

T.C
Sağlık Bakanlığı
Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi
Tıbbi Mikrobiyoloji
Klinik Şefi: Doç. Dr. Mustafa Demirci

HCV RNA POZİTİF KRONİK HEPATİT C HASTALARINDA OTOANTİKOR PREVALANSI

RABİYE ALTINBAŞ

UZMANLIK TEZİ

2009 - İZMİR

T.C
Sağlık Bakanlığı
Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi
Tıbbi Mikrobiyoloji
Klinik Şefi: Doç. Dr. Mustafa Demirci

HCV RNA POZİTİF KRONİK HEPATİT C HASTALARINDA OTOANTİKOR PREVALANSI

RABİYE ALTINBAŞ

UZMANLIK TEZİ
Tez Danışmanı: Uzm. Dr. Nükhet Kurultay

2009 - İZMİR

ÖNSÖZ

Asistanlık eğitimimde bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım değerli Şef'imiz sayın Doç.Dr. Mustafa Demirci'ye ve emekli Şef'imiz Uzm.Dr. Metin Türker'e teşekkür ederim.

Tez çalışmam boyunca mesleki bilgi ve deneyimleriyle yol gösteren tez danışmanım değerli Klinik şef yardımcımız Uzm. Dr. Nükhet Kurultay'a teşekkür ederim.

Tezimin hazırlanmasında ilgi ve desteğini hiç eksik etmeyen sevgili Başasistan Uzm. Dr. Aslı Gamze Şener'e ve diğer Başasistanlara, Uzmanlarıma, birlikte çalıştığım mesai arkadaşlarıma, Tıbbi Mikrobiyoloji'nin tüm personeline teşekkür ederim.

İhtisasım süresince destek ve fedakarlıklarından dolayı biricik eşime ve her zaman arkamda olan benim en iyi şekilde yetişmem için hiçbir özveriden kaçınmayan canım anneme ve tüm aileme sonsuz teşekkürler.

Saygılarımla

Rabiye ALTINBAŞ

İÇİNDEKİLER

1.GİRİŞ VE AMAÇ	1
2.GENEL BİLGİLER	3
2.1.Tarihçe	3
2.2.Viroloji	4
2.3.Genom Yapısı	4
2.3.1.Yapısal Proteinler	6
2.3.2.Yapısal Olmayan Proteinler	7
2.4.HCV Replikasyonu	9
2.4.1.Replikon Sistemler	10
2.5.Epidemiyoloji ve Bulaş	12
2.6. HCV Genotipleri	13
2.7.Klinik Özellikler	15
2.7.1.Akut Hepatit C	15
2.7.2.Kronik Hepatit C	16
2.7.3.Hepatosellüler Karsinom	17
2.8.İmmünpatogenez	18
2.9.Otoimmunité ve Hepatit C Virusu ile Birlikte Olan Otoimmün Bozukluklar	19
2.10.HCV Enfeksiyonunda Tanı	21
2.10.1.Serolojik Testler	21
2.10.2.Moleküler Testler	22
2.10.2.1.Kalitatif Testler	22
2.10.2.2.Kantitatif Testler	23
2.10.2.3.Genotipleme	24
2.11.Örneklerin Toplanması, Taşınması ve Saklanması	25
2.12.HCV Enfeksiyonunda Tedavi	26

3. MATERYALVE METOD	29
3.1.Real Time PCR Tekniği ile HCV RNA Tespiti	30
3.1.1. COBAS® TaqMan® HCV Testi Prensibi	30
3.1.2. COBAS TaqMan HCV Testi	31
3.1.2.1.Reaktiflerin Hazırlanması	31
3.1.2.2.Numune (hasta ve kontrol grubu serumları) ve Test	
Kontrollerinin Hazırlanması	33
3.1.2.3..Amplifikasyon Ve Deteksiyon	35
3.1.2.4.Hasta Listesi Hazırlanması, Sisteme Y�klenmesi	36
3.1.2.5.Son��ların Hesaplanması ve Yorumlanması	37
3.2.�ndirekt �mmunfloresan Tekniği �le ANA, AMA, ASMA,	
LKM Otoantikor Tespiti	38
3.2.1.Testin Prensibi	38
3.2.2.Testin A�amaları	40
4. BULGULAR	42
5. TARTI��MA VE SONU��	48
��ZET	53
KAYNAKLAR	56

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. HCV Genomunun Kodladığı Proteinler ve Fonksiyonları	5
Tablo 2. HCV Genotip, Subtip ve Türümsü Tanımları	13
Tablo 3. HCV Enfeksiyonu Tanı ve Takibinde Kullanılan Testler	24
Tablo 4. Kronik HCV Enfeksiyonunda Tedavi Seması	28
Tablo 5. High Pure System Viral Nukleik Asid Kit İçeriği	30
Tablo 6. PCR Reaktifleri (Amplifikasyon ve Deteksiyon)	31
Tablo 7. ANA, AMA, ASMA Test Kiti İçeriği	39
Tablo 8. LKM Test Kiti İçeriği	39
Tablo 9. Olgularda Tespit Edilen HCV RNA Değerleri	42
Tablo 10. Olgularda Tespit Edilen Otoantikörlerin Dağılımı	44

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. HCV 'nin Şematik Yapısı	4
Şekil 2. Hepatit C Virusunun Genom Yapısı	8
Şekil 3. HCV Replikasyon Basamakları	10



GRAFİKLER

Grafik 1. Cinsiyete göre hasta ve kontrol sayılarının dağılımı	46
Grafik2. Hasta ve Kontrol Grubunun Yaş Ortalaması	46



KISALTMALAR

µl: Mikrolitre
AFP: Alfa fetoprotein
ALT: Alanin Aminotransferaz
AMA: Antimitokondriyal antikor
ANA: Antinükleer antikor
APC: Antigen-presenting cell
ASMA: Anti smooth muscle antikor
AST: Aspartat aminotransferaz
BCR: B cell receptor
cDNA: Complamenter Deoksiribonükleik Asit
CTL: Sitotoksik T Lenfosit
ELISA: *Enzym-linked immunoabsorbent assay*
EMCV: *Ensefalomyokardit virüsü*
FDA: Food and Drug Administration
GSA: Gel shift analizi
HCC: *Hepatocellular Carcinoma*
HVR: Hypervariable region
IFN: İnterferon
Ig: İmmunglobulin
IL: İnterlökin
IRES: Internal ribosomal entrysite
IU: International units
KDa: Kilodalton
LDL: Low Density Lipoprotein
LKM: Anti Liver Kidney Microsomal Antikoru
LPS: Lipopolisakkarit

MHC: Major histokompabiliti
nm: Nanometre
NS: Non-structural
ORF: Open reading frame
p: Anlamlılık
PBS: Phospat Buffer Solution
PCR: Polimeraz Chain Reaction
RNA: Ribonükleik asit
PV: *Polyo virüsü*
RDRP: RNA dependent RNA polimeraz
RI: Replikatif intermediate
SCID: Severe Combined Immuno Deficiency
SSCP: Single strand conformationel polymorphism
SPSS: *Statistical Package for Social Sciences*
TCR: T cell receptor
TGGE: Temparature gradient gel
TMA : Transcription Mediated Amplification
UTR: Untranslated region
VLDL: Very Low Density Lipoprotein

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Hepatit C virüsü 1989 yılında ilk olarak non-A non-B olarak tanımlandı. Transfüzyon sonrası ve sporadik olarak ortaya çıkan hepatitlerin major etyolojik nedeni olarak gösterildi. Günümüzde kronik hepatit, hepatik steatoz, siroz ve hepatocellüler karsinom ile ilişkili bulunmaktadır (1). HCV, karaciğer (KC) hastalığı dışında hematolojik, dermatolojik, renal, otoimmün ve nörolojik bozukluklar gibi çok sayıda ekstra hepatik belirti ve bulgulara neden olmaktadır (2).

Dünyada 170-300 milyon kişi HCV ile enfektir. HCV ciddi bir halk sağlığı sorunu olarak önemini her geçen gün artarak sürdürmektedir. Enfeksiyonun geçişinde başlıca enfekte kan ve kan ürünleri rol oynamaktadır. Damar içi uyuşturucu kullananlar, kontrolsüz cinsel hayat yaşayanlar, hemodiyaliz hastaları, sağlık personeli, annesi HCV ile enfekte yenidoğan potansiyel risk atında bulunmaktadır (3, 4).

Akut hepatitlerin %20'sinde, kronik hepatitlerin ise %70'inde HCV etkindir. Akut hepatit C enfeksiyonlarının çoğunluğu asemptomatiktir ve yüksek oranında kronikleşme göstermektedir (4).

Tedavi seçeneklerinin her geçen gün ilerlemesine rağmen hala koruyucu aşısı bulunmayan HCV'nin neden olduğu akut hepatit %50-80 oranında kronik hepatit C'ye, kronik hepatit C ise 20 yıl sonunda %4-20 oranında siroza ilerlemektedir. Siroz gelişen hastaların %1-5'inde 1 yıl içinde hepatocellüler karsinom gelişmektedir (5). KC transplantasyonu yapıldıktan sonraki 5 yıl içinde oluşan organ redlerinden %20-30 oranında HCV sorumludur (6).

HCV enfeksiyonu tanısına, HCV antikorlarını (anti-HCV) araştırarak başlanmaktadır. Viremiyi tanımlamak için ise HCV RNA düzeyi saptanmaktadır (3). HCV RNA varlığının gösterilmesi HCV enfeksiyonun kesin tanısı için altın standarttır (7). HCV'nin tanısını desteklemek için biyopsi yapılmaktadır (8).

HCV'nin neden olduğu kronik HCV enfeksiyonu ile hepatit dışı birçok hastalık arasında ilişki bulunmaktadır. Çoğu otoimmün hastalık olup kriyoglobulinemi, membranoproliferatif glomerülonefrit, poliarteritis nodosa, porfiria cutanea tarda, otoimmun tiroid hastalığı, sjögren sendromu başlıcalarıdır. HCV enfeksiyonu sırasında otoimmun bir hastalık olmadan da KC ya da diğer organlara spesifik çeşitli otoantikorlar oluşmaktadır (9).

HCV ile ilişkili kronik hepatitlerin yaklaşık olarak %25'inde, yetişkin hastalarda otoantikorların varlığı deneysel çalışmalarla gösterildi (10).

.HCV enfeksiyonları ile birlikte görülen ekstrahepatik otoimmun hastalıklarda ileri yaş, dişi cinsiyet ve KC fibrozisi varlığı önemli risk faktörleri olarak ilişkilendirilmektedir (11). HCV'nin zarf proteini E2'nin, B hücre yüzeyinde bulunan CD81'i uyarak otoantikor oluşumuna neden olduğu düşünülmektedir (12).

Çalışmamızda; RT PCR ile HCV RNA düzeyi 10^4 - 10^7 IU/ml aralığında tayin edilen hastalarda, indirekt immün floresan yöntemi ile otoantikor tayini yapılarak, HCV RNA pozitif hastalardaki otoantikor prevalansını saptamayı amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1.Tarihçe

İngitere'den Mac Callum ve Bauer ile A.B.D'den Havens isimli bilim adamları 1940'larda viral hepatite neden olan en az iki tür virus olduğunu buldu (13). Blumberg ile arkadaşları 1965'de Hepatit B ve ardından Feinstone 1973'de Hepatit A ile ilgili serolojik markerları tanımladı (14). Böylece iki ayrı tipte viral hepatit olduğu anlaşıldı. Ancak A ve B tiplerinden farklı olarak bulunan ve tanımlanamayan diğer viral hepatitler için non-A non-B ismi kullanılmaya başlandı.

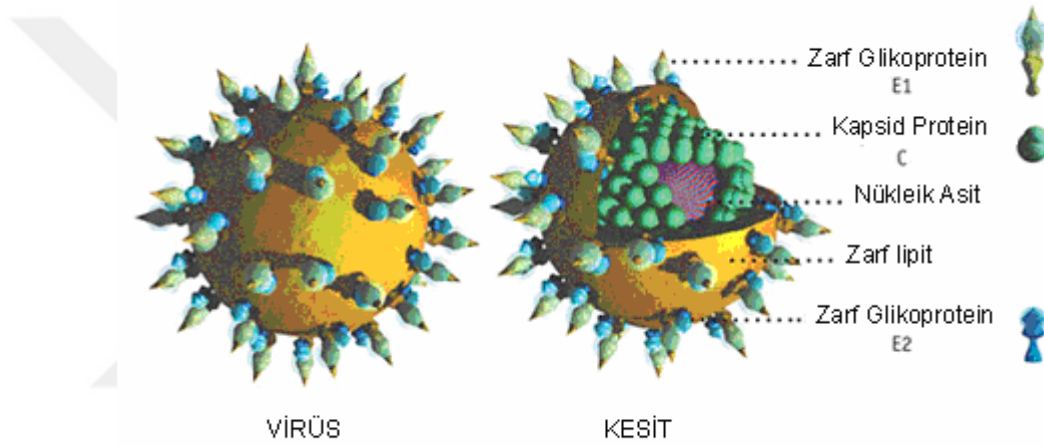
Havens ve bazı bilim adamları tarafından 1956'da kendi kendini sınırlayan akut hepatite neden olan üçüncü bir virüsün olduğu rapor edildi.

Prince ve arkadaşları 1974 yılında A ve B hepatit virüsleri dışında bir nedenle oluşan transfüzyon sonrası hepatitlerini rapor ettiler (13). Choo ve arkadaşları tarafından 1989'da non A non B hepatitleri Hepatit C olarak isimlendirildi (14).

A.B.D'de Hastalık Kontrol Merkezi ile birlikte Chiron Corporation tarafından 6 yıl süren çalışma 1989'da sonlandı. Houghton ve arkadaşları, deneysel olarak enfekte ettikleri bir şempanzenin serumunda viral komplemanter DNA (cDNA) elde ettiler. cDNA'nın kodladığı küçük protein fragmanının hastaların antikorları ile reaksiyona girmesi serolojik çalışmalarda önemli bir başlangıca neden olmuştur (15).

2.2.Viroloji

Hepatit C virüsü (HCV) Hepaciviruslar genusunda, Flaviviridea ailesinde, yaklaşık 40-50 nm çapında, dışta lipit yapıda bir zarf, içte tek zincirli, pozitif polariteli Ribonükleik Asid (RNA) ve bunu saran nükleokapsit kor proteininden oluşur.



Şekil 1. HCV 'nin Sematik Yapısı (16)

2.3.Genom Yapısı

Tek zincirli nükleik asitten oluşan genom 9500 nükleotid uzunluğundadır. HCV genomu tek bir protein kodlayıcı bölge (open reading frame=ORF) içerir. Genomun büyük bir kısmını kapsayan ORF yaklaşık 3010 aminoasid uzunluğunda bir poliprotein kodlar. Bu büyük poliprotein sonradan virus ve konak proteaz enzimleri tarafından kesilir. Sonuçta işlevsel olarak farklı proteinler oluşur. Poliproteinin N-ucundan itibaren yaklaşık dörtte birlik kısmı yapısal proteinleri, geriye kalan kısmı ise yapısal olmayan proteinleri

(non structural=NS) oluşturur. Genom üzerinde genlerin dizilimi; 5'-C-E1-E2-p7-NS2-NS3-NS4A-NS4B-NS5A-NS5B-3' şeklindedir. NS3-NS4A-NS4B-NS5A-NS5B'ye "viral RNA replikaz kompleksi" adı verilmektedir. Bu enzim kompleksi viral replikasyonda rol alır. NS2 ve p7 replikasyon için gerekli olmayıp virüsün proteinlerinin toplanmasında görev alırlar (17).

Tablo 1. HCV Genomunun Kodladığı Proteinler ve Fonksiyonları

Aminoasit	Protein	Fonksiyon
1-191	C	Nükleokapsid
192-383	E1	Zarf Glikoprotein
384-746	E2	Zarf Glikoprotein
747-809	P7	Viriopori
810-1026	NS2	NS2/3 oto-proteaz
1027-1657	NS3	Ser Proteaz, RNA Helikaz
1658-1711	NS4A	NS3 Ser Proteaz kofaktör
1712-1972	NS4B	İntraselüler membran veziküller
1972-2420	NS5A	ISDR, interferon direnci
2420-3010	NS5B	RNA dependent RNA Polimeraz

2.3.1Yapısal proteinler

Yapısal proteinlerden N-ucunda bulunan C geni ilk kodlanan gen olup ürünü kor proteinidi (p22). Bu protein çok immünojeniktir. HCV ile enfekte olanlarda bu proteine karşı antikor saptanır. Kor proteinine ait biyolojik etkiler; HCV replikasyonunun baskılanması, hücre siklusunun düzenlenmesi, hücresel protoonkogenlerin transkripsiyonunun düzenlenmesi, apoptozun indüksiyonu ya da baskılanması olarak sıralanmaktadır.

HCV genomunda C geninin ardından E1 ve E2 genleri gelir. E1 ve E2 genleri yoğun bir glikozillenmeye uğrar. gp35 ve gp70 olarak isimlendirilen bu iki zarf glikoproteini sırası ile E1 ve E2 genleri tarafından kodlanır. E2 geni ürünü olan gp70'in ilk 30 aminoasitlik kısmı çok fazla genetik değişkenlik gösterir. Burası "hiper variable region 1" (HVR-1) olarak adlandırılır (18).

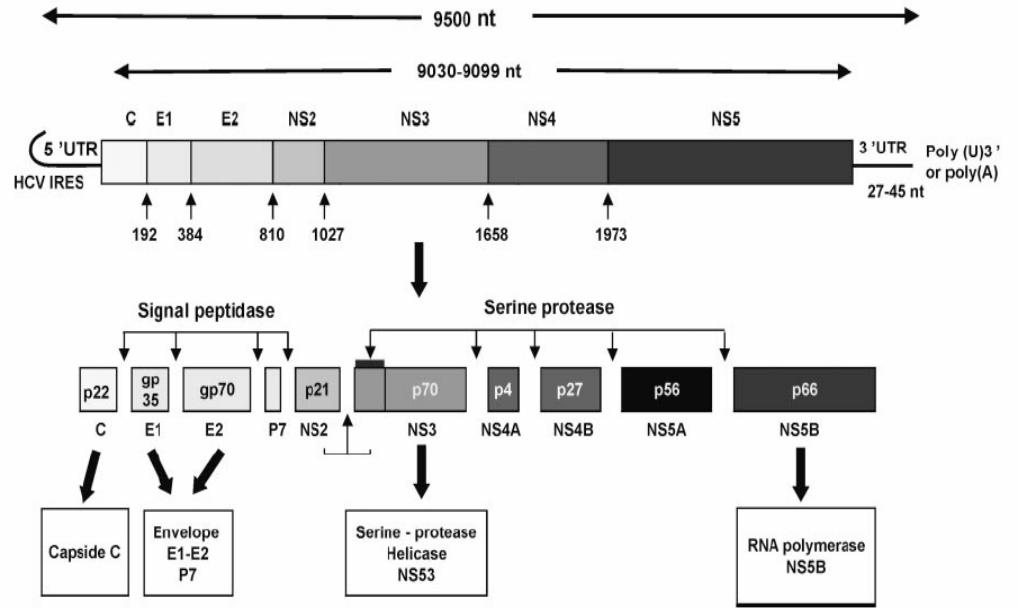
Genom üzerinde oluşan bir kesilmenin ardından da p7 proteini oluşur. Bu küçük proteinin membranla birlikte iyon kanalı (viroporin) olduğu bilinmektedir.

2.3.2.Yapısal Olmayan Proteinler

NS2 ve NS3'ün kodladığı otoproteazlar, poliprotein molekülünün yapısal olmayan (non structural=NS) bölgelerin oluşumunda rol oynayan proteinlerin parçalanarak ayrılmasını sağlar. Çok işlevli olan NS3'ün serin proteaz ve helikaz aktiviteleri bulunmaktadır. NS4A'nın ürünü NS3 proteaz enziminin kofaktörüdür. NS5B'nin ürününün işlevi henüz bilinmemektedir. Ancak NS4A'nın fosforilasyonunun düzenlenmesinde, intrasellüler membran veziküllerinin oluşumunda rol aldığı düşünülmektedir. NS4A'nın iki ürünü saptanmıştır. Bunlar 56 ve 58 kDa ağırlığında olup bu proteinlerin de işlevi henüz bilinmemektedir. Replikasyondaki en önemli enzim NS5B geninin ürünü olan RNA'ya bağımlı RNA polimeraz işlevi gören enzimdir (19).

Genomun 5' ve 3' uçlarında oldukça iyi korunmuş iki adet translasyona uğramayan bölge (untranslated region=UTR) vardır. Genomun 5'ucunda bulunan 5'UTR bölgesi 332-342 nükleotid uzunluğundadır. Tüm HCV suşları arasında yüksek düzeyde (%92 oranında) benzerlik göstermesi nedeniyle HCV viremisinin saptanması ile ilgili çalışmalarda hedef bölgesi olmuştur (20). Bu bölgedeki RNA yapısının 4 tane bukle "stem-loop" içerdiği düşünülmektedir. Stem-loop, uygun dizilerin birbirleri ile bağlanması sonucu oluşan bir kök ve bağlanmayan bölgelerin bir halka oluşturduğu yapıya verilen isimdir. HCV proteinlerinin translasyonunda 5'UTR bölgesi rol almaktadır. Bu bölge RNA molekülünün ribozom ile yaptığı bağlanmada etkilidir. HCV genomundaki bağlanan bölge de 5'UTR'de bulunmakta ve "internal ribosomal entrysite" (IRES) olarak adlandırılmaktadır. Başlangıçta yer alan 29 nükleotid dışında 5'UTR'nin tamamı bu işlevde yer alarak, "IRES"i oluşturmaktadır. İlk 23 nükleotidin ise translasyonu baskılayıcı rolü olduğu sanılmaktadır. Pestivirüslerle benzer bir mekanizma kullanarak, HCV'nin 5'UTR bölgesinin ribozomların 40 S alt ünitesine bağımsız olarak bağlandığı ve prokaryotlara benzer şekilde translasyonu başlattığı, bu sayede gelecekteki antivirallere uygun bir hedef oluşturabileceği düşünülmektedir (21).

Genomun 3'UTR bölgesi yaklaşık 27 ila 45 nükleotid içermektedir. 3'UTR bölgesinin "replikaz tanıma bölgesi" olarak işlev gördüğü düşünülmektedir. Virüs replikasyonunda, negatif RNA zincirinin sentezinde rol oynayan bu bölge, replikasyon sırasında NS3 ve NS5A ile etkileşmektedir (18).



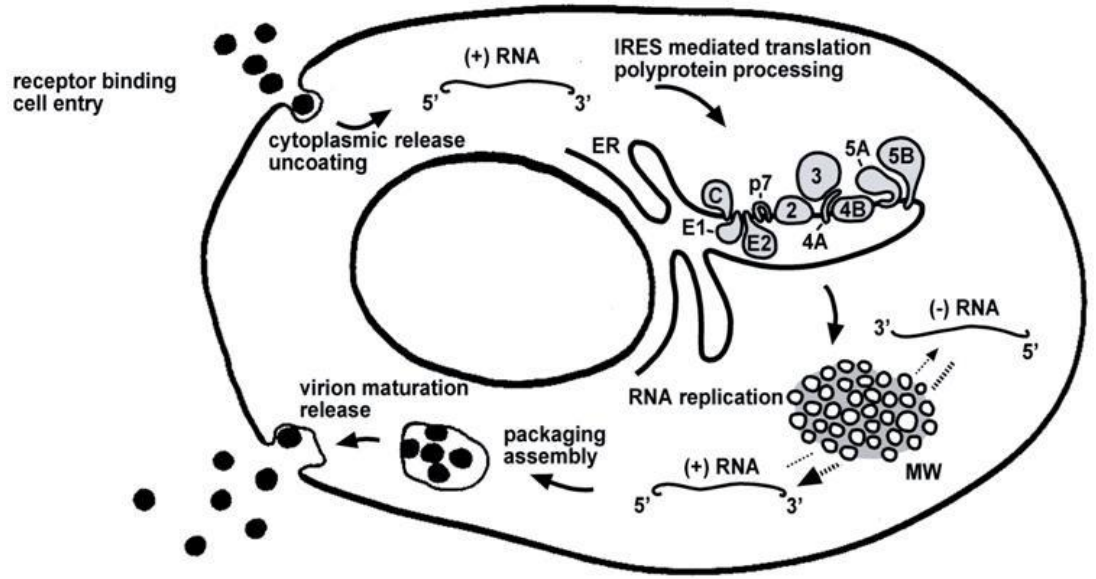
Şekil 2. Hepatit C Virusunun Genom Yapısı

2.4.HCV Replikasyonu

Replikasyon basamakları: virusun hücre yüzeyine tutunma ve penetrasyonu, viral RNA'nın kılıfından ayrılması, viral genomun replikasyon için gerekli olan replikazları oluşturmak üzere translasyona uğraması ve hücreden salınması olarak sıralanır (22).

Virusun hücresel reseptörü kesin olarak bilinmemektedir. E1/E2 heterodimerlerinin dolaşımında LDL ve VLDL gibi beta-lipoproteinlerine bağlandığı gösterilmiştir. Virus hücre içine alındıktan sonra kapsidinden kurtulur ve genom serbest kalır (23).

Pozitif polariteli RNA'ya sahip olan bu virüsün RNA polimeraz enzimi yoktur. İzole RNA enfektiftir ve doğrudan ribozomlara gidip mRNA gibi bağlanır. Ribozomlar tarafından okunan RNA (translasyon) RNA-bağımlı RNA polimeraz (RDRP) enzimini oluşturur (24). Erken proteinlerin sentezini başlatır. Bu proteinler stoplazmada viral genomun replikasyonunu sağlar. Replikasyonda ilk basamak negatif RNA iplikçiklerinin sentezidir. Ara replikatif form (replikatif intermediate=RI) olarak da adlandırılan bu iplikçiklerin sentezinde genomik RNA kalıp olarak kullanılır. İkinci basamakta ise bu kez ara formlar kalıp olarak kullanılarak çok sayıda pozitif yönelimli RNA iplikçığı sentezlenir. Her iki basamakta da erken proteinlerden biri olan RDRP enzimi iş görür. Replikasyonun tamamlanması ile birlikte geç (yapısal) proteinlerin sentezi başlar. Bu proteinler genomik RNA ile bir araya gelerek viral partikülleri oluşturur. ER ya da golgi membranlarından tomurcuklanarak olgunlaştığını gösteren kanıtlar vardır.(23, 25).



Şekil 3. HCV Replikasyon Basamakları

2.4.1.Replikon Sistemler

Sağlıklı donörlerden alınan periferik kanın mononükleer hücreleri HCV pozitif serum ile enfekte edilerek replikasyonla ilişkili çalışmalara başlanmıştır. Daha sonraları, insan lenfoid hücre dizisi olan HPBMa102-2, bir insan B hücre dizisi olan Daudi hücreleri, İnsan T lenfotropik Virus-1 (HTLV-1) ile enfekte MTec klonu gibi hücreler HCV ile enfekte edilmiştir. Bu tür hücresel çalışmalar yanında HCV ile ilişkili çeşitli fare modelleri geliştirilmiştir. Atimik çıplak farelerde, hepatosellüler karsinoma hücreleri ile tümör oluşturulup daha sonra oluşan bu tümör hücrelerinde HCV RNA saptanması insan hepatositleri grefti yapılan ve plazminojen aktivatör transgeni (A1b-PA) taşıyan Severe Combined Immuno Deficiency (SCID) farelerinin HCV pozitif serum ile enfekte edilmesi, insan polyo virüsü (PV) reseptörü "eksprese" eden transgenik farelerin, PV IRES'inin HCV IRES'i ile değiştirildiği "şimerik" PV/HCV ile enfekte edilmesi fare modellerine örnek olarak gösterilmektedir (26).

İn vitro HCV replikasyonunun sağlanması bilimsel çalışmalarda önemli bir aşama olmuştur. HCV'nin hücre kültürü modelinde in vitro replikasyonu ile ilgili bugün gelinen en son aşama RNA replikazlar ve cDNA in vitro transkriptleridir. Bu aşamadan önce hücreler, enfeksiyöz HCV partikülü içeren serumlarla enfekte edilmekteydi. Replikon sistemlerde in vitro olarak elde edilen cDNA'lardan oluşturulan transkriptler, başka bir deyişle cDNA'dan elde edilen HCV RNA'lar hücre dizilerini enfekte etmektedir. Bunun sonucu olarak, enfeksiyonu oluşturmada kullanılan materyal bol ve homojendir. Virusun yaşam döngüsü ile ilgili mutasyonları incelemek açısından in vitro replikon sistemleri önemlidir. Çalışmalar HCV genomunun tamamını kullanarak yapıldığı için, sonuçların doğruluğu önem taşımaktadır (27). Huh7 (Human hepatoma) hücre dizilerinin seçici olarak, HCV subgenomları ile transfeke edilmesi sonucu otonom olarak replike olabilen HCV RNA'lar oluşturulmaktadır. Kor'dan NS2'ye kadar olan bölüm, neomisin-fosfotransferaz (neo) geni ve ensefalomyokardit virüsünün (EMCV) IRES genini içeren bir gen kaseti ile değiştirilmiştir. Neomisin- fosfotransferaz (neo) geni G418 adlı sitotoksik ilaca dirençten, EMCV'nin IRES'i ise NS3'ten NS5B'ye kadar olan HCV bölgesinin translasyonundan sorumludur. Huh7 hücreleri, oluşturulan replikon RNA'lar ile transfeke edilmekte ardından transfeke olmayan ya/ya da yeterli miktarda RNA üretmeyen hücreler G418 tarafından yok edilir. Geriye yalnızca HCV RNA üreten hücreler kalmaktadır. HCV ile ilgili bilinmeyenlerin tamamlanması, virüsün aşısı ve tedavisi ile ilgili pek çok gelişmenin elde edilmesi için replikon sisteminin geliştirilmesi ciddi önem taşımaktadır (19).

2.5.Epidemiyoloji ve Bulaş

HCV enfeksiyonları tüm dünyada giderek büyüyen önemli bir sağlık sorunu olup, milyonlarca insanı etkilemektedir (20, 28). HCV enfeksiyonu sıklığı ülkelere göre değişmekle birlikte dünyada ortalama %3 civarındadır. Avrupa'da genel popülasyonda ortalama %1 iken Avrupa'nın kuzey bölgelerinde %0.5, güney bölgelerinde %2 civarındadır. Afrika'da özellikle Mısır'da prevalans oldukça yüksek olup %10'un üzerindedir. A.B.D'de ise genel popülasyonda prevalans %1.8 iken kan donörlerinde bu oran %0.5'dir. Amerikan Hastalık Kontrol Merkezinin verilerine göre A.B.D'de 3.9 milyon kişide anti-HCV pozitif olup, bunların 2.7 milyonu viremiiktir. Yine A.B.D'de kronik hepatitlerin %40'ından HCV'nin sorumlu olduğu ve bu hastalıktan her yıl 8.000-10.000 kişinin öldüğü bildirilmektedir (29).

HCV genelde kontamine kanın perkutan yolla teması sonucu bulaşmaktadır. Damar içi uyuşturucu kullanımı en sık bulaş yolu olup tüm enfeksiyonların %55 ile %65'ini oluşturur (30).

Enfekte kan ürünlerinin ya da organların alınması 1992'den önce HCV enfeksiyonlarının önemli nedenleri arasındayken, HCV taramalarının başlamasıyla bu yol önemini yitirmiştir. Yeni nesil antikor tarama testleri ile kan nakli yoluyla HCV bulaş riski 1/103.000'den, kan örneklerinin havuzlanarak nükleik asit tabanlı testlerle taranması ile 1/2.000.000'a düşmüştür (31). HCV cinsel yol ile de bulaşmaktadır, uzun süre tek eşli ilişkilerde öngörülen yıllık bulaş riski 0 ile %0.6 arasındadır (32). Kokain kullanımı, kontamine tıbbi ekipmana maruz kalma, iğne batmaları ve vertikal bulaş HCV enfeksiyonunun yayılmasına neden olmaktadır. HCV tükürükte saptanabilse de gündelik temaslarla bulaşın çok ender olduğu düşünülmektedir. Mesleki temas yönünden, içi boş iğnelerle olan yaralanmalarda HCV bulaş riski %1.8'dir (33).

Ülkemizde anti-HCV sıklığı %0.2 ila %2.4 arasında değişmektedir. Risk grupları ve bölgesel özelliklere bağlı olarak oranlar farklılık göstermektedir (34).

2.6.HCV Genotipleri

Nükleotid dizilimlerinde genom boyunca önemli değişiklikler bulunan HCV izolatları için filogenetik analize göre 6 genotip ve 80'den fazla alttip tanımlanmıştır. Genotipler rakamlarla (1'den 6'ya kadar) alttipler ise küçük harflerle (a,b,c...vb) ifade edilir. Genotipler arasında benzerlik oranı %56-72, alttipler arasında %75-86 ve aynı subtipler içinde yer alan kökenler arasında %87.8'den daha fazladır. Bu oran "quasispecies" (türümsü)'lerde oldukça yüksek olup %91-99 arasındadır. Genotip dağılımı risk grupları, yaş ve coğrafi bölgelere göre değişkenlik gösterir. Ülkemizdeki predominant genotip 1b'dir. Türkiye'deki HCV enfeksiyonlarının yaklaşık %75'i 1b, %9'u 1a ve geri kalanı 2a, 3a ve 4'tür. Genotip 1b Güney ve Doğu Avrupa'da, Japonya'da da sık görülür. Yemen, Kuveyt, Irak, Suudi Arabistan'da genotip 4, Güney Afrika'da genotip 5a, Hong Kong'da genotip 6a en sık görülür. İntravenöz uyuşturucu kullananlarda da başlıca genotip 3, 2 ve daha az oranda 1a görülür (23, 35, 36).

Tablo 2. HCV Genotip, Subtip ve Türümsü Tanımları

<i>Terim</i>	<i>Tanım</i>	<i>Nükleotid Benzerlik</i>
Genotip	Farklı virüsler arasındaki heterojenite	%56-72
Subtip	Her genotip içinde birbirine yakın virüsler	%75-86
Quasispecies (türümsü)	Her bir kişideki virüs içindeki genetik varyant kompleksleri	%91-%99

HCV'nin RNA'ya bağımlı RNA polimeraz enziminin "proofreading" (düzeltme okuması) aktivitesinin olmaması nedeniyle genom düzeyinde değişikliği fazladır. Bu durum mutasyonlara neden olmakta ve "quasispecies" (türümsü) oluşmasına neden olmaktadır. Quasispecies'lerin saptanması birkaç şekilde yapılmaktadır. Başlıcaları, klonlama ve ardından sekanslama

(DNA dizi analizi), “hetero duplex gel shift” analizi (GSA), “temperature gradient gel” elektroforez (TGGE) ve “single-strand conformationel polymorphism” (SSCP)’dir.

Mutasyonlar sonucu eskisinden çok az farklar taşıyan yeni virüsler daha avantajlı konuma geçer, böylece baskın olan mutant virüsler çoğalarak enfeksiyonu sürdürür. Tedaviye olan direnç ve bağışıklık sisteminden kaçış bunun tipik bir sonucudur. HCV genomunun her bölgesinde görülen dizi varyasyonu, zarf proteinini kodlayan bölgede (E1 ve E2) diğer bölgelere göre daha fazladır. On yılı geçkin süre içersinde, kişilerdeki HCV enfeksiyonunu sürdüren suşlar incelendiğinde yılda yer değiştirme hızı nükleotid başına 1.44 ile 1.92×10^{-3} olarak hesaplanmıştır (21, 37, 38).

KC hasarı, siroz ve hepatosellüler kanser gelişimi açısından HCV ‘nin genotip ve mutasyonlarının bilinmesi önemlidir. Yine uygulanacak tedavi protokol şeklinin belirlenmesi, prognozun izlenmesinde de genotip ve mutasyonlar önemlidir. HCV’nin özellikle genotip 1b tipi ile oluşan enfeksiyonlarında kronik aktif hepatit ve siroz gelişme riski daha yüksektir. Genotip 1b ile oluşan enfeksiyonlar, genotip 2 ve 3 ile oluşan enfeksiyonlara göre interferon tedavisine daha düşük yanıt verir (39, 23).

Uzun süreli yanıt elde edilen hastalar incelendiğinde, genotip 2 ve 3 ile enfekte olmuş hastalarda, genotip 1b ve 1a ile enfekte olmuş hastalara göre HCV RNA’nın serum, KC ve mononükleer lökositlerden eradikasyonunun daha hızlı olduğu görüldü. Tip 1b ile enfekte, KC transplantasyonu olanlarda diğerlerine göre daha sık ve daha hızlı hepatit oluşur (36).

2.7.Klinik Özellikler

HCV'ye maruz kalan hastaların %15 ile %40'ında enfeksiyon temizlenir (28, 38). Geri kalan %60 ile %85 hastada, kendiliğinden iyileşme çok ender olur ve enfeksiyon kronikleşmeye gider (40).

Kronik KC hastalığının önemli nedenlerinden biri HCV enfeksiyonudur. HCV, kronik KC hastalığının en az %40'ından sorumludur. Dünya sağlık örgütünün raporuna göre 2001 yılında kronik KC hastalığından ölümlerin 280.000'den fazlası HCV enfeksiyonu ile ilişkili bulunmuştur. Yılda 100.000'in üzerinde KC kanseri olgusunda etken HCV'dir. KC transplantasyonlarının başta gelen nedeni kronik HCV enfeksiyonudur.

2.7.1.Akut Hepatit C

Akut Hepatit C olgularının çoğu subklinik ve anikterik seyrettiği için akut dönemde hepatit C'nin tanınması oldukça güçtür. İnkübasyon süresi ortalama 6-8 haftadır. Bu süre 2-26 hafta arasında değişir. Temastan sonra genellikle KC enzimlerinin yükselmesinden 1-4 hafta önce, kanda HCV RNA pozitifleşir. Enfeksiyonun ilk 8-12 haftasında viremi pik yapar. Anti HCV antikorları virus alındıktan 20-150 gün (ortalama 50 gün) sonra pozitifleşir. ALT yükselmesi ise genellikle 4.haftadan sonra olur. Akut hepatit C çoğunlukla asemptomatik olmakla birlikte halsizlik, iştahsızlık, kas ağrısı, bulantı, kusma, sağ üst kadranda ağrısı, idrar renginde koyulaşma gibi semptomlar görülebilir. Sarılık %20'den az olguda görülür. Hastaların %15-20'si tam olarak iyileşirken geri kalan %80-85'i kronikleşir. Yaşlılarda, vireminin yüksek olduğu hastalarda ve erkeklerde kronikleşme riski daha yüksektir. Akut HCV enfeksiyonundan fulminan hepatit gelişimi çok nadirdir. Hastada kronik hepatit B enfeksiyonu olması fulminan hepatit için önemli bir risk faktörüdür.

2.7.2.Kronik Hepatit C

HCV ile enfekte kişilerin %50-80'inde hepatit C enfeksiyonu kronikleşmektedir. Çocuklukta ya da genç erişkin dönemde enfekte olan kişilerde HCV klerensi yaşlılara göre daha yüksektir. Kronik hepatit C'de en sık bildirilen semptom yorgunluktur. İştahsızlık, halsizlik, kilo kaybı, kaşıntı, eklem ağrısı, bulantı gibi semptomlar da görülebilir. Serum ALT düzeyi genellikle normalin 3 katını geçmez ve karakteristik olarak dalgalı seyir gösterir. Bilirubin normal sınırlardadır. Kronik hepatit C'nin ilginç özelliklerinden biri otoantikörlerin oluşmasıdır. Kronik HCV enfeksiyonu otoimmün karakterleri tetikler. HCV ile esansiyel mikst kryoglobulinemi, membranoproliferatif glomerülonefrit ve porfiriya kutena tarda arasında kuvvetli bir ilişki vardır. Bazı hastalarda serumda, tip 2 otoimmün hepatite görülen LKM-1 antikorları tespit edilir. Kronik HCV enfeksiyonunun en önemli sonucu hepatik fibrozisin ve bunun sonucunda siroz ve hepatocellüler karsinom (HCC)'un gelişmesidir. HCV enfeksiyonu alındıktan sonra hastaların %5-20'sinde 10-20 yıl sonra siroz gelişebilir. Fibrozisin ilerlemesi; enfeksiyonun süresi, ileri yaş, erkek cinsiyet, alkol kullanımı, HBV ya da HIV koenfeksiyonu ve düşük CD4 sayısı gibi çeşitli nedenlerle ilişkilidir. Ayrıca hemokromatozis, genotip 3 enfeksiyonu ve şistozomiyazisin fibrozisteki ilerlemeyi hızlandırabileceği bildirilmektedir. Kronik hepatit C'nin en iyi prognostik göstergesi KC histolojisidir. Hafif nekroz ve inflamasyonu, sınırlı fibrozisi olan hastaların prognozu oldukça iyidir, siroza ilerleme oranları düşüktür. Bunun yanında orta ya da şiddetli nekroinflamasyonu ve ya fibrozisi olan hastalarda 10-20 yıl sonra siroza ilerleme ihtimali yüksektir. HCV'ye bağlı siroz oluşursa, hastalar abdominal distansiyon, ödem, kolay ortaya çıkan ciltte morarmalar ya da akolik dışkılamadan yakınırlar (41, 42).

Kronik Hepatit C enfeksiyonunda karşılaşılan başlıca histolojik bulgular 4 tiptedir.

a.Fibrozis yok

Lenfosit, plazma hücreleri, makrofaj ve arada dağılmış eozinofil ve nötrofillerden oluşan portal ve periportal infiltrasyon görülür.

b.Portal alan genişlemesi

İltihabi infiltrasyona bağlı olarak komşu hepatik kordonların birleşme yerlerinde hepatositlerin aktif yıkımı meydana gelir.

c.Köprüleşme, periportal fibrozis

Hepatositlerin ortadan kaldırıldığı lobülün retikulum çatısında çökme ve buna bağlı olarak portal alanlarda santral venler arasında köprüleşme nekrozu oluşur.

d.Septal fibrozis ve siroz

Köprüleşme ve periportal nekrotik hücrelerin yerini fibrozis alır ve siroz gelişir (43).

Kronik HCV enfeksiyonu ya da sirozu olan kişilerde 6 ayda bir ultrasonografi ve α -fetoprotein (AFP) bakılarak HCC yönünden takibi yapılır.

2.7.3.Hepatocellüler Karsinom

Sirozlu hastaların yaklaşık %25'inde 5 yıl içinde son dönem KC hastalığı (özofagus varisi, hepatik ensefalopati) ve HCC gelişir. Siroz oluşuktan sonra HCC'a ilerleme hızı yılda %1-4'tür. Siroza ilerlememiş kronik hepatit C'de HCC riski düşüktür. HCC riski yaşla birlikte anlamlı olarak artmaktadır. HCV enfeksiyonu ileri yaşta kazanılırsa, HCC daha kısa sürede gelişir (41, 42).

2.8.İmmünopatogeneze

HCV, konak hücrede meydana getirdiği hasarı sitopatik etki ile değil immün sistem üzerinden gösterir. Konağa giren virus replikasyonuna devam ettiği için, enfekte konakta oluşan doğal ve edinisel immün yanıt virusu yok etmeye yetmez. Hepatit C enfeksiyonu gelişmesinde hem konağa ait hem de virusa ait faktörler etkili olmaktadır.

Virus sahip olduğu serin proteazları ile interferon üretimini baskılar. E2 ve NS5A ile antiviral ve antiproliferatif özelliği olan protein kinazı inhibe eder, E2 proteini aynı zamanda naturel killer hücrelerinin fonksiyonlarını inhibe eder. *Hepatit C virusu* tüm bu etkileri ile konağın doğal bağışıklığından kendini korur (44, 45).

HCV, dendritik hücrelerin allo stimülasyonunda defekte neden olur ve fonksiyonlarını bozar, oluşan quasispeciesler de virusun avantajlı hale geçmesini sağlar. HCV kor proteinin etkisi ile IFN γ ve IL-2 üretimini inhibe eder. Edinilmiş immün yanıtta bu defektler de kronik HCV enfeksiyonlarından önemli derecede sorumludur (45).

Akut ve kronik hepatitlerde konağın hücresel ve sıvısal yanıtı büyük önem taşımaktadır. HCV enfeksiyonlarının iyileşme ile sonuçlandığı bireylerde, virüse ait proteinler (kor, zarf, NS3, NS4 ve NS5) "antijen presenting cell" (APC) tarafından tanınıp işlendikten sonra major histokompatibilite II (MHC II) molekülleri aracılığıyla CD4⁺ reseptör taşıyan T helper lenfositlerine sunulur. Antijen sunumu ile aktiveleşen bu hücreler interlekin 2 (IL2) salgılayarak B lenfositlerin ve CD8⁺ T sitotoksik lenfositlerin (CTL) aktivitesini düzenler.

Sitokinler, viral enfeksiyona karşı koruyucu rol oynar. Bunu, virus replikasyonunu engelleyerek direkt olarak ya da hücresel immün yanıtı artırarak indirekt olarak yapabilir (46). HCV enfeksiyonunun iyileşme ile sonuçlandığı bireylerde NS3 proteininin 1248-1261. aa'leri arasında yer alan epitopa karşı artan CD4 lenfosit yanıtının olduğu bildirilmiştir.

Bazı araştırmacılar ise HCV enfeksiyonlarında antikor yanıtının zayıf olduğunu; var olan antikorların ise zarf proteinlerinin aşırı glikozillenmiş ve lipoproteinler ile maskelenmiş olması nedeniyle nötralizan epitoplara bağlanamadığını ve virus nötralize edilemediği için enfeksiyonun kronikleştiğini öne sürmektedir.

Kronik HCV olgularının yaklaşık %50'sinde portal alanların merkezinde kazeifikasyon nekrozu olsun ya da olmasın granülom saptanır. Akut hepatit C'de ise granülomlar hiç görülmez.

HCV enfeksiyonunda safra kanalı hasarı, lenfoid follüküller ve / veya agregatlar ve geniş yağ damlacıklarının sıklıkla ortaya çıktığı belirlenmiştir. Öte yandan Mallory cisimlerine benzeyen materyal HCV biyopsi örneklerinde saptanmıştır (47, 22, 23).

2.9.Otoimmunité ve Hepatit C Virusu ile Birlikte Olan Otoimmun Bozukluklar

Organizmayı dış etkenlere (enfeksiyonlara) karşı korumak için özellişmiş işlevlere sahip hücrelerin oluşturduğu sisteme immün sistem denir. Organizmayı korumaya yönelik mekanizmaların kendileri bazen doku hasarına neden olur ki bu otoimmun hastalık olarak isimlendirilir. Patojenlerin ortadan kaldırılmasında doğal ve kazanılmış immunité birlikte işlev görür. Antijenler T ve B lenfositleri tarafından tanınır. T hücreleri taşıdıkları Tcell receptor (TCR) sayesinde, Antijen sunan hücrelerin (APC) major histokompatibilité kompleksi (MHC) ile sundukları antijenleri tanırırlar. B hücreleri de B cell receptor (BCR) görevi yapan yüzey immunoglobulinleri ile antijeni tanırırlar. Normal koşullarda otoantijenlere karşı yanıt oluşmaz, bu seçici cevapsızlık "self-tolerans" olarak isimlendirilir. Tolerans gelişmesi normal immün sistemin ana özelliğidir. Toleransın kaybolması ile immün sistem yabancı ya da otoantijen ayırımı yapmaz. Otoreaktif lenfositler aktive olur, klonal ekspansiyona uğrar ve otoantikör üretirler. Otoimmün

hastalıkların ortaya çıkışında genetik faktörlerin yanı sıra çevresel faktörlerin de rol oynadığı düşünülmektedir (48).

Hepatit C virus infeksiyonu hematolojik, dermatolojik, renal bozukluklar, otoimmün ve nörolojik bozukluklar gibi çok sayıda ekstra hepatik belirti ve bulgulara sahiptir. Kriyoglobulinemi, glomerulonefrit, kutanöz vaskülit ve çeşitli non spesifik otoantikor varlığının HCV infeksiyonu ile ilişkisi kesindir (49).

Antinükler antikor, düz kas antikoru, liver-kidney antikoru sıklığı HCV infeksiyonlu hastalarda yüksektir. Otoantikorları pozitif hastalarda tedavi planlanırken predomınan otoimmün bozukluğun saptanması gereklidir. HCV viremisi olan hastada düşük otoantikor titresi ve genetik olarak otoimmün hastalık yatkınlığı düşünülmüyorsa IFN alfa ile tedavi edilirken, yüksek otoantikor titresi ve klinik olarak otoimmün hastalığı düşündüren bulguları olan hastalarda başlangıç tedavisi olarak steroid ve immün supresif ilaç verilmelidir (49).

2.10.HCV Enfeksiyonunda Tanı

HCV enfeksiyonlarının tanısında serolojik testler ve nükleik asit saptanmasına dayalı moleküler testler kullanılmaktadır.

2.10.1.Serolojik Testler

Serolojik olarak kullanılan yöntem, EIA (Enzym Immun Assay) ile ant-HCV antikorlarını saptar. Oluşan antikorlar immüniteyi değil HCV enfeksiyonunu gösterir.

İlk kuşak EIA testleri tek bir rekombinant HCV klonundan (c-100-3 peptidinden) elde edilmiştir. NS3 geninin bir kısmı ile NS4 geni ürününün neredeyse tamamını içermektedir. Ancak duyarlılık ve özgüllükleri düşük olup serokonversiyonu saptamada yetersiz kalmışlardır.

İkinci kuşak testler kor (c-22-3) ve NS3 (c-33-c) bölgesinden ek rekombinant proteinler içermektedir.

Üçüncü kuşak testlerde ikinci kuşak sistemindeki antijen havuzuna NS5'ten bir rekombinant protein eklenmiştir. Üçüncü kuşak EIA testlerin duyarlılık ve özgüllüğü ikinci kuşak testlerden daha yüksek olup %97-99'dur.

Serokonversiyonu saptamak 3-6 haftayı bulmaktadır. Bağışıklık sistemi bir şekilde baskılanmış kişilerde bu testler yanlış negatif çıkabilir. HIV (Human Immunodeficiency Virus) enfeksiyonu olanlarda, hemodiyaliz hastalarında, HCV ile ilişkili esansiyel mikst kriyoglobulinemisi olanlarda kanda antikor saptanmayabilir. Böyle durumlarda RIBA (recombinant immunoblot assay) testleri ile doğrulama yapılması önerilmektedir. Bu testte başlıca ELISA'da (enzym linked immunosorbent assay) kullanılan antijenler kullanılmakta, ELISA'dan farklı olarak her antijene karşı oluşmuş antikorlar ayrı ayrı saptanabilmektedir. Bu testlerde kullanılan antijenler rekombinant ya

da sentetik özellikte olup en az iki tanesine karşı pozitif değer saptanması testin doğrulanması için yeterli kabul edilmektedir (21, 50).

Serolojik yöntemler kullanılarak akut ya da kronik hepatit ayırımı yapılamamaktadır. Bunun için EIA ile anti-HCV antikoru, PCR ile HCV RNA bakılmalıdır. Enfeksiyondan 1-2 hafta sonra HCV RNA, 4-10 hafta sonra ise anti-HCV pozitifleşir. Ani-HCV'nin negatif, HCV RNA'nın pozitif olması akut hepatit C'nin kuvvetli göstergesidir. Birkaç hafta sonra anti-HCV'nin pozitifleşmesi ile tanı desteklenir. Anti-HCV ve HCV RNA'nın ikisi de pozitif olduğunda akut C hepatiti ile kronik C hepatiti ayırımı yapmak için klinik bulgulardan yararlanılır (51).

2.10.2.Moleküler Testler

2.10.2.1.Kalitatif Testler

FDA tarafından onaylı 3 kalitatif RT-PCR kiti vardır; AMPLICOR 2,0 (Roche Diagnostics, Indianapolis, Ind.), Ampliscreen 2,0 (Roche Diagnostics), UltraQual (National Genetics Institute, Los Angeles Calif.)

Kalitatif testler vireminin doğrulanmasını gerektiren ya da düşük düzeyli viremi durumlarında yararlıdır. Hasta kanında HCV varlığını (viremi) araştırır. Bu pozitif anti-HCV testinin aktif HCV enfeksiyonunu yansıtıp yansıtmamasının araştırılması anlamına gelir. Kalitatif test pozitiflik ya da negatiflik hakkında bilgi vermektedir. Test yarı otomatiktir, bioanalitik bir sistemin tamamı (COBAS) Amplicor testine adapte edilerek testin yarı otomatik hale gelmesi sağlanmıştır. Bu sayede ekstraksiyonun basitleşmesi ve tek tüpte hem ters transkripsiyonun hem de amplifikasyonun gerçekleştirilmesi mümkün olmuştur. Duyarlılık ve özgüllük yüksek kalırken, teknisyenlerin iş başında harcadıkları süre kısalmıştır.

Testin alt saptama sınırı 50 IU/ml olup yapılan iyileşmeler sonucunda, vireminin < 12 IU/ml düzeyinde saptanabileceği öngörülmektedir.

2.10.2.2.Kantitatif Testler

HCV RNA kantitasyonu WHO standardı kullanılarak IU/ml cinsinden standardize edilmiş ve Süper Quant Testinde 2.000.000 kopya/ml'nin 800.000 IU/ml'ye denk olduğu gösterilmiştir.

TaqMan teknolojisi kullanan (Roche Diagnostics ve Abbott Molecular Des Plains, III) iki gerçek zamanlı PCR (RT-PCR) yöntemi kalitatif testle kıyaslanabilir duyarlılıkta, kantitatif ve geniş bir aralıkta doğrusal ($> 6 \log_{10}$) sonuç vermektedir. Gerçek zamanlı yöntemler daha hızlı, otomatize, güvenilir ve maliyet etkindirler. Bu nedenle HCV RNA kantitasyonunda gerçek bir ilerlemeyi temsil ederler. Her iki test de internal kontrol kullanmaktadır. Roche Diagnostics için TaqMan 48 aygıtı kullanılmaktadır. Roche analiz spesifik reaktifler (ASR)'in saptama sınırı 10 ile 71 IU/ml'dir. 1.5 ile 6.5 $\log_{10}$ arasında doğrusal aralığa sahiptir.

RT-PCR düşük orandaki viral materyali saptamakta en güçlü testtir. Testin çok duyarlı olması kontaminasyona bağlı yalancı pozitifliğe yol açar. Ancak son zamanlarda bazı tanı kitleri özellikle otomatize sistemlerin kontaminasyon olasılığını oldukça azaltmıştır. Kantitatif RT-PCR virus miktarını ölçer. Kantitatif test hasta kanındaki virus miktarını uluslararası ünite (IU) olarak verir. Hastalığın prognozunu izlemek için önemli bir testtir.

Diğer bir kantitatif test Branched DNA (bDNA) testidir. Nükleik asit değil sinyalin saptanması ve amplifikasyonu esasına dayanmaktadır. Sonuç olarak kontaminasyona daha az duyarlı olup RT-PCR'a oranla daha yüksek virus düzeyini saptayabilmektedir.

Transcription Mediated Amplification (TMA) ise PCR'dan farklı bir kalitatif testtir ve ml'de 2-5 viruse kadar ölçüm yapılabilir.

2.10.2.3.Genotipleme

Bir hastanın genotipinin bilinmesi, tedavinin süresini ve dozunu yönlendirdiğinden ve tedaviye yanıtın en iyi belirleyicisi olduğundan, önemlidir.

“Line probe assay” (INNO-LIPA HCV II; Bayer) 5’- NCR’den köken alan biotinlenmiş PCR ürünlerinin nitroselüloz şeritler üzerindeki tipe özgü problemlerle hibridizasyonu esasına dayalı bir DNA hibridizasyon testidir. Altı ana genotipi saptayabilir. Mutasyonlar nedeniyle yanlış tipleme olasıdır; bu tür yeni “line probe” paternleri tanımlanmıştır (23, 21, 29).

Tablo 3. HCV Enfeksiyonu Tanı ve Takibinde Kullanılan Testler (21)

Test	Amaç	Yorum
Hepatit C virüsü antikor (Anti-HCV) EIA (Enzyme immunoassay) RIBA (Recombinant immunoblot assay)	İnfeksiyon olduğunu gösterir, ancak akut, kronik ya da iyileşmiş olup olmadığını göstermez Tüm EIA pozitiflikleri RIBA ya da RT-PCR ile doğrulanmalıdır	Duyarlılık % 97’den fazladır Düşük prevalanslı topluluklarda EIA’nın yalancı pozitiflik oranı çok yüksektir. Serokonversiyon geç oluşabilir ve erken yapılan test sonuç vermeyebilir.
Hepatit C virüsü RNA’sı (HCV RNA) 1. Kalitatif testler (RT-PCR)	Virüsü bulaşmadan sonraki 1-2 hafta içerisinde saptar. Tedavi altındaki hastaların takibinde kullanılır.	Örneğin alınması, transportu ve işlenmesi ile ilgili yanlış pozitif ve negatif sonuçlar elde edilebilir.
2. Kantitatif testler (RT-PCR ya da branched DNA (bDNA) testleri)	HCV RNA miktarını saptarlar	Kalitatif HCV RNA’dan daha az duyarlıdır. Tedavi başlangıcında bakılır. 2 log düşme erken virolojik yanıt için anlamlıdır.
Genotipleme	HCV’nin genetik farklılıklarını saptar: 6 genotip, 50’den fazla alttipi belirler Tedavinin süresi belirler	Genotip 1 (1a, özellikle 1b alttipi) Türkiye ‘de en sık rastlanan genotiptir ve varolan tedavilere düşük yanıt gösterir

2.11.Örneklerin Toplanması, Taşınması ve Saklanması

Serolojik testlerde, rutin işlemlerle elde edilen serum ya da plazma örnekleri kullanılabilir. Kantitatif viral RNA tayini için serum tercih edilse de EDTA ya da sitratlı kan örneklerinden elde edilen plazmalar da kabul edilebilir. Heparin PCR tepkimelerinde gerekli Taq polimeraz enzimine bağlandığından heparinli tüplerden kaçınılmalıdır. Kan örnekleri alındıktan sonra en kısa sürede laboratuara ulaştırılmalıdır; örneklerin oda ısısında ulaştırılması kabul edilebilir. Serum örnekleri için, kanın pıhtılaşması beklenmeli ardından 4-6 saat içinde santrifüj edilmelidir. Santrifügasyon sonrasında, serum aseptik koşullarda ayrılmalıdır. Plazma örnekleri de benzer biçimde işlenmeli, santrifügasyon sonrası plazma ayrılmalıdır. PCR tabanlı yöntemler için örneklerin 2 saat içinde ulaştırılması ve işlenmesi yeğlenmektedir; örneklerin 25 C°'de 72 saat tutulmaları viral RNA düzeylerinde hafif fakat önemsiz bir azalmaya neden olmaktadır. İşlenmiş örneklerin – 70 C°'de saklanması optimal olsa da, bir çalışmada -20 C°'de 2 yıldan uzun saklanan örneklerde HCV RNA düzeyinde bir azalma saptanmadığı gösterilmiştir. Yineleyen dondur-çözdür döngülerinden, HCV RNA kaybına neden olabildiklerinden, kaçınılmalıdır (42).

2.12.HCV Enfeksiyonunda Tedavi

Kronik HCV tedavisinde amaç dekompanze siroz ve hepatosellüler karsinom gelişimini, bunlara bağlı ölümleri önleyebilmektir.

İnterferon monoterapisi ile tedaviye 1990'da başlanmış ve ardından 1991'de interferon ve ribavirin kombine tedavisine geçilerek daha etkili yanıt elde edilmiştir. Son yıllarda kronik hepatit C standart tedavisi için peg-interferon ve ribavirin kombinasyonu kullanılmaktadır. Peg-interferon, klasik interferona polietilenglikol (peg) molekülünün eklenmesi ile elde edilmiştir. Peg-interferonun yarılanma süresi daha uzundur. Önceleri haftada 3 gün yapılan injeksiyon tedavileri bu sayede haftada 1 kez olarak değişmiştir.

Peg-interferon ve ribavirin kombinasyonu ile yapılan kronik hepatit C tedavisinde, tedavi süresi ve tedaviye yanıt genotipe bağlı olarak değişmektedir.

Tedavinin 12.haftasında HCV RNA'nın en az 2 log düşmesi ya da negatif bulunması "erken viral yanıt" olarak değerlendirilir. Bu durumda tedavi süresi genotip 1 hastalarda 48 haftaya tamamlanır. Genotip 2 ve 3 hastalarda ise 24 haftalık tedavi yeterli sayılmaktadır.

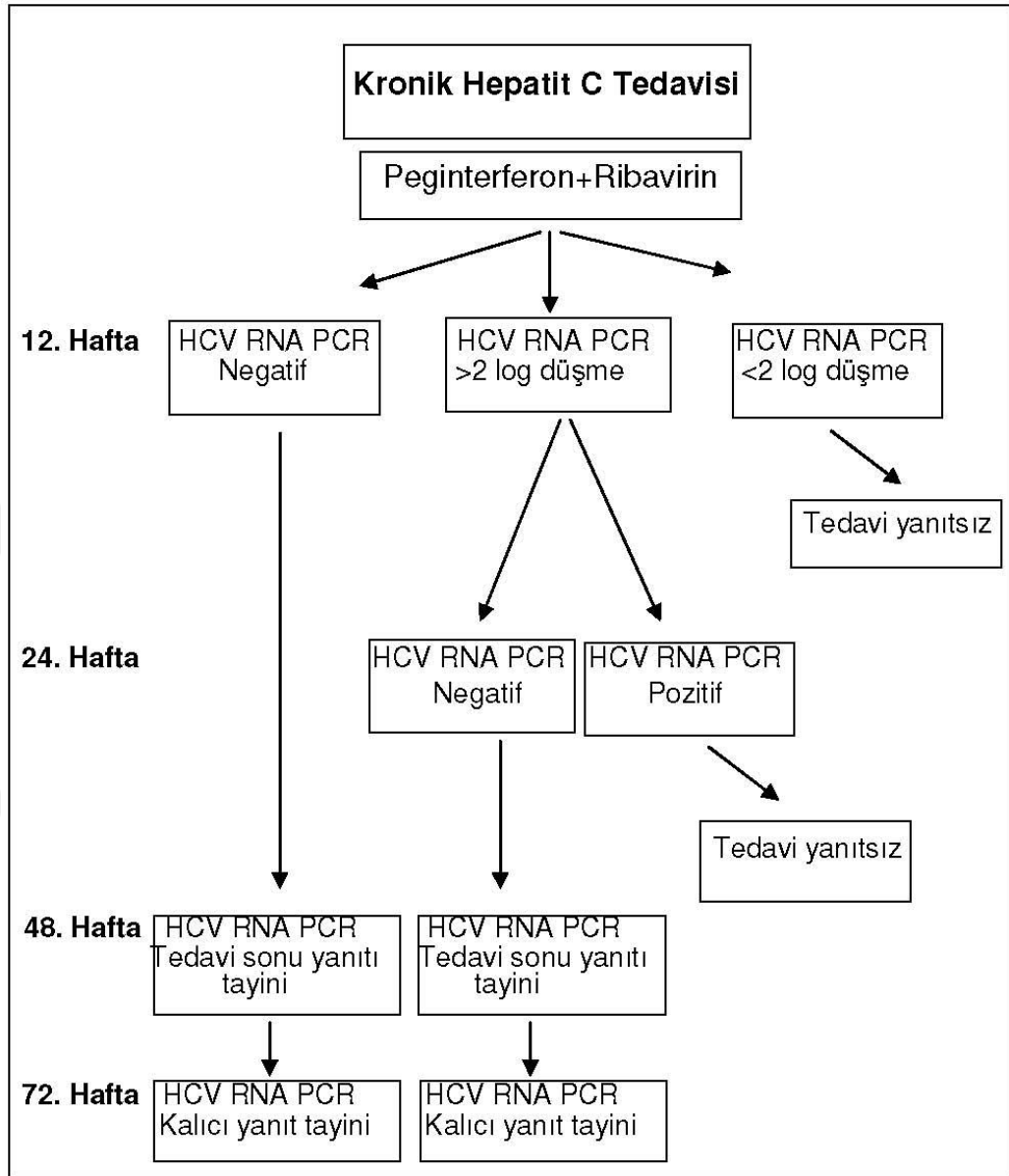
Tedavinin 12.haftasında HCV RNA düzeyinde 2 log düşme var ancak negatifleşme yok ise tedaviye 24. haftaya kadar devam edilir ve 24.haftada tekrar HCV RNA bakılır. 24.haftada hala HCV RNA pozitif ise bu hastalarda kalıcı yanıt beklenmemelidir. 24.haftada HCV RNA negatif bulunursa genotip 1 hastaların tedavileri 48.haftaya kadar sürdürülür.

Tedavi sonunda HCV RNA'si negatifleşen hastalarda, tedavinin bitiminden 24 hafta sonra tekrar HCV RNA bakılır. HCV RNA'sı negatif kalmaya devam eden bu hastalarda kalıcı viral yanıt olduğu kabul edilir.

Peg-interferon ve ribavirin kombinasyon tedavisi alan hastalarda çeşitli yan etkiler ortaya çıkar. Peg-interferon ilişkili yan etkiler; nötropeni, trombositopeni, hipertiroidi ve hipotiroidi, baş ağrısı, bulantı, kusma, hafif dereceli ateş, kilo kaybı, tinnitus, irritabilite, konsantrasyon ve hafıza bozuklukları şeklinde sıralanır. Grip benzeri tablo ve depresyon klasik

interferon ve ribavirin tedavisine göre daha az gelişmektedir. Ribavirin ilişkili yan etkiler; hemolitik anemi, halsizlik, kaşıntı, döküntüler, sinüzit, gut hastalığı ve teratojenite olarak sayılabilir. Özellikle ribavirin nedeniyle gelişebilen doğumsal anomaliler nedeniyle tedavi sırasında ve tedaviden 6 ay sonrasına kadar gebelikten korunulmalıdır. Yan etkiler özellikle tedavinin ilk haftalarında belirgin olmakta ve parasetamol gibi analjezikler, nonsteroid anti-inflamatuvar ilaçlar ve antidepresanlar ile kontrol altına alınabilmektedir. Etkin bir yanıt elde edebilmek için, tedavinin %80'lik periyodunda öngörülen kombinasyon tedavisindeki her iki ilacın da peg-interferon %80 ve ribavirin %80'er ilaç dozları uygulanmaya çalışılmalıdır (80/80/80 kuralı). Kronik hepatit C tedavisinde, özellikle genotip 1 hastalarında daha etkili ve tüm hastalar için daha tolere edilebilir bir tedavi ihtiyacı halen sürmektedir. Ayrıca peg-interferon ve ribavirin kombinasyon tedavisine yanıt alınamayan vakalarda da onaylanmış bir tedavi mevcut değildir. Günümüzde yanıtız vakalar dahil tüm olgular için viramidin, proteaz inhibitörleri veya immünmodülatör tedaviler gibi yeni tedavi alternatifleri üzerinde çalışmalar devam etmektedir (52).

Tablo 4. Kronik HCV Enfeksiyonunda Tedavi Seması



3.MATERYAL ve METOD

01 Mayıs–31 Aralık 2008 tarihleri arasında İzmir Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarında anti-HCV antikoru ve HCV RNA'sı (+) pozitif saptanan 63 kronik HCV hastası ile anti-HCV antikoru ve HCV RNA'sı (-) negatif saptanan 55 sağlam kişiden oluşan kontrol grup çalışmaya alındı. Bu hastalarda otoantikor prevalansını belirlemek için otoantikor düzeyleri test edildi.

Serolojik göstergelerden anti-HCV antikoru, kemilüminesan tekniği kullanılarak VITROS (Ortho-Clinical Diagnostics, Inc. U.S.A) ile çalışıldı.

HCV-RNA düzeyi, real time PCR (gerçek zamanlı PCR) tekniği ile COBAS® TaqMan® HCV test kiti ile (TaqMan HCV, Roche Molecular Systems Inc, Branchburg, N.J.) üretici firma önerileri doğrultusunda çalışılarak belirlendi.

Antinükleer antikor (ANA), antimitokondriyal antikor (AMA), antismooth muscle antikoru (ASMA) Euroimmun firmasının, Mosaic Basic Profile kiti (Euroimmun Lübeck, Germany) kullanılarak, antiliver-kidney mikrozomal antikoru (LKM) Euroimmun firmasının, Liver Mosaic kiti (Euroimmun Lübeck, Germany) kullanılarak indirekt floresan antikor tekniği ile 1/100 sulandırımında çalışıldı. Pozitif olanlar 1/200-1/320-1/640-1/1000 olarak sulandırıldı. 1/100 ve üzerindeki pozitif olarak kabul edildi.

Çalışmaya alınan hasta grubunda HCV RNA düzeyleri 10^4 - 10^7 IU/ml arasında değişmektedir.

Hasta ve kontrol grubunda eşlik eden immünolojik bir hastalık saptanmamıştır.

3.1.Real Time PCR tekniği ile HCV RNA Tespiti

3.1.1 COBAS® TaqMan® HCV Testi Prensibi:

COBAS® TaqMan® HCV testinde 3 aşamalı proses tanımlanmıştır. Proseslerden ilki manuel olarak HCV RNA'nın ekstraksiyonudur. İkinci proses hedef RNA'dan reverse transkripsiyon ile komplementer DNA (cDNA)'nın oluşturulmasıdır. Son proses ise HCV spesifik primerların ve floresanla işaretli oligonükleotid problemların kullanılarak cDNA'dan kantitatif olarak ölçülebilen HCV amplikonlarının oluşmasıdır.

COBAS TaqMan 48 HCV RNA Test kutusunda "High Pure System Viral Nucleic Acid" kiti ve "PCR Reaktifleri (Amplifikasyon ve Deteksiyon)" yer almaktadır.

Tablo 5. High Pure System Viral Nucleic Acid Kiti İçeriği

Lysis/ Binding Buffer (LYS), yeşil kapaklı	2x 25 ml
Carrier RNA (CAR), beyaz kapaklı	2x 2 mg
Proteinase K (PK), pembe kapaklı	2x 100 mg
Inhibitor Removal Buffer (IRB), siyah kapaklı	1x 33 ml
Wash Buffer (WASH), mavi kapaklı	1x 20 ml
ELB, renksiz (Elution Buffer)	1x 30 ml
High Pure System Viral Nucleic Acid Rack (Set RS) Lysis Rack Filter Tube Rack (Waste Rack'ı ile birlikte) Elution Rack Cover Rack	X4 adet
High Pure System Viral Nucleic Acid Waste Rack (WR)	x8 adet

Tablo 6. PCR Reaktifleri (Amplifikasyon ve Deteksiyon)

HCV Quantitation Standard (HCV QS)	2x 1.0 ml
High (+) Control (HCV H(+) C)	2x 1.0 ml
Low (+) Control (HCV L(+) C)	2x 1.0 ml
COBAS TaqMan Negative Control (CTM (-) C)	4x 1.0 ml
COBAS TaqMan HCV Master Mix (HCV MMX)	2x 1.4 ml
COBAS TaqMan Manganese Solution (CTM Mn2+)	2x 1.0 ml

3.1.2.COBAS TaqMan HCV Testi

Çalışmaya başlamadan önce hasta ve kontrol grubuna ait serumlar, test için gerekli reaktifler oda sıcaklığına, ısı bloğu 70 C°'ye, su banyosu 50 C°'ye getirmelidir.

3.1.2.1.Reaktiflerin Hazırlanması:

- 1) 20 ml.%96-%100'lük etanol IRB'ye ilave edilir. 5-10 defa baş aşağı çevirerek karıştırılır.
- 2) 50 ml. %96-%100'lük etanolü WASH Buffer'a ilave edilir. 5-10 defa baş aşağı çevirerek karıştırılır.
- 3) 2 ml.'lik ependorf tüpün içinde Elution Buffer'ı 70 C°'ye ısıtılır. (Her numune için gerekli ELB miktarı 75 µl'dir.)

Test Sayısı	2	24
ElutionBuffer(ml))	.0	4.0

4) Test sayımıza göre aşağıdaki tabloda belirtilen miktarlarda İsoopropanol temiz, steril bir tüp içine alınır.

Test Sayısı	2	24
Isopropanol(ml)	.0	10.0

5) 0,5ml. Elution Buffer, Carrier RNA şişesine ilave edilir. Vortekslenir. Bu 24 TEST için olan miktardır. Kullanılmayan kısım -15/12 C°'de 28 gün saklanabilir.

6) 5 ml Elution Buffer, ProteinazK'ya ilave edilir. Vortekslenir. Bu 24 TEST için olan miktardır. Kullanılmayan kısım -15/12 C°'de 28 gün saklanabilir.

7) Çalışılacak numuneye göre tablodaki bilgiler doğrultusunda Lysis/Binding Solüsyonu hazırlanır.

Test Sayısı	12	24
Lysis/Binding Buffer (ml.)	7	14
Carrier RNA (µl)	140	280
HCV QS (µl)	56	112
ProteinazK(ml.)	1.4	2.8

Eğer donmuş Carrier RNA ve Proteinaz K reaktifleri kullanılacaksa, oda ısısında çözülmesini bekleyip kullanmadan önce baş aşağı çevirerek iyice karıştırılmalıdır.

Belirlenen miktarlarada Lysis/Binding Buffer temiz, steril 50 ml.'lik tübe konur.

Lysis/Binding Buffer ihtiva eden tübün içine, belirtilen miktarda Carrier RNA ilave edilir.

HCV QS şişesi 3-5 sn. vortekslenir ve belirtilen miktar, Lysis/Binding Buffer ve Carrier RNA ihtiva eden tübe ilave edilir.

Tübün kapağı kapatılıp 10-15 defa baş aşağı çevirerek karıştırılır. Kesinlikle vortekslenmez. Vortekslemek solusyonda hava kabarcıklarına neden olur.

Lysis/Binding Buffer, Carrier RNA, HCV QS içeren tüpe belirlenen miktarlarada ProteinazK ilave edilir.

Tübün kapağı kapatılıp 10-15 defa baş aşağı çevirerek karıştırılır. Kesinlikle vortekslenmez. Vortekslemek solusyonda hava kabarcıklarına neden olur.

3.1.2.2.Numune (hasta ve kontrol grubu serumları) ve Test Kontrollerinin Hazırlanması:

1) 625 µl. Lysis/Binding Solüsyonu, Lysis Rack'taki çalışma yapacağımız kuyulara konur. Kapaklar yarı kapatılır.

2) Her bir kuyucuğun kapakları teker teker açılarak 500 µl. Test Kontrolleri ve serumlar uygun kuyucuklara ilave edilir. Kapaklar sıkıca kapatılır.

3) Tüm kontrol ve serumlar konduktan sonra Lysis Rack 10 sn.kadar vortekslenir.

4) Lysis Rack 10 dakika 50 C°'de inkübe edilir. Lysis Rack benmariden alındıktan sonra kurulur.

5) Lysis Rack 10-20 sn. 4600*g'da santrifüjlenir.

6) Kuyucukların kapakları teker teker açılarak, her bir kuyucuğa 250 µl isopropanol konulur. Her ilaveden sonra kapaklar çok sıkı bir şekilde kapatılır.

7) Rack 3 defa baş aşağı çevrilerek karıştırılır. Daha sonra yaklaşık 10 sn vortekslenir.

8) Lysis Rack 10-20 sn.4600*g'da santrifüjlenir.

9) Waste Rack takılı olan Fitler Tube Rack'ının kuyucuklarına, Lysis Rack'taki her bir kuyucuktan 750 µl konulur. Her ilaveden sonra kapaklar sıkı bir şekilde kapatılır.

10) İlave işlemi bittikten sonra Fitler Tube Rack'ı 4600*g'da santrifüjlenir.

11) Lysis Rack'ın kuyucuklarının kapakları tekrar açılarak her bir kuyucukta kalan kısım alınarak Filter Tube Rack'ında karşılık gelen kuyucuğa konulur. Her ilaveden sonra kapaklar çok sıkı bir şekilde kapatılır. Lysis Rack'ı artık atabiliriz.

12) Filter Tube Rack'ı 2 dak. 4600*g'da santrifüjlenir.

13) Filter Tube Rack'ı Waste Rack'ından ayrılır ve yeni bir Waste Rack'ı koyulur.

14) Fitler Tube Rack'ının tüm kapakları açılır. Her kuyucuğa 400 µl IRB konulur. Kuyucukların iç yan yüzeylerine dokunmamaya dikkat edilir.

15) Filter Tube Rack'ı 2 dak. 4600*g'da santrifüjlenir.

16) Fitler Tube Rack'ının tüm kapakları açılır. Her kuyucuğa 700 µl WASH buffer konur. Kuyucukların iç yan yüzeylerine dokunmamaya dikkat edilir.

17) Filter Tube Rack'ı 2 dak. 4600*g'da santrifüjlenir.

18) Filter Tube Rack'ı Waste Rack'ından ayrılır ve yeni bir Waste Rack'ı koyulur.

19) Fitler Tube Rack'ının tüm kapakları açılır. Her kuyucuğa 700 µl WASH buffer konur. Kuyucukların iç yan yüzeylerine dokunmamaya dikkat edilir.

20) Filter Tube Rack'ı 3 dak. 4600*g'da santrifüjlenir.

21) Filter Tube Rack'ı Waste Rack'ından ayrılır. Filter Tube Rack'ı Elution Rack'ına yerleştirilir. Waste Rack'ı atılır.

22) Tüm kapaklar açılır, daha önceden ısıbloğuna konmuş Elution Buffer'dan 75 µl, filtreye dokunmadan filtrenin merkezine konulur. Elution

Bufferı ilave ettikten sonra kapaklar sıkıca kapatılır. Elution Rack'ı, Elution Buffer konulduktan sonra en az 3 dakika oda ısısında bekletilir.

23) Filter Tube Rackı 3 dak. 4600*g'da santrifüjlenir.

24) Filter Tube Rackı Elution Rackından ayrılır. Filter Tube Rackı atılır.

25) Cover Rackı Elution Rackına yerleştirilir. Tüm kapaklar kapatılır.

26) İşlemlenmiş hasta ve kontrol grubu serumları ile test kontrolleri direkt olarak PCR işleminde kullanılabilir. 3 saat içerisinde kullanılmayacaksa Elution Rackı ile birlikte 2-8 C°'de 24 saat ya da 2 ml.lik steril polypropylen tüplerde -20 C ° de 1 hafta süre ile saklanabilir.

3.1.2.3.Amplifikasyon Ve Deteksiyon:

K-Carrier ve K-Carrier tutucusu toz bırakmayan bir bez ile her çalışma öncesi %70 isopropanol ile temizlenir.

Master Mixi hazırlanmadan en az 30 dakika öncesinde, COBAS TaqMan HCV Master Mix (HCV MMX) ve COBAS TaqMan Manganese Solüsyonu (CTM Mn⁺²) oda ısısına getirilmelidir.

Master Mixi hazırlandıktan sonra 1 saat içinde kullanılmalıdır.

Hasta ve kontrol serumları ile test kontrolleri Master Mixe ilave edildikten sonra, amplifikasyon 2 saat içerisinde başlamalıdır.

1) K-carrier, K-carrier tutucusuna yerleştirilir.

2) K tüpler, K-carriere yerleştirilir.

3) K tube Capper ile K tüplerin kapakları açılır. Kapaklar K tube taşıyıcısının yanındaki park pozisyonuna alınır.

4) Master Mixin Hazırlanması (24 test için),

170 µl CTM Mn⁺², bir şişe HCV MMX'e ilave edilir. Şişe baş aşağı çevirilerek 10 defa karıştırılır. Asla vortekslenmez. Master Mix ışıktan korunmalıdır ve 1 saat içinde kullanılmalıdır.

5) Her bir K tübüne, 50 µl MMX ilave edilir.

6) Master Mix ihtiva eden K tüplere, 50 µl hasta ve kontrol serumları ile test kontrolleri, çalışma listesine uygun olarak ilave edilir. Pipet ile çok hassas bir şekilde, hava kabarcığı oluşturmamak kaydı ile 3 kere karıştırılır.

7) K tüplerin kapakları, K tube capper ile kapatılır. 2 saat içinde amplifikasyon başlamalıdır.

3.1.2.4.Hasta Listesi Hazırlanması, Sisteme Yüklenmesi:

1) Bilgisayar açılır, User ID ile password yazılır.

2) COBAS® TaqMan® 48 Analizörü açılır, bilgisayardaki AmpliLink SW'i açılır. User ID ve password girilir.

3) K-carrier hasta listesi oluşturmak için Orders ikonu tuşlanır. Sample tabı seçilir. Sonra New butonuna basılır. Sırasıyla herbir numune için numarası girilir. "HCVHP2" Test seçilir. Save butonuna basarak hafızaya alınır.

4) Orders penceresinde Quality Control tabı seçilir. New butonu tıklanıp, kitin içinden çıkan "Cobas TaqMan HCV Test For Use With The High Pure System Controls Value Card" da yazılı olan bilgilerin girişi yapılır. COBAS TaqMan HCV Test lot numarası, son kullanma tarihi, Low (+) ve High (+) kontrol aralıkları ile lot spesifik kalibrasyon faktörlerinin bilgisi ekranda belirlenen yerlere girilir. "OK" tuşuna basılır.

5) Yine Orders penceresinden K-carrier tabı seçilir. K-carrier penceresinde New tabına basılır. Keypad ya da barkot okuyucu ile K-carrier'in barkotu "K-carrier ID" yazan kısmın sağındaki boşluğa yazılır.

6) Pencerenin en alt kısmında yer alan test panelinden HCVHP2 testi seçilir.

7) Çalışma listesinde Type (T) kolonunun ilk sırası seçilir. Bu alan menu için belirlenir ve gerekli kontrol tipi seçilir. Aynı sırada bulunan sample ID kısmının üstüne iki kere tıklanır. LookUp Control penceresi mevcut tüm kontrol bilgileri için açılacaktır. Kontrol seçildikten sonra buna uygun kalibratör ve kontrol bilgileri, bilgi panelinin sağ alt köşesinde görülecektir. Bu işlemler, gerekli tüm kontroller için tekrarlanır.

8) Çalışma listesine numune girişi yapmak için yine ilk sırayı çift tıklanır. Bu LookUp Sample penceresinin açılmasına neden olur. Daha önce belirlenen numune listesi görülür.

9) Save tuşuna basılarak K-carrier için hazırlanan hasta listesi hafızaya alınır.

10) System tabındaki Systems ikonu seçilir. Open tuşuna basılarak Thermal Cycler açılır. Thermal Cycler'ın "Cover" kapağı tamamiyle açıldığında Systems penceresinde "Ready to Load" yazısı görülür ve Thermal Cycler'ın "Lid" kapağı açılabilir hale gelir. K-carrier taşıyıcı aracılığıyla K-tüplerini içeren K-carrier Thermal Cycler'a yerleştirilir. Thermal Cycler'ın Lid kapağı kapatılır.

11) System penceresindeki TC ikonunun altındaki Start'a basılarak Thermal Cycler'ın "Cover" kapağı kapatılır. Çalışma başlamıştır.

3.1.2.5.Sonuçların Hesaplanması ve Yorumlanması

Cobas TaqMan 48 Analizörü, HCV RNA titresini otomatik olarak hesaplar. HCV RNA titresi International Units (IU/ml) olarak verilir.

COBAS TaqMan 48 Analizörü, HCV RNA ve HCV Kantitasyon Standart RNA'sı için Cycle Threshold (Ct) belirler.

HCV RNA ve Kantitasyon Standart RNA'sı için belirlediği Ct değeri ve lot spesifik kalibrasyon faktörlerine dayanarak HCV RNA titresini belirler.

Daha önceden belirlenmiş aralık içerisinde bulunan HCV L (+) C ve HCV H (+) C'leri için IU/ml titrelerini belirler.

Nümerik olarak verilen bir değer, örneğin [2.3E+05 IU/ml] testin dinamik aralığında bulunan test sonucunu ifade eder.

[<25.00E+00 IU/ml] sonuç geçerli fakat titre, testin belirlenen dinamik aralığının altındadır.

[>3.91E+08 IU/ml] sonuç geçerli fakat titre, testin belirlenen dinamik aralığının üstündedir.

[Target not Detected] sonuç geçerli fakat sonuç tespitedilebilir deteksiyon limitinin altındadır.

[Invalid] sonuç hesaplanamamıştır ve bir hata oluşmuştur.

3.2.İndirekt İmmunfloresan Tekniği İle ANA, AMA, ASMA, LKM Otoantikör Tespiti:

3.2.1.Testin Prensibi:

Bu test kiti serum ya da plazmadaki insan antikorlarının in vitro olarak belirlenmesi için tasarlanmıştır.

Substrat kombinasyonları sulandırılmış hasta örnekleri ile inkübe edilir. Eğer reaksiyon pozitif ise spesifik antikorlar ile antijenler birleşir.

İkinci adımda, antikorlar floresanla işaretli insan immunglobulini ile işaretlenir ve inkübasyon işlemi sonunda floresan mikroskopu ile görüntülenir.

İFA testinde kullanılan slaytlar insan Hep-2 hücresi, maymun karaciğeri, fare böbreği ve fare mide doku kesitleri ile kaplıdır. Slaytların doku kaplı yüzeyine dokunulmamalı, koruyucu kabı zarar gören slaytlar asla kullanılmamalıdır.

Floresan işaretli insan immunglobulini kullanılmadan önce iyice karıştırılmalı ve ışığa duyarlı olduğu için gün ışığından korunmalıdır.

Phosphat Buffer Solution (PBS) hazırlamak için, 1 paket PBS tuzu 1 litre distile suda çözülür ve üzerine 2 ml tween 20 (yağ) eklenerek karıştırılır. Hazırlanan bu karışım +2 C° ile +8 C°de 1 hafta saklanabilir.

Tablo 7. ANA, AMA, ASMA Test Kiti İçeriği

Slide	10 adet
Floresan işaretli anti-human IgG	1x1.5 ml
ANA pozitif kontrol	1x0.25 ml
AMA pozitif kontrol	1x0.1 ml
Negatif kontrol	1x0.1 ml
PBC için tuz (pH 7.2)	2 paket
Tween 20	2x2.0 ml
Medium	1x3.0 ml
Lamel	12 adet

Tablo 8. LKM Test Kiti İçeriği

Slide	10 adet
Floresan işaretli anti-human IgAGM	2x1.5 ml
AMA pozitif kontrol	1x0.5 ml
LKM pozitif kontrol	1x0.1 ml
Negatif kontrol	1x0.25 ml
PBC için tuz (pH 7.2)	2 paket

Tween 20	2x2.0 ml
Medium	1x3.0 ml
Lamel	12 adet

3.2.2.Testin Aşamaları:

- 1) PBS hazırlandı.
- 2) Dilüsyonlar yapıldı. ANA, AMA, ASMA, LKM için 1/100 (990 µl PBS+10 µl serum) dilüsyon yapıldı.
- 3) Polistrien şablonun (reagent tray “reaktif tepsi”) ilk penceresine 25 µl pozitif (+) kontrol, sonraki pencerelere 25 µl hasta serumu konuldu.
- 4) Üzerine BIOCHIP kaplı slayt kapatılarak 30 dak.bekletildi.
- 5) Süre bittikten sonra slaytlar PBS ile yıkanıp içinde PBS olan şalelere yerleştirildi. Burada 5 dak.bekletildi.
- 6) Süre bittikten sonra slaytların doku olmayan arka yüzü gazlı bez ile silindi.
- 7) Temiz yeni bir polistrien şablon alındı, her bir pencereye 20 µl konjugat (floresan işaretli anti insan immunglobulini) konuldu.
- 8) Üzerine BIOCHIP kaplı slayt kapatılarak 30 dak. bekletildi.
- 9) Süre bittikten sonra slaytlar PBS ile yıkanıp içinde PBS olan şalelere yerleştirildi. Burada 5 dak.bekletildi.

10) Süre bittikten sonra slaytların doku olmayan arka yüzü gazlı bez ile silindi.

11) Önce gliserol damlatılan lamların üzerine BIOCHIP kaplı slayt kapatıldı.

12) Değerlendirme immunfloresan mikroskopunda (Zeiss) 20 ve 40'lık objektiflerle iki farklı göz tarafından yapıldı.

İstatistiksel Analizler

Kategorik verilerde Çapraz Tablo, Ki-kare ve Fisher-exact test istatistiksel analiz metodları kullanıldı.

Yaş değişkeni için gruplar arası farkın önem kontrolünde T-test istatistiksel analiz metodu kullanıldı.

İstatistik önem eşik değeri olarak $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Verilerin istatistiksel analizi SPSS (*Statistical Package for Social Sciences*) 11.5 for Windows programı kullanılarak yapıldı.

4.BULGULAR

Hepatit C virüsü ile enfekte kronik karaciğer hastalığı olan 63 kişilik hasta ve *Hepatit C virüsü* ile enfekte olmayan sağlam 55 kişilik kontrol grubuna ait serumlarda anti-HCV antikoru, HCV RNA düzeyi ve ANA, AMA, ASMA, LKM otoantikörlerinin varlığı araştırıldı.

Çalışmaya alınan 63 olgunun HCV RNA değerleri 9 nolu tabloda gösterildiği şekildedir.

Tablo 9. Olgularda Tespit Edilen HCV RNA Değerleri

sıra no	protokol no	isim	cinsiyet	yaş	HCV-RNA(IU/ml)
1	9970313	A.K A	ERKEK	64	1,79E+07
2	8976665	A Ö	ERKEK	49	9,86E+05
3	9944839	A K	ERKEK	46	9,61E+05
4	9898696	A O	ERKEK	53	1,30E+07
5	9820788	A R T	ERKEK	72	5,14E+04
6	9943625	A T	ERKEK	64	2,68E+06

7	9568506	A K	ERKEK	34	1,25E+06
8	9910698	A K	BAYAN	43	8,94E+05
9	9050687	A G	BAYAN	74	8,92E+06
10	9037040	A Ü	BAYAN	74	2,69E+05
11	9280042	B S	BAYAN	40	6,53E+04
12	9702697	C Ö	ERKEK	42	9,05E+05
13	9333515	E T	BAYAN	72	2,40E+07
14	9033630	E A	ERKEK	62	7,12E+04
15	9880837	E A	BAYAN	49	2,00E+07
16	9842311	E Ç	BAYAN	60	9,95E+06
17	9193114	F Ç	BAYAN	43	1,61E+05
18	10084403	G Ç	BAYAN	67	3,56E+07
19	9274546	G A	BAYAN	59	4,82E+06
20	9747852	G G	BAYAN	48	1,69E+06
21	9723846	G Ç	BAYAN	63	1,11E+05
22	9033694	G B	BAYAN	53	9,88E+06
23	9826563	G Ö	BAYAN	71	3,06E+06
24	9503070	G Y	BAYAN	34	1,28E+07
25	9284061	H Ö	ERKEK	67	1,70E+07
26	9939756	H E	BAYAN	54	2,68E+06
27	8950224	H A	BAYAN	67	1,93E+05
28	9928025	H G	ERKEK	70	1,31E+06
29	9246296	İ U	BAYAN	40	1,79E+06
30	9694560	İ B	BAYAN	39	1,57E+06
31	9778939	İ Ü	ERKEK	56	3,45E+06
32	9130336	İ A	ERKEK	58	1,07E+07
33	9967908	M S	BAYAN	37	4,36E+06
34	9502371	M G	ERKEK	38	3,58E+05
35	9730717	M K	BAYAN	40	5,22E+04
36	9471753	M S	ERKEK	65	5,03E+04
37	9957366	M Ç	BAYAN	66	1,41E+06
38	9515554	M K	BAYAN	48	6,14E+06
39	9944721	M Ü	ERKEK	31	1,93E+06
40	10034624	N.T B	BAYAN	68	1.47E+5
41	9891271	N P	BAYAN	41	6,42E+05
42	9045624	N T	ERKEK	70	6,22E+05
43	10118390	O Y	ERKEK	58	1,51E+07
44	10250445	P E	BAYAN	32	1,60E+06
45	9926643	R Y	BAYAN	61	1,06E+05
46	9788998	R S	ERKEK	62	3,27E+07
47	9922350	S K	ERKEK	36	5,34E+05
48	9610224	S A	BAYAN	66	3,00E+06
49	9299464	S Ü	BAYAN	42	9,49E+06

50	9941244	S İ	BAYAN	65	1,61E+07
51	9283963	S Y	BAYAN	38	1,18E+06
52	9833787	S A	BAYAN	59	8,50E+06
53	9912860	S Ö	BAYAN	48	3,39E+06
54	9812946	S A	BAYAN	39	2,13E+05
55	8994348	S E	BAYAN	52	3,01E+05
56	9559797	S S	BAYAN	69	6,48E+05
57	9205420	S V	ERKEK	75	1,19E+07
58	10057047	T G	BAYAN	65	1,45E+05
59	9350617	T K	BAYAN	70	4,32E+05
60	10055851	T V	BAYAN	32	5,41E+04
61	9110718	Ü Y	BAYAN	64	6,16E+06
62	8924944	V Y	BAYAN	59	3,03E+06
63	9512429	Y D	ERKEK	55	3,58E+05

Çalışmaya alınan 63 olgunun ANA, AMA, ASMA, LKM antikorlarına ait bulgular 10 nolu tabloda gösterildiği şekildedir.

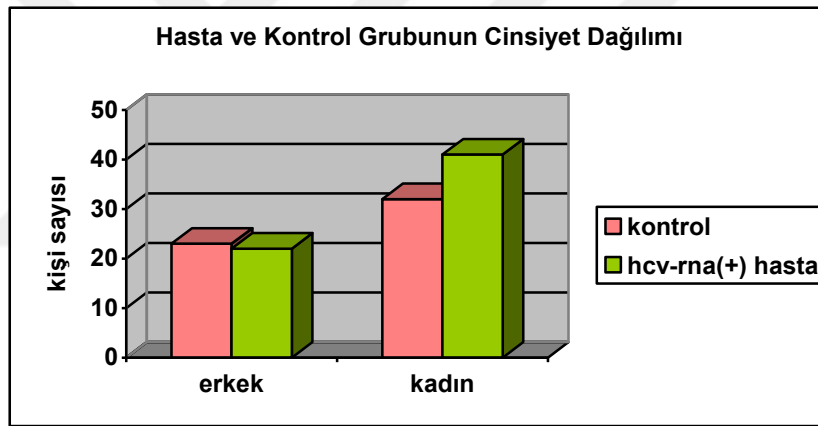
Tablo 10. Olgularda Tespit Edilen Otoantikorların Dağılımı

sıra no	protokol no	isim	ANA	AMA	ASMA	LKM
1	9970313	A.K A	0,0	0,0	0,0	0,0
2	8976665	A Ö	0,0	0,0	1,0	0,0
3	9944839	A K	0,0	0,0	0,0	0,0
4	9898696	A O	1,0	0,0	0,0	0,0
5	9820788	A R T	0,0	0,0	0,0	0,0
6	9943625	A T	0,0	0,0	0,0	0,0
7	9568506	A K	0,0	0,0	0,0	0,0
8	9910698	A K	0,0	0,0	0,0	0,0
9	9050687	A G	0,0	0,0	0,0	0,0
10	9037040	A Ü	0,0	0,0	0,0	0,0
11	9280042	B S	0,0	0,0	0,0	0,0
12	9702697	C Ö	0,0	0,0	0,0	0,0
13	9333515	E T	1,0	0,0	0,0	0,0
14	9033630	E A	0,0	0,0	0,0	0,0
15	9880837	E A	0,0	0,0	0,0	0,0

16	9842311	E Ç	0,0	0,0	0,0	0,0
17	9193114	F Ç	1,0	0,0	0,0	0,0
18	10084403	G Ç	0,0	0,0	0,0	0,0
19	9274546	G A	1,0	0,0	0,0	0,0
20	9747852	G G	0,0	0,0	0,0	0,0
21	9723846	G Ç	0,0	0,0	0,0	0,0
22	9033694	G B	0,0	0,0	0,0	0,0
23	9826563	G Ö	1,0	0,0	0,0	0,0
24	9503070	G Y	0,0	0,0	0,0	0,0
25	9284061	H Ö	0,0	0,0	0,0	0,0
26	9939756	H E	0,0	0,0	0,0	0,0
27	8950224	H A	0,0	0,0	0,0	0,0
28	9928025	H G	0,0	0,0	0,0	0,0
29	9246296	İ U	0,0	0,0	0,0	0,0
30	9694560	İ B	1,0	0,0	0,0	0,0
31	9778939	İ Ü	1,0	0,0	0,0	0,0
32	9130336	İ A	1,0	0,0	0,0	0,0
33	9967908	M S	0,0	0,0	0,0	0,0
34	9502371	M G	0,0	0,0	0,0	0,0
35	9730717	M K	0,0	0,0	0,0	0,0
36	9471753	M S	0,0	0,0	0,0	0,0
37	9957366	M Ç	0,0	0,0	0,0	0,0
38	9515554	M K	0,0	0,0	0,0	0,0
39	9944721	M Ü	0,0	0,0	0,0	0,0
40	10034624	N.T B	0,0	0,0	0,0	0,0
41	9891271	N P	0,0	0,0	0,0	0,0
42	9045624	N T	0,0	0,0	0,0	0,0
43	10118390	O Y	0,0	0,0	0,0	0,0
44	10250445	P E	1,0	0,0	1,0	0,0
45	9926643	R Y	0,0	0,0	0,0	0,0
46	9788998	R S	0,0	0,0	0,0	0,0
47	9922350	S K	0,0	0,0	0,0	0,0
48	9610224	S A	0,0	0,0	0,0	0,0
49	9299464	S Ü	0,0	0,0	0,0	0,0
50	9941244	S İ	0,0	0,0	0,0	0,0
51	9283963	S Y	0,0	0,0	0,0	0,0
52	9833787	S A	1,0	0,0	0,0	0,0
53	9912860	S Ö	0,0	0,0	0,0	0,0
54	9812946	S A	0,0	0,0	0,0	0,0
55	8994348	S E	0,0	0,0	1,0	0,0
56	9559797	S S	0,0	0,0	0,0	0,0
57	9205420	S V	0,0	0,0	0,0	0,0
58	10057047	T G	1,0	0,0	0,0	0,0

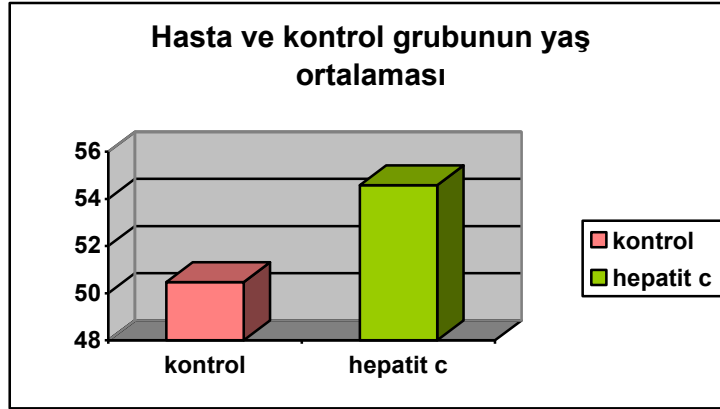
59	9350617	T K	0,0	0,0	0,0	0,0
60	10055851	T V	0,0	0,0	0,0	0,0
61	9110718	Ü Y	0,0	0,0	0,0	0,0
62	8924944	V Y	0,0	0,0	0,0	0,0
63	9512429	Y D	0,0	0,0	0,0	0,0

Hepatit C virusuna bağlı kronik karaciğer hastalığı olan grupta bayanlar %56.2, erkekler %48.9 olarak bulundu. Kontrol grubunda ise bayanlar %43.8 ve erkekler %51,1 olarak bulundu. Hasta ve kontrol grubunun cinsiyetleri arasında istatistiki anlamı olan farklılık saptanmadı (p=0.455). Gruplar cinsiyet bakımından homojen olarak bulundu.



Grafik1. Cinsiyete Göre Hasta ve Kontrol Sayıları

Hepatit C virusuna bağlı kronik karaciğer hastalığı olan grupta yaş 50.47 ± 13.58 yıl olarak bulundu. Kontrol grubunda ise 54.57 ± 13.08 yıl olarak bulundu. Hasta ve kontrol grubunun yaşları arasında istatistiki anlamı olan farklılık saptanmadı (p=0.098). Gruplar yaş açısından homojen olarak bulundu.



Grafik2. Hasta ve Kontrol Grubunun Yaş Ortalaması

Hepatit C virusuna bağlı kronik karaciğer hastalığı olan grup ile kontrol grubu otoantikor pozitifliği yönünden karşılaştırıldığında;

ANA antikoru, hasta grubunda 11 olguda (%17.46), kontrol grubunda 10 olguda (%18.18) pozitif saptandı. Gruplar arasında ANA pozitifliği yönünden istatistiksel anlamı olan fark saptanmadı ($p=0.919$).

Hasta grubunda görülen 11 ANA olgusun HCV RNA düzeyi $\geq 10^5$ olan hastalar ile HCV RNA düzeyi 10^5 'in üzerinde olan hastalardaki dağılımı incelendiğinde sırası ile 2 (%18.2) ve 9 (%81.8) olduğu bulundu. Oran olarak yüksek bulunan bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p=0.176$).

Hepatit C virusuna bağlı kronik karaciğer hastalığı olan grup ile kontrol grubundaki olguların hiç birinde AMA antikoru saptanmadı.

ASMA antikoru, hasta grubunda 3 olguda (%4.76) ve kontrol grubunda 1 olguda (%1.82) pozitif saptandı. Hasta grubu ve kontrol grubu arasında ASMA pozitifliği yönünden istatistiksel anlamı olan fark saptanmadı ($p=0.718$).

Hepatit C virusuna bağlı kronik karaciğer hastalığı olan grup ile kontrol grubundaki olguların hiç birinde LKM antikoru saptanmadı.

ANA pozitifliği saptanan 21 olgunun %57.1'i kadın, %42.9'u erkek olarak bulundu. ASMA pozitifliği saptanan 4 olgunun %75'i kadın, %25'i erkek olarak bulundu.

Hasta grubunda ortalama alt düzeyi 71.2 (18-587), ast düzeyi 65.5 (22-470) olarak bulunmuştur.

Hasta grubunda yer alan 63 hastadan 6'sı interferon tedavisi almaktaydı. Tedavi alan hastaların tümünde otoantikorlar negatif olarak bulunmuştur.

5.TARTIŞMA ve SONUÇ

Karaciğer Hepatit C virus replikasyonunda primer bölgedir. HCV enfeksiyonun ortadan kaldırılması ve kontrol altına alınmasında immün sistemin önemi büyüktür. T lenfositlerle birlikte immünoregülatör sitokinler HCV enfeksiyonuna karşı konağın savunmasında önemli role sahiptir. T helper1 tarafından salınımı uyarılan IL-2 ve IFN γ konağa ait antiviral etkiden sorumludur. T helper 2 tarafından salınımı uyarılan IL-10 ise bu etkinin gelişmesini inhibe etmekten sorumludur (53).

Kronik Hepatit C virus enfeksiyonu olan hastalarda çok sayıda ekstrahepatik bulgular gelişmektedir. HCV hepatotropik ve lenfotropik özelliklerin ikisine de sahiptir. HCV lenfotropizminin, viruse bağılı immünolojik bozuklukların patogeneğinde önemli bir rolü vardır. HCV zarf proteini E2, hepatosit ve B lenfosit üzerinde bulunan CD81 molekülünü bağlar. CD81 B lenfosit yüzeyinde CD21, CD19 VE Leu13 ile birlikte bulunur. E2 ve CD81'in bağlanması ile aktive olan bcl-2 protoonkogeni HCV 'ye bağılı otoimmün

bozukluklara yol açar. Bu protoonkogen, etkisini apoptozu inhibe ederek gösterir.

HCV antijenleri ile konak otoantijenlerindeki moleküler benzerlik (mimicry), B lenfositlerinin aktivasyonu ve otoantikor üretiminden sorumlu tutulan diğer bir mekanizmadır (54).

HCV yüksek düzeyde mutasyona uğramakta ve bu mutasyonlar düzeltilemediğinde escape mutantlar oluşmaktadır. Escape mutantlar kolayca immun sistemden kaçabilmekte ve baskın hale gelerek enfeksiyona neden olmaktadır (44).

Clifford ve arkadaşları 117 kronik hepatit C hastasını incelemişler, ANA sıklığını %14, LKM sıklığını %2, ASMA sıklığını %66 saptamışlardır (55). Çalışmalarına alınan kronik hepatit C hastalarının %55' i interferon tedavisi almıştır. Bizim çalışmamızda 63 kronik hepatit C hastasından 6 kişisi interferon alan hastalardı. Ancak bu hastaların hiçbirinde otoantikor tespit edilmemiştir.

Cacoup ve arkadaşları 1614 kronik hepatit C hastasını incelemişler ve bunların %74'ünde en az bir eksrahepatik bulgu olduğunu bildirmişlerdir. ANA sıklığını %10, ASMA sıklığı %7, LKM sıklığını %2 ve AMA sıklığını %1 olarak belirtmişlerdir (56). Çalışmamızda ANA antikoruna %17.46, ASMA antikoruna %4.76 bulundu ve bu değerlerin literatürle uyumlu olduğu görülmektedir.

Floreani ve arkadaşları 71 Anti-HCV pozitifliği olan hasta ile 142 Anti-HCV'si negatif bireyi otoantikorlar açısından karşılaştırmışlar, Anti-HCV'si pozitif olan hastalarda ANA sıklığını %9.8, ASMA sıklığını %11, ANA ve ASMA'dan en az birinin sıklığını %5 bulmuşlar ve sağlıklı gruba oranla daha yüksek olduklarını tespit etmişlerdir (57). Bizim çalışmamızda hasta grubu ile sağlıklı kontrol grubu arasında otoantikor görülme sıklığı açısından istatistiksel anlamı olan bir fark bulunmamıştır. Floreani ve arkadaşlarının yaptığı bu çalışmada AMA otoantikoru aynı bizim çalışmada olduğu gibi hiç bir hastada tespit edilememiştir.

Fried ve arkadaşları steroid tedavisi alan 17 otoimmün hepatitli hasta ile 62 kronik hepatit C hastasını çalışmalarına dahil etmişler, kronik hepatit C

hastalarında ANA sıklığını %21, bulmuşlar, ANA titresinin otoimmün hepatit hastalarından daha düşük olduğunu ve ANA görülme sıklığının daha çok yaşlı bireylerde gözlemlendiğini ifade etmişlerdir (58). Fried ve arkadaşlarının yaptığı bu çalışmada 62 kronik hepatit C hastasından hiç birinde LKM antikoru saptanmamıştır. Bizim çalışmamızda da 63 kronik hepatit C hastasının hiç birinde LKM antikoru saptanmamıştır.

Bayraktar ve arkadaşları 162 kronik hepatit C hastası ile 41 otoimmün kronik hepatit hastasını karşılaştırmışlar, kronik hepatit C hastalarında ANA sıklığını %63, AMA sıklığını %4 ve ASMA sıklığını %65 olarak bulmuşlar ve bu sonuçların otoimmün hepatitli hastaların sonuçlarına yakın olduğunu tespit etmişlerdir. Ancak kronik hepatit C hastalarının %50' sinin interferon tedavisi aldıklarını bildirmişlerdir (59).

Gatselis ve arkadaşları 102 HCV hastasında antiviral tedavinin etkisini araştırdıklarında ASMA sıklığını %74.5, ANA sıklığını %53.9 ve LKM sıklığını %2.9 olarak bulmuşlardır. AMA hiçbir hastada görülmemiştir (60).

Bizim yaptığımız çalışmada 63 hastadan 6'sı tedavi alıyordu. Bu hastaların hiç birinde otoantikor tespit edilmemiştir. Yukarıda belirtilen iki çalışmadan farklı bir sonuç çıkmasını tedavi alan hastalarımızın sayısının yetersiz olmasına bağlamaktayız. Bunun için daha geniş bir grupta çalışma yapılmasında fayda olacağı kanısındayız.

Cassani ve arkadaşları 290 kronik hepatit C hastasında ANA sıklığını %9, ASMA sıklığını %20 ve LKM sıklığını %6 bulmuşlardır (61).

Singan ve arkadaşları 31 Anti-HCV pozitifliği olan hastayı ve 31 sağlıklı bireyi karşılaştırmışlar, Anti-HCV pozitifliği olan hasta grubunda ANA sıklığını %16, AMA sıklığını %12, kontrol grubunda ANA sıklığını %3, AMA sıklığını %9 olarak bulmuşlardır (62).

Lenzi ve arkadaşları 226 Anti-HCV pozitifliği olan hasta, 87 HBsAg pozitifliği olan hasta ve 226 sağlıklı bireyi karşılaştırmışlar, ANA, AMA, ASMA otoantikorlarını non-spesifik otoantikor (NOSA) olarak belirlemişler; NOSA sıklığını Anti-HCV pozitif olan grupta %75, hepatit B grubunda %6 ve kontrol grubunda %7 olarak tespit etmişlerdir (63).

Daha önce yapılan çalışmalarda hepatit C hastalarında otoantikor görülme sıklığının artmış olduğu tespit edilmiştir.

YAZAR	ANA	ASMA	AMA
Clifford ve ark (55)	%14	%66	%2
Cacoup ve ark (56)	%10	%7	Bakılmamış
Floreani ve ark (57)	%9.8	%11	%0
Fried ve ark (58)	%21	%55	Bakılmamış
216-- (60)	%16		%12
Bayraktar ve ark (59)	%63	%65	%41
Cassani ve ark (61)	%9	%20	Bakılmamış
Bizim Çalışmamızda			
Lenzi ve ark (63)	NOSA: %75		

Bu çalışmada hepatit C hastalarında ASMA otoantikoru görülme sıklığının sağlıklı gruba oranla artmış olduğu gözlemlendi. Ancak bu oransal artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$)

Çalışmaya alınan olgularda AMA ve LKM pozitifliği tespit edilemedi. Daha önce yapılan çalışmalarda kronik hepatit C hastalarında, ANA, AMA, ASMA, LKM pozitifliğinin sıklığı oldukça değişken bulunmuştur. ANA ve ASMA kronik HCV'li hastalarda yüksek prevalansta bulunmaktadır. Kronik HCV hastalarında yapılan çalışmalarda ANA prevalansının %6 ile %22 arasında, ASMA prevalansını da %10 ile %66 gibi oldukça geniş bir aralıkta görülebileceği belirtiliyor (64, 65, 66).

1/100 sulandırımıyla yapılan bir çalışmada ANA %1.1, ASMA %5.5 olarak bulundu. Çalışmada AMA ve LKM otoantikoru pozitif bulunmadı (64).

Anti-LKM görülme prevalansı literatüre göre %0-11 arasıdır. Aynı literatürde ANA için prevalans %6-41 olarak belirtilmiştir (67).

Kronik hepatit C enfeksiyonunun konakta çeşitli immunolojik bozukluklara yol açtığı bilinmektedir. Bunlar içinde otoantikorların oluşumu da yer almaktadır (66).

Yapılan çalışmalar HCV ile infekte yetişkin hastalarda otoantikor varlığını gösterdi. LKM ile HCV enfeksiyonu arasında ilişkiyi gösteren çalışmalar vardır ama araştırmacılar kesin bir sonuca varmamıştır (68). Kronik HCV hastalarında Anti-LKM görülme sıklığı %2-10 arasında belirtilmiştir (69). Bazı literatürlere göre kronik HCV'li hastalarda anti-LKM görülme prevalansı düşük titrede %10'un üzerinde tespit edilmiştir (64). Bazı literatürlere göre ise kronik HCV hastalarında LKM diğer otoantikora göre daha az sıklıkta görülmektedir (70, 65).

Estonya'da kronik HCV'li hastalarda yapılan bir çalışmada ANA %14.4 ve ASMA %43.3 olarak tespit edilmiştir. Çalışma 1/10 dilüsyonda yapıldığı için oranlar bizim çalışmamıza göre oldukça yüksek bulunmuştur (64).

Himoto ve arkadaşları çalışmalarında ANA prevalansının %8-54, AMA prevalansının %0-8, ASMA prevalansının %10-75, LKM prevalansının %0-13 olabileceğini belirtiyorlar (65). Başka bir çalışmada ise ANA prevalansının %10-33, ASMA prevalansının %13-66 olabileceği belirtiliyor (66).

Akashi ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ANA %15, AMA %34, LKM %0,5 olarak tespit edildi (71).

Wilson ve arkadaşları 1/20 titrede çalıştığında ASMA %66 pozitif bulundu. ANA ise 1/80 titrede çalışıldı ve %14 pozitif tespit edildi (72).

Muratori ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada 1/40 dilüsyonda ANA %7, ASMA %13.3, LKM %2.1 olarak bulundu. Hiçbir hastada AMA tespit edilmedi (73).

LUO ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ANA %34, ASMA %5 ve AMA %1 pozitif bulundu (66).

SQUADRITO ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ANA %7.7, ASMA %12.7 pozitif bulundu. Bu çalışmada erkek ve kadındaki yaygınlık benzer bulunmuştur (74).

Muratori ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ANA %9, ASMA %17 ve LKM %11 olarak bulunmuştur (75).

Clifford ve ark. (59) ile Bayraktar ve ark.'nın yaptıkları çalışmalarda ASMA pozitifliği %65 civarındadır. Ancak bu yazarlar çalışmalarına interferon tedavisi alan kronik hepatit C hastalarını da dahil etmişlerdir. Bu çalışmaya interferon tedavisi alan olguların dahil edilmemesi. ve literatürle karşılaştırıldığında olgu sayısının az olması ASMA pozitif olgu olmamasını açıklayabileceğini düşünmekteyiz.

Çalışmamızdaki otoantikör prevalanslarının düşük bulunması çalışma grubunun yeterli sayıda olmamasından kaynaklanabilir. Bunu göz önünde bulundurarak daha büyük sayıda oluşturulan hasta grubunda tekrar bakılmasında fayda vardır.

Prevalanstaki farklılıkların değişik laboratuvarların kullandığı titrasyon eşiklerine bağlı oldabileceği de düşünülmektedir.

ÖZET

HCV enfeksiyonları tüm dünyada giderek büyüyen önemli bir sağlık sorunudur (20, 28). En sık bulaş yolu damar içi ilaç kullanımıdır (30).

HCV'nin 6 genotipi ve 80'den fazla subtipi tanımlanmıştır. Virus yüksek düzeyde mutasyona uğrar ve bu özelliği ile konak immün yanıtından kendini korumayı başarır (35).

Kronik hepatit C virus enfeksiyonu gelişmesinde virusa ve konağa bağlı faktörler etkilidir. Enfeksiyon sırasında bir çok otoimmün hastalık oluşması ve otoantikörlerin saptanması immünolojik mekanizmaların rolünü düşündürmektedir (49).

Çalışma, 01 Mayıs–31 Aralık 2008 tarihleri arasında İzmir Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarına gelen 63 kronik

hepatit C enfeksiyonlu hasta ve 55 sağlam kontrol grubuna uygulandı. Bu iki grupta ANA, AMA, ASMA, LKM otoantikoları incelendi ve gruplar kendi aralarında bu veriler bakımından analiz edildi.

Çalışmamızda anti-HCV antikorı; kemilüminesan tekniği kullanılarak, HCV-RNA düzeyi; real time PCR (gerçek zamanlı PCR) tekniği kullanılarak, ANA, AMA, ASMA, LKM otoantikolar; indirekt floresan antikor tekniği kullanılarak çalışıldı.

ANA otoantikolarının görölme sıklığı hasta ve kontrol grubunda sırası ile %17.46 ve %18.18 olarak bulundu. Bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı.

ASMA otoantikolarının görölme sıklığı oran olarak hepatit C hastalarında (%4.76) kontrol grubuna (%1.82) göre daha yüksek bulunmakla beraber istatistiksel olarak anlamlı değildi. AMA ve LKM pozitifliği ise her iki grupta da saptanmadı.

Sonuç olarak sağaltım yönünü belirlemede otoantikoların varlığını araştırmak önem taşır. İnterferon sağaltımı otoimmun hepatiti tetikler. Kortikosteroidler ise viral replikasyonu artırır. Predominant hastalığa odaklanarak sağaltım önceliğinin belirlenmesi gerekmektedir.

SUMMARY

HCV infections are health problems which increase day by day all around the world. Intravenous drug use is the most seen transmission of HCV.

6 genotypes and more than 80 subtypes of HCV have been defined. Virus incurs high level of mutation and with this character, it prevails to defend itself from host immun response.

In arising of chronic HCV infection, factors related to the virus and host are effective. During the infection, many autoimmun disease and autoantibodies are found. This situation shows the role of immunologic mechanisms.

This study was applied to 63 chronic HCV infected patients and 55 healthy control group who came to the Ataturk Education and Research Hospital Microbiology Laboratory between the dates of 01 May and 31 December 2008. ANA, AMA, ASMA, LKM autoantibodies were studied in this two group and the groups were analysed in terms of this data among themselves.

In our study; chemiluminescence technique was used for anti-HCV antibody, Real Time PCR technique was used for HCV RNA level and indirect fluorescent antibody technique was used for ANA, AMA, ASMA, LKM autoantibodies.

The frequency of ANA autoantibodies in patient and control groups found like %17.46 and %18.18 respectively. This was not statistically significant.

Although the frequency of ASMA autoantibodies as a ratio was higher in hepatitis C patients compared to control group; it was not statistically significant. Positiveness of AMA and LKM wasn't confirmed in both groups.

As a result it is important to research the existence of autoantibodies while determining treatment direction. Treatment of interferon triggers autoimmune hepatitis. Corticosteroids increase viral replication. Determination of treatment priority by focusing on predominant disease is needed.



KAYNAKLAR

1. Suzuki T, Aizaki H, Murakami K, Shoji I, and Wakita T. Molecular biology of *hepatitis C virus*. J Gastroenterol 2007; 42: 411–423.
2. Karataş Ö, Dıraçoğlu D, Ekmekçi A, Mete Ö, Aksoy C. *Hepatit C Virüse* bağlı kriyoglobulinemik vaskülitli bir olgu. Fiziksel Tıp ve Rehabilitasyon. 2008; 54(4): 177-180.
3. Leblebicioğlu H. Kronik *hepatit C*'de güncel tedavi. ANKEM. 2006; 20 (Ek 2): 208-212.
4. Ural O, Arslan U, Fındık D. Konya bölgesinde *hepatit C virusu* genotip dağılımı. İnfeksiyon Dergisi (Turkish Journal of Infection) 2007; 21(4): 175-181.

5. Brass V, Moradpour D, Blum HE. Molecular Virology of *Hepatitis C Virus* (HCV): 2006 Update. International Journal of Medical Sciences. 2006; 3(2): 29-34.
6. Berenguer M. Systematic review of the treatment of established recurrent *hepatitis C* with pegylated interferon in combination with ribavirin. Journal of Hepatology. 2008; 49: 274–287.
7. Özekinci T, Atmaca S, Akpolat N, Temiz H, Arıkan E. HCV İnfeksiyonu Tanısında EIA ve PCR Sonuçlarının Karşılaştırılması. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi. 2005; 35: 123-125.
8. Öztas P, Polat M, Yalçın B, Gür G, Tamer E, Allı N. *Hepatit C Virüs* ile ilişkili deri hastalıkları. Türkiye Klinikleri J Med Sci. 2007; 27: 136-138.
9. Ersöz G, Akarca US, Topalak Ö, Batur Y, Yılmaz, Başdemir G, Erensoy S. Kronik Viral Hepatitlerde Otoantikorlar. Türkiye Klinikleri J Gastroenterohepatology. 1997; 8: 31-35.
10. Muratori P, Muratori L, Verucchi G, Attard L, Bianchi FB, and Lenzi M. Non–Organ-Specific Autoantibodies in Children with Chronic *Hepatitis C*: Clinical Significance and Impact on Interferon Treatment Clinical Infectious Diseases. 2003; 37: 1320–6.
11. Petrova DVS, Tzvetanska AH, Naumova EJ, Mihailova AP, Hadjiev EA et al. Chronic hepatitis C virus infection: Prevalence of extrahepatic manifestations and association with cryoglobulinemia in Bulgarian patients. World J Gastroenterol. 2007; December 28; 13(48): 6518-6528.
12. Himoto Takashi, Nishioka M. Autoantibodies in Hepatitis C Virus-Related Chronic Liver Disease. Hepatitis Monthly. 2008; 8(4): 295-303.
13. Feinman CV, Berris B, Sinclair JC, Wrobel D. Hepatitis non A-non B. CMA Journal. 1980; August 9; V(123): 181-184.
14. Lau JY-N, Fang JW-S, Mizokami M, Gish RG, And Wright TL. Hepatitis C. Principles of Molecular Medicine. Second Edition. Runge MS and Patterson C. Humana Press Inc. Totowa, NJ. 2006; 542-553.

15. Kubo Y, Takeuchi K, Boonmar S, Katayama T et al. A cDNA fragment of hepatitis C virus isolated from an implicated donor of post-transfusion non-A, non-B hepatitis in Japan. *Nucleic Acids Research*. 1989; Volume 17: Number 24: 10367-10372.
16. HLA association with Hepatitis C virus clearance <http://www.irishscientist.ie/2001/contents.asp?contentxml=01p28.xml&contentxml=IS01pages.xml> Nisan 2009
17. Brass V, Moradpour D, Blum HE. Molecular Virology of *Hepatitis C Virus* (HCV):2006 Update. *Int J Med Sci*. 2006; 3: 29-34.
18. Kanda T, Steele R, Ray R, Ray RB. Small interfering RNA targeted to *hepatitis C virus* 5' nontranslated region exerts potent antiviral effect. *J Virol*. 2007; 81: 669-76.
19. McHutchison JG, Bartenschlager R, Patel K, Pawlotsky J.M. Review The face of future *hepatitis C* antiviral drug development: Recent biological and virologic advances and their translation to drug development and clinical practice. *Journal of Hepatology*. 2006; 44: 411–421.
20. Armstrong GL, Wasley A, Simard E.P, McQuillan G.M, Kuhnert W.L. and Alter M.J. The Prevalence of *Hepatitis C Virus* Infection in the United States, 1999 through 2002 *Annals of Internal Medicine* Volume 144: Number 10: 705-714.
21. Türkoğlu S. Hepatit C virusu viroloji ve seroloji. *Viral Hepatit 2007* (Ed.)Tabak F, Balık İ, Tekeli E. Orhan Matbaası. İstanbul. 2007; 228-245.
22. Yenen OŞ. *Hepatiti C*. Willke Topçu A, Söyletir G, Doğanay M ed. *İnfeksiyon hastalıkları*. Nobel Tıp Kitabevi, 1996; 700 I–700 XVI.
23. Abacıoğlu H. *Hepatit C Virus*. Mutlu G, İmir T, Cengiz AT, Ustaçelebi Ş. Tümbay E, Mete Ö ed. *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji*. Ankara: Güneş Kitabevi, 1999; 881–893.
24. Bilgehan H. Mikroorganizma Genetiği. *Temel Mikrobiyoloji ve Bağışıklık Bilimi*. İzmir: Fakülteler Kitabevi, 10. Baskı 2002; 121-152.
25. Brass V, Moradpour D, Blum HE. REVIEW *Hepatitis C virus* infection: in vivo and in vitro models. *Journal of Viral Hepatitis*. 2007; 14 (Suppl.1): 64–67.

26. Yap TL, Xu T, Chen Y.L, Malet H, Egloff M.P, Canard B, Vasudevan SG, Lescar J. Crystal Structure of the Dengue Virus RNA-Dependent RNA Polymerase Catalytic Domain at 1.85-Angstrom Resolution. *Journal Of Virology*. 2007; May; 81(9): 4753–4765.
27. Appel N, Schaller T, Penin F, Bartenschlager R. From structure to function: new insights into *hepatitis C virus* RNA replication. *J Biol Chem*. 2006; Apr; 14(281): 9833-6.
28. Chen SL, and Morgan TR. The Natural History of *Hepatitis C Virus* (HCV) Infection. *International Journal of Medical Sciences*. 2006; 3: 47-52.
29. Ustaçelebi S, Ergünay K. *Hepatit C Virusu*. Ustaçelebi S, Abacıoglu H, Badur S (eds). *Moleküler, Klinik ve Tanısal Viroloji*. Güneş Kitabevi, 2004; 203-209.
30. Flam SL, Parker .A, and Chopra S. Risk Factors Associated With Chronic *Hepatitis C Virus* Infection: Limited Frequency of an Unidentified Source of Transmission. *The American Journal Of Gastroenterology*. 1998; 93(4): 597-600.
31. Stramer SL, Glynn SA, Kleinman SH, Strong M, Caglioti S, Wright DJ, Dodd RY, and Busch MP. Detection of HIV-1 and HCV Infections among Antibody-Negative Blood Donors by Nucleic Acid–Amplification Testing. *The new england journal of medicine*. 2004; 351: 760-8.
32. Terrault N.A. Sexual Activity as a Risk Factor for *Hepatitis C* *Hepatology*. 2002; 36(5); Suppl.1: S99-S105.
33. Hughes JM, Mahy BWJ, Thacker SB, Ward JW, Hewitt SM. Recommendations for Prevention and Control of *Hepatitis C Virus* (HCV) Infection and HCV-Related Chronic Disease. *MMWR Recomm Rep* 1998; 47(RR-19): 1–39.
34. Demirtürk N, Demirdal T, Toprak D, Altındış M, Aktepe OC. *Hepatitis B and C virus* in West-Central Turkey: Seroprevalence in healthy individuals admitted to a university hospital for routine health checks. *Turk J Gastroenterol* 2006; 17(4): 267-272.

35. Combet C, Garnier N, Charavay C, Grando D, Crisan D, Lopez J et al. euHCVdb: the European *hepatitis C virus* database. *Nucleic Acids Res.* 2007; 35: D363-D366.
36. Simmonds P, Bukh J, Combet C, Deleage G, Enomoto N, Feinstone S et al. Consensus proposals for a unified system of nomenclature of *hepatitis C virus* genotypes. *Hepatology* 2005; 42: 962-73.
37. Pawlotsky JM. Virology of *Hepatitis B* and *C viruses* and antiviral targets. *J Hepatol.* 2006; 44(1 Suppl): S10-S13.
38. Ogata N, Alter H J, Miller R H, Purcell R H. Nucleotide sequence and mutation rate of the H strain of *Hepatitis C virus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1991; 88: 3392-3396.
39. Nainan OV, Lu L, Gao F.X, Meeks E, Robertson BH, Margolis HS. Selective transmission of *Hepatitis C virus* genotypes and quasispecies in humans and experimentally infected chimpanzees. *Journal of General Virology.* 2006; 87: 83–91.
40. Watanabe H, Saito T, Shinzawa H, Okumoto K, Hattori E, Adachi T, Takeda T, Sugahara K, Ito J, Saito K, Togashi H, Suzuki R, Hayashi M, Miyamura T, Matsuura Y, and Kawata S. Spontaneous Elimination of Serum *Hepatitis C Virus* (HCV) RNA in Chronic HCV Carriers: A Population-Based Cohort Study. *Journal of Medical Virology.* 2003; 71: 56–61.
41. Akıncı E, Bodur H. HCV enfeksiyonunda klinik ve tanı. *Viral Hepatit 2007* (Ed.) Tabak F, Balık İ, Tekeli E, Orhan Matbaası. İstanbul. 2007; 220-226.
42. Murray PR. Klinik Mikrobiyoloji. Başustaoğlu A. (ed). *Hepatit C ve G Virusleri*, 9.Baskı, Atlas Kitapçılık, Ankara. 2009; 1437-52.
43. Robbins SL, Kumar V. Patoloji. Uluoğlu Ö (çeviri ed). Karaciğer, safra sistemi ve pankreas. 4.Baskı, Güneş Kitabevi, Ankara. 1990; 735-795.
44. Chang K, Rehermann B, Chisari FV. Immunopathology of *Hepatitis C*. *Springer Semin Immunopathol.* 1997; 19: 57-68.
45. Özaras R. Kronik Hepatit B ve C’de immunopatogenez. *Viral Hepatit 2007* (Ed.) Tabak F, Balık İ, Tekeli E, Orhan Matbaası. İstanbul. 2007; 310-317.

46. Banner BF, Allan C, Savas L, Baker S, Barnard G, Bonkovsky HL. Inflammatory markers in chronic hepatitis C. *Virchows Arch.* 1997; 431: 181–187.
47. Scheuer PJ, Krawczynski K, Dhillon AP. Histopathology and detection of *Hepatitis C virus* in liver. *Springer Semin Immunopathol.* 1997; 19: 27-45.
48. Artım B, Esen B, İnanç M. Sistemik Lupus Eritematozus Etyopatogenezinde Virüslerin Rolü. *İst. Tıp Fak. Derg.* 2005; 68: 85-91.
49. Medina J, Garcia L, Buey L, & Moreno R, Otero R. Review article: *Hepatitis C virus*-related extra-hepatic disease aetiopathogenesis and management. *Aliment Pharmacol Ther.* 2004; 20: 129–141.
50. Zein NN. Clinical Significance of *Hepatitis C Virus* Genotypes. *Clinical Microbiology Reviews*, 2000; Apr: 223–235.
51. Lavillette D, Morice Y, Germanidis G, Donot P, Soulier A, Pagkalos E, Sakellariou G et al. Human Serum Facilitates *Hepatitis C Virus* Infection and Neutralizing Responses Inversely Correlate with Viral Replication Kinetics at the Acute Phase of *Hepatitis C Virus* Infection. *Journal Of Virology.* 2005; May: 6023–6034.
52. Taban V, Kalaycı C. Kronik hepatit C güncel tedavisi. *Viral Hepatit 2007* (Ed). Tabak F, Balık İ, Tekeli E, Orhan Matbaası. İstanbul. 2007; 246-254.
53. Akyüz F, Polat N, Kaymakoglu S, Aksoy N, Demir K, Beşışık F, Badur S, Çakaloglu Y, Ökten A. Intrahepatic and peripheral T-cell responses in genotype 1b *Hepatitis C virus*-infected patients with persistently normal and elevated aminotransferase levels. *World J Gastroenterol.* 2005;11(45): 7188-7191.
54. Feri C, Antonelli A, Mascia MT, Sebastiani M, Fallahi P, Ferrari D, Pileri SA, Zignego AL. HCV-related autoimmune and neoplastic disorders: the HCV syndrome. *Digestive and Liver Disease.* 2007; 39(Suppl.1): S13-S21.

55. Clifford BD, Donahue D, Smith L, Cable E, Luttg B, Manns M, Bonkovsky HL. High prevalence of serological markers of autoimmunity in patients with chronic hepatitis C. 1995; 21(3): 613-619.
56. Cocoup P, Poynard T, Ghillani P, et al. Extrahepatic manifestations of chronic hepatitis C. *Arthritis Rheum.* 1999; 42: 2204-2212.
57. Floreani A, Beterle C, Carderi I, Presotto F, Pedini B et al. Is *Hepatitis C virus* a risk factor for thyroid autoimmunity? *Journal of Viral Hepatitis.* 2006; 13: 272–277.
58. Fried MW, Draguesku JO, Shindo M, Simpson LH, Banks SM, Hoofnagle JM, DiBisceglie AM. Clinical and serological differentiation of autoimmune and *Hepatitis C virus* related chronic hepatitis. *Dig Dis Sci.* 1993; 38: 631-636.
59. Bayraktar Y, Bayraktar M, Gürakar A, Hassanein TI, Van Thiel DH. A comparison of the prevalence of the autoantibodies in individuals with chronic hepatitis C and those with autoimmune hepatitis: the role of interferon in the development of autoimmune diseases. *Hepatogastroenterology* 1997; 44 (14): 417-425.
60. Gatselis NK, Georgiadou SP, Koukoulis GK et al. Clinical significance of organ- and non-organ-specific autoantibodies on the response to anti-viral treatment of patients with chronic hepatitis C. *Aliment Pharmacol Ther.* 2006; 24: 1563–1573.
61. Cassani F, Cateleta M, Valentini P, Muratori P, Giastra F, Francesconi R et al. Serum autoantibodies in chronic hepatitis C: comparison with autoimmune hepatitis and impact on the disease profile. *Hepatology.* 1997; 26:3.
62. Singan M, Eskioğlu E, Üstündağ Y, Köseoğlu T, Üner E, Sezer K. Anti- HCV antikor pozitif hastalarımızda ANA, AMA ve anti- LKM-1 antikorlarının varlığı. *Türkiye Tıp Dergisi* 2001; 8(4): 161-165.
63. Lenzi M, Bellontoni S, Saccoccio G, Muratori P, Masutti F, Muratori L, Cassani F, Bianchi FB, Tribelli C. Prevalence of nonorgan-specific autoantibodies and chronic liver disease in the general population: a nested case-control study of the Dionysos cohort. *Gut* 1999; 45: 435-441.

64. Zusinaite E, Metsküla K, Salupere R. Autoantibodies and hepatitis C virus genotypes in chronic hepatitis C patients in Estonia. *World J Gastroenterol* 2005;11(4): 488-491.
65. Himoto T, Nishioka M. Autoantibodies in Hepatitis C Virus-Related Chronic Liver Disease. *Hepatitis Monthly* 2008; 8(4): 295-303.
66. Luo J.C, Hwang S.J, Li C.P, Lu R.H, Chan C.Y, Wu J.C, Chang F.Y And Lee S.D. Clinical significance of serum auto-antibodies in Chinese patients with chronic hepatitis C: Negative role of serum viral titre and genotype. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 1998; 13: 475-479.
67. Bogdanos D, Bogdanos P, Mieli G, Vergani G, and Vergani D. Non–Organ-Specific Autoantibodies in Hepatitis C Virus Infection: Do They Matter? *Clinical Infectious Diseases* 2005; 40:508–10.
68. Abe K, Miyakawa H, Miyachi K, Kako M, Furue H. Anti-Liver/Kidney Microsome-1-Positive Chronic Hepatitis C Responding to Interferon with Type I Cryoglobulinemia. *Internal Medicine* 1995; 34: 1114-1119.
69. Be´land K, Lapierre P, Marceau G, Alvarez F. Anti-LC1 autoantibodies in patients with chronic hepatitis C virus Infection. *Journal of Autoimmunity*. 2004; 22: 159–166.
70. Ramos M, Casals M, Pares A, Jara L.J, Solans R, Vinas O, Va´zquez P, Sa´nchez J.M, Tapias J.M, Rode´s J, Font J. Antimitochondrial antibodies in patients with chronic hepatitis C virus infection: description of 18 cases and review of the literature. *Journal of Viral Hepatitis*. 2005; 12: 648–654.
71. Akashi Y, Inoh M, Seto K, Gamo N, Kuboki M, And Kurata N. Autoantibody in a patient with chronic hepatitis C virus infection showing complete remission after interferon therapy. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 2002; 17: 925–928.
72. Wilson LE, Widman D, Dikman SH, and Gorevic PD. Autoimmune Disease Complicating Antiviral Therapy for Hepatitis C Virus Infection. *Semin Arthritis Rheum* Copyright 2002; 32:163-173.
73. Muratori P, Muratori L, Guidi M, Granito A, Susca M, Lenzi M and Bianchi FB. Clinical Impact of Non–Organ-Specific Autoantibodies on the

Response to Combined Antiviral Treatment in Patients with Hepatitis C. *Clinical Infectious Diseases* 2005; 40: 501–7.

74. Squadrito G, Previti M, Lenzi M, Pagano Le Rose E, Caccamo G, Restuccia T, Cesare ED, Pollicino T, And Raimondo G. High Prevalence of Non-Organ-Specific Autoantibodies in Hepatitis C Virus-Infected Cirrhotic Patients from Southern Italy. *Digestive Diseases and Sciences*. 2003; 48(2): 349–353.

75. Muratori P, Muratori L, Verucchi G, Attard L, Bianchi FB, and Lenzi M. Non–Organ-Specific Autoantibodies in Children with Chronic Hepatitis C: Clinical Significance and Impact on Interferon Treatment. *Clinical Infectious Diseases* 2003; 37: 1320–6.