

70533

T.C.
GENELKURMAY BAŐKANLIĐI
GÜLHANE ASKERİ TIP AKADEMİSİ
ASKERİ TIP FAKÜLTESİ
MİKROBİYOLOJİ VE KLİNİK MİKROBİYOLOJİ
ANABİLİM DALI BAŐKANLIĐI

**NESTED VE NON-NESTED RT-PCR İLE
HCV-RNA'NIN ARAŐTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

Biyolog Nazif ESİN

ANKARA - 1998

ÖNSÖZ

Bu tez konusu Gülhane Askeri Tıp Akademisi ve Askeri Tıp Fakültesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Kurulu'nun 31-Ocak- 1997 gün ve 118 sayılı kararı, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'nün 4-Şubat-1997 gün ve YÜK.LİS.DOK.MRK.: 0530-7-97/8 sayılı yazısı ile verilmiş ve çalışılmaya başlanmıştır.

Hepatit C virus (HCV) infeksiyonlarının laboratuvar tanısında in-vitro kültür olanağının, antijen saptamanın ve etkeni mikroskopta göstermenin mümkün olmaması nedeniyle virusun kendisi ile ilgili tek direkt tanı olanağı viral genomun araştırılmasıdır. Virus RNA'sının (HCV-RNA), revers transkripsiyon-polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) ile gösterilmesi en yaygın yöntemdir. Uygulamada çeşitli örneklerden RNA ekstraksiyonu yapılmakta ve revers transkripsiyon sonucu elde edilen c.DNA'nın iki aşamalı (Nested) PCR tekniği ile saptanması yoluna gidilmektedir.

İki aşamalı PCR kullanımı, aşırı duyarlılığı ve kontaminasyon riskini de beraberinde getirmektedir. Pahalı ve henüz standardize edilmemiş bu tekniğin yerine, rutinde uygulanabilecek daha ucuz, duyarlı ve basit tekniklere ihtiyaç duyulmaktadır.

Doktora eğitimim süresince teşvik ve yardımlarını gördüğüm danışmanım Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji ABD. Başkanı Prof.Dr. Hüseyin GÜN'e, aynı şekilde yakın ilgi, bilgi ve yardımlarıyla beni destekleyen değerli hocalarım Doç.Dr. Ayhan KUBAR'a, Yrd.Doç.Dr.Çakır GÜNEY'e, Yrd.Doç.Dr.Şinasi Taner YILDIRAN'a, Uzm.Dr.Mehmet YAPAR'a ve diğer öğretim üyelerine şükran ve saygılarımı sunarım.

Çalışmalarım sırasında her zaman özveri göstererek sabırla destek ve yardımlarını gördüğüm eşim Lab. teknisyeni Suzan Esin'e ve beraber çalışmaktan onur duyduğum Anabilim Dalımızın tüm personeline teşekkür ederim.

Biyolog Nazif ESİN

İÇİNDEKİLER

I. GİRİŞ	1
II. GENEL BİLGİLER	3
A. TARİHÇE	3
B. VİRUSUN GENEL ÖZELLİKLERİ, SINIFLANDIRMA VE GENOTİPLERİ ..5	
C. HCV ENFEKSİYONUNUN KLİNİK ÖZELLİKLERİ	9
D. EPİDEMİYOLOJİ	11
E. PATOGENEZ VE PATOLOJİ.....	14
F. LABORATUVAR TANISI	18
G. KORUNMA VE KONTROL	20
III. GEREÇ VE YÖNTEM	23
A. HASTA VE KONTROL GRUBU	23
B. HCV-RNA'NIN SAPTANMASI	23
C. RT-PCR ÇALIŞMA PROTOKOLÜ	26
1. RNA'NIN SAFLAŞTIRILMASI.....	26
2. cDNA'NIN SENTEZİ	27
3. PCR	28
4. PCR ÜRÜNLERİNİN ANALİZİ	30
IV. BULGULAR	31
V. TARTIŞMA VE SONUÇ	34
VI. ÖZET	43
VII. İNGİLİZCE ÖZET	44
VIII. KAYNAKLAR.....	45

GİRİŞ

Transfüzyon sonrası ya da sporadik vakalar şeklinde ortaya çıkan ve başlangıçta non-A non-B (NANB) hepatiti olarak adlandırılan hepatit olgularının büyük bir kısmından sorumlu olduğu düşünülen Hepatit C virusunun (HCV), bugün posttransfüzyon (PT) hepatitin yanı sıra asemptomatik taşıyıcılıktan, akut ve kronik hepatit, siroz ve hepatoselüler karsinomaya (HSK) kadar değişen karaciğer patolojilerine neden olduğu ortaya konmuştur (24,34).

Normal popülasyonda veya gönüllü kan donörlerinde anti-HCV pozitifliğine dayanılarak yapılan çalışmalarda HCV infeksiyonlarının tüm dünyada yaygın, ancak kıtalar, ülkeler hatta bölgeler arasında farklı prevalansa sahip olduğu görülmektedir(21,64,73). Yapılan serolojik çalışmalarda Hepatit B'nin neden olduğu PT hepatitleri dışında kalan PT-NANB hepatitlerinin %90'ına yakın bir kısmından HCV nin sorumlu olduğu görülmüştür(1,69). Bir çok araştırma sonucunda ise HCV infeksiyonlarının sadece transfüzyon sonrası gelişen PT-NANB hepatitleri ile sınırlı kalmadığı, farklı ve bilinmeyen bulaşma şekilleri ile de kronik hepatit, siroz, hepatoselüler karsinoma gibi karaciğer patolojilerinin en sık görülen nedenlerinden biri olabileceği iddia edilmiştir(23,82). Diğer taraftan farklı etyolojiye sahip olup sebebi bilinmeyen ve kriptojenik olarak tanımlanan kronik karaciğer hastalığı grubunda da HCV'nin etyolojik rolü yaygın olarak araştırılmış ve bu grup kronik karaciğer hastalıklarında da değişik oranlarda anti-HCV pozitifliği saptanmıştır (76,94).

HCV infeksiyonlarının laboratuvar tanısı için bugün farklı iki yöntem uygulanmaktadır. Birincisi virusun yapısal (Structural S) ve yapısal olmayan (Nonstructural NS) proteinlerine karşı oluşan anti-HCV antikorlarının serumda ELİSA yöntemi ile gösterilmesidir. Protein epitoplarına karşı oluşan antikorların ayrı ayrı saptanmasını sağlayan rekombinant immünoblotting(RIBA) tekniği ile de bu yöntemin doğrulama işlemi gerçekleştirilebilmektedir (3,5,32). İkincisi viral

antijenlerin ya da viral replikasyonun saptanmasıdır. Viral antijenlerin varlığının bilinen immünolojik yöntemlerle saptanamaması ve virusun invitro şartlarda üretilmemesi nedeniyle viral replikasyonun varlığı ancak virusa ait nükleer materyalin (RNA) invitro nükleik asit amplifikasyon teknikleri kullanılarak gösterilmesi ile mümkün olabilmektedir. (46,67). HCV RNA'sının gösterilmesi vireminin saptanması açısından önemli olduğu kadar, kronik karaciğer hastalıklarına yol açabilecek diğer nedenlerin (HBV, CMV, EBV, alkol, ilaç, otoimmünite, metabolik nedenler vs.) ekarte edilmesi açısından da önem taşımaktadır(42).

HCV-RNA'nın gösterilmesinde amplifikasyon yöntemleri olarak hem klasik "tek aşamalı" (non-nested) hem de "iki aşamalı" (nested) PCR yöntemleri tanımlanmıştır(5,29). Nested PCR yönteminde, ilk çevrim amplifikasyon ürünleri, internal ikinci bir primer seti kullanılarak yeniden amplifiye edilirler. Bu yöntemin ileri derecede duyarlı olduğu ileri sürülmüş, uygun primerlerin kullanılmasıyla <1 CID50 (şempanze infeksiyöz dozu) duyarlılığına ulaşabileceği gösterilmiştir. Öte yandan, elde edilmiş cDNA eğer pürifiye edilirse (fenol/kloroform ekstraksiyonu ve sonrasında etanol presipitasyonu ile), bunun non-nested PCR ile amplifikasyonunun, nested PCR yöntemine göre daha duyarlı olacağı da ileri sürülmüştür (4). Bu nedenle araştırmamızda hepatit C olduğundan şüphelenilen hastalar ile serolojik sonuçları belli olan bir dizi serum örneği kullanılarak HCV-RNA için non-nested PCR testi ile nested-PCR testinin analitik ve klinik duyarlılıklarını karşılaştırmayı, ayrıca ticari kit kullanmadan en ucuz ve en duyarlı yöntemi rutine oturtmayı amaçladık.

GENEL BİLGİLER

Tarihçe

Hepatit A ve B viruslarının tanımlanması ve bu etkenlere karşı güvenilir serolojik testlerin geliştirilip, yaygın olarak kullanılmaya başlanılmasından sonra 1970'li yıllarda genellikle posttransfüzyon hepatitlerin çoğunluğundan sorumlu üçüncü bir tip infeksiyöz hepatitin varlığı tanımlanmıştır. Transfüzyon sonrası gelişen bu hepatitlerin bilinen diğer virusların (CMV ve EBV gibi) dışında başka bir veya birden fazla farklı etkenle ortaya çıkabileceği düşünülmüştür. Bilinen yöntemlerle uzun süre saptanamayan bu hepatotropik etkenlere non-A non-B(NANB) adı verilmiştir (29).

1970'li yılların ortalarından itibaren infeksiyon etkenini saptamak amacıyla deneysel hayvan modelleri geliştirilmiş olup, NANB hepatitli kişilerin serum ya da plazmaları şempanzelerle intravenöz yoldan inoküle edilerek bu hayvanlarda da insanlardakine benzer hepatit tablolarının meydana gelebileceği gösterilmiştir. Ayrıca şempanzelerden başka hayvanlar da deneysel olarak NANB etkenleri ile infekte edilmeye çalışılmışsa da bu hayvanlarda şempanzelerde olduğu gibi infeksiyon oluşturulamamıştır(11).

NANB ile infekte edilerek hepatit oluşturulmuş şempanzelerin hepatosit sitoplazmalarında 150-200 nm. büyüklüğünde çift membranlı tübül benzeri çok sayıda oluşumlar gözlenmiş ve bunlara "tubule-forming agent" (TFA) adı verilmiştir(70). 1980'li yıllarda TFA içeren infeksiyöz inokülasyonların kloroformla muamele edildikten sonra şempanzeler için infeksiyöz özelliğini kaybettikleri görülmüş, böylece NANB etkenlerinden birinin lipid zarflı bir virüs olabileceği düşünülmüştür. Daha sonra yapılan filtrasyon çalışmalarında TFA'ların 80 nm.'lik filtrelerden geçebildiği gösterilmiş, böylece bunların küçük, lipid zarf içeren Hepadnaviridea ,Togaviridea, Flaviviridea ailesinden birine ait ya da yeni bir virüs olabileceği düşünülmüştür(11,21,70).

Viral etkenin izolasyon ve identifikasyon çalışmalarına ek olarak çeşitli yöntemlerle, muhtemel NANB etkenlerine ait antijen ve antikörlerin gösterilmesine çalışılmış ancak bu çalışmaların hiç birisinde başarılı olunamamıştır. Bunun da, NANB etkenlerinin diğer hepatotropik ajanlardan farklı olarak infektif titrelerinin düşük olmasından ve dolayısıyla uygun moleküler markırlarının belirlenememesinden kaynaklandığı kanaatine varılmıştır(48).

Klasik virolojik ve immünolojik yöntemlerle NANB ajanlarının belirlenememesi, araştırmacıları seksenli yılların ortalarından itibaren rekombinant moleküler teknoloji alanına yöneltmiştir. Bu yıllarda geliştirilen moleküler teknikler ile NANB etkenlerinin nükleik asidi (RNA) hakkında önemli bulgular elde edilmiştir. Yüksek titreli TFA'lı serumlardan etken RNA' sını izole edilmiş ve random primerler kullanılarak "reverse transcriptase"(RT) enzimi ile NANB'ye spesifik komplementer DNA(cDNA) elde edilmiştir. Bu cDNA molekülü "lambda gt 11" bakteriyofajına transfer edilerek Escherichia coli'de NANB'ye spesifik polipeptidler sentezletilmiştir. NANB'ye spesifik olarak elde edilen polipeptidler kronik NANB'li şahısların serumları ile karşılaştırılarak reaksiyon veren 5-1-1 ve C81 klonlarının NANB etkeninin genomundan türemiş olduğu ortaya konmuştur. Bu klonların nükleotid sekansları belirlenmiş ve böylece bilinen diğer hepatit viruslarından farklı yeni bir virus; Hepatit C virusu(HCV) 1989 yılında tanımlanmıştır(19,55).

Virusun Genel Özellikleri, Sınıflandırma ve Genotipleri

HCV'nin yapısıyla ilgili bilgilerin çoğu birçok *invivo* ve *invitro* sistemlerde klonlanmış cDNA örneklerinden elde edilen veriler ile bu virusa benzeyen bilinen diğer virusların genomik yapılarının incelenmesiyle elde edilmiştir.

Viryonun Yapı ve Fiziksel Özellikleri: HCV'nin serumdaki titresinin düşük olması ve üretilebileceği etkili hücre kültür sistemlerinin bulunmaması nedeniyle bu virusun yapısı, replikasyonu ve biyokimyasal özellikleri ile ilgili sınırlı bilgi elde edilebilmiştir(19,55). İmmun elektron mikroskobu çalışmasında muhtemel HCV viryonunun, 55-65 nm. çapında, yüzeyinde dikensi çıkıntılar olan bir yapıya sahip olduğu görülmüştür. Virusun büyüklüğü hakkındaki bilgiler daha çok filtrasyon deneylerine dayanmakta olup, buna göre virusun çapı 45-55 nm. arasında değişiklik göstermektedir(70-78). Konsantre insan plazmasından elde edilen viryonların kloroform ya da deterjanlarla muamelesinden sonra infeksiyöz özelliğini kaybetmesi virusun lipid yapıda bir zarfa sahip olduğunu göstermektedir. HCV poliproteinleri, primer sekansları bakımından pestivirus ve daha az oranda da flavivirus tarafından kodlanan proteinlere benzerlik gösterirler(20,44). HCV'de pestivirus ve flavivirus poliproteinlerinin primer yapılarına benzerlik gösteren az sayıda yapılar olmasına rağmen, sekans homolojilerindeki ko-linear bölgelerin varlığı, bu viruslar arasında benzer genetik organizasyonların var olduğunu göstermektedir. Ayrıca 5' terminal genomik RNA bölgesinin yukarıdaki büyük "Open Reading Frame" (ORF)'nin pestivirus genomunda aynı bölgede olması da bu düşüncüyü desteklemektedir. HCV'nin küçük, zarflı bir virus olması flaviviruslara benzetilmesine neden olmuştur. Tüm bu veriler HCV'nin pestiviruslarla uzaktan akraba olduğunu ve daha az oranda da flaviviruslarla yakınlığı olduğunu göstermektedir. Böylece HCV yeni bir genus olarak diğer iki virus, pestivirus ve flavivirus ile birlikte Flaviviridea familyası içerisinde yer almıştır(44,47,70).

Viral genom: Çok sayıdaki HCV izolatının genomik sekanslarının tamamı ya da tamamına yakın bir kısmı belirlenmiştir. Bir çok majör HCV genotipinin bütün dünyada farklı genomik dizilimlerinin olduğu ortaya konmuştur. HCV genomu çeşitli yapısal veya yapısal olmayan viral proteinleri kodlayan çok sayıda genden oluşan tek bir ORF içeren, yaklaşık 9500 nükleotidlik tek pozitif iplikli linear bir RNA'dan ibarettir(19,20). Genomun her iki ucunda protein kodlamayan bölgeler(non coding region, NCR) bulunur. Bu bölgeler viral genomun replikasyonunda, translasyonunda ve virusun paketlenmesinde görev alan dizileri içerirler. Viral genomun 5'NCR'si 341-344 baz uzunluğunda olup, genomun dizilim yönünden en iyi korunmuş bölgesini oluşturur. Genomun 3'NCR'si ise oldukça kısa heteropolimerik yapıda olup 27-66 nükleotidden oluşur. Bu iki bölge arasında kalan genomik bölgeden, uzunluğu çok az oranda değişiklik gösteren, yaklaşık 3010-11 veya 3030 amino asit uzunluğunda öncü bir poliprotein kodlanır. Bu poliproteinlerin amino ucu tarafında yapısal (structural, S) proteinler (C, E1, E2, p7), karboksi ucu tarafında ise yapısal olmayan (nonstructural, NS) proteinler (NS2, NS3, NS4, NS5) yer alır (20-96). Virusun yapısal proteinleri konak hücre endoplazmik retikulumunda(ER) bulunan sinyal peptidaz tarafından, yapısal olmayan proteinleri ise metalloproteaz ve serin proteaz adlı viral kodlu iki ayrı proteaz tarafından poliprotein öncülerinden ayrıştırılırlar(45,84).

HCV, nükleotid dizilimlerindeki benzerlik oranı yaklaşık %70'den fazla olan heterojen bir grup virus ihtiva eder. Nükleik asid dizilim homolojisi ve filogenetik analiz esas alındığında HCV'nin genetik varyantları bazılarının herbirisi birkaç subtip ihtiva eden 6 major genotip ve 6 subtip(1a,1b,2a,...) ayrılırlar. Yer yüzünde genotip ve subtiplerin coğrafi dağılımında bölgeler ve ülkeler arasında farklılıklar görülmektedir. Genotip1a,1b,2b ve 3a ABD'de ve Batı Avrupa'da en fazla görülen subtiplerdir. HCV genotip 1b,2a ve 2b Japonya ve Taiwan'da prevalen iken, HCV genotip 4,5 ve 6 Ortadoğu Güney Afrika ve Hong Kong gibi ülkelerde predominant olarak görülür. Ülkemizde ise HCV genotip1b'nin diğer tiplerden daha fazla görüldüğü bildirilmiştir(2,6,27).

HCV Proteinleri: Komplamenter DNA(cDNA) ekspresyon sistemleri ile yapılan analizlerde hali hazırda HCV'den, en az 9-10 polipeptid idantifiye edilmiş olup, bunlardan 3 ya da 4 tanesi yapısal(S) proteinler, geri kalanı da yapısal olmayan(NS) proteinlerdir(38,47,57).

Yapısal proteinlerden protein C (21-22 kDa) bazik özellikte bir nükleokapsid proteinidir. Konakçı sinyal peptidazlar aracılığı ile poliprotein öncülerinin N-terminal bölgesinden itibaren oluşturulur. Farklı HCV tipleri arasında iyi korunmuş olması nedeniyle diagnostik çalışmalarda önemli bir hedef teşkil etmektedir. Yüzdoksanbir amino asit içeren C proteininin farklı izolatlar arasındaki amino asit değişkenliği % 9 dan az olarak tespit edilmiştir. Bir çok çalışmada HCV'nin C proteinine karşı oluşan antikorların infeksiyonun başlangıcında geliştiği gösterilmiştir(41,90).

Yapısal proteinlerden diğerleri, iki adet glikozillenmiş zarf proteinlerinden E1(31-37 kDa) ve E2(61-72 kDa)'den ibarettir(39,60,84). E2 proteini ya tek başına yada E2/p7 ile birleşmiş şekilde iki ayrı formda bulunabilmektedir. Bu nedenle p7 proteininin de virusun yapısal proteinlerinden olabileceği düşünülmektedir. İnfeksiyöz plazmadaki HCV'nin bitki lektinlerine bağlandığı gösterilmiş olup, bu nedenle viryonların glikolize olduğu ve kompleks karbonhidratların muhtemelen golgi aparatında ilave edildiği düşünülmektedir. E1 ve E2 proteinleri HCV RNA'sı ile transfekte memeli hücrelerinde endoplazmik retikulum lümeninde birbirlerine nonkovalan bağlarla bağlanarak heterodimerik yapılar şeklinde bulunurlar(48,97).

İnvitro ve invivo cDNA ekspresyon sistemleri kullanılarak, HCV tarafından kodlanan proteinlerin çok büyük bir kısmının yapısal olmayan proteinler olduğu gösterilmiştir. HCV'nin yapısal olmayan proteinleri büyük ölçüde poliproteinlerden, viral kodlu iki proteazın kombine aktivasyonu ile oluşmaktadır. Bu proteazlardan birincisi NS2/NS3 proteininin ayrışmasını sağlayan NS2 kodlu metalloproteazdır(45). İkinci proteaz NS3 bölgesinden kodlanır. Tripsin familyasına ait olup bir serin proteazdır. Bu serin proteaz NS3/NS4a, NS4a/NS4b, NS4b/NS5a ve NS5a/NS5b proteininin ayrışmasını sağlar(34-84). NS3 kodlu proteinlerin bu

fonksiyonlarının dışında NTPaz ve RNA/DNA helikaz etkinliğinin de olduğu bilinmektedir. Serin proteaz etkinliği molekulün amino ucunda helikaz etkinliği ise karboksi ucunda yer almaktadır. HCV'nin yapısal olmayan proteinlerinin bazılarının fonksiyonları bilinmemektedir. Yukarıda tartışıldığı gibi NS2,NS3,NS4 ve NS5 proteininin ayrışmasını sağlamanın yanısıra, NS5a'nin amino asid sekans motifi RNA'ya bağımlı RNA polimeraz'a benzemekte, bu yúzden muhtemelen RNA'ya bağımlı RNA polimeraz aktivitesi de içermektedir. Diğer yapısal olmayan proteinlerin çoğunun transinfekte memeli hücrelerinin endoplazmik retikulumlarında identifiye edilmeleri, bu proteinlerin virusun paketlenmesi ve replikasyonlarında önemli fonksiyonları olduğunu düşündürmektedir (38, 39, 45, 70, 84).

Virus replikasyonu: HCV replikasyonundaki başlangıç olaylar iyi anlaşılamamıştır. HCV glikoproteinleri için hücresele reseptörler identifiye edilememiştir. HCV partiküllerinin beta lipoprotein ve immünoglobulinler ile birleşmesinin virusun hücreye girmesi ve farklı dokuları infekte edebilmesi üzerinde etkili rollerinin olduğu sanılmaktadır(48,97). şempanze modellerinde, HCV RNA'sı hepatositlerde, inokülasyon sonrası en erken üçüncü günde tesbit edilebilmiş ve karaciğer enzimlerinden alanin amino transferaz(ALT) viral infeksiyon süresince yüksek düzeyde kalmıştır. Akut infeksiyonlarda hepatositlerde viral antijenlerin ortaya çıkışı, pozitif ve negatif RNA'ların bulunması hepatositlerin HCV replikasyonu için majör bir alan olduğunu göstermektedir(79). Özellikle kronik infekte kişilerde ekstra hepatik rezervuarlarda da HCV'nin replike olabileceğine ilişkin görüşler vardır. Bazı çalışmalarda RT-PCR veya in situ hibridizasyon yöntemleriyle HCV RNA'sının perifer mononükleer hücrelerde gösterilmesi bu tezi doğrular niteliktedir(62-79). HCV'nin in vivo doku tropizminin anlaşılması virus için hücre kültür sistemlerinin geliştirilmesini ve replikasyonunun anlaşılmasını kolaylaştıracaktır. Her ne kadar HCV replikasyonu için etkili bir hücre sistemi geliştirilememişse de bazı ilerlemeler kaydedilmiştir(86). şimdiye kadar in vitro HCV infeksiyon ve replikasyonu için insan hepatositleri, periferel kan lökositleri, insan B hücre kültürleri, fare-retrovirusu ile infekte insan T-hücre kültürü(Molt 4-Ma) gibi

hücreler kullanılmıştır. Aslında bu hücrelerden küçük bir kısmı infekte edilebilmektedirler. İn vitro olarak farklı HCV inokülasyonlarının Molt 4-Ma hücre kültüründe şempanze modellerine benzer infeksiyon özelliği gösterdiği bulunmuştur. Bu hücre kültürü, HCV'nin nötralizasyonu ve kronik infeksiyonlar esnasında nötralizasyondan kaçan mutant virusların incelenmesi amacıyla kullanılmaktadır(48).

HCV İnfeksiyonunun Klinik Özellikleri

Hepatit C virus infeksiyonlarının inkübasyon süreleri HAV ile HBV'nin inkübasyon süreleri arasında (2-26 hafta arasında değişmekte) olup ortalama 8-10 hafta kadardır. Akut HCV infeksiyonları genellikle asemptomatik seyrederek. HCV ile infekte şahısların yaklaşık %95'i bir hepatit atağı geçirdiklerini hatırlamamaktadırlar. Sarılıkla seyreden klasik hepatit tablosu ile az karşılaşılır. Akut infeksiyonların sadece %25'ine yakın bir kısmında sarılık görülebilir. Ortaya çıkan klinik belirtiler diğer hepatitlere göre daha hafiftir. İştahsızlık, yorgunluk, halsizlik gibi genel hepatit tablosu yanında bazı olgularda karnın sağ üst bölgesinde ağrı şikayeti vardır. Yine az sayıda olguda purpura, ürtiker, deri döküntüleri, artralji ve serum hastalığına benzer bulguların hastalık tablosuna eşlik ettiği bildirilmiştir. Küçük oranda da olsa hepatomegali, splenomegali gibi bir kaç diğer fiziksel bulgular da bildirilmiştir(24,34,48,80).

Hastaların çoğu asemptomatik olduğundan hastalık sıklıkla laboratuvarında tesadüfen serum aminotransferaz(ALT,AST) değerlerinin yüksek bulunması ile saptanır. Diğer karaciğer testlerinin tanı değeri sınırlı olup ALT yüksekliği HCV için daha spesifiktir. Hastalığın seyrine ve kronikleşme durumuna göre ALT düzeyleri farklı paternler gösterir(34). ALT düzeyinde hızlı bir artış ve bunu takiben normale dönüş daha çok iyileşen vakalarda görülür. ALT'nin 6 aydan daha uzun bir süre yükselmesi ve yüksek kalarak devam etmesi ya da inişli çıkışlı bir seyir takip etmesi, kronikleşmenin belirtileridir. Ancak bazen bulgularında HCV infeksiyonu bulunması ve karaciğer biopsisinde inflamasyon saptanmasına rağmen karaciğer biyokimya

testlerinin normal olduğu durumlara da rastlanılmaktadır(24,34,53,80). Akut HCV infeksiyonundan sonra fulminant hepatit gelişiminin batı ülkelerinde nadir olarak bildirilmesine rağmen Japonya gibi uzak doğu ülkelerinde HCV'nin tek başına ya da diğ er hepatit virusları ile birlikte fulminant hepatite neden olduğu bildirilmiştir(49).

Akut HCV infeksiyonlarının yaklaşık %25'inde anti-HCV antikorları gelişir. ALT düzeyi normale döner. HCV RNA'sı kaybolur ve iyileşme görülür. Yaklaşık %25'inde normal ALT düzeyi ve anti-HCV antikoru gelişmesine rağmen HCV RNA'sı pozitif kalır. Geri kalan %50'sinde ise kronik hepatit C gelişir. Böylece HCV RNA pozitifliğine göre HCV infeksiyonlarında kronikleşme oranı %75'den fazladır(48,53).



Epidemiyoloji

Duyarlı serolojik testlerin geliştirilmesinden sonra Anti-HCV pozitifliğine dayanılarak yapılan sero-epidemiolojik çalışmalarla, HCV infeksiyonlarına bütün dünyada değişen oranlarda rastlandığı ortaya konmuştur(64,80). Birinci kuşak ELISA testleri ile yapılan ilk çalışmalarda, transfüzyon sonrası hepatit gelişen hastaların %50-80'inden HCV'nin sorumlu olabileceği gösterilmiştir. Sonraki çalışmalarda daha duyarlı, özgül ikinci ve üçüncü kuşak ELISA testleri ile bu oranın %90'ın üzerinde olduğu görülmüştür(1). Seroprevalans çalışmaları genellikle sağlıklı kan donörlerinde yapıldığından gerçek risk gruplarındaki prevalansı göstermemektedir. Günümüzde dünyada toplam 300 milyondan fazla kişinin HCV ile infekte olduğu, ABD gibi bir ülkede buna her yıl ortalama 150 bin kişinin katıldığı tahmin edilmektedir(8,48). İnfeksiyonun sıklığı dünyada genel olarak %0.05-2 arasında değişmektedir(8,21,64,80). Bu oran coğrafi bölgelere göre farklılık gösterir. Örneğin İngiltere gibi Kuzey Avrupa ülkelerinde prevalans %0.05-1.0 iken, Güney Akdeniz ülkelerinde bu oran %2-5, Afrika'da %6 dır(48,80). Yine doğuya doğru gidildiğinde bu oranın arttığı görülmektedir. Seropozitiflik oranı yaş ile artmaktadır. Özellikle 50 yaş üzerinde HCV infeksiyonu insidansının arttığı görülmüştür. Japonya'da yapılan bir çalışmada 6-15 yaşlarındaki çocuklarda serokonversiyon gözlenmemiştir. Ancak bu yaşlardan sonra serokonversiyonda düzgün bir artış kaydedilmiştir(64,93). Mısır'ın kırsal alanlarında yapılan bir çalışmada 1-5 yaşlarındaki çocuklarda anti HCV pozitifliği %2-3, 6-10 yaşlarında %5.8 ve 9-15 yaşlarında ise %9.7 olarak bulunmuştur(73).

Ülkemizde de HCV infeksiyonlarında anti HCV pozitifliğine dayanılarak yapılmış çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Normal popülasyonda ve kan donörlerinde yapılmış olan bu çalışmalar bölgelere göre farklılıklar göstermekle birlikte HCV infeksiyon oranı ortalama olarak %0.3-1.8 arasında değişmektedir(22,81).

Sadece anti-HCV pozitifliğine dayanılarak yapılan çalışmaların infekte/taşıyıcı bireylerin tamamını yansıtmayacağı düşünülmektedir. Bunun nedeni antikor tarama testlerinin duyarlılığının henüz tüm anti HCV pozitifliklerini saptayabilecek düzeyde olmaması veya yalancı pozitif sonuç verebilmesidir. Yine kimi olgularda antikor yanıtı ya hiç gelişmemekte ya da çok kısa süreli olmaktadır.

Bulaşma yolları: HCV'nin bilinen bir vektörü ya da bir rezervuarı yoktur. İnsan, bilinen tek konaktır. İnfeksiyon başlıca parenteral ya da perkütan yolla bulaşmaktadır.

Parenteral bulaşmanın en iyi bilinen şekli kan ve kan ürünleri ile olanıdır. Antikor taraması yapılmadan gerçekleştirilen transfüzyonlardan sonra gelişen hepatit olgularının %90'ından fazlasından HCV infeksiyonları sorumludur. Kan ve kan ürünlerinin çok duyarlı yöntemlerle taranmaya başlanmasından sonra bu yolla bulaşma riskinde önemli düşüşlerin kaydedilmesi bu yolun etkinliğini göstermektedir. İntravenöz ve intramusküler immünoglobulin preparatları ile de az da olsa HCV bulaşması mümkündür(1,17,24,37).

Diğer bir yüksek risk grubu intravenöz(İV) ilaç ve madde kullananlardır. İV ilaç ve madde bağımlıları özellikle kontamine enjektörleri paylaşımları nedeniyle çoğunlukla HCV ile infekteldirler. Epidemiyolojik veriler bağımlılık süresi ile anti-HCV pozitifliği arasında bir korelasyon olabileceğini göstermektedir. Tek kullanımlık enjektörlerin kullanılması ile de bu yolla bulaşma riskinde 1989 yılından itibaren belirgin bir azalma görülmüştür(14,17,37).

Hemodiyaliz hastaları da HCV için bir diğer risk grubunu oluşturmaktadır. Diyaliz sayısı ve süresi bu riski artırmaktadır. Diyaliz öncesi anti-HCV taramalarının bu grup hastalarda da HCV infeksiyon riskini büyük oranda azaltacağı düşünülmektedir. İdeal olanı anti-HCV pozitif hastaların ayrı diyalize tabi tutulmalarıdır. Ancak bu hastalar gerek hastane, gerekse aile içi bulaşma riskine

her zaman açıktır. Böbrek, karaciğer, kalp gibi solid organ transplantasyonları da HCV enfeksiyonunun bulaşmasına neden olabilmektedir (17,24,93).

Bilinen parenteral bulaşma risk faktörlerini taşımayan kişilerde ortaya çıkan sporadik ya da toplumda kazanılmış HCV enfeksiyonları non parenteral yol ile de bulaşabilmektedir. Bunların başında cinsel yolla bulaşma gelir. Ancak HCV'nin HBV'ye göre viremi ve enfeksiyon oluşturma düzeyleri düşük olduğundan bu yolla bulaşmanın gerçekleşebilmesi için uzun süre ve çok sayıda temas gerekmektedir. HCV viremi ve kronik karaciğer hastalığı olan kişilerin eşleri HCV enfeksiyonu bakımından risk altındadırlar ve bu risk beraberlik süreleri ile artmaktadır. HCV'nin cinsel ilişki ile bulaşma riskinin düşük olması nedeniyle homoseksüel erkekler ve fahişeler önemli bir risk grubu oluşturmamaktadırlar (1,7,17,23,24,82).

HCV'nin anneden-bebeğe (vertikal) geçişini saptamak oldukça güçtür. Çünkü bebekteki anti HCV pozitifliği özellikle yaşamın ilk aylarında annenin antikoru yansıtır olabilir. Fakat maternal HCV RNA'nın geçişini ölçen araştırmalarda bu yolla geçişin de mümkün olabileceği gösterilmiştir. Bu yolla bulaşmada annenin HCV RNA düzeyinin yüksek olması (>10⁶ virus/ml.) önemli bir faktördür. Bulaşma doğum esnasında ya da doğumdan kısa bir süre sonra olabilir (48).

Epidemiyolojik verilere göre olguların %40 kadarında HCV ile hiç bir olası bulaşma yolu saptanamamaktadır. Bu sporadik vakalardaki enfeksiyonun bulaşma mekanizması belirsiz olup bulaşmanın muhtemelen salya, gözyaşı gibi vücut sıvıları ve aile içi yakın temas ile (aile içinde cinsel olmayan yollarla bulaşmanın sık olmamakla birlikte görülebileceği ve bu tür bulaşmaların, virus içeren vücut salgıları ile temas sonucu olabileceği düşünülmektedir.) veya enfekte ve iyi sterilize edilmemiş ortak kullanılan araçlarla olabileceğine dair görüşler ileri sürülmüştür. Örneğin; akupunktur, döğme, diş cerrahi girişimleri, kaza ile iğne batması (sağlık personeli), enfekte cam enjektör, traş bıçağı kullanımı vs. gibi faktörler HCV enfeksiyonunun bulaşmasında rol oynayabilmektedir (17,23).

Patogenez ve Patoloji

PT-NANB hepatitlerinin esas nedeni olarak bilinen HCV infeksiyonları genellikle perkütan ve parenteral bulaşma sonucu ortaya çıkar(24,34). Viremi genellikle infeksiyon etkeninin alınmasından bir hafta sonra görülür. Yapılan çalışmalarda deneysel olarak infekte edilen şempanzelerin hepatositlerinin çoğunda infeksiyonu takiben 2 gün içinde ve serumlarında ise bundan 1-2 gün sonra genomik RNA'nın varlığı gösterilmiştir(61,87). İnfeksiyonun akut dönemi birkaç ay sürebilir ve bu esnada hastalar genellikle viremiktirler. İnfeksiyonu takiben birkaç hafta içerisinde hepatositlerin hasarlanması sonucu serum aminotransferaz düzeyleri (alaninaminotransferaz, ALT ve aspartat aminotransferaz, AST) yükselir. İnfekte kişilerin %50'sinden fazlasında kronik hepatit gelişir. Kronik infeksiyon gelişen kişilerde ALT düzeyleri tipik olarak iniş çıkışlar gösterir ve hastalar genellikle viremiktirler. Kronikleşmeyen vakaların bir kısmında akut infeksiyonu takiben serum ALT düzeyi normale döner(14,87,91). İnfeksiyon normal seyrini tamamlayarak iyileşme ile sonuçlanırken, vakaların büyük bir kısmında yine viremi devam eder. Bu gibi kişilerin hepatositlerinde immünofloresans metodu ile HCV antijenleri gösterilmiştir(26).

HCV'nin kronik infeksiyonlarında patogonomik sayılabilecek histopatolojik bulgular yoktur. Ancak bazı bulgulara C hepatitinde diğer viral hepatitlerden daha sık olarak rastlanır. Bu hastaların karaciğer biopsilerinde portal alanlarda fokal lenfosit birikimi, hepatosit sitoplazmalarında büyük yağ damlacıkları, lobüler sinusoidal inflamasyon hücre aktivasyonları, daha az oranda da safra kanal hasarı ile hepatosit sitoplazmalarında eozinofilik Mallory cisimcikleri görülür (37,54,88).

Kronik HCV infeksiyonlarının histolojik özellikleri, kronik persistan hepatitte (KPH) ve kronik aktif hepatitte (KAH) farklılıklar göstermektedir. KPH'de inflamatuvar infiltrasyonlar sadece portal alanlarda sınırlıdır. KAH'de ise infiltrasyon çevre parankime doğru yayılır, bunun sonucu hepatosit harabiyeti oluşur ve rejenerasyon

odakları gelişir. KAH'in siroza dönüşüm riski daha yüksek olmakla birlikte, KPH'in de siroza neden olabileceği bildirilmektedir (37,54).

Kronikleşen vakalarda, KPH olgularının bir kısmından KAH gelişir. Yıllar sonra bu gibi olguların yaklaşık %20'sine yakın bir kısmında siroz oluşumu görülür. Sirotik olguların yaklaşık %20-25'inde ise karaciğer yetmezliği ortaya çıkar. HCV infeksiyonlarının daha ileri ve önemli bir sonucu da hepatosellüler karsinomadır (HSK). KAH den siroz ve sonra HSK ya geçiş görülmektedir. Bu geçiş yavaş ve kademeli olup, HCV infeksiyonları başlaması ile siroz ya da HSK başlangıcı arasındaki süre ortalama 21-29 yıl kadardır(52,53).

HCV'nin karaciğer hastalığının bütün bu farklı şekillerinin oluşmasında rolü olduğu düşünülürse de, yaş, alkol kullanımı, hepatit B virusu (HBV) ile ko-infeksiyon ve konağın immün sistem yetmezliği gibi yardımcı faktörlerin de bu evrelerin oluşma şekil ve sürelerini etkilediği görülmektedir. Ayrıca infeksiyonun bulaşma şekli de hastalığın seyrini etkileyebilmektedir. Zira PT HCV infeksiyonlarının, intra venöz ilaç ve madde kullanımına bağlı gelişen HCV infeksiyonlarından daha ciddi seyrettiği görülmüştür. Bunun da nedeni muhtemelen virusun başlangıç infeksiyon dozunun yüksek olmasından kaynaklanıyor olabilir(37,66,92).

Aslında HCV infeksiyonlarının patogenezi henüz tam olarak açıklığa kavuşmamıştır. İnfeksiyon esnasında meydana gelen karaciğer hücre harabiyeti virusun sitopatik etkisine ya da infeksiyona karşı oluşan immün yanıtı bağlı olabilir. Ancak oluşan immün yanıtın humoral yanıtın mı yoksa hücresel yanıtın mı hastalığın patogenezesinden sorumlu olduğu henüz açıklığa kavuşmamıştır. Kantitatif çalışmalar, asemptomatik olarak virusu taşıyan ve normal ALT düzeyine sahip kan donörlerinin dolaşımlarındaki HCV RNA düzeyinin, kronik karaciğer hastalığı olan kişilerden daha düşük düzeyde olduğunu göstermiştir. Öyleyse karaciğer hastalığının şiddeti doğrudan viral RNA ile ilgili olabilir. İmmün sistemi bozuk ya da karaciğer transplantlı hastalarda transplantla ilgili immünsüpresyon nedeniyle dolaşımda yüksek titrede virus varlığı saptanmıştır(48,56).

HCV infeksiyonlarının son dönemlerinde HCV'ye özgü antikorların ortaya çıkması karaciğer harabiyetinin şiddetini, vireminin devamını, ya da ortadan kaldırılmasını çok büyük oranda etkilemektedir. Her ne kadar karaciğer harabiyetinin bir kısmı doğrudan HCV'nin sitopatik etkisi sonucu ortaya çıkmakta ise de, son zamanlarda kabul gören görüş konağın immün cevabının, özellikle virusa özgü sitotoksik T lenfositlerin, hücre hasarında rol oynayan faktör olduğu yolundadır(40). HCV tarafından kodlanan yapısal ve yapısal olmayan proteinlerdeki bir çok epitopu tanıyabilen MHC-I bağımlı CD8⁺sitotoksik lenfositler(CTL) hastaların çoğunun karaciğer infiltratlarında gösterilmiştir. Alfa İNF tedavisi ile karaciğer infiltratlarındaki CD8⁺ lenfosit sayısı ve serum ALT düzeylerinin düşmesi arasında bir uyum olduğu görülmüştür(48). HCV'ye özgü sitotoksik lenfositler hem infekte şempanzelerin karaciğer infiltratlarında hem de hastaların periferal kanlarında gösterilmiştir. Kronik hepatitli kişilerde MHC-II bağımlı CD4 lenfosit yanıtının, hem periferal kanda hem de karaciğer infiltratlarında, bütün HCV proteinlerine özellikle de NS4 proteinlerine karşı antikor oluşumuna yardımcı olduğu gösterilmiştir(40,48). Anti-HCV serokonversiyonu şahıslara göre değişmekle birlikte infeksiyon başlangıcından 7-31 hafta kadar sonra oluşabilmektedir(48).

HCV infeksiyonlarının nasıl kronikleştiği ve virusun immün yanıtta nasıl kaçabildiği tam olarak bilinmemektedir. Bir görüşe göre kronikleşme immün yanıtta kaçabilen viral mutantlar ile ilişkilidir. HCV ile infekte bireylerde ve şempanzelerde yapılan deneysel çalışmalara göre, infeksiyonun başlangıcında oluşan humoral ve hücrel immün yanıt infeksiyon süresince virusun eliminasyonunu sağlayamamakta, dolayısıyla konağın HCV'ye karşı geliştirdiği immün yanıt virusa bağlı özellikler nedeniyle yeterli olamamaktadır. Bu nedenle virus konağın immün denetiminden kurtulabilmektedir. HCV infeksiyonları insanlarda antikorların varlığında bile çok büyük oranda kronikleşebilmektedirler. Şöyle ki; akut infeksiyonlarda antikorlar serbest virusları nötralize eder, bu nötralizan antikorların etkisi ile viruslar infekte hepatositlerde sınırlı kalır veya infekte olmamış hücrelerin infeksiyonu önlenir ve süratle HCV RNA titresinde bir azalma görülür. Ancak bazı

durumlarda infeksiyonun seyri sırasında viral genomun bazı bölgelerinde mutasyonlar geliştiği ve böylece virusun immünolojik denetimden kaçarak "escape mutantlar" geliştirdiği düşünülmektedir. HCV genomunun bütün bölgelerinde mutasyonlar saptanabilmekteyse de, en yüksek oranda mutasyonun saptandığı bölge E2 deki 28-30 amino asitlik bir bölgedir. Bu bölgeye çok değişken bölge "hypervariable region"(HVR) adı verilir. HVR'deki bu değişiklik HCV infeksiyonları sırasında yeni varyantların ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Ortaya çıkan bu yeni varyantlar mevcut antikorların nötralizasyon etkilerinden kurtularak yeni bir infeksiyonu, yeni bir infeksiyon ise yeni varyantları ortaya çıkararak infeksiyonun devam etmesini sağlar. Oluşan antikorların da mevcut varyantların eliminasyonuna yetmeyerek bu şekilde HCV infeksiyonlarının immün seleksiyonla kronikleşmesine neden olabileceği düşünülmektedir (53,87,95).

HCV'nin aynı zamanda bazı hepatik ve ekstra hepatik otoimmün hastalıkların etyopatogenezinde de rol oynayabileceği gösterilmiştir(15,63). Dolaşımlarında konak karaciğer ve böbrek mikrozomlarına karşı antikor(anti-LKM) varlığı gösterilen tip2 otoimmün hepatitli kişiler ile antinükleer antikor(ANA), düz kas antikorları(DKA) ihtiva eden tip1 otoimmün hepatitli kişilerin bir kısmının HCV yönünden viremik olduğu gösterilmiştir(15). Aslında HCV'nin bu tip otoimmün hastalıkların oluşumundaki rolünün pek açık olmamasına karşın, bazı ekstrahepatik otoimmün hastalıklardaki rolleri daha iyi belirlenmiştir. Mikst kriyoglobulinemi ve membranoproliferatif glomerulonefrit'li hastaların büyük çoğunluğunda HCV nükleokapsid proteinlerine karşı antikor varlığına ek olarak HCV RNA'sının varlığı da belirlenmiştir. Sjögren sendromu, porfira kutenea tarda ve idiopatik trombositopeni gibi hastalıklar da HCV ile ilişkili diğer otoimmün hastalıklar arasında yer almaktadırlar(15,63).

Laboratuvar Tanısı

Farklı hepatotropik etkenler tarafından meydana getirilen karaciğer hastalıklarında klinik semptomlar birbirine benzemektedirler. Lenfoid foliküllerin varlığı ve sinuzoidal enflamasyonlar, steatosis(karaciğer yağlanması) ve safra kanalı hasarı gibi histopatolojik bulgular HCV infeksiyonlarında da gözlenmesine rağmen, sadece HCV'ye özgü bulgular değildir. Periportal hepatosit sitoplazmalarında gözlenen eozinofilik "Mallory benzeri cisimcikler" HCV için karakteristik olmakla birlikte kronik olguların sadece %20'sine yakın bir kısmında görülür(54,88). Bu yüzden klinik olarak asemptomatik şahıslarda özgül tanı yalnız virusa ait spesifik markırların gösterilmesi ile mümkün olabilmektedir. Zira hastalığın tanısı, tedavinin takibi ve HCV infeksiyonunun yıllar sonra ortaya çıkabilecek sekelleri açısından önem taşımaktadır.

Günümüzde HCV infeksiyonlarının tanısı, virusun yapısal ya da yapısal olmayan proteinlerine karşı oluşmuş antikorların serolojik testlerle gösterilmesi; ya da doğrudan vireminin saptanması amacıyla virus'a ait nükleer materyalin(RNA) gösterilmesi ile mümkün olabilmektedir(19,46,51,55,90,94).

Antikor Saptanması: Başlangıçta serolojik tanı, HCV genomunun NS4 bölgesine ait c-1-1 ve c-100-3 proteinlerinden, rekombinant ya da sentetik antijenlerle hazırlanmış ticari ELISA kitleri ile bu proteinlere karşı oluşmuş antikorların saptanması ile mümkün olabilmekte idi (55). Birinci kuşak ELISA testleri adı da verilen bu testlerle, ilk zamanlar HCV'nin temel epidemiyolojisi açısından önemli bilgiler elde edilmiştir. Ancak bu testler günümüzde yetersiz duyarlılıkta olmaları ve düşük risk gruplarında yanlış sonuçlar verebilmeleri nedeniyle kullanımdan kalkarak, yerlerini ikinci ve üçüncü kuşak ELISA testlerine bırakmışlardır(5,32,46,67,90). Birinci kuşak HCV ELISA test sonuçlarının doğrulanması için birinci kuşak rekombinant immüno blot (RIBA-1) testleri geliştirilmiş olup, bu testte de yine c-100-3 antijenine karşı antikor aranmakta, fakat

kullanılan farklı teknik(immünoblot) sayesinde, protein kontaminasyonu sonucu oluşabilen ELISA yalancı pozitifliğinin önüne geçilmektedir.

Daha sonraki çalışmalarda serolojik testlerde duyarlılık ve özgüllüğü fazla olan ikinci(c-100-3 proteinine ilave olarak c22 proteini ihtiva eder) ve üçüncü(c22, NS3, NS4 ve NS5 proteinlerini ihtiva eder) kuşak olarak bilinen ve virusun yapısal olmayan proteinlerine ilaveten yapısal proteinlerini de içeren, rekombinant ve sentetik(nonspesifik bağlanmaları önler) proteinlerden hazırlanan ELISA testleri geliştirilmiştir. Duyarlılık ve özgüllüğü çok yüksek olan bu testlerde yalancı pozitifliğin(özellikle immünoglobülin düzeyi yüksek olan hastalarda, otoimmün karaciğer hastalığı olanlarda ve sirozlularda) hala sorun olması nedeniyle, pozitif ve şüpheli sonuçların doğrulanması için yine aynı kuşak RIBA testleri geliştirilmiştir(46,90).

HCV ile infekte şahısların HCV'nin farklı proteinlerine karşı immün cevapları farklıdır. Bu nedenle tanıda bir grup protein kombinasyonunun bulunması hastalığın erken tanısı ya da serokonversiyonun saptanması açısından önemlidir(90). Serokonversiyonun ortaya çıkma süresi 7-31 hafta arasında değişmektedir. HCV ile infekte şahıslarda serokonversiyon genellikle nükleokapsid ve zarf proteinlerine karşı oluşmaktadır., immünosüpresif olgularda ise antikor yanıtının oluşamayacağı bildirilmektedir(48,97).

Vireminin Saptanması: HCV infeksiyonları yüksek oranlarda kronikleşerek siroz ve hepatoselüler karsinoma gibi önemli komplikasyonlara neden olmaktadır. Yaşlılarda, vireminin yüksek olduğu hastalarda ve immünosüprese olgularda kronikleşme riski daha yüksektir(21,34,52,80,85). İnfeksiyonun antikor tarama testleri ile tanımlanmasında aktif bir infeksiyonla, geçirilmiş bir infeksiyonun birbirinden ayırt edilmesi mümkün olamamaktadır. Zira viremi, antikorların varlığında bile görülebilmektedir. Ayrıca serokonversiyon için belirli bir süre geçmesi gerekmektedir. İmmünosüprese olgularda ise antikor yanıtı hiç oluşmayabilir(5,46,55,67,90). Bu gibi durumlarda serolojik testler yüksek

duyarlılıklarına rağmen tanıya yardımcı olamaz. Bu nedenle vireminin belirlenmesi aktif bir infeksiyonun tanımı için önem taşımaktadır. HCV'nin invitro şartlarda üretilebileceği hücre kültür sistemlerinin olmaması ve viral antijen titrelerinin çok düşük olması nedeniyle vireminin varlığı, bilinen immünolojik ve hücre kültürü yöntemleri ile gösterilememektedir. Diğer taraftan klinik örneklerden elektron mikroskobu ile HCV identifikasyonu henüz uygulanabilir bir yöntem değildir. Bu nedenle vireminin varlığı ve takibi sadece viral nükleik asitlerin(HCV-RNA) gösterilmesi ile mümkün olabilmektedir(32,94,97).

Nükleik asit amplifikasyon yöntemlerinden olan Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) son yıllarda yaygın olarak kullanılan tekniklerin başında gelmektedir. Seksenli yılların ortalarında Saiki ve arkadaşları tarafından geliştirilen bu teknik, tanısal amaçla HCV RNA'sının gösterilmesinde, HCV'nin klonlanmasından sonra yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır(32,94). Ancak, bu uygulamaların standardize olmaması önemli bir sorundur. PCR ile karaciğer dokusunda ve serumda HCV RNA varlığı araştırılabilir. PCR ile HCV infeksiyonu bulaşmayı takiben üçüncü günden itibaren saptanabilmektedir. HCV genetik değişikliklerin yüksek oranda görüldüğü bir virustur. Bu nedenle amplifikasyon için (hedeflenecek bölge) genomun en iyi korunan bölgesi olan 5'NCR' a özgü primerler tercih edilir. Ayrıca son yıllarda, yine bir hedef çoğaltma yöntemi olan "nucleic acid-based amplification(NASBA™)" ve bir sinyal çoğaltma yöntemi olan"branched DNA(bDNA)" teknikleri de HCV'nin tanımlanmasında yeri olmaya başlayan yeni moleküler biyolojik yöntemlerdir(97).

Korunma ve Kontrol

HCV'nin genetik yapısının belirlenmesinden sonra deneysel olarak şempanzelerde rekombinant HCV proteinleri ile hazırlanan aşılarla ümit verici sonuçlar alınmışsa da bugün için henüz insanlara uygulanarak immün yanıtın oluşmasını sağlayabilen etkili bir aşı geliştirilememiştir. İnfeksiyonlu kişilerde oluşan anti HCV antikorlarının koruyucu olmaması (virusun eliminasyonunu

sağlayamaması), nötralizan antikörlerin tam olarak bilinmemesi, HCV' nin stabil bir yapıda olmaması ve farklı genomik tiplerinin varlığı aşı geliştirilmesinde en önemli engeller olarak görülmektedir. Anti-HCV antikörleri ihtiva eden immünglobülinlerin de deneysel etkinliği bilinmekle beraber, pratikte uygulanma alanları henüz yoktur(22,24,48).

Günümüzde HCV infeksiyonlarına karşı korunma, yalnız infeksiyon kaynaklarına ve bulaşma yollarına karşı alınacak önlemlerle sınırlı kalmaktadır. Kan ve kan ürünlerinin, geliştirilen serolojik testlerle çok dikkatli olarak taranmasından sonra, transfüzyon sonucu meydana gelen HCV infeksiyonlarının oluşma riski oldukça azalmış, ancak tamamen ortadan kaldırılamamıştır. Bunun nedeni kullanılan testlerin yeterince duyarlı ve özgül olmaması, seronegatif kişilerde de HCV RNA'sının bulunabilmesidir. Bu nedenle HCV infeksiyonlarından korunmada, kan ve kan ürünleri ile organ vericilerinin HCV yönünden incelenmesi, gereksiz kan transfüzyonlarından kaçınılması, hemodiyaliz hastalarının ayrılması, risk gruplarında bulunanların eğitilmesi gibi önlemlerin alınması büyük önem taşımaktadır. Kronikleşme ve siroz gelişme olasılığı çok yüksek oranda görüldüğünden, HCV infeksiyonlarının önlenmesi ve tedavisinde etkili olabilecek bir çok yaklaşım denenmiştir. Kortikosteroidler gibi anti-inflamatuar ilaçların karaciğer inflamasyonlarını azalttığı görülmüşse de, bağışıklık baskılayıcı tedavinin gerçekte hastaya zararlı olduğu ve sirozun daha çabuk gelişmesine neden olduğu ortaya konmuştur. Bugüne kadar üzerinde çalışılan nükleozid analoglarından yalnızca ribavirin'in etkili olabileceğine dair izlenimler elde edilmişse de, bu konudaki deneyimler sınırlıdır. Kronik NANB(HCV) infeksiyonlarının tedavisinde alfa interferon uygulanması 1986 yılından beri çok sayıda randomize çalışmalarla sürdürülmüştür. Günümüzde HCV infeksiyonlarının tedavisinde klinik deneyimi ve etki mekanizması tam olarak bilinmemekle birlikte IFN'lar(IFN alfa 2a"Roferan, Roche", IFN alfa 2b"İntronA,Schering", IFN alfa n1-Human Lenphoblastoid-"Wellferon, Welcom") kullanılmaktadır(31, 58).

Yapılan bir çok araştırmada IFN ile etkili bir tedavi elde edilmesi için IFN'nin uygulanma süresi,dozu, hasta seçimi üzerinde durulmuş ve birçok tedavi protokolleri denenmiştir. Bu araştırmalarda 6 veya 12 ay süre ile haftada 3 defa 3-6 MU alfa IFN tedavisi uygulanan hastalarda tedavi sırasında ALT düzeylerinin %45-80 oranında normale dönebileceği ortaya konmuştur. Tedavi gören hastaların bir kısmında tedavi kesildikten sonra nüks görülürken, yaklaşık %30'unda ALT düzeylerinin uzun bir süre normal sınırlarda kaldığı, HCV RNA'sının negatifleştiği ve kontrol gruplarına oranla karaciğer histolojisinde belirgin düzelmelerin olduğu gözlenmiştir. Bu araştırmalar sonucunda IFN tedavisinin başarısında bazı faktörlerin önemli rolleri olabileceği düşünölmüştür. İlk olarak, karaciğer hasarı daha hafif olan hastalarda, ileri derecede karaciğer harabiyeti gelişmiş olan hastalara oranla, tedaviye yanıt alma şansının daha yüksek olduğu görölmüştür. Tedaviye yanıt ile yaş arasında da bir uyum vardır. Zira yaşlı hastaların tedaviye iyi yanıt vermediği gözlenmektedir. Tedavi sonrası gelişen nüks olaylarının azaltılması için IFN dozunun ve uygulama süresinin artırılması gerekliliğinin bildirilmesine rağmen, bu konu üzerindeki çalışmalar henüz kesinlik kazanmamıştır. Tedavi öncesi serum HCV RNA düzeylerinin düşük ya da yüksek olması, HCV genotipi(HCV tip1 infeksiyonlarının IFN'a tip2 ve 3'den daha dirençli olduğu belirtilmektedir.) ve HCV genomunun E2/NS1 bölgesinde HVR deki mutasyonlar IFN tedavisine yanıtı etkileyebilecek diğer faktörler arasında yer almaktadır(22,31,58,72).

GEREÇ VE YÖNTEM

Hasta ve Kontrol Grubu

Şubat 1997 - Ocak 1998 tarihleri arasında Gülhane Askeri Tıp Akademisi ve Askeri Tıp Fakültesi Gastroenteroloji ve İnfeksiyon hastalıkları klinikleri tarafından hepatit C şüphesi ile gönderilen 50 hasta serumu çalışma kapsamına alındı. Hastaların tümünde anti- HCV antikoru pozitif, 41 hastada serum ALT düzeyi yüksekken 9 hastada ise normaldi. Çalışma kapsamına alınan hastaların yaş, cinsiyet durumları, laboratuvar ve histopatolojik bulguları hastaların kendilerine sorularak veya dosyaları incelenerek kaydedildi.

Elli hepatit C hastasının 22'si kadın 28'i erkek olup yaşları 11-66 (ortalama 39.1) arasında değişmekteydi. Hasta grubu dışında GATA bünyesinde kliniklerle doğrudan ilişkisi olmayan ünitelerde çalışan, anti-HCV antikoru negatif, serum transaminaz değerleri normal, yaşları 22 ile 52 (ortalama=43.3) arasında değişen, sağlıklı 13 kadın 27 erkek toplam 40 kişi ise kontrol grubu olarak alındı.

Bireylere ait serum örnekleri dondurup çözme işleminin, sonuçları olumsuz etkilememesi için küçük hacimlere bölünerek PCR analizleri yapılana kadar -20°C de saklandı.

HCV-RNA'nın Saptanması

HCV genomik RNA'nın saptanmasında nested-RT-PCR yöntemi kullanıldı(18). Uyguladığımız yöntemde kullanılan tampon, solusyon ve diğer maddeler aşağıda verilmiştir:

Solusyon D (Denatürasyon solusyonu): 4.2 M guanidine thiocyanate (Serva), 0.75M Na-citrate (pH 7.0 Sigma), 25 mM EDTA (Sigma), %0.5 wt/vol sarkosyl(Sigma), 0.1 M beta-merkaptto etanol(Sigma).

Water saturated phenol, pH4.3 (Sigma)

Chloroform-isoamyl alcohol (49:1) (Sigma)

4M sodium acetate, pH:4 (Sigma)

İsopropylalchole (%99.7) (Merck)

Ethanol (%75)

Diethyl pyrocarbonate (DEPC, Sigma) (Nonspesifik bir RNAse inhibitörüdür). RNA ekstraksiyonu süresince kullanılan bütün solusyonlar %0.1lik DEPC ile muamele edilmiş deionize distile su ile hazırlanıp sterilize edilerek kullanıldı.

RNAse inhibitörü (Sigma)

Reverse transcriptase (M-MuLV RT, Epicentre)

10X RT tamponu (Epicentre)

25mM MgCl₂: 1 M MgCl₂ (Sigma) stok solusyonundan hazırlandı

Deoksinükleosid trifosfat (dNTP) karışımı: Bu karışım 100mM dATP, 100mM dGTP, 100mM dCTP ve 100mM dTTP (Epicentre)'in her birinden 10mM içerecek şekilde hazırlandı.

Taq DNA polimerase (GATA)

10X Taq tamponu: 100mM Tris-HCl(pH8.3), 500mM KCl, %0.8 NP40

Oligonükleotid primerler(18): HCV genomunun 5'NCR de 251bp (baz sayısı) uzunlukta bir bölgeyi hedef alan bir takım dış (209 ve 939) ve bir takım da iç (nested) primer (211 ve 940) liyofilize olarak MWG-Biotech GmbH (Almanya) firmasına sentezletildi. Bu primerlerin dizilimleri Tablo - I ve II'de gösterilmiştir.

Tablo- I. Çalışmada kullanılan oligonukleotid primer dizilimleri (Nested)

İsmi	Bölge	5' baz	Pol.*	5'.....3' dizilimi
209	NCR	8	-	ATA CTC GAG GTG CAC GGT CTA CGA GAC CT
211	NCR	-29	-	CAC TCT CGA GCA CCC TAT CAG GCA GT
939	NCR	-297	+	CTG TGA GGA ACT ACT GTC TT
940	NCR	-279	+	TTC ACG CAG AAA GCG TCT AG

* Polarite: Primer dizilimlerinin oryantasyonu (- antisens + sens)

Tablo- II. Çalışmada kullanılan oligonukleotid primer dizilimleri (Non-nested)

İsmi	Bölge	5' baz	Pol.	5'.....3' dizilimi
AK-1	NCR	-17	-	GCACTCGCAAGCACCCCTATC
AK-2	NCR	-284	+	CTGTCTTCACGCAGAAAGCG

Primerler 100 pmol/μl olacak şekilde sulandırılıp küçük porsiyonlar halinde -20° C de kullanılıncaya kadar saklandı.

- *Jel-yükleme tamponu*: 6X (%0.25 bromophenol blue(Bio-Rad), %0.25 xylene cyanole FF(Bio-Rad) , %40 sucrose(Sigma)).

RT PCR Çalışma Protokolu

RNA'nın Saflaştırılması (18):

Acide-guanidinium-phenol-chloroform yöntemi ile RNA saflaştırma işlemi (Nested ve non-nested için) Chomyszynski ve Sacchi (18)'ye göre yapıldı:

Her çalışmada daha önce PCR ile RNA pozitifliği ve negatifliği bilinen kontrol serum örnekleri çalışmaya dahil edildi.

Örnek hazırlama odasında;

1. 100 µl hasta serumu + 500 µl sol.D + 50 µl sod. Acet. + 500µl phenol + 100 µl chloroform-isoamyl alcohole (49:1) 1.5 ml lik steril bir ependorf tüpü içerisine konarak, vortekslendi ve 15 dakika buz üzerinde bekletildi.

2. +4 °Cde 10 000 g de 20 dakika santrifüj edildi. Bu aşamada RNA' ların üst fazda, DNA ve proteinlerin ise fenol ve ara fazda yer almaları sağlanmış oldu.

3. Üst (berrak) faz dikkatlice yeni bir ependorf tüpe alınıp, üzerine eşit miktarda isopropilalcohole ilave edilip vortekslendi.

4. Tekrar +4 °C de 10 000 g de 20 dakika santrifüj edilerek RNA'nın çökmesi sağlandı.

5. Çökelti üzerine %75'lik ethanole'den 500 µl ilave edilip hafifçe vortekslendi.

6. Tekrar 10 000 g de 20 dakika santrifüj edildi. RNA' lar tekrar çöktürülerek, üst faz atılıp dipteki çökelti 10 - 15 dakika havada kurutuldu.

Bu safhaya kadar RNA'lar ortamdaki guanidinium isothiocyanate nedeniyle ribonükleazlardan korunmaktaydı. Bundan sonra RNA' lar artık korunmasız olduğu

için bu aşamadan sonra ribonükleaz kontaminasyonundan sakınılması için gerekli özen gösterildi.

7. Çökelti 20-25 µl steril suda 10-15 dakika 37°C' de bekletilerek çözüldü.

8. Bu aşamadan sonra RNA'lar cDNA sentezi için hazır hale gelmiş oldu. Hemen çalışılmayacak olan örnekler -80° C de kullanılıncaya kadar saklandı.

cDNA Sentezi:

HCV'nin bir RNA virusu olması nedeniyle PCR öncesi hazırlanan RNA suspansiyonundan RT yardımı ile cDNA sentezletilmesi işlemine geçildi. Bu nedenle her örnek için :

0.5 µl primer (209, antisens)

14.5 µl ekstrakte edilen RNA

karişımı 65° C' de 5 dakika tutularak sonra +4° C' de üzerine;

1 µl dNTP karişımı (10 mM) (Epicentre)

2 µl 10X RT tamponu (Epicentre)

2 µl DTT (Epicentre)

0.1µl (5 Ü) RT (MuMLV, Epicentre)

hazırlanan bu karişımdan her örneğin üzerine 5 µl ilave edilip toplam 20 µl'lik karişım önce 37° C de 60 dakika, sonra 95° C de 5 dakika tutularak PCR öncesi cDNA sentezi gerçekleştirildi.

Her cDNA sentez çalışmasına, daha önceki çalışmalarda RNA pozitifliği bilinen bir pozitif kontrol, DEPC'li su ise negatif kontrol olarak ilave edildi. Kalan RNA örneği -80° C' de saklandı.

PCR

HCV enfeksiyonlu hastaların serumlarına hem "non-nested-PCR" yöntemi (tek primer çifti ile tek tur PCR), hemde HCV ye ait partikül sayısının az olması nedeniyle duyarlılığı artırmak için "nested- PCR" yöntemi kullanıldı, yani HCV ye özgül farklı iki ayrı primer çifti kullanılarak üstüste iki ayrı tur PCR yapıldı.

Birinci Tur PCR (tek örnek için 50µl hacimde yapıldı).

dNTP karışımı(10mM)	1 µl
10X Tq buffer	5µl
MgCl ₂ (25mM)	5 µl
P(209, antisens)	0.5 µl
P(939, sens)	1 µl
Tq DNA pol.	2 µl
cDNA	5 µl
Deiyonize su	30.5 µ

DNA amplifikasyonu (PCR) için, ependorflardaki toplam 50 µl olan final karışım thermo cycler (Thecne, cyclogene)'e konularak aşağıdaki ısı programı uygulandı:

	Denaturation	Annealing	Extention
Siklus 1	94°C 5 dk		
Siklus 2-34	94°C 40 saniye	48°C 40 sn	72°C 1: 30 dk
Siklus 35			72°C 10 dk

Bu şekilde toplam 35 siklus uygulanarak birinci tur PCR tamamlanmış oldu. Buraya kadar olan işlemlerle "non-nested" yöntemi de tamamlanmış oldu.

Her birinci tur PCR çalışmasında daha önceki çalışmalarda pozitifliği bilinen bir cDNA örneği pozitif kontrol olarak ve negatif kontrol olarak da DEPC'li su ilave edildi. Kalan cDNA örneği -80° C' de saklandı.

İkinci Tur PCR (tek örnek için 50 µl hacimde yapıldı).

dNTP karışımı(10mM)	1µl
10X Tq buffer	5µl
MgCl ₂ (25mM)	5 µl
P(211, antisens)	1 µl
P(940, sens)	1 µl
Tq DNA pol.	2 µl
1.tur PCR ürünü	5 µl
Deiyonize su	30 µl

İkinci tur DNA amplifikasyonu (PCR) için, ependorflardaki toplam 50 µl olan final karışım thermo cyclers'e konularak aşağıdaki ısı programı uygulandı:

	Denaturation	Annealing	Extention
Siklus 1	94°C 2 dk		
Siklus 2-34	94° C 40 saniye	48°C 40 sn	72°C 1:30 dk
Siklus 35			72°C 10 dk

Bu şekilde toplam 35 siklus uygulanarak ikinci tur PCR tamamlanmış oldu. Her iki tur PCR çalışmasında da daha önceki çalışmalarda pozitifliği bilinen bir PCR örneği, pozitif kontrol olarak ve negatif kontrol olarak da DEPC'li su ilave edildi. Kalan birinci tur örneği -80 °C de saklandı.

PCR Ürünlerinin Analizi

Bu işlem agaroz jel elektroforezi yöntemi ile gerçekleştirildi . Bunun için %2'lik agaroz jel (Sigma) 0.5xTBE ile hazırlandı. Horizontal mini jel elektroforez (Bio-Rad) tankına yerleştirildi. Örnekler, kendi hazırladığımız yükleme tamponu (loading) ile 1/6 oranında sulandırılarak agaroz jeldeki kuyucuklara molekül ağırlığı standardı ile birlikte kondu(Molekül ağırlığı standardı olarak ϕ x 174 fajının Hae III restriksiyon enzimi ile kesilmiş parçaları kullanıldı). Elektroforez işlemi 80V sabit akım altında 45 dakikalık bir süre boyunca uygulandı. Daha sonra jel 0.5 μ g/ml ethidium bromide(Sigma) içeren distile su içinde 20 dakika boyandıktan sonra boyanın atılması (destain) amacıyla 1mM MgSO₄(Sigma) 'lı distile suda 10-15 dakika tutuldu. Tüm işlemleri tamamlanan jel, 251 baz çiftlik bölgeye karşılık gelen bandın 312 nm dalga boyuna sahip UV transilluminator (Bio-Rad) altında aranması ile analiz edildi.

Çalışmamızda kontaminasyon riskini azaltmak için önerilen kurallara titizlikle uyuldu. Her çalışmada test edilecek örneklerin yanında ve testin her aşamasında mutlaka bilinen pozitif ve negatif serum örnekleri de çalışmaya dahil edildi. Örnekler en az iki defa test edildi. İki çalışmada pozitif olarak bulunan örnekler pozitif olarak değerlendirildi.

Her iki yöntem arasında, sonuçlar açısından fark olup olmadığı "bağımlı gruplarda ki-kare testi" ile karşılaştırıldı. Ayrıca "Nested-PCR" in altın standart olarak kabul edildiği durumlarda " non-nested " in spesifite,sensitivite, pozitif ve negatif prediktif değerleri ayrı ayrı hesaplandı.

BULGULAR

Bu çalışmada hepatit C dışında kalan kronik karaciğer hastalığı nedenlerinin ekarte edildiği ve ELISA testi ile anti HCV antikorları pozitif 50 hasta serumunda RT-PCR yöntemi ile HCV-RNA'sının varlığı iki değişik yöntemle (Nested ve non-nested) araştırılarak sonuçları karşılaştırıldı.(Tablo-III)

HCV RNA varlığını araştırmak amacıyla uygulanan nested-RT-PCR yöntemiyle 50 hastanın 31 (%62)'inin serum örneklerinde HCV RNA'sı pozitif bulunurken, aynı 50 hastanın non-nested-RT-PCR yöntemiyle 25(%50)'i pozitif. Kontrol grubunu oluşturan 40 sağlıklı bireyin hiçbirisinin serum örneğinde her iki PCR yöntemi ile HCV RNA pozitifliği gösterilemedi. Çalışma grubuna ait bulgular tablo-IV de özetlenmiştir.

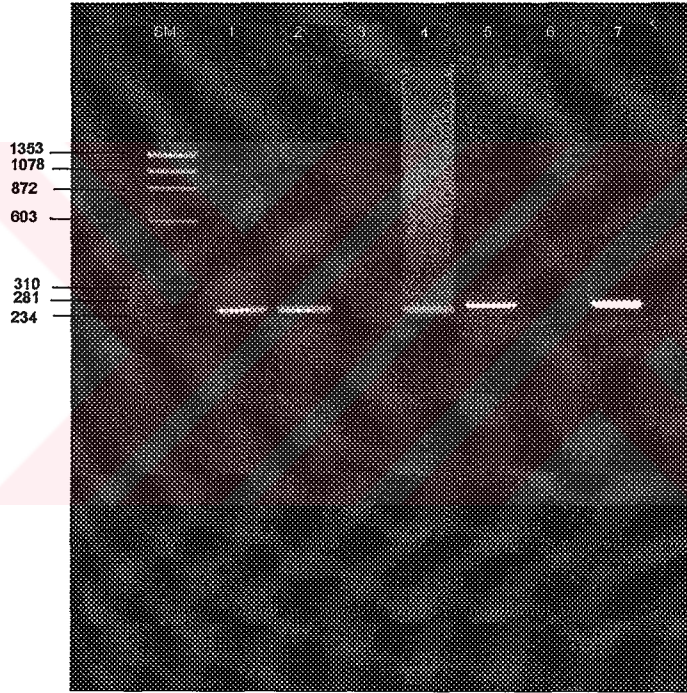
Tablo-IV Çalışma grubunu oluşturan hastalarda Nested ve non-nested yöntemlerin HCV-RNA pozitifliği açısından karşılaştırılması.

	NESTED	NON-NESTED	Toplam
HCV-RNA (+)	31(%62)	25(%50)	56
HCV-RNA (-)	19(%38)	25(%50)	44
Toplam	50	50	100

HCV-RNA sonuçları açısından iki yöntem arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı.(bağımlı grupta ki-kare testi, $\chi^2=3.6$, $p<0.05$)

Nested-RT-PCR yöntemi altın standart olarak alındığında non-nested RT-PCR yönteminin duyarlılığı %74, özgüllüğü %90 olarak bulundu. Ayrıca non-nested PCR in PPV (Positive productivity value) değeri %92 ,NPV (Negative productivity value) değeri ise %68 olarak hesaplandı. İki yöntem arasındaki uyumluluk oranı ise %80 idi.

HCV RNA'sı genomun 5'non coding bölgesi hedef alınarak kullanılan primer dizileri ile elde edilen tek basamaklı (non-nested) ve iki basamaklı (nested) RT-PCR arasındaki amplifikasyon ürünleri agaroz jel elektroforezinde ethidium bromidle boyanarak gösterilmiştir(Şekil 1).



Şekil-1 RT PCR amplifikasyon ürünleri agaroz jel elektroforezinde görünümü.
SM: Size Marker, 1-4: nested-PCR, 5-7: non-nested-PCR.

Tablo-III : Nested ve non-nested PCR ile HCV-RNA test sonuçları.

Sıra No	Prot. No	Yaş/ Cisiyet	PCR		Sıra No	Prot. No	Yaş/ Cisiyet	PCR	
			Nested	Non-nested				Nested	Non-nested
1	7	29/E	+	+	26	36	27/K	-	-
2	9	41/E	-	-	27	35	22/K	+	+
3	10	26/E	+	+	28	24	23/E	+	-
4	6	48/E	+	-	29	37	37/E	+	+
5	11	30/E	-	+	30	17	22/E	+	-
6	15	34/E	+	-	31	38	25/E	+	+
7	13	29/E	+	+	32	48	52/K	-	-
8	12	39/E	-	-	33	39	31/E	+	+
9	14	33/E	+	+	34	49	26/K	-	-
10	16	43/E	+	-	35	40	35/K	+	+
11	21	40/E	+	+	36	51	66/K	-	-
12	19	11/K	-	-	37	41	40/E	+	+
13	25	45/K	+	+	38	52	28/K	-	-
14	22	40/E	-	-	39	53	41/K	-	-
15	26	32/K	+	+	40	50	35/K	-	-
16	23	21/E	+	-	41	42	46/E	+	+
17	29	45/E	-	+	42	43	24/E	+	+
18	28	36/K	+	-	43	54	43/K	-	-
19	31	28/K	+	+	44	44	29/E	+	+
20	32	24/E	+	-	45	45	21/E	+	+
21	30	58/E	+	+	46	58	28/E	-	-
22	33	41/K	-	-	47	60	41/K	-	-
23	27	36/K	+	+	48	61	37/E	-	-
24	8	33/K	-	-	49	46	46/K	+	+
25	34	29/K	+	+	50	47	30/K	+	+

TARTIŞMA ve SONUÇ

HCV'nin 1989 yılında Choo ve arkadaşları(19,55) tarafından klonlanmasından sonra, HCV infeksiyonları gerek viral hepatit şüpheli hastalarda, gerekse risk gruplarında, kan donörlerinde, geliştirilen çeşitli yöntemlerle araştırılmıştır. Bu araştırmalarda farklı yöntemler kullanılmış olup farklı sonuçlar elde edilmiştir. Ancak hepsinde de ortaya çıkan ortak sonuç, HCV infeksiyonlarının bütün dünyada yaygın olduğu ve HCV'nin kronik taşıyıcılığına neden olmanın yanısıra, kronik karaciğer hastalıklarının etiolojisinde de önemli rol oynadığıdır(24-34).

HCV infeksiyonlarının önemi, infeksiyonun yüksek oranlarda kronikleşmesi, kronik infeksiyonların yaklaşık %20-30'nun zamanla siroz ve bunun bir ileri aşaması olan karaciğer yetmezliği ya da HSK gibi önemli komplikasyonlara neden olmasından kaynaklanmaktadır(24,34). Ancak HCV kronik karaciğer hastalıklarının tek nedeni olmayıp HCV dışında, başka viral, toksik ve metabolik nedenlerle de kronik karaciğer hastalığı gelişebilmektedir. HCV'ye bağlı olarak kronik karaciğer hastalığının tanısında klinik bulgulara ek olarak, serum ALT düzeylerinin 6 ay ve daha fazla bir süre yüksek seyretmesi, histopatolojik olarak kronikleşme bulgularının kriter olarak alınması yanıltıcı olabilmektedir. Zira HCV infeksiyonlarının kliniği diğer viral kaynaklı hepatitlerin kliniğinden pek farklı olmadığı gibi, biyokimyasal bulgular da farklı nedenlerle meydana gelen kronik karaciğer hastalıklarında aynıdır. Kaldı ki HCV infeksiyonlarında serum ALT düzeylerinin infeksiyonun seyrine bağlı özellikler nedeniyle zaman zaman normal düzeylere indiği bilinmektedir(46). Histopatolojik olarak da kronik HCV hepatitini diğer hepatitlerden ayırt etmek oldukça zor ya da imkansızdır(54-88). Günümüzde kronik HCV infeksiyonlarının tedavisinde kısıtlı oranda IFN ile tedavi olanağı bulunmaktadır(31,59,72). İşte bu nedenlerden dolayı, kronik karaciğer hastalıklarında etkenin güvenilir yöntemlerle tanımlanması, hastalığın seyrinin izlenmesi açısından olduğu kadar, uygulanan tedavinin etkinliğinin takibi açısından da zorunludur.

HCV infeksiyonlarının kesin tanısı, serolojik olarak ticari ELISA testleri ile anti-HCV antikorlarının saptanması, ya da moleküler yöntemlerle HCV RNA'sının gösterilmesi ile yapılmaktadır.

Bu çalışmada, kronik karaciğer hastalığı yönünden takip edilen ve ELISA II ile anti-HCV antikorları pozitif bulunan hasta serumlarında, son yıllarda geliştirilen moleküler tekniklerden RT-PCR ile HCV RNA'sının varlığı iki değişik yöntemle araştırılarak en uygun yöntemin rutinde kullanılması amaçlanmıştır.

Anti-HCV antikor testleri, ilk olarak viral genomun NS4 bölgesine ait rekombinant antijenlerle (C-100-3) hazırlanan ELISA testleridir (19,55). Birinci kuşak ELISA testleri adı da verilen bu testlerin yetersiz duyarlılık ve özgüllükte olması, ayrıca düşük risk gruplarında yanlış sonuçlar vermesi, virüsün biyolojisi üzerinde daha ileri çalışma gereksinimlerini ortaya koymuştur(1,5). Yapılan çalışmalarda anti-HCV antikorlarının saptanmasını etkileyen en önemli faktörlerin HCV'nin nükleik asit dizilimindeki varyasyonlardan ileri geldiği görülmüş ve bu nedenle varyasyonların az olduğu ve daha özgül bölgeleri ihtiva eden, HCV infeksiyonlarının teşhisinde özgül olabilecek bir grup protein kombinasyonu kullanılarak, II. ve III. kuşak ELISA testleri geliştirilmiştir. Bu kuşak ELISA testlerinde varyasyonların daha az görüldüğü, yapısal olmayan (NS3, c33-c) bölge proteinlerine ilaveten nisbeten stabil bir bölge olan yapısal (Core, c22-3) bölgelerine ait rekombinant proteinler ilave edilerek duyarlılık ve özgüllük artırılmıştır (5,46,80,90). Bu şekilde HCV antijenlerinin kombine olarak kullanımı ile yüksek risk gruplarında %10-30 oranında daha fazla vak'a teşhis edilebilmiştir. Bugün II. ve III. kuşak ELISA testleri, gerek HCV infeksiyonlarının tanımlanmasında, gerekse kan donörleri taramalarında rutin olarak kullanılmaktadır.

HCV infeksiyonlarının tanısında antikor belirleme yöntemleri önemli tanı yöntemleridir. Kan donörlerinin taranması ve rutin taramalar gibi geniş topluluklara kolaylıkla uygulanabilmesi ve çabuk sonuç vermesi bu testlerin avantajlarını oluşturmaktadır. Ayrıca antikor pozitifliği klinik bulgular ve enzim yüksekliği ile

birlikte HCV RNA pozitifliğinin bir göstergesi olarak düşünülebilir. Antikor yanıtı hem tamamen iyileşen hem de kronikleşen hastalarda olduğundan, anti-HCV antikor testlerinin geçirilmiş bir infeksiyonla aktif bir infeksiyonu birbirinden ayırt edememesi gibi bir dezavantajı vardır. Zira anti-HCV antikorları sıklıkla viremi ile birlikte saptanabilmektedir. Diğer taraftan duyarlılık ve özgüllüğü artırılmış serolojik testler geliştirilmişse de, halen yalancı pozitiflik sorunu düşük oranda da olsa devam etmektedir. Henüz HCV infeksiyonlarının tanımlanmasında %100 güvenilir serolojik yöntemler mevcut değildir. Ayrıca, bazı olgularda(özellikle immünosupresif bireylerde) ise antikor yanıtı oluşmamaktadır (46,51,94). Bu nedenle HCV infeksiyonlarının tanımlanmasında vireminin belirlenmesi önem kazanmaktadır. Vireminin belirlenmesi, serolojik testlerin değerlendirilmesi yanında, uygulanacak antiviral tedavinin etkinliğinin izlenmesi açısından da önem taşımaktadır.

HCV'nin invitro şartlarda üretilebileceği bir hücre kültür sisteminin olmaması, viral antijenlerin mevcut immünolojik yöntemlerle gösterilememesi gibi nedenlerle, vireminin varlığı ancak, alternatif bir yöntem olan nükleik asit amplifikasyon teknikleri kullanılarak serum ya da plazmada HCV RNA'sının saptanması ile ortaya konabilmektedir. Kronik karaciğer hastalarında HCV RNA'sının serum ya da plazmada gösterilmesi, anti-HCV antikor pozitif olgularda aktif bir infeksiyonun tanımlanmasının yanı sıra, HCV antikor cevabı olmayan seronegatif hastaların belirlenmesinde de büyük önem taşımaktadır (94,51). Ayrıca HCV RNA tayini ALT yüksekliğine neden olabilecek diğer karaciğer patolojilerinin ekarte edilerek gereksiz ilaç kullanımının ve ekonomik kayıpların da önlenmesi açısından önem taşıyan bir tanı yöntemidir.

HCV RNA'sının RT PCR ile gösterilmesi HCV, infeksiyonlarının tanısında güvenilir ve yaygın olarak kullanılan bir nükleik asit amplifikasyon yöntemidir. HCV RNA'sının RT-PCR ile saptanması ilk defa Weiner ve ark.(94) tarafından uygulanmıştır. HCV infeksiyonlarında, genellikle çok düşük düzeyde seyreden viremi(10^2 - 10^4 genom/ml) nedeniyle, testin duyarlılığını artırmak amacıyla, bu

teknikinin modifiye şekli olan iki aşamalı bir PCR, "nested RT-PCR" Garson ve ark. (32,33) tarafından tarif edilmiştir.

Weiner ve ark.(94), kronik karaciğer hastalığı olan anti-HCV antikoru pozitif 9 hastadan 7'sinin serumlarında HCV RNA pozitifliği saptamış ve anti-HCV antikoru pozitifliği ile HCV RNA pozitifliği arasında yüksek bir uyumun varlığına dikkati çekmiştir. Bresters ve ark.(12), 22 NANB'li kronik karaciğer hastasının 13'ünde anti-HCV pozitifliği ile birlikte HCV RNA'sını belirlemiş, bir hastada anti-HCV antikoru pozitif, HCV RNA'sını negatif bulmuştur. HCV RNA negatifliğini RNA'nın saptanabilirlik düzeyinin altında olmasından ya da geçirilmiş bir enfeksiyondan kaynaklanabileceğini vurgulamıştır. Kato ve ark.(51), 30 NANB'li kronik karaciğer hastasının 16'sında anti-HCV antikoru pozitif ve bu hastaların 13'ünde (%81) HCV RNA'sını pozitif bulmuştur. Geri kalan 14 anti-HCV antikoru negatif hastanın 7'sinde(%50) HCV RNA'sını pozitif bulmuştur. Araştırmacılar,HCV RNA pozitif, anti-HCV antikoru negatif olan bu viremik hastalarda, viral genomun yapısal olmayan proteinlerine karşı yeteri kadar antikor yanıtının oluşturulmadığını ileri sürmüşlerdir. Yapılan diğer çalışmalarda, anti-HCV antikoru pozitif kronik karaciğer hastalarının serum ve karaciğer dokularında Margin ve ark(59) %94, Pozzato ve ark (71) %86. Takehare ve ark (79) %100, Tsutsumi ve ark(9) %100, Bukh ve ark(28) %100, Finkelstein ve ark(30)%64, Kiyosawa ve ark(53) %98 oranında HCV RNA pozitifliği bulmuşlardır. Anti-HCV antikoru negatif kronik karaciğer hastalarında ise Kato ve ark(51) %50 oranında HCV RNA pozitifliği bulmuşlardır.

Ülkemizde bu konuda yapılan çalışmalarda anti-HCV antikoru pozitif kronik karaciğer hastalarında HCV RNA pozitifliği, Badur'un çalışmasında (9) %100, Erensoy ve ark.(28)%89, olarak bulunurken, anti-HCV antikoru negatif kronik karaciğer hastalığı olgularının %3.6'sında HCV RNA pozitifliği belirlenmiştir(28).

Bizim çalışmamızda anti- HCV 'si pozitif toplam 50 hastanın %62 (31/50)' sinde nested RT PCR ile HCV RNA pozitif bulunurken, bu oran non-nested yöntem ile %50 (25/50) bulunmuştur.Kontrol grubunu oluşturan anti-HCV 'leri negatif

sağlıklı 40 bireyde ise HCV RNA pozitifliği saptanmamıştır. Bizim her iki yöntemle elde ettiğimiz HCV RNA pozitiflik oranlarını ayrı ayrı diğer çalışmalarda belirtilen sonuçlarla karşılaştırdığımızda biraz daha düşük olduğunu görüyoruz. Bu oranı etkileyen faktörler değişik araştırmalarda da belirtildiği gibi şunlar olabilir :

1. HCV infeksiyonlarında klinik tablonun gidişine göre viral RNA'nın saptanmasında farklılıklar görülebilir. Zira serolojik markırlar senelerce devam ederken HCV'nin kronik infeksiyonlarında viral RNA genellikle saptanabilirse de, zaman zaman vireminin geçici olabilmesi nedeniyle saptanabilirlik düzeyinin altına düşebilmektedir. Bu nedenle HCV RNA'sının saptanmasında örnek alınmasında zamanlamanın önemi büyüktür.

2. Çalışmamızda bu oranı etkileyen ve diğer çalışmalardan farklı en önemli faktörlerden birisi anti-HCV antikor pozitif HCV RNA'sı negatif hastaların 9'unun IFN tedavisi altında olması olabilir. IFN tedavisinin hastaların %60'dan fazlasında geçici de olsa HCV RNA negatifliğine neden olduğu bilinmektedir.

3. Mevcut anti-HCV antikor pozitifliği geçirilmiş bir HCV infeksiyonuna ait olabilir. Anti-HCV antikor pozitif, ancak HCV RNA'ları negatif bu hastaların serum ALT değerlerinin %50'sinin normal değerlerde, %50'sinin ise normalin bir katı kadar yüksek olduğu görülmektedir. Bu da bu hastalarda muhtemel bir viral replikasyonun olmadığını düşündürmektedir. Ayrıca bu hastaların kronik hepatiti başka nedenlere bağlı olabilir ve mevcut antikorların bir kısmı yalancı pozitiflik nedeniyle tesbit edilmiş olabilir. Serolojik olarak HCV infeksiyonlarının tanısında, duyarlılık ve özgüllüğü artırılmış antikor testleri geliştirilmişse de halen yalancı pozitiflik sorunu düşük oranda da olsa devam etmektedir.

4. RNA'nın tesbit edilemeyecek kadar düşük düzeyde bulunması ve RNA ekstraksiyonu esnasında RNA harabiyetine bağlı olarak meydana gelen RNA kaybı nedeniyle yalancı negatiflik olabilir. Yapılan çalışmalarda RT PCR ile tanı konulabilmesi için serumun ml.sinde $\geq 10^2$ ve daha fazla miktarda viral genom

bulunması gerekmekte, ya da fazla miktarda örneğin işleme alınması önerilmektedir.

5. HCV genomundaki varyasyonlar ve belirlenecek hedef bölgelere uygun primerlerin kullanılmamış olmaları da sonuçlarımızı etkileyebilecek faktörler arasında yer alabilir. Ancak, bizim bu araştırmada çoğu araştırmacının önerdiği şekilde, HCV genomunun en iyi korunan ve yüksek oranda dizilim benzerliklerine sahip, polimorfizimden etkilenmeyen bölge olarak bilinen 5'NCR'a ait primer dizilerini kullanmış olmamız, seropozitif şahıslarda görülen HCV RNA negatifliğinin ve primer hedef arasındaki uyumsuzluktan kaynaklanma olasılığını zayıflatmaktadır. Bugün HCV RNA'sının belirlenmesinde viral genomun farklı bölgelerine uygun olabilecek çok sayıda primer setleri tarif edilmiştir. Ancak, çoğu araştırmacı HCV'ye ait genetik varyasyonların sıklığı ve çeşitli özelliklerinden dolayı genetik varyasyonların daha az görüldüğü ve farklı HCV suşları arasında benzerliklerin en fazla(%95-97) olduğu iyi korunmuş 5'NCR'i tercih etmişlerdir (36,95).

Ayrıca yapılan çalışmalarda, temel prensibi aynı olan fakat farklı PCR protokolleri ve farklı primerlerin kullanılmış olması, sonuçların tam olarak birbirleri ile kıyaslanmasını zorlaştırmaktadır.

Bugün HCV enfeksiyonlarının laboratuvar tanısında PCR, doğrulama testi olarak kullanılmaktadır. Genelde test duyarlılığını artırmak amacıyla bir çok merkez, DNA miktarının büyük oranda artırıldığı ilk tur amplifikasyondan sonra ürünlerin ikinci turda oligonucleotide primerler ile PCR'a maruz bırakıldığı nested (tekrarlı) PCR yaklaşımını kullanmaktadırlar(32). Nested PCR'ın sakıncalı bir yönü, ikinci tur PCR'ın ilk tur PCR amplifikasyon ürünlerinin varlığında yapılmasıdır ki bu testin ürün DNA tarafından kontamine edilme riskini artırır. Ayrıca 10-13 saatlik bir çalışma süresi gerektirmesi de diğer bir dezavantajdır. Nested-PCR'a alternatif bir yaklaşım olarak test ettiğimiz tek basamaklı (non-nested)-PCR ise kontaminasyona daha az meyillidir ve daha kısa sürede sonuçlanmaktadır (5-8 saat).

Test duyarlılığı açısından, HCV-RNA'nın PCR ile klinik uygulamasında nested' in gerekli olduğu öne sürülmüştür(41). Nested 'in altın standart olarak alındığı çalışmamızda non-nested yöntemin duyarlılığı %74 bulunmuştur.Bu nedenle,nested PCR'ın non-nested-PCR'dan daha duyarlı olduğunu söyleyebiliriz.Duyarlılığa ek olarak,klinik teşhis laboratuvarında PCR ile ilgili en önemli kriter doğruluktur. Özgüllüğünü %90 olarak bulduğumuz non-nested'in bu oranı nested'a yakındır.Aynı klinik örnekler kullandığımız bu iki yöntemde, uyum oranı ise %80 olarak bulunmuştur.

Gretch ve arkadaşları (41), hepatit C virüs RNA'sının tespitinde tek basamaklı PCR ile Nested PCR karşılaştırmışlar ve iki yöntem arasında %100 uyum gözlemlemişlerdir.Bizim çalışmamıza çok benzeyen bu araştırmanın farkı; tek basamaklı PCR'ın ardından oligonükleotid prob ile sıvı hibridizasyona dayanan yeni bir tekniği kullanmalarındadır.

Viral RNA'nın RT PCR ile saptanması, HCV infeksiyonlarında etkenin belirlenmesi yanında tedavi sonuçlarının değerlendirilmesi ve hastanın izlenmesi gibi hususlarda da geniş uygulama alanı bulmaktadır. Bununla birlikte bu yöntem rutin laboratuvarlarda kullanılırken bazı konulara dikkat edilmesi gereği vardır. PCR son derece duyarlı bir metod olduğu için örneklerin kontaminasyondan korunması gereklidir. PCR ile mikroorganizmaların kendileri değil, nükleik asitlerinin çok küçük miktarları saptandığından, PCR ile tesbit edilen RNA dizilerinin infeksiyöz virusa mı, yoksa nötralize veya defektif virusa mı ait olduğunun bilinmesi mümkün olmamaktadır. Yine de HCV RNA pozitifliği aktif bir viral replikasyonun varlığının belirtisi olabileceğinden HCV RNA pozitif hastalar potansiyel olarak aktif infeksiyonlu kabul edilmelidir.

HCV RNA'sının belirlenmesinde PCR'in avantajlarının yanısıra, yeterli altyapı donanımının gerekliliği, iş gücü yoğunluğu, yalancı pozitiflik ve yalancı negatiflik gibi sonuçlar ile farklı primerlerle farklı sonuçların alınması, standardizasyon güçlüğü ve kantitatif ölçüm belirleyememe gibi dezavantajları da vurgulanmaktadır.

Bu yöntemin yaygın olarak kullanılması için, gelecekte bu yöntemde gerçekleştirilen tüm prosedürlerin standart olarak uygulanabilmesi ve kontaminasyon riskinin ortadan kaldırılması gereklidir. Bu gerçekleşene kadar, RT PCR kullanan her laboratuvar pozitif ve negatif kontrol numuneleri kullanarak kendi kalite kontrollerini yapma zorunluluğundadır.

Bu çalışma ve bu konuda yapılan diğer çalışmalar, herhangi bir etyolojik ajanın saptanamadığı kronik karaciğer hastalıklarının oluşmasında, HCV'nin önemli rolü olduğunu vurgulamaktadır. HCV infeksiyonlarında PCR'ın en büyük yararının anti-HCV pozitif olgularda, viral replikasyonun olup olmadığının gösterilmesidir. İki aşamalı PCR kullanımı, aşırı duyarlılığı ve kontaminasyon riskini de beraberinde getirmekte olup; aerosol tipi amplikon yayılımının söz konusu olduğu uzun ve zahmetli yöntemdir. Biz bu çalışmada daha kısa ve pratik olarak uygulanan ayrıca kontaminasyondan hayli uzak olan non-nested yöntemin duyarlılığını nested'a göre düşük bulduk (%74). Bu oran düşüklüğünde kuşkusuz nested PCR yönteminin altın standart olarak kabul edilmesi önemli bir unsurdur. Ancak bizim nested PCR ı altın standart olarak kabul etmemizin temel nedeni bu yöntemin altın standart olarak önerilmesi (41) ve bizim çalıştığımız hasta grubunda klinik + enzim değerleri ile uyumlu olmasıdır. Bu haliyle non-nested yöntemin rutinde kullanılmasının hatalı olacağı ancak Southern veya radyoaktif oligonukleotid problemlarla sıvı hibridizasyon gibi ilave tekniklerle duyarlılığın artırılacağı kanaatindeyiz.

HCV-PCR teknolojisi pahalı ve standardize edilmemiş bir yöntemdir. Bugün için standardize edildiği savunulan ticari kitlerle yapılan çalışmaların bile bazen sorun yarattığının gözlenmesi; ayrıca bu kitlerin aşırı pahalı ürünler olması (hasta başı 100 dolar), kısıtlayıcı faktörler olarak karşımıza çıkmaktadır. Bugün bir çok laboratuvar kendi hazırladıkları reaktifler ve geliştirdikleri protokoller ile çalışmakta olup, çelişkili sonuçlar hiç de azımsanmıyacak oranlardadır. Uygulaması basit ancak bulguların değerlendirilmesi önemli ölçüde bilgi birikimi ve deneyim gerektiren bu yöntemin ülkemiz koşullarında her sağlık kuruluşunda gerçekleştirilmeye çalışılması, hem güç, hem pahalı, hemde yararsız bir seçim olacaktır. Bu

nedenlerden dolayı, rutin uygulamalarda olmasa bile, özellikle şüpheli, serokonversiyon gelişmeyen vakaların aydınlatılması veya IFN tedavisi uygulanacak hastalarda tedavinin etkinliğinin izlenmesi açısından, tercih edilecek yöntem olması gerektiği kanaatindeyiz.



ÖZET

Bu çalışmada Şubat 1997- Ocak 1998 yılları arasında Gülhane Askeri Tıp Akademisi ve Askeri Tıp Fakültesi Gastroenteroloji ve İnfeksiyon Hastalıkları klinikleri tarafından HCV hepatiti şüphesi ile gönderilen 50 hasta serumunda HCV-RNA'sı iki farklı RT-PCR yöntemiyle araştırıldı. Olguların tamamı Hepatit B virüs markırları dahil diğer viral nedenlerle, toksik ,metabolik ya da otoimmün etyolojinin ekarte edildiği olgulardı. Yaş ortalaması 39 (11-66) olan hastaların 22'si kadın , 28'i erkekti ve tümünde anti-HCV antikorları pozitifti.

HCV-RNA varlığını araştırmak amacıyla uygulanan nested-RT-PCR yöntemiyle 50 hastanın 31 (%62)'inin serum örneğinde HCV-RNA'sı pozitif bulunurken, bu oran non-nested-RT-PCR yöntemiyle 25 (%50) olarak bulunmuştur. Kontrol grubunu oluşturan 40 sağlıklı bireyin hiçbirisinde her iki PCR yöntemiyle HCV-RNA pozitifliği gösterilemedi.

Nested'a göre daha ucuza mal olan ve daha pratik olarak uygulanan, ayrıca kontaminasyondan hayli uzak olan non-nested yöntemin duyarlılığını daha düşük bulduk (%74). Duyarlılığın düşük olması nedeniyle non-nested yöntemin rutinde tek başına kullanılmasının yeterli olmayacağı, ancak Southern veya radyoaktif oligonukleotid problarla sıvı hibridizasyon gibi ilave tekniklerle duyarlılığın artırılabilceği sonucuna varıldı.

SUMMARY

In the period between February 1997 and January 1998, HCV-RNA was investigated in sera of fifty patients, from those examined and suspected to have hepatitis due to HCV in Gastroenterology and Infections Diseases Clinics at Gülhane Military Medical Academy and School of medicine, using two different RT-PCR methods. In all of the patients, the other possible aetiologies including HBV and other viral agents, toxic, metabolic or otoimmun pathologies were excluded. Anti-HCV antibodies were found to be positive in sera of all patients. The mean age of the patients was 39 (11-66) years and 28 out of 50 patients was male.

By using nested-RT-PCR and non-nested-RT-PCR methods, HCV-RNA was found to be positive in 31 (62%) and in 25 (50%) out of 50 patients, respectively. In control group, HCV-RNA was found to be negative in sera of fourty (all) healthy individuals by both PCR methods.

Although the non-nested-RT-PCR method was cheaper, more practical and has low contamination rate than nested method, we found its sensitivity relatively low (74%). Due to this low sensitivity rate, it was concluded that the routine use of non-nested-RT-PCR alone was not suitable. By additional methods such as Southern blot or liquid hibridisation, the non-nested-RT-PCR might be more valuable tool.

KAYNAKLAR

1. Aach, R.D., Stevens, C.E., Hollinger, F.B., Mosley, J.W., Peterson, D.A.: Hepatitis C Virus Infection in Post-transfusion Hepatitis: An Analysis with First and Second-Generation Assays. *N Engl. J Med*, 325:1325-9, 1991.
2. Abacıoğlu, Y.H., Davidson, F., Tuncer, S., Yap, P.L., Ustacelebi, Ő., Yulug, N., Simmonds, P.: The Distribution of Hepatitis C Virus Genotypes in Turkish Patients. *J Viral Hepatitis*, 2:297-301, 1995.
3. Abacıoğlu, Y.H.,Çakaloğlu, Y.,BaŐgöl, S.:Hepatitis C Virüsünün Virolojik ve Moleküler Özellikleri ve Kliniği. *Aktüel Tıp Dergisi*, 2(3): 143-168,1997.
4. Akpolat, T., Arık, N., Arısoy, T., Songur, C., Bakkaloğlu, M., Erkan, İ. Yasavul, Ü. Turgan, Ç., Çağlar, Ő.: High Prevalence of Antibodies to Hepatitis C Virus among Renal Transplant Recipient: Corelation with Chronic Liver Dysfunction. *Nephron*, 64:163-164, 1993.
5. Alberti, A.: Diagnosis of Hepatitis C Facts and Perspectives. *J Hepatology*, 12:279-282, 1991.
6. Altamirano, M., Delaney, A., Wong, A., Marostenmaki, J., Pi, D.: Identification of Hepatitis C Virus Genotypes among Hospitalized Patients in British Colombia, Canada. *J Infect. Dis*, 171:1034-8, 1995.
7. Alter, H.J., Coleman, P.J., Alexander, W.J., Kramer, E., Miller, J.K., Mandel, E., Hadler, S.C. Matgolis, H.S.: Importance of Heterosexual Activity in the Transmission of Hepatitis B and non-A non-B Hepatitis. *JAMA*, 262:1201-1205, 1989.
8. Alter, J.H., Purcell, H.R., Shih, J.W., Melpolder, J.C., Houghton, M., Choo, Q.L., Kuo, G.: Detection of Antibody to Hepatitis C Virus in Prospective Followed Transfusion Recipient with Acute and Chronic non-A, non-B Hepatitis. *N Engl. J Med*, 321:1494-1500, 1989.

9. Badur, S., Aaçfidan, A., Trkoğlu, S., Dedeoğlu, F., Kaymakoğlu, S., kten, A., etin, E.T.: HCV İnfeksiyonunun Serolojik Tanısında eşitli ELISA ve RIBA Tekniklerinin Değeri ve PCR Yöntemi ile HCV-RNA'sı Araştırılması. *Klimik Derg*, 5 (2):70-73, 1992.
10. Bouffard, P., Hayashi, P.H., Acevedo, R., Levy, N., Zeldis JB.: Hepatitis C Virus Is Dedected in a Monocyte/ Macrophage Subpopulation of Peripheral Blood Mononuclear Cell of Infected Patients . *J Infect Dis*, 166; 1276-80,1992.
11. Bradley, D.W., Maynard, J.E.: Etiology and Natural History of Post-transfusion and Enterically-transmitted non-A non-B Hepatitis. *Sem.in Liver*. 6: (1) 56-66. 1986.
12. Brester, D., Cuypers, H.T.M., Reeinsik, H.W., Chamuleau, RAFM., Schipper, M.E.I., Boeser-Nunnink, B.D.M., Lelie, P.N., Jansen, P.M.L.: Dedection of Hepatitis C Virus RNA Sequences in Fresh and Parafin-embedded Liver Biopsy Specimens of non-A, non-B Hepatitis Patients. *J of Hepatology*, 15:391-395, 1992.
13. Brillanti, S., Foli, M., Daiani, S.: Persistent Hepatitis C Viremia whitout Liver Disease. *Lancet*, 341:464-465, 1993.
14. Cengiz, A.T., Akdenizli, M.A., Bingöl. N., Kıyan, M.: Kan Donörlerinde anti-HCV Antikorlarının ELISA ile Araştırılması. *Mikrobiyol Blt*, 28:313-321,1994.
15. Cerny, A., Chisari, F.: Immnological Aspects of HCV Infection. *Intervirolgy*, 37:119-125, 1994.
16. Chan, S.W., McOmish, F., Holmes, E.C.: Analysis of a New Hepatitis C Virus Type and its Phylogenetic Relationship to Exiting Variants. *J Gen. Virol*, 73:1131-41, 1992.
17. Chiaramonte, M., Stroffolini, T., Lorenzoni, U., Minniti, F., Conti, S., Floreani, A., Ntakirutimana, E., Vian, A., Ngatchu, T., Naccarato, R.: Risk Factors in

Community -Acquired Chronic Hepatitis C virus Infection: a case control study in Italy . J Hepatology, 24:129-134,1996.

18.Chomyszynski, P., Sachhi, N.: Single-Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction. Analytical Biochemistry,162:159-165, 1987.

19.Choo, Q.L., Kuo, G., Weiner, A.J., Overby, L.R., Bradley, D.W., Houghton, M.: Isolation of a cDNA Clone Derived from a Blood-Borne Non-A, Non-B Viral Hepatitis Genome. Science, 244:359-362, 1989.

20.Choo, Q.L., Richhman, K.H., Han, J.H., Berger, K., Lee, C., Dong, C., Gallegos, C., Coit, D., Mediana-Selby, A., Barr, P.J., Weiner, A.J., Bradley, D.W., Kuo, G., Houghton, M.:Genetic Organization and Diversity of the Hepatitis C Virus Proc. Natl.Acad. Sci USA , 88 :2451-2455, 1991.

21.Choo, Q.L., Weiner, A.J., Overby, L.R., Kuo, G., Houghton, M., Bradley, D.W.: Hepatitis C Virus: The Major Causative Agent of Viral non-A, non-B Hepatitis. Br. Med. Bull , 46:423-441, 1990.

22.Çakaloğlu, Y.: Hepatitis C Virus İnfeksiyonu(C hepatiti) Epidemiyoloji-Patogenez-Klinik-Tedavi. Viral Hepatit 94. Viral Hepatit Şavaşım Derneği.İstanbul, Nobel Tıp Kitapevi 1994, 190-235.

23.Diago, M., Zapater, R., Tuset, C., Carbonell, P., Gonzales, C., Cors, R., Casas, E.: Intrafamily Transmission of Hepatitis C Virus: Sexual and non-sexual Contacts. J Hepatology , 25:125-128, 1996.

24.Dienstag, J.L., Alter, H.J.: Non-A Non-B Hepatitis: Evolving Epidemiologic and Clinic Perspective. Sem.in liver, 6 (1): 67-81, 1986.

25.Doğanay, M., Patiroğlu, T., Utaş, C.: Değişik Gruplarda HBs Ag, Anti-HCV ve anti-HDV Pozitifliğinin Karşılaştırılması. Mikrobiyol Bült, 27:107-112, 1993.

26. Dubois, F., François, M., Mariotte, N., Caces, E., Vol, S., Roingeard, P., Barin, F., Goudeau, A., Tichet, J.: Serum-Alaninaminotranferase Measurement as a Guid to Selective Testing For Hepatitis C. During Medical Checkup. *J Hepatology*, 21:837-841, 1994.
27. Dusheiko, G., Schmilovitz-Weiss, H., Brown, D., McOmish, F., Yap, P.L., Sherlock, S., McIntyre, N., Simmonds, P.: Hepatitis C Virus Genotypes: An Investigation of Type-Specific Differences in Geografic Origin and Disease. *Hepatology* 19:13-18, 1994.
28. Erensoy, S., Akarca, U., Özacar, T., Sayiner, AA., Zeytinoğlu, A., Burhanoğlu, D., Çavuşoğlu, C., Batur, Y.: HCV-RNA Testinin Hepatit C Virus(HCV) infeksiyon Tanısındaki Etkinliği. III. Ulusal Viral Hepatit Simpozyumu 7-9 Kasım, Ankara 1996.
29. Feinstone, S.M., Kapikian, A.Z., Purcell, R.H., Alter, H.J., Holland, P.V.: Transfusion-associated Hepatitis Nor due to Viral Hepatitis A or B. *N Engl J Med*, 292:767-770, 1975.
30. Finkelstein, S.D., Sayegh, R., Uchman, S.: Disease Activity of Hepatitis C Correlates with Single-stage Polymerase Chain Reaction Dedection of Hepatitis C virus. *A.J.C.P.*, 101:321-326, 1994.
31. Frangeul, L., Musser, L., Cresta, P., Cacoub, P., Huraux J.M., Lunel, F.: Hepatitis C Virus Genotypes and Subtypes in Patients With Hepatitis C, with and without Cryoglobulinemia. *J Hepatology* , 25:427-432. 1996.
32. Garson, J.A ., Tedder, R.S., Briggs, M., Tuke, P., Glazebrook, J.A., Trute, A., Parker, D., Barbara, J.A., Contreras, M., Aloysius, S.: Detection of Hepatitis C Viral Sequences in Blood Donations by "nested" Polymerase Chain Reaction and Prediction of Infectivity. *Lancet* , 335:1419-1422, 1990.

- 33. Garson, J.A., Ring, C., Tuke, P., Tedder, R.S.: Enhanced Detection by PCR of Hepatitis C virus RNA. Lancet, 878-879, 1990.**
- 34. Genesca, J., Estaban, J.I., Alter, H.J.: Non-A Non-B Hepatitis: Hepatitis C. Sem.in liver, 11: (2) 147-158, 1991.**
- 35. Giostra, F., Manzin, A., Lenzi, M., Francesconi, R., Solforsi, L., Manotti, P., Muratori, L., Zauli, D., Clementi, M., Bianchi, F.B.: Low Hepatitis C Viremia Levels in Patients with anti-Liver/Kidney Microsomal Antibody Type 1 Positive Chronic Hepatitis. J Hepatology, 25:433-438, 1996**
- 36. Goeser, T., Müller, M.H., Ye, J., Pfaff, E., Theilmann, L.: Characterization of Antigenic Determinants in the Core Antigen of Hepatitis C Virus. Virology, 205:462-469, 1994.**
- 37. Gordon, S.C., Elloway, R.S., Long, J.C., Dmuchowski, C.F.: The Pathology of Hepatitis C as a Function of Mode of Transmission: Blood Transfusion vs. Intravenous Drug Use. Hepatology, 18:1338-1343, 1993.**
- 38. Grakoui, A., McCourt, D.W., Wychowski, C., Feinstone, S.M., Rice, C.M.: Characterization of the Hepatitis C Virus-Encoded Serine Proteinase: Determination of Proteinase-Dependent Polyprotein Cleavage Sites. J Virol, 67:2832-2843, 1993.**
- 39. Grakoui, A., Wychowski, C., Lin, C., Feinstone, S.M., Rice, C.M.: Expression and Identification of Hepatitis C Virus Polyprotein Cleavage Products. J Virol, 67:1385-1395, 1993.**
- 40. Gretch, D., Corey, L., Wilson, J., de la Rosa, C., Wilson, R., Carithers, R., Busch, Jr-M., Hart, J., Sayers, M., Han, J.: Assessment of Hepatitis C Virus RNA Levels by Quantitative Competitive RNA Polymerase Chain Reaction: High-Titer Viremia Correlates with Advanced Stage of Disease. J Infect Dis, 169:1219-25, 1994.**

41. Gretch, D.R., Wilson, J.J., Carithers, R.T., Rosa, C.D., Han, J.H., Corey, L.: Detection of Hepatitis C Virus RNA: Comparison of One-Step Polymerase Chain Reaction (PCR) with Nested-Set PCR. *J Clin Microbiol*, 31:289-291, 1993.
42. Güney, Ç.: Kronik Karaciğer Hastalarında HCV-RNA'sının PCR ile Gösterilmesi. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora tezi. Ankara 1998.
43. Hammel, P., Marcellin, P., Martinot-Peignoux, M., Pham, B.N., Degott, C., Level, R., Lefort, V., Benhassen, A., Erlinger, S., Benhamou, J.P.: Etiology of Chronic Hepatitis in France: Predominant Role of Hepatitis C Virus. *J Hepatology*, 21:618-623, 1994.
44. Han, J.H., Shyamala, V., Richman, K.H., Brauer, M.J., Irvine, B., Urdea, M.S., Tekamp-Olson, P., Kou, G., Choo, Q.L., Houghton, M.: Characterization of the Terminal Regions of Hepatitis C Viral RNA: Identification of Conserved Sequences in the 5' Untranslated Region and Poly(A) Tails at the 3' end. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:1711-1715, 1991.
45. Hijikata, M., Mizushima, H., Akagi, T., Mori, S., Kakiuchi, N., Kato, N., Tanaka, T., Kimura, K., Shimotohno, K.: Two Distinct Proteinase Activities Required for the Processing of a Putative Nonstructural Precursor Protein of Hepatitis C Virus. *J Virol*, 67:4665-4675, 1993.
46. Hino, K.: Diagnosis of hepatitis C. *Intervirology*, 37:77-86, 1994.
47. Houghton, M., Weiner, A.J., Han, J., Kuo, G., Choo, Q.L.: Molecular Biology of Hepatitis C Virus: Implication for Diagnosis, Development and Control of Viral Diseases. *Hepatology*, 14:381-88, 1991.
48. Houghton, M.: Hepatitis C Virus in *Fields Virology* third ed. Edited by B.N. Fields DM, Knipe PM, Howley et al. Lippincott-Raven Publisher, Philadelphia 1996. 1035-1058.

49. Inokuchi, K., Nakata, K., Hamasaki, K., Daikoku, M., Nakao, K., Kato, Y., Yatsuhashi, H., Koga, M., Yano, M., Nagataki, S.: Prevalence of Hepatitis B or C Virus Infection in Patients with Fulminant Viral Hepatitis. An Analysis using Polymerase Chain Reaction. *J Hepatology*, 24:258-264, 1996.
50. Johnson, R.J., Gretch, D.R., Yamabe, H., Hart, J., Bacchi, C.E., Hartwell, P., Couser, W., Corey, L., Wener, M.H., Alpers, C.E., Willson, R.: Membranoproliferative Glomerulonephritis Associated with Hepatitis C Virus Infection. *N Eng J Med*, 328(7):465-470, 1993.
51. Kato, N., Yokosuka, O., Omoto, M., Hosoda, K., Ohno, M.: Detection of Hepatitis C Virus Ribonucleic Acid in the Serum by Amplification with Polymerase Chain Reaction. *J Clin Invest*, 86:1764-1767, 1990.
52. Kiyosawa, K., Sodeyama, T., Tanaka, E., Gibo, Y., Yoshizawa, K., Nakano, Y., Furuta, S., Akahane, Y., Nishioka, K., Purcell, H., Alter, H.J.: Interrelationship of Blood Transfusion, Non-A, Non-B hepatitis and Hepatocellular Carcinoma: Analysis by Detection of Antibody to Hepatitis C Virus. *Hepatology*, 12:671-675, 1990.
53. Kiyosawa, K., Tanaka, E., Sodeyama, T., Furuta, S.: Natural History of Hepatitis C. *Intervirology*, 37:101-107, 1994.
54. Krawczynski, K., Beach, M.J., Bradley, D.W., Kuo, G., Di Bisceglie, A.M., Houghton, M., Reyes, G.R., Kim, J.P., Choo, Q.L., Alter, M.J.: Hepatitis C Virus Antigen in Hepatocytes: Immunomorphologic Detection and Identification. *Gastroenterology*, 103:622-629, 1992
55. Kuo, G., Choo, Q.L., Alter, H.J., Gitnick, G.L., Redeker, A.G., Purcell, R.H., Miyamura, T., Dienstag, J.L., Alter, M.J., Stevens, C.E., Tegmeier, G.E., Bonino, F., Colombo, M., Lee, W.S., Kuo, C., Berger, K., Schuster, J.R., Oversy, L.R., Bradley, D.W., Houghton, M.: An Assay for Circulating Antibodies to a Major Etiologic Virus of Human Non-A, Non-B Hepatitis. *Science*, 244:362-364, 1989.

- 56.Lefkowitch, J.H., Schiff, E.R., Davis, G.L.: Pathological Diagnosis of Chronic Hepatitis C: A Multicenter Comparative Study with Chronic Hepatitis B, Gastroenterology,104:595-603, 1993.**
- 57.Lin, C., Lindennach, B.D., Pragai, B.M., McCourt, D.W., Rice, C.M.: Processing in the Hepatitis C Virus E2-NS2 Region: Identification of p7 and Two Distinct E2-Specific Products with Different C Termini, Hepatitis C. Virusiol, 68:5063-5073, 1994.**
- 58.Lino, S., Hino, K., Yasuda, K.: Current State of Interferon Therapy for Chronic Hepatitis C. Intervirology, 37:87-100, 1994.**
- 59.Margin, S., Craxi, A. Fabiano, C.: Hepatitis C Viremi in Chronic Liver Disease: Relationship to Interferon-alfa or Corticosteroid Treatment. Hepatology 19:273-279, 1992.**
- 60.Matsuura, Y., Suzuki, T., Suzuki, R., Sato, M., Aizaki, H., Saito, I., Miyamura, T.: Processing of E1 and E2 Glycoproteins of Hepatitis C Virus Expressed In Mammalian and Insect Cell. Virology, 205:141-150, 1994.**
- 61.Mc. Cormic, S.E., Goodman, Z.D., Maydonovitch, C.L., Sjogren, M.H.: Evaluation of Liver Histology, ALT Elevation, and HCV RNA titer in Patients with Chronic Hepatitis C. Am. J Gastroenterol, 91:1516-1522, 1996.**
- 62.Mihm, S., Hartmann, H., Ramadori, G.: A Reevaluation of the Association of Hepatitis Virus Replicative Intermediates with Peripheral Blood Cells Including Granulocytes by a Tagged Reverse Transcription/ Polymerase Chain Reaction Tecnique. J Hepatology, 24:491-497, 1996.**
- 63.Nagamine, T., Ohtuka, T., Takehara, K., Arai, T., Takagi, H., Mori, M.: Trombositopenia Associated with Hepatitis C Viral Infection. J Hepatology, 24:135-140, 1996.**

- 64.Nishioka, K.: Epidemiological Studies on Hepatitis C Virus Infection: Dedection, Prevalance, Exposure and Prevention. Intervirology, 37: 58-67,1994.
- 65.Özyıkılan, E., Tatar, G., Köseoğlu, T., Özkuyumcu, C., Kayhan, B., Telatar, H.: Virusa Bağlı Karaciğer Hastalıklarında HBV Yüzey Antijeni anti-HDV ve anti-HCV Antikor Sıklığı.Mikrobiyol Bült, 27:308-313, 1993.
- 66.Pares, A., Barrera, J.M., Cabelleria, J., Ercilla,G., Bruguera, M., Cabelleria, L., Castillo, R., Rodes, J.: Hepatitis C virus Antibodies in Chronic Alcoholic Patients: Association with Sewerity of Liver Injury. Hepatology, 12:1295-1299, 1990.
- 67.Pawlotsky, J.M., Bastie, A., Pellet, C., Remire, J., Darthuy, F., Wolfe, L., Sayada, C., Duval, J., Dhumeaux, D.: Significance of Indeterminate Third-Generation Hepatitis C Virus Recombinant Immunoblot Assay. J Clin. Microbiol, 34:80-83, 1996.
- 68.Pawlotsky, J.M., Tsakiris, L., Roundot-Thoraval, F., Pellet, C., Stuyyer, L., Duval, J., Dhumeaux, D.: Relationship between Hepatitis C Virus Genotypes and Sources of Infection in Patients with Chronic Hepatitis C. J of Infect Dis, 171:1607-1610, 1995.
- 69.Pereira, J.G.B., Milford, E.L., Kirkman, R.L., Quan, S., Sayre, K.R., Johnson, P.J., Wilber,J.C., Levey, S.: Prevalence of Hepatitis C Virus RNA in Organ Donors Positive for Hepatitis C Antibody and in the Recipients of Their Organs. N Engl J Med, 327(13):910-915, 1992.
- 70.Plagemann, P.G.W.: Hepatitis C Virus. Arch Virol, 120:165-180, 1991.
- 71.Pozzato, G., Kaneko, S., Moretti, M., Croce, L.S., Franzin, F., Unoura, M., Bercic, L., Tiribelli, C., Crovatto, M., Santani, G., Kobayashi, K.: Different Genotypes of Hepatitis C Virus are Associated with Different Severity of Chronic Liver Disease. J Med.Virology, 43:291-296, 1994.

72.Rabinovitz, M., Block, G., Finkelstein, S.: Alfa Interferon of Patients with Chronic Hepatitis C. Am. J of Gasroenterology ,91:1523-1526, 1996.

73.Saeed, A.A., Al-Admawi, A.M., Al-Rasheed, A., Fairclough, D., Bacchus, R., Ring, C., Garson, J.: Hepatitis C Virus Infection in Egyptian Volunteer Blood Donors in Riyadh. Lancet , 338:459-460, 1991.

74.Scheuer, P., Ashrafzadeh, P., Sherlock, S., Brown, D., Dusheiko, G.M.: The Pathology of Hepatitis C. Hepatology, 15:567-571, 1992.

75.Simmonds, P., Holmes, EC., Cha, T.A., Chan, S-W., McOmish, F.C., Irvine, B., Beall, E., Yap, P.L., Kolberg, J., Urdea, M.S.: Classification of Hepatitis C Virus into Six Major Genotypes and a Series of Subtypes by Phylogenetic Analysis of the NS-5 Region . J Gen Virol ,74:2391-2399, 1993.

76.Soykan, İ., Yıldırım, İ.S., Akbulut, H., Taşkesen, S., Cindoruk, M., Çağatay, M., Haznedaroğlu, S.: Kronik Karaciğer Hastalıklarında Hepatit C Virus Antikor Sıklığı. Gastroenteroloji, 4:(3)402-404, 1993.

77.Şentürk, H., Sonsuz, A., Özdemir, S., Gürakar, A., Eyigün, C., Akın, P., Demircan, O., Kocabalkan, F., Demiröz, P., Gürakar, M.: Çeşitli Karaciğer Hastalıklarında ve Yüksek Risk Gruplarında anti-HCV Prevalansı. Gastroenteroloji , 2: (3):334-336, 1991.

78.Takahashi, K., Kishimoto, S., Yoshizawa, H., Okomato, H., Yoshikawa, A., Mishiro, S.: p26 Protein and 33 -nm Particle Associated with Nucleocapsid of Hepatitis C virus Recovered From the Circulation of Infected Hosts. Virology, 191:431-434, 1992.

79.Takehara, T., Hayashi, N., Mita E., Hagiwara, H., Ueda, K., Katayama, K., Kasahara, A., Fusumato, H., Kamada, T.: Detection of the Minus Strand of Hepatitis C Virus RNA by Revers Transcription and Polymerase Chain

Reaction: Implications for Hepatitis C Virus Replication in Infected Tissue. *Hepatology*, 15:387-390, 1992.

80.Tang, E.: Hepatitis C Virus -A Review. *West J Med*, 155:164-168, 1991.

81.Thomas, D.L., Mahley, R.W., Badur, S., Palaoglu, E., Quinn, T.C.: The Epidemiology of Hepatitis in Turkey. *Infection* , 6:411-414, 1994.

82.Thomas, D.L., Zenilman, J.M., Alter, H.J., Shih, J.W., Galai, N., Carella A.V., Quinn, T.C.: Sexual Transmission of Hepatitis C Virus among Patients Attending Sexually Transmitted Diseases Clinics in Baltimore- An analysis of 309 sex Partnerships. *J of Infect Dis*, 171:768-775, 1995.

83.Tibbs, C.J., Palmer, S.J., Coker, R., Clark, S.K., Parsons, G.M., Hojvat, S., Peterson, D., Banatvala, J.E.: Prevalance of Hepatitis C in Tropical Communities: the Importance of Confirmatory Assays. *J of Med Virology*, 34:143-147, 1991.

84.Tomei, L., Failla, C., Santolini, E., De Francesco, R., Monica, N.L.: NS3 Is a Serin Protease Required for Processing of Hepatitis C Virus Polyprotein. *J Virol*, 67:4017-4026, 1993.

85.Tsai, J.F., Jeng, J.E., Ho, M.S., Chang, W.Y., Lin, Z.Y., Tsai, J.H.: Independent and Additive Effect Modification of Hepatitis C and B Viruses Infection on the Development of Chronic Hepatitis. *J Hepatology*, 24:271-276, 1996.

86.Tsubo, S., Nagamori, S., Miyazaki, M., Mihara, K., Fukaya, K., Teruya, K., Kosaka, T., Tsuji, T., Namba, M.: Persistence of Hepatitis C Virus RNA in Established Human Hepatocellular Carcinoma Cell Lines. *J of Med Virology*, 48:133-140, 1996.

87.Türkoğlu, S., Lazizi, Y.: Serumda Hepatit C Virus RNA'sının Polimeraz Zincir Reaksiyonu(PCR) ile Saptanmasının Anlamı. *Klimik Derg*, 7(2):69-70, 1994.

- 88.Uchida, T.: Patology of Hepatitis C. *Intervirology*, 37:126-132, 1994.
- 89.Ulrich, P., Romeo, J.M., Lane, P.K.: Dedection, Semiquantititation, and Genetic Variation in Hepatitis C Virus Sequences Amplified from the Plasma of Blood Donors with Elevated Alanine aminotransferase. *J Clin. Invest*, 86:1609-1614, 1990.
- 90.Van Der Poel, C.L., Cuyperes, H.T.M., Reesink, H.W., Weiner, A.J., Quan, S., Di Nelo, R., Van Boven, J.J.P., Winkel, I., Mulder-Folkerts, D., Exel-Oehlers, P.J., Schaasberg, W., Leentvaar-Kuypers, A., Polito, A., Houhgton, M., Lelie, P.N.: Confirmation of Hepatitis C Virus Infection by New Four-Antigen Recombinant Immunoblot Assay. *Lancet*, 337:317-19, 1991.
- 91.Van Doorn, L.J., Quint, W.: Longitudinal Analysis of Hepatitis C Virus Infection and Genetic Dirift of the Hypervariabl Region. *J Infec. Dis*, 169:1226-35, 1994.
- 92.Wands, J.R., Blum, H.E.: Hepatitis B and C Virus and Alcohol-Induced Liver Injury. *Hepatology*, 14:730-733, 1991.
- 93.Watanabe, J., Minegishi, K., Mitsumori, T., Ishifuji, M., Oguchi, T., Ueda, M., Togunaga, E., Tanaka, E., Kiyosawa, K., Furuta, S., Katayama, T., Kuo, G., Choo, Q.L., Houghton, M.: Prevalence of Anti-HCV Antibody in Blood Donors in the Tokyo. *Area Vox Sang*, 59:86-88, 1990.
- 94.Weiner, A.J., Kuo, G., Bredley, D.W., Bonino, F., Saracco, G., Lee, C., Rosenblatt, J., Choo, Q.L., Hoghton, M.: Dedection of Hepatitis C Viral Sequences in non-A, non-B Hepatitis . *Lancet*, 335:1-3, 1990.
- 95.Weiner, A.J., Brauer, M.J., Rosenblatt, J., Richman, K.H., Tung, J., Crawford, K., Bonino, F., Saracco, G., Choo, Q.L., Houghton, M., Han, J.H.: Variable and Hypervariable Domains Are Found in the Regions of HCV Corresponding to the Flavivirus Envelope and NS1 Proteins and the Pestivirus Envelope Glycoproteins. *Virology*, 180:842-848, 1991.

96.Yamada, N., Tanihara, K., Takada, A., Yorihuzi, T., Tsutsumi, M.,Shimomura, H., Tsuji, T., Daete, T.: Genetic Organization and Diversity of the 3' Non coding Region of the Hepatitis C Virus Genome. *Virology*, 223:255-261, 1996.

97.Yenen, O.Ş.: Hepatitis C Virusu(HCV), Molekül Özellikleri ve Serolojik Tanı. *Viral Hepatit 94*, Viral Hepatit Şavaşım Derneği. İstanbul, Nobel Tıp Kitapevi 1994, 133-190.

