



**T.C. SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ, HAYDARPAŞA
NUMUNE SAĞLIK UYGULAMA VE ARAŞTIRMA MERKEZİ**

**HEPATİT C VİRÜS ENFEKSİYONU OLAN HASTALARDA
VİREMİ TESPİTİNDE ANTİ-HCV S/CO DEĞERİ
ARAŞTIRILMASI**

DR. GÜLDEN AYDIN

TIPTA UZMANLIK TEZİ

İSTANBUL/2019



**T.C. SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ, HAYDARPAŞA
NUMUNE SAĞLIK UYGULAMA VE ARAŞTIRMA MERKEZİ**

**HEPATİT C VİRÜS ENFEKSİYONU OLAN HASTALARDA
VİREMİ TESPİTİNDE ANTİ-HCV S/CO DEĞERİ
ARAŞTIRILMASI**

DR. GÜLDEN AYDIN

**Tez Danışmanı
DOÇ. DR. RIZA ADALETİ**

TIPTA UZMANLIK TEZİ

İSTANBUL/2019

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	i
KISALTMALAR.....	ii
TABLO LİSTESİ.....	v
ŞEKİL LİSTESİ.....	vi
ÖZET.....	vii
ABSTRACT.....	ix
GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
GENEL BİLGİLER.....	3
GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	16
BULGULAR.....	24
TARTIŞMA.....	42
SONUÇ VE ÖNERİLER.....	52
KAYNAKLAR.....	54
ÖZGEÇMİŞ.....	58
EK 1. TEZ KONUSU ONAY FORMU.....	60

TEŞEKKÜR

Her türlü bilimsel konuda desteğini esirgemeyen, değerli hocam, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. Sebahat AKSARAY’a,

Tez konumun belirlenmesinden yazımına kadar her aşamada desteğini gördüğüm, bilgi ve tecrübelerini bizimle paylaşmaktaki samimiyetini örnek aldığım, her zaman bizim daha iyi yetişmemiz için uğraşan tez danışmanım, Sayın Doç. Dr. Rıza ADALETİ’ye,

İstatistik bilgisi ile mikrobiyoloji bilgisini en güzel şekilde harmanlayan ve tezimin istatistiğinde çok büyük emeği olan Uzm. Efe Serkan BOZ’a, gereç ve yöntemler bölümünü yazmamda çok yardımları olan Uzm. Dr. Muhterem YÜCEL’e ve yardımlarını esirgemeyen diğer uzmanlarımıza,

Her zaman bulunduğumuz ortamı güzelleştiren, asistan odamızı cıvıl cıvıl hale getiren, iyi ya da kötü günümde yanımda olan, işe hep mutlu ve istekli gelmemi sağlayan yardımsever, güler yüzlü asistan arkadaşlarıma,

Çalışma hayatındaki en büyük yardımcılarımız, çalışkan ve disiplinli teknisyen arkadaşlarıma,

Beni her türlü zorluklara rağmen bugünlere getiren, canım babam Mürsel GÜLEŞEN ve canım annem Atike GÜLEŞEN’e, kardeşlerim Gülten ve Samet’e,

Gerek asistanlık süresince, gerek tez yazarken ya da sınava hazırlanırken zamanlarımdan çaldığım, stresimi paylaşmak zorunda bıraktığım, eşim Mehmet Semih AYDIN’ a ve canımın içi biricik kızım yavrum Mahinurum’a,

En içten teşekkürlerimle...

KISALTMALAR

ALT	Alanin aminotransferaz
bDNA	branched DNA
CD 81	Cluster of Differentiation 81
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
cDNA	Komplementer DNA
CLIA	Chemiluminescence Immunoassay
CMIA	Chemiluminescence Microparticle Immunoassay
C_T	Threshold cycle
D1	Domain 1
D2	Domain 2
D3	Domain 3
DNA	Deoksiribonükleik Asit
E1	Envelope 1
E2	Envelope 2
EDTA	Etilendiamin Tetra Asetik Asit
EGF	Epidermal Growth Factor
EIA	Enzyme Immunoassay
EQUATOR	Enhancing the Quality and Transparency of Research
HBsAg	Hepatit B surface Antigen
HCV	Hepatit C Virüsü
HCVkAg	Hepatit C Virüs Kor Antijeni
HIV	Human Immunodeficiency Virus

HVR	Hypervariable Region
IRES	Internal Ribosomal Entry Site
LDH	Laktat Dehidrogenaz
LDL	Low Density Lipoprotein
LIA	Line Immunoassay
LIPA	Line Prob Assay
MEIA	Microparticle Enzyme Immunoassay
NAD	Nikotinamid Adenin Dinükleotid
NK	Natural Killer
NS	Non Structural
NTPaz	Nükleozid Trifosfataz
ORF	Open Reading Frame
QS	Quantitation Standards
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
RIBA	Recombinant Immunoblot Assay
RLU	Relative Light Units
RNA	Ribonükleik Asit
ROC	Received Operator Characteristics
RT-PCR	Reverse Transcriptase Polimerase Chain Reaction
SR-BI	Scavenger receptor BI
S/CO	Sample/Cut-off
TMA	Transcription Mediated Amplification
TRIPOD	Transparent Reporting of a multivariable prediction model for Individual Prognosis Or Diagnosis

UTR Untranslated Region



TABLO LİSTESİ

Tablo 1: Olguların demografik özelliklere göre dağılımı.....	24
Tablo 2: Hasta verilerinin kliniklere göre dağılımı.....	25
Tablo 3: Olguların tanılara göre dağılımı.....	26
Tablo 4: Olguların genotiplere göre dağılımı.....	28
Tablo 5: Anti-HCV deskriptif analiz değerleri.....	30
Tablo 6: Alanin aminotransferaz deskriptif analiz değerleri.....	31
Tablo 7: Alanin aminotransferaz ve anti-HCV değerlerinin HCV RNA sonucuna göre değerlendirilmesi.....	32
Tablo 8: Yeni anti-HCV cut-off değeri ile HCV RNA karşılaştırılması.....	35
Tablo 9: Yeni anti-HCV cut-off değerimizin HCV viremi tanısındaki performansı.	35
Tablo 10: Yeni ALT cut-off değeri ile HCV RNA karşılaştırılması.....	38
Tablo 11: Yeni ALT cut-off değerimizin HCV viremi tanısındaki performansı.....	38
Tablo 12: Anti-HCV ve ALT cut-off değerlerinin HCV RNA durumu ile karşılaştırılması.....	40
Tablo 13: Anti-HCV ve ALT cut-off değerlerinin HCV viremi tanısındaki performansı.....	40
Tablo 14: Alanin aminotransferaz ve anti-HCV değerlerinin genotip sonucuna göre değerlendirilmesi.....	41

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1: Hepatit C virüs genomunun yapısı ve poliprotein işlenmesi.....	5
Şekil 2: Hepatit C virüs replikasyon döngüsü.....	8
Şekil 3: Hepatit C virüs tanısında direkt ve indirekt testler.....	11
Şekil 4: Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezleri 2013 HCV tanı algoritması.....	13
Şekil 5: Araştırmamızın analitik basamakları.....	18
Şekil 6: Olguların genotip dağılımı.....	27
Şekil 7: Anti-HCV dağılımı.....	30
Şekil 8: Alanin aminotransferaz dağılımı.....	31
Şekil 9: Hepatit C virüs RNA değerine göre anti-HCV S/CO için ROC eğrisi.....	33
Şekil 10: Yeni anti-HCV cut-off değerimize göre HCV RNA durumu grafiği.....	34
Şekil 11: Hepatit C virüs RNA değerine göre ALT için ROC eğrisi.....	36
Şekil 12: Yeni ALT cut-off değerimize göre HCV RNA durumu grafiği.....	37
Şekil 13: Anti-HCV ve ALT cut-off değerleri birlikte kullanıldığında HCV RNA durumu grafiği.....	39
Şekil 14: Çalışmamızın sonunda laboratuvarımız için oluşturduğumuz HCV tanı algoritması.....	50

ÖZET

AMAÇ

Hepatit C virüsü enfeksiyonlarının laboratuvar tanısında anti-HCV testleri ve HCV RNA testleri kullanılmaktadır. Anti-HCV testleri düşük maliyetli ve duyarlılığı yüksek olması nedeniyle tarama testi olarak önerilmektedir. Tarama testi reaktif bulunan örnekler HCV RNA testi ile doğrulanmaktadır. HCV RNA testi ise maliyeti yüksek ve ileri düzey teknik gerektiren bir test olması sebebiyle her laboratuvarında çalışılmamakta bu durum hastaların tanı ve tedavisinin gecikmesine yol açmaktadır. Ayrıca HCV prevalansı düşük olan toplumlarda yalancı pozitif anti-HCV test sonuçları sık olarak gözlenmektedir. Çalışmamızda anti-HCV, ALT ve HCV RNA arasındaki ilişkinin retrospektif değerlendirilmesi ve elde edilecek verilerin analizi ile laboratuvarımız için hastalardaki gerçek antikor pozitifliğini ve viremiyi göstermede optimal bir anti-HCV S/CO cut-off değeri elde edilmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamız 1 Temmuz 2014 - 1 Temmuz 2017 tarihleri arasında 18 yaş üzeri anti-HCV reaktifliği olan ve aynı serumda eş zamanlı HCV RNA ve ALT testi çalışılan 1290 olgunun 1754 verisi ile yapılmıştır. Anti-HCV testi kemilüminesan immunassay yöntemi ile HCV RNA analizi kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu ile çalışılmıştır. En uygun kesim noktası (cut-off point) ROC eğrisi analizine dayalı seçilmiştir. İstatistiksel anlamlılık $p < 0.05$ düzeyinde değerlendirilmiştir.

BULGULAR

Çalışmamızda üç yıllık dönemde 754.190 anti-HCV testi çalışılmıştır. Bu sonuçlardan 10.679 test sonucu reaktif bulunmuştur. Hepatit C seroreaktivite oranımız çalışmamıza dahil edilen dönem için %1.4 olarak hesaplanmıştır.

Sonuçların 742'sinde (%42.3) HCV RNA sonucu pozitif iken, 1012'sinde (%57.7) negatiftir.

HCV RNA' ya göre anti-HCV için tespit edilen cut-off noktası 7.13 (duyarlılık %97.4, özgüllük %50.3, pozitif prediktif değer %59, negatif prediktif değer %96.4) bulunmuştur.

HCV RNA' ya göre ALT için tespit edilen cut-off noktası 27.5 IU/L bulunmuştur (duyarlılık %77.6, özgüllük %80.8, pozitif prediktif değer %75, negatif prediktif değer %83.1).

TARTIŞMA

Günümüzde yüksek duyarlılığı, düşük maliyeti, çok fazla teknik beceri gerektirmemesi ve otomatize cihazlarla çalışılabilme imkanı, test sonuçlanma süresinin kısa olması gibi nedenlerle birçok laboratuvarında kullanımda olan anti-HCV antikor testleri, HCV tanı ve taramasında vazgeçilmez bir yöntemdir. Ancak ülkemiz gibi HCV prevalansının düşük olduğu toplumlarda yalancı pozitif test sonuçları sıktır. Yeni cut-off değerimizin laboratuvar iş akışı içerisinde kullanılmasıyla birlikte yalancı pozitif anti-HCV test sonuçları ve buna bağlı olarak gereksiz yere çalışılan HCV RNA test sayıları azalabilir. Yeni anti-HCV cut-off değerimize göre cut-off değerinin altındaki reaktivliklerde, HCV enfeksiyonlarını takip eden klinikler, HCV RNA sonucunu beklemeden hasta tarama amaçlı geldiyse yalancı pozitif bir sonucu ya da tedavi alan bir hasta ise verilen tedavinin başarısını öngörebilir.

Anahtar Kelimeler: Anti-HCV, HCV RNA, ALT

ABSTRACT

AIM

Anti-HCV tests and HCV RNA tests are used in the laboratory diagnosis of hepatitis C virus infections. Anti-HCV tests are recommended as screening tests due to their low cost and high sensitivity. Samples with screening test reactive are confirmed by HCV RNA test. The HCV RNA test does not work in every laboratory because it is a high-cost test and requires a high-level technique and this leads to delay in the diagnosis and treatment of patients. In addition, false positive anti-HCV test results are frequently observed in populations with low HCV prevalence. In our study, we aimed to retrospectively evaluate the relationship between anti-HCV, ALT and HCV RNA and to obtain an optimal anti-HCV S/CO cut-off value for our laboratory to show the true antibody positivity and viremia in patients.

MATERIAL AND METHOD

Our study was performed on 1 July 2014 - 1 July 2017 with 1754 data of 1290 cases with anti-HCV reactivity over 18 years of age and concurrent HCV RNA and ALT test in the same serum. The anti-HCV test was studied by the chemiluminescence immunoassay method and the HCV RNA test was performed by quantitative real-time polymerase chain reaction. The cut-off point was chosen based on the ROC curve analysis. The statistical significance was evaluated at $p < 0.05$.

RESULTS

In our study, 754.190 anti-HCV tests were performed in a 3-year period. 10.679 test results were found as reactive. Our rate of hepatitis C seroreactivity was calculated as 1.4% for the period included in our study.

The HCV RNA result was positive in 742 (42.3%) of the results, whereas in 1012 (57.7%) HCV RNA result was negative.

According to HCV RNA, cut-off point 7.13 (sensitivity 97.4%, specificity 50.3%, positive predictive value 59%, negative predictive value 96.4%) was found for anti-HCV.

The cut-off point determined for ALT according to HCV RNA was 27.5 IU/L (sensitivity 77.6%, specificity 80.8%, positive predictive value 75%, negative predictive value 83.1%).

CONCLUSION

Currently in use in many laboratories for anti-HCV antibody tests, high sensitivity, low cost, the possibility to work with automated instruments, test result time it is an indispensable reasons HCV screening and diagnosis as being short method. In countries with low prevalence of HCV such as our country, false positive test results are common. With the use of our new cut-off value in laboratory workflow, false positive anti-HCV test results and therefore the number of unnecessary HCV RNA tests can be reduced. Clinics following HCV infections may predict a false positive result if the patient has come for screening, or a patient receiving treatment, without waiting for HCV RNA results in the reactivity below the cut-off value compared to our new anti-HCV cut-off value.

Key Words: Anti-HCV, HCV RNA, ALT

GİRİŞ VE AMAÇ

Geçmişte non-A non-B hepatit etkeni olarak bilinen Hepatit C virüsü (HCV), enfeksiyonlarının çoğunun kronik enfeksiyon şeklinde seyretmesi ve karaciğer karsinomuna ilerlemesi nedeniyle virüsün ilk keşfinden bu yana önemli bir halk sağlığı sorunudur.

En önemli bulaş yolunun kan ve kan ürünleri olduğunun anlaşılmasının ardından hastalarda HCV'ye karşı gelişen antikorların olup olmadığını araştırmak amacıyla bazı testler geliştirilmiştir. Bu testler ile anti-HCV antikorları, genellikle enzim immün yöntemler (enzyme immunoassay; EIA) veya kemilüminesans immün yöntemler (chemiluminescence immunoassay; CLIA) kullanılarak tespit edilmektedir. Bu yöntemlerin ortak mekanizması; HCV antijenlerinin katı bir faza bağlanarak hareketsizleştirilmesi ve hasta serumunda bulunan anti-HCV antikorları ile bu antijenin birleşmesinin sağlanması sonrasında, bu özgül birleşmenin işaretli anti insan antikoru kullanılarak gösterilmesidir. Bu aşamalardan sonra EIA yönteminde renk değişimi, CLIA yönteminde ise yayılan ışık ölçülerek absorbans değerleri elde edilmektedir. Hasta serumu (sample) absorbans değerinin, cihazın eşik değer (cut off) absorbans değerine oranlanmasıyla elde edilen sample/cut off (S/CO) değerleri ile anti-HCV sonuçları raporlanmaktadır. Üretici firmalar tarafından reaktiflik sınırı genellikle anti-HCV S/CO ≥ 1 olarak önerilmektedir.

Anti-HCV testi HCV tanı algoritmasında ilk basamak tanı testidir. Bu testin duyarlılığı yüksek olmasına karşın HCV enfeksiyonlarının az görüldüğü toplumlarda yalancı pozitif sonuçlara sıklıkla rastlanmaktadır.

Anti-HCV reaktif saptanan hasta örneklerinde doğrulama amaçlı olarak HCV RNA testi çalışılması gerekmektedir. Moleküler yöntemler kullanılarak çalışılan HCV RNA testi; tecrübeli teknik personel gerektirmesi, emek yoğun ve yüksek maliyetli bir test olması nedeniyle birçok laboratuvarında çalışılamamaktadır.

Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezleri (Centers for Disease Control and Prevention; CDC) 2013 yılında yayınladığı yeni HCV tanı algoritmasında, ilk basamakta anti-HCV çalışılması reaktif bulunan örneklerde HCV RNA çalışılmasını önermektedir. Aynı zamanda CDC, anti-HCV testi için sistem verilerinin analizi ile

Üreticinin önerdiği cut-off değeri dışında her toplumun kendi cut-off değerini belirleyebileceğini ne sürmüştür.

Çalışmamızda anti-HCV kaynaklı yalancı pozitif sonuçları en aza indirmek, yalancı pozitif anti-HCV sonuçları nedeniyle gereksiz HCV RNA çalışılmasını azaltmak ve HCV RNA testinin alışılamadığı sağlık birimlerindeki meslektaşlarımıza hastalardaki HCV viremisini öngörmede yol gösterici olacak bir anti-HCV S/CO cut-off değerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Ayrıca bu cut-off değeri kullanılarak kendi laboratuvarımız için yeni bir HCV tanı algoritmasının oluşturulması planlanmıştır.



GENEL BİLGİLER

GİRİŞ

Hepatit C virüsü, non-A non-B hepatit etkeni olarak ilk defa Choo ve arkadaşları tarafından 1989 yılında tanımlanmıştır (1). Virüs partikülünün yapısı, genom organizasyonu ve replikasyon döngüsünün özellikleri nedeniyle *Flaviviridea* ailesinin *Hepacivirüs* cinsinde sınıflandırılan HCV, yaklaşık 50 nm çapında küresel yapıda zarflı bir ribonükleik asit (RNA) virüsüdür (2,3).

Tedavisiz olgular başta olmak üzere HCV ile enfekte bireylerin önemli bir kısmının kronik karaciğer hastalığı ve hepatosellüler karsinom için aday olması, HCV'yi önemli bir halk sağlığı sorunu haline getirmektedir.

Dünya Sağlık Örgütü'nün 2017 Küresel Hepatit Raporu verileri, dünyada kronik HCV enfeksiyonu olan 71 milyondan fazla kişi bulunduğunu ve HCV'ye bağlı ölümlerin yıllık 399 bin civarında olduğunu göstermektedir. Dünya genelinde 2015 yılı içinde 1.75 milyon yeni HCV enfeksiyonu geliştiği tahmin edilmektedir. Bu rakam, tüm dünyada yılda yaklaşık 100 binde 24 yeni HCV enfeksiyonu meydana geldiğini göstermektedir (4).

Yapılan çalışmalarda ülkemizde HCV prevalansının %0.3-1.8 arasında olduğu bildirilmekle birlikte ülkemize ait net istatistik verisi bulunmamaktadır (5,6). Sağlık Bakanlığı tarafından 2018 yılında yayınlanan Türkiye Viral Hepatit Önleme ve Kontrol Programı'nda 18 yaş üstü nüfusta yaklaşık 250.000-550.000 kişinin HCV ile enfekte olduğu ve HCV ile enfekte olanların büyük çoğunluğunun bu durumun farkında olmadığı bildirilmiştir. Sağlık Bakanlığı 2016 verilerine göre ülkemizde karaciğer transplantasyonunun ikinci en sık nedeni HCV'dir. Anti-HCV pozitifliğinin hemodiyaliz hastalarında %3.8, periton diyalizi yapılan hastalarda %1.7, böbrek transplantasyonu yapılan hastalarda %1.96, karaciğer transplantasyonu yapılan hastalarda ise %7.6 olduğu bildirilmiştir (7).

HEPATİT C VİRÜS GENOM YAPISI

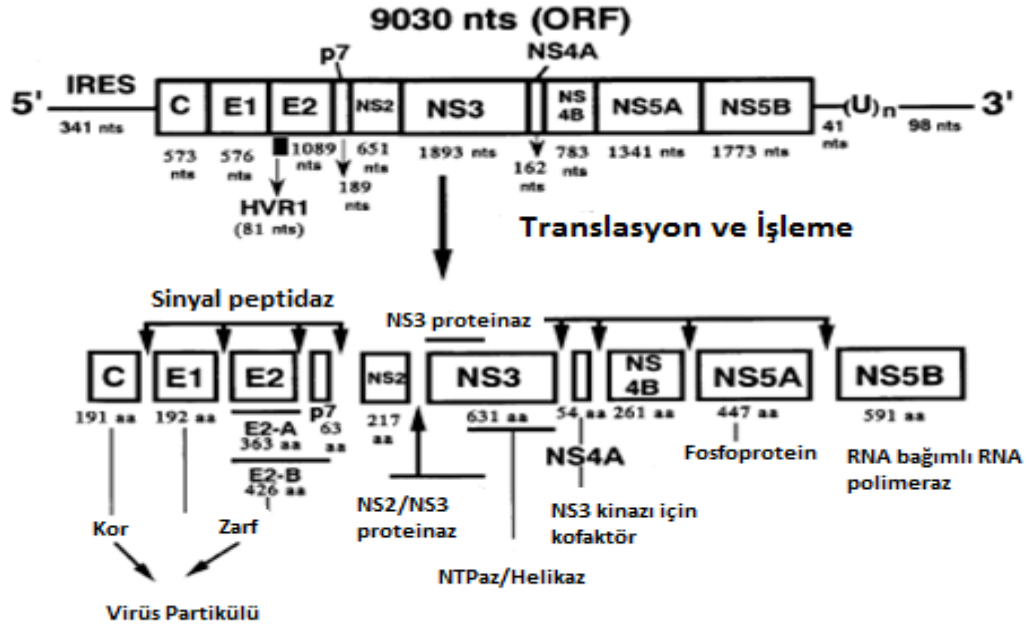
Hepatit C virüs genomu, yaklaşık 9,6 kb uzunluğunda olup tek iplikli ve pozitif polariteli RNA'dan oluşmaktadır. Genomu ise yaklaşık 30-35 nm çapındaki protein kılıf çevrelemektedir (2,3).

Translasyona Uğramayan RNA Bölgeleri

Hepatit C virüs genomunun 3' ve 5' uçlarında translasyona uğramayan bölge (untranslated region; UTR) olarak adlandırılan bölgeler bulunmaktadır. UTR bölgeleri, viral proteinlerin sentezi ve virüsün replikasyonunda rol oynamasına rağmen bu bölgeler herhangi bir proteini kodlamamaktadır (2). Yaklaşık 340 nükleotid uzunluğundaki 5' UTR bölgesi, iç ribozom giriş bölgesi (internal ribosomal entry site; IRES) adı verilen işlevsel bir bölge içermektedir. Bu bölge, herhangi bir translasyon başlatıcı sinyale gerek duymadan viral genomun direk olarak 40S ribozomal alt üniteye bağlanmasını sağlamaktadır (3).

Viral genomun 3' ve 5' UTR bölgeleri arasındaki 3011 aminoasitlik açık okuma penceresi (open reading frame; ORF) yaklaşık 9 kb uzunluğundaki viral poliproteini kodlamaktadır (2,3). Bu poliprotein içerisinde virüse ait 10 proteini barındırmaktadır. Viral ve konağın hücresel proteazları tarafından parçalanan poliprotein; bir kor proteini ve iki zarf glikoproteininden oluşan üç yapısal proteini, p7 ve yapısal olmayan 2 (non structural; NS2) proteinini ve beş yapısal olmayan proteini (non structural; NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B) oluşturmaktadır (Şekil 1).

Sonlanma kodonunun akış yönünde, ORF bitiminden sonraki 200-235 nükleotid uzunluğunda bölge 3' UTR bölgesi olarak adlandırılmaktadır. Bu bölge, 50-100 nükleotid arasında değişen poli U/UC segmenti ve çok iyi korunmuş 98 nükleotidlik 3' X bölgesini içermektedir (Şekil 1) (2,3).



Şekil 1: Hepatit C virüs genomunun yapısı ve poliproteininin işlenmesi (Şekilde poliproteininin virüse veya konağa ait proteazlar tarafından işlenme basamakları ve poliproteininin kesim noktaları ile birlikte yapısal ve yapısal olmayan proteinlerin işlevi görülmektedir. - Kato N.'den)

Yapısal Proteinler

Hepatit C virüsünün yapısal proteinleri kor proteinini ve iki adet zarf glikoproteininden (E1, E2) oluşmaktadır (Şekil 1). Yapısal proteinler, yapısal olmayan proteinlerden farklı olarak konak hücreye ait sinyal peptidazlar tarafından poliproteinden ayrılmaktadır (2).

Poliproteininin amino terminal ucundaki 191 aminoasitlik bölge, sinyal peptidaz ile poliproteinden ayrılarak kor proteinini oluşturmaktadır. Kor proteinini immunojenik özelliğidir. Virüsle enfekte hastaların serumunda hem kor protein hem de kor proteine karşı gelişen antikorlar saptanabilmektedir. HCV'nin konak immün yanıtından kaçışında, natural killer (NK) hücre yanıtı ve T hücre çoğalmasını inhibe eden kor proteininin rolü olduğu gösterilmiştir (3).

Yapısal proteinlerden E1 ve E2, viral poliproteininin sırasıyla 383 ve 746. sırasındaki aminoasitlerden kesilerek oluşturulan transmembran glikoproteinleridir.

Kabaca E2'nin "cluster of differentiation" 81 (CD81), "scavenger receptor BI" (SR-BI) ve occludin, claudin gibi konak hücre reseptörlerine bağlanmada, E1'in ise virüsün füzyonla konak hücre içine girişinde rolü olduğu düşünülmektedir (2).

Tüm genom içerisinde E2, HCV'nin en çok değişkenlik gösteren bölgelerini içermektedir. Çok değişken bölge (hypervariable region; HVR) olarak adlandırılan bu bölgeler HVR-1, HVR-2 ve HVR-3 olmak üzere üç parçadan oluşmaktadır. İşlevi çok fazla aydınlatılmış olmasa da özellikle HVR-1, genom içerisinde en fazla değişkenlik gösteren bölge olarak bilinmektedir. İmmün sistem hücrelerinin reseptör olarak tanıdığı zarf içindeki daha derin bir yapıyı HVR-1'in maskelediği ve böylece HCV'nin immün yanıtı kaçılabildiği öne sürülmektedir. Yapılan çalışmalarda HVR-1 bölgesinde deneysel olarak oluşturulan delesyon ile viral enfeksiyonun şiddetinin azaldığı ancak enfeksiyonun tamamen ortadan kalkmadığı gösterilmiştir (3).

Yapısal Olmayan Proteinler

Virüsün yapısal olmayan proteinleri NS2'den NS5B'ye kadar olan kısmı içermektedir (Şekil 1). Bu proteinler, viral poliproteinden virüse ait proteazlarca kesilerek oluşmaktadır. İyon kanalı özelliğinde olan P7 proteininin, virüsün bir araya gelme sürecinde rol oynadığı düşünülmektedir (2).

Hidrofobik bir transmembran proteini olan NS2, NS2/NS3 bağlantısının kesilmesinde görev alan bir sistein proteazdır. NS3 proteini, serin proteaz, RNA helikaz ve nükleozid trifosfataz (NTPaz) aktivitesine sahip olup NS3/4A, NS4A/NS4B, NS4B/NS5A ve NS5A/NS5B bölünmelerinden sorumludur. NS3 proteaz aktivitesinin birkaç mekanizmayla immün yanıtı kaçılabildiği gösterilmiştir (2).

NS4A proteini, NS3 proteazı için bir kofaktör olarak görev almaktadır. NS4B proteini, viral replikasyon sırasında endoplazmik retikulum üzerinde oluşan membranöz ağ yapısının oluşmasında rol oynamaktadır (2).

NS5A proteini, RNA replikasyonunda rol oynamakla birlikte kesin fonksiyonları belirlenemeyen membrana bağlı bir fosfoproteindir ve üç bölgeden (Domain: D1, D2, D3) oluşmaktadır. RNA replikasyonu sırasında, D1 ve D2

bölgeleri RNA bağlanması ve dimerizasyonunda görevli iken D3 bölgesi lipid damlacıkları üzerinden kor proteini ile etkileşime girerek viral tutunmada görev almaktadır. Yapılan çalışmalarda NS5A proteinindeki sekans polimorfizmlerinin bazı HCV genotiplerindeki interferon tedavisine direnç ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. NS5B, RNA replikaz kompleksinin katalitik çekirdeği olarak kabul edilen membrana bağlı bir proteindir (3).

HEPATİT C VİRÜS REPLİKASYON DÖNGÜSÜ

Hücreye Giriş

Virüsün hücre içine girişinden olgun virionların salınımına kadar olan viral yaşam döngüsünün ayrıntıları hücre kültür sistemleri kullanılarak incelenmiştir.

Hepatit C virüsü CD81, düşük dansiteli lipoprotein (low density lipoprotein; LDL) reseptörü, epidermal büyüme faktörü (epidermal growth factor; EGF) reseptörü, SR-BI ve sıkı bağlantı reseptörlerinden occludin ve claudini kullanarak hücre yüzeyine tutunmaktadır. Zarf glikoproteinleri ile bu reseptörlerin ilişkisi sonucunda HCV, kltrin aracılı endositoz ile hücre içine alınmaktadır. Endozom içindeki asidifikasyon zarf proteinlerinin konformasyonunu değiştirmekte, bunun sonucunda açığa çıkan füzyon peptidleri vasıtasıyla endozomal zar ile füzyon gerçekleşmektedir. Kapsid soyulması sonrasında ise viral genom sitozole salınmaktadır (2,3).

Translasyon

Viral genomun 5' ucundaki UTR bölgesinde yer alan IRES bölümünün ribozomun 40S alt birimine bağlanmasından sonra viral poliprotein sentezi gerçekleşmektedir. Sentezlenen poliprotein viral ya da konak hücreye ait proteazlar tarafından işlenmesi sonucunda viral proteinler ortaya çıkmaktadır (2).

Replikasyon

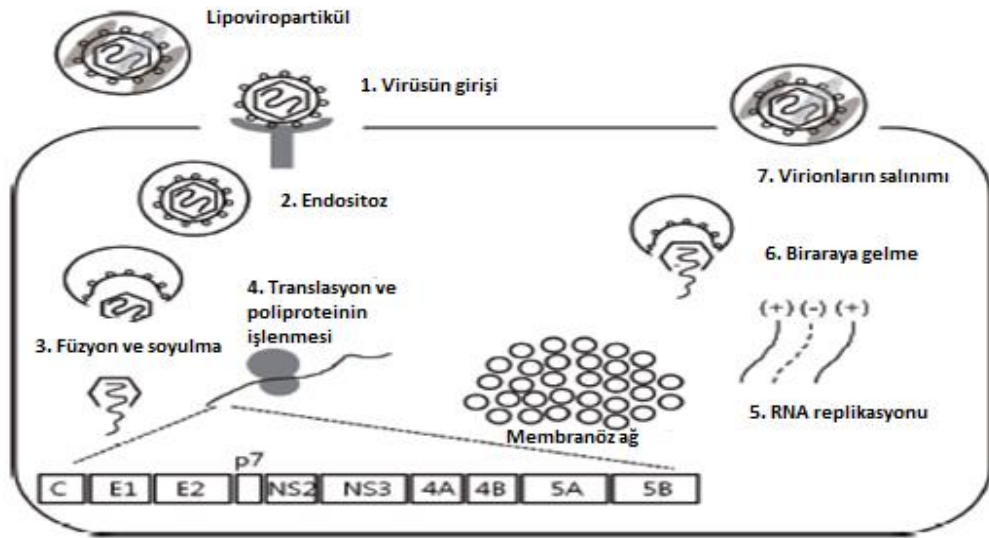
Viral replikasyon, hücrenin sitoplazmasında NS4 proteinin oluşturduğu membranöz ağ içerisinde gerçekleşmektedir. Membranöz ağ içerisinde yapısal ve yapısal olmayan proteinler birikmekte ve replikasyon kompleksi oluşmaktadır. Replikasyon kompleksinin katalitik çekirdeğini oluşturan NS5B proteini, pozitif

polariteli RNA molekülünü kalıp olarak kullanarak yeni viral genomların sentezini başlatmaktadır (2).

Bir Araya Gelme ve Salınma

Replikasyon döngüsünün bu basamağı, kapsid proteinlerinin sentezlenmesi ve RNA'nın sentezlenen kapsid proteinleriyle sarılması sonucu oluşan nükleokapsid yapısının oluşması ile başlamaktadır

Nükleokapsid yapısı oluştuktan sonra endoplazmik retikulum zarından tomurcuklanan HCV, zarf yapısını kazanmakta ve oluşan yeni viral partiküller ekzositozla hücre dışına salınmaktadır (Şekil 2) (2).



Şekil 2: Hepatit C virüs replikasyon döngüsü (Şekilde HCV virion partikülünün hücreye endositozla girişi, poliprotein sentezlenmesi ve işlenmesi sonrasında membranöz ağ içinde replikasyonun gerçekleşmesi ve olgun virion partikülünün zarf yapısını kazandıktan sonra hücreden salınma basamağı şematize edilmiştir. - Kim WC., Chang KM.'den)

HEPATİT C VİRÜSÜNDEKİ GENETİK ÇEŞİTLİLİK

Viral kinetik için oluşturulan matematik modelleri, dolaşımdaki virionların yarı ömrünün 45 dakika olduğunu ve kronik HCV enfeksiyonu olan hastalarda günde 10^{12} yeni virion partikülü üretildiğini göstermektedir (3).

Viral döngünün yüksekliği ve NS5B RNA polimerazında ‘‘proofreading’’ aktivitesinin bulunmaması viral mutasyonların ortaya çıkışını kolaylaştırmaktadır.

Bunun sonucunda özellikle kronik HCV enfeksiyonu olan bir kişide ‘‘quacispecies’’ (türümsü) adı verilen bir veya daha fazla nükleotid farklılığı gösteren birbirinden farklı HCV varyantları ortaya çıkmaktadır. Özellikle HCV’ye karşı gelişen hücresel bağışıklık yanıtlarının türümsü varyantların oluşumunda önemli rol oynadığı düşünülmektedir (3).

HEPATİT C VİRÜS GENOTİPLERİ

Farklı kişilerden elde edilen tüm genom dizileri belli olan HCV suşları, DNA (deoksiribonükleik asit) ya da protein dizilerindeki benzerliklere göre önceleri grup ve alt grup olarak sınıflandırılmış, bu sınıflandırma genotiplerin ortaya çıkmasına zemin oluşturmuştur. Tüm genom dizilerinde %66-69 oranında benzerlik gösteren virüsler genotip olarak tanımlanmıştır (2).

Güncel sınıflandırmaya göre genotipler rakamla (1, 2,...) subtipler ise küçük harflerle (a, b,...) ifade edilmektedir (2). Smith ve ark. tarafından 2014 yılında yapılan çalışmaya göre HCV’nin yedi genotipi ve 67 subtipi olduğu gösterilmiştir (8). Gower ve ark. tarafından 2014 yılında yapılan bir metaanalizde %46 oran ile genotip 1 tüm dünyada en yaygın genotip iken bunu genotip 3 (%22), genotip 2 (%13) ve genotip 4 (%13) takip etmektedir. Bunlar içinde tek başına subtip 1b’nin tüm enfeksiyonların %22’sinden sorumlu olduğu gösterilmiştir (9). Ülkemizdeki HCV enfeksiyonlarında en sık genotip 1, subtiplerden ise en sık subtip 1b’nin görüldüğü bilinmektedir.

Hepatit C virüs genotipleri hastalığın prognozunu, tedavi şeklini ve tedavi süresini etkilemektedir. Dünya çapında en sık görülen genotip 1 enfeksiyonlarında kronik aktif hepatit ve siroz gelişimi daha yüksek iken interferon tedavisine yanıtın düşük olduğu bilinmektedir. Genotip 3 ile enfekte olan kişilerde ise steatoz ve fibroz

gelişim riski daha yüksektir. Genotip 2 ve 3'te tedavi süresi kısa iken genotip 1 ve 4'te tedavi süresi daha uzundur (10).

HEPATİT C VİRÜS ENFEKSİYONLARININ KLİNİK SEYRİ

Hastalığın doğal seyrinin uzun olması dışında doğal seyrinin tüm ayrıntıları bilinmemektedir. Akut viral HCV sıklıkla asemptomatik seyretmektedir. Kişiler genellikle HCV ile enfekte olduğunun farkında olmamakta ülkemizde HCV tanısı sıklıkla evlilik öncesi taramalarda, cerrahi hazırlığı sırasında veya kan bağışçı taramalarında konulmaktadır. Tedavisiz bırakılan tüm akut olgular kronik viral hepatit C'ye ilerlemektedir. Yaş, konağın immün yanıtı ve viral kinetiklerin kronikleşmede önemli olduğu düşünülmektedir. Kronik HCV enfeksiyonu olan hastaların %20 ile %30'unda ortalama 25 yıl içerisinde karaciğer sirozu gelişmektedir. Siroz gelişen hastalarda hepatosellüler karsinom gelişme riski %0-3 arasında değişmektedir (11).

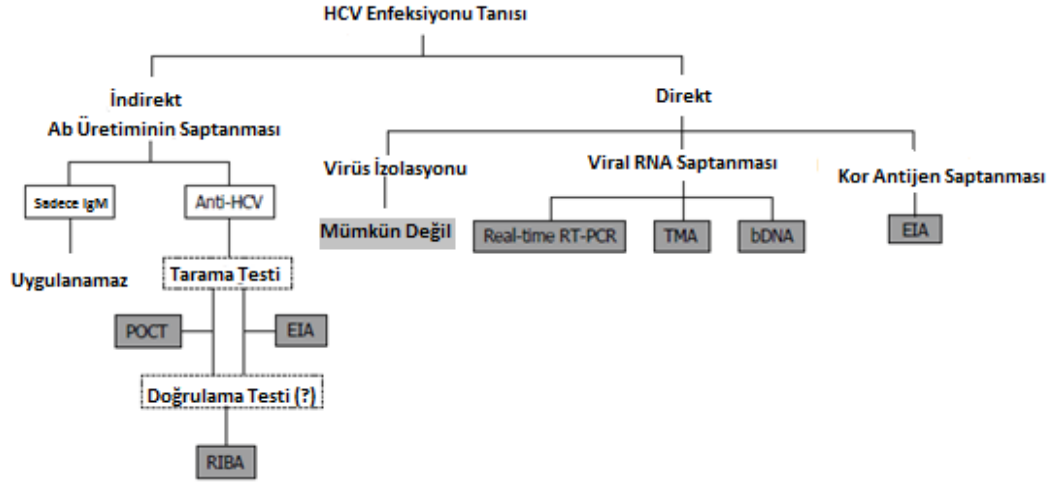
HEPATİT C VİRÜS ENFEKSİYONLARININ LABORATUVAR TANISI

Virolojik Testler

Hepatit C virüs enfeksiyonunun tanısında kullanılan testler, antikor ölçümüne dayanan indirekt testler ve viral partikül bileşenlerinin belirlendiği HCV RNA ve kor antijen testleri gibi direkt testler olarak iki gruba ayrılabilir (Şekil 3). Direkt ve indirekt testler enfeksiyonun tanısı, tedavi kararı ve tedaviye yanıtı değerlendirmede önemli bir rol oynamaktadır (12).

Hepatit C virüs bulaşını takip eden ilk haftalarda HCV RNA, serum veya plazmada moleküler yöntemler kullanılarak saptanabilmektedir. Anti-HCV antikorları ise üçüncü nesil EIA kullanımı ile HCV bulaşının sekizinci haftasından itibaren serumda saptanabilmektedir. Anti-HCV antikorları, hastalığın tüm dönemlerinde pozitif kalmakta ve kalıcı bağışıklık yanıtının bir göstergesi olarak kabul edilmemektedir. Yapılan çalışmalarda HCV bulaşı olan olguların yaklaşık %10'unda 6 aya kadar anti-HCV antikorlarının pozitifleşmediği görülmüştür. Serum aminotransferazları, 1 ile 26. haftalar arasında yükselmeye başlamakta ve HCV

enfeksiyonu süresince aminotransferaz düzeylerinde dalgalanmalar gözlenmektedir (11).



Şekil 3: Hepatit C virüs tanısında direkt ve indirekt testler [POCT: hasta başı tanı testleri (Point of care test), Real time RT-PCR: Gerçek zamanlı ters transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (real time reverse transcriptase polimerase chain reaction) TMA: Transkripsiyon aracılı amplifikasyon (Transcription mediated amplification), bDNA: dallı DNA (branched DNA) - Li HC., Lo SY.'den]

1. Anti-HCV tespiti:

Hepatit C virüsünün keşfinden sonra özellikle kan donörlerini HCV açısından taramak ve bulaşı engellemek amacıyla anti-HCV antikorlarının tespitinde kullanılabilecek serolojik testler geliştirilmiştir.

Anti-HCV antikorları, EIA ve CLIA yöntemleri kullanılarak serumda tespit edilebilmektedir (13). Virüsün keşfedildiği 1989 yılından bu yana üç nesil EIA testi geliştirilmiştir. Bu testler; antijen olarak NS4 proteinin rekombinant c100-3 epitopunu içeren birinci nesil HCV EIA, birinci nesile NS3 proteinin rekombinant epitopu olan c33c ve kor proteini epitopu olan c22-3'ün eklenmesiyle geliştirilen ikinci nesil HCV EIA ve en son ikinci nesil EIA'ya NS5 bölgesinden yeni bir rekombinant antijenin eklenmesiyle geliştirilen üçüncü nesil HCV EIA testleridir.

Üçüncü nesil EIA testlerinin kullanımı ile HCV enfeksiyonunun serolojik tanısı, HCV bulaşının sekizinci haftasından itibaren konulabilmektedir. Bu süre birinci nesil EIA testlerinde 16 hafta iken ikinci nesil EIA testlerinde 10 hafta kadardır. Ayrıca kor, NS3, NS4 ve NS5 bölgelerinin yanı sıra HCV kapsid antijenini de saptayan dördüncü nesil EIA testleri geliştirilme aşamasındadır. Testin duyarlılık ve özgüllüğü hakkında yeterli çalışma olmamasına rağmen yapılan çalışmalarda üçüncü nesil EIA testine kıyasla dördüncü nesil EIA testi ile bulaştan sonraki yaklaşık beşinci haftada HCV antijen ve antikorlarının saptanabildiği bildirilmiştir (12).

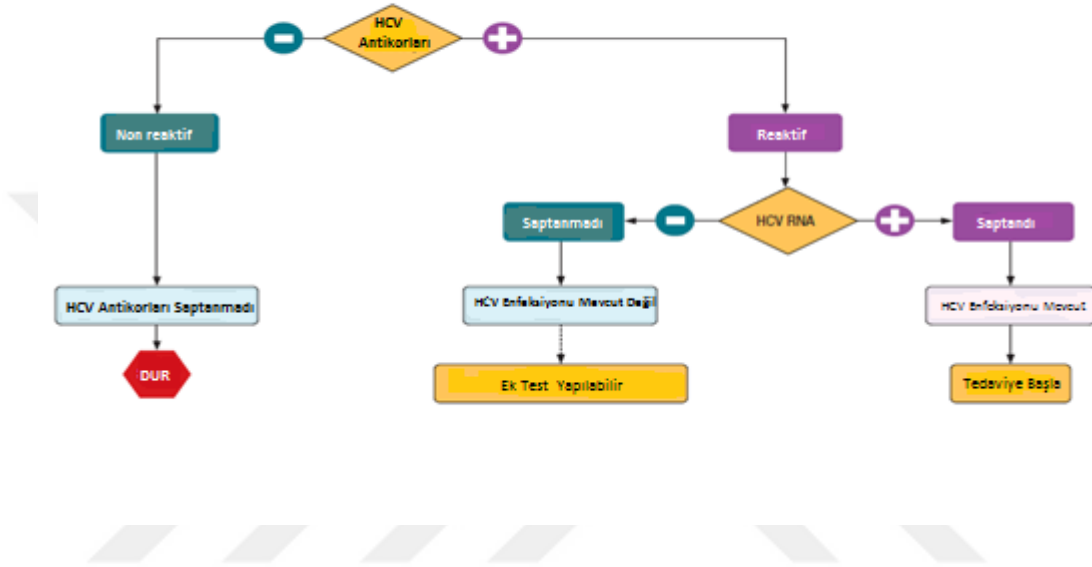
Anti-HCV EIA ve CLIA testlerinin değerlendirilmesinde hasta serumundan (sample) elde edilen absorbansın eşik değer absorbansına (cut-off) bölünmesi ile elde edilen sample/cut-off (S/CO) değerleri kullanılarak semikantitatif bir sonuç verilmektedir. Üretici firmalar, reaktivlik sınırını genellikle anti-HCV S/CO ≥ 1 olarak önermektedir (11).

2. Yeni HCV tanı algoritması ve anti-HCV sample/cut-off oranının önemi:

Geçmişte EIA yöntemleri ile alınan reaktif sonuçların doğrulanması amacıyla rekombinant immünblot (recombinant immunoblot assay; RIBA) testleri kullanılmıştır. RIBA yönteminde önceden hazırlanan rekombinant HCV antijenleri, nitroselüloz bir şeridin üzerine yerleştirilmiştir. Birkaç işlem sonrasında substrat ilavesi ile oluşan renk değişimi gözlenerek oluşan bantlar değerlendirilmektedir. İki veya daha fazla bandın görülmesi pozitif, tek bandın görülmesi belirsiz (indetermine) ve hiç bandın görülmemesi ise negatif olarak değerlendirilmektedir (13). Özellikle belirsiz sonuçların sık görülmesi nedeniyle daha önceleri doğrulama testi olarak kullanılan RIBA testi, 2013 yılında CDC tarafından HCV tanı algoritmasından çıkarılmıştır (13). Anti-HCV test sonucu reaktif, HCV RNA sonucu negatif bulunan hastalarda RIBA testi, ek bir antikor testi olarak laboratuvarlar tarafından halen kullanılmaktadır.

Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezleri, 2013 yılında yayınladığı yeni HCV tanı algoritmasında ilk olarak anti-HCV tarama testi ile HCV antikorlarının araştırılmasını, reaktif saptanan örneklerde moleküler yöntemlerle HCV RNA testi

çalışılmasını önermektedir. Bu aşamadan sonra HCV RNA testi negatif olan hastalarda ek bir anti-HCV antikor testinin daha yapılmasını veya hasta ile ilgili klinik şüphenin güçlü olması durumunda HCV RNA testinin tekrarlanmasını önermektedir (Şekil 4).



Şekil 4: Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezleri 2013 HCV tanı algoritması (https://www.cdc.gov/hepatitis/hcv/pdfs/hcv_flow.pdf 'den)

Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezleri, HCV prevalansına veya test edilen popülasyonun özelliklerine bakılmaksızın EIA ve CLIA sistemlerinin veri analizi ile ek test gereksinimini en aza indireyecek ve kişinin gerçek antikor değerini yansıtacak bir S/CO oranının belirlenebileceğini önermektedir. Bu nedenle tavsiye edilen anti-HCV test algoritması, S/CO oranlarını kullanacak şekilde genişletilmiştir. Günümüzde laboratuvarların birçoğunun tek başına reaktif bir tarama testine dayalı anti-HCV sonucunu raporladıkları bildirilmiştir (14).

3. Hepatit C kor antijen testleri:

Geçmişte kor proteinin antijenik yapısı incelendiğinde bu yapının HCV ile enfekte hastalarda tanı ve tedavi takibinde kullanılabileceği gösterilmiştir. Bunun üzerine HCV kor antijenini (HCVkAg) saptamak amacıyla EIA ve CLIA temelli testler geliştirilmiştir. Geliştirilen testlerin tamamı HCVkAg'i kantitatif olarak

saptayabilmektedir. Freiman ve ark. tarafından 2016 yılında yapılan bir metaanalize göre iyi performans gösteren bir HCVkAg testinin, hastadaki viral yük 3000 IU/ml ve üzerinde olduğunda nükleik asit testlerine benzer şekilde tanısal doğruluk gösterdiği saptanmıştır (16).

HCVkAg'nin özellikle transfüzyon/transplantasyon öncesi ve yüksek risk gruplarında HCV taramasında, HCV ile enfekte olan fakat tedavi almayan hastalarda viral replikasyonun belirlenmesinde ve antiviral tedavinin izleminde kantitatif bir gösterge olarak kullanılabileceği düşünülmektedir (2).

4. Nükleik asit testleri:

Serum veya plazmada HCV RNA'nın tespiti, vireminin saptanmasında en güvenilir yöntemdir. Hedef amplifikasyon yöntemleri (RT-PCR, TMA) ve sinyal amplifikasyon yöntemleri (bDNA) ile serumda kalitatif veya kantitatif olarak HCV RNA saptanabilmektedir (17).

4.1. Kalitatif nükleik asit testleri:

Hepatit C virüs RNA'sının kalitatif olarak saptanmasında daha çok RT-PCR ve TMA temelli yöntemler kullanılmaktadır. RT-PCR yönteminde elde edilen HCV RNA molekülü önce ters transkriptaz enzimi ile komplementer DNA (cDNA) 'ya çevrilmekte ve sonrasında cDNA molekülleri DNA polimeraz enzimi vasıtasıyla çoğaltılarak analiz edilmektedir. Hedef amplifikasyon yöntemlerinden biri olan TMA yöntemi, ters transkriptaz ve RNA polimeraz enzimleri ile hem RNA hem de DNA moleküllerini kalıp olarak kullanarak HCV RNA'yı saptayabilmektedir (2).

4.2. Kantitatif nükleik asit testleri:

Hedef amplifikasyon yöntemleri (real time ters transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu ve TMA) ve sinyal amplifikasyon yöntemleri (bDNA) ile HCV RNA kantitatif olarak saptanabilmektedir. Real time PCR yönteminde çift zincirli DNA moleküllerine bağlanabilen floresan boyalar (SYBERGreen, PicoGreen gibi) kullanılarak eş zamanlı sinyal oluşumu izlenmekte ve böylelikle elde edilen genetik materyalin kantitasyonu sağlanabilmektedir. Bu yöntemde tüm PCR basamakları

kapalı sistem içerisinde gerçekleştiğinden kontaminasyona bağlı yalancı pozitif sonuçlar en aza indirgenmektedir (2, 18).

5. Genotip tayini:

Hepatit C virüsü enfeksiyonu olan kişilerde hastalığın prognozunun öngörülmesinde ve tedavi planlanmasında HCV genotip tayini önem taşımaktadır. Bu amaçla HCV genotipinin saptanmasında HCV genomunun dizilenmesi ve sonrasında filogenetik analiz yapılması, altın standart yöntem olarak kabul edilmektedir (2). Ancak rutin laboratuvar işleyişinde dizileme yöntemi, yüksek maliyetli ve emek yoğun bir yöntem olması nedeniyle pratik bulunmamaktadır. Bu nedenle PCR temelli bazı yöntemler, genotip tayininde daha yaygın olarak kullanılmakta ve dizi analizi, referans laboratuvarlarla sınırlı kalmaktadır.

Genotipe özgü primerlere ek olarak kor ya da NS5B bölgeleri hedef alınarak yapılan PCR, 5' UTR bölgesinin PCR ile çoğaltılması sonrasında restriction fragment length polymorphism (RFLP) yöntemi ve 5' UTR, kor, E1, NS3 ya da NS5B'nin hedef alınarak PCR ile çoğaltılması sonrasında ters hibridizasyon yöntemi gibi PCR temelli testler günümüzde sıklıkla kullanılmaktadır (2).

GEREÇ VE YÖNTEMLER

ARAŞTIRMANIN KAPSAMI

Bu çalışma, Nisan 2017 tarihinde hastaların hastane bilgi sistemi üzerinden elde edilecek anti-HCV, HCV RNA ve alanin aminotransferaz (ALT) değerlerinin karşılaştırılacağı metodolojik bir araştırma olarak planlanmıştır.

Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi İstatistik Birimi ile görüşülerek örneklem hesabı ve power analiz yapılmıştır. Örneklem büyüklüğü, MedCalc Statistical Software version 12.7.7 (MedCalc Software bvba, Ostend, Belgium; <http://www.medcalc.org>; 2013) programı kullanılarak tip 1 hata %5 ve power %80 olacak şekilde en az 46 hasta verisi olarak hesaplanmıştır. Çalışmanın örnekleme, İstanbul İli 2. Hizmet Bölgesi Merkez Laboratuvarı'mızda 1 Temmuz 2014 ile 1 Temmuz 2017 tarihleri arasında anti-HCV testi çalışılan hasta verileri olarak belirlenmiştir.

Çalışmamız için Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi Bilimsel Araştırmalar Etik Kurulu'na 15.09.2017 tarihinde başvuru yapılmıştır. Dokuz Ekim 2017 tarihli toplantıda HNEAH-KAEK2017/KK/120 karar numarası ile etik kurul onayı alınmıştır. Çalışmaya etik kurul onay tarihinden bir ay sonraki tarih olan 26 Ekim 2017 tarihinde başlanmıştır. Dosya taraması 26 Aralık 2017 tarihinde tamamlanmıştır.

Çalışmamızda T.C. Sağlık Bakanlığı İstanbul İli 2. Hizmet Bölgesi Merkez Laboratuvarı'mızda 1 Temmuz 2014 ile 1 Temmuz 2017 tarihleri arasındaki 3 yıllık dönemde çalışılan anti-HCV test sonuçları ALIS Laboratuvar Bilgi Sistemi (sürüm:8.42, Ventura, Türkiye) kullanılarak retrospektif olarak taranmıştır.

ALIS sisteminden hastaların dosya numarası, ad soyad, yaş, cinsiyet, anti-HCV, HCV RNA ve alanin aminotransferaz (ALT) değerleri, varsa HCV genotip durumu ve klinik tanı bilgisine ulaşılmıştır.

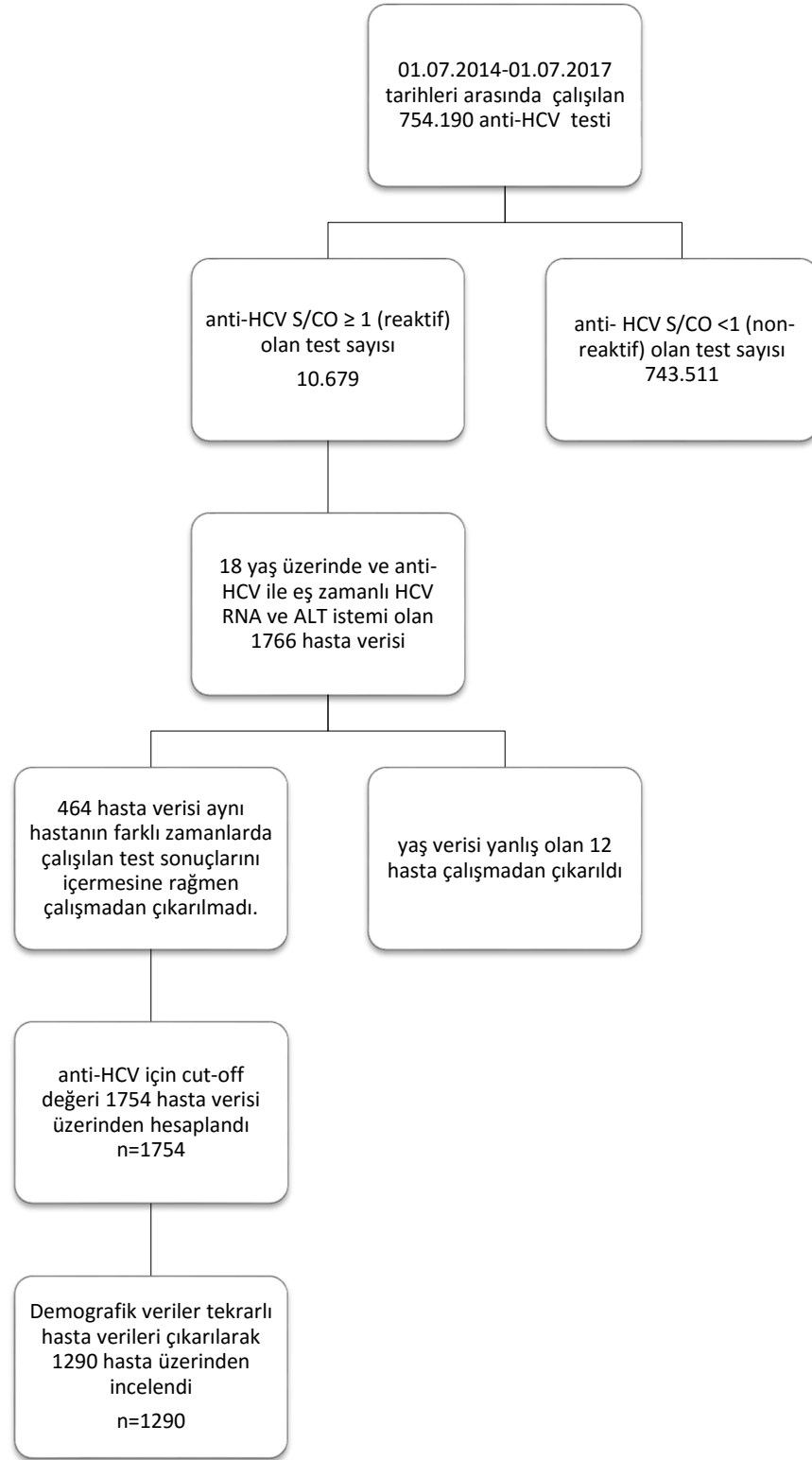
Çalışmaya dahil edilme kriterleri; 18 yaş üzerinde olan, anti-HCV sonucu reaktif olan ve anti-HCV ile eş zamanlı, HCV RNA ve ALT istemi olan hastalar şeklinde belirlenmiştir.

Hariç tutma kriterleri; 18 yaş altı olan ve anti-HCV sonucu nonreaktif olan kişiler ve anti-HCV reaktif fakat eş zamanlı ALT ve HCV RNA çalışılmayan hastalar şeklinde belirlenmiştir.

Laboratuvar bilgi sisteminden üç yıllık dönemde çalışılan toplam 754.190 sayıda anti-HCV test sonucu elde edilmiştir. Bu sonuçlardan 743.511 sayıda test sonucu nonreaktif, 10.679 test sonucu reaktif bulunmuştur.

Anti-HCV test sonucu reaktif olan 18 yaş üzerindeki hastalardan anti-HCV ile eş zamanlı HCV RNA ve ALT istemi olan 1766 hasta verisine ulaşılmıştır. 1766 hasta verisinden 12 hastanın yaş bilgisi yanlış olduğundan çalışmadan çıkarılarak 1754 hasta verisi ile çalışmaya devam edilmiştir. 1754 hasta verisi içerisinde 464 veri aynı hastanın farklı zamanlarda çalışılan test sonuçlarını içermesine rağmen veri zenginliği sağlaması açısından çalışmadan çıkarılmamıştır.

Demografik verilerin dağılımı 1290 hasta üzerinden incelenmiştir (n=1290) (Şekil 5).



Şekil 5: Araştırmamızın analitik basamakları

UYGULANAN YÖNTEM VE TEKNİKLER

Anti-HCV Tespiti

Anti-HCV tespiti için ARCHITECT i2000SR cihazı (Abbott Laboratories, Diagnostics Division, Abbott Park, IL, USA) ve ARCHITECT Anti-HCV kiti (Abbott Laboratories, Diagnostics Division, Abbott Park, IL, USA) kullanılmıştır.

Kullandığımız sistem, serum veya plazmada HCV kor proteinine ve virüsün yapısal olmayan NS3 ve NS4 proteinlerine karşı oluşan anti-HCV antikorlarını, HCr43 ve c100-3 rekombinant proteinlerini kullanarak kalitatif olarak saptayabilen CLIA temelli ikinci nesil kemilüminesans mikropartikül immün yöntem (chemiluminescence microparticle immunoassay; CMIA) yöntemidir. Testin spesifitesi %99.5 - %99.7, sensitivitesi ise %99.2 - %99.7'dir.

Değerlendirme aşamasında cihaz, kalibratörün ortalama RLU (relative light units) değerini 0.074 katsayısı ile çarparak bir cut-off RLU değeri elde etmekte ve numune RLU değerini cut-off RLU değerine bölerek S/CO bazında bir sonuç vermektedir.

Üretici firma, S/CO değeri bir ve üzerinde ölçülen tüm değerleri reaktif olarak kabul etmekte ve sonuç vermeden önce testin iki kez tekrar edilmesini önermektedir.

Çalışmamıza dahil edilen üç yıllık dönem içinde, hasta örnekleri üreticinin önerileri doğrultusunda bu sistem ile çalışılmış olup yöntem veya cihaz değişikliği yapılmamıştır.

Kantitatif HCV RNA Tayini

Laboratuvarımızda üç yıllık dönemde HCV RNA tayininde QIAGEN marka (QIAGEN, Germany) otomatize sistem kullanılmıştır.

İlk olarak laboratuvarımıza 10 ml'lik etilendiamin tetra asetik asitli (EDTA) tüpte gönderilen kan örnekleri 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında 1200 µl hasta plazma örneği cihazın sample tüplerine ayrılmıştır. Üreticinin önerileri doğrultusunda QIASymphony DSP Virus/Pathogen Midi Kit

(QIAGEN, Germany) ile QIA Symphony SP/AS cihazının (QIAGEN, Germany) SP modülü kullanılarak viral nükleik asitler manyetik partikül ayırma işlemiyle saf olarak elde edilmiştir. Bu işlemin ardından örnekler, artus HCV QS-RGQ Kiti (QIAGEN, Germany) ile QIA Symphony SP/AS cihazının AS modülü kullanılarak otomatik pipetlenmiştir.

Hepatit C virüs RNA'sının kantitatif analizi için kullandığımız artus HCV QS-RGQ kiti, içerdiği Master A ve Master B ile HCV genomunun 5' UTR bölgesinin 240 bp'lik bölümünü ampikon olarak tanımakta ve bu bölgenin reverse transkripsiyonu ve amplifikasyonu için gereken enzim ve reaktifleri içermektedir.

Test, viral RNA miktarının saptanmasını sağlayan dört eksternal pozitif kontrol (QS 1-4, quantitation standards) ve bir internal negatif kontrol ile birlikte çalışılmaktadır. artus HCV QS-RGQ kitinin analitik duyarlılığı 21 IU/ml olup $35 - 1.77 \times 10^7$ IU/ml aralığında HCV RNA kantitasyonu yapabilmektedir.

Pipetleme işleminin ardından PCR aşaması Rotor-Gene Q (QIAGEN, Germany) cihazı ile yapılmıştır. Rotor-Gene Q Real time PCR cihazında, 50 °C'de 30 dakika RNA reverse transkripsiyonu ile cDNA oluşumu sonrasında 95 °C'de 15 dakikalık tek döngü ile hot start enziminin başlangıç aktivitesi gerçekleştirilmiştir. Hot start enziminin aktivasyonu ile birlikte bir döngü 95 °C'de 15 saniye, 50 °C'de 60 saniye, 72 °C'de 30 saniye olacak şekilde 50 döngü sonrasında cDNA amplifikasyonu sağlanmıştır.

En son aşamada; C_T (threshold cycle, eşik döngü), kitin sağladığı 4 HCV eksternal pozitif kontrol (QS) ve internal kontrol verileri ile birlikte yeşil ve sarı kanallardaki floresan ışıma değerlendirilerek kantitatif HCV RNA analizi gerçekleştirilmiştir.

Genotip Tayini

Klinik olarak HCV genotiplendirme istemi olan ve viral yükü saptanan hasta örneklerinden HCV genotip tayini yapılmıştır.

Bu amaçla PCR temelli çalışan Geno Sen's HCV Genotyping 1/2/3/4 RG qualitative Real Time PCR kiti (Genome Diagnostics Pvt. Ltd., India) kullanılmıştır.

Rotor-Gene Q (QIAGEN, Germany) real time PCR cihazında, 50 °C'de 15 dakikalık tek bir döngüden sonra, 95 °C'de 10 dakikalık bir denatürasyon yapılmış ve daha sonra 95 °C'de 15 saniye, 55 °C'de 20 saniye, 72 °C'de 15 saniye olmak üzere 45 döngü ile PCR aşaması gerçekleştirilmiştir.

Floresan ışımaya kırmızı, yeşil, turuncu ve sarı kanallarda alınmış olup, genotip 1 için kırmızı, genotip 2 için yeşil, genotip 3 için turuncu, genotip 4 için sarı kanalda değerlendirme yapılmıştır.

İkibin ondört ile 2015 yılı arasındaki yaklaşık 18 aylık dönemde bu yöntem ile HCV genotiplerinden sadece genotip 1, 2, 3 ve 4 saptanabilmiştir. Genotip 5, 6 ve subtipler bu yöntem ile saptanamadığından 2016 yılından itibaren GEN-C 2.0 Reverse Hybridization Strip Assay (NLM Diagnostici, Italy) testine geçilmiştir. Bu test, ters hibridizasyona dayalı bir line prob assay (LIPA) yöntemidir. Bu yöntem HCV genotip ve subtiplerini HCV genomunun 5' UTR ve kor bölgelerindeki varyasyonları temel alarak tanımlamaktadır. LIPA yönteminde özellikle HCV viral yükü 5×10^3 - 8×10^6 aralığında olan örneklerde optimum sonuç elde edilmektedir.

Hasta plazma örneklerinden üreticinin önerileri doğrultusunda QIASymphony DSP Virus/Pathogen Midi Kit (QIAGEN, Germany) ile QIASymphony SP/AS cihazı (QIAGEN, Germany) kullanılarak viral nükleik asitler saf olarak elde edilmiştir. Bu işlem sonrasında Rotor-Gene Q (QIAGEN, Germany) cihazı ile PCR aşaması gerçekleştirilmiştir.

Bu yöntemde hasta örneğinden PCR ile elde edilen amplikonlar, üzerinde genotipe özgü biyotin işaretli spesifik oligonükleotid problemlerin yerleştirildiği bantlar bulunan nitroselüloz stripler üzerine aktarılmıştır. Amplikonların oligonükleotid problemlerle hibridizasyonu sonucunda oluşan biyotin işaretli hibridler, alkalik fosfataza bağlı streptavidin ile saptanabilmektedir. Substrat ve streptavidin-alkalin fosfataz kompleksinin reaksiyonu sonucunda stripte mor renkli bantların oluşumu

gözlennmektedir. Elde edilen bantlar üreticinin sunduğu kalıp stripler ile karşılaştırılarak genotip analizi yapılmıştır.

Bu yöntem, HCV genotip 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 ve subtiplerden 1a, 1b, 2a/2c, 2b, 3a, 3c, 3k, 4a, 4b, 4c/4d, 4e, 4f, 4h, 5a, 6a/6b, 6f/q, 6m ve 7a saptanmasına olanak sağlamıştır.

Alanin Aminotransferaz Ölçümü

Laboratuvarımızda hasta örneklerinden ALT ölçümü ARCHITECT c sistem ve AEROSET sistemi (Abbott Laboratories, Diagnostics Division, Abbott Park, IL, USA) ile yapılmıştır. Hasta örneğinde bulunan ALT, amino grubunun L-alaninden α -ketoglutarat'a transferini katalize eder ve piruvat ve L-glutamati oluşturur. Pirüvat, NADH ve laktat dehidrogenaz (LDH) varlığında L-laktata indirgenir. Bu reaksiyonda NADH, nikotinamid adenin dinükleotite (NAD) oksitlenir.

Testin çalışma prensibi, NADH'ın NAD'a oksidasyonu nedeniyle 340 nm'de absorbans azalma oranının ölçülmesine dayanmaktadır. Test, serum veya plazma kullanılarak üreticinin önerileri doğrultusunda çalışılmıştır. Testin referans aralığı <37 IU/L'dir. Çalışmaya dahil edilen üç yıllık dönemde cihaz veya yöntem değişimi olmamıştır.

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Bu çalışma için herhangi bir çıkar çatışması yoktur.

ÇALIŞMANIN TASARIMI

Bu tez çalışmasında, hastaların laboratuvar sistemimizdeki anti-HCV ve ALT değerlerinden HCV RNA'ya göre bir anti-HCV S/CO cut-off değeri elde edilmesi ve bu cut-off değeri ile HCV enfeksiyonu olan hastalarda vireminin öngörülmesi amaçlanmıştır. Bu nedenle çalışmamızın tasarımı, Collins ve ark. tarafından yapılan '*Transparent Reporting of a multivariable prediction model for Individual Prognosis Or Diagnosis (TRIPOD): The TRIPOD Statement*' çalışması referans alınarak Enhancing the Quality and Transparency of Research (EQUATOR) kılavuzlarından TRIPOD kılavuzuna uygundur (21).

İSTATİSTİKSEL İNCELEMELER

Çalışmada elde edilen bulgular değerlendirilirken, istatistiksel analizler için IBM SPSS Statistics 22 (IBM SPSS, Türkiye) programı kullanılmıştır.

Çalışma verileri değerlendirilirken parametrelerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro Wilks testi ile değerlendirilmiş ve parametrelerin normal dağılım göstermediği saptanmıştır.

Çalışma verileri değerlendirilirken tanımlayıcı istatistiksel metodların (Ortalama, Standart sapma, frekans) yanı sıra niceliksel verilerin karşılaştırılmasında Mann Whitney U test kullanılmıştır.

En uygun kesim noktası (cut-off point) received operatör characteristic (ROC) eğrisi analizine dayalı seçilmiştir.

Anti-HCV ve ALT parametreleri için ROC eğrisinden belirlenen yeni cut-off değerlerine göre pozitif ve negatif kuralları SPSS programında yeniden düzenlenmiştir. Bu düzenlemeden sonra cut-off değerleri ile HCV RNA pozitiflik tanısı arasındaki ilişki ki-kare testi ile belirlenmiştir.

IBM SPSS Statistics 22 (IBM SPSS, Türkiye) programı kullanılarak cut-off değerleri için duyarlılık, özgüllük, pozitif prediktif değer ve negatif prediktif değer hesaplamaları yapılmıştır. Anlamlılık $p < 0.05$ düzeyinde değerlendirilmiştir.

Duyarlılık (Sensitivite): Gerçek hastalar içinden testin hastaları belirleyebilme özelliğidir.

Özgüllük (Spesifite): Gerçek sağlamlar içinden testin sağlamları belirleyebilme özelliğidir.

Pozitif Prediktif Değer: Test pozitif (hasta) sonuç verdiği zaman, olgunun gerçekten pozitif (hasta) olma olasılığıdır.

Negatif Prediktif Değer: Test negatif (sağlam) sonuç verdiği zaman, olgunun gerçekten negatif (sağlam) olma olasılığıdır.

BULGULAR

DEMOGRAFİK VERİLER

Bu çalışma 1 Temmuz 2014-1 Temmuz 2017 tarihleri arasında yaşları 18 ile 94 arasında olan, 546'sı (%42.3) erkek ve 744'ü (%57.7) kadın olmak üzere toplam 1290 olgunun 1754 sonucu üzerinde yapılmıştır. Olguların demografik bilgileri tablo 1'de verilmiştir.

Tablo 1: Olguların demografik özelliklere göre dağılımı

Yaş (yıl)	n	Ort $\pm$ SD	Min.-Max
	1290	53.8 $\pm$ 15.5	18-94
Cinsiyet	n	%	
Erkek	546	42.3	
Kadın	744	57.7	
Toplam	1290		

Ort: ortalama, SD: standart deviasyon, Min: en küçük değer, Max: en büyük değer

Hasta verilerinin kliniklere göre dağılımı tablo 2’de verilmiştir. Verilerin çoğunu Gastroenteroloji ve Enfeksiyon Hastalıkları kliniklerindeki hastalar oluşturmaktadır.

Tablo 2: Hasta verilerinin kliniklere göre dağılımı

Klinik	n
Gastroenteroloji	829
Enfeksiyon Hastalıkları	636
İç Hastalıkları	131
Acil Servis	49
Diğer	109
Toplam	1754

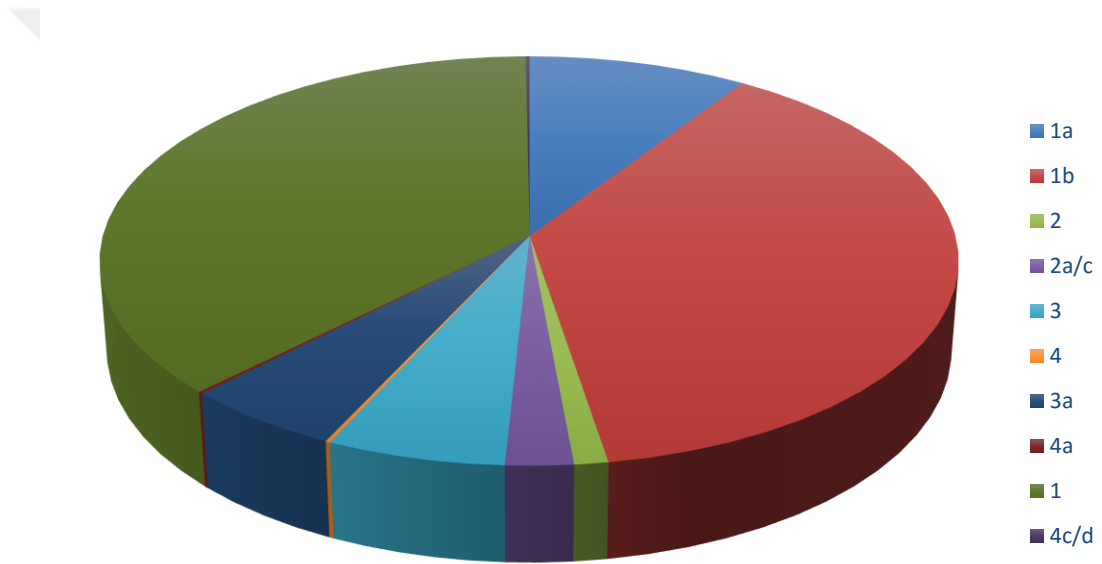
Olguların sistemdeki tanıları incelendiğinde 944'ünün Kronik Hepatit C, 34'ünün Hepatit B, 9'unun Akut Viral Hepatit, 152'sinin Karaciğer Hastalıkları ile ilgili tanılar ve 151 olgunun ise viral hepatit ve karaciğer hastalığı dışında bir tanısının olduğu gözlenmiştir. Olguların tanılara göre dağılımı tablo 3'de verilmiştir.

Tablo 3: Olguların tanılara göre dağılımı

Tanı	n
Kronik Hepatit C	944
Kronik Hepatit B	34
Akut Viral Hepatit	9
Karaciğer Hastalıkları	152
Diğer	151
Toplam	1290

Çalışmamızda 622 olguda HCV genotip analizi yapılmıştır. Olguların 522'si (%84) ile en sık genotip 1 saptanmıştır. Subtiplerden ise 235 (%37.7) olgu ile en sık subtip 1b saptanmıştır (Şekil 6). Genotip 5, 6 ve 7 saptanmamıştır. Genotip 2 ve genotip 4 saptanan 15 olguda subtip ayrımı yapılamamıştır. Olguların 6'sında genotip değişimi (veya karışık genotip?) saptanmıştır. Olguların genotip dağılımı tablo 4'de verilmiştir.

Genotip Dağılımı



Şekil 6: Olguların genotip dağılımı

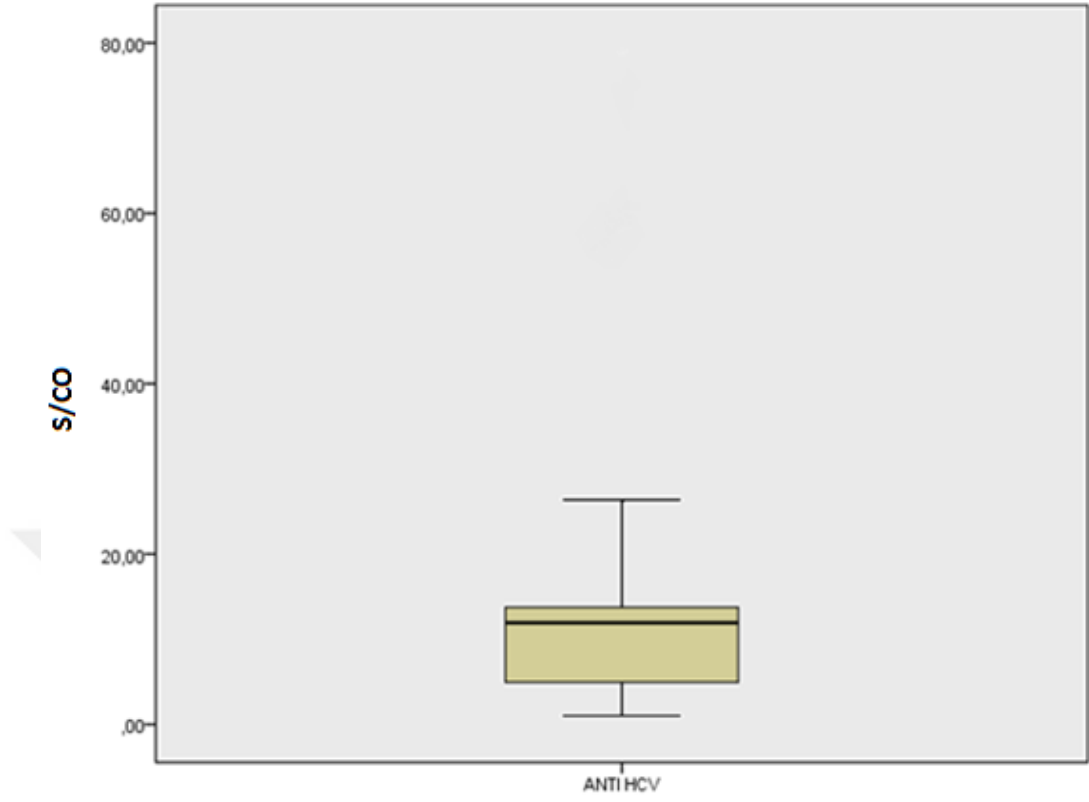
Tablo 4: Olguların genotiplere göre dağılımı

Genotip	n	%
1	230	36.9
1a	57	9.1
1b	235	37.7
2	7	1.12
2a/2c	14	2.25
3	37	5.9
3a	33	5.3
4	1	0.1
4a	1	0.1
4c/4d	1	0.1
1-3	4	0.6
1b-2	2	0.2
Toplam	622	100

İSTATİSTİK VERİLERİ

Çalışmamızda Temmuz 2014 - Temmuz 2017 tarihleri arasında toplam 754.190 anti-HCV testi çalışılmıştır. Bu sonuçlardan 10.679 test sonucu reaktif, 743.511 test sonucu nonreaktif bulunmuştur. HCV seroreaktivlik oranımız çalışmamıza dahil edilen dönem için %1.4 olarak hesaplanmıştır.

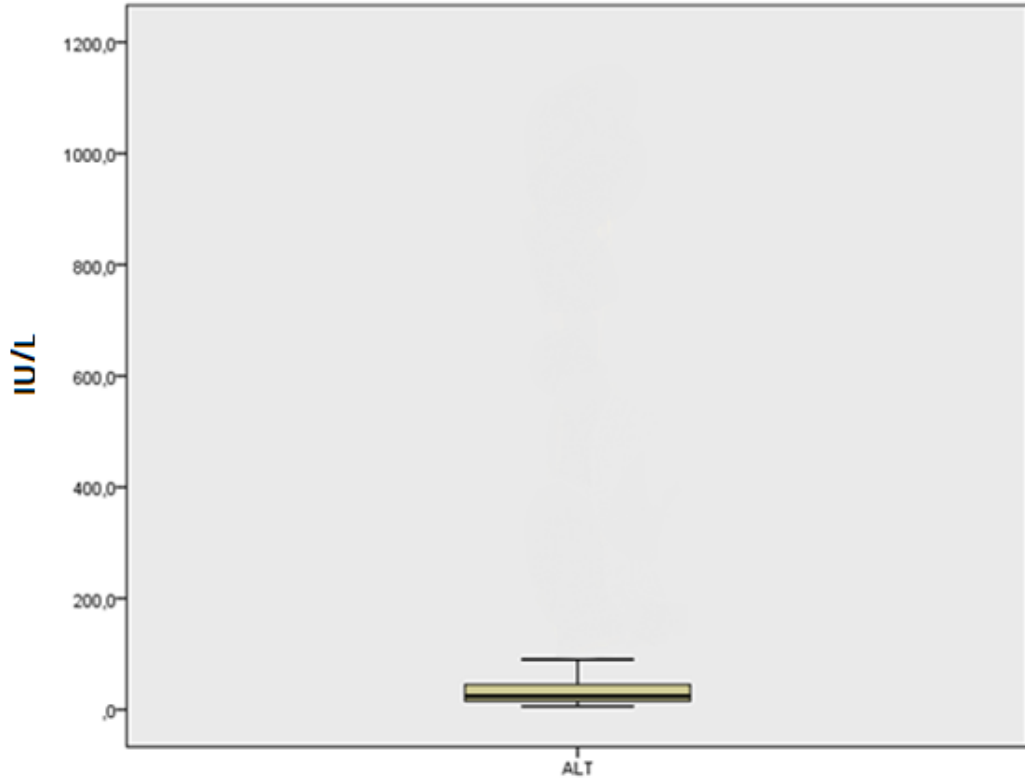
Çalışma verileri değerlendirilirken parametrelerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro Wilks testi ile değerlendirilmiş ve parametrelerin normal dağılım göstermediği saptanmıştır. Anti-HCV ve ALT test sonuçlarının dağılımı şekil 7 ve şekil 8'deki kutu grafiklerinde gösterilmiştir. Anti-HCV için medyan değer 11.9 (interquartile range=8.81), ALT için medyan değer 24 (interquartile range=30.3) bulunmuştur. Anti-HCV ve ALT için deskriptif analiz değerleri tablo 5 ve tablo 6'da verilmiştir.



Şekil 7: Anti-HCV dağılımı

Tablo 5: Anti-HCV deskriptif analiz değerleri

Anti-HCV (S/CO)	
Medyan	11.9
Minimum	1.01
Maximum	78.86
Range	77.85
Interquartile range	8.81



Şekil 8: Alanin aminotransferaz dağılımı

Tablo 6: Alanin aminotransferaz deskriptif analiz değerleri

ALT (IU/L)	
Medyan	24
Minimum	6
Maximum	1055
Range	1049
Interquartile range	30.3

Sonuçların 742'sinde (%42) HCV RNA sonucu pozitif iken, 1012'sinde (%58) negatif bulunmuştur.

Hepatit C virüs RNA sonucu pozitif olanların ALT düzeyleri, HCV RNA sonucu negatif olanlardan istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur (p=0.001).

Hepatit C virüs RNA sonucu pozitif olanların anti-HCV düzeyleri, HCV RNA sonucu negatif olanlardan istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur (p=0.001) (Tablo 7).

Tablo 7: Alanin aminotransferaz ve anti-HCV değerlerinin HCV RNA sonucuna göre değerlendirilmesi

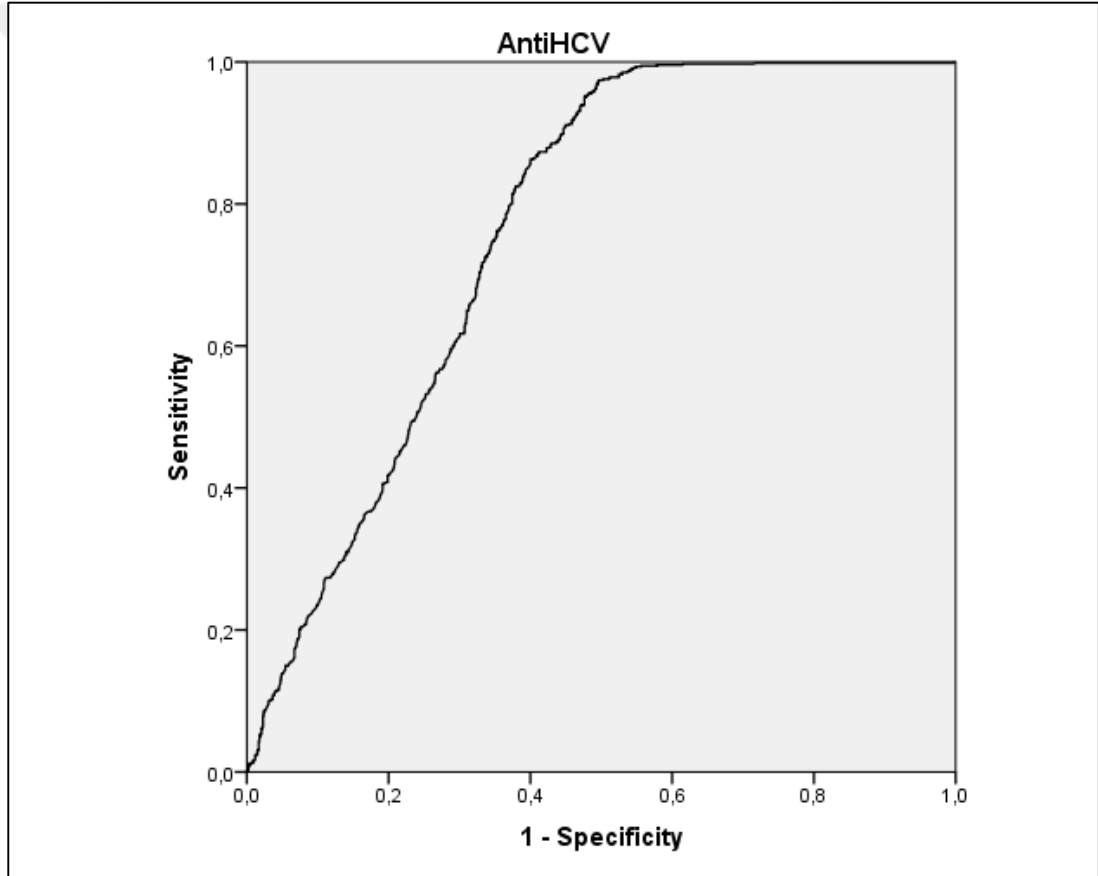
HCV RNA	ALT (IU/L)	Anti-HCV (S/CO)
	Ort±SD (medyan)	Ort±SD (medyan)
Negatif	23,88±33,68 (17)	7,77±5,45 (7,07)
Pozitif	63,03±71,69 (45)	12,83±3,44 (13,13)
P	0,000*	0,000*

Mann Whitney U Test * $p < 0.05$

Ort: ortalama, SD: standart deviasyon

Hepatit C Virüs RNA Değerine Göre Anti-HCV S/CO için Cut-off Noktası Tayini

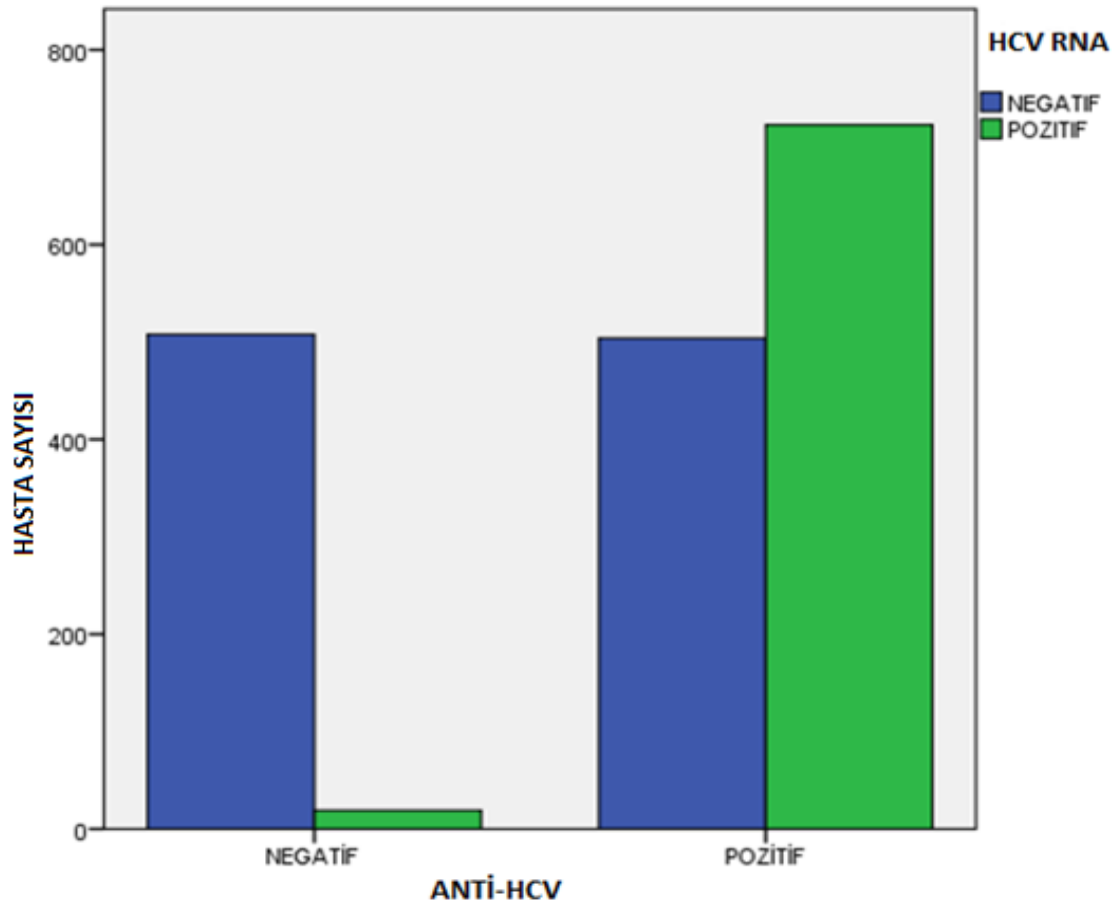
Hepatit C virüs RNA pozitifliğinde anti-HCV için ROC eğrisi çizilmiştir. Eğri altında kalan alan 0.761, standart hatası 0.01'dir. ROC eğrisi altında kalan alan 0.5'ten anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur ($p=0.001$). ROC eğrisi şekil 9'da verilmiştir.



Şekil 9: Hepatit C virüs RNA değerine göre anti-HCV S/CO için ROC eğrisi

Hepatit C virüs RNA pozitiflik tanısında anti-HCV için tespit edilen cut-off noktası 7.13 bulunmuştur. Bu değerin duyarlılığı %97.4, özgüllüğü %50.3, pozitif prediktif değeri %59, negatif prediktif değeri %96.4 hesaplanmıştır. Anti-HCV ile HCV RNA durumunun karşılaştırılması tablo 8’de verilmiştir.

Anti-HCV değerleri bulduğumuz yeni cut off değerine göre pozitif ve negatif olarak düzenlenmiştir. Bu işlemten sonra yapılan ki-kare testinde anti-HCV cut-off değeri ile HCV RNA pozitifliği arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunmuştur ($p=0.001$).



Şekil 10: Yeni anti-HCV cut-off değerimize göre HCV RNA durumu grafiği

Tablo 8: Yeni anti-HCV cut-off değeri ile HCV RNA karşılaştırılması

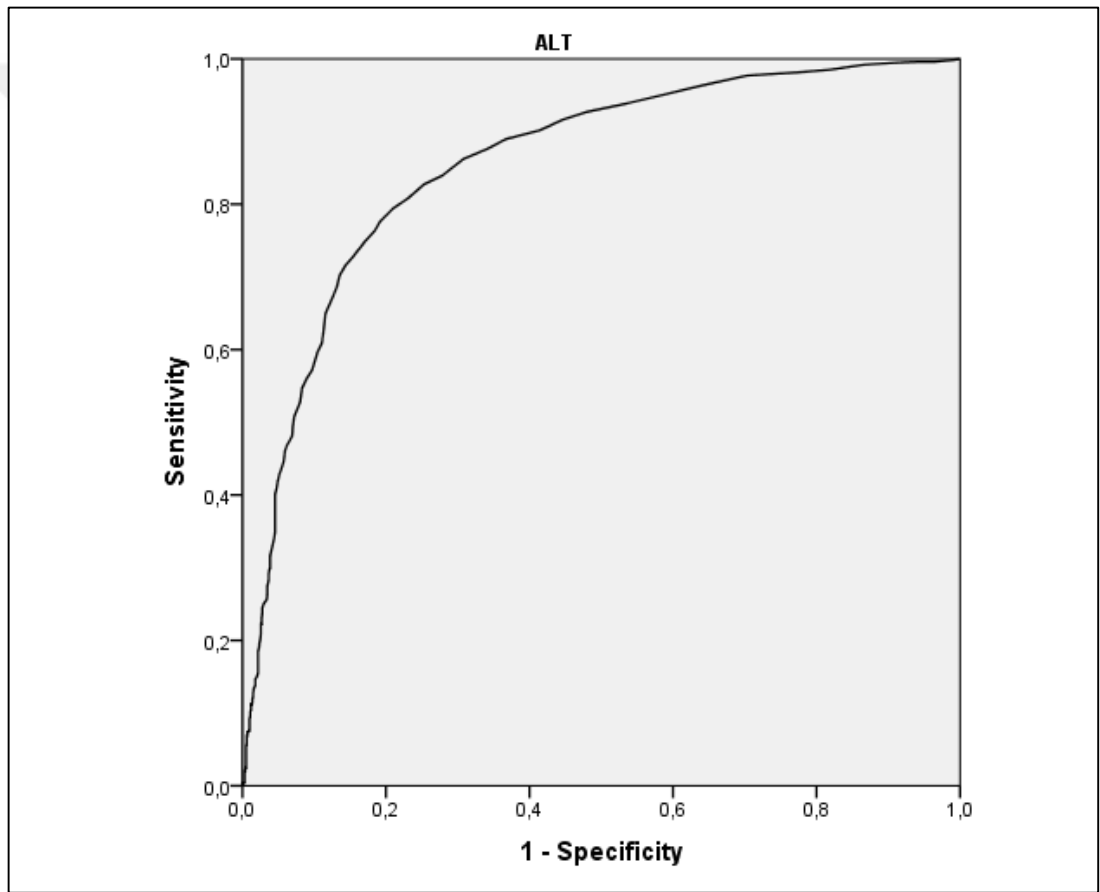
		HCV RNA		Toplam
		NEGATİF	POZİTİF	
Anti-HCV (S/CO)	NEGATİF (S/CO <7.13)	508	19	527
	POZİTİF (S/CO ≥7.13)	504	723	1227
Toplam		1012	742	1754

Tablo 9: Yeni anti-HCV cut-off değerimizin HCV viremi tanısındaki performansı

Anti-HCV (S/CO)	7.13
Duyarlılık, %	97.4
Özgüllük, %	50.3
Pozitif Prediktif Değer, %	58.9
Negatif Prediktif Değer, %	96.4

Hepatit C Virüs RNA Değerine Göre ALT için Cut-off Noktası Tayini

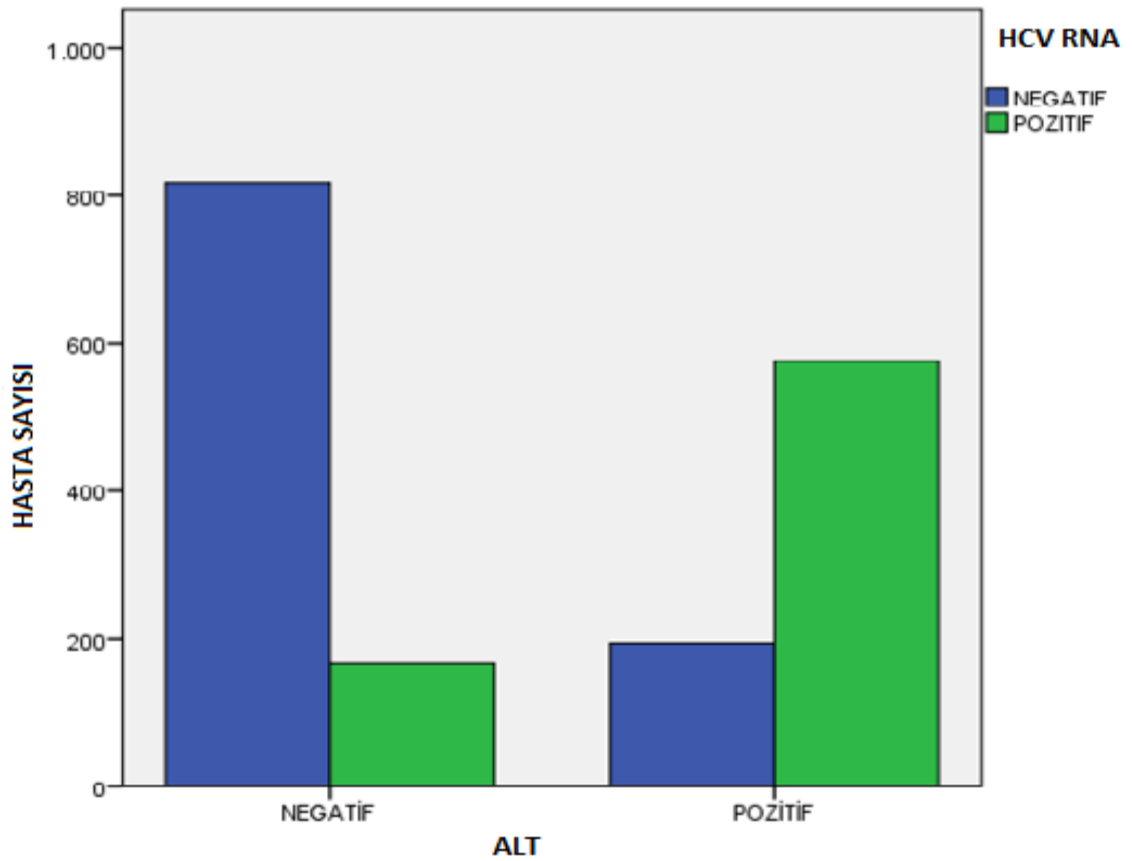
Hepatit C virüs RNA pozitifliğinde ALT için ROC eğrisi çizilmiştir. Eğri altında kalan alan 0.856, standart hatası 0.01'dir. ROC eğrisi altında kalan alan 0.5'ten anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur ($p=0.001$). ROC eğrisi şekil 11'de verilmiştir.



Şekil 11: Hepatit C virüs RNA değerine göre ALT için ROC eğrisi

Hepatit C virüs RNA pozitiflik tanısında ALT için tespit edilen cut-off noktası 27.5 IU/L'dir. Bu değerin duyarlılığı %77.6, özgüllüğü %80.8, pozitif prediktif değeri %74.8, negatif prediktif değeri %83.1 olarak bulunmuştur (Tablo 11). Alanin aminotransferaz ile HCV RNA durumunun karşılaştırılması şekil 12 ve tablo 10'da verilmiştir.

Alanin aminotransferaz değerleri bulduğumuz yeni cut off değerine göre pozitif ve negatif olarak düzenlenmiştir. Bu düzenlemeden sonra yapılan ki-kare testinde ALT cut-off değeri ile HCV RNA pozitifliği arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunmuştur ($p=0.001$).



Şekil 12: Yeni ALT cut-off değerimize göre HCV RNA durumu grafiği

Tablo 10: Yeni ALT cut-off değeri ile HCV RNA karşılaştırılması

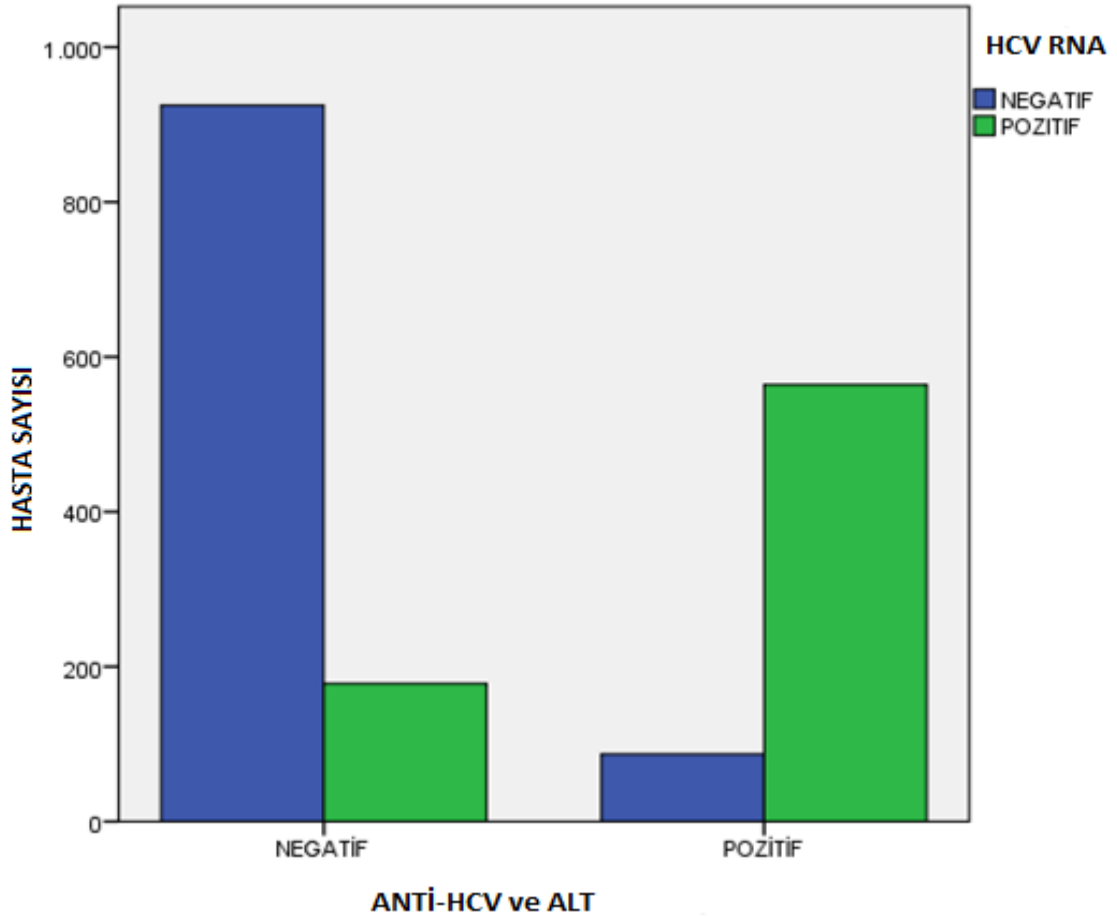
		HCV RNA		Toplam
		NEGATİF	POZİTİF	
ALT (IU/L)	NEGATİF (<27.5 IU/L)	818	166	984
	POZİTİF (≥27.5 IU/L)	194	576	770
Toplam		1012	742	1754

Tablo 11: Yeni ALT cut-off değerimizin HCV viremi tanısındaki performansı

ALT (IU/L)	27.5
Duyarlılık, %	77.6
Özgüllük, %	80.8
Pozitif Prediktif Değer, %	74.8
Negatif Prediktif Değer, %	83.1

Yeni Anti-HCV ve ALT Cut-off Değerlerinin Birlikte Değerlendirilmesi

Çalışmamızda yeni anti-HCV cut-off değeri ve yeni ALT cut-off değeri SPSS programı ile tek değişken haline getirilmiştir. Ki-kare testinde her iki cut-off değerinin birlikte kullanılması ile HCV RNA durumu arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunmuştur ($p=0.001$). Her iki cut-off değeri birlikte kullanıldığında HCV RNA durumu karşılaştırması şekil 13 ve tablo 12’de verilmiştir. HCV RNA pozitiflik tanısında iki cut-off değeri birlikte kullanıldığında duyarlılık %76, özgüllük %91.4, pozitif prediktif değer %86.6, negatif prediktif değer %83.9 olarak hesaplanmıştır (Tablo 13).



Şekil 13: Anti-HCV ve ALT cut-off değerleri birlikte kullanıldığında HCV RNA durumu grafiği

Tablo 12: Anti-HCV ve ALT cut-off değerlerinin HCV RNA durumu ile karşılaştırılması

		HCV RNA		Toplam
		NEGATİF	POZİTİF	
Anti-HCV (S/CO) ve ALT (IU/L)	NEGATİF (Anti-HCV S/CO <7.13 ve ALT <27.5 IU/L)	925	178	1103
	POZİTİF (Anti-HCV S/CO ≥7.13 ALT ≥27.5 IU/L)	87	564	651
Toplam		1012	742	1754

Tablo 13: Anti-HCV ve ALT cut-off değerlerinin HCV viremi tanısındaki performansı

Anti-HCV ve ALT	
Duyarlılık, %	76
Özgüllük, %	91.4
Pozitif Prediktif Değer, %	86.6
Negatif Prediktif Değer, %	83.9

Çalışmamızda ülkemizde en sık görülen genotip 1b ile 1b dışındaki diğer genotip arasında ALT ve anti-HCV değerleri açısından fark olup olmadığı incelenmiştir.

Genotip sonucu 1b olanlar ile diğer genotiplerin ALT ve anti-HCV ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır (sırasıyla $p=0.148$ ve $p=0.395$) (Tablo 14).

Tablo 14: Alanin aminotransferaz ve anti-HCV değerlerinin genotip sonucuna göre değerlendirilmesi

Genotip	ALT (IU/L)	Anti-HCV (S/CO)
	Ort±SD (medyan)	Ort±SD (medyan)
1b	54,09±67,4 (37)	12,9±4,96 (13,18)
Diğer	59,37±70,5 (41)	12,85±2,57 (13,11)
P	0,148	0,395

Mann Whitney U Test

Ort: ortalama, SD: standart deviasyon

TARTIŞMA

Hepatit C virüsü tüm dünyada akut ve kronik viral hepatitlerin en önemli etkenlerinden biridir. 1989 yılında virüsün moleküler yöntemlerle tanımlanması virüsün biyolojisinin, vücuda bulaş yollarının anlaşılmasına ve bu virüsü tanımlayacak yeni tanı yöntemlerinin geliştirilmesine neden olmuştur (22).

Hepatit C virüsünün başlıca bulaş yolunun kan ve kan ürünleri olduğunun keşfinden sonra yeni vaka sayısını azaltmak amacıyla yapılan çalışmalar ile HCV'ye özgül antikorları saptayan EIA testlerinin ve sonrasında doğrulama için RIBA testinin geliştirilmiş olması 1990'lı yılların sonunda transfüzyonla ilişkili HCV enfeksiyon insidansının %0.01'den daha azına düşmesine neden olmuştur (23). Günümüzde ise gelişen HCV tarama yöntemleri ile birlikte bu rakamın 1 milyon ünite transfüzyonda bire kadar düştüğü gösterilmiştir (24).

Günümüzde HCV bulaşını önlemek veya şüpheli olgularda tanı koymak amacıyla kan ve kan ürünlerinde ilk basamak tarama testi olarak anti-HCV EIA ve CLIA testleri kullanılmaktadır.

Bu tarama testleri HCV riskini azaltmada son derece etkili olmasına karşın, özellikle HCV prevalansı düşük olan toplumlarda, HCV enfeksiyonuna ait klinik bulguları olmayan bazı kişilerde yalancı pozitif test sonuçlarıyla sıklıkla karşılaşmaktadır (25,26).

Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezleri, özellikle HCV prevalansı düşük toplumlardaki yalancı pozitif anti-HCV test sonuçlarını azaltmak amacıyla birkaç üretici firma için hastadaki gerçek antikor pozitifliğini yansıtan anti-HCV S/CO cut-off değerlerini bildirerek HCV tanı algoritmasını genişletmiştir (14). CDC aynı zamanda anti-HCV S/CO cut-off değerlerinin toplum özelliklerine bakılmaksızın sistem verilerinin analizi ile elde edilebileceğini önermiş ve laboratuvarların kendi HCV tanı algoritmalarını oluşturmalarına olanak sağlamıştır.

Laboratuvarımızda anti-HCV testi çalıştığımız ARCHITECT kiti (Abbott Laboratories, USA) için CDC tarafından %95 olasılıkla gerçek antikor pozitifliğini yansıtan anti-HCV S/CO cut-off değeri ≥ 5 olarak önerilmiştir (14).

Çalışmamızda HCV RNA ile anti-HCV S/CO değerleri karşılaştırılarak cut-off değeri 7.13 bulunmuştur. Bu cut-off değeri için duyarlılık %97.4, özgüllük %50.3, pozitif prediktif değer %58.9, negatif prediktif değer %96.4 olarak hesaplanmıştır. Bu değer CDC'nin kullandığımız kit için önerdiği anti-HCV S/CO cut-off değerine yakındır.

Kermani ve ark. tarafından 2015 yılında İran'da kan transfüzyon merkezinde 265 hasta üzerinde yapılan kesitsel bir çalışmada anti-HCV S/CO değerleri kantitatif HCV RNA analizi ile karşılaştırılarak viremik ve viremik olmayan hastalarda ayrı 2 cut-off değeri hesaplanmıştır. Bu çalışmada kullanılan anti-HCV kitinin kuşağı belirtilmemiştir. Anti-HCV S/CO oranı, viremik hastalarda 4.1, viremik olmayan hastalarda 2.7 saptanmıştır. Viremik hastalardaki anti-HCV S/CO oranı viremik olmayanlara göre anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur ($p<0.05$). Anti-HCV S/CO değeri 2.7'nin (%100 duyarlılık ve %81.4 özgüllük) altında olan hastalarda vireminin olmadığı, bu değer üzerinde olan hastalarda vireminin olduğu gözlemlenmiştir (27).

Ülkemizde Altuğlu ve ark. tarafından 2011 yılında Ege Üniversitesi'nde anti-HCV test sonucu reaktif olan 309 hasta ile yapılan çalışmada anti-HCV reaktif test sonuçları HCV RNA analizi yerine line immunoassay (LIA) yöntemi ile doğrulanmıştır. Anti-HCV testi 2. kuşak EIA ile çalışılmıştır. Bu çalışma sonucunda anti-HCV S/CO cut-off değeri %91.2 duyarlılık ve %81.4 özgüllük ile 3.27 olarak bulunmuştur. Bu çalışmanın sonucunda, anti-HCV test sonucu S/CO değeri 3.27'nin üzerinde olan hastalarda yüksek antikor pozitifliği olduğu ve ek teste gerek olmadığı sonucuna varılmıştır (28).

Lai ve ark. tarafından 2011 yılında Amerika Birleşik Devletleri Department of Veterans Affairs Medical Centers'da yapılan retrospektif çalışmada Vitros ECI CIA (Ortho Clinical Diagnostics) ile çalışılan 34.243 anti-HCV test sonucu taranmıştır. Herhangi bir dışlama kriteri konulmadan tüm anti-HCV reaktif test sonuçları çalışmaya dahil edilmiştir. Anti-HCV test sonucu reaktif olan hasta örnekleri -70 derecede saklanarak 30 gün içinde HCV RNA çalışılmıştır. Anti-HCV testi reaktif HCV RNA testi negatif olan hasta örneklerine RIBA çalışılmıştır. 30 aylık dönemde 3082 anti-HCV test sonucu reaktif bulunmuştur. Bunlardan HCV

RNA ve RIBA testi negatif olan 281 hasta örneği yalancı anti-HCV pozitifliği olarak değerlendirilmiştir. Tüm test sonuçları ile yapılan ROC analizinde 3, 8 ve 20 olmak üzere üç ayrı anti-HCV S/CO cut-off değeri elde edilmiştir. Elde edilen cut-off değerleri kullanılarak HCV tanı algoritması; anti-HCV S/CO değeri <3.0 olan hasta örneklerinde gerçek anti-HCV negatifliği, anti-HCV S/CO değeri 3.0-19.9 arasında ek test olarak RIBA yapılması RIBA pozitif bulunan hasta örneklerine HCV RNA çalışılması, anti-HCV S/CO değeri >20.0 olan hasta örneklerinde vireminin tespiti için ek test yapılmadan HCV RNA çalışılması şeklinde düzenlenmiştir (29).

Kao ve ark. tarafından 2015 yılında Tayvan’da hemodiyaliz hastaları üzerinde yapılan kesitsel çalışmada HCV viremisini göstermede anti-HCV S/CO değerinin önemini vurgulamak amacıyla anti-HCV ve HCV RNA karşılaştırılmıştır. Anti-HCV testi 3. kuşak mikropartikül enzim immün yöntemi (microparticle enzyme immunoassay; MEIA) ile (AxSYM HCV version 3.0, Abbott Laboratories, USA) HCV RNA reverse transcriptase PCR (Cobas Amplicor Hepatitis C Virus Test, version 2.0 Roche Molecular Systems, USA) ile çalışılmıştır. Bu çalışmada antiviral tedavi alan hastalar çalışma dışı bırakılmıştır. Toplam 369 hastada anti-HCV çalışılmış bunlardan 53 tanesinde reaktif sonuç elde edilmiş ve sonrasında bu hastaların serumlarında HCV RNA çalışılmıştır. Elde edilen verilerle yapılan ROC analizinde 15, 24, 44 ve 65 olmak üzere dört farklı anti-HCV S/CO cut-off değeri elde edilmiştir. Sonuç olarak hemodiyaliz hastalarındaki HCV viremisinin öngörülmesinde duyarlılığı %80.4 ve özgüllüğü %100 olan 65 değeri, cut off değeri olarak belirlenmiştir. Bu değer bizim çalışmamızda elde ettiğimiz 7.13 değerinden oldukça yüksek bir değer olmakla birlikte duyarlılığı düşüktür (30).

Moretti ve ark. tarafından 2012 yılında İtalya’da yapılan retrospektif çalışmada anti-HCV S/CO değerleri ile RIBA sonuçları karşılaştırılmıştır. Anti-HCV testi 3. kuşak CLIA yöntemi (Ortho-Clinical Diagnostics, Johnson & Johnson, United Kingdom) ile çalışılmıştır. Çalışmada 12.800 hasta verisi taranmış olup bunlardan 313 hastanın anti-HCV testi reaktif bulunmuştur. Anti-HCV testi reaktif bulunan hastalar RIBA testi (Chiron RIBA HCV 3.0 strip immunoassay (Chiron Corporation, Emeryville, CA) ile doğrulanmıştır. Pozitif, negatif ve indetermine RIBA sonuçlarına göre üç farklı anti-HCV S/CO cut off değeri belirlenmiştir. Üç

farklı cut-off değeri içinde %95 pozitif prediktif değere sahip olan 10.3 değeri seçilmiştir. Sonuç olarak kendi laboratuvarları için HCV tanı algoritmasını; anti-HCV S/CO değeri 10.3'ün altında olan hastalarda ek olarak RIBA testi yapılması, anti-HCV S/CO ≥ 10.3 olan hastalarda ise bu değerin, hastaların %95'inde gerçek antikor değerini yansıttığı ve bu nedenle ek teste gerek olmadan doğrudan anti-HCV test sonucunun raporlanması şeklinde düzenlemişlerdir (31).

Pan ve ark. tarafından 2016 yılında Çin'de yapılan retrospektif bir çalışmada anti-HCV ile RIBA karşılaştırılmıştır. Anti-HCV testi EIA yöntemi ile (Elecys Anti-HCV II assay, Roche Diagnostics International Ltd., Rotkreuz, Switzerland) çalışıldıktan sonra anti-HCV S/CO >1 olan serumlarda RIBA testi (RecomLine HCV IgG strip immunoassay, Mikrogen GmbH, Neuried, Germany) çalışılmıştır. Çalışılan anti-HCV kitinin kuşağı belirtilmemiştir. Bu çalışmada 36.341 anti-HCV testi taranmış olup 288 test sonucu reaktif bulunmuştur. Elde edilen verilerden yapılan ROC analizinde optimal cut-off değeri %97.8 duyarlılık ve %86 özgüllük ile 12.27 seçilmiştir. Araştırmacılar anti-HCV S/CO cut-off değerinin 12.27'ye yükseltilmesi ile anti-HCV S/CO ≥ 1 kullanıldığında ortaya çıkan yanlış pozitif sonuçların önüne geçilebileceğini düşünmüşlerdir (32).

Ülkemizde Balk ve ark. tarafından 2007 yılında Ankara Yüksek İhtisas Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nde yayınlanan bir diğer çalışmada anti-HCV test sonucu reaktif olan hastalarda HCV viremisinin gösterilmesinde anti-HCV, HCV RNA ve ALT değerlerinin kullanımı araştırılmıştır. Bu çalışmada anti-HCV testi 3. kuşak mikropartikül enzim immün yöntemi ile çalışılmış olup 124 hastada anti-HCV test sonucu reaktif bulunmuştur. Hastaların tümü hepatit B yüzey antijeni (HBsAg) ve Human Immunodeficiency Virus (HIV) antikorları açısından taranmış ve negatif bulunmuştur. Kantitatif HCV RNA analizi ile anti-HCV S/CO değerlerinin karşılaştırılması ile anti-HCV S/CO cut-off değeri 25.9 seçilmiştir. Bu değer için duyarlılık ve özgüllük %100 olarak bulunmuş anti-HCV S/CO değeri 25.9 ve altında olan hastaların hiçbirinde HCV RNA pozitif saptanmamıştır. Araştırmacılar bu çalışmanın sonunda belirlenecek cut-off değeri sayesinde HCV RNA testinin her hastaya yapılmasının gerekli olmadığı düşüncesine varılmıştır (33). Bu çalışmada

elde edilen cut-off değeri çalışmamızda elde ettiğimiz cut-off değerinden hem sayısal hem de duyarlılık, özgüllük bakımından oldukça yüksektir.

Şanlıdağ ve ark. tarafından 2016 yılında yapılan çok merkezli retrospektif bir çalışmada anti-HCV düzeyleri ile HCV RNA arasındaki korelasyon incelenmiştir. Bu çalışmaya anti-HCV testi reaktif olan 658 hasta dahil edilmiş hiçbir dışlama kriteri uygulanmamıştır. ROC analizi sonucunda anti-HCV S/CO cut-off değeri %95.6 duyarlılık ve %52.7 özgüllük ile 5 bulunmuştur. Bu çalışmada elde edilen cut-off değeri hem duyarlılık, özgüllük hem de değer bakımından çalışmamıza benzerdir. Araştırmacılar bu çalışmanın sonucunda düşük titrede anti-HCV reaktivliklerinde öncelikle en az iki hafta sonra testin yeni bir örnekle tekrarlanması ve hastanın kliniği ile birlikte değerlendirilmesi bunun sonucunda şüphe olması durumunda HCV RNA çalışılması gerektiği düşüncesine varmışlardır (34).

Karakoç ve ark. tarafından 2017 yılında kan donörleri üzerinde yapılan çok merkezli bir çalışmada anti-HCV, RIBA ve HCV RNA sonuçları karşılaştırılmıştır. Bu çalışmada, anti-HCV testi (Ortho HCV Ab Version 3.0 (Ortho Clinical Diagnostics, US) ve Radim HCV Ab (Radim S.p.A, Italy), RIBA testi (INNO-LIA HCV Ab 3.0 (Innogenetics, Belgium) ve Chiron RIBA HCV 3.0 (Chiron Corporation, US) olmak üzere iki farklı ticari kit ile tüm örnekler ikişer kez çalışılmıştır. Seroreaktivlik oranı %0.25 olarak hesaplanmıştır. Anti-HCV sonuçları RIBA ve HCV RNA ile karşılaştırılıp iki farklı ticari kit için farklı cut-off değeri hesaplanmıştır. Bu değerler OrthoEIA için 8.1, microEIA için 3.4 olarak hesaplanmıştır. Araştırmacılar bu çalışmanın sonunda anti-HCV test sonucu gri zon ve reaktif olan her örneğin iki kuyucukla tekrar çalışılması negatif olanların gerçek negatif olarak kabul edilmesi, tekrar gri zon olan örneklerin takibi yapılması, reaktif olan örneklerde cut-off değerinin altında olan örneklerle RIBA testi çalışılması, cut-off değerine eşit ve üstü olan örneklerde ise nükleik asit testi çalışılması şeklinde algoritma oluşturmuşlardır (35).

Hepatit C virüsü, yaşam döngüsünün herhangi bir döneminde konağın genetik materyaline integre olamadığından latent enfeksiyon oluşturmamaktadır. Bu nedenle virüsün yaşam döngüsündeki farklı noktaları hedef alan direkt etkili antiviral ilaçlar sayesinde günümüzde hastalığın tedavisinin mümkün olduğu hatta tamamen kür

sağlandığı bilinmektedir. Hepatit C virüs enfeksiyonu olan bir hastada vireminin ortaya konulmasından sonraki süreçte kantitatif HCV RNA analizi ile viral yük durumu ve viral genotip tayini klinisyenin tedavi seçimine yol göstermektedir. Özellikle HCV'ye karşı yeni geliştirilen direkt etkili antivirallerin kombinasyon seçenekleri ve uygun tedavi süreleri genotip ve subtiplere göre değişiklik göstermektedir (22). Bu nedenle bölgede en sık görülen HCV genotip ve subtipin hangisi olduğu ve hastanın hangi genotip ya da subtip ile enfekte olduğunun bilinmesi önem taşımaktadır.

Seo ve ark. tarafından 2009 yılında Kore'de yapılan retrospektif bir çalışmada hastaların anti-HCV, HCV RNA ve ALT değerleri karşılaştırılmıştır. Çalışmamıza benzer şekilde anti-HCV testi EIA yöntemi ile (Architect i2000; Abbott Laboratories, Abbott Park, IL, USA) HCV RNA testi kalitatif (Cobas Amplicor; Roche, Basel, Switzerland) ve kantitatif (Cobas TaqMan Analyzer; Roche) yöntemle çalışılmıştır. Anti-HCV testi reaktif HCV RNA testi negatif olan hastalarda ek test olarak RIBA (Chiron RIBA HCV 3.0 Strip Immunoblot Assay, Chiron Co., Emeryville, CA, USA) çalışılmış bu durumda RIBA pozitif olan hastalar yalancı pozitif olarak kabul edilmiştir. Daha önce interferon tedavisi alan, karaciğer sirozu, hepatosellüler karsinomu, hepatit B yüzey antijeni pozitif ve anti-HIV pozitif olan hastalar çıkarıldıktan sonra kalan 487 hasta çalışmaya dahil edilmiştir. Bu çalışmada elde edilen verilerden yapılan ROC analizinde anti-HCV S/CO için cut off değeri %94 duyarlılık ve %97 özgüllük ile 10.9, ALT için cut-off değeri %66 duyarlılık %77 özgüllük ile 32.5 IU/L olarak bulunmuştur. Bizim çalışmamıza kıyasla bu çalışmada anti-HCV için bulunan cut-off değerinin duyarlılığı benzer olmakla birlikte özgüllüğü daha yüksektir. Bu çalışmada ayrıca 179 hastada HCV genotip analizi yapılmıştır. 83 hastada genotip 1, 96 hastada genotip 2 saptanmıştır. HCV RNA seviyeleri genotip 1 de daha yüksek bulunmuşken ($p<0.001$) yaş, cinsiyet ve ALT değerleri açısından iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır ($p>0.05$). Bu çalışmanın sonucunda araştırmacılar anti-HCV S/CO <10.9 bulunduğunda kalitatif HCV RNA çalışılması, anti-HCV ≥ 10.9 bulunduğunda ise kantitatif HCV RNA çalışılması gerektiği kanısına varmışlardır (36).

Çalışmamızda ROC analizi ile ALT için cut-off noktası 27.5 IU/L olarak seçilmiştir. Bu değerin duyarlılığı %77.6, özgüllüğü %80.8, pozitif prediktif değeri %74.8, negatif prediktif değeri %83.1 olarak bulunmuştur. Bu çalışmayla kıyaslandığında ALT cut-off değerimizin duyarlılığı ve özgüllüğü daha yüksektir.

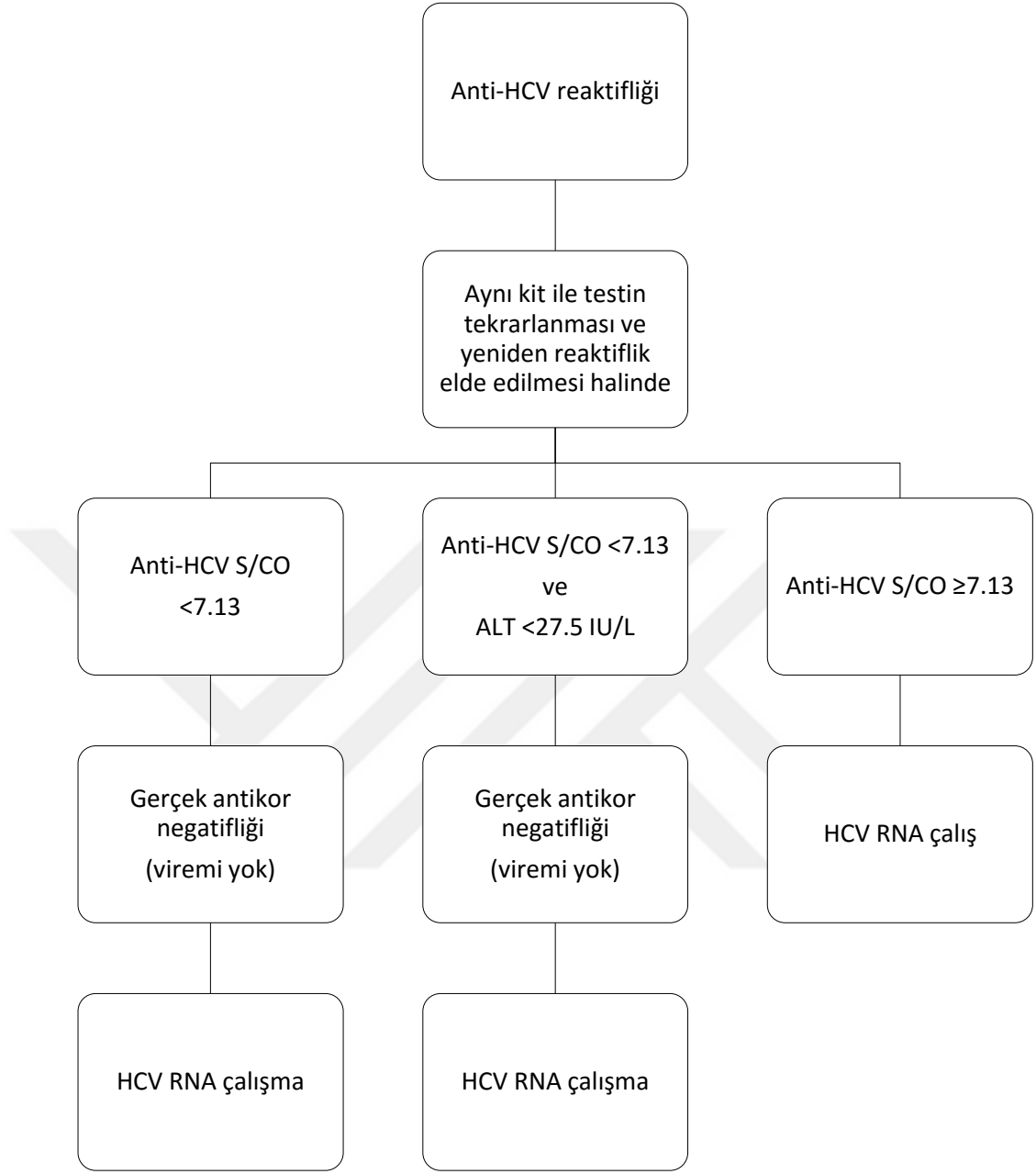
Çalışmamızda ROC eğrileri çizilerek hem anti-HCV hem de ALT için cut-off değerleri elde edilmiştir. Alanin aminotransferaz testi HCV tanısında referans bir test olmadığından ALT cut-off değerine göre anti-HCV için yeni bir cut-off değeri belirlenememiştir. Bu nedenle ALT ve anti-HCV yeni cut-off değerleri birlikte kullanıldığında HCV viremisini saptamadaki tanısız değeri araştırılmıştır. Çalışmamızda HCV RNA pozitiflik tanısında iki cut-off değeri birlikte kullanıldığında duyarlılık %76, özgüllük %91.4, pozitif prediktif değer %86.6, negatif prediktif değer %83.9 olarak hesaplanmıştır. Her iki cut-off değerinin birlikte kullanılması durumunda duyarlılık ve negatif prediktif değer düşüğü özgüllük ve pozitif prediktif değerin arttığı gözlemlenmiştir.

Çalışmamızın yapıldığı üç yıllık dönemde 622 hastanın HCV genotip analizine ulaşılmıştır. Elde edilen HCV genotipleri arasında 522 (%85) olgu ile genotip 1 en sık görülen genotip olmuştur. Genotip 1'in 230'u (%44) subtiplendirilememiştir. Subtiplendirme yapılanlar içinde en sık genotip 1b saptanmıştır. Çalışmamızda ülkemizde en sık görülen genotip 1b ile 1b dışındaki diğer genotipler arasında ALT ve anti-HCV değerleri açısından fark olup olmadığı incelenmiştir. Genotip sonucu 1b olanlar ile diğer genotiplerin ALT ve anti-HCV ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ($p>0.05$). Bu durum genotip 1 saptanan olguların çoğunun subtiplendirilememesi nedeniyle olabilir.

Elde ettiğimiz veriler ışığında HCV için tanı algoritmamız:

- 1- Tarama amaçlı serumda anti-HCV testi çalışılması
- 2- Anti-HCV reaktif saptanan örneklerin aynı test ile tekrarlanması
- 3- Anti-HCV S/CO değeri <7.13 saptandığında gerçek antikor negatifliği (viremi yok) kabul edilmesi
- 4- Yeni cut-off değerimize göre nonreaktif (S/CO <7.13) ve ALT değeri <27.5 IU/L ise yine gerçek antikor negatifliği (viremi yok) kabul edilmesi
- 5- Anti-HCV testi yeni cut-off değerimize göre nonreaktif saptanan durumlarda HCV RNA çalışılmaması, klinik gereklilik halinde testin en az iki hafta sonra tekrarlanması ve HCV RNA çalışılması
- 6- Anti-HCV S/CO değeri ≥ 7.13 saptandığında ise HCV RNA çalışılması

şeklinde düzenlenebilir (Şekil 14).



Şekil 14: Çalışmamızın sonunda laboratuvarımız için oluşturduğumuz HCV tanı algoritması

Çalışmamız birkaç eksikliğe sahiptir: Laboratuvarımızda anti-HCV için 2. kuşak CMIA testi kullanılmaktadır.

Anti-HCV testi reaktif, HCV RNA testi negatif çıkan örneklerle yönelik ek test yapılmamaktadır.

Çalışmamızın örneklemini 11 farklı hastanenin örneklerinin çalışıldığı İstanbul İli 2. Hizmet Bölgesi Merkez Laboratuvarı'nda çalışılan hasta verileri oluşturmaktadır. Tüm hastanelerin hasta bilgi sistemi klinisyenlerin kullanımına açık olup her hastanenin kendisinde kuruludur. Bu nedenle hastaların antiviral tedavi alıp almadıkları bilgisine ulaşılamadığından çalışmamıza tanı ve tedavi konusunda kısıtlama yapılmaksızın aynı serum örneğinde eş zamanlı anti-HCV, HCV RNA ve ALT çalışılan tüm hastalar dahil edilmiştir.

Anti-HCV S/CO için elde ettiğimiz cut-off değeri birçok çalışmada elde edilen cut-off değerlerinin duyarlılıkları ile benzer olmakla birlikte özgüllüğü ve pozitif prediktif değeri düşüktür. Bunun nedeni hastaların antiviral tedavi alıp almadığının ve hastalığın hangi evresinde olduğunun bilinmemesi olabilir.

Çalışmamızda tüm hastaların HBsAg ve anti-HIV değerleri olmadığından birkaç çalışmada olduğu gibi HBsAg ve anti-HIV pozitif olan hastalar çalışma dışında bırakılmamıştır.

Hastaların tümünde genotip analizi yapılmamıştır. Genotip analizinin yapıldığı yaklaşık 18 aylık dönemde kullandığımız kit nedeniyle HCV'nin bazı genotipleri ve subtipleri saptanamamıştır. Bu nedenle çalışmamızın başında planladığımız genotiplere göre ayrı veya ülkemizde en sık görülen subtip 1b için bir anti-HCV S/CO cut-off değeri hesaplanamamıştır.

Tüm bu sebepler göz önünde bulundurulduğunda çalışmamızın devamının prospektif yürütülmesi ve çalışmaya dahil edilecek hastaların tümünde aynı serumdan anti-HCV, HCV RNA, ALT, genotip tayini ve HBsAg, anti-HIV gibi antikorların çalışılmasıyla elde edilecek verilerden genel ve genotiplere göre ayrı ayrı anti-HCV S/CO cut-off değeri belirlenmesi ile yeni bir HCV tanı algoritmasının geliştirilmesinin daha iyi olacağı düşüncesindeyiz.

SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada Temmuz 2014-Temmuz 2017 tarihleri arasında anti-HCV testi çalışılan 754.190 hasta verisi retrospektif olarak taranmıştır. Anti-HCV test sonucu reaktif olan 10.679 sonuç bulunmuştur. Test sonucu reaktif olan, 18 yaş üstü, aynı hastanın aynı serumunda anti-HCV, HCV RNA ve ALT çalışılmış 1290 olgunun 1754 verisi üzerinden anti-HCV ve ALT için duyarlılık ve özgüllük dengesi en iyi olan cut-off değerlerinin araştırıldığı çalışmamızdan elde edilen sonuçlar şu şekildedir:

- 1- Çalışmamıza dahil edilen dönem için anti-HCV seroreaktivite oranımız %1.4'dür.
- 2- Hepatit C enfeksiyonu olan hastaların büyük bir kısmı Gastroenteroloji ve Enfeksiyon Hastalıkları kliniğinde takip edilmektedir.
- 3- Çalışmamızda olguların 34'ünde (%2.63) Hepatit B enfeksiyon tanısı olduğu gözlemlenmiştir.
- 4- Çalışmamızda olguların 522'si (%84) ile en sık genotip 1 saptanmıştır. Subtiplerden ise 235 (%38) olgu ile en sık subtip 1b saptanmıştır.
- 5- Çalışmamızda HCV RNA sonucu pozitif olan hastaların anti-HCV ve ALT değerleri HCV RNA sonucu negatif olan hastalara göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur ($p=0.001$).
- 6- Çalışmamızda anti-HCV için ROC analizi yapılmış olup tüm cut-off noktaları içinden duyarlılık ve özgüllük dengesi en iyi olan 7.13 değeri, yeni cut-off değeri olarak seçilmiştir.
- 7- Yeni anti-HCV cut-off değerimiz için duyarlılık %97.4, özgüllük %50.3, pozitif prediktif değer %59 ve negatif prediktif değer %96.4 olarak hesaplanmıştır. Bu cut-off değerinin duyarlılık ve negatif prediktif değeri yüksek olduğundan cut-off değerinin altında saptanan reaktivite değerleri yalancı pozitifliği göstermektedir.
- 8- Anti-HCV test sonucu S/CO <7.13 saptanması durumunda HCV RNA testi çalışılmaması, hastada HCV yönünden klinik şüphenin devam etmesi durumunda en

az 2 hafta sonra anti-HCV testinin yeni bir örnekle tekrarlanması, yeniden reaktiflik saptandığında HCV RNA çalışılması önerilebilir.

9- Yeni anti-HCV cut-off değerimizin pozitif prediktif değeri düşük olduğundan cut-off değerinin üzerinde saptanan anti-HCV reaktifliklerinde hastada viremi olmayabilir. Bu nedenle cut-off değerinin üzerindeki tüm reaktiflikler HCV RNA ile doğrulanmalıdır.

10- Günümüzde yüksek duyarlılığı, düşük maliyeti, çok fazla teknik beceri gerektirmemesi ve otomatize cihazlarla çalışılabilme imkanı, test sonuçlanma süresinin kısa olması gibi nedenlerle birçok laboratuvarında kullanımda olan anti-HCV antikor testleri, HCV tanı ve taramasında vazgeçilmez bir yöntemdir. Ancak ülkemiz gibi HCV prevalansının düşük olduğu toplumlarda yalancı pozitif test sonuçları sıktır. Yeni cut-off değerinin laboratuvar iş akışı içerisinde kullanılmasıyla birlikte yalancı pozitif anti-HCV test sonuçları ve buna bağlı olarak gereksiz yere çalışılan HCV RNA test sayıları azaltılabilir.

11- Yeni anti-HCV cut-off değerimize göre anti-HCV test sonuçları raporlandığında HCV enfeksiyonlarını takip eden klinikler, cut-off değerinin altındaki reaktifliklerde HCV RNA sonucunu beklemeden hasta tarama amaçlı geldiyse yalancı pozitif bir sonucu, tedavi alan bir hasta ise verilen tedavinin başarısını öngörebilir.

KAYNAKLAR

1. Choo QL, Kuo G, Weiner AJ et al. Isolation of acDNA clone derived from a bloodborne non-A, non-B viral hepatitis genome. Science. 1989, 244:359-362
2. Altındış M, Tabak F (eds). Hepatit Mikrobiyolojisi. 1. Baskı. İstanbul: İstanbul Tıp Kitabevi, 2015:159-192
3. Ray SC, Thomas DL. " Hepatitis C " İçinde: Bennett JE, Dolin R, Blaser MJ (eds). Mandell, Douglas and Bennett' s Principles and Practice of Infectious Diseases. 8th ed. 2015:1904-1927
4. World Health Organization. Hepatitis C. Available at: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs164/en/> (erişim tarihi: 12.12.2017)
5. Köse Ş, Ece G, Şamlıoğlu P, Topaloğlu S. Tepecik Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nde düşük düzeyde antihepatit C pozitifliği saptanan örneklerin HCV RNA düzeylerinin değerlendirilmesi. Turk Hij Den Biyol Derg 2011; 68(4): 191-6.
6. Ecemiş T, Akçalı S, Erbay Dünder P, Şanlıdağ T. HCV enfeksiyonu tanısında anti-HCV testi ve eşik değer. Türkiye Klinikleri J Med Sci 2012; 32(6): 1648-52.
7. Türkiye Viral Hepatit Önleme ve Kontrol Programı 2018-2023, Sağlık Bakanlığı Yayın No: 1102, Ankara, 2018
8. Smith DB, Bukh J, Kuiken C et al. Expanded classification of hepatitis C virus into / genotypes and 67 subtypes: updated criteria and genotype assignment web resource. Hepatology. 2014;59(1):318-27
9. Gower E, Estes C, Blach S, Razavi-Sharer K, Razavi H. Global epidemiology and genotype distribution of the hepatitis C virus infection. J Hepatol. 2014;61(1S):45-57
10. Abacıoğlu YH, Öktem İMA, " Hepatit C Virusu " İçinde: Us AD, Ergünay K (eds). Moleküler, Klinik ve Tanısal Viroloji, Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi; 2012:336-365

11. Tabak F. " Virus Enfeksiyonları " İçinde: Willke Topçu A, Söyletir G, Doğanay M (eds). Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. 4. Baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 2017:1694-1698
12. Gupta E, Baipai M, Choudhary A. Hepatitis C virus: Screening, diagnosis, and interpretation of laboratory assays, Asian J Transfus Sci. 2014 Jan-Jun; 8(1): 19–25., doi: 10.4103/0973-6247.126683
13. Us AD. " Viral Enfeksiyonların Serolojik Tanısı " İçinde: Us AD. Temel İmmünoloji ve Seroloji. Ankara: Hipokrat Kitabevi; 2016:241-245
14. Centers for Disease Control and Prevention. Hepatitis C. Available at: <https://www.cdc.gov/hepatitis/hcv/labtesting.htm> (erişim tarihi: 12.12.2017)
15. Centers for Disease Control and Prevention. Hepatitis C. Available at: https://www.cdc.gov/hepatitis/hcv/pdfs/hcv_flow.pdf (erişim tarihi: 12.12.2017)
16. Freiman MJ, Tran MT, Schumacher GS et al. HCV Core Antigen Testing for Diagnosis of HCV Infection: A systematic review and meta-analysis. Ann Intern Med. 2016 September 06; 165(5): 345–355. doi:10.7326/M16-0065.
17. Li HC, Lo SY. Hepatitis C virus: Virology, diagnosis and treatment. World J Hepatol. 2015 June 8; 7(10): 1377-1389 ISSN 1948-5182.
18. Chevaliez S, Pawlotsky JM. Virology of hepatitis C virus infection. Best Practice & Research Clinical Gastroenterology. 26 (2012) 381–389.
19. Kato N. Molecular virology of Hepatitis C virüs. Acta Med. Okayama. 2001. Vol. 55, No. 3, pp.136
20. Kim WC, Chang KM. Hepatitis C virüs: virology and life cycle. Clinical and Molecular Hepatology. 2013;19:17-25
21. Collins GS, Reitsma JB, Altman DG, Moons KG. Transparent Reporting of a multivariable prediction model for Individual Prognosis or Diagnosis (TRIPOD): the TRIPOD statement. Ann Intern Med. 2015;162(1):55-63 PMID:25560714

22. Cloherty G, Talal A, Collier K et al. Role of serologic and molecular diagnostic assays in identification and management of hepatitis C virus infection. *J Clin Microbiol.* 2016. 54: 265–273.
23. Couroucé AM, Le Marrec N, Girault A, Ducamp S, Simon N. 1994. Anti-hepatitis C virus (anti-HCV) seroconversion in patients undergoing hemodialysis: comparison of second and third generation anti-HCV assays. *Transfusion* 34: 790–795.
24. Selvarajah S, Busch MP. 2012. Transfusion transmission of HCV, a long but successful road map to safety. *Antivir Ther* 17: 1423–1429.
25. Gretch DR. Diagnostic tests for hepatitis C. *Hepatology.* 1997; 26(3 S): 43S-47S.
26. Alter MJ, Kuhnert WL, Finelli L. Guidelines for laboratory testing and result reporting of antibody to hepatitis C virus. Centers for Disease Control and Prevention. *MMWR* 2003;52(RR03):1-16.
27. Kermani FR, Sharifi Z, Ferdowsian F, Paz Z, Tavassoli F. The Usefulness of Anti-HCV Signal to Cut-off Ratio in Predicting Viremia in Anti-HCV in Patients With Hepatitis C Virus Infection. *Jundishapur J Microbiol.* 2015 April; 8(4): e17841.
28. Altuğlu İ, Gürsel D, Aksoy A, Orman M, Erensoy S. The importance and role of anti-HCV signal/cutoff ratio in diagnosis of hepatitis C virus infection. *Ege Tıp Dergisi / Ege Journal of Medicine* 50(4): 223-228, 2011.
29. Lai KKY, Jin M, Yuan S et al. Improved Reflexive Testing Algorithm for Hepatitis C Infection Using Signal-to-Cutoff Ratios of a Hepatitis C Virus Antibody Assay. *Clinical Chemistry* 57:7 1050–1056 (2011)
30. Kao HH, Chen KS, Lin CL, Chang JJ, Lee CH. Utilization of Signal-to-Cutoff Ratio of Hepatitis C Virus Antibody Assay in Predicting HCV Viremia among Hemodialysis Patients. *Nephron* 2015;130:127–133, DOI: 10.1159/000430988.

31. Moretti M, Pieretti B, Masucci A et al. Role of Signal-to-Cutoff Ratios in Hepatitis C Virus Antibody Detection. *Clinical and Vaccine Immunology* p. 1329–1331. doi:10.1128/CVI.00175-12
32. Pan J, Li X, He G et al. Reflex threshold of signal-to-cut-off ratios of the Elecsys anti-HCV II assay for hepatitis C virus infection. *J Infect Dev Ctries* 2016; 10(9):1031-1034. doi:10.3855/jidc.7301
33. Balk M, Saydam G, Cengiz D et al. The Utility of ANTI-HCV S/CO Ratio, HCV-RNA and ALT Test in Predicting Viremia in ANTI-HCV Positive Patients. *Turkish Journal of Biochemistry* 2007; 32 (2) ; 51–54.
34. Şanlıdağ T, Akçalı S, Ecemiş T et al. Hepatit C Virus (HCV) Enfeksiyonunun Tanısında Anti-HCV Düzeyi (S/Co) ile HCV-RNA Arasındaki Korelasyonun Araştırılması. *Mikrobiyol Bul* 2016; 50(3): 508-510 doi: 10.5578/mb.26509
35. Karakoç AE, Berkem R, Irmak H et al. Investigation of an algorithm for anti HCV EIA reactivity in blood donor screening in Turkey in the absence of nucleic acid amplification screening. *Transfusion and Apheresis Science* 56 (2017) 732–737
36. Seo YS, Jung ES, Kim JH et al. Significance of Anti-HCV Signal-to-Cutoff Ratio in Predicting Hepatitis C Viremia. *The Korean Journal of Internal Medicine* Vol. 24. DOI: 10.3904/kjim.2009.24.4.302

ÖZGEÇMİŞ

I- Bireysel Bilgiler

Adı-Soyadı: Gülden AYDIN

Doğum yeri ve tarihi: Üsküdar / 04.07.1989

Uyruğu: T.C.

Medeni durumu: Evli

Askerlik durumu: Muaf

İletişim adresi ve telefonu: Kozyatağı mahallesi Sarıkaya sokak No:12 Daire:13

Kadıköy/İSTANBUL guldengulesen@hotmail.com Tel: 0507 931 53 13

Yabancı dili: İngilizce

II- Eğitimi

1. İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi 2012-2013 (6. Sınıf Farabi Öğrenci Değişim Programı)
2. Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi 2007-2012
3. İstanbul Bayrampaşa Tuna Lisesi 2003-2006
4. İstanbul Gaziosmanpaşa Ülkü İlköğretim Okulu 1995-2003

IV- Mesleki Deneyimi

1. 2 Aralık 2013- 16 Aralık 2013: Kocaeli Kartepe Toplum Sağlığı Merkezi- Tabip
2. 16 Aralık 2013- 30 Mart 2015: İstanbul Erenköy Ruh ve Sinir Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi- Ruh Sağlığı ve Hastalıkları-Asistan Doktor
3. 30 Mart 2015- Halen: İstanbul Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi- Tıbbi Mikrobiyoloji-Asistan Doktor

V- Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar

1. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Derneği

VI- Yayınları:

1. Aydın G., Ayçık ÖD, Yiğit G., Şenel F., Uzun MA., Adaleti R., Aksaray S., Ender Bir Peritonit Etkeni, *Aggregatibacter aphrophilus*, Türk Mikrobiyol Cem Derg 45(2):92-95, 2015 doi:10.5222/TMCD.2015.092
2. Aydın G, Yiğit G, Doğan Ö, Adaleti R, Aksaray S. Komplike Üriner Sistem Enfeksiyonuna Sekonder Gelişmiş Bir Sepsis Vakası. 31. ANKEM Kongresi. Poster Bildiri

3. Aydın G, Akar T, Yiğit G, Doğan Ö, Adaleti R, Aksaray S. İdrar Kültürlerinden İzole Edilen *Escherichia coli* Suşlarında Fosfomisin Direnci Sıklığının Araştırılması.

31. ANKEM Kongresi. Poster Bildiri

4. Kansak N, Aslan M, Adaleti R, Ceran N, Aydın G (et al.). 2016-2018 Dönemi HIV Tarama ve Doğrulama Sonuçlarının Değerlendirilmesi. 38. Türk Mikrobiyoloji Kongresi. Poster Bildiri

5. Klinik Örneklerden İzole Edilen Gram Negatif Bakterilerin Kolistin Duyarlılığının Belirlenmesinde Yarı Otomatize Sistem İle Sıvı Mikrodilüsyon Yönteminin Karşılaştırılması, 33. Ankem Kongresi ve 38. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, Sözlü Bildiri

VII- Bilimsel Etkinlikleri

Aldığı burslar:

1. 33. Ankem Kongresi, Sözlü Bildiri Kayıt ve Konaklama Bursu
2. 38. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, BioMerieux Kayıt ve Konaklama Bursu

Ödüller:

1. 38. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, BioMerieux FilmArray Yarışması, 3.lük Ödülü
2. Sağlık Bilimleri Üniversitesi, TUEK2018, Hipotez Yarışması, 2.lık Ödülü

VIII- Eğitim programı haricinde aldığı kurslar ve katıldığı eğitim seminerleri:

1. 1. HIV Çalıştayı, Yeditepe Ünv. 15-16 Ekim 2015
2. Rehberimizi Birlikte Kullanalım: Üriner Sistem Örnekleri, Cerrahpaşa Tıp Fak. 25 Mart 2016
3. 12. Antimikrobik Kemoterapi Günleri, Şişli, Harbiye 1-3 Nisan 2016
4. Antimikrobiyal Yönetim ve Klinik Mikrobiyoloji Uzmanı, Marmara Ünv. 18 Şubat 2017
5. Akılcı Test Seçimi Akılcı Laboratuvar: Bruselloz, Acıbadem Ünv. 7 Nisan 2017
6. *Haemophilus influenzae* Çalıştayı, Bahçeşehir Ünv. 9-10 Haziran 2017
7. Antibiyotik Duyarlılık Testleri ve Direnç Mekanizmaları Kursu, İstanbul Ünv. İstanbul Tıp Fak. 9-10 Eylül 2017
8. 2. Ulusal Viroloji Günleri, Ege Ünv. Tıp Fak. 22-24 Mart 2018
9. 13. Antimikrobik Kemoterapi Günleri, Acıbadem Ünv. 6-8 Nisan 2018
10. 33. Ankem Kongresi, Muğla, Fethiye 2-6 Mayıs 2018
11. 38. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, Antalya, 4-8 Kasım 2018

EK.1 TEZ KONUSU ONAY FORMU

Uzmanlık Öğrencisinin Adı Soyadı:	Gülden AYDIN
Telefon:	0507 931 53 13
E-Posta:	guldengulesen@hotmail.com
Uzmanlık Dalı:	Tıbbi Mikrobiyoloji
Eğitim Kurumu:	TC. Sağlık Bilimleri Üniversitesi İstanbul Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi
Uzmanlık Eğitime Başlama Tarihi:	30.03.2015
Uzmanlık Eğitimini Bitirme Tarihi:	30.03.2019
Tez Danışmanının Adı Soyadı:	Doç. Dr. Rıza ADALETİ
Telefon:	0532 696 89 17
E-Posta:	rizaadaleti@gmail.com

1-Tez Başlığı/Konusu:

Hepatit C Virüs Enfeksiyonu Olan Hastalarda Viremi Tespitinde Anti-HCV S/CO Değeri Araştırılması

2-Araştırma sorusu:

Hepatit C Virüs enfeksiyonu olan bir hastada vireminin olup olmadığını bir anti-HCV sample/cut off (S/CO) değeri ile, HCV RNA sonucunu beklemeden tespit edebilir miyiz?

3-Araştırmanın amacı:

Hepatit C Virüs enfeksiyonu bulaşıcı hastalıklar içinde önemli bir yere sahip olan çoğunlukla kronik seyreden bir hastalıktır. Hepatit C Virüs enfeksiyonlarında tanı ve tarama amaçlı olarak kullanılan ilk basamak test anti-HCV testidir.

Anti HCV antikorları genellikle Enzyme Immunoassay (EİA) veya Chemiluminescence Immunoassay (CLIA) temelli yöntemler kullanılarak tespit edilir. Bu yöntemlerin ortak mekanizması; HCV antijenlerinin katı bir faza bağlanarak hareketsizleştirilmesi ve hasta serumunda bulunan anti-HCV antikorları ile bu antijenin birleşmesinin sağlanması ve daha sonra bu özgül birleşmenin işaretli anti insan antikorları kullanılarak gösterilmesidir. Bu aşamalardan sonra EİA yönteminde renk değişimi, CLIA yönteminde yayılan ışık ölçülerek absorbans değerleri elde edilir. Anti-HCV test sonuçlarını değerlendirirken hasta serumu (sample) absorbansının, eşik değer (cut off) absorbansına oranlanmasıyla elde edilen sample/cut off (S/CO) değerleri kullanılmaktadır. S/CO > 1 olan değerler pozitif olarak kabul edilmektedir.

Tarama sırasında anti-HCV testi pozitif saptanan hastalarda sonraki aşama HCV-RNA testi ile pozitifliğin doğrulanmasıdır. Moleküler yöntemler kullanılarak çalışılan HCV-RNA testi; zahmetli, eğitilmiş personel gerektirmesi, zaman alması ve yüksek maliyetli bir test olması nedeniyle birçok laboratuvarında çalışılmamaktadır.

Bu nedenle araştırmamızda hastaların anti-HCV S/CO değerlerini eş zamanlı çalışılan HCV-RNA değerleri ile karşılaştırarak viremi tespitinde kullanılabilecek bir anti-HCV S/CO değeri elde edilmesi

planlanmıştır. Elde edilecek olan anti-HCV S/CO değerinin, HCV-RNA test sonucu beklenmeden Hepatit C Virüs enfeksiyonu olan hastaların tanı, tedavi ve takibine yol göstermesi amaçlanmıştır.

4-Araştırma materyalleri, popülasyonu:

Araştırma materyalimiz arşiv verileri olarak belirlenmiştir. Bu veriler Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı Laboratuvar Bilgi Sisteminden elde edilecektir. Araştırma popülasyonumuz 1 Temmuz 2014- 1 Temmuz 2017 tarihleri arasında 18 yaş üzerinde Hepatit C Virüs enfeksiyonu açısından tarama veya tedavi takibi nedeniyle Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi'ne başvurmuş ve anti-HCV değeri pozitif bulunan hastalar olarak tasarlanmıştır.

5-Dahil etme ve hariç tutma kriterleri:

18 yaş üzeri, anti-HCV pozitif saptanan ve HCV RNA çalışılan hastalar çalışmaya dahil edilmiştir. 18 yaş altı hastalar çalışmadan hariç tutulmuştur.

6-Araştırmanın birincil sonuç değişkenleri:

Anti-HCV, HCV RNA değerleri

7-Araştırmanın türü ve tasarımı:

Araştırmamızın türü retrospektif veri analizi olarak tasarlanmıştır.

8- Araştırma hipotezi:

Hepatit C Virüs enfeksiyonu olan hastalarda viremiyi, HCV RNA sonucunu beklemeden bir anti-HCV S/CO değeri ile tespit edebiliriz.

9-Örneklem sayısı ve belirleme yöntemi:

Örneklem sayısı 1.tip hata %5, testin gücü %80 olacak şekilde en az 46 hasta olarak hesaplanmıştır.

Örneklem hesabı MedCalc Statistical Software version 12.7.7 (MedCalc Software bvba, Ostend, Belgium; <http://www.medcalc.org>; 2013) Programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Çalışmaya 3 yıllık (1 Temmuz 2014- 1 Temmuz 2017) süreçte 1766 hasta verisi dahil edilecektir.

10-Araştırmada kullanılacak istatistik yöntemler:

Sürekli değişkenleri tanımlamak için deskriptif istatistikler kullanılacaktır. (ortalama, standart sapma, minimum, medyan, maksimum)

Bağımsız ve normal dağılan iki sürekli değişkenin karşılaştırılması Student t testi ile, bağımsız ve normal dağılıma uymayan iki değişkenin karşılaştırılması Mann-Whitney U ile yapılacaktır.

Kategorik değişkenler arasındaki ilişkinin incelenmesi amacıyla Ki-Kare (ya da uygun yerlerde Fisher Exact test) kullanılacaktır. Normal dağılan iki s¼rekli değişkenin korelasyonu i¼in Pearson korelasyon analizi, normal dağılıma uygunluk g¼stermeyen iki s¼rekli değişkenin korelasyonu i¼in Spearman's rho korelasyon analizi yapılacaktır. Bağımsız değişkenlerin s¼rekli bağımlı değişken ¼zerindeki etkisini incelemek amacıyla ¼oklu doğrusal regresyon analizi uygulanacaktır. Uygulanan tanı testlerini g¼c¼n¼ incelemek i¼in duyarlılık, ¼zg¼ll¼k hesaplamaları yapılacaktır. ROC analizi yapılarak cut-off değeri hesaplanacaktır. İstatistiksel anlamlılık d¼zeyi 0,05 olarak belirlenmiştir. Analizler MedCalc Statistical Software version 12.7.7(MedCalc Software bvba, Ostend, Belgium; http://www.medcalc.org; 2013) Programı kullanılarak ger¼ekleřtirilecektir.
11-Araştırmanın orijinalliği ve bilime katkısının a¼ıklaması:
12-A¼ıklamak istediğiniz diğer konular:

Tez Danışmanı
Doç. Dr. Rıza Adaleti
Kontrol edilmiştir ve
uygundur.
İmza