERİ.....	18
2.8.2.2.1. KALİTATİF HCV RNA TESTLERİ.....	18
2.8.2.2.2. KANTİTATİF HCV RNA TESTLERİ.....	19
2.8.2.2.3. GENOTİPLEME TESTLERİ.....	20
2.9. HCV ENFEKSİYONUNUN TEDAVİSİ.....	20

III-GEREÇ VE YÖNTEM.....	22
3.1. ANTİ-HCV TESTLERİ.....	22
3.2. HCV CORE ANTİJEN TESTİ.....	24
3.3. HCV RNA TESTİ.....	24
3.4. STRİP IMMUNBLOT TESTİ.....	26
3.4.1. SOLÜSYONLARIN HAZIRLANMASI.....	27
3.4.2. TEST PROSEDÜRÜ.....	27
3.4.3. TESTİN DEĞERLENDİRİLMESİ.....	28
3.5. İSTATİSTİKSEL ANALİZ.....	29
IV-BULGULAR.....	30
V-TARTIŞMA.....	48
VI-SONUÇLAR.....	67
VII-ÖZET.....	70
VIII-SUMMARY.....	72
IX-KAYNAKLAR.....	75

KISALTMALAR

ALT:	Alanin Aminotransferaz
bdNA:	dallı DNA
CAP/CTM:	Cobas Ampliprep/Cobas TaqMan
CDC:	Centers for Disease Control and Prevention
cDNA:	Komplementer DNA
CIA:	Kemilüminesans Immunoassay
CLDN:	Claudin-1
CMIA:	Kemilümünasans Mikropartükül Immunoassay
COI:	Cut-off Index, Eşik İndeks
dNTPs:	Deoksinükleotid Trifosfat
DSÖ:	Dünya Sağlık Örgütü
ECLIA:	Elektrokemilüminesans Immunoassay
EGFR:	Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
EIA:	Enzim Immunoassay
EphA2:	Ephrin Reseptör A2
ER:	Endoplazmik Retikulum
FDA:	Food and Drug Administration
HAV:	Hepatit A Virüsü
HBV:	Hepatit B Virüsü
HCV:	Hepatit C Virüsü
HSK:	Hepatosellüler Karsinom
HVR-1:	High Variable Region-1
IFN:	Interferon
IRES:	Internal Ribozomal Entry Site
ISDR:	Interferon Sensitivity Determining Region
IU:	Uluslararası Ünite
LDLR:	Düşük Dansiteli Lipoprotein
MHCII:	Major Histokompatibilite Kompleks Sınıf II
NANBH:	Non-A Non-B Hepatit
NK:	Doğal Öldürücü Hücre

NPC1L1: Niemann-Pick C1-like 1 Kolesterol Absorbsiyon Reseptörü

NPD: Negatif Prediktif Değer

NTR: Non-translated Region

OCLN: Occludin

ORF: Open Reading Frame

PAMPs: Patojen İlişkili Moleküler Patern

PCR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu

PegIFN: Pegile Interferon

PI4KIII α : Fosfotidilinozitol 4 Kinaz III α

POC: Point-of-Care

PPD: Pozitif Prediktif Değer

QS: Kantitasyon Standart

RIBA: Recombinant Immunblot Assay

S/Co: Sinyal/Cut-off

TLRs: Toll Like Reseptör

TMA: Transkripsiyon Aracılı Amplifikasyon

TABLÖLAR ÇİZELGESİ

Tablo I: Anti-HCV saptamada kullanılan ticari testler.....	13
Tablo II: 179 örneğin çalışmaya alınan testlere göre sonuçları.....	31
Tablo III: Anti-HCV testlerinin birbiriyle karşılaştırılması ve % uyumları.....	32
Tablo IV: HCV RNA ile kıyaslandığında çalışılan testlerin performansları.....	38
Tablo V: 179 örneğin anti-HCV ve <i>recomLine</i> HCV IgG sonuçlarına göre dağılımları.....	46
Tablo VI: Innostest çalışılan 57 hastanın HCV RNA, HCV core antijen ve <i>recomLine</i> HCV IgG sonuçları.....	47

ŞEKİLLER ÇİZELGESİ

Şekil 1: Hepatit C virüsünün genom yapısı.....	3
Şekil 2: A. Akut HCV enfeksiyonunun serolojik özellikleri, B. Kronik HCV enfeksiyonunun serolojik özellikleri.....	11
Şekil 3: Hepatit C virüsü enfeksiyonunun tanımlanması için önerilen test algoritması.....	16
Şekil 4: Vitros anti-HCV S/Co-Advia Centaur anti-HCV S/Co değerlerinin korelasyonları ($r=0.727$, $p<0.001$, $n=164$).....	33
Şekil 5: Vitros anti-HCV S/Co-Elecsys anti-HCV II COI değerlerinin korelasyonları ($r=0.093$, $p=0.240$, $n=161$).....	33
Şekil 6: Vitros anti-HCV S/Co-Architect anti-HCV S/Co değerlerinin korelasyonları ($r=0.662$, $p<0.001$, $n=159$).....	34
Şekil 7: Vitros anti-HCV S/Co-Liaison anti-HCV S/Co değerlerinin korelasyonları ($r=0.635$, $p<0.001$, $n=160$).....	34
Şekil 8: Advia Centaur anti-HCV S/Co-Elecsys anti-HCV II COI değerlerinin korelasyonları ($r=0.251$, $p<0.01$, $n=157$).....	35
Şekil 9: Advia Centaur anti-HCV S/Co-Architect anti-HCV S/Co değerlerinin korelasyonları ($r=0.719$, $p<0.001$, $n=156$).....	35

Şekil 10: Advia Centaur anti-HCV S/Co-Liaison anti-HCV S/Co değerlerinin korelasyonları ($r=0.702$, $p<0.001$, $n=153$).....	36
Şekil 11: Elecsys anti-HCV II COI-Architect anti-HCV S/Co değerlerinin korelasyonları ($r= -0.058$, $p=0.472$, $n=157$).....	36
Şekil 12: Elecsys anti-HCV II COI-Liaison anti-HCV S/Co değerlerinin korelasyonları ($r=0.023$, $p=0.781$, $n=154$).....	37
Şekil 13: Architect anti-HCV S/Co-Liaison anti-HCV S/Co değerlerinin korelasyonları ($r=0.842$, $p<0.001$, $n=154$).....	37
Şekil 14: Anti-HCV testlerinin ($n=142$) ROC eğrileri.....	39
Şekil 15: <i>recomLine</i> HCV IgG testinin ($n=130$) ROC eğrisi.....	40
Şekil 16: HCV core antijen testinin ($n=179$) ROC eğrisi.....	40
Şekil 17: HCV core antijen ve HCV RNA konsantrasyonları arasındaki korelasyon grafiği ($r=0.943$, $n=90$, $p<0.001$).....	41
Şekil 18: HCV RNA-Vitros anti-HCV S/Co değerlerinin korelasyon grafiği ($r= -0.055$, $p=0.605$, $n=90$).....	42
Şekil 19: HCV RNA-Advia Centaur anti-HCV S/Co değerlerinin korelasyon grafiği ($r= -0.053$, $p=0.623$, $n=90$).....	43

Şekil 20: HCV RNA-Elecsys anti-HCV II COI değerlerinin korelasyon grafiği ($r = -0.022$, $p = 0.841$, $n = 90$).....43

Şekil 21: HCV RNA-Architect anti-HCV S/Co değerlerinin korelasyon grafiği ($r = -0.009$, $p = 0.932$, $n = 90$).....44

Şekil 22: HCV RNA-Liaison anti-HCV S/Co değerlerinin korelasyon grafiği ($r = -0.189$, $p = 0.076$, $n = 90$).....44

Şekil 23: $\leq 10^5$ ve $> 10^5$ HCV RNA düzeylerinde elde edilen değerlerin karşılaştırılması ($n = 90$).....45

I. GİRİŞ

Hepatit C virüsü (HCV) zarflı RNA virüsüdür ve *Flaviviridae* ailesindeki *Hepacivirus* cinsi içinde sınıflandırılmaktadır. HCV genomu, 9.6-kb tek sarmal pozitif yönelimli RNA virüsüdür. Dünya nüfusunun yaklaşık %3'ü HCV ile enfektedir (1). 200 milyondan fazla insan karaciğer sirozu ve hepatosellüler kanser (HSK) gelişimi açısından risk altındadır. HCV enfeksiyonuna bağlı gelişen HSK, karaciğer transplantasyonunun bir endikasyonu olması nedeniyle önemli bir sağlık sorunudur (2).

Enfeksiyon kontamine kan ürünleri, damar içi uyuşturucu kullanımı, kontamine tıbbi aletler, dövme, anneden bebeğe geçiş, seksüel temas gibi başlıca parenteral yolla bulaşır (3).

Enfeksiyonun tanısında kullanılan anti-HCV testleri, rekombinant HCV antijenlerini kullanan enzim immunoassay (EIA) ve kemilüminesans immunoassay (CIA) metodlarına dayanmaktadırlar. Bu testler yüksek yalancı pozitiflik oranları göstermektedirler. Akut-kronik-geçirilmiş enfeksiyon ayırımı yapamamaları, pencere döneminde yetersiz kalmaları diğer dezavantajlarıdır. Günümüze dek dört farklı kuşak anti-HCV testi geliştirilmiştir. Anti-HCV testlerine destekleyici test olarak kullanılan strip immunblot testler, çalışma zorluğu ve yüksek oranda belirsiz sonuç vermeleri nedeniyle rutin laboratuvarlarda çok sık kullanılmamaktadır. Serumda HCV RNA varlığının saptanması mevcut enfeksiyonun tanısı için önemlidir (1). HCV RNA testinin pahalı olması, özel ekipman gerektirmesi gibi nedenlerle, HCV RNA'ya alternatif olabileceği ileri sürülen HCV core antijen testleri geliştirilmiştir (4).

Bu çalışmada, Türkiye'de, Hepatit C enfeksiyonunun laboratuvar tanısında kullanılan immunoassay metoduna dayalı beş farklı Anti-HCV kitlerinin tanı değerlerinin araştırılması ve HCV RNA, HCV core antijen testleri arasında uyum olup olmadığının belirlenmesi amaçlanmıştır.

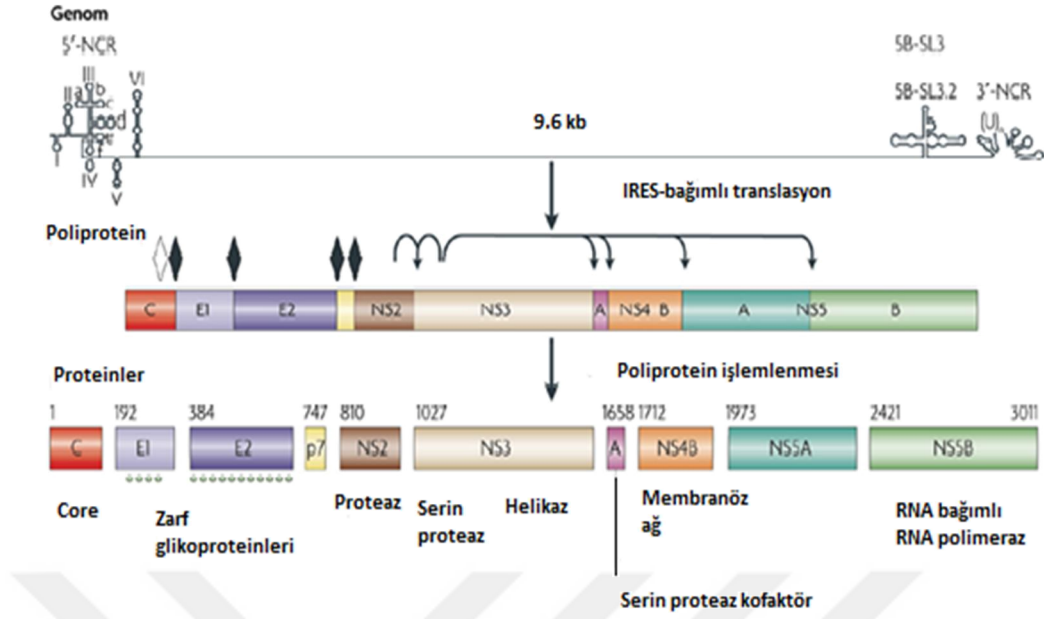
II. GENEL BİLGİLER

2.1. HCV VİROLOJİK ÖZELLİKLERİ

II. Dünya Savaşı sırasında transfüzyon teknolojisinin genişlemesi, post-transfüzyon hepatitlerinin salgınlarına yol açmıştır. 1947 yılında McCallum, iki farklı klinik viral karaciğer enfeksiyonlarını tanımlamak için Hepatit A ve Hepatit B terimlerini önermiştir ve 1975 yılı itibariyle Hepatit A (HAV) ve Hepatit B (HBV) virüsleri için doğru tanı yöntemleri elde edilmiştir. Kısa bir süre içinde, en az bir veya daha fazla etkenin de hepatite neden olabileceği ortaya çıkmıştır. Choo ve arkadaşları tarafından üçüncü bir virüs keşfedilene kadar bu etkenlerin doğası belirsiz kalmıştır (5).

HCV, non A non B hepatitli (NANBH) bir kişinin kanıyla enfekte bir şempanzeden, viral RNA'nın izole edilmesiyle ilk olarak 1989 yılında tanımlanmıştır. Elde edilen viral RNA'dan, ters transkriptaz ile DNA üretilmiş, proteinler eksprese edilmiş ve NANBH'li kişilerden izole edilen antikorlar sonrasında viral proteinleri saptamada kullanılmıştır. Bu çalışmalar, virüsü saptamada kullanılan enzim immunoassayin, genomik yöntemlerin ve diğer testlerin gelişimine yol açmıştır (6).

HCV; Sarıhumma virüsü, Dang virüsü, kene kaynaklı ensefalit virüsleri gibi klasik flavivirüsler, hayvan pestivirüsleri, GB virüs A (GBV-A), GBV-B ve GBV-C virüsleri ile birlikte *Hepacivirus* genusunda, *Flaviviridae* ailesinde sınıflandırılmaktadır (7). HCV zarflı, pozitif yönelimli ve tek sarmallı bir RNA virüsüdür. Genomu yaklaşık 9600 nükleotidden oluşmaktadır ve 5' ve 3' uçlarında bulunan herhangi bir proteini kodlamayan bölgeler (Non-translated Region; NTR) tarafından çevrelenmiş büyük bir açık okuma bölgesine (Open Reading Frame; ORF) sahiptir (Şekil 1). ORF tarafından yaklaşık 3000 aminoasit uzunluğunda öncü bir poliprotein sentezlenir (8, 9).



Şekil 1: Hepatit C virüsünün genom yapısı

(https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/File:HCV_genome.jpg'den uyarlanmıştır)

5'NTR bölgesi 341 nükleotid uzunluğundadır ve genomun translasyon ve replikasyonunun regülasyonunda görev alır. Internal Ribosomal Entry Site (IRES) adı verilen içerdiği bir bölge sayesinde cap-bağımsız olarak poliprotein translasyonunu başlatabilir (10). 3'NTR bölgesi yaklaşık 200 nükleotid uzunluğundadır ve RNA replikasyonunda görev alır. İnsan hepatoma hücre hatlarında bu bölgenin IRES-bağımlı translasyonu güçlü bir şekilde indüklediği gösterilmiştir (11).

ORF tarafından kodlanan 3000 aminoasitlik öncü poliprotein, dokuz adet proteolitik bölgeden ayrılarak yapısal ve yapısal olmayan toplam on adet proteine ayrılır. Yapısal proteinler olan core (özyapı) ve zarf glikoproteinleri (E1 ve E2) öncü poliproteinden, konak hücre endoplazmik retikulumunda (ER) bulunan *sinial peptidazlar* tarafından kesilerek ayrılırlar. Yapısal olmayan p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A ve NS5B proteinleri ise öncü poliproteinden *viral proteazlar* tarafından kesilirler (9).

İlk yapısal protein olan core proteini farklı HCV genotiplerinde en çok korunmuş viral proteindir. Poliprotein yapısından, *sinyal peptidaz* tarafından kesilerek ayrılan immatür core proteini, olgun formuna dönüştürülmek için *sinyal peptid peptidaz* tarafından bir kez daha kesilir ve viral RNA genomunu çevreleyen nükleokapsid yapısını oluşturur (9). Diğer yapısal proteinler E1 ve E2 zarf glikoproteinleri tip 1 transmembran glikoproteinleridir ve virüsün hücreye girişi için gereklidir. E1'in ise füzyonda rolü olduğu öne sürülmektedir (12). E2 glikoproteini bir veya birden fazla reseptör veya koreseptöre bağlanarak hücreye girişe aracılık eder ve aynı zamanda interferon-indüklenebilir protein kinaz R'yi inhibe ettiği ve etkileşime geçtiği öne sürülmüştür (13).

p7 proteini 63 aminoasitten oluşan katyon kanal aktivitesi gösteren integral membran proteindir. *In vitro* olarak viral RNA replikasyonu için gerekli olmasa da, *in vivo* enfeksiyon oluşturulmasında gereklidir ve virüsün bir araya gelme aşamasında etkindir (7, 9). Yapısal olmayan proteinlerden NS2 proteini; NS3 proteininin N-terminal bölgesiyle birleşip NS2-3 *sistein otoproteazını* oluşturarak, poliprotein yapısını NS2-NS3 bileşkesinden kesen bir transmembran proteindir ve p7 proteini gibi virüsün bir araya gelme aşamasında etkilidir (9). NS3 proteini 1/3 N-terminal ucuyla *serin proteaz*, 2/3 C-terminal ucuyla *RNA helikaz* ve *NTPaz* aktiviteleri gösteren multifonksiyonel bir proteindir. NS4A proteini, NS3 proteini için kofaktör fonksiyonundadır, birlikte NS3-4A kompleksini oluştururlar ve RNA replikasyonu ve virüsün bir araya gelme aşamasında önemli rol oynarlar. NS4B proteini 27-kDa büyüklüğünde, endoplazmik retikulum membranının etrafında bulunan, HCV genom replikasyonunun gerçekleştiği yer olan 'membranöz ağ' oluşumunu uyaran bir proteindir (7, 9). NS5A proteini, viral replikasyonda, hücre sinyal ileti yollarının ve interferon yanıtlarının modülasyonunda, apoptozun baskılanmasında ve lipid metabolizmasının bozulmasında rol oynayan hidrofilik bir fosfoproteindir. İnterferon tedavisine yanıtı belirleyen ISDR (interferon sensitivity determining region) adı verilen bir bölge içerir. NS5A proteini, NS3-4A kompleksi gibi tedavi hedefleri arasındadır (12). NS5B proteini HCV poliproteininin en sonunda yer alan viral proteindir ve HCV replikasyonunda rol alan RNA-bağımlı RNA polimeraz enzimini kodlar (7).

2.2. HCV GENOTİPLERİ

2005 konsensusunda, HCV varyantları ve genotip-subtip belirleme kriterleri için anlaşmaya varılmış ve tek tip isimlendirme önerileri sunulmuştur. Bunun için genotip ve subtip belirlemede: [1] bir veya daha fazla tüm kodlama bölgesinin sekanslanması; [2] epidemiyolojik olarak ilişkisi olmayan en az 3 izolatın varlığı; [3] önceden belirlenen sekanslardan farklı filogenetik grup; [4] intergenotipik ve intersubtipik rekombinasyonların dışlanması kriterleri gerekmektedir (14). Keşfedilme sıralarına göre genotipler rakamlarla, subtipler alfabetik sıraya göre harflerle ifade edilmektedir (15).

RNA bağımlı RNA polimerazın yüksek hata oranı ve konakçı immün sistemin uyguladığı baskı, HCV evrimini 7 farklı genotip ve 67'den fazla subtip oluşumuna zorlamıştır (genotip1-7). Genotip7, son yıllarda Orta Afrika'da Demokratik Kongo Cumhuriyeti'ndeki hastalardan izole edilmiştir. Tüm genomun nükleotid dizileri bakımından genotipler birbirlerinden ortalama %31-33, subtipler ise %15-25 farklılık gösterirler. İlk 6 genotipten, genotip5 dışında, tüm genotipler yüksek genetik çeşitliliğe sahiptirler (16, 17).

Enfekte bir konakta, türümsü olarak adlandırılan birbirleriyle yakından ilişkili ancak genetik olarak farklı varyantlar ortaya çıkmaktadır. Türümsüler arasındaki genetik çeşitliliğin konağın bağışık yanıtına bağlı olduğu düşünülmektedir. Bu çeşitlilik en çok E2 proteinin aşırı değişken bölgesi-1'de (High Variable Region-1; HVR-1) gözlenmektedir. Kronik hastalarda, tedavi öncesi genetik çeşitliliğin yüksek olması tedavi başarısızlığına neden olmaktadır (18). Benzer bir şekilde, genetik çeşitlilik HCV aşısının geliştirilmesini de zorlaştırmaktadır (15).

Dünya genelinde en yaygın genotip, 83.4 milyon olguyu (tüm HCV olgularının %46.2'si) içeren genotip1'dir. İkinci sırada %30.1 ile genotip3 gelmektedir (54.3 milyon olgu). Genotip2, 4 ve 6 tüm olguların %22.8'inden, genotip5 kalan %1'den az kısımdan sorumludur (19). Genotipler kendilerine özgü coğrafik dağılım gösterirler ve klinik açıdan önemlidirler. Genotip1 Birleşik

Devletler ve Avrupa’da yayginken, genotip4 Mısır, genotip5 Güney Afrika ve genotip6 Güneydoğu Asya’da yaygındır. Farklı genotipler açısından seyir ve bulaş açısından çok fark olmasa da, pegile-interferon (PegIFN) ve ribavirin tedavisine yanıtını öngörmede genotip en önemli belirleyicidir (18).

Türkiye’de genotip1, özellikle de genotip1b, enfeksiyonların %90’ından sorumludur. Genotip2, 3, 4 görülme sıklığı düşük olsa da ülkemizde mevcuttur. Son zamanlarda Kayseri yöresinde, Türkiye prevalansından farklı olarak %35 oranında genotip4 izole edilmiştir ve bunun güvenilir olmayan tıbbi müdahalelere bağlı olduğu düşünülmektedir (20).

2.3. HCV EPİDEMİYOLOJİSİ

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) raporlarına göre dünya popülasyonunun %3’ü HCV ile enfektidir (21). Bu oran kronik karaciğer hastalığı gelişme riski olan 200 milyon insanı temsil eder (2). Her yıl dünya çapında, 3-4 milyon yeni insan HCV ile enfekte olur ve HCV’ye bağlı komplikasyonlar nedeniyle 350.000 kişi hayatını kaybetmektedir (22).

HCV prevalansı Afrika ve Orta Doğu’da yüksektir. Olguların büyük bir kısmı Mısır, Kamerun, Suudi Arabistan, Irak ve Suriye’de %2-15 prevalansı ile görülmektedir. 1950-1980 yıllarında uygulanan şistozomiyazis eradikasyon kampanyasında güvenilir olmayan tıbbi prosedürlerin uygulandığı ve ev içi geçişin yüksek olduğu Mısır, en yüksek HCV prevalansına sahip ülkedir (30’lu yaş grubunda %50’den fazladır) (23).

Kuzey Amerika, Avustralya ve Japonya %2’yi geçmeyen oranla düşük prevalansa sahip bölgelerdir. Amerika Birleşik Devletleri’nde genel olarak %1.6-1.8 prevalansı ile toplam 5.7 milyon insanın seropozitif olduğu, %75’inin 1945-1965 doğumlu olduğu ve 1/3’ünü tutuklu insanların ve evsizlerin oluşturduğu bilinmektedir. Sağlık uygulamalarının geliştirilmesi ve kan-organ donörlerinin taranması nedeniyle 1980’li yılların ortalarından itibaren kaydedilen yeni enfeksiyonlarda düşüş saptanmıştır. Avustralya’da da benzer bir prevalansla

parenteral ilaç kullanımına bağı, HCV'nin pik yaptığı yaş grubu 30-39 yaşlarıdır. Japonya'da uygunsuz sterilizasyon uygulamaları ve güvenilir olmayan tıbbi müdahaleler nedeniyle HCV en sık 40-69 yaşlarında görülmektedir (23).

HCV prevalansı Batı ve Orta Avrupa için %2.4, Doğu Avrupa için %2.9 olarak tahmin edilmektedir. 1970 ve 1980'lerin başında enfekte kanlarla transfüzyon yapılması ve güvenilir olmayan tıbbi müdahaleler nedeniyle insanların önemli bir kısmı HCV'ye maruz kalmıştır (24).

Ülkemizdeki HCV prevalansı ortalama %1 civarındadır (25). Farklı çalışmalarda bu değer değişmektedir; örneğin kan donörlerinde Diyarbakır ve Erzurum'da yapılan iki farklı çalışmada HCV prevalansı sırasıyla %0.64 ve %0.4 olarak bulunurken (26, 27), Kayseri ve Adana'da hemodiyaliz hastalarında yapılan çalışmalarda sırasıyla %10 ve %14.4 gibi yüksek prevalans değerleri saptanmıştır (28, 29). 2003 yılında Eskişehir'de 595 hemşire üzerinde yapılan bir çalışmada seropozitiflik oranı %5.4 olarak belirlenmiştir (30). Hastanemizde 2002-2004 yılları arasında rutin sağlık kontrolü için başvuran hastalarda yapılan çalışmada HCV prevalansı %2.2 (31), 2012-2014 yılları arasında %2.9 olarak bulunmuştur (32).

2.4. HCV YAŞAM SİKLUSU

HCV sadece insanları ve şempanzeleri enfekte etmektedir (33). HCV yaşam döngüsünün sürdürülmesini ve enfeksiyöz virüs partiküllerinin üretilmesini sağlayacak yeterli *in vitro* hücre kültürlerinin ve uygun hayvan modellerinin olmaması nedeniyle, hücre giriş mekanizmasının çalışmaları oldukça karmaşık olmuştur (34). 2005 yılında, klonlanmış viral genom transfer edilmiş insan hepatosellüler karsinom derivesi Huh-7 hücrelerinden enfeksiyöz HCV partiküllerinin üretimine izin veren hücre kültür sistemlerinin oluşturulması, HCV araştırmalarında yeni bir buluş olmuştur (8).

HCV litik olmayan, hedef hücreleri enfekte edip çoğalan ve hücre bütünlüğünü bozmadan hücreden dış ortama salınan bir virüstür. HCV'nin yaşam siklusu 4 basamaktan oluşmaktadır (35).

2.4.1. VİRÜSÜN HÜCREYE GİRİŞİ

HCV, parenteral yolla bulaşır ve kan dolaşımıyla karaciğere ulaşır. Karaciğer sinüzoidlerinde fenestralı endotelyumu geçerek hepatositlerin bazolateral yüzeyiyle temas eder (35). Hepatositlere giriş, düşük dansiteli lipoprotein reseptörü (LDLR), tetraspanin CD81, SR-B1, sıkı bileşke proteinleri claudin-1 (CLDN1) ve occludin (OCLN) gibi birçok hücrel proteini kullanan kompleks bir süreçtir. *In vitro* çalışmalar bu konakçı faktörlerinin sıralı bir şekilde kullanıldığını göstermektedir. İlk olarak, HCV-SRB1 bağlanmasından sonra, HCV virüsünün yapısının değiştiği ve bu sayede E2-CD81 birleşmesinin meydana geldiği düşünülmektedir. Sonrasında, CLDN1 ile bağlanmayı güçlendirmek için tirozin kinaz reseptörleri olan *epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR)* ve *ephrin reseptör A2 (EphA2)* ye gerek vardır (36). Tirozin kinaz reseptörleri aynı zamanda hücreden hücreye geçişe de katkıda bulunurlar (37). CD81-CLDN1 bağlanmasından sonra, OCLN ile etkileşim olur ve HCV hücre içine klatrin-aracılı endositoz ile alınır (36). Son dönemlerde girişe etkili olduğu düşünülen, enterositlerde de bulunabilen bir kolesterol reseptörü olan *Niemann-Pick C1-like 1 kolesterol absorpsiyon reseptörü (NPC1L1)* hepatositler üzerinde tanımlanmıştır (37).

2.4.2. TRANSLASYON VE POLİPROTEİN ÜRETİMİ

Virüs hücre içine girdikten sonra nükleokapsid sitoplazmaya salınır, kapsid ayrılır ve HCV RNA genomu sitoplazmaya salınır. Pozitif yönelimli RNA'ya sahip olması nedeniyle, viral RNA mRNA gibi davranarak direkt translasyon işlemi gerçekleşir. 5'-IRES bölgesinin ribozoma bağlanmasıyla cap-bağımsız olarak translasyon başlar. Translasyon kaba endoplazmik retikulumda (ER) meydana gelir, yapısal ve yapısal olmayan proteinlerin üretimi için proteazlarca kesilen bir poliprotein üretilir (38).

2.4.3. REPLİKASYON

HCV, kendi genomunu çoğaltmak amacıyla NS4B proteini aracılığıyla ‘*membranöz ağ*’ adında bir yapı oluşturmak için intrasellüler zarlarda düzenlemeler yapar (39). Bu yapı; yapısal olmayan HCV proteinleri, HCV RNA, ER membranı ve lipid damlacıkları içeren çift-membran veziküllerinden oluşur. Viral replikasyon bu yapı üzerinde, NS5B tarafından oluşturulan RNA bağımlı RNA polimeraz tarafından, pozitif iplikli genomun kalıp olarak kullanılarak negatif iplikli genom sentezlemesiyle gerçekleşir. Sentezlenen negatif iplikçikler kalıp olarak kullanılarak, pozitif iplikli yeni viral genomlar oluşturulur. Siklofilin A, fosfotidilinozitol 4 kinaz III α (PI4KIII α) gibi hücresel faktörler de replikasyonda rol alır (37).

2.4.4. HÜCREDEN SALINMA

Nükleokapsit oluşumu, kapsit proteininin oligomerizasyonu ve genomik RNA’nın enkapsidasyonu ile gerçekleşir (40). Nükleokapsit oluşuktan sonra virus ER zarlarından tomurcuklanarak zarf yapısını kazanır. Zarflanan viral partiküller ekzositozla hücre dışına salınır (12).

2.5. PATOGENEZ VE BAĞIŞIK YANIT

HCV öncelikle hepatositleri enfekte etmesine rağmen viral genom ve antijenler, Kupffer hücreleri ve endotelial hücreler gibi karaciğerin diğer hücrelerinde de saptanabilmektedir. Virüs aynı zamanda periferik kan lökositlerinde, lenf nodlarında, barsak epitelyal hücrelerinde ve beyinde de bulunabilmektedir. Kronik HCV enfeksiyonunda karaciğer, CD4⁺ ve CD8⁺ T lenfositleri, B lenfositleri, doğal öldürücü (NK) hücreler (CD56⁺CD3⁻) ve NK T hücreleri (CD56⁺CD3⁺) tarafından infiltre edilmiştir. Nekroinflamatuvar süreç portal ve lobüler kompartmanları birlikte kapsar (41).

Doğal bağışıklıkta; hedef hücrelerin viral enfeksiyonu, hücre içi olaylar dizisini başlatır ve enfekte hücre ve komşu hücrelerde antiviral süreçle sonuçlanır. Antiviral süreç tip1 interferon (IFN) - α ve - β uyarılmasına bağlıdır. Antiviral efektör gen ekspresyonunu indükleyen sinyallerin başlamasını sağlayan, konakçı

hücresinde eksprese edilen patojen-ilişkili moleküler patern (PAMPs) reseptörleridir ve PAMP reseptörleri olarak görev yapan özgül Toll-like reseptör (TLRs) ya da nükleik asit bağlayıcı proteinlerle bağlanırlar (41).

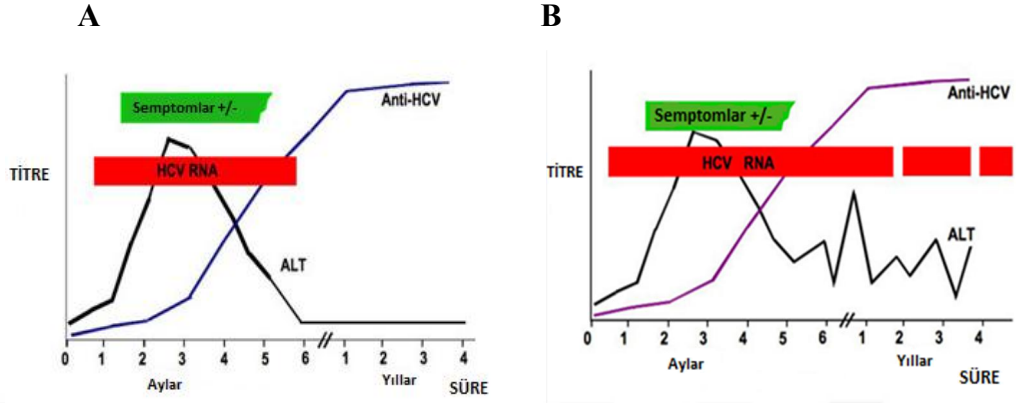
Anti-HCV antikorlarının viral temizlenmedeki yanıtta önemli rolü olduğuna ilişkin kanıtlar sınırlıdır. Primer enfeksiyonun iyileşmesi E1 ve E2 proteinlerine karşı oluşmuş özgül HCV antikor titreleriyle ilişkili değildir. Özgül HCV antikorları, 3. kuşak anti-HCV testleriyle maruziyetten 39 gün sonra (23-72. günler) veya plazma viremisinden sonra ortalama 23 günde (7-72. günler) saptanabilmektedir (41).

2.6. HCV ENFEKSİYONU KLİNİĞİ

Yıllık insidans tahminleri, her yıl 3-4 milyon kişinin HCV ile enfekte olduğunu ve 350.000 insanın HCV ile ilgili nedenlerden dolayı öldüğünü göstermektedir (42). HCV'nin ortalama inkübasyon süresi 7 haftadır. Bununla birlikte temastan sonraki bir-iki gün içinde kanda HCV RNA saptanabilmektedir (43). Akut hastalık klinik olarak hafiftir, özgül olmayan grip benzeri semptomlar şeklinde başlamaktadır ve tesadüfen veya kronik hepatite ilerlediğinde tanı konabilmektedir. Sarılık, koyu renkli idrar, iştahsızlık, sigara içenlerde sigaraya karşı isteksizlik ve karın ağrısı görülebilen semptomlar arasındadır. Hastaların %18-34'ünde HCV spontan olarak temizlenmektedir. Bu olay *IL28B* kalıtımı ve DQB1*0301 Major Histokompatibilite Kompleks sınıf II (MHCII) alleliyle ilişkili olarak bulunmuştur. Akut enfeksiyon uzun dönem sekellerle ilişkili değildir (42).

Kanda 6 ay boyunca HCV RNA'nın bulunması enfeksiyonun kronikleştiğini göstermektedir. Kronik hepatit en sık görülen sonuçtur (42). Serum alanin aminotransferaz (ALT) düzeyleri semptomlardan bağımsız dalgalanmalar göstermektedir (43). Kronik HCV karaciğer fibrozisi, siroz, HSK ve son dönem karaciğer yetmezliğine neden olabilmektedir. Siroz, %10-20 hastada 20-30 yıl içinde gelişmektedir. Siroz gelişiminden sonra, HSK ve hepatik dekompanzasyon gelişim riski sırasıyla %1-5 ve %3-6'dır. Dekompanzasyon sonrası ilerleyen

yıllarda ölüm riski %15-20 arasında değişmektedir (42). Akut ve kronik HCV enfeksiyonlarının serolojik özellikleri Şekil 2’de gösterilmiştir.



Şekil 2: A.Akut HCV enfeksiyonunun serolojik özellikleri, B.Kronik HCV enfeksiyonunun serolojik özellikleri

(<http://www.microbiologybytes.com/virology/HCV.html> den uyarlanmıştır)

2.7. HCV BULAŞ YOLLARI VE KORUNMA

Dünya nüfusunun yaklaşık %3'ü HCV ile enfektedir ve tahminlere göre son dönem karaciğer hastalığı, hastaların %30'unda gelişmektedir (44). HCV, enfekte kanla temas yoluyla bulaşmaktadır. Enfeksiyon için tanımlanan risk faktörleri arasında; HCV ile enfekte kan transfüzyonu, tıbbi tedaviler sırasında kontamine enjektör kullanımı, uyuşturucu kullanımı, seksüel temas, anneden bebeğe vertikal geçiş, ev içi temas, dövme yaptırmak ve piercing taktırmak bulunmaktadır (22, 44). CDC (Centers for Disease Control and Prevention), hepatit C enfeksiyonunun esas olarak, enfekte kan ürünlerine büyük ve tekrarlayan şekilde maruz kalmayla bulaştığını bildirmiştir. Yüksek riskli grupta damar içi uyuşturucu kullananlar, enfekte kan, kan ürünleri ve organ alıcıları, iğne yaralanmalarına maruz kalan sağlık çalışanları ve HCV ile enfekte anneden doğan bebekler bulunmaktadır. Düşük riskli grupta HCV enfekte kişiyle seksüel temasta bulunmak, enfekte kan ile kontamine kişisel eşyaların paylaşımı (jilet ve diş fırçası gibi) bulunmaktadır (45).

Genetik çeşitliliğinin çok olması, hücre kültürlerinin tam olarak geliştirilememesi ve uyarılan immün yanıtın tam olarak virüsü eradike edememesi gibi zorluklar nedeniyle geliştirilmeye çalışılan aşılar HCV enfeksiyonunu önlemede etkili değildir. Bu nedenle, enfeksiyonun bulaşını önlemeye çalışmak önemlidir. Kan bağışçılarını taramak ve güvenli enjeksiyon stratejileri geliştirmek HCV enfeksiyonundan korunmada gereklidir (44).

2.8. HCV ENFEKSİYONUNUN TANISI

HCV enfeksiyonu tanısında direkt ve indirekt yöntemler kullanılmaktadır. Direkt tanı yöntemleri core antijen ve viral genom gibi viral komponentleri, indirek tanı yöntemleri HCV'ye karşı oluşmuş antikorları saptamaktadır (46).

2.8.1. İNDİREKT TANI YÖNTEMLERİ

HCV tarama ve tanı testi olarak kullanılırlar ve aktif-geçirilmiş enfeksiyon ayrımı yapamazlar (46). Serolojik testler HCV özgül IgG antikorlarını saptamaktadır. HCV enfeksiyonu için IgM yanıtı akut ve kronik fazda değişken bir şekilde tespit edilebildiği için, akut HCV enfeksiyonunda anti-HCV IgM tanısal belirteç olarak kullanılamaz. Klinik kullanım için lisanslı anti-HCV IgM testi bulunmamaktadır (47).

2.8.1.1. ANTİKOR TESTLERİ

İmmün sistem yeterli antikor oluşturma kadar yaklaşık 8-12 hafta geçmektedir. Antikor testleri, plazma veya serumdaki HCV proteinlerinin çeşitli epitoplarına karşı oluşan antikorları, Enzim immunoassay (EIA) veya kemilüminesans immunoassay (CIA) yöntemleriyle saptamaktadırlar (48, 49). Günümüze kadar dört farklı kuşak anti-HCV antikor testi geliştirilmiştir. Birinci kuşak anti-HCV testleri, NS4 geninden elde edilen c100-3 rekombinant antijenini kullanmaktadır. Duyarlılığı-özgüllüğü düşük ve yanlış pozitif sonuçlar verebilen testlerdir. İkinci kuşak anti-HCV testleri, NS4 geni c100-3 antijenine ek olarak, core geninden c33c, NS3 geninden c22-3 antijenleri ile daha fazla rekombinant antijen içermektedir. Birinci kuşak testlere göre serokonversiyonu saptama süresi kısalmıştır ve duyarlılığı daha fazladır. Üçüncü kuşak anti-HCV testlerine NS5

antijeni eklenmiştir ve antikorları saptama süresi kısalmıştır. Üçüncü kuşak testlerin duyarlılığı düşük prevelanslı toplumlarda %99.7-99.9, düşük prevelanslı toplumlarda %97 olarak değişmektedir (48). Birinci kuşak anti-HCV testler serokonversiyonu ortalama 16 haftada, ikinci kuşak testler 10 haftada ve üçüncü kuşak testler 8 haftada saptayabilmektedirler. HCV kapsid antijenini ve core, NS3, NS4 ve NS5 bölgelerine karşı oluşan antikorları saptayabilen dördüncü kuşak anti-HCV testleri var olan testlere göre pencere dönemini 17 gün kadar kısaltmaktadırlar (50). Rutin laboratuvarlarda kullanılan bazı ticari anti-HCV testlerinin özellikleri Tablo I’de verilmiştir (46).

Tablo I: Anti-HCV saptamada kullanılan ticari testler

Analizör ve Üretici Firma	Test prensibi	Katı faz	HCV Antijenleri	Örnek miktarı (µl)	Reaksiyon süresi (dk)	Tescil
Architect i2000SR, Abbott Laboratories	CMIA	Paramanyetik partiküller	HCr43 (core-NS3), c100-3 (NS4A)	20	20	FDA, CE
LiaisonXL, Diasorin	CIA	Paramanyetik partiküller	Core, NS3, NS4	25	46	CE
VITROS ECi, VITROS 3600, Ortho-Clinical Diagnostics	CIA	Mikro kuyucuk	c22-3 (core), c200 (NS3-NS4), NS5	20	55	FDA, CE
Elecsys, Roche Diagnostics	ECLIA	Paramanyetik partiküller	Core, NS3, NS4	40	18	FDA, CE
ADVIA Centaur, Siemens	CIA	Manyetik partiküller	c22-3 (core), NS3, c200, NS5	10	58	FDA, CE

CMIA: Kemiliminesans mikropartikül immünoassay, CIA: Kemilüminesans immunoassay, ECLIA: Elektrokemilüminesans immunoassay, FDA: Food and drug administration, CE: Conformité Européenne (Avrupa Uygunluğu)

Hasta serumlarındaki antikor titreleri hem sinyal-cutoff (eşik değer) (S/Co) oranıyla hem de cutoff index (COI, eşik indeks) değerleriyle temsil edilmektedir. Yapılan çalışmalar, hasta serumlarındaki yüksek anti-HCV antikor titrelerinin gerçek pozitiflik şansının yalancı pozitiflikten daha yüksek olduğunu göstermiştir. % 95-98 olguda gerçek vireminin olduğu S/Co oranı değerleri EIA yöntemine dayalı testlerde 3.8, CIA yöntemine dayalı testlerde 8 olarak belirlenmiştir. CDC

2003 yılında ek test ihtiyacının belirlenmesinde S/Co oranını yönergelere eklemiştir (50).

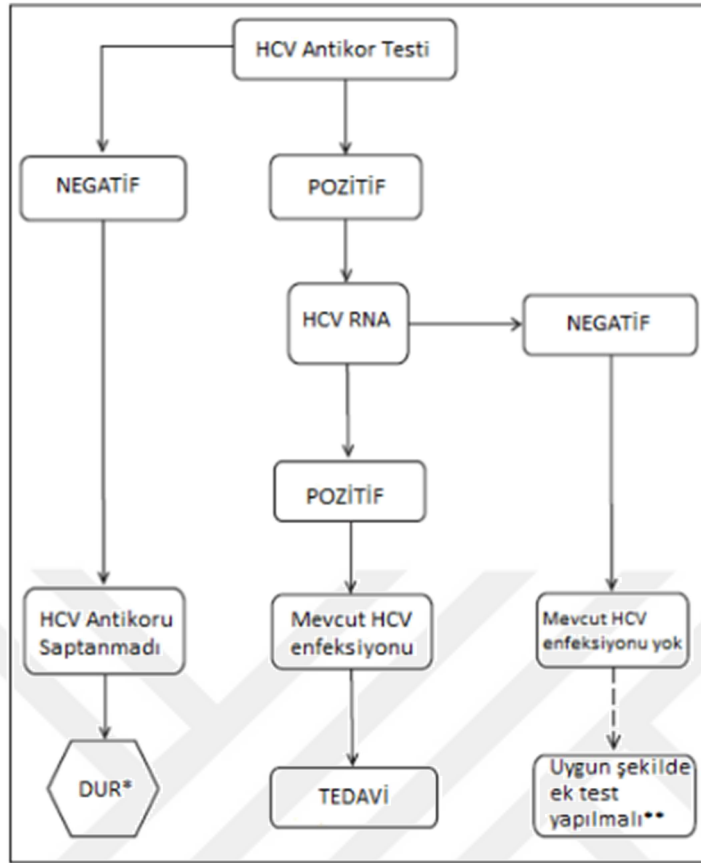
Son yıllarda geliştirilen üçüncü kuşak 4.0 versiyon anti-HCV testlerinden Monolisa HCV Ag/Ab ULTRA (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) testi kapsid antijenini ve HCV antikorunu birlikte saptayabilmektedir. Henüz antikorların oluşmadığı dönemde antijeni saptayabilmesiyle, enfeksiyonun erken dönemlerinde kullanılabilir. Innostest HCV Ab IV EIA (Fujirebio, Gent, Belgium) dördüncü kuşak anti-HCV testi, birçok genotip antijenini içermektedir (1a, 1b, 2 ve 3a) ve non-1 genotiplerin prevalansının yüksek olduğu toplumlarda kan güvenliği için üstün olduğu kanıtlanmıştır (51). Testin duyarlılığı %100, özgüllüğü %99.8 olarak belirlenmiştir. HCV core (2 farklı epitop), NS3, NS4A, NS4B ve NS5A bölgelerine karşı oluşan antikorları saptayabilmektedir (52). Murex HCV Ag/Ab (DiaSorin, Dartford, UK) testi core antijenini ve HCV antikorlarını birlikte saptayabilen kombine bir testtir. Yüksek özgüllük ve duyarlılığa sahip olan bu test, immün yetmezlikli hastalarda tanı amaçlı alternatif olarak kullanılabilir (53).

Antikor testleri, akut-aktif-geçirilmiş enfeksiyon arasında ayırım yapamamaktadırlar. Maruziyet ve serokonversiyon dönemleri arasında, antikor üretemeyen immünolojik bozuklukları olan hastalarda yalancı negatif sonuçlar veya başka antijenlerle çapraz reaksiyonlar verebilmektedirler (48). Ayrıca paraproteinemi, otoantikor üretimi gibi yüksek IgG konsantrasyonları (>5 mg/ml), ya da tekrarlayan dondurma-çözdürme sonrası IgG denatürasyonu gibi durumlarda, bazı IgG molekülleri mikro-kuyucuk yüzeylerine bağlanmaya kuvvetli bir eğilim gösterdiğinden sinyal oluşumuna yol açarak yalancı pozitifliklere neden olmaktadır (54). Hepatit C prevalansının düşük olduğu popülasyonlarda, yalancı pozitiflik oranı artmaktadır (48). CIA yöntemine dayalı anti-HCV testleriyle yapılmış çalışmalarda yalancı pozitiflik oranları %4.21-52.2 arasında değişen oranlarda bildirilmiştir (55, 56).

2.8.1.2. DESTEKLEYİCİ TESTLER

Strip immunblot testleri (RIBA; Chiron Corporation, Emeryville, CA, USA/ *recomLine* HCV IgG; Mikrogen Diagnostik, Neuried, Almanya/ INNO-LIA; Innogenetics, Ghent, Belçika) EIA testleriyle reaktif olan sonuçların gerçek veya yalancı pozitif ayrımını yapmak için destekleyici amaçlı geliştirilmiş testlerdir. 1992 yılından beri üçüncü kuşak Rekombinant immunblot (RIBA) testlerinin kullanımı yaygınlaşmıştır. RIBA HCV 3.0 SIA (Ortho Clinical Diagnostics) testi NS5 ve c33-c rekombinant antijenlerini ve c22(p)- c100(p) sentetik peptidlerini içermektedir (57). INNO-LIA™ HCV Score (Innogenetics, Ghent, Belçika) üçüncü kuşak testi, core bölgesinden elde edilen HCV antijeni, E2 aşırı değişken bölgesi (HVR), NS3 helikaz bölgesi, NS4A, NS4B ve NS5A bölgelerini içermektedir (58). *recomLine* HCV IgG testi rekombinant HCV antijenleri core 1, core 2, helikaz, NS3, NS4 ve NS5 bölgelerini içermektedir (59).

Bu testler EIA türünde testler olmasına rağmen; çalışma zorluğu, belirsiz sonuçların oranının fazla olması ve yüksek maliyet gibi dezavantajlara sahiptir. Bu nedenle bu testler gelişmekte olan ülkelerde ve rutin tanı prosedürlerinde sıklıkla kullanılmaz (58). 2003 yılında CDC tarafından yayınlanan yönergeden farklı olarak 2013 yılında yapılan güncellemede, HCV RIBA testinin doğrulama için artık kullanılmaması gerektiği, bunun yerine FDA (Food and drug administration) onayı almış başka bir HCV antikor testiyle tekrar çalışılması gerektiği bildirilmiştir. HCV enfeksiyonu şüphesinde izlenmesi gereken algoritma Şekil 3'de verilmiştir (60).



Şekil 3: Hepatit C virüsü enfeksiyonunun tanımlanması için önerilen test algoritması

*: Son 6 ay içerisinde HCV maruziyeti durumlarında, HCV RNA veya ileri HCV antikor testleri yapılması önerilir. İmmünyetmezlik hastalarında HCV RNA testi yapılması kabul edilebilir.

** : Geçirilmiş HCV enfeksiyonunu, yalancı pozitiflik durumlarından ayırt edebilmek için, başka bir HCV antikor testi kullanımı kabul edilebilir. Eğer hastanın son 6 ay içerisinde HCV maruziyeti varsa veya HCV enfeksiyonunun klinik bulguları varsa veya test örneğinin çalışılmasında ve saklanması sorun olduğu düşünülüyorsa HCV RNA testi tekrar edilmelidir.

2.8.1.3. HIZLI, HASTABAŞI (POINT-OF-CARE, POC) TARAMA TESTLERİ

Anti-HCV testlerinin mükemmel sayılabilecek doğru sonuçlarına rağmen, sonuçların geç çıkması, örneklerin çalışılmasında özel ekipman gerektirmesi, örneklerin toplanmasında ve ulaştırılmasında bir bireyin gerekliliği gibi nedenlerle tarama testleri olarak kullanımı kısıtlıdır (61). Son yıllarda yapılışı basit olan, hızlı ve ekipman gerektirmeyen hasta başı testler geliştirilmiştir. Bu testler, laboratuvar

şartları dışında ulaşılması zor olan yerlerde, uyuşturucu kullanıcıları gibi yüksek riskli popülasyonlarda HCV testinin yapılabilmesini mümkün kılmaktadır. Şu anda FDA tarafından onay almış tek HCV testi OraQuick HCV Hızlı testi (OraSure) 'dir. Bu test HCV antikorlarını, parmak ucu kanından, tam kan, serum, plazma ya da oral sıvı örneklerinden test edebilmektedir. Nitrosellüloz bir membranın üzerine core, NS3 ve NS4 antijenleri sabitlenmiştir ve HCV antikor varlığında 20 dakika içinde kırmızı-mor çizgi oluşmaktadır (46). Yüksek spesifite ve sensitiviteye sahip olan testlerdir (62).

2.8.2. DİREKT TANI YÖNTEMLERİ

Aktif HCV enfeksiyonunun tanısı için viral komponentlerin saptanması gerekmektedir. HCV Core Antijen testi ve RNA testleri bu amaçla kullanılan testlerdir.

2.8.2.1. HCV CORE ANTİJEN (AG) TESTİ

HCV core proteini antijenik, birçok hücrel proteinle etkileşen, özgül hücrel ve humoral immüniteyi indükleyen ve çeşitli yollar ile HCV enfeksiyonunun patogeneğinde önemli rol oynayan bir proteindir (63). HCV core antijen, serumda HCV RNA belirdikten 1 gün sonra ve HCV antikorlarından 45 gün önce saptanabilmekte ve dondurma çözündürme olaylarından HCV RNA'dan daha az etkilenmektedir (49). Birçok farklı HCV core Ag testi ile yapılan çalışmalarda, HCV core Ag düzeyinin HCV RNA miktarı ile uyumlu olduğu gösterilmiştir. Kolay çalışılması, ucuz olması, moleküler testlere göre kontaminasyonun az olması gibi nedenlerle moleküler testlere alternatif olarak gösterilmiştir (64).

HCV core antijeni saptayan testler, mevcut HCV enfeksiyonunu belirleyebilmek amacıyla geliştirilmiştir. İlk geliştirilen test kalitatif olarak, kan donörlerinde tarama amacıyla yapılmıştır. Pencere dönemi serokonversiyon süresini belirgin bir şekilde kısaltmıştır. 2001 yılında, HCV core antijenini saptamak ve tam kantitasyonunu yapabilmek için ikinci bir test Track-C: Ortho-Clinical Diagnostics (Raritan, N.J, USA) geliştirilmiştir (65). HCV core

antijeninin kantitasyonu, viral yükün belirlenmesi için olası bir alternatif olarak önerilmiştir (66). HCV core antijen testi prekonfirmatif test olarak tanımlanmıştır ve bu amaçlı kullanımının uygun olacağı bildirilmiştir (67). Fakat geliştirilen EIA yöntemine dayalı ilk versiyonlar düşük duyarlılık nedeniyle bu beklentileri karşılamamıştır. Son yıllarda CIA yöntemine dayalı yüksek duyarlılık gösteren yeni bir test Architect HCV Core Antijen (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL, USA) testi geliştirilmiştir (66). Bu testin duyarlılığı, önceki EIA yöntemine dayalı testlerden 8-21 kat daha üstündür (4). Cutoff değeri 3.00 fmol/litre (0.06 pg/ml) olarak iyileştirilmiştir. Sonucu 3-10 fmol/litre arasında kalan değerlerde örnekler tekrar edilmelidir, bunun dışında örneklerin bir kez çalışılması yeterlidir (68). Analitik duyarlılığı, HCV genotipine göre mililitrede uluslararası ünite (IU/mL) cinsinden 500-3000 HCV RNA miktarı olarak değişmektedir (64).

2.8.2.2. MOLEKÜLER HCV TESTLERİ

Moleküler testler HCV ile enfekte hastaların yönetiminde çok önemlidir çünkü HCV-RNA serumda enfeksiyondan 10-14 gün sonra ve antikor oluşumundan 1 ay önce saptanabilmektedir. Otomatik moleküler testleri standardize edebilmek için DSÖ farklı yöntemlerle viral yük miktarını yorumlamayı kolaylaştıran uluslararası birimi (IU/mL) geliştirmiştir. Ticari sistemler, HCV genotip1 DSÖ standardına göre kalibre edilmektedir. Kalitatif ve kantitatif HCV RNA testleri olarak ikiye ayrılırlar (49).

2.8.2.2.1. KALİTATİF HCV RNA TESTLERİ

Kalitatif testler, transkripsiyon aracılı amplifikasyon (TMA), klasik polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ve gerçek-zamanlı (real-time) PCR testlerini içeren hedef amplifikasyon prensibine dayanır. HCV RNA ekstrakte edilir ve çift-sarmal tamamlayıcı DNA (cDNA)'ya ters transkribe edilir ve sonrasında siklik enzimatik reaksiyon sonucu saptanabilir bir kopya sayısı oluşmasına neden olur. PCR temelli testlerde HCV genomunun çift-sarmal DNA kopyaları elde edilirken, TMA'da tek-sarmal RNA kopyaları oluşturulur. Klasik PCR veya TMA tekniklerinde amplifiye edilmiş ürünlerin tespiti, spesifik probler üzerine üretilen amplikonların hibridizasyonu ile sağlanır. Gerçek zamanlı PCR testinde,

amplifikasyonun her döngüsü floresan sinyal yayılımına neden olur ve bu sinyallerin miktarı başlangıç örneğindeki HCV RNA miktarıyla orantılıdır. Kalitatif saptama yapan testler ≤ 50 HCV RNA IU/mL saptayabilmeli ve tüm HCV genotipleri için aynı duyarlılığa sahip olmalıdır. Ters-transkriptaz PCR temelli Cobas® Amplicor® HCV v2.0 (Roche Molecular Systems, Pleasanton, California) testinin en düşük saptama değeri 50 IU/mL iken, TMA temelli Versant® HCV RNA Qualitative Assay (Bayer HealthCare) testinin 10 IU/mL'dir. HCV RNA'nın kantitasyonu için de kullanılabilen gerçek-zamanlı PCR testlerinin, kalitatif amaçlı kullanımlarında saptama sınırı 5-30 IU/mL'dir (69).

2.8.2.2.2. KANTİTATİF HCV RNA TESTLERİ

HCV RNA kantitasyonu hedef amplifikasyon (yarışmalı PCR ya da gerçek-zamanlı PCR) veya sinyal amplifikasyon [dallı DNA (bdNA)] teknikleri sayesinde yapılabilmektedir. Ticari testler içinde yarışmalı PCR temeline dayananlar LCx® HCV RNA Kantitatif Testi (Abbott Laboratories), Amplicor HCV Monitor® v2.0 ve onun yarı otomatik versiyonu Cobas® Amplicor HCV Monitor® v2.0 (Roche Molecular Systems) testleridir. bdNA teknolojisine dayanan Versant® HCV RNA 3.0 testi (Siemens); gerçek-zamanlı PCR amplifikasyon temeline dayananlar Cobas® TaqMan HCV testi ve onun otomatik ekstraksiyon ile birleştirilmiş formu olan Cobas Ampliprep® (CAP/CTM, Roche Molecular Systems), Abbott m2000_{RT} sistemini kullanan, m2000_{SP} otomatik ekstraksiyon prosedürü (m2000 Real-Time PCR Sistemi) ile birleştirilebilen Abbott RealTime™ HCV (Abbott Diagnostics), otomatik ekstraksiyon cihazı QIASymphony SP/AS ile birlikte kullanılabilen RotorGeneQ realtime PCR (QIAGEN, GmbH, Hilden, Germany) ve Versant HCV RNA 1.0 testini kullanan real-time kinetik PCR (kPCR) tekniğine dayalı Versant kPCR moleküler sistem (Siemens Molecular Diagnostics) testleridir (2, 70, 71). Türkiye'de, mevcut tüm real-time PCR yöntemleri farklı rutin laboratuvarlarda kullanılabilmektedir.

Üst limitin üzerinde olan değerlerde doğru ölçümü elde etmek için, numune 1/10 veya 1/100 dilüsyonda tekrar test edilmelidir. Kantitasyonda uluslararası

ünitenin (IU) kullanımına rağmen kalibrasyondaki farklılıklar nedeniyle, aynı örneklerin sonuçları farklı sistemlerde farklı sonuçlar verebilmektedir (70).

2.8.2.2.3. GENOTİPLEME TESTLERİ

HCV genotiplendirmesi uygun tedavi seçimini belirlemek açısından önemlidir. HCV genotipi, viral genomun 5'NTR, core, E1 ya da NS5B bölgeleri üzerinden belirlenebilir (2). 5'NTR bölgesini hedefleyen testlerde yanlış sınıflandırmalar yapılabilmektedir (72).

Genotipleme metodları içinde direkt sekanslama, revers transkriptaz PCR, *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP), tipe özgü PCR ve hibridizasyon temelli line-prob testleri bulunmaktadır. Genotiplendirmede altın standart viral genomun özgül bölgelerinin belirlenmesi esasına dayanan direkt sekanslama yöntemidir fakat rutin laboratuvarlarda sık uygulanmaz, epidemiyolojik çalışmalarda kullanılmaktadır. Trugene HCV Genotipleme (Siemens) testinde 5'NTR bölgesinden 244 baz çifti amplifiye edilerek sekanslama yapılır. Revers transkriptaz PCR testlerinden HCV Genotype II (Abbott) testi klinik tanıda kullanımda FDA onayı almıştır. Line prob testlerinden Versant HCV Genotip 2.0 (Siemens) ve Linear Array Hepatit C Virus Genotipleme Testi (Roche) CE-IVD (Invitro Diagnostics) belgelidir ve Avrupa'da kronik HCV hastalarında genotiplemede kullanılmaktadır (2). Pirosekanslama, genotiplendirme çalışmalarında kullanılan DNA sentezi sırasında açığa çıkan pirofosfatların saptanması esasına dayanan gerçek zamanlı kantitatif dizi analizi tekniğidir. Çalışma süresinin kısa olması ve fiyatının uygun olması gibi nedenlerle kullanılan bir yöntemdir (73).

2.9. HCV ENFEKSİYONUNUN TEDAVİSİ

HCV enfeksiyonunun tedavisinin yüksek maliyeti, tedavi yanıtını izlemede kullanılan ileri laboratuvar testlerinin gerekliliği ve ilaçlara bağlı yan etkilerin yüksek oranda olması nedeniyle, düşük ve orta gelirli ülkelerin birçoğunda HCV tedavisinden yararlanabilen hasta sayısı oldukça düşüktür. Ayrıca, yüksek gelirli ülkelerin birçoğunda, uyuşturucu bağımlıları gibi bazı gruplar tedaviyi

reddetmektedirler (74). Tedavinin ana hedefi dolaşımdaki HCV yükünü yok etmektir. Bunun göstergesi olarak HCV RNA düzeylerinin saptanamaz hale gelmesi gerekmektedir. Hedeflenen son nokta kalıcı viral yanıtın oluşmasıdır (75).

Tedavide ilk kullanılmaya başlanan ilaç interferondur (IFN). IFN alfa, antiviral etkileri olan konakçı genlerini uyararak etki eden, HCV çoğalmasının güçlü bir inhibitörüdür. Pegile edilmiş formu olan PegIFN HCV tedavisinin temelidir. HCV üzerindeki etkinliğini çeşitli mekanizmalarla yapmaktadır. Tedavide interferonla kombine olarak kullanılan ve sinerjistik etkinliği olan diğer temel tedavi ajanı Ribavirin'dir. Yeni kullanıma giren antiviral ajanlar telaprevir ve boseprevir, NS3/4A proteaz inhibitörleridir ve bu antivirallere hızla direnç gelişebildiğinden, tek başlarına kullanılmamalı ve kullanımları sırasında oluşabilecek yan etkileri nedeniyle dozları azaltılmamalıdır (76).

Direkt etkili antiviral ajanların bulunmadığı ülkelerde kronik C hepatiti standart olarak PegIFN ve Ribavirin ikili kombinasyonu ile tedavi edilmekte ve uygulanacak tedavi başlangıçtaki virolojik ve klinik özellikler ve tedavi sırasında meydana gelen viral kinetik ile ilgili verilere göre belirlenmektedir (77). Yaşı 40'ın altında olanlarda, siyah ırktan olmayan hastalarda, kilosu 75 kg'ın altında, ya da vücut kitle indeksi 30kg/m^2 'nin altında olanlarda, karaciğerde yağlanması olmayan, fibrozis skoru ≤ 2 olanlarda, tedavi öncesi viral yük $<800.000\text{ IU/mL}$ olanlarda kalıcı viral yanıt olasılığı daha yüksektir (75). Standart tedavi algoritmasına göre genotip1 hastalarında 48 hafta, genotip2-3 hastalarında 24 hafta PegIFN ve Ribavirin kombine tedavisi uygulanmaktadır. HCV tedavisinde IL28B gen polimorfizminin önemli olduğu gösterilmiştir. IL28B geninde rs12979860 lokasyonunda CC alleleline sahip olanlarda akut HCV enfeksiyonunda spontan klirens daha sıktır ve genotip1 HCV ile kronik C hepatiti olanlarda da standart tedaviye yanıt daha yüksektir (77).

III. GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma için 14.TUS.13 proje no ile Afyon Kocatepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından destek sağlanmıştır ve Afyon Kocatepe Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan 2014/04-87 sayılı karar ile etik kurul onayı alınmıştır.

Çalışmaya, 1 Eylül 2014-30 Haziran 2015 tarihleri arasında farklı bölümlerin klinik, poliklinik ve yoğun bakımlarından Afyon Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesi ANS Uygulama ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na gönderilen 179 serum örneği dahil edilmiştir. Rutin anti-HCV ve HCV RNA çalışılması için gönderilen serum örnekleri, 5000 devirde 15 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası 3 ml serumu bulunan serum örnekleri numaralandırılma yapılarak -80°C'deki derin dondurucuda muhafaza edilmiştir. Serumlar 5 farklı anti-HCV testi (Vitros anti-HCV, Advia Centaur anti-HCV, Elecsys anti-HCV II, Architect anti-HCV, Liaison anti-HCV), HCV Ag, HCV RNA, *recom*Line HCV IgG ve gerekli durumlarda Innostest HCV Ab IV testleriyle çalışılmıştır.

3.1. ANTİ-HCV TESTLERİ

İlk antikor testi; ticari Advia Centaur CP (Siemens, Almanya) cihazıyla, ADVIA Centaur HCV kiti (Siemens Healthcare Diagnostics, Tarrytown NY, USA) kullanılarak üretici firmanın talimatları doğrultusunda, Afyon Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesi ANS Uygulama ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda çalışılmıştır. ADVIA Centaur HCV testi, iki adet rekombinant (c200 ve NS5) antijen ve bir adet sentetik core (c22) peptidi içeren üçüncü kuşak bir antikor testidir. Hepatit C virüsüne karşı oluşmuş IgG tipi antikorları 10 µl serum veya plazma örneğinden, indirekt iki yıkamalı sandviç immunoassay yöntemine dayalı olarak saptamaktadır. S/Co oranı ≥ 1 ise sonuç pozitif; ≤ 0.80 ise negatif olarak değerlendirilmiştir.

İkinci antikor testi, Architect® i2000SR System (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL, USA) ile Architect® Anti-HCV kiti (Wiesbaden, Germany) kullanılarak Denizli Servergazi Devlet Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda üretici firmanın talimatları doğrultusunda çalışılmıştır. Kemilüminesans mikropartikül immunoassay yöntemine dayalı bu test, hepatit C virüsüne karşı oluşmuş antikorları 20 µl serum veya plazma örneğinden saptayabilmektedir. Core ve NS3 bölgelerinden HCr43 proteini, NS3 ve NS4 bölgelerinden c100-3 rekombinant proteinleri alınarak tasarlanmış üçüncü kuşak bir antikor saptama testidir. S/Co oranı ≥ 1 ise sonuç pozitif; 0.00-0.79 ise negatif olarak değerlendirilmiştir.

Üçüncü antikor testi, Vitros® ECiQ Immunodiagnosics System (Ortho-Clinical Diagnostics, Rochester, NY) ile Vitros Anti-HCV testi (High Wicombe, UK) kullanılarak Afyon Kocatepe Üniversitesi ANS Uygulama ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda üretici firmanın talimatları doğrultusunda çalışılmıştır. Hepatit C virüsüne karşı oluşan IgG tipinde antikorları, 20 µl serum veya plazma örneğinden; c22-3, c200 ve NS5 rekombinant antijenlerini kullanarak immunometrik yöntemle saptayan üçüncü kuşak bir antikor testidir. S/Co oranı ≥ 1 ise sonuç pozitif; ≤ 0.90 ise negatif olarak değerlendirilmiştir.

Dördüncü antikor testi, Liaison® XL Murex HCV Ab kiti (DiaSorin, Saluggia, Italy) kullanılarak Liaison® XL sistemi (DiaSorin, Saluggia, Italy) ile Afyon Özel Park Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda üretici firmanın talimatları doğrultusunda çalışılmıştır. Core, NS3 ve kimerik NS4 rekombinant antijenlerini kullanarak 25 µl serum veya plazma örneğinden; kemilüminesans immunoassay yöntemiyle antikorları saptayan üçüncü kuşak anti-HCV testidir. S/Co oranı ≥ 1 ise sonuç pozitif olarak değerlendirilmiştir.

Beşinci antikor testi, Elecsys anti-HCV II kiti (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) kullanılarak Roche Cobas e601 cihazı (Basel, Switzerland) ile Afyonkarahisar Devlet Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda üretici firmanın talimatları doğrultusunda çalışılmıştır. Elecsys anti-HCV II kiti; 40 µl

serum veya plazma örneğinden elektrokemilüminesans immunoassay metoduna dayalı, core, NS3 ve NS4 rekombinant antijenlerini içeren üçüncü kuşak antikör testidir. COI ≥ 1 ise sonuç pozitif; ≤ 0.90 ise negatif olarak değerlendirilmiştir.

Innotest HCV Ab IV (Fujirebio, Gent, Belgium) testi üretici firmanın talimatları doğrultusunda Afyon Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesi ANS Uygulama ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda çalışılmıştır. Innotest HCV Ab IV testi enzim immunoassay metoduna dayalı core (2 farklı epitop bölgesi), NS3, NS4A, NS4B ve NS5A bölgelerinden antijen içeren dördüncü kuşak anti-HCV testidir.

3.2. HCV CORE ANTİJEN TESTİ

Antijen testi, Architect® i2000SR System (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL, USA) ile Architect HCV Ag kiti (Wiesbaden, Germany) kullanılarak Denizli Servergazi Devlet Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda üretici firmanın talimatları doğrultusunda çalışılmıştır. Kemilüminesans mikropartükül immunoassay (CMIA) metoduna dayalı olarak 108 µl insan serum veya plazma örneğinden, kantitatif olarak hepatit C virüsü core antijenini saptayabilen bir testtir. Örnekteki hepatit C virusu core antijen konsantrasyonu, önceden oluşturulan Architect HCV Ag kalibrasyon eğrisine göre belirlenmektedir. Örnek içindeki konsantrasyon ≥ 3 fmol/L ise, örnek HCV Ag açısından pozitif kabul edilmiştir. Konsantrasyon ≥ 3 fmol/L ve < 10 fmol/L ise test 2 kez daha tekrar edilmiştir. Her iki test tekrarında, negatif değerler elde edilmişse sonuç negatif olarak; bir veya iki test tekrarının pozitif olması durumunda sonuç tekrarlı pozitif olarak değerlendirilmiştir ve ilk elde edilen değer sonuç olarak kabul edilmiştir.

3.3. HCV RNA TESTİ

HCV RNA testi Cobas® AmpliPrep/ Cobas® TaqMan® HCV Kantitatif Test, versiyon 2.0 (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) kiti ile, Roche Cobas® AmpliPrep ve Roche Cobas TaqMan 48 Analizör cihazları kullanılarak üretici firmanın talimatları doğrultusunda Afyon Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesi

ANS Uygulama ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda çalışılmıştır.

Cobas® AmpliPrep/ Cobas® TaqMan® HCV Kantitatif Test, versiyon 2.0 kiti insan plazma veya serumundan genotip1-6'ları saptayarak, kantitatif HCV RNA ölçümü yapabilen nükleik asit amplifikasyon testidir ve 3 ana sürece dayanmaktadır: (1) HCV RNA izolasyonu için örneğin hazırlanması; (2) komplementer DNA (cDNA) meydana getirmek için hedef RNA'nın ters transkripsiyonu ve (3) hedef cDNA'nın PCR amplifikasyonu ve aynı zamanda hedefe özgül oligonükleotid problemlerinin saptanması.

Örneklerin hazırlanması Roche Cobas® AmpliPrep cihazında otomatik olarak yapılmıştır. Cihaza 650 µl serum örneği yüklenmiştir. HCV virüs partikülleri, nükleik asit yapılarının serbest kalması ve serbest kalan HCV RNA'nın RNaz'lardan korunması için yüksek ısıda proteaz ve lizis bufferla inkübe edilerek parçalanmaktadır. Proteaz ve miktarı bilinen HCV Kantitasyon Standart (QS) RNA molekülleri, lizis reaktifi ve manyetik cam partikülleri ile birlikte her örneğin içine katılmıştır. Sonrasında karışım cihazda inkübe edilir ve HCV RNA ve HCV QS RNA manyetik cam partiküllerinin yüzeyine bağlanır. Tuzlar, proteinler ve diğer hücresel maddeler gibi bağlanmayan maddeler yıkamayla uzaklaştırılır. Yıkama basamağı tamamlandıktan sonra, adsorbe edilen nükleik asitler yüksek sıcaklıkta sulu bir çözelti ile ayrıştırılırlar. HCV RNA ve HCV QS RNA içeren işlenmiş örnek, Roche Cobas TaqMan 48 Analizör cihazına yüklenmiştir.

HCV RNA'nın ters transkripsiyonu sonucu oluşan cDNA'nın PCR amplifikasyonu için, HCV genomunda oldukça korunmuş bölge olan 5'NTR bölgesine tanımlı sekanslar primer olarak kullanılmaktadır. Ters transkripsiyon ve PCR amplifikasyon reaksiyonları, Z05 ve Z05D DNA polimeraz termostabil rekombinant enzimleriyle gerçekleşmektedir. Manganez (Mn^{+2}) varlığında ve uygun koşullar altında her iki enzim ters transkriptaz ve DNA polimeraz aktivitesi

gösterebilmektedir. Böylece, hem ters transkripsiyon hem de PCR amplifikasyonu ampliconların gerçek-zamanlı saptanmasıyla birlikte gerçekleşmektedir.

İşlenmiş örnekler ters transkripsiyonun ve PCR amplifikasyonunun meydana geldiği amplifikasyon tüpündeki (K-tüpü) amplifikasyon karışımına eklenir. Primerlerin HCV RNA ve HCV QS RNA'ya bağlanmasına izin vermek için reaksiyon karışımı ısıtılır. Manganez ve deoksinükleotid trifosfatların (dNTPs) varlığında polimerazlar hedef RNA'ya komplementer DNA zincirini uzatırlar. Ters transkripsiyonun ardından, RNA:cDNA hibridinin denatürasyonu için Roche Cobas TaqMan 48 Analizöründeki termal cycler, reaksiyon karışımının ısını yükseltir. Ardından soğutma yapıldıktan sonra primerler, hedef cDNA'ya bağlanır ve çift sarmal DNA molekülü oluşturulur. Roche Cobas TaqMan 48 Analizörü belirli döngü sayısında bu süreci otomatik olarak tekrar etmektedir. Her döngüde DNA ampliconunun miktarının iki katına çıkması hedeflenmiştir. Amplifikasyon işlemi sırasında, floresan boyalarının emisyon yoğunluğunun izlenmesini sağlayan çift etiketli probların (dual-labeled prob) kullanılması PCR ürününün gerçek zamanlı tespitine olanak sağlar. Probların bir ucu reporter boya, diğer ucu baskılayıcı (quencher) boya ile işaretlidir. HCV ve HCV QS için farklı problar kullanılmaktadır. Termostabil polimerazların 5'-3' nükleaz aktivitesiyle, problar PCR esnasında hibridize olurlar ve reporter boyanın floresansı artar. Artan floresans sayesinde HCV RNA'nın kantitasyonu yapılabilmektedir. Kantitasyon işlemi, her örneğin içine eklenen HCV QS'in sinyaliyle HCV RNA'nın sinyali karşılaştırılarak yapılmaktadır.

3.4. STRİP IMMUNBLOT TESTİ

Destekleyici test olarak *recomLine* HCV IgG (Mikrogen Diagnostik, Neuried, Germany) strip immunblot testi kullanılmış ve Afyon Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesi ANS Uygulama ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda çalışılmıştır. Nitrosellülöz membran üzerine sabitlenmiş rekombinant HCV antijenlerine (Core 1, core 2, helikaz, NS3, NS4, NS5) karşı oluşmuş özgül IgG antikorlarının saptanması için kullanılan kalitatif bir testtir.

3.4.1. SOLÜSYONLARIN HAZIRLANMASI

Yıkama Tamponu A:

1. Her bir strip için, 2 ml konsantre yıkama solüsyonu içerisinde 0,1 g yağsız süt tozu çözündürüldü.
2. Karışımın üzerine 18 ml deiyonize su eklenerek, toplamda her bir strip için 20 ml kullanıma hazır yıkama tamponu A elde edildi.

Konjugat Solüsyonu:

1. Her bir strip test için, 20 µl konsantre konjugat, 2 ml kullanıma hazır yıkama tamponu A ile dilüe edildi.

3.4.2. TEST PROSEDÜRÜ

1. Çalışma başlatılmadan 30 dk önce reaktifler oda ısısına getirildi.
2. Stripler pens yardımıyla, içerisinde 2 ml kullanıma hazır yıkama tamponu A bulunan inkübasyon tepsisine yerleştirildi.
3. 20 µl serum/kontrol örneği eklendi, inkübasyon tepsisinin üzeri plastik kapakla kapatıldı ve 3 saat boyunca shaker kullanılarak inkübe edildi.
4. Süre sonunda plastik kapak açıldı, kuyucuklardaki serum/kontrol dilüsyonu boşaltıldı ve üzerine 2 ml kullanıma hazır yıkama tamponu A eklendi. 5 dk boyunca shaker yardımıyla yavaşça sallandı ve yıkama tamponu A boşaltıldı. Bu işlem 3 kez tekrar edildi.
5. 2 ml kullanıma hazır konjugat solüsyonu eklenerek, tepsinin üzeri plastik kapakla kapatıldı, shaker üzerinde 45 dk inkübe edildi.
6. Süre sonunda plastik kapak açıldı, kuyucuklardaki konjugat solüsyonu boşaltıldı ve üzerine 2 ml kullanıma hazır yıkama tamponu A eklendi. 5 dk boyunca shaker yardımıyla yavaşça sallandı ve yıkama tamponu A boşaltıldı. Bu işlem 3 kez tekrar edildi.
7. 1.5 ml kullanıma hazır substrat solüsyonu eklendi ve shaker kullanılarak 8 dk sallandı.
8. Reaksiyonu durdurmak için, deiyonize su kullanılarak 3 kez kısaca yıkama işlemi yapıldı.

9. Değerlendirme yapılmadan önce stripler emici kağıtların arasında, ışıktan korunarak 2 saat süreyle kurutuldu.

3.4.3. TESTİN DEĞERLENDİRİLMESİ

[1] Reaksiyon kontrol bandında açıkça görülebilir koyu bandın oluştuğu, [2] IgG konjugat kontrol bandının net bir şekilde boyandığı ve [3] cut-off kontrol bandında zayıf ama görülebilir boyanmanın olduğu strip testler değerlendirmeye alındı.

Düzgün çalışmış strip testler, değerlendirme formunda işaretlenmiş reaksiyon kontrol bandına uyumlu olacak şekilde uygun alanlara yapıştırıcı sayesinde yapıştırıldı. Her bandın boyanma yoğunluğu değerlendirilerek, değerlendirme formunda striplerin karşısında her antijene karşılık gelen kutucuklara not edildi.

Bantlardaki boya yoğunluğu	Değerlendirme
Reaksiyon yok	-
Çok az yoğunluk (cut-off bandından daha az)	+/-
Az yoğunluk (cut-off bandına eşdeğer)	+
Yüksek yoğunluk (cut-off bandından yüksek)	++
Çok güçlü yoğunluk	+++

Test sonuçları aşağıdaki kriterlere göre belirlendi.

Test Sonucu	Kriterler
Negatif	Antijen yok $\geq$ cut-off <u>veya</u> İzole NS3, NS4 ya da NS5 $\geq$ cut-off
Borderline	İzole Core 1 $\geq$ cut-off <u>veya</u> İzole Core 2 $\geq$ cut-off <u>veya</u> İzole Helikaz $\geq$ cut-off <u>veya</u> Helikaz ve bir NS proteini (NS3, NS4 veya NS5) $\geq$ cut-off <u>veya</u> İki diğer rastgele antijen $\geq$ cut-off
Pozitif	Core 1 ve Core 2 $\geq$ cut-off <u>veya</u> Core 1 ve ek antijen $\geq$ cut-off <u>veya</u> Core 2 ve ek antijen $\geq$ cut-off <u>veya</u> Üç rastgele antijen $\geq$ cut-off

3.5. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Veriler PASW Statistics 18.0 bilgisayar programı ile değerlendirildi. Cihazlar arası korelasyonlar ve HCV RNA, antikor testleri ve HCV core antijen testleri arasındaki korelasyon ilişkileri Spearman korelasyon katsayısı kullanılarak hesaplandı. HCV RNA düzeylerine göre HCV core antijen ve antikor testleri arasındaki ilişki Mann-Whitney U testi kullanılarak belirlendi. Her bir antikor testinin kritik eşik değeri MedCalc Versiyon 15.4 kullanılarak belirlendi.

IV. BULGULAR

Afyon Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesi ANS Uygulama ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na 1 Eylül 2014-30 Haziran 2015 tarihleri arasında rutin olarak çeşitli servis, yoğun bakım veya polikliniklerden anti-HCV ve/veya HCV RNA testleri çalışılması için gönderilen, HCV enfeksiyonu açısından tedavi alan veya almayan 179 serum örneği çalışmaya dahil edildi.

Çalışmaya alınan hastaların 105'i (%58.66) kadın, 74'ü (%41.34) erkek hastadır. Kadın hastaların yaş ortalaması 56.76 (± 14.52), erkek hastaların 57.79 (± 15.41), tüm grubun 57.18 (± 14.86) olarak belirlendi.

Sonuçlar değerlendirilerek, 127 örneğin HCV enfeksiyonu açısından hükmünün pozitif, 52 örneğin negatif olduğuna karar verildi. Karar verme aşamasında anti-HCV testlerinin sonuçlarına bakılmaksızın HCV RNA, *recomLine* HCV IgG, HCV core antijen ve bu üç testin uyumsuz sonuçlarında çalışılan Innostest HCV Ab IV testlerinin sonuçları birlikte değerlendirildi. HCV RNA negatif, *recomLine* HCV IgG sonuçları pozitif veya 'borderline' olarak bulunan örneklerde geçmiş veriler incelendi.

Pozitif olduğuna karar verilen 127 örneğin, 78'inin kadın hasta (yaş ortalaması: 59.62), 49'unun erkek hasta (yaş ortalaması: 58.44) olduğu belirlendi. Negatif olduğuna karar verilen 52 örneğin 27'sinin kadın hasta (ortalama yaş: 48.48), 25'inin erkek hasta (yaş ortalaması: 56.52) olduğu belirlendi. 179 örneğin çalışılan 5 farklı anti-HCV testi, HCV antijen, HCV RNA, *recomLine* HCV IgG testleri sonuçları Tablo II'de verilmiştir.

Tablo II: 179 örneğin çalışmaya alınan testlere göre sonuçları

Test sonucu	Vitros anti-HCV	ADVIA Centaur anti-HCV	Elecsys anti-HCV II	Architect anti-HCV	Liaison anti-HCV	HCV core antijen	recomLine HCV IgG	HCV RNA
Pozitif	159	145	151	149	148	94	133	90
Negatif	20	34	28	30	31	85	34	89 ¹
Borderline	-	-	-	-	-	-	12	-
Toplam	179	179	179	179	179	179	179	179

¹: HCV RNA'sı negatif olan 37 örnek; 23'ü tedavi almış, 14'ü Kronik Hepatit C tanısı olduğu belirlenen hastalardan elde edildi.

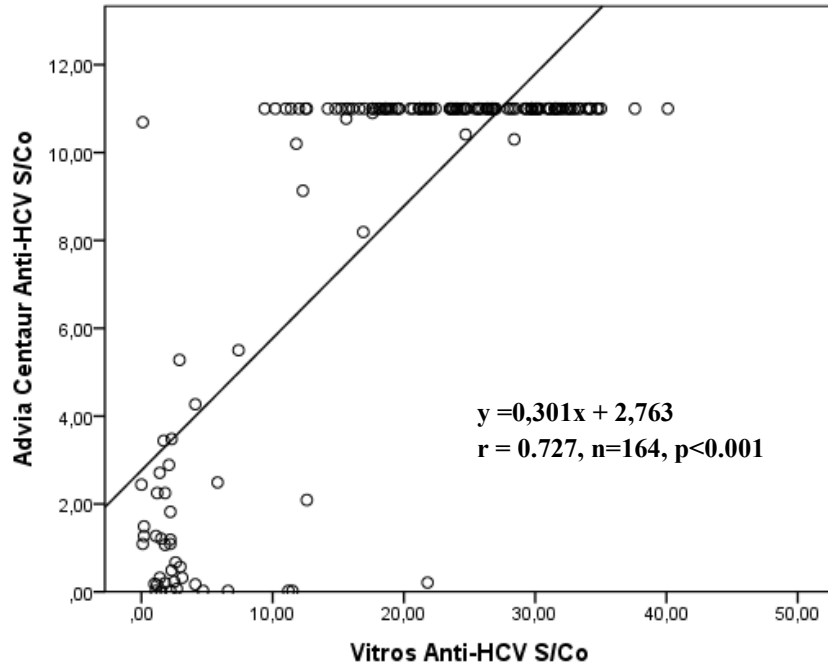
Tüm anti-HCV testlerinin negatif ve pozitif sonuç verdiği örnek sayıları ve uyum yüzdeleri Tablo III'de verilmiştir. Karşılaştırma yapılan 5 farklı anti-HCV testinin içinde en yüksek uyum %94.9 ile Elecsys II ve Liaison anti-HCV testleri arasında, en düşük uyum ise %86.5 ile Advia Centaur ve Vitros anti-HCV testlerinde saptandı. Vitros, Elecsys II, Architect ve Liaison anti-HCV testleri arasındaki uyum oranları %92.1 ile %94.9 aralığında değişirken, diğer testlerle en düşük uyum gösteren Advia Centaur için %86.5 ile %92.7 aralığında saptandı. 5 farklı testin birbiriyle olan uyumu %83.8 (150/179) olarak bulundu.

Tablo III: Anti-HCV testlerinin birbirleriyle karşılaştırılması ve % uyumları

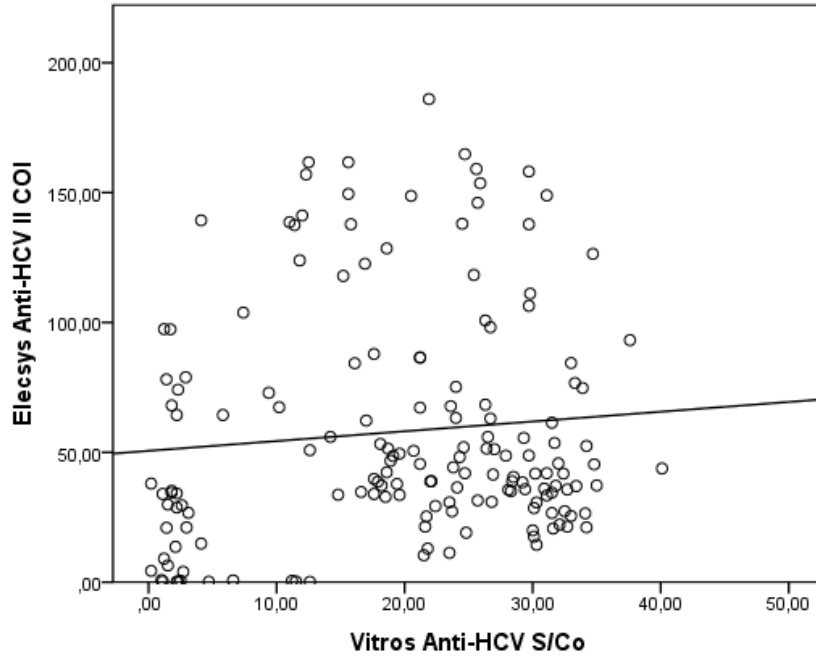
	Vitros (n=179)	Advia Centaur (n=179)	Elecsys II (n=179)	Architect (n=179)	Liaison (n=179)
		-,+	-,+	-,+	-,+
Vitros					
Negatif		15,5	18,2	20,0	19,1
Pozitif		19,140	10,149	10,149	12,147
Advia Centaur	%86.5 (155/179)				
Negatif			22,12	23,11	26,8
Pozitif			6,139	7,138	5,140
Elecsys II	%93.2 (167/179)	%89.9 (161/179)			
Negatif				22,6	25,3
Pozitif				8,143	6,145
Architect	%94.4 (169/179)	%89.9 (161/179)	%92.1 (165/179)		
Negatif					25,5
Pozitif					6,143
Liaison	%92.7 (166/179)	%92.7 (166/179)	%94.9 (170/179)	%93.8 (168/179)	
Negatif					
Pozitif					

-:Negatif, +:Pozitif

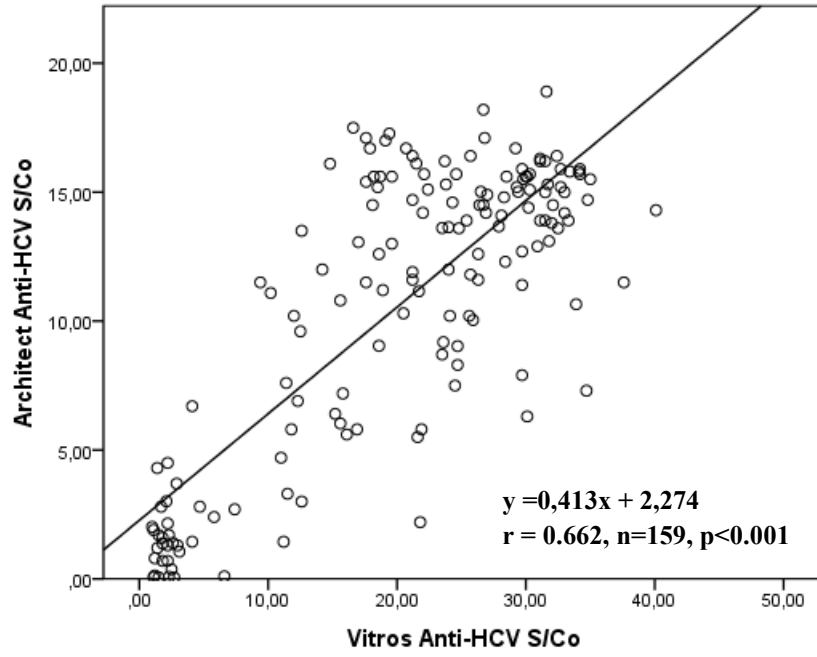
Vitros anti-HCV, Advia Centaur anti-HCV, Elecsys anti-HCV II, Architect anti-HCV ve Liaison anti-HCV testlerinin ikili karşılaştırmalarında, testlerden birinde ve/veya her ikisinde pozitif S/Co veya COI değerleri arasındaki ilişkiler grafikler üzerinde gösterilmiştir (Şekil 4-13). Vitros-Advia Centaur ($r=0.727$), Advia Centaur-Architect ($r=0.719$), Advia Centaur-Liaison ($r=0.702$), Architect-Liaison ($r=0.842$) anti-HCV testleri arasında iyi korelasyon değerleri elde edilirken; Vitros-Architect ($r=0.662$), Vitros-Liaison ($r=0.635$) anti-HCV testleri arasında orta korelasyon; Advia Centaur-Elecsys II ($r=0.251$) anti-HCV testleri arasında düşük korelasyon saptanmıştır. Vitros-Elecsys II ($r=0.093$), Elecsys II-Architect ($r= -0.058$), Elecsys II-Liaison ($r=0.023$) anti-HCV testleri arasında ise korelasyon saptanmamıştır.



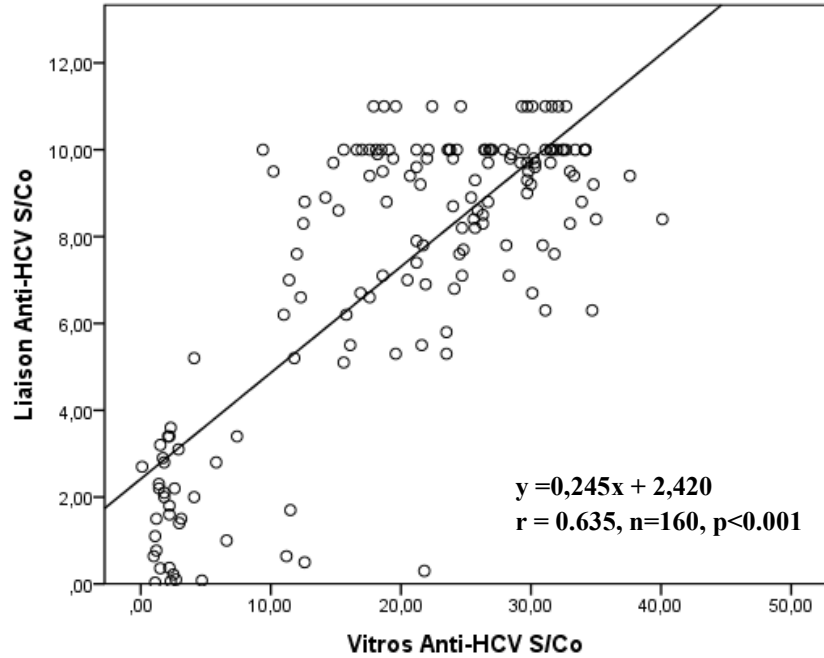
Şekil 4: Vitros anti-HCV S/Co-Advia Centaur anti-HCV S/Co değerlerinin korelasyonları ($r=0.727, p<0.001, n=164$)



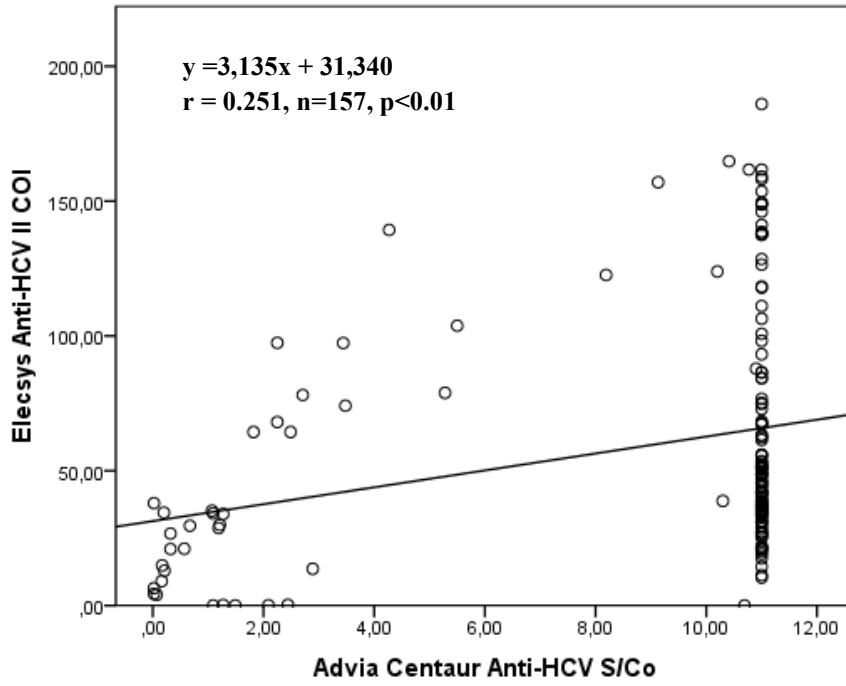
Şekil 5: Vitros anti-HCV S/Co-Elecsys anti-HCV II COI değerlerinin korelasyonları ($r=0.093, p=0.240, n=161$)



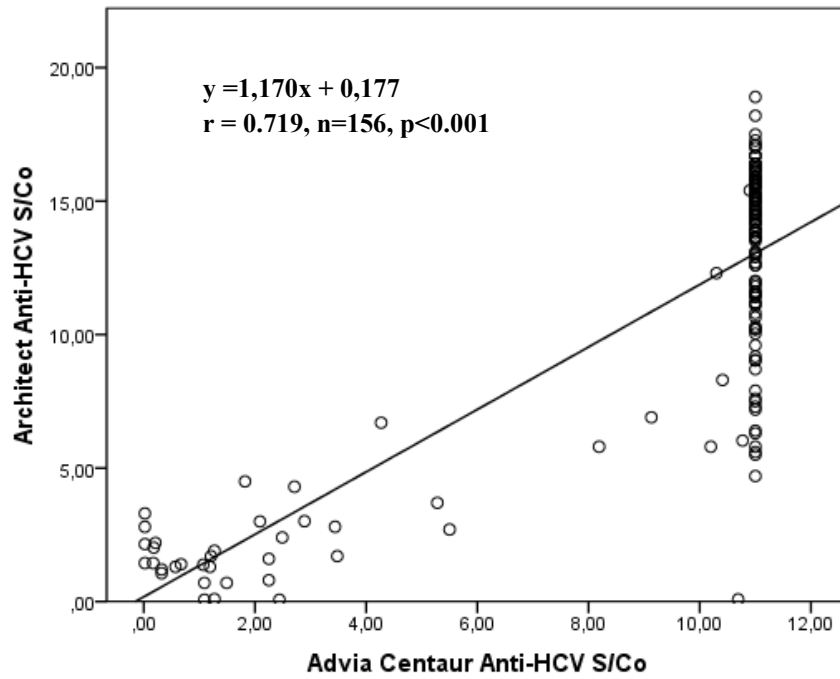
Şekil 6: Vitros anti-HCV S/Co-Architect anti-HCV S/Co değerlerinin korelasyonları ($r=0.662, p<0.001, n=159$)



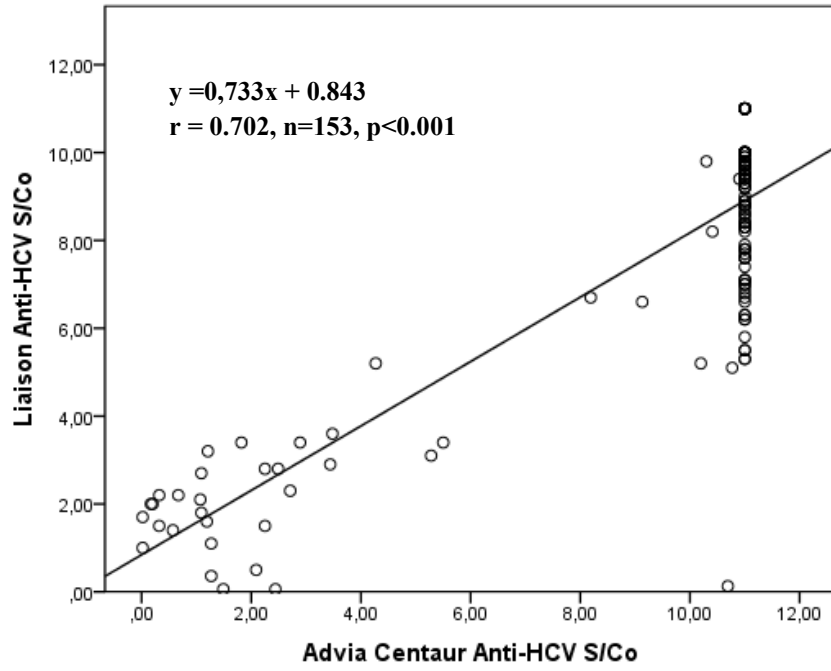
Şekil 7: Vitros anti-HCV S/Co-Liaison anti-HCV S/Co değerlerinin korelasyonları ($r=0.635, p<0.001, n=160$)



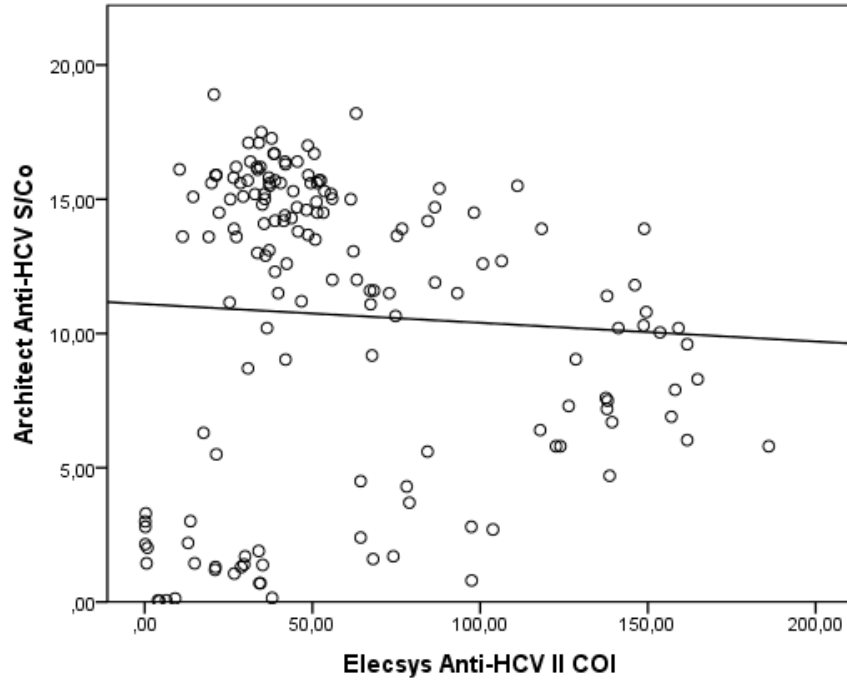
Şekil 8: Advia Centaur anti-HCV S/Co-Elecsys anti-HCV II COI değerlerinin korelasyonları ($r=0.251$, $p<0.01$, $n=157$)



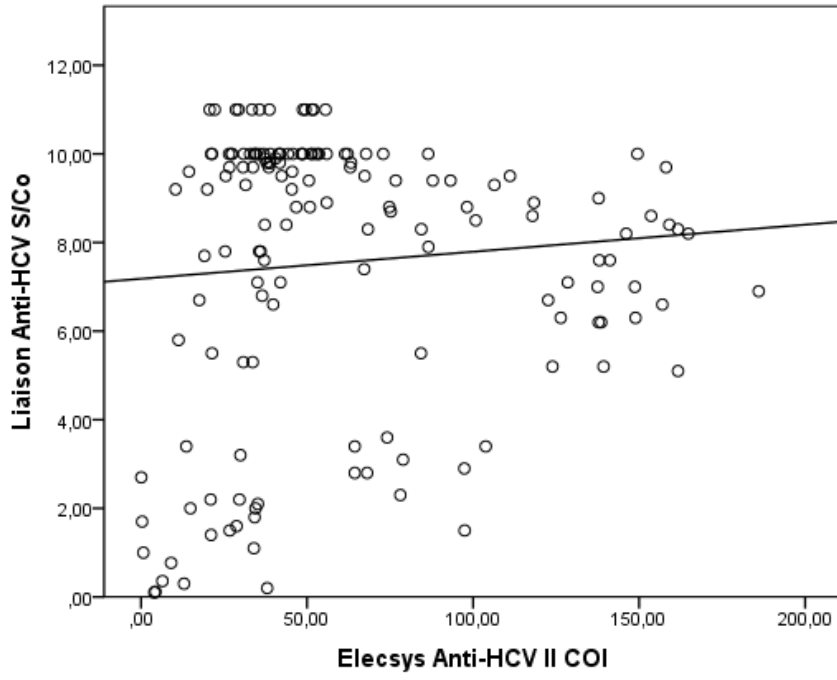
Şekil 9: Advia Centaur anti-HCV S/Co-Architect anti-HCV S/Co değerlerinin korelasyonları ($r=0.719$, $p<0.001$, $n=156$)



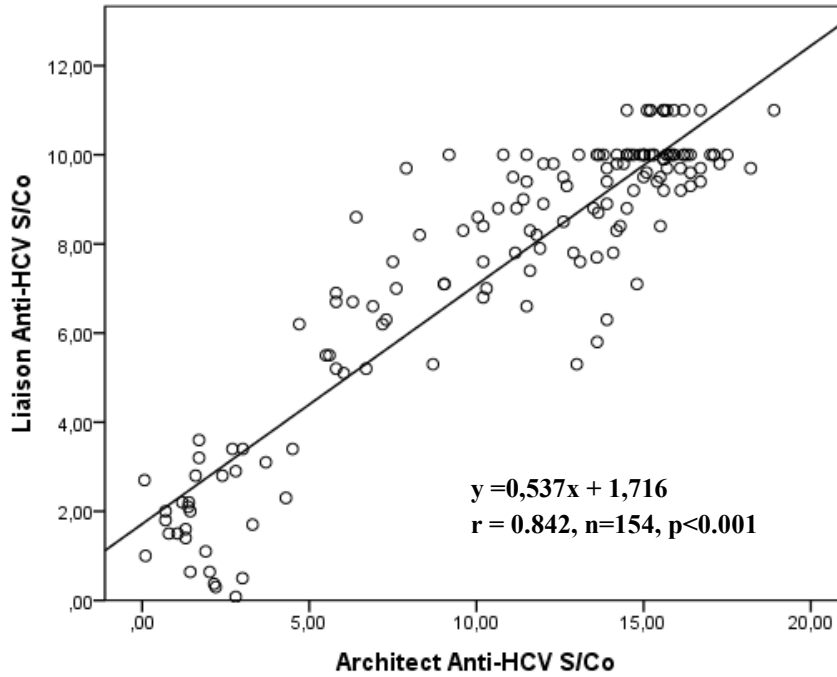
Şekil 10: Advia Centaur anti-HCV S/Co-Liaison anti-HCV S/Co değerlerinin korelasyonları ($r=0.702$, $p<0.001$, $n=153$)



Şekil 11: Elecsys anti-HCV II COI-Architect anti-HCV S/Co değerlerinin korelasyonları ($r= -0.058$, $p=0.472$, $n=157$)



Şekil 12: Elecsys anti-HCV II COI-Liaison anti-HCV S/Co değerlerinin korelasyonları ($r=0.023$, $p=0.781$, $n=154$)



Şekil 13: Architect anti-HCV S/Co-Liaison anti-HCV S/Co değerlerinin korelasyonları ($r=0.842$, $p<0.001$, $n=154$)

HCV RNA altın standart test kabul edilerek, çalışılan tüm testlerin performansları Tablo IV’de gösterilmiştir. Tüm örnekler içerisinde HCV RNA negatif örnek sayısı 89 olup bunların 37 tanesi; 23’ü antiviral tedavi almış olan ve 14’ü kronik hepatit C tanısıyla izlenmekte olan hastalardan elde edildi. Bu 37 örnek; anti-HCV testleri ve *recomLine* HCV IgG testinin duyarlılık, özgüllük, pozitif prediktif değer (PPD), negatif prediktif değer (NPD) ve doğruluk hesaplamalarına dahil edilmedi.

Tablo IV: HCV RNA ile kıyaslandığında çalışılan testlerin performansları

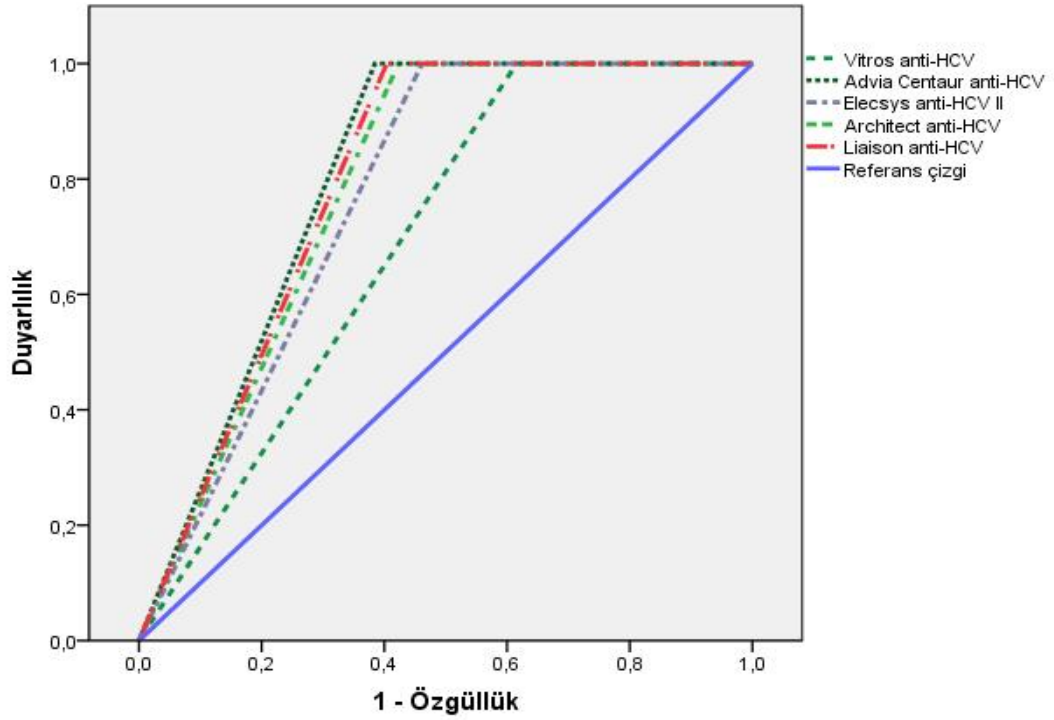
	Vitros (n=142)	Advia Centaur (n=142)	Elecsys II (n=142)	Architect (n=142)	Liaison (n=142)	<i>recomLine</i> HCV IgG ¹ (n=130)	Antijen (n=179)
Duyarlılık (%)	100	100	100	100	100	100	98.88
Özgüllük (%)	38.46	63.46	53.84	57.69	59.61	82.92	94.38
PPD (%)	73.77	82.56	78.94	80.35	81.08	92.70	94.68
NPD (%)	100	100	100	100	100	100	98.82
Doğruluk (%)	77.46	86.61	83.09	84.50	85.21	94.61	96.67
Toplam Pozitif (n)	122	109	114	112	111	96	94
Yalancı Pozitif (n)	32	19	24	22	21	7	5
Yalancı Negatif (n)	-	-	-	-	-	-	1

NPD: Negatif Prediktif Değer

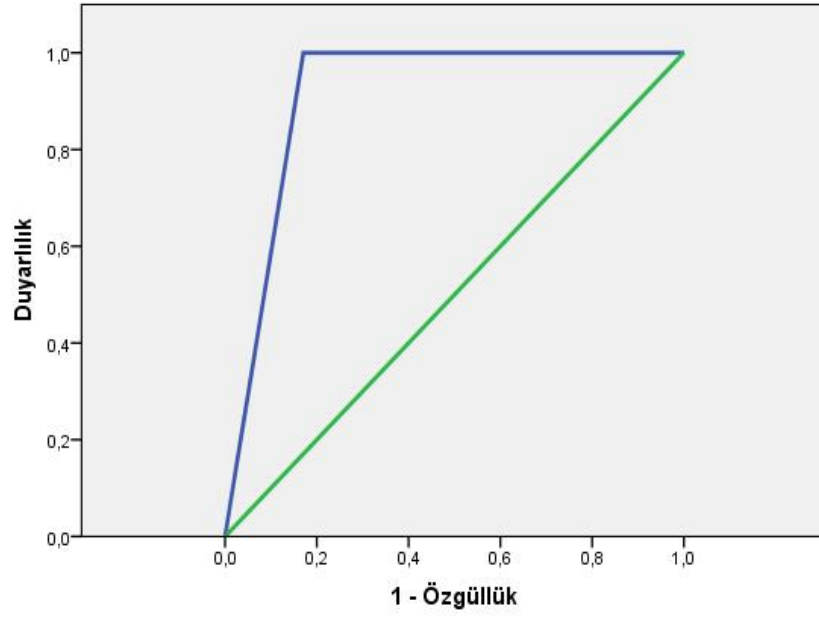
PPD: Pozitif Prediktif Değer

¹: *recomLine* HCV IgG sonucu borderline olan 12 örnek hesaplamalara dahil edilmedi.

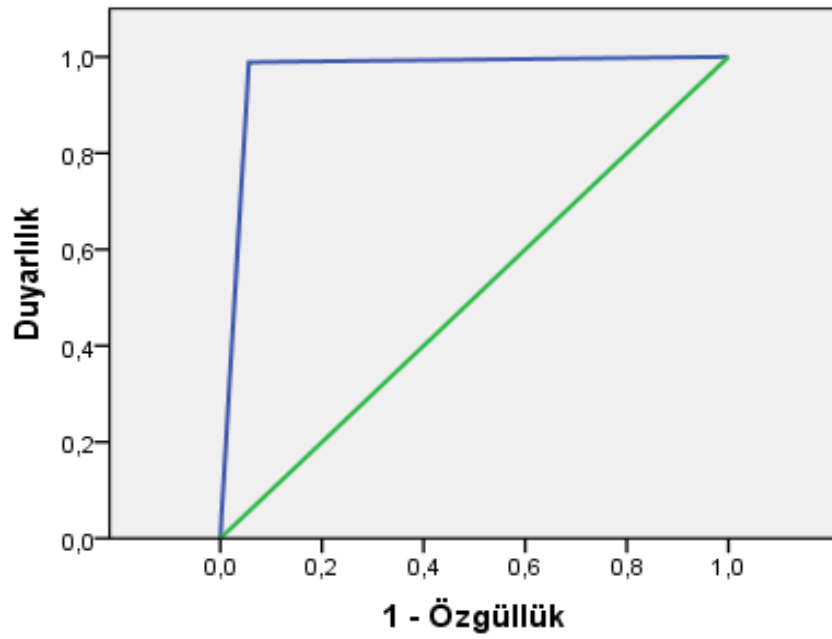
Vitros anti-HCV, Advia Centaur anti-HCV, Elecsys anti-HCV II, Architect anti-HCV ve Liaison anti-HCV testleri için yalancı pozitiflik açısından kritik eşik değerler sırasıyla 6.6 S/Co, 5.28 S/Co, 14.88 COI, 3.6 S/Co ve 4.3 S/Co olarak belirlendi. Vitros anti-HCV, Advia Centaur anti-HCV, Elecsys anti-HCV II, Architect anti-HCV ve Liaison anti-HCV testlerinin alıcı işletim karakteristiği (ROC-Receiver-Operating Characteristics) eğrileri tek bir grafikte, *recomLine* HCV IgG ve HCV core antijen testi ayrı grafiklerde gösterildi (Şekil 14-16).



Şekil 14: Anti-HCV testlerinin (n=142) ROC eğrileri

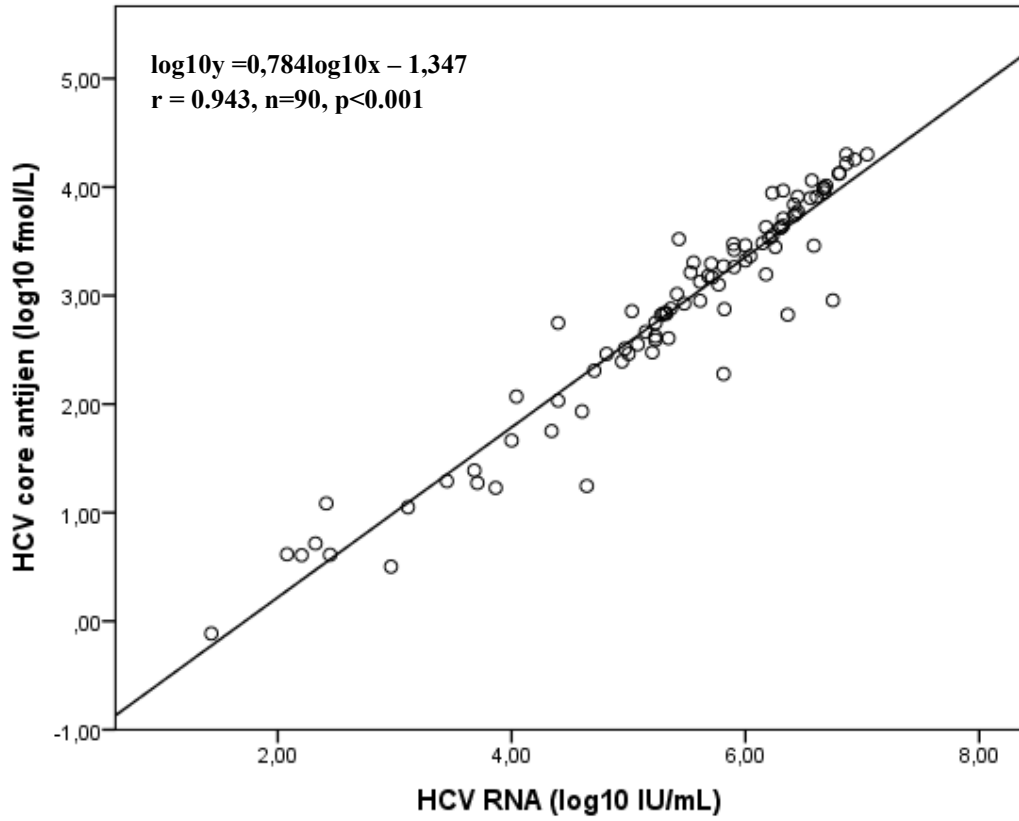


Şekil 15: *recomLine* HCV IgG testinin (n=130) ROC eğrisi



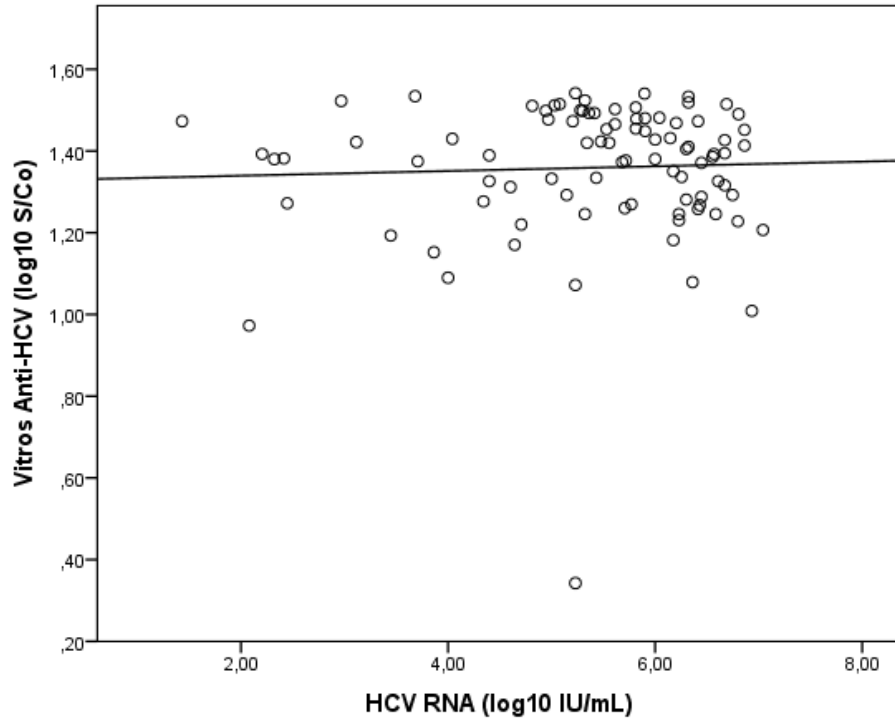
Şekil 16: HCV core antijen testinin (n=179) ROC eğrisi

HCV core antijen değerleri ve HCV RNA konsantrasyonları arasında Spearman korelasyon testine göre iyi bir korelasyon belirlendi ($r=0.943$, $p<0.001$) (Şekil 17). HCV RNA testi pozitif bulunan 90 örneğin 89’unda (%98.88) HCV core antijen testi de pozitif olarak saptandı. HCV core antijen sonucu negatif bulunan 1 rneęin HCV RNA değeri 2.7×10^1 IU/mL olarak belirlendi. . HCV core antijen değeri 3 ile 10 fmol/L arasında olan 25 örneğin test tekrarları sonucunda 15 örnek negatif, 10 örnek tekrarlı pozitif olarak bulundu. 10 tekrarlı pozitif örneğin 5’inde HCV RNA ($1.2-9.3 \times 10^2$ IU/mL) değerleri pozitif olarak saptandı.

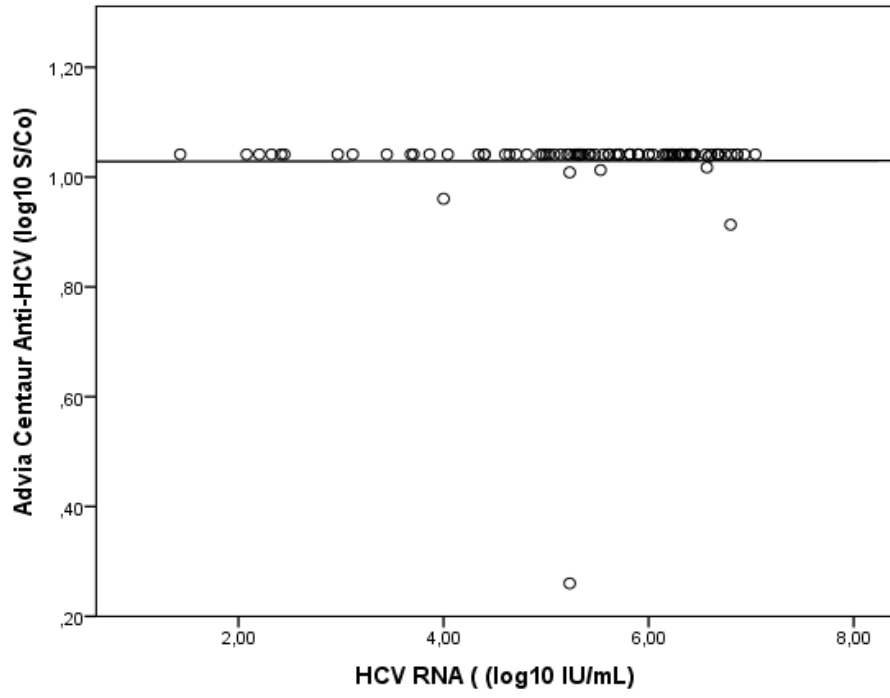


Şekil 17: HCV core antijen ve HCV RNA konsantrasyonları arasındaki korelasyon grafiği ($r=0.943$, $n=90$, $p<0.001$) (Hesaplamalar log10 cinsinden yapıldı.)

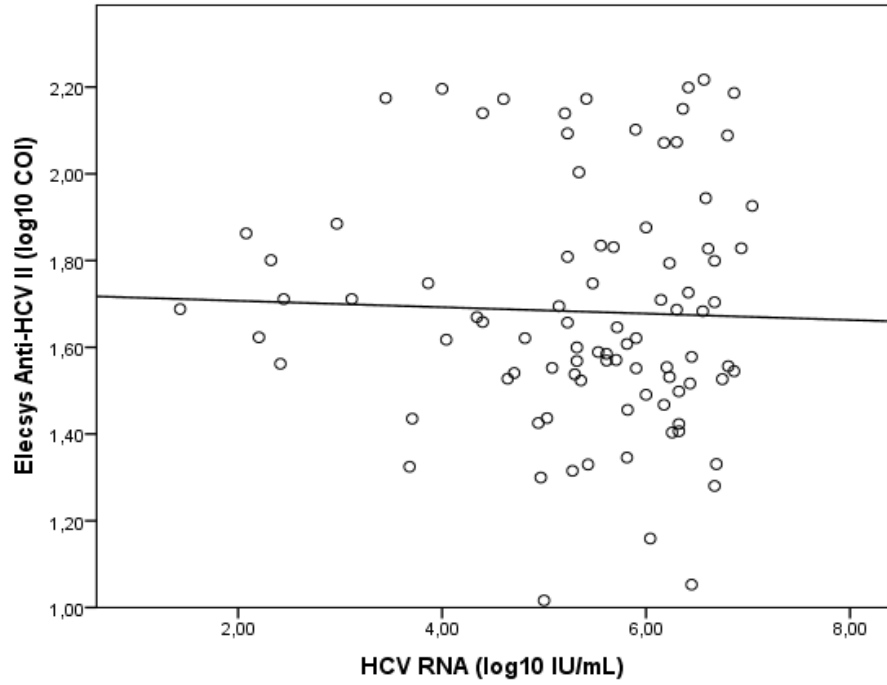
HCV RNA pozitif örneklerin hepsinde tüm anti-HCV testleri pozitif olarak sonuç verdi (n=90). Anti-HCV testlerinin S/Co oranları veya COI değerlerinin HCV RNA düzeyleriyle (IU/mL) arasındaki ilişki, Spearman korelasyon testi kullanılarak grafikler üzerinde her bir anti-HCV testi için ayrı ayrı gösterildi. HCV RNA düzeyleriyle S/Co oranları veya COI değerleri arasında hiçbir anti-HCV testinde anlamlılık saptanmadı (Şekil 18-22).



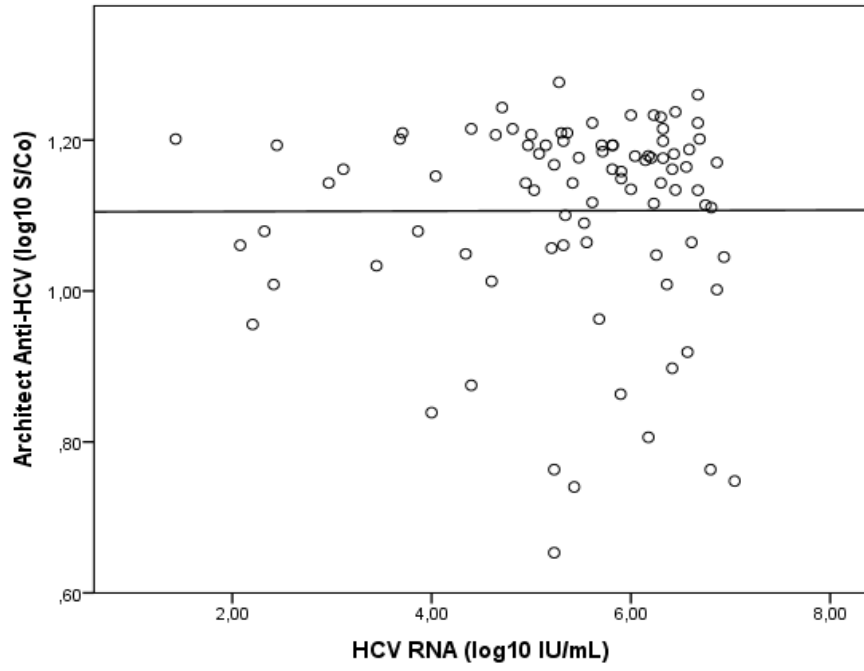
Şekil 18: HCV RNA-Vitros anti-HCV S/Co değerlerinin korelasyon grafiği ($r = -0.055$, $p=0.605$, $n=90$)



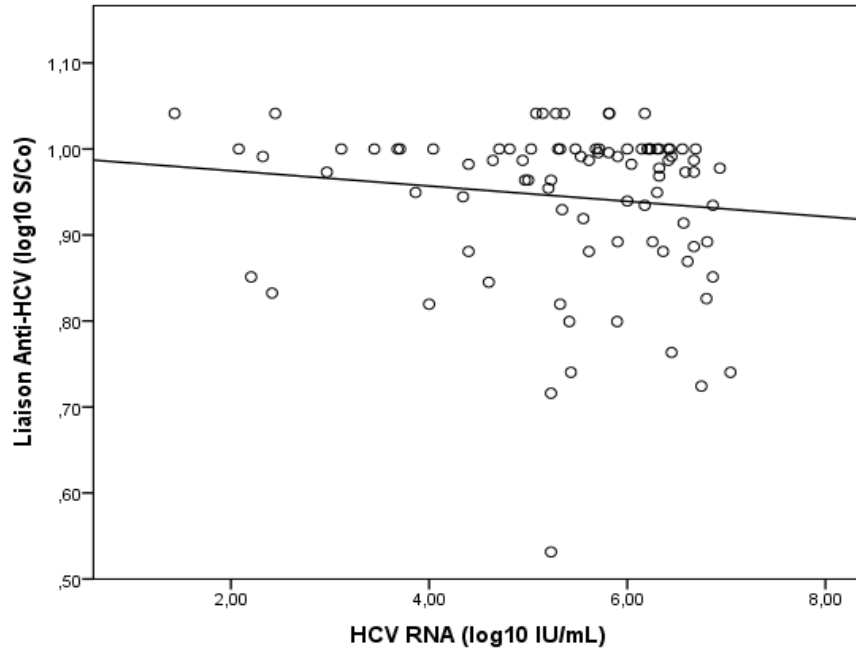
Şekil 19: HCV RNA-Advia Centaur anti-HCV S/Co değerlerinin korelasyon grafiği ($r = -0.053$, $p = 0.623$, $n = 90$)



Şekil 20: HCV RNA-Elecsys anti-HCV II COI değerlerinin korelasyon grafiği ($r = -0.022$, $p = 0.841$, $n = 90$)

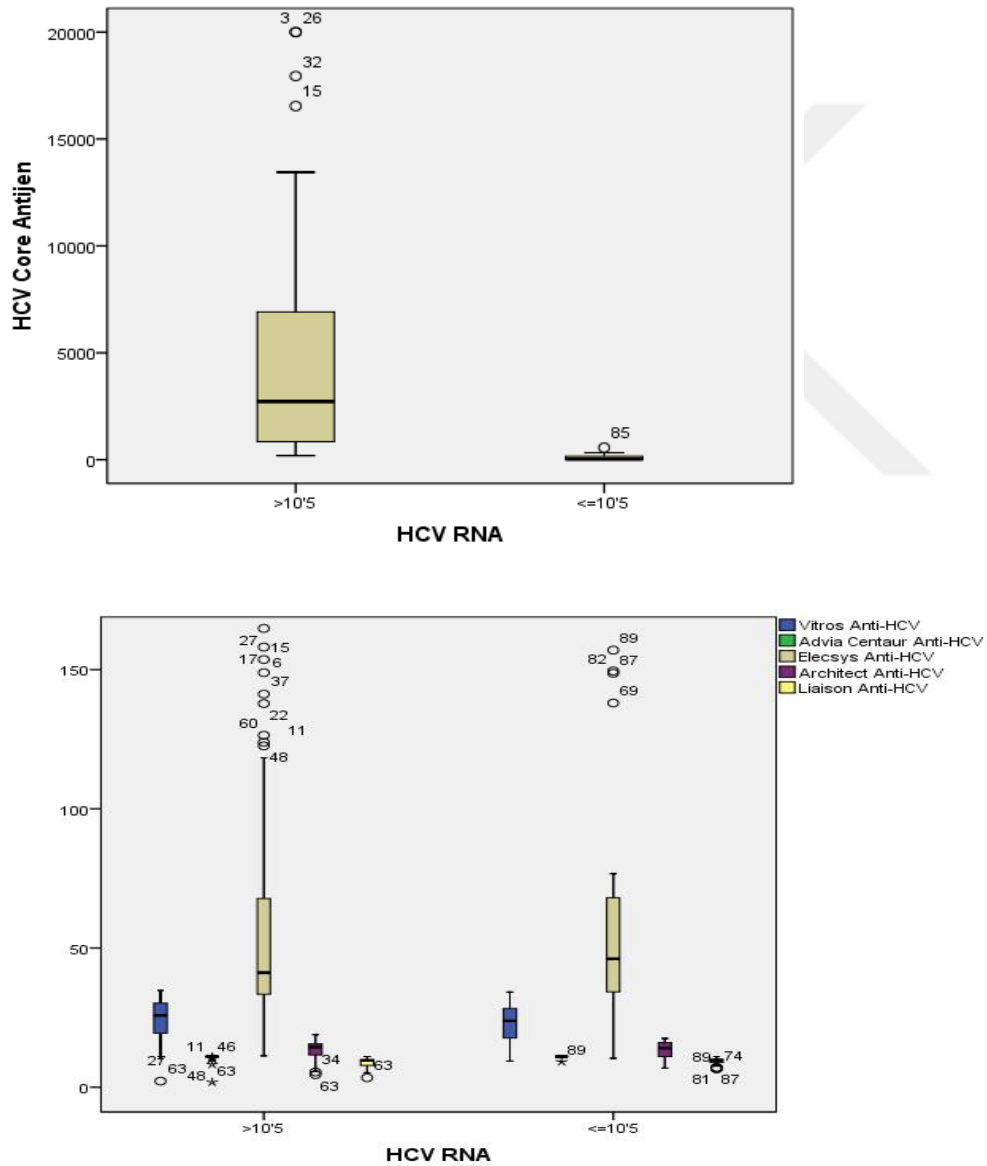


Şekil 21: HCV RNA-Architect anti-HCV S/Co değerlerinin korelasyon grafiği ($r = -0.009$, $p = 0.932$, $n = 90$)



Şekil 22: HCV RNA-Liaison anti-HCV S/Co değerlerinin korelasyon grafiği ($r = -0.189$, $p = 0.076$, $n = 90$)

HCV RNA düzeyleri $\leq 10^5$ ve $>10^5$ IU/mL olarak ayrıldığında; bu değerlere karşılık gelen Vitros anti-HCV, Advia Centaur anti-HCV, Architect anti-HCV, Liaison anti-HCV S/Co oranları, Elecsys anti-HCV II COI değerleri ve HCV core antijen fmol/L düzeylerindeki ilişki değerlendirildi (Şekil 23). Mann-Whitney U testine göre HCV core antijen testi için HCV RNA düzeylerine göre anlamlı ilişki saptanırken ($p<0.001$); Vitros anti-HCV ($p=0.239$), Advia Centaur anti-HCV ($p=0.455$), Elecsys anti-HCV II ($p=0.725$), Architect anti-HCV ($p=0.920$) ve Liaison anti-HCV ($p=0.564$) testleri için saptanmamıştır.



Şekil 23: $\leq 10^5$ ve $>10^5$ HCV RNA düzeylerinde elde edilen değerlerin karşılaştırılması (n=90)

Tüm örneklerin sonuçları değerlendirildiğinde 179 örnekte 5 farklı anti-HCV testi ve *recomLine* HCV IgG testleri uyumlu olarak 129 örnekte pozitif, 13 örnekte negatif olarak saptandı. 5 farklı anti-HCV ve *recomLine* HCV IgG testlerinin birbirleriyle olan uyumu %79.33 (142/179) olarak hesaplandı ve tüm antikor testlerinin sonuçları Tablo V’de verilmiştir.

Tablo V: 179 örneğin anti-HCV ve *recomLine* HCV IgG testleri sonuçlarına göre dağılımları

Sayı(%)	Vitros	Advia Centaur	Elecsys II	Architect	Liaison	<i>recomLine</i> HCV IgG
129 (72.07)	Pozitif	Pozitif	Pozitif	Pozitif	Pozitif	Pozitif
13 (7.26)	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
6 (3.36)	Pozitif	Pozitif	Pozitif	Pozitif	Pozitif	Borderline
4 (2.23)	Negatif	Pozitif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
4 (2.23)	Pozitif	Negatif	Negatif	Pozitif	Negatif	Negatif (2) BL (2)
4 (2.23)	Pozitif	Negatif	Pozitif	Pozitif	Pozitif	Pozitif (3) BL (1)
3 (1.67)	Pozitif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif (3)
3 (1.67)	Pozitif	Negatif	Pozitif	Negatif	Negatif	Negatif (3)
2 (1.12)	Pozitif	Pozitif	Pozitif	Pozitif	Pozitif	Negatif (2)
2 (1.12)	Pozitif	Pozitif	Pozitif	Negatif	Pozitif	Pozitif (1) BL (1)
2 (1.12)	Negatif	Negatif	Pozitif	Negatif	Negatif	Negatif (2)
1 (0.56)	Pozitif	Negatif	Negatif	Pozitif	Pozitif	Negatif (1)
1 (0.56)	Negatif	Pozitif	Negatif	Negatif	Pozitif	Negatif (1)
1 (0.56)	Pozitif	Negatif	Negatif	Negatif	Pozitif	Negatif (1)
1 (0.56)	Pozitif	Pozitif	Negatif	Pozitif	Negatif	Negatif (1)
1 (0.56)	Pozitif	Negatif	Pozitif	Pozitif	Pozitif	Negatif (1)
1 (0.56)	Pozitif	Negatif	Pozitif	Pozitif	Negatif	BL (1)
1 (0.56)	Pozitif	Negatif	Pozitif	Negatif	Pozitif	BL (1)
179						

BL: Borderline

Beş farklı anti-HCV testlerinin sonuçlarına bakılmaksızın, HCV RNA, HCV antijen ve *recomLine* HCV IgG testlerinin arasında uyumsuzluk saptanan 57 örnekte ek olarak 4.kuşak anti-HCV testi olan Innatest HCV Ab IV (Fujirebio, Gent, Belgium) testi çalışıldı (Tablo VI). Bu grupta 40 örnekte 5 farklı anti-HCV ve *recomLine* HCV IgG testlerinin birlikte pozitif olduğu saptandı. HCV RNA testi bu 40 örneğin hepsinde, HCV Core antijen testi ise 38’inde negatif olarak belirlendi. 36’sında Innatest HCV Ab IV sonucu pozitif olarak saptandı. HCV RNA sonucu negatif, Innatest HCV Ab IV sonucu pozitif olan bu 36 hastanın geçmişe yönelik dosyaları incelendiğinde hepsinin tedavi almış olan veya kronik hepatit C tanılı olarak takip edilen hastalar olduğu doğrulandı (23 tedavi almış hasta, 13 kronik hepatit C hastası). Innatest HCV Ab IV sonucu negatif bulunan 4 hastanın HCV RNA testlerinin de negatif olması sebebiyle, *recomLine* HCV IgG ve diğer anti-HCV testleri yalancı pozitiflik olarak değerlendirildi.

Tablo VI: Innatest çalışılan 57 hastanın HCV RNA, HCV core antijen ve *recomLine* HCV IgG sonuçları

Sayı	<i>recomLine</i> HCV IgG	HCV RNA	HCV core antijen	INNOTEST
36	Pozitif	Negatif	Negatif	Pozitif
1	Pozitif	Negatif	Pozitif	Negatif
1	Pozitif	Negatif	Pozitif	Pozitif
6	Pozitif	Negatif	Negatif	Negatif
1	Negatif	Negatif	Pozitif	Negatif
8	Borderline	Negatif	Negatif	Negatif
2	Borderline	Negatif	Pozitif	Negatif
1	Borderline	Pozitif	Negatif	Pozitif
1	Borderline	Negatif	Negatif	Pozitif
57				

V. TARTIŞMA

Hepatit C enfeksiyonunun büyük bir bölümünün (%80) kronikleşmesi, %20 kadar enfeksiyonun siroza ilerlemesi ve hepatosellüler karsinoma neden olması nedeniyle hepatitin önemli etkenlerindendir ve tanısının doğru, kısa sürede ve erken yapılması önemlidir (78, 79).

HCV enfeksiyonunun tanısı için direkt ve indirekt yöntemler kullanılmaktadır. İndirekt yöntemler antikor saptanması, direkt yöntemler ise antijen veya nükleik asit saptanması esasına dayanmaktadır. İndirek yöntemler hastanın kliniği açısından genellikle yeterli olamamaktadır (80). Antikor saptanmasını sağlayan anti-HCV testleri HCV prevalansının düşük olduğu popülasyonlarda (<%10) tarama amaçlı kullanımlarında yüksek yalancı pozitiflik oranları göstermektedirler (81). Bu nedenle HCV RNA varlığının gösterilmesi hastanın klinik durumunu belirlemek için önemli bir tanı yöntemidir. Enfeksiyonun doğası gereği aralıklı viremiye yol açması nedeniyle, HCV RNA'nın serumda saptanmaması tanıyı dışlamamaktadır. HCV enfeksiyonu açısından risk taşıyan hastalar aralıklı olarak izlenmelidir (80).

Rutin laboratuvarlarda CIA veya EIA metodlarına dayalı farklı anti-HCV testleri kullanılmaktadır (56). Bu çalışmada CIA yöntemine dayalı Architect anti-HCV, Elecsys anti-HCV II, Vitros anti-HCV, Advia Centaur anti-HCV ve Liaison anti-HCV testleri kullanıldı.

Çalışmamızda Vitros anti-HCV ve Advia Centaur anti-HCV testleri arasındaki uyum %86.5 (155/179) olarak bulundu. 2007 yılında Watterson ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmalarında Vitros ECi anti-HCV testi Advia Centaur anti-HCV, Chiron RIBA HCV 3.0 (SIA) ve Roche Cobas Amplicor HCV 2.0 (PCR) testleri ile karşılaştırılmıştır. Toplam 237 örnekle yaptıkları ilk çalışmalarında Vitros ECi anti-HCV ve Advia Centaur anti-HCV testlerinin uyumu değerlendirilmiş ve %92 (218/237) olarak bulunmuştur. VITROS ECi Anti-HCV S/Co <10 olan pozitif 32 örneğin kullanıldığı ayrı bir çalışmalarında

VITROS ECi Anti-HCV testi ile Advia Centaur HCV testinin %37 (12/32) uyumlu olduğu, RIBA'nın sadece örneklerin %25'inde 'şüpheli' veya pozitif saptandığı ve örneklerin sadece %3'ünde PCR pozitifliği olduğu belirlenmiştir (82).

Çalışmamızda Vitros anti-HCV ve Elecsys anti-HCV II testleri arasındaki uyum %93.2 (167/179) olarak bulundu. 2008 yılında Kim ve arkadaşları kemilüminesans yöntemlere dayalı Elecsys anti-HCV testi, Architect anti-HCV testi, Vitros anti-HCV testi ve Access HCV Ab PLUS testlerini kullanarak testlerin performanslarını karşılaştırdıkları çalışmalarında, her dört cihazda da çalışılabilen 267 serum örneğinden 16'sında cihazlar arası uyumsuzluk belirlemişlerdir. Vitros anti-HCV ve Elecsys anti-HCV testleri arasındaki uyum %97.3 (513/527) olarak saptanmıştır (55). Park ve arkadaşları 2012 yılında yaptıkları bir çalışmada Vitros anti-HCV testinin performansını değerlendirmek için 1011 serum örneğini Vitros anti-HCV ve Elecsys anti-HCV testleri ile çalışmışlardır. Her iki testle negatif bulunan sonuçlar negatif olarak kabul edilmiştir. Pozitif bulunan örnekler ayrıca Architect anti-HCV testi ile çalışılmıştır. Her 3 testle pozitif saptanan örneklerin sonucu pozitif olarak kabul edilmiştir. Aralarında uyumsuzluk bulunan örnekler için RIBA HCV 3.0 Strip immunblot testi ve HCV RNA testi çalışılmıştır. Bir karara varılamayan durumlarda klinik semptomlar, aminotransferaz yüksekliği, eski anti-HCV ve HCV RNA sonuçları gibi medikal kayıtlardan inceleme yapılmıştır. 1011 örneğin 794'ünü her 2 testle negatif, 200'ünü her 3 testle pozitif saptamışlardır. Uyumsuz bulunan 17 örneğin, 6'sında RIBA pozitif, 3'ünde negatif bulunmuştur. RIBA belirsiz bulunan 8 örneğin 5'i medikal kayıtlarla pozitif, 1'i negatif olarak değerlendirilmiştir. HCV RNA hiçbir uyumsuz sonuçta pozitif saptanmamıştır. Bu çalışmada Vitros anti-HCV ve Elecsys anti-HCV testlerinin uyumu %99.6 (1094/1011) bulunmuştur (83). Her iki çalışmada da uyum oranları bizim çalışmamıza yakın bulunmuştur.

Çalışmamızda Architect anti-HCV ve Vitros anti-HCV testleri arasındaki uyum %94.4 (169/179) olarak bulundu. Kim ve arkadaşlarının 2008 yılında,

kemilüminesans yöntemlere dayalı testleri kullanarak yaptıkları çalışmalarında Architect anti-HCV ve Vitros anti-HCV testleri arasındaki uyumu %98.1 (517/527) olarak belirlemişlerdir (55). Berger ve arkadaşlarının 2008 yılında 2034 serum örneğini kullanarak Architect anti-HCV testinin performansını, Vitros anti-HCV testi ile karşılaştırarak değerlendirdikleri çalışmalarında iki test arasındaki uyumu %98.1 (1996/2034) olarak bulmuşlardır (84). Her iki çalışmada da uyum oranları bizim çalışmamıza yakın bulunmuştur.

Yine, Kim ve arkadaşlarının 2008 yılında kemilüminesans yöntemlere dayalı yaptıkları aynı çalışmalarında Architect anti-HCV ve Elecsys anti-HCV testleri arasındaki uyum %97.1 (568/585) olarak bulunmuştur (55). Bizim çalışmamızda Architect anti-HCV ve Elecsys anti-HCV II testleri arasındaki uyum %92.1 olarak bulundu.

Çalışmamızda Architect anti-HCV ve Liaison anti-HCV testleri arasındaki uyum %93.8 (168/179) olarak bulundu. Krawczyk ve arkadaşlarının 2014 yılında Liaison XL ve Abbott Architect sistemlerini karşılaştırarak, 506 rastgele seçilen serum örneği ile yaptıkları çalışmada Liaison XL ve Abbott Architect arasındaki uyumu %98.81 (500/506) olarak belirlemişlerdir (85).

Ayrıca çalışmamızda Vitros anti-HCV ve Liaison anti-HCV testleri arasındaki uyum %92.7 (166/179), Advia Centaur anti-HCV ve Elecsys anti-HCV II %89.9 (161/179), Advia Centaur anti-HCV ve Architect anti-HCV %89.9 (161/179), Advia Centaur anti-HCV ve Liaison anti-HCV %92.7 (166/179) ve en iyi uyum Elecsys anti-HCV II ve Liaison anti-HCV %94.9 (170/179) testleri arasında bulunmuş olup, literatürde benzer uyumluluk çalışmalarına rastlanılmamıştır.

Çalışmaya aldığımız anti-HCV testlerinin S/Co veya COI değerlerinde ve birbirleriyle korelasyonlarında farklılıklar görüldü, bu durum testlerin dizaynı aşamasında kullanılan antijenlerin farklı olması veya antijenlerin farklı epitop kısımlarının kullanılmasından kaynaklanıyor olabilir (83). En yüksek kantitatif

değerler Elecsys anti-HCV II testiyle saptanmıştır. Elecsys anti-HCV II testinin kantitatif değerleri COI olarak belirlendiği için diğer testlerdeki S/Co değerlerinden daha yüksek değerler elde edilmiştir.

Çalışmamızda Vitros anti-HCV ve Architect anti-HCV S/Co oranları arasında orta korelasyon ($r=0.662$, $p<0.001$, $n=159$) saptandı. Berger ve arkadaşları 2008 yılında yaptıkları çalışmada Vitros anti-HCV testi ve Architect anti-HCV testi S/Co oranları arasındaki korelasyon katsayısını R^2 : 0.89 ($n=178$) olarak belirleyerek, iki test arasında iyi bir korelasyon saptamışlardır (84). 2013 yılında Yang ve arkadaşları Elecsys anti-HCV II testinin performansını değerlendirmek için Architect anti-HCV ve Vitros anti-HCV testleri ile karşılaştırmışlar, farklı örnek gruplarında farklı çalışmalar yapmışlardır. Toplam 861 rutin örneğin kullanıldığı ilk çalışmalarında 829 örneğe her 3 anti-HCV testi negatif sonuç vermiştir. Üç testin bir veya daha fazlasının pozitif sonuç verdiği 32 örnek için RIBA 3.0 testi çalışılmıştır. Örneklerin 18'i pozitif, 12'si negatif olarak doğrulanmıştır. Uyumsuz sonuç alınan diğer iki örnek çalışmadan çıkarılmıştır. Çalışmada Architect anti-HCV ve Vitros anti-HCV testleri S/Co değerleri arasında iyi bir korelasyon saptanmıştır ($r=0.97$, $p<0.01$) (86).

Aynı çalışmada, bizim çalışmamızda da olduğu gibi, Elecsys anti-HCV II testinin Vitros anti-HCV testi ($p=0.22$) ve Architect anti-HCV ($p=0.13$) testleriyle karşılaştırılmasında S/Co değerleri arasında korelasyon saptamamışlardır (86). Park ve arkadaşlarının 2012 yılında yapmış oldukları çalışmada anti-HCV testleri S/Co oranları aralarındaki korelasyonlar da belirlenmiştir. Elecsys anti-HCV ve Vitros anti-HCV testleri S/Co değerleri arasında orta korelasyon ($r=0.5159$, $p<0.0001$, $n=216$), Elecsys anti-HCV ve Architect anti-HCV testleri arasında orta korelasyon ($r=0.4998$, $p<0.0001$, $n=216$), Vitros anti-HCV ve Architect anti-HCV testleri arasında iyi korelasyon ($r=0.8019$, $p<0.0001$, $n=216$) saptamışlardır (83).

2013 yılında Hassan ve arkadaşlarının Architect anti-HCV testi, Vidas® anti-HCV testi (Biomerieux) ve Liaison® XL anti-HCV testlerini kullanarak 95 serum örneği üzerinde yaptıkları bir çalışmada, her üç cihaz 70/95 örneğe aynı

sonucu vermiştir. Architect anti-HCV ve Liaison anti-HCV testleri S/Co oranları arasında iyi korelasyon ($r=0.964$) bulunmuştur (87). Bizim çalışmamızda da Architect anti-HCV ve Liaison anti-HCV testleri S/Co oranları arasında iyi korelasyon ($r=0.842$, $p<0.001$, $n=154$) bulunmuştur.

Hepatit C virüsüyle enfekte olan kişinin yaşantısı oldukça etkileneceğinden, tanısının mümkün olduğunca güvenilir olması gereklidir (56). Bizim çalışmamızda çalışılan tüm testler sonucunda, 179 serum örneğinin 127'sinin kesin hükmünün HCV enfeksiyonu açısından pozitif, 52'sinin negatif olduğuna karar verildi. Vitros anti-HCV testi 159/179 pozitiflik saptayarak 32 örnekte yalancı pozitif sonuç verdi. Yalancı pozitiflik saptanan 32 örneğin 27'sinde S/Co değeri <5 , kalan 5 örnekte 6.60-21.80 değerleri arasında saptandı. Advia Centaur anti-HCV testi 145/179 örnekte pozitiflik saptayarak 19 örnekte yalancı pozitif sonuç verdi. 19 örneğin 17'sinde S/Co değeri <5 , 2 örnekte 5.28 ve 10.69 olarak belirlendi. Elecsys anti-HCV II testi 151/179 pozitiflik saptayarak 24 örnekte yalancı pozitiflik verdi. Diğer anti-HCV testlerinden farklı olarak 24 örneğin COI değerleri 4.01-97.46 arasında saptandı. Architect anti-HCV testi 149/179 pozitif sonuç belirleyerek 22 örnekte yalancı pozitif sonuç verdi. Tüm örneklerde S/Co değerleri <5 olarak belirlendi. Liaison anti-HCV testi 148/179 pozitiflik belirleyerek 21 örnekte yalancı pozitif sonuç verdi. Tüm örneklerde S/Co değerleri <5 olarak belirlendi.

2009 yılında Keşli ve arkadaşları Cobas[®] e 601 anti-HCV CIA sistem (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), Architect[®] i2000SR anti-HCV CIA sistem (Abbott Laboratories, Diagnostics Division, Abbot Park, IL, USA) ve Ortho[®] HCV 3.0 ELISA (Ortho-Clinical Diagnostics, Raritan, NJ, USA) sistemlerinin karşılaştırmalı çalışmalarında konfirmasyon testi olarak RIBA ve HCV-RNA testi (Qiagen, Hilden, Germany) kullanmışlardır. Toplam 7156 serum örneğinin dahil edildiği çalışmada, her üç cihazın toplamda pozitif sonuç verdiği 136 örnek içinde 23 RIBA 'belirsiz' sonuç, RNA ile negatif olarak bulunmuştur. Sonuçları uyumsuz bulunan 73 örnekte, RIBA 23 'belirsiz', 47 negatif, 3 pozitif ve RNA 3 pozitif, 70 negatif sonuç vermiştir. RNA ve RIBA ile gerçek anti-HCV

pozitifliği doğrulanan hasta sayısı 65'tir. Bu rakama göre yalancı pozitif Anti-HCV sayısı Cobas® e 601 için 71(%52.2), Architect® i2000SR için 21(%24.4) ve Ortho® HCV 3.0 ELISA için 1(%1.6) olarak bulunmuştur. Ayrıca Ortho® HCV 3.0 ELISA için 3 örnekte yalancı negatiflik tespit edilmiştir. Ortalama yalancı pozitiflik %26.1 olarak belirlenmiştir. CIA yönteminin kullanıldığı testlerde yalancı pozitiflik oranlarının yüksek olması nedeniyle S/Co oranları düşük olan hastalarda konfirmasyon testlerine ihtiyaç olduğu vurgulanmıştır (56).

Çalışmamızda tüm anti-HCV testlerinin duyarlılık ve negatif prediktif değerleri %100 olarak saptandı. Özgüllük ve pozitif prediktif değerler, yakın olarak belirlendi. En iyi test Advia Centaur anti-HCV, sonrasında sırasıyla Liaison anti-HCV, Architect anti-HCV, Elecsys anti-HCV II ve Vitros anti-HCV testleri olarak belirlendi. Farklı çalışmalara bakıldığında, bizim çalışmamızdaki özgüllük ve pozitif prediktif değerler diğer çalışmalardan daha düşük bulundu. Bunun nedeninin; çalışma grubumuzda anti-HCV düşük titre pozitif hastaların özellikle seçilmiş olmasından ve anti-HCV negatif hastaların az seçilmiş olmasından kaynaklandığını düşünmekteyiz.

Vitros anti-HCV testi için duyarlılık %100, özgüllük %38.46, PPD %73.77, NPD %100 ve doğruluk %77.46 olarak hesaplandı. Daha önce de bahsedilen Kim ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada her dört cihazda çalışılabilen 267 serum örneğinden 16'sında cihazlar arası uyumsuzluklar görülmüş olup, 16 örneğin hepsi HCV RNA açısından negatif saptanırken; numune yetersizliği nedeniyle 14/16'ünde RIBA çalışılabilmiş ve 10'u RIBA negatif, 4'ü 'şüpheli' olarak saptanmıştır. 'Şüpheli' sonuçların hesaplamalara dahil edilmediği çalışmada, Vitros anti-HCV testi için duyarlılık %100, özgüllük %96.5 olarak hesaplanmıştır (55). Petruzzello ve arkadaşları 2013 yılında Ortho Vitros anti-HCV CIA (Ortho Clinical Diagnostics), Ortho HCV 3.0 EIA (Ortho Clinical Diagnostics), RIBA (Ortho Clinical Diagnostics) ve Cobas Ampliprep/Taqman HCV RNA (Roche Molecular Diagnostics System) testlerini kullanarak 5550 hastayla yaptıkları bir çalışmada, 43 uyumsuz sonuç belirlemişlerdir. Birbiriyle farklı olan 43 sonuç, EIA ile negatif, CIA ile düşük pozitif (S/Co 1-8) bulunan

örnekler olup, çalışılan RIBA testi 21 negatif, 20 ‘şüpheli’ ve 2 pozitif sonuç vermiştir. RIBA negatif örnekler, Anti-HCV pozitifliği açısından yalancı pozitiflik olarak, RIBA ‘şüpheli’ ve pozitif örnekler gerçek pozitif olarak değerlendirilmiştir. Çalışmalarında Vitros anti-HCV CIA testinin duyarlılığını %100, özgüllüğünü %96,4 olarak belirlemişlerdir (88). Zachary ve arkadaşları 2005 yılında yaptıkları bir çalışmada 2020 hasta üzerinde Vitros anti-HCV, Monolisa anti-HCV ve Abbott AxSYM anti-HCV testlerini karşılaştırmışlardır. Örneklerden 1990’ı her üç testle negatif, 76’sı pozitif, 44’ü uyumsuz sonuç vermiştir. Pozitif bulunan 76 örnek 3 farklı immunblot testle doğrulanmaya çalışılmış, 69’u bu testlerle doğrulanmış, 1’i RNA testiyle doğrulanmış, 6’sı sonuca varılamadığı için hesaplamalardan çıkarılmıştır. Uyumsuz bulunan 44 sonuç için çalışılan immunblot testleriyle 34’ü negatif olarak doğrulanmış, 10’u sonuca varılamadığı için hesaplamalardan çıkarılmıştır. Bu doğrulamalarla 1934 kesin negatif, 70 kesin pozitif sonuç elde edilmiştir. Vitros anti-HCV testi için yalancı pozitiflik sayısı 13 olarak bulunmuş, özgüllük %99.33 olarak hesaplanmıştır (89). Park ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada Vitros anti-HCV testi için özgüllük %99.5, duyarlılık %99.5, PPD %98.1, NPD %99.9 (83); Yang ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada özgüllük %99.05, duyarlılık %100, PPD %69.23 ve NPD %100 olarak hesaplanmıştır (86).

Çalışmamızda Elecsys anti-HCV II testi için duyarlılık %100, özgüllük %53.84, PPD %78.94, NPD %100 ve doğruluk %83.09 olarak hesaplandı. 2013 yılında Esteban ve arkadaşları farklı merkezlerde, Elecsys anti-HCV II, Architect anti-HCV (Abbott Laboratories, Wiesbaden, Germany), Vitros ECi anti-HCV (Ortho Clinical Diagnostics, High Wycombe, UK) Advia Centaur HCV (Siemens Healthcare Diagnostics, Marburg, Germany) ve farklı testler kullanarak yaptıkları bir çalışmada, Elecsys anti-HCV II testini diğer cihazlarla karşılaştırmış ve konfirmasyon testleriyle doğrulamışlardır. Elecsys anti-HCV II testinin özgüllüğü toplam 6850 kan donörü ve 3922 yatan hasta popülasyonunda sırasıyla %99.84 ve %99.66 olarak bulunmuştur. Çapraz reaksiyon faktörlerinin ve HCV enfeksiyon riskinin bulunduğu 2397 örnek üzerinde gerçekleştirdikleri bir diğer çalışmada, Elecsys anti-HCV II testi 6 hastada yalancı pozitiflik göstererek, özgüllüğü

%99.66 olarak hesaplanmıştır (90). Yoo ve arkadaşları 2015 yılında 9 farklı bağımsız merkezde gerçekleştirdikleri bir çalışmada, Elecsys Anti-HCV II testini, içinde Architect anti-HCV, Vitros ECI anti-HCV ve Advia Centaur anti-HCV testlerinin de bulunduğu 7 ayrı test sistemiyle karşılaştırmışlardır. Her merkez Elecsys Anti-HCV II testini kendi bünyesinde bulunan testlerle karşılaştırmıştır. Toplam 7726 rutin serum örneğinin kullanıldığı çalışmada, Elecsys anti-HCV II testinin duyarlılığı %100, özgüllüğü %99.66 olarak belirlenmiştir (91). Park ve arkadaşlarının çalışmasında Elecsys anti-HCV II testinin özgüllüğü %99.9, duyarlılığı %100, PPD %99.5, NPD %100 (83); Yang ve arkadaşlarının çalışmasında özgüllük %99.64, duyarlılık %100, PPD %85.71 ve NPD %100 olarak bulunmuştur (86).

Bu çalışmada Advia Centaur anti-HCV testi için duyarlılık %100, özgüllük %63.46, PPD %82.56, NPD %100 ve doğruluk %86.61 olarak hesaplandı. Dwyer'ın 2004 yılında yayınlamış olduğu makalede, Advia Centaur anti-HCV testinin, Abbott AxSYM anti-HCV testiyle karşılaştırılması sonucunda Avrupa performans değerlendirme sonuçlarının duyarlılığının %100 (449/449), özgüllüğünün %99.9 (5217/5222) olarak bulunduğunu belirtmiştir (92). Yoo ve arkadaşları Advia Centaur anti-HCV testinin duyarlılığını %100, özgüllüğünü %99.83 olarak bulmuşlardır (91).

Bu çalışmada Architect anti-HCV testi için duyarlılık %100, özgüllük %57.69, PPD %80.35, NPD %100 ve doğruluk %84.50 olarak hesaplandı. Jonas ve arkadaşları 2005 yılında Architect anti-HCV testinin performansını belirlemek için 3811 ve 1984 örnekle yaptıkları bir çalışmada Architect anti-HCV testinin özgüllüğünü sırasıyla %99.76 ve %99.22 olarak bulmuşlardır (93). 2013 yılında Demircili'nin 189 hastayla yapmış olduğu bir çalışmada, 148 hasta Architect anti-HCV pozitif, 80 hasta HCV RNA pozitif, 79 hasta strip immunblot (SIT) pozitif ve 77 hasta HCV core antijen pozitif olarak bulunmuştur. SIT testiyle 'şüpheli' bulunan 8 örnekte HCV RNA negatif olarak tespit edilmiştir. HCV RNA doğrulama testi olarak kabul edildiğinde Architect anti-HCV testinin özgüllüğü %36.6, duyarlılığı %98.7, PPD %53.3, NPD %97.5 ve doğruluk %62.9 olarak

belirlenmiştir (94). Yang ve arkadaşları Architect anti-HCV testi için özgüllük, duyarlılık, PPD, NPD sırasıyla %99.17, %94.44, %70.83, %99.88 olarak bulmuşlardır (86). Kim ve arkadaşları Architect anti-HCV testi için duyarlılığı %100, özgüllüğü %98.8 (55), Yoo ve arkadaşları sırasıyla %97.3 ve %99.76 olarak belirlemişlerdir (91).

Liaison anti-HCV testi için duyarlılık %100, özgüllük %59.61, PPD %81.09, NPD %100 ve doğruluk %85.21 olarak hesaplandı. Malm ve arkadaşları 2015 yılında kan donörlerinde, Liaison XL cihazının farklı parametrelerde performansını belirlemek için Abbott Architect sistemi ile karşılaştırmışlardır. Liaison XL anti-HCV testinin duyarlılık ve özgüllükleri sırasıyla %100 ve %99.9 olarak oldukça yüksek bulunmuştur (95). Hassan ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada Liaison anti-HCV testinin özgüllüğü %100, duyarlılığı %89.6 olarak hesaplanmıştır (87). Krawczyk ve arkadaşları Liaison anti-HCV testinin özgüllüğünü %99.35, duyarlılığını %93.18 bulmuşlardır (85).

Çalışmamızda yalancı pozitiflik için kritik eşik değerler Vitros anti-HCV testi için 6.6 S/Co, Advia Centaur anti-HCV testi için 5.28 S/Co, Elecsys anti-HCV II testi için 14.88 COI, Architect anti-HCV testi için 3.6 S/Co ve Liaison anti-HCV testi için 4.3 S/Co olarak belirlendi. Kim ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada, S/Co kritik eşik değerlerini Architect anti-HCV için ≥ 3 ve Vitros anti-HCV için ≥ 7 olarak belirlemişlerdir (55). Keşli ve arkadaşları Architect anti-HCV için eşik değeri 5 S/Co olarak belirlemişlerdir. Altuglu ve arkadaşları 2011 yılında yapmış oldukları çalışmalarında Architect anti-HCV testi için eşik değer noktalarını 3.27 olarak belirlemişlerdir (96). Yang ve arkadaşları çalışmalarında Elecsys anti-HCV II testi için eşik değeri 20.0 olarak belirlemişlerdir (86).

Ayrıca çalışmamızda HCV RNA pozitif saptadığımız örneklerde, tüm anti-HCV testlerinin S/Co veya COI değerleri HCV RNA (IU/mL) düzeyleriyle karşılaştırıldı ve hiçbir testte anlamlılık saptanmadı (Vitros anti-HCV $p=0.605$, Advia Centaur anti-HCV $p=0.623$, Elecsys anti-HCV II $p=0.841$, Architect anti-

HCV $p=0.932$, Liaison anti-HCV $p=0.076$). Anti-HCV testlerinin sayısal sonuçlarını değerlendirerek, HCV RNA düzeyleri hakkında bir kanıya varmanın mümkün olmadığı kanaatine varıldı. Literatürde benzer çalışmalara rastlanılmamıştır.

Mevcut HCV enfeksiyonunun belirlenebilmesi için HCV RNA varlığının nükleik asit temelli testlerle gösterilmesi gerekmektedir. Fakat nükleik asit temelli testlerin özel donanım ve deneyimli personel gerektirmesi, yüksek maliyetli olması gibi nedenlerle HCV core antijen testleri, ilk olarak 1990'lı yıllarda nükleik asit temelli testlere alternatif olarak geliştirilmeye başlanmış testlerdir (97). 2000'li yılların başında kullanıma giren EIA metoduna dayalı trak-C (Ortho Clinical Diagnostics, Raritan, NJ, USA) HCV core antijen testinin kantitatif ölçüm sınırı 1.5 pg/mL iken, son yıllarda kemilüminesans yöntemine dayalı geliştirilen Architect HCV Core antijen (Abbott, Germany) testinin 0.06 pg/mL olarak duyarlılığı arttırılmıştır. Her iki testin de HCV RNA düzeyleriyle iyi korele olduğu bildirilmiştir (98).

Çalışmamızda 179 örneğin 94'ünde (%52.51) HCV core antijen testi pozitif saptandı. Örneklerin 89/94'ü HCV RNA testi pozitif olarak belirlendi. HCV RNA negatif olup antijen tekrarlı pozitifliği saptanan 5/94 örneğin HCV core antijen değerleri 3.56-6.43 fmol/L arasında saptandı. Beş örneğin 1'i kronik hepatit C tanısı olduğu bilinen bir hastadan elde edilen örnek olup, *recomLine* HCV IgG ve Innatest HCV Ab IV testleri de pozitif olarak belirlendi. HCV RNA düzeyleri enfeksiyon süresince dalgalanma gösterdiğinden, 3 hafta sonra alınacak numunede HCV RNA'nın pozitifleştiği görülebilirdi fakat çalışmamızın doğası gereği numuneler biriktirilerek çalışıldığından, bu hastadan yeni numune alınamadı. Demircili 2013 yılında yaptığı çalışmasında anti-HCV, HCV core antijen, SIT pozitif ve HCV RNA negatif olarak saptadığı 2 örnek için, 3 hafta sonra tekrar serum örneği almış ve yeni örneklerinde HCV RNA'nın pozitif bulunduğunu raporlamıştır (94). Diğer 4/5 örneğin 2'sinde *recomLine* HCV IgG test sonuçları borderline, 1'inde negatif, 1'inde pozitif olarak belirlenmiş olup tüm örneklerin Innatest HCV Ab IV sonuçları da HCV RNA ile birlikte negatif

olduğundan bu örneklerdeki HCV core antijen pozitifliği yalancı pozitiflik olarak değerlendirildi. 2010 yılında Miedouge ve arkadaşlarının 98 HCV RNA pozitif örnek ve 3009 hemodiyaliz hastasından elde edilen örneklerle yaptıkları bir çalışmada Architect HCV core antijen testinin performansı araştırılmıştır. Toplam 3009 hemodiyaliz hastasıyla yaptıkları çalışmada 2752/3009 anti-HCV negatif saptanmıştır. Anti-HCV negatif saptanan örneklerden 2729'u HCV RNA ve HCV core antijen testleriyle negatif bulunurken, 2'si pozitif bulunmuştur. Uyumsuz olan 21 örnek HCV core antijen pozitif, HCV RNA negatif saptanmıştır. Antijen değerleri 'grayzone' aralıkta belirlenen 21 örnek, serum yetersizliği nedeniyle tekrara alınmadığından ilk çalışmanın sonuçları yalancı pozitif kabul edilmiştir (99).

Miedouge ve arkadaşlarının çalışmasında, 98 HCV RNA pozitif örneğin 90'ında antijen pozitifliği saptamışlardır. Antijenin negatif saptandığı örneklerdeki HCV RNA düzeyleri 6 örnekte, 0-2000 IU/mL, 2 örnekte 2001-6000 IU/mL olarak bulunmuştur. Her iki test arasındaki uyum genotipten bağımsız olarak anlamlı bulunmuştur ($r=0.9041$, $p<0.0001$) ve antijen testinin özgüllüğü %99.2, duyarlılığı %100 olarak belirlenmiştir (99). Bizim çalışmamızda da HCV RNA'sı $2,7 \times 10^1$ IU/mL düşük titre pozitif saptanan 1 örnekte HCV core antijen negatif sonuç verdi ve HCV RNA (IU/mL) ve HCV core antijen (fmol/L) düzeyleri arasında log10 hesaplamaları üzerinden iyi korelasyon saptandı ($r=0.943$, $p<0.001$). HCV core antijen testinin duyarlılığı %98.88, özgüllüğü %94.38, pozitif prediktif değeri %94.68, negatif prediktif değeri %98.82 ve doğruluğu %96.67 olarak belirlendi.

2000 yılında Tanaka ve arkadaşlarının birinci jenerasyon EIA HCV Core Antijen testinin performansını değerlendirmek için yaptıkları bir çalışmada, antijen testini hem in-house nested RT-PCR ile hem de Amplicor HCV testi versiyon 1 (Nippon Roche Co. Ltd, Tokyo, Japan) ile karşılaştırmışlardır. Seçtikleri ilk grup 75 kronik hepatit C, 58 kronik hepatit B, 24 non-viral KC hastası ve 50 sağlıklı bireyden oluşmaktadır. HCV core antijen pozitifliği sadece kronik hepatit C hastalarında görülmüş olup, 73/75 (%97) pozitif saptanmıştır.

Pozitif olmayan 2 örneğin HCV RNA düzeyleri : $<1.0 \times 10^3$ ve 1.4×10^3 kopya/ml olarak belirlenmiştir. İkinci grup hasta 17 transfüzyon ilişkili akut hepatit C hastasından oluşmaktadır. Antijen testi 16/17 (%94) hastada pozitif bulunmuştur. Negatif bulunan 1 örneğin HCV RNA'sı da negatif olarak saptanmıştır. Üçüncü grup 167 Anti-HCV pozitifliği olan asemptomatik gruptan oluşmaktadır. HCV RNA 129/167 (%77) hastada pozitif olarak bulunmuştur. Antijen pozitifliği 126/129 (%98) örnekte tespit edilmiştir. Antijen saptanamayan örneklerin genotipleri bir hastada genotip1b, diğer iki hastada genotip2a olarak belirlenmiştir. Dördüncü grup interferon tedavisi alan 48 kronik hepatit C hastasından oluşmaktadır. Antijen testiyle HCV RNA arasında önemli pozitif korelasyon belirlenmiş olup, tedavi yanıtıyla antijen sonuçları arasında iyi bir uyum gözlenmiştir. Genotipler arası HCV RNA düzeylerinde farklılık saptanırken, antijen miktarlarında saptanmamıştır. Bu çalışmada antijen testinin tedavi altındaki hastalarda HCV RNA testine alternatif olabileceği vurgulanmıştır (100).

Couroucé ve arkadaşları 2000 yılında yapmış oldukları bir çalışmada, hemodiyalize giren 28 hastadan alınan 135 seri kan örneği ve 6 HCV RNA pozitif, anti-HCV negatif hastadan aldıkları kan örnekleriyle HCV Ag ELISA (Ortho Clinical Diagnostics, Raritan, NJ) testinin performansını değerlendirmişlerdir. HCV RNA pozitif 6 kan donöründen yapılan testlerde 5/6 (%83.3) antijen testi pozitif bulunmuştur. Antijen negatif bulunan 1 örneğin HCV RNA viral yükü 6×10^4 kopya/ml olarak belirlenmiştir. Toplam 28 hastadan seri olarak toplanan 135 örneğin 43'ünde hem HCV RNA hem de antijen testi negatif olarak bulunmuştur. HCV RNA pozitif olan 92/135 örneğin, 81'inde (%88) antijen pozitif belirlenebilmiştir. Antijen tespit edilemeyen 11 örneğin 8'inde viral yük $<10^5$ kopya/ml, iken 3'ünde 1.28×10^5 ve 3.93×10^5 arasında saptanmıştır. Bu 28 hastadan 20'sinin seri örneklerinde antijen saptanma günü ve antikör saptanma günleri belirlendiğinde antijenin antikora göre ortalama 48.8 gün daha erken saptandığı gözlemlenmiştir ve bu 20 hastadan 15'inde antijen pozitifliği, HCV RNA ile birlikte aynı günde saptanmıştır. Diğer 5 örnekte antijen saptanma süreleri 5-10 gün arasında değişmektedir. Testin kullanım kolaylığı, zaman ve

para tasarrufu, antikordan erken sürede saptanması gibi verilerin ışığında nükleik asit temelli testlere alternatif olarak kan donörlerinde tarama testi olarak kullanılabileceği belirtilmiştir (101).

2009 yılında Morota ve arkadaşları Architect HCV core antijen testini değerlendirmek için yaptıkları bir çalışmada, 197 genotipi bilinen HCV RNA pozitif örnek, 10 serokonversiyon paneli ve kan donörleri, yatan hastalar ve HCV enfeksiyonu ile ilişkisi olmayan hastalardan elde edilen toplam 5403 örnekle çalışmışlardır. HCV RNA pozitif 197 örnekten 196'sı (%99.5) antijen testiyle pozitif bulunmuştur. Antijen saptanamayan 1 örneğin genotipi 4a/4c olarak belirlenmiştir. Serokonversiyon panelleriyle yapılan çalışmada HCV RNA testinin ve antijen testinin virüsü saptama süreleri arasında fark saptanmamış olup, çalışılan antikör testiyle antijen tespiti arasında ortalama 35.8 (23-65) gün saptanmıştır. Panellerde HCV RNA pozitif olan toplam 68 örnekten 66'sında (%97.1) HCV core antijen pozitif sonuç vermiştir. Antijen pozitifliği saptanmayan iki örneğin viral yükleri <500 IU/mL olarak belirlenmiştir. Özgüllük hesaplamaları için kullanılan 5403 serum örneği içinde ilkinde 21, tekrarlı çalışmalarında 10 hastada antijen pozitifliği tespit edilmiş, bunların da 9'u anti-HCV ve HCV RNA testleriyle doğrulanmıştır. İlk çalışmadaki özgüllük %99.78 (5382/5394), tekrarlı çalışmalarda %99.98 (5393/5394) olarak belirlenmiştir. HCV RNA ve HCV Ag testleri arasında iyi korelasyon saptanmıştır ($r=0.74$). Tüm bu sonuçlar değerlendirildiğinde HCV RNA testine ulaşılabilirliğin zor olduğu durumlarda antijen testinin alternatif olarak kullanılabilecek bir test olduğu kanaatine varılmıştır (102).

Ross ve arkadaşları 2010 yılında Architect HCV core antijen testinin performansını belirlemek için birden fazla grupta çalışma yapmışlardır. İlk olarak anti-HCV negatif 100 örnekte, HCV Ag sonuçlarını hepsinde negatif belirleyerek analitik özgüllüğü %100 bulmuşlardır. Serokonversiyon panelleriyle yaptıkları çalışmada HCV antijen testinin antikör testine göre 4-16 gün daha erken saptama yaptığını, 385 HCV RNA pozitif örnekle yaptıkları bir diğer çalışmada antijen ile aralarında iyi korelasyon ($r=0.857$) olduğunu bulmuşlardır (103).

Keşli ve arkadaşları 2011 yılında 212 hastada yapmış oldukları bir çalışmada Architect HCV core antijen testini, Architect anti-HCV ve HCV RNA testi (Qiagen, Hilden, Germany) sonuçlarıyla karşılaştırmışlardır. 52/212 örnek HCV RNA ve antijen açısından negatif bulunmuştur. 38/52 örnekte anti-HCV yalancı pozitifliği saptanmıştır. Yalancı pozitiflik belirlenen 38 örneğin 22'sinde S/Co oranı <6 olarak bulunmuştur. 160/212 serum örneği HCV RNA ile, 154/212 antijen testiyle pozitif bulunmuştur. HCV RNA pozitif, antijen negatif saptanan 6 örnekten 5'inin HCV RNA düzeyleri 0.75×10^2 - 2.49×10^2 IU/mL arasında ve bir örnek $6,562 \times 10^3$ IU/mL olarak belirlenmiştir. HCV RNA ile kıyaslandığında antijen testinin özgüllüğü %100, duyarlılığı %96.3, pozitif prediktif değeri %100 ve negatif prediktif değeri %89.7 olarak hesaplanmıştır. HCV RNA ve antijen testleri arasında iyi korelasyon bulunmuştur ($r=0.864$). Antikor testlerinin yalancı pozitiflik oranlarının yüksek olması, akut-geçirilmiş-kronik enfeksiyon ayrımının yapılamaması, serokonversiyonu saptamasının uzun olması (45-68 gün), immün yetmezlikli hastalarda saptanamaması ve antijen testinin yüksek özgüllük ve duyarlılığa sahip olması gibi nedenlerle, antijen testinin HCV enfeksiyonu tanısında kullanılabileceği vurgulanmaktadır (67).

Ottiger ve arkadaşları 2013 yılında yapmış oldukları çalışmada Architect HCV core antijen testinin uyumunu değerlendirmişlerdir. Kronik hepatit C tanılı 101 hastadan elde ettikleri 126 HCV RNA pozitif serum örneğinin, 105'inde HCV core antijen pozitif bulunmuş, HCV core antijenin belirlenemediği HCV RNA düzeyleri 2.5×10^2 - 3.16×10^4 IU/mL (2.4 - $4.5 \log_{10}$ IU/mL) arasında saptanmıştır. HCV antijen ve HCV RNA arasındaki lineer regresyon R^2 0.887 olarak hesaplanmış, genotipler arası fark gözlenmemiştir. Ayrıca 221 anti-HCV pozitif örnekle yaptıkları bir diğer çalışmalarında, 117/221 HCV core antijen pozitif bulmuşlardır. Antijen negatif 104/221 örnek için HCV RNA ve immunblot ek testlerine ihtiyaç duymuşlardır. Örneklerin 41'inde blot pozitifliği, 6'sında 23-2620 IU/mL arasında değişen HCV RNA pozitifliği belirlemişlerdir. Toplam 57 örnekte, blot sonuçlarının negatif ve belirsiz olması nedeniyle HCV enfeksiyonu olmadığı düşünülmüştür. Bu veriler ışığında HCV core antijen testinin; pozitif saptanan anti-HCV testinden sonra HCV tanı algoritmasına sokulabileceği, antijen

testinin negatif saptanması halinde immunblot testiyle doğrulama yapılması gerektiği, blot testinin de negatif saptandığı durumlarda ek test yapılmadan enfeksiyon açısından negatif olarak yorumlanabileceği ancak şüpheli durumlarda 2-3 ay sonrasında testlerin tekrarlanabileceği önerisinde bulunmuşlardır (104).

Cicioğlu ve arkadaşları 2014 yılında yaptıkları bir çalışmada Architect HCV core antijen testini HCV RNA sonuçlarıyla karşılaştırmışlardır. Toplam 115 Anti-HCV pozitif hastanın 96'sında HCV RNA pozitif saptanmıştır (12 düşük viremili hasta). HCV antijen ise 83/115 hastada pozitif bulunmuştur. Antijen testinin özgüllüğü %100, duyarlılığı %86.5, pozitif prediktif değeri %100, negatif prediktif değeri %59.4 ve doğruluğu %88.7 olarak belirlenmiştir. HCV RNA sonuçlarıyla antijen testinin iyi korele olduğu gösterilmiştir. HCV antijen testinin pozitif dediği hastaların pozitif olarak rapor edilebileceği, negatif dediği hastaların hepsinin gerçek negatif olmadığı, konfirmasyon testine ihtiyaç olduğu belirtilmiştir (105).

Florea ve arkadaşları 2014 yılında Architect HCV core antijen testini kronik hepatit C hastalarında çalışmışlardır. Toplam 76 serumun dahil edildiği çalışmada 58 serum HCV RNA pozitif, 18'i RNA negatif saptanmıştır. Antijen pozitifliği 43/58 örnekte saptanmıştır. Antijenin saptanamadığı durumlarda viral yükler düşük bulunmuştur. HCV RNA negatif olan örneklerin hepsi antijen negatif bulunmuştur. Antijen testinin duyarlılığı %82.4, negatif prediktif değeri %80.9, özgüllük ve pozitif prediktif değeri %100 olarak belirlenmiştir. HCV RNA ile antijen değerleri arasında iyi korelasyon saptanmış olup, aktif enfeksiyon durumlarında antijen testinin moleküler yöntemlere ulaşılamadığında kullanılabileceği belirtilmiştir (66).

2014 yılında Chevaliez ve arkadaşları kronik hepatit C hastalarında Architect HCV core antijen testi ve 2 farklı HCV RNA testini -m2000 (Abbott Diagnostics, Chicago, IL) ve CAP/CTM HCV v2.0 (Roche Molecular Systems, Pleasanton, CA)- 3 farklı grup toplam 514 örnek üzerinde çalışmışlardır. İlk grupta bulunan HCV RNA ve antikor negatif olan 171 örneğin hiçbirinde antijen

pozitif saptanmamış, özgüllük %100 olarak belirlenmiştir. İkinci grup 26 HCV antikor pozitif HCV RNA negatif olan seropozitif hastalardan oluşmaktadır. Bu grupta da hiç antijen pozitifliği tespit edilmemiştir. Üçüncü grup 317 örnekten oluşan HCV RNA ve antikor pozitif, kronik hepatit C enfeksiyonu olan gruptur. Altı örnek haricinde hepsinde HCV Core antijen saptanmıştır. HCV RNA düzeyleri ve antijen arasında tüm genotiplerde her iki HCV RNA test yöntemiyle korelasyon bulunmuştur (*m2000* $r=0.89$; CAP/CTM $r=0.88$). Antijen testinin tarama, tanı ve tedavi takibinde HCV RNA'ya alternatif bir test olabileceği belirtilmiştir (106).

Long ve arkadaşları 2014 yılında HCV core antijen (Architect HCV Core antijen) testinin performansını, HCV enfeksiyonu ile birlikte HIV-1 enfeksiyonu olan ve olmayan hastalar üzerinde değerlendirmişlerdir. 2009-2012 yılları arasında 66'sı HIV-1/HCV koenfeksiyonlu hastalardan oluşan, 139 hastayı takip ederek çalışmaya dahil etmişlerdir. HCV RNA pozitif saptanan hastaların hiçbirinde HCV core antijen testi negatif sonuç vermemiştir. HCV enfekte hasta grubunda 2009 yılında HCV RNA ve HCV core antijen testleri arasında iyi korelasyon saptanmıştır (genotip1b $r=0.802$, genotip2a $r=0.786$). 2012 yılında yaptıkları ölçümlerde de benzer şekilde iyi korelasyon belirlenmiştir (genotip1b $r=0.919$, genotip2a $r=0.944$). HIV-1/HCV koenfeksiyonlu hasta grubunda HCV RNA ve HCV core antijen düzeyleri arasında genotipten bağımsız iyi korelasyon düzeyleri saptanmıştır (107).

Mixson-Hayden ve arkadaşları 2015 yılında Architect HCV core antijen testinin performansını değerlendirmek için, 175 plazma donörü ve 376 uyuşturucu bağımlısı hastada bir çalışma yapmışlardır. 175 örneğin 73'ü antikor (Vitros anti-HCV) negatif HCV RNA pozitif, 30'u antikor pozitif HCV RNA negatif, 72'sinde her iki test pozitif olarak saptanmıştır. Antijen pozitifliği RNA pozitif hastaların 137/145'inde (%94.5) saptanmıştır. Toplam 376 örnekli ikinci grupta 98 antikor pozitif örnek saptanmıştır. 87/98 (%88.8) örnek HCV RNA pozitif olarak belirlenirken, 82/87 (%94.3) antijen pozitif bulunmuştur. Antijenin saptanmadığı durumlarda RNA düzeyi, saptanan durumlara göre daha düşük saptanmıştır. Her

iki grupta da HCV RNA ve antijen arasında iyi korelasyon ($r=0.959$) belirlenmiştir (97).

Bu çalışmada HCV RNA pozitif saptanan 90 örneğin IU/mL değerleri $>10^5$ ve $\leq 10^5$ olarak ayrıldığında, bunlara karşılık gelen HCV core antijen fmol/L düzeyleri ve anti-HCV testlerinin S/Co oranları veya COI değerleri log10 hesapları üzerinden karşılaştırılmış olup, sadece HCV core antijen değerleri için iki grup arasında anlamlı ilişki saptandı ($p<0.001$). Keşli ve arkadaşlarının 2011 yılında, Demircili'nin 2013 yılında yapmış oldukları çalışmalarda da HCV RNA düzeylerinin 10^5 IU/mL sınır değerinin altındaki ve üstündeki değerlere karşılık gelen HCV core antijen miktarlarında anlamlı ilişki belirlemişlerdir (67, 94).

Genel sonuçlarımıza bakacak olursak, çalıştığımız 5 anti-HCV testinin hepsi 137/179 (%76.5) örnek için pozitif, 13/179 (%7.3) örnek için negatif sonuç verdi. Anti-HCV testlerinin tümü pozitif saptanan 129/137 örneğin *recomLine* HCV IgG testleri pozitif, 6/137 'borderline' ve 2/137 negatif olarak saptandı. Tüm örneklerle HCV RNA ve HCV core antijen testleri de çalışıldığından, anti-HCV test sonuçlarına bakılmaksızın HCV RNA, HCV core antijen ve *recomLine* HCV IgG testleri arasında uyumsuzluk saptanan 57 örneğe dördüncü kuşak antikor testi olan Innostest HCV Ab IV testi de çalışıldı.

Tüm anti-HCV testleri ve *recomLine* HCV IgG testleri birlikte pozitif saptanan 129 örnek içinde, HCV RNA negatif ve *recomline* HCV IgG pozitif sonuçları arasındaki uyumsuzluk nedeniyle 40 örneğe Innostest çalışılması gerekti. 36/40 örnekte Innostest HCV Ab IV testi pozitif saptanırken 4 örnekte negatif sonuç verdi. Innostest pozitif belirlenen 36 örneğin 23'ünün Hepatit C tedavisi alan, 13'ünün kronik hepatit C tanısıyla takipli hastalardan oluştuğu belirlendi. Ayrıca kronik hepatit C tanısıyla izlenmekte olan 1 hastada ise Advia Centaur anti-HCV negatif, diğer anti-HCV testleri pozitif, HCV RNA negatif, *recomLine* HCV IgG pozitif ve Innostest HCV Ab IV pozitif olarak bulundu. Bu hastanın Advia Centaur anti-HCV sonucu yalancı negatiflik olarak değerlendirildi. Fakat

bu 37 hasta HCV RNA üzerinden gerçekleştirilen özgüllük-duyarlılık hesaplamalarına dahil edilmedi.

Bu gruptaki 4/40 HCV RNA ve Innatest negatifliğinin birlikte saptandığı hastalarda ise *recomLine* HCV IgG sonuçları yalancı pozitiflik olarak değerlendirildi. *recomLine* HCV IgG testinin yalancı pozitiflik olarak değerlendirildiği diğer 3 örnekten 2'sinde antikor testlerinden Advia Centaur anti-HCV negatif, 1'inde Architect anti-HCV negatif olarak saptandı. Bu örneklerde HCV RNA testlerinin negatif olması üzerine çalışılan Innatest HCV Ab IV testlerinin sonucunun da negatif çıkması üzerine, hastaların geçmiş verileri değerlendirilerek hiçbir hastada HCV enfeksiyonu ile ilgili bilgiye ulaşılamadı ve pozitif sonuç veren tüm antikor testleri yalancı pozitiflik olarak değerlendirildi.

Ayrıca *recomLine* HCV IgG sonucu 'borderline' olan 6 örneğe Innatest HCV Ab IV testi çalışıldı. Bir örnekte HCV RNA ve Innatest pozitif saptanırken, diğer 5 örnekte HCV RNA ve Innatest negatif olarak belirlenerek 5 örneğin HCV açısından negatif olduğu kanaatine varıldı. *recomLine* HCV IgG sonucu negatif bulunan 1 örneğe Innatest HCV Ab IV testi çalışıldı ve HCV RNA ve Innatest sonuçları da negatif bulunarak, bu örneğin de HCV açısından negatif olduğu kanaatine varıldı.

Innatest HCV Ab IV çalıştığımız diğer 6 örneğin hepsinde HCV RNA sonuçları negatif, *recomLine* HCV IgG 'borderline' olarak belirlendi. Innatest HCV Ab IV testi örneklerin 5'inde negatif, 1'inde pozitif olarak saptandı. Innatest HCV Ab IV pozitifliği saptanan hastanın *recomLine* HCV IgG sonucu 'borderline', HCV RNA sonucu negatif olduğundan, bu örnekteki Innatest HCV Ab IV testi pozitif sonucu yalancı pozitiflik olarak değerlendirilerek, 6 hastadaki HCV RNA negatif sonuçları üzerinden hastaların HCV açısından negatif olduğu kanaatine varıldı.

Hepatit C enfeksiyonu tanısı algoritma yaklaşımlarında tanısal problemler hala güncelliğini ve önemini korumaktadır. Dünya nüfusunun %3'ünün HCV ile

enfekte olduğu düşünölecek olursa, sorunların giderilmesi için yapısal antijenlerin hücre kültürlerinde üretilip saf olarak elde edilmesi, testlerin içërisine ilave edilerek testlerin geliştirilmesi gerekmektedir.



VI. SONUÇLAR

1. Çalışmamızda karşılaştırma yapılan 5 farklı anti-HCV testlerinin içinde sonuçlar açısından, en düşük uyum %86.5 ile Advia Centaur ve Vitros anti-HCV testleri arasında, en yüksek uyum ise %94.9 ile Elecsys anti-HCV II ve Liaison anti-HCV testleri arasında belirlendi. Tüm testlerin birbiriyle olan uyumu %83.8 olarak belirlendi.
2. Testler arasındaki S/Co değerleri arasındaki korelasyon en iyi Architect-Liaison ($r=0.842$) anti-HCV testleri arasında saptandı. En kötü korelasyon Elecsys anti-HCV II testiyle diğer cihazlar arasında belirlendi. Elecsys II-Advia Centaur ($r=0.251$) anti-HCV testleri arasında düşük korelasyon saptanırken, diğer cihazlarla arasında korelasyon belirlenmedi.
3. HCV RNA değerleri (IU/mL) ve anti-HCV testleri S/Co veya COI değerleri arasında korelasyon belirlenmedi.
4. Vitros anti-HCV, Advia Centaur anti-HCV, Elecsys anti-HCV II, Architect anti-HCV ve Liaison anti-HCV testleri için kritik eşik değerler sırasıyla 6.6 S/Co, 5.28 S/Co, 14.88 COI, 3.6 S/Co ve 4.3 S/Co olarak belirlendi. Elecsys anti-HCV II testinin kantitatif değerleri cutoff indeks (COI) olarak belirlendiği için diğer testlerdeki S/Co değerlerinden daha yüksek değerler elde edilmiş olup bu durum Elecsys anti-HCV II testinin kritik eşik değerinin diğer testlerden daha yüksek olarak bulunmasına neden olmaktadır.
5. Çalışmamızda üçüncü kuşak CIA ve EIA yöntemine dayalı anti-HCV testlerinin sonuçlarına karşılaştırmalı olarak baktığımızda, duyarlılık ve negatif prediktif değerler tüm testlerde %100 olarak belirlendi. Özgüllük ve pozitif prediktif değerler arasında farklar olmakla birlikte, immunoassay testlerin tanı değerlerinin birbirlerine yakın oldukları gözlemlendi.

6. Analitik performansı en yüksek olan test Advia Centaur anti-HCV testi olarak belirlendi. Sonrasında sırasıyla Liaison anti-HCV, Architect anti-HCV, Elecsys anti-HCV II ve Vitros anti-HCV testleri gelmektedir.
7. Anti-HCV testleri rutin laboratuvarlarda HCV enfeksiyonunun tanısında hızlı sonuç vermesi, çalışmanın kolay olması ve yüksek maliyet gerektirmemesi gibi nedenlerle tarama testleri olarak kullanılmaktadır. Fakat yalancı pozitiflik oranlarının yüksek olması nedeniyle sonuçların ek testlerle desteklenmesi ve doğrulanması gerekmektedir. Strip immunblot testler bu amaçla geliştirilmiş fakat maliyeti yüksek, çalışması zor ve 'şüpheli' sonuçları fazla olan testlerdir. Uyumsuz sonuçların çözümlerinde yeterince yol gösterici olamamaktadır. Çalışmamızda kullandığımız *recomLine* HCV IgG testi 12/179 örnek için 'borderline' sonuç vermiştir.
8. Serumda HCV RNA'nın saptanması enfeksiyonun belirlenmesi açısından altın standart test olarak kullanılmaktadır ve tedavi takibinde viral yükün belirlenebilmesi açısından önemlidir fakat testin maliyeti yüksektir ve deneyimli personel gerektirmektedir.
9. Ayrıca virüsün doğası gereği fluktuasyon göstermesi, örnek alımının nonviremik safhaya denk gelebilmesi nedeniyle HCV RNA'nın negatif olarak saptanması enfeksiyon varlığını dışlamamaktadır. Enfeksiyon şüphesi durumlarında HCV RNA testinin tekrar edilmesi gerekmektedir.
10. HCV core antijen testleri son yıllarda HCV RNA testine alternatif olabilmesi amacıyla geliştirilen testlerdir. Düşük viral yük konsantrasyonlarında negatif sonuç verebilmektedir. Çalışmamızda düşük HCV RNA viral yük saptanan 1 hastada HCV core antijen testi negatif olarak belirlendi. İlk çalışmada yüksek oranda (25/179 örnek) grayzone değerleri elde edildi. Test tekrarları sonucunda 15 örnek negatif, 10 örnek pozitif olarak belirlendi. Beş örnekte HCV RNA negatif olmasına karşın yalancı pozitiflik belirlendi.

- 11.** Antijen testi ve HCV RNA testi arasında iyi bir korelasyon saptandı ($r=0.943$). HCV Core antijen testinin yüksek duyarlılık ve özgüllük göstermesi, kısa sürede sonuç vermesi, çalışma kolaylığı ve ucuz olması gibi nedenlerle HCV RNA testine ulaşımın zor olduğu durumlarda alternatif olarak kullanılabilecek bir test yöntemidir.
- 12.** Yüksek özgüllük ve duyarlılık nedeniyle 4. kuşak anti-HCV testleri ihtilaflı sonuçların aydınlatılmasında iyi sonuçlar vermektedir.
- 13.** Hepatit C enfeksiyonu tanısı algoritma yaklaşımlarında tanısal problemler hala güncelliğini ve önemini korumaktadır. Dünya nüfusunun %3'ünün HCV ile enfekte olduğu düşünülecek olursa, sorunların giderilmesi için yapısal antijenlerin hücre kültürlerinde üretilip saf olarak elde edilmesi, testlerin içerisine ilave edilerek testlerin geliştirilmesi gerekmektedir.

VII. ÖZET

HCV enfeksiyonunun %80'inin kronikleşmesi, hepatosellüler karsinom ve karaciğer sirozuna neden olması, karaciğer transplantasyonuna yol açması gibi nedenlerle günümüzde önemli bir sağlık problemidir. HCV enfeksiyonunun tanısında doğru sonuçların elde edilebilmesi için, günümüzde farklı tanı yöntemleri kullanılmaktadır. Bu çalışmada Türkiye'de rutin laboratuvarlarda HCV enfeksiyonunun tanısında kullanılan farklı anti-HCV testlerinin ve HCV core antijen testinin tanı değerlerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Çalışmaya Afyon Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesi ANS Uygulama ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na 1 Eylül 2014-30 Haziran 2015 tarihleri arasında rutin olarak anti-HCV ve/veya HCV RNA testleri çalışılması için gönderilen 179 serum örneği dahil edildi. Serum örnekleri en az 3 cc olacak şekilde -80⁰C derin dondurucuda çalışma günlerine kadar saklandı. Örnekler Vitros anti-HCV (Ortho-Clinical Diagnostics, High Wycombe, UK), Advia Centaur anti-HCV (Siemens Healthcare Diagnostics, Tarrytown NY, USA), Elecsys anti-HCV II (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), Architect anti-HCV (Wiesbaden, Germany), Liaison anti-HCV (DiaSorin, Saluggia, Italy), Architect HCV Ag (Wiesbaden, Germany), *recomLine* HCV IgG (Mikrogen Diagnostik, Neuried, Germany), Cobas[®] AmpliPrep/ Cobas[®] TaqMan[®] HCV Kantitatif Test, versiyon 2.0 (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) ve sadece uyumsuz sonuçlar için Innostest HCV Ab IV (Fujirebio, Gent, Belgium) testleriyle çalışıldı.

Beş farklı anti-HCV testleri içinde sonuçlar açısından en yüksek ve en düşük uyum sırasıyla %94.9 ile Elecsys II-Liaison anti-HCV testleri arasında ve %86.5 ile Advia Centaur-Vitros anti-HCV testlerinde saptandı. Diğer anti-HCV testleri ile en düşük uyum gösteren test Advia Centaur olarak belirlendi. Beş farklı anti-HCV testlerinin birbiriyle olan uyumu %83.8 (150/179) olarak bulundu. En iyi S/Co korelasyon değeri Architect-Liaison ($r=0.842$) anti-HCV testleri arasında elde edildi. En düşük korelasyon Advia Centaur-Elecsys II ($r=0.251$) anti-HCV

testleri arasında gözlemlendi. Elecsys anti-HCV II ve diğer testler arasında korelasyon saptanmadı. HCV RNA'nın altın standart kabul edilerek yapıldığı hesaplamalarda tüm anti-HCV testlerinin duyarlılık ve NPD'leri %100 olarak belirlendi. Çalışılan anti-HCV testlerinin tamamı analitik performansları açısından değerlendirildi ve Advia Centaur en yüksek olarak bulundu sonra diğer testler Liaison anti-HCV, Architect anti-HCV, Elecsys anti-HCV II ve Vitros anti-HCV sırasıyla derecelendirildi. Vitros anti-HCV, Advia Centaur anti-HCV, Elecsys anti-HCV II, Architect anti-HCV ve Liaison anti-HCV testleri için kritik eşik değerler sırasıyla 6.6 S/Co, 5.28 S/Co, 14.88 COI, 3.6 S/Co ve 4.3 S/Co olarak belirlendi. HCV RNA (IU/mL) ve anti-HCV testleri (S/Co veya COI) değerleri arasında korelasyon belirlenmedi. HCV core antijen ve HCV RNA konsantrasyonları arasında Spearman korelasyon testine göre iyi bir korelasyon belirlendi ($r=0.943$, $p<0.001$, $n=90$). HCV RNA sonucu pozitif, antijen testi negatif bulunan bir örnekte düşük viral yük tespit edildi (2.7×10^1 IU/mL). HCV RNA negatif olup antijen tekrarlı pozitifliği saptanan beş örneğin HCV core antijen değerleri 3.56-6.43 fmol/L arasında saptandı.

HCV enfeksiyonu tanısında günümüzde tarama amaçlı kullanılan EIA veya CIA yöntemlerine dayalı üçüncü kuşak anti-HCV testlerinin yalancı pozitif sonuçlar verebilmeleri nedeniyle sonuçlarının ek testlerle desteklenmesi gerekmektedir. HCV RNA testi altın standart test olarak kabul edilmektedir, fakat vireminin olmadığı dönemlerde HCV RNA testinin negatif sonuç verebileceği unutulmamalıdır. Enfeksiyon şüphesi durumlarında testin tekrarlanması gerekmektedir. Son dönemlerde kullanıma giren dördüncü kuşak anti-HCV testleri yüksek duyarlılık ve özgüllükleriyle uyumsuz sonuçların aydınlatılması konusunda oldukça iyi sonuçlar vermektedir. HCV core antijen testleri HCV RNA testinin çalışmadığı durumlarda enfeksiyon varlığını göstermek adına kullanılabilecek alternatif bir testtir. Tanı algoritma yaklaşımlarındaki problemler hala devam etmektedir. Bu sorunlar ancak HCV hücre kültürlerinden elde edilen saf yapısal antijenlerin ilave edildiği yeni jenerasyon anti-HCV kitlerinin geliştirilmesi ile tam olarak çözüme kavuşturulabilir.

VIII. SUMMARY

INVESTIGATION OF DIAGNOSTIC VALUES OF DIFFERENT ANTI-HCV REACTIVES BASED ON IMMUNOASSAY METHOD USED IN THE LABORATORY DIAGNOSIS OF HEPATITIS C INFECTION IN TURKEY

HCV infection is an important health problem for reasons such as 80% of infection become chronic, cause to hepatocellular carcinoma and liver cirrhosis and lead to liver transplantation. Nowadays different diagnostic methods used to obtain the correct results, in the diagnosis of HCV infection. In this study, it was aimed to investigate diagnostic values of the five different anti-HCV tests and HCV core antigen test used in the routine laboratories for the diagnosis of HCV infection in Turkey.

One hundred seventy nine sera samples were included into the study sent to Afyon Kocatepe University Faculty of Medicine ANS Practice and Research Hospital Medical Microbiology Laboratory for routine anti-HCV and/or HCV RNA testing between 1 September 2014 and 30 June 2015. Sera samples were aliquoted as to be at least 3 cc and were kept in -80⁰C deep freezer until the study days. Samples were tested by Vitros anti-HCV (Ortho-Clinical Diagnostics, High Wycombe, UK), Advia Centaur anti-HCV (Siemens Healthcare Diagnostics, Tarrytown NY, USA), Elecsys anti-HCV II (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), Architect anti-HCV (Wesbaden, Germany), Liaison anti-HCV (DiaSorin, Saluggia, Italy), Architect HCV Ag (Wesbaden, Germany), *recomLine* HCV IgG (Mikrogen Diagnostik, Neuried, Germany), Cobas[®] AmpliPrep/ Cobas[®] TaqMan[®] HCV Quantitative Test, version 2.0 (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) and Innotest HCV Ab IV (Fujirebio, Gent, Belgium) only for discrepant results.

In terms of results in the five different anti-HCV tests, the highest and the lowest agreement was detected respectively in Elecsys II- Liaison anti-HCV tests

with 94.9% and Advia Centaur-Vitros anti-HCV tests with 86.5%. It was determined that the lowest agreement showed in the Advia Centaur with the other anti-HCV tests. The overall concordance rate of five different anti-HCV tests was found 83.8% (150/179). The best S/Co correlation value was obtained between Architect and Liaison ($r=0.842$) anti-HCV tests. The lowest correlation was observed between Advia Centaur and Elecsys II ($r=0.251$) anti-HCV tests. There was no correlation between Elecsys anti-HCV II and the other tests. In the calculations that HCV RNA was accepted as the gold standard, sensitivity and NPV of all anti-HCV tests was determined to be 100%. All the studied anti-HCV tests evaluated for the analytical performances and Advia Centaur was found to be the highest, the other anti-HCV tests: Liaison, Architect, Elecsys and Vitros graded respectively. The critical values for Vitros anti-HCV, Advia Centaur anti-HCV, Elecsys anti-HCV II, Architect anti-HCV and Liaison anti-HCV tests were determined as 6.6 S/Co, 5.28 S/Co, 14.88 COI, 3.6 S/Co and 4.3 S/Co respectively. It was not determined any correlation between anti-HCV tests (S/Co or COI) and HCV RNA (IU/mL) values. It was determined a good correlation between HCV core antigen and HCV RNA concentrations by Spearman correlation test ($r=0.943$, $p<0.001$, $n=90$). It was observed low viral load (2.7×10^1 IU/mL) in one sample which the antigen test is negative and HCV RNA result is positive. HCV core antigen values was found between 3.56-6.43 fmol/L in five samples which samples HCV RNA negative and antigen repeatedly positive.

The third generation anti-HCV tests based on EIA and CIA methods used for screening of diagnosis of HCV infection nowadays, should be supported by additional tests due to give false positive results. HCV RNA test is considered as the gold standard test, but in the absence of viremia, should be noted that HCV RNA test result could be negative. In cases of suspected infection the test should be repeated. The fourth generation anti-HCV tests with high specificity and sensitivity came into use in recent years, gives very good results in the elucidation of discordant results. HCV core antigen tests can be used as an alternative test in order to show the presence of infection when HCV RNA test can not be studied. Problems in diagnostic algorithm approaches still continues. This problems may

be solved properly only by the way that improving new generation anti-HCV reactivities that embedded pure structural antigens obtained from HCV cell cultures into the new generation anti-HCV reactivities.



IX. KAYNAKLAR

1. Irshad M, Mankotia DS, Irshad K. An insight into the diagnosis and pathogenesis of hepatitis C virus infection. World J Gastroenterol 2013;19(44): 7896-909.
2. Mukherjee R, Burns A, Rodden D, Chang F, Chaum M, Garcia N, Bollipalli N, Niemz A. Diagnosis and Management of Hepatitis C Virus Infection. J Lab Autom 2015; 1-20.
3. Cho YK, Kim YN, Song BC. Predictors of spontaneous viral clearance and outcomes of acute hepatitis C infection. Clinical and Molecular Hepatology 2014; 20: 368-75.
4. Hadziyannis E, Minopetrou M, Georgiou A, Spanou F, Koskinas J. Annals of Gastroenterology 2013; 26: 146-9.
5. Dewar TN. Non-A, Non-B Hepatitis. West J Med 1990; 153: 173-9.
6. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. Tıbbi Mikrobiyoloji. Ankara: Atlas Kitapçılık, 2010.
7. Moradpour D, Penin F, Rice CM. Replication of hepatitis C virus. Nat Rev Microbiol 2007; 5: 453-63.
8. Myrmel H, Ulvestad E, Åsjo B. The hepatitis C virus enigma. Apmis 2009; 117: 427-39.
9. Hundt J, Li Z, Liu Q. Post-translational modifications of hepatitis C viral proteins and their biological significance. World J Gastroenterol 2013; 19(47): 8929-39.

10. Eroğlu Ç, Pınarbaşı E. Hepatitis C virus: genome organization, viral proteins and implications in disease pathogenesis. *Turk J Biol* 2000; 24: 253-69.
11. Sharma SD. Hepatitis C virus: molecular biology & current therapeutic options. *Indian J Med Res* 2010; 131: 17-34.
12. Us D, Ergünay K. Moleküler, Klinik ve Tanısal Viroloji. Ankara: Bilimsel Tıp Kitabevi, 2012.
13. Lemon SM, Walker C, Alter MJ. Hepatitis C virus. In: *Fields Virology*, 5th Edition, Vol 1 (Knipe DM, Howley PM, eds). Philadelphia: Wolters Kluwer – Lippincott Williams & Wilkins, 2007; 1253-1304.
14. Smith DB, Bukh J, Kuiken C, Muerhoff AS, Rice CM, Stapleton JT, Simmonds P. Expanded classification of hepatitis C virus into 7 genotypes and 67 subtypes: updated criteria and genotype assignment web resource. *Hepatology* 2014; 59(1): 318-27.
15. Zein NN. Clinical significance of hepatitis C virus genotypes. *Clin Microbiol Rev* 2000; 13(2): 223-35.
16. Echeverria N, Moratorio G, Cristine J, Moreno P. Hepatitis C virus genetic variability and evolution. *World J Hepatol* 2015; 7(6): 831-45.
17. Murphy DG, Sablon E, Chamberland J, Fournier E, Dandavino R, Tremblay CL. Hepatitis C virus genotype 7, a new genotype originating from Central Africa. *J Clin Microbiol* 2015; 53(3): 967-72.
18. Başustaoğlu A, Kubar A, Tanyüksel M. Klinik Mikrobiyoloji 9.Baskı. Ankara: Atlas Kitapçılık, 2009.
19. Messina JP, Humphreys I, Flaxman A, Brown A, Cooke GS, Pybus OG, Barnes E. Global distribution and prevalence of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology* 2015; 61(1): 77-87.

20. Cicozzi M, Zehender G, Polat C, Lai A, Kayman T, Sorrentino C, Ebranati E, Cella E, Presti AL, Abacioglu H. Phylogenetic Analysis of HCV-4d in Turkey: Curious Case of Kayseri Province. *J Med Virol* 2014; 86: 454-60.
21. Lee MH, Yang HI, Yuan Y, L'Italien G, Chen CJ. Epidemiology and natural history of hepatitis C virus infection. *World J Gastroenterol* 2014; 20(28): 9270-80.
22. Kretzer IF, Livramento AD, Cunha JD, Gonçalves S, Tosin I, Spada C, Treitinger A. Hepatitis C worldwide and in Brazil: Silent epidemic – Data on disease including incidence, transmission, prevention, and treatment. *Sci World J* 2014; 2014: 1-10.
23. Ansaldi F, Orsi A, Sticchi L, Bruzzone B, Icardi G. Hepatitis C virus in the new era: Perspectives in epidemiology, prevention, diagnostics and predictors of response to therapy. *World J Gastroenterol* 2014; 20(29): 9633-52.
24. Negro F. Epidemiology of hepatitis C in Europe. *Dig Liver Dis J* 2014; 46: 158-64.
25. Gower E, Estes C, Blach S, Razavi-shearer K, Razavi H. Global epidemiology and genotype distribution of the hepatitis C virus infection *Journal of Hepatology Update: Hepatitis C. J Hepatol* 2014; 61(1): 45-57.
26. Dayan S, Tekin A, Tekin R, Dal T, Hosoglu S, Yazgan UC, Bekcibasi M, Gul K. HBsAg, anti-HCV, anti-HIV 1/2 and syphilis seroprevalance in healthy volunteer blood donors in southeastern Anatolia. *J Infect Dev Ctries* 2013; 7(9): 665-9.
27. Uyanik MH, Malçok HK, Aktaş O. Kan donörlerinde Hepatit B Hepatit C ve HIV-1/2 Seroprevalansı. *AÜTD* 2004; 36: 35-8.

28. Bozkurt I, Aygen B, Yildiz O, Gokahmetoglu S. Bölgemizdeki Hemodiyaliz Hastalarında Hepatit C virüsü enfeksiyonunun sıklığı ve epidemiyolojik özellikleri. *Klimik Dergisi/Klimik J* 2012; 24(3): 167-72.
29. Özgür G, Çolakoğlu SÖ, Seyrek N, Sağlıker Y, Paydaş S, Akkız H. Hemodiyaliz hastalarında anti HCV sıklığı. *Turk J Gastronterol* 1996; 7: 17-21.
30. Kosgeroglu N, Ayrancı U, Vardareli E, Dincer S. Occupational exposure to hepatitis infection among Turkish nurses: frequency of needle exposure, sharps injuries and vaccination. *Epidemiol Infect* 2003; 132(1): 27-33.
31. Demirtürk N, Demirdal T, Toprak D, Altındış M, Aktepe OC. Hepatitis B and C virus in West-Central Turkey: Seroprevalence in healthy individuals admitted to a university hospital for routine health checks. *Turkish J Gastroenterol* 2006; 17(4): 267-72.
32. Demir C, Keşli R, Aşık G, Yoldaş Ö, Çetinkaya Ö. Antiviral tedavi almayan Düşük risk gruplarına ait serum örneklerinden elde edilen anti-HCV, HCV RNA ve HCV genotiplendirme sonuçlarının incelenmesi. *Moleküler Mikrobiyoloji Kongre Kitabı* 2014; pp:139, syf:141.
33. Carcamo WC, Nguyen CQ. Advancement in the development of models for Hepatitis C research. *J Biomed Biotechnol* 2012; 2012: 1-7.
34. Samreen B, Khaliq S, Ashfaq UA, Khan M, Afzal N, Shahzad MA, Riaz S, Jahan S. Hepatitis C virüs entry: Role of host and viral factors. *Infect Genet Evol* 2012; 12(8): 1699-1709.
35. Gerold G, Pietschmann T. The HCV life cycle: In vitro tissue culture systems and therapeutic targets. *Gig Dis* 2014; 32(5): 525-537.

36. Shulla A, Randall G. Hepatitis C virüs – host interactions, replication, and viral assembly. *Curr Opin Virol* 2012; 2(6): 719-26.
37. Kim CW, Chang KM. Hepatitis C virus: virology and life cycle. *Clin Mol Hepatol* 2013; 19(1): 17-25.
38. Ashfaq UA, Javed T, Rehman S, Nawaz Z, Riazuddin S. An overview of HCV molecular biology, replication and immune responses. *Virol J* 2011; 8(1): 161-70.
39. Dubuisson J, Cosset FL. Virology and cell biology of the hepatitis C virus life cycle – An update. *J Hepatol* 2014; 61(1): 3-13.
40. Kunkel M, Lorinczi M, Rijnbrand R, Lemon SM, Watowich SJ. Self-assembly of nucleocapsid –like particles from recombinant Hepatitis C virus core protein. *J Virol* 2001; 75(5): 2119-29.
41. 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: 24-32.
42. Westbrook RH, Dusheiko G. Natural history of hepatitis C. *J Hepatol* 2014; 61: 58-68.
43. Topçu AW. Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. 3.Baskı. İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri, 2008.
44. Shaheen MA, Idrees M. Evidence-based consensus on the diagnosis, prevention and management of hepatitis C virus disease. *World J Hepatol* 2015; 7(3): 616-27.
45. <http://www.cdc.gov/hepatitis/hcv/hcvfaq.htm#b1>. Centers for Disease Control and Prevention. Hepatitis C FAQs for Health Professionals.

46. Saludes V, Gonzales V, Planas R, Matas L, Ausina V, Martro E. Tools for the diagnosis of hepatitis C virus infection and hepatic fibrosis staging. *World J Gastroenterol* 2014; 20(13): 3431-42.
47. Kamili S, Drobeniuc J, Araujo AC, Hayden TM. Laboratory Diagnostics for Hepatitis C Virus Infection. *Clin Infect Dis* 2012; 55(Suppl 1): 43-8.
48. Ellethy A, Sliem H, Hassan G. Updated molecular diagnosis of chronic hepatitis C. *J Gastroenterol Hepatol Res* 2012; 1(8): 147-52.
49. Fernandez MC, Barrera MC. Introduction of an automated system for the diagnosis and quantification of Hepatitis B and C viruses. *Open Virol J* 2012; 6: 122-34.
50. Gupta E, Bajpai M, Chaudhary A. Hepatitis C virus: Screening, diagnosis and interpretation of laboratory assays. *Asian J Transfus Sci* 2014; 8(1): 19-25.
51. Yagci S, Padalko E. Comparison of Monolisa HCV Ag/Ab ULTRA with two anti-HCV assays for the detection of HCV infection in Hospital setting. *Curr Microbiol* 2012; 64(2): 148-151.
52. INNOTEST HCV Ab IV: the first fourth generation assay with unique antigens from different genotypes. *Microgen Bioproducts Newsletter* 2008; 28: 1-4.
53. Yang JF, Lin YY, Hsieh MH, Tsai CH, Liu SF, Yu ML, Dai CY, Huang JF, Lin WY, Lin ZY, Chen SC, Chuang WL. Performance characteristics of a combined hepatitis C virus core antigen and anti-hepatitis C virus antibody test in different patient groups. *Kaohsiung J Med Sci* 2011; 27(7): 258-63.
54. Kesli R. Evaluation of assay methods and false positive results in the laboratory diagnosis of hepatitis C virus infection. *Arch Clin Microbiol* 2011; 2(4): 2-5.

55. Kim S, Kim JH, Yoon S, Park YH, Kim HS. Clinical Performance Evaluation of Four Automated Chemiluminescence Immunoassays for Hepatitis C Virus Antibody Detection. *J Clin Microbiol* 2008; 46: 3919-23.
56. Kesli R, Ozdemir M, Kurtoglu M, 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.
57. Martin P, Fabrizi F, Dixit V, Quan S, Brezina M, Kaufman E, Sra K, Dinello R, Polito A, Gitnick G. Automated RIBA hepatitis C virus (HCV) strip immunoblot assay for reproducible HCV diagnosis. *J Clin Microbiol* 1998; 36(2): 387-90.
58. Kesli R. An overview of the laboratory assay systems and reagents used in the diagnosis of hepatitis C virus (HCV) infections. In Abulzein E ed. *Trends in Immunolabelled and Related Techniques*. InTech Publishing House, Rijeka, Croatia; 2012: 339-50.
59. Bauer P, Göttner G, Böcher O, Soutschek E. Introducing Hepatitis C Virus (HCV) line immunoassay for serum or plasma samples based on recombinant antigens. APASL Liver Week Poster Presentation, 2013.
60. MMVR. Testing for HCV Infection: An update of Guidance for Clinicians and Laboratorians. *Centers Dis Prev Morb Mortal Wkly Rep* 2013; 62(18): 347-74.
61. Parisi MR, Soldini L, Vidoni G, Mabellini C, Belloni T, Brignolo L, Negri S, Schlusnus K, Dorigatti F, Lazzarin A. Point-of-care testing for HCV infection: recent advances and implications for alternative screening. *New Microbiologica* 2014; 37: 449-58.

62. Pai NP, Sollis K, Peelin RW. Rapid hepatitis C tests: better than the gold standard? *Expert Rev Mol Diagn* 2013; 13(3): 221-3.
63. Alias MB, Patel K, Dahari H, Beaucort 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.
64. Chevaliez S. Virological tools to diagnose and monitor hepatitis C virus infection. *Clin Microbiol Infect* 2011; 17(2):116-21.
65. Gaudy C, Thevenas C, Tichet J, Mariotte N, Goudeau A, Dubois F. Usefulness of the Hepatitis C virus core antigen assay for screening of a population undergoing routine medical checkup. *J Clin Microbiol* 2005; 43(4): 1722-6.
66. Florea D, Neaga E, Nicolae I, Maxim D, Popa M, Otelea D. Clinical Usefulness of HCV Core Antigen Assay for the Management of Patients with Chronic Hepatitis C. *J Gastrointest Liver Dis* 2014;23(4): 393-6.
67. 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.
68. Tillmann HL. Hepatitis C virus core antigen testing: Role in diagnosis, disease monitoring and treatment. *World J Gastroenterol* 2014; 20(22): 6701-6.
69. 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.
70. Chevaliez S, Pawlotsky JM. Hepatitis C Virus: virology, diagnosis and management of antiviral therapy. *World J Gastroenterol* 2007; 13(17): 2461-6.

71. Schønning K. Comparison of the QIAGEN artus HCV QS-RGQ test with the Roche COBAS Ampliprep/COBAS Taqman HCV Test v2.0 for the quantification of HCV-RNA in plasma samples. *J Clin Virol* 2014; 60(4): 323-7.
72. Scott JD, Gretch DR. Molecular Diagnostics of Hepatitis C Virus Infection. *Jama* 2007; 297(7): 724-32.
73. Gökahmetoglu S, Atalay M, Kılınç A. Hepatit C Virus Genotiplerinin Pirosekanslama Yöntemi ile Belirlenmesi. *Erciyes Tıp Derg* 2011; 33(2): 99-102.
74. Guidelines for the screening, care and treatment of persons with Hepatitis C infection. World Health Organization 2014; April: 1-122.
75. Demirtürk N. Kronik hepatit C tedavisinde yeni seçenekler. *Genel Tıp Derg* 2011; 21(4): 163-8.
76. Kabaçam G, Önder FO. Hepatit C Enfeksiyonu Tedavisinin Bugünü ve Yarını. *Güncel Gastroenteroloji* 2013; 17(3): 225-31.
77. Çakaloğlu Y. Kronik C Hepatiti Tedavisi' 2012 "Direk Etkili Antiviral Ajanlarla Sağlananlar". *ANKEM Derg* 2012; 26(Ek2): 135-43.
78. Kaya S, Arıdoğan BC, Çetin ES, Adiloğlu AK, Demirci M. Comparison of polimerase chain reaction and serological methods in the diagnosis of hepatitis C virus infection. *SDÜ Tıp Fak Derg* 2007; 14(1): 10-4.
79. Alp A, Hasçelik G. Klinik örneklerden Kantitatif Olarak Hepatit C Virus RNA'sının Saptanmasında COBAS Amplicor ve COBAS Taqman sistemlerinin Karşılaştırılması. *Mikrobiyol Bul* 2008; 42: 627-34.

80. Şener GA, Güngör S, Buyraç Z, Türk M, Ünsal B, Türker M. Hepatit C Virüsü İnfeksiyonunun Tanısında HCV RNA Saptanmasının Önemi. *Viral Hepatiti Drg* 2005; 10(2): 82-4.
81. Afşar İ, Şener AG, Gönül B, Kuruştay N, Türker M. Tam Otomatik Kemiluminesans immunassay ile düşük düzeyde anti-Hepatit C Virüs (Anti-HCV) Pozitif Saptanan örneklerin HCV RNA Düzeylerinin Değerlendirilmesi. *İnfeksiyon Derg (Turkish Journal of Infection)* 2007; 21(2): 85-8.
82. Watterson JM, Stallcup P, Escamilla D, Chernay P, Reyes A, Trevino SC. Evaluation of the Ortho-Clinical Diagnostics Vitros ECi Anti-HCV test: Comparison with three other methods. *J Clin Lab Anal* 2007; 21: 162-6.
83. Park Y, Seok Y, Choi J, Kim H. Performance evaluation of the Vitros anti-hepatitis C virüs antibody assay for use in clinical laboratories. *Clin Biochem* 2012; 45(1-2): 175-7.
84. Berger A, Rabenau H, Allwinn R, Doerr HW. Evaluation of the new ARCHITECT anti-HCV screening test under routine laboratory conditions. *J Clin Virol* 2008; 43(2): 158-61.
85. Krawczyk A, Hintze C, Ackermann J, Goitowski B, Trippler M, Grüner N, Fraune MN, Verheyen J, Fiedler M. Clinical Performance of the novel DiaSorin LIAISON XL murex: HBsAg Quant, HCV-Ab, HIV-Ab/Ag assays. *J Clin Virol* 2014; 59(1): 44-9.
86. Yang R, Guan W, Wang Q, Liu Y, Wei L. Performance evaluation and comparison of the newly developed Elecsys anti-HCV II assay with other widely used assays. *Clin Chim Acta* 2013; 426: 95-101.
87. Hasssan J, McDonnell V, Crean M, Connell J. Comparative evaluation of Three Commerical Automated Immunoassays: Architect (Abbott), Vidas® (BioMerieux) and LIAISON® XL (Diasorin), for the Detection of Antibody to Hepatitis C Virus. *Glob J Immunology Allerg Dis* 2014; 1: 60-4.

88. PetruzzIELlo A, Coppola N, Fraulo M, Loquercio G, Azzaro R, Diodato AM, Iervolino V, Di Costanzo G, Di Macchia AC, Di Meo T, Ferro R, Guiliano P, Pasquale G, Cacciapuoti C. Ortho VITROS enhanced chemiluminescence assay for detection of hepatitis C virus (HCV) antibodies: Determination of a borderline range. *African J Microbiol Res* 2013; 7(20): 2359-64.
89. Zachary P, Ullmann M, Djeddi S, Meyer N, Wendling MJ, Schvoerer E, Keller FS, Gut JP. Evaluation of three commercially available hepatitis C virus antibody detection assays under the conditions of a clinical virology laboratory. *J Clin Virol* 2005; 34: 207-10.
90. Esteban JI, Helden JV, Alborino F, Bürgisser P, Cellerai C, Pantaleo G, Eiras A, Rodriguez MI, Ghisetti V, Gleich M, Imdahl R, Kaiser C, Möller P, Wetlitzky O, Segovia M, Schennach H, Annelies M. Multicenter Evaluation of the Elecsys Anti-HCV II Assay for the Diagnosis of Hepatitis C virus Infection. *J Med Virol* 2013; 1368: 1362-8.
91. Yoo SJ, Wang LL, Ning HC, Tao CM, Hirankarn N, Kuakarn S, Yang R, Han TH, Chan RC, Hussain H, Hussin H, Muliaty D, Shen L, Liu H, Wei L. Evaluation of the Elecsys® Anti-HCV II assay for routine hepatitis C virus screening of different Asian Pacific populations and detection of early infection. *J Clin Virol* 2015; 64: 20-7.
92. Dwyer R. The ADVIA Centaur® infectious disease assays: a technical review. *J Clin Virol* 2004; 30S1: 1-5.
93. Jonas G, Pelzer C, Beckert C, Hausmann M, Kapprell HP. Performance characteristics of the ARCHITECT® Anti-HCV assay. *J Clin Virol* 2005; 34: 97-103.
94. Demircili ME. HCV Kor Antijeninin Tanı Değerinin Anti HCV ve HCV RNA ile kıyaslanarak Araştırılması. Uzmanlık Tezi, 2013, Konya.

95. Malm K, Kragstbjerg E, Andersson S. Performance of Liaison XL automated immunoassay platform for blood-borne infection screening on hepatitis B, hepatitis C, HIV 1/2, HTLV 1/2 and *Treponema pallidum* serological markers. *Transfus Med* 2015; 25(2): 101-5.
96. Altuğlu İ. The importance and role of anti-HCV signal / cutoff ratio in diagnosis of hepatitis C virüs infection. *Ege Journal of Medicine* 2011; 50(4): 223-8.
97. Hayden TM, Dawson GJ, Teshale E, Le T, Cheng K, Drobeniuc J, Ward J, Kamili S. Performance of ARCHITECT HCV core antigen test with specimens from US plasma donors and injecting drug users. *J Clin Virol* 2015; 66: 15-8.
98. Mederacke I, Wedemeyer H, Ciesek S, Steinmann E, Raupach R, Wursthorn K, Manns MP, Ludger H. Performance and clinical utility of a novel fully automated quantitative HCV-core antigen assay. *J Clin Virol* 2009; 46: 210-5.
99. 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.
100. Tanaka E, Ohue C, Aoyagi K, Yamaguchi K, Yagi S, Kiyosawa K, Alter HJ. Evaluation of a new enzyme immunoassay for hepatitis C virus (HCV) core antigen with clinical sensitivity approximating that of genomic amplification of HCV RNA. *Hepatology* 2000; 32(2): 388-93.
101. Couroucè AM, Le Marrec N, Bouchardeau F, Razer A, Maniez M, Laperche S, Simon N. Efficacy of HCV core antigen detection during the preseroconversion period. *Transfusion* 2000; 40: 1198-202.

102. 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: 8-14.
103. Ross RS, Viazov S, Salloum S, Hilgard P, Gerken G, Roggendorf M. Analytical performance characteristics and clinical utility of a novel assay for total hepatitis C virus core antigen quantification. *J Clin Microbiol* 2010; 48(4): 1161-8.
104. Ottiger C, Gygli N, Huber AR. Detection limit of architect hepatitis C core antigen assay in correlation with HCV RNA, and renewed confirmation algorithm for reactive anti-HCV samples. *J Clin Virol* 2013; 58(3): 535-40.
105. Buket CA, Ayşe A, Selçuk K, Süleyman Ö, Emel SÇ. Comparison of HCV core antigen and anti-HCV with HCV RNA results. *Afr Health Sci* 2014; 14(4): 817-9.
106. Chevaliez S, Soulier A, Poiteau L, Alias BM, Pawlotsky JM. Clinical utility of hepatitis C virus core antigen quantification in patients with chronic hepatitis C. *J Clin Virol* 2014; 61(1): 145-8.
107. Long L, Shen T, Gao J, Duan Z, Liang H, Lu F. Effectiveness of HCV core antigen and RNA quantification in HCV-infected and HCV/HIV-1-coinfected patients. *BMC Infect Dis* 2014; 14(1): 1-8.