



Hepatit C İnfeksiyonlarının Laboratuvar Tanısı, Karşılaşılan Güçlükler ve Güncel Tanı Algoritması

Laboratory Diagnosis of Hepatitis C Infections, Difficulties and Current Diagnostic Algorithm

Fatih ŞAHİNER¹(iD), Ramazan GÜMRAL¹(iD)

¹ Sağlık Bilimleri Üniversitesi Gülhane Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye

Makale atfı: Şahiner F, Gümrall R. Hepatit C infeksiyonlarının laboratuvar tanısı, karşılaşılan güçlükler ve güncel tanı algoritması. FLORA 2020;25(2):139-53.

ÖZ

Hepatit C virüsü (HCV) başlıca infekte kişilerin kan ve vücut sıvılarıyla temas sonucu bulaşan, insanlarda akut ve kronik hepatite neden olan ve diğer hepatit virüslerinden farklı olarak yüksek oranda kronikleşme potansiyeli taşıyan bir infeksiyon etkenidir. Antijenik yapılarının yüksek oranda değişkenlik göstermesi nedeniyle henüz bir koruyucu aşı geliştirilememiş olsa da, yakın zamanda kullanıma giren direkt etkili antiviral ilaçlar ile HCV infeksiyonlarının kalıcı tedavisi mümkün hale gelmiştir. Tedavi başarısında tedavi öncesi genotip-subtip belirlenmesi ve tedavi süresince kantitatif moleküler analizlerle viral yük takibi gibi laboratuvar testleri kritik öneme sahiptir. HCV infeksiyonlarının laboratuvar tanısı ayrıca kan ve kan ürünlerinin taranması ve epidemiyolojik surveysans gibi infeksiyon kontrol önlemleri için de önemlidir. HCV tanısında karşılaşılan en önemli güçlükler düşük pozitif serolojik test sonuçları, serolojik pencere dönemi, immünsüpresif hastalarda antikor üretiminin olmayışı, çok sayıda genotip-subtip varlığının ve genomik varyasyonların primer-prob tasarımı güçleştirilmesi gibi kısıtlılıklardır. Geçmişte düşük titreli serolojik test sonuçlarını doğrulamak için rekombinant proteinlerin kullanıldığı immünbloklama testlerine başvurulmuştur. Günümüzde ise bu testlerin yerini yüksek duyarlılık ve özgüllüğe sahip olmaları yanında, akut infeksiyonlarda erken tanı imkanı sunan moleküler testler almıştır. Bu makalede HCV infeksiyonlarının tanı ve takibinde kullanılan yöntemlerin avantajları ve kısıtlılıkları ele alınmış ve HCV infeksiyonlarının yönetiminde mevcut testlerin kullanımına dayalı güncel tanı algoritması gözden geçirilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Anti-HCV; HCV-RNA; Akut infeksiyon; Kantitasyon

ABSTRACT

Laboratory Diagnosis of Hepatitis C Infections, Difficulties and Current Diagnostic Algorithm

Fatih ŞAHİNER¹, Ramazan GÜMRAL¹

¹ Department of Medical Microbiology, Faculty of Gulhane Medicine, University of Health Sciences, Ankara, Turkey

Hepatitis C virus (HCV) is an infectious agent transmitted mainly by the contact of blood and body fluids of infected people, causing acute and chronic hepatitis in humans with a high potential for chronicity, unlike other hepatitis viruses. Although a protective vaccine has not yet been developed due to the extreme variability of its antigenic structures, it has become possible to permanently treat HCV infections with direct-acting antiviral drugs recently introduced. Laboratory tests such as determination of genotype-subtype before

Geliş Tarihi/Received: 26/07/2019 - Kabul Ediliş Tarihi/Accepted: 02/12/2019

©Telif Haklı 2020 Flora. Makale metnine www.floradergisi.org web adresinden ulaşılabilir.

Çevrimiçi Yayın Tarihi: 22.06.2020

the start of treatment and viral load monitoring by using quantitative molecular analyzes during treatment are critical for the success of treatment. Laboratory diagnosis of HCV infections is also important for infection control measures such as screening of blood and blood products and epidemiological surveillance. The most important difficulties encountered in the diagnosis of HCV are low positive serological test results, serological window period, lack of antibody production in immunosuppressive patients, the presence of multiple genotype-subtypes and genomic variations that complicate primary-probe design. In the past, immunoblotting tests using recombinant proteins had been used to confirm low titer serological test results. Nowadays, these tests have been replaced by molecular tests that provide early detection of acute infections as well as having high sensitivity and specificity. In this article, advantages and limitations of the methods used in the diagnosis and follow-up of HCV infections are discussed, and the current diagnostic algorithm based on the use of available tests in the management of HCV infections is reviewed.

Key Words: Anti-HCV; HCV-RNA; Acute infection; Quantitation

GİRİŞ

Hepatit C virüsü (HCV), 1989 yılında non-A non-B kronik hepatitin ana nedeni olarak tanımlanmış olan, tek iplikli pozitif polariteli RNA genomu taşıyan bir flavivirüstür^[1,2]. Kronik HCV enfeksiyonunun gerçek prevalansı hakkında kesin bir kanıt yoktur, ancak 185 milyondan fazla kişinin kronik hepatit C ile yaşadığı ve enfeksiyonun her yıl yaklaşık 500 bin ölüme neden olduğu tahmin edilmektedir^[3,4]. Dünya nüfusunun yaklaşık %3'ü HCV ile enfekte iken, ülkemizde bu oran yaklaşık olarak %1'dir^[4,5]. HCV enfeksiyonlarının tanısında klinik belirti ve bulguların değerlendirilmesi, karaciğer enzimleri başta olmak üzere biyokimyasal analizler, karaciğer dokusunun fibrozis derecesi (ISHAK ve Knodell skorlamaları) ve siroz varlığı gibi patolojik değişiklikler yönünden incelenmesi tedavi planlaması ve hasta yönetiminde klinik öneme sahiptir^[6,7]. Benzer klinik belirtiler ve nonspesifik laboratuvar bulguları HCV dışında farklı hastalıklarda ve diğer viral enfeksiyonlarda da görülebildiği için spesifik testler ile ayırıcı tanı yapılmasına gereksinim duyulur. HCV enfeksiyonlarının spesifik tanısı başlıca hasta serumunda virüse özgü antikorların gösterilmesi veya viral nükleik asit (HCV-RNA) varlığının saptanması gibi mikrobiyolojik testler temelinde yapılır. Son yıllarda HCV enfeksiyonlarının tedavisinde önemli ilerlemeler kaydedilmiş ve değişen klinik ihtiyaçları karşılamak adına tanı paradigmasında bazı değişiklikler olmuştur^[8]. Günümüzde HCV enfeksiyonlarının yönetiminde (antiviral tedavinin planlanması ve tedavi takibinde) genotip tayini yapabilen ve kantitatif sonuçlar sunan moleküler yöntemler kritik öneme sahip testler haline gelmiştir.

NONSPEŞİFİK KLİNİK ve LABORATUVAR BULGULARI

HCV enfeksiyonunun klinik tanısı başlıca karaciğer tutulumu ve hasarı olmak üzere etkilenen organlardan kaynaklanan hastalık semptomlarının değerlendirilmesiyle yapılır. Bununla beraber, akut HCV enfeksiyonlarının sadece %15-30'u semptomatiktir^[9]. Akut enfeksiyonlar grip benzeri hafif belirtilerle geçirilebilir, ancak sarılık (olguların %10-15'inde), idrar renginde koyulaşma, anoreksi ve çeşitli abdominal rahatsızlıklar şeklinde belirtiler de görülebilir^[10,11]. Olguların %70-85'inde enfeksiyon kronikleşir ve 20-30 yıl içinde hastaların %17-55'inde siroza, %1-23'ünde hepatoselüler kansere ilerleyebilir^[10]. HCV enfeksiyonlarında biyokimyasal, hematolojik ve histopatolojik parametrelerde çeşitli değişiklikler gözlenir. Karaciğer hasarı ve hastanın genel durumunun nonspesifik göstergeleri arasında karaciğer enzimlerinde yükselme, albumin, globulin, bilirubin, üre ve kreatinin değerleri, protrombin zamanı ve "International Normalized Ratio (INR)" değerleri yer alır^[12]. Histopatolojik değişikliklerden en önemlisi olan fibrozis derecesini değerlendirmek için sıklıkla karaciğer biyopsisi uygulanır. Bununla beraber karaciğerdeki hasarın durumunu değerlendirmek için ultrasonografi, transient karaciğer elastografisi, serum aspartat aminotransferaz/platelet oranı (APRI) indeksi, FibroTest ve FIB4 testleri gibi invaziv olmayan yöntemler de kullanılabilir^[6,13].

HCV İNFEKSİYONLARININ SPEŞİFİK TANISI

HCV enfeksiyonlarının mikrobiyolojik tanısı başlıca serum veya plazma örneklerinde viral antijenlere karşı oluşan antikorların gösterilmesi ve

HCV-RNA saptanması esasına dayalıdır. Doğrudan viral antijen düzeylerini (kor antijeni gibi) ölçen testler de geliştirilmiştir^[8]. Genotip-subtip tayini, viral yükü gösteren kantitatif testler ve antiviral direnç testleri de mikrobiyolojik analizler arasında yer alır. HCV rutin hücre kültürlerinde üretilmemektedir, bu nedenle tanısal amaçlı kullanılan bir in vivo veya in vitro kültür sistemi bulunmamaktadır. Bununla beraber, antiviral ilaç geliştirme çalışmaları ve aşı çalışmalarının yürütüldüğü araştırma laboratuvarlarında Huh7 hücrelerinde, şimerik farelerde (insan karaciğeri transplante edilmiş) ve sempanzelerde düşük replikasyon düzeyli de olsa virüs üretilmektedir^[1,14].

HCV İNFEKSİYONLARINDA SEROLOJİK TANI

HCV infeksiyonlarının serolojik tanısı “Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)” ve “Chemiluminescence Immuno Assay (CLIA)” temelli yöntemlerle HCV spesifik antijen veya antikoların gösterilmesini kapsamaktadır. Serolojik testlerle IgM ve IgG antikolarının varlığı ve titresi ile IgG antikoları için avidite indeksi araştırılabilmektedir^[15]. Anti-HCV pozitifliği kişinin HCV ile karşılaştığını göstermekte, ancak infeksiyonun temizlenme durumu (clearance), akut veya kronik aktif infeksiyon ayrımı ve reinfeksiyon-reaktivasyon olasılıkları hakkında güçlü bir veri sağlamamaktadır. Ayrıca, bağışıklığı baskılanmış hastalar, insan immünyetmezlik virüsü (HIV) infeksiyonu olan kişiler ve hemodiyaliz hastalarında saptanabilir düzeyde HCV antikoru bulunmayabileceği için bu hastalar HCV infeksiyonları açısından değerlendirilirken serolojik testler yerine doğrudan HCV-RNA testleri tercih edilmelidir^[16].

ELISA ve CLIA Temelli Testler

Anti-HCV antikolarını saptamaya yönelik testler HCV infeksiyonlarının tanı ve taramasında ilk başvuru (birinci basamak) testlerdir. Farklı duyarlılık oranlarına sahip olan bu testlerin çok sayıda ticari formu geliştirilmiş ve kullanıma sunulmuştur^[17]. HCV-ELISA-CLIA testlerinin tasarımlarında antijen olarak kor, NS3 ve NS4 gibi korunmuş gen bölgeleri tarafından eksprese edilen proteinlerin yanında, E2-HVR bölgeleri, NS4 ve NS5 bölgesince kodlanan rekombinant proteinler de kullanılmaktadır^[7,11,17,18]. Rekombinant prote-

inler ile spesifik olmayan reaksiyonların önlenmesi için serolojik testlerde maya ve *Escherichia coli* proteinlerini içeren bir seyreltme tamponu kullanılır^[7]. HCV replikasyon basamakları ve HCV proteinlerine dair bilgilerin açıklığa kavuşturulmasına paralel olarak serolojik tanı testlerinin içerdiği antijenlerin kompozisyonunda yıllar içerisinde değişiklikler olmuş ve testlerin duyarlılıklarında önemli ilerlemeler sağlanmıştır.

Birinci nesil testler 1992 yılından itibaren kullanıma sunulmuş olup, HCV genomunun NS4 bölgesinde kodlanan yapısal olmayan rekombinant bir protein olan c100-3'e karşı gelişen antikoları saptayacak şekilde tasarlanmıştır^[11]. Kullanılan antijenin yapısal bir protein olmaması nedeniyle test tüm HCV olgularını saptayamıyordu. Bu ilk testlerin duyarlılığı %70-80 olup, birçok hastada yanlış-pozitif sonuç vermiştir^[19]. Ayrıca, antikor varlığını saptama süresi infeksiyon başlangıcından 15-16 hafta sonrasına kadar uzundu^[11].

İkinci nesil testler, NS4 rekombinant proteinlere (5-1-1 ve c100) ilave olarak kor bölgesinden (c22-3) ve NS3 bölgesinden (c33c veya c200) türetilmiş iki rekombinant protein daha içerir^[11,17,19]. İkinci nesil testlerle akut infeksiyonlarda infekte bireylerin %92-95'i tespit edilebilir olmuş, pencere dönemi de 10 haftaya kadar kısaltılmıştır^[7,11].

Üçüncü nesil testler 1996 yılında lisans olarak kullanıma sunulmuştur. E2 proteininin HVR bölgesi, NS4A, NS4B ve NS5A bölgelerine ait antijenlerin eklendiği üçüncü nesil testlerde kor ve NS3 proteinleri de yeniden yapılandırılmıştır^[11,17]. c100 ve 5-1-1 antijenlerinin yerine c100 peptidi, c22'nin yerine c22p peptidi eklenmiş, c33c'nin ise yoğunluğu artırılmıştır^[17]. Üçüncü nesil testlerin geliştirilmiş duyarlılığı (%97) NS3 antijeninin artan reaktivitesine atfedilirken, NS5 antijeninin ilave yanlış-pozitif sonuçlar üretebileceği öne sürülmüştür^[7]. Yalancı pozitiflik oranlarının yükselmesi nedeniyle bazı firmalar test içeriğinden NS5 antijenini çıkarıp, antijen kompozisyonunda küçük değişiklikler yaparak duyarlılık ve özgüllüğü arttırmışlardır^[20]. Üçüncü nesil testler pencere dönemi 4-8 haftaya kısaltılmıştır^[11].

Kor bölgesinden iki epitop kullanılan ve NS3, NS4A, NS4B, NS5A gibi proteinlerin çeşitlendiril-

diği dördüncü nesil testlere genotip 1a, 1b, 2 ve 3'e ait genotip spesifik NS3 ve NS4 proteinleri eklenmiştir. Böylece testlerin duyarlılıkları üçüncü kuşak testlere göre daha yüksek (%99-100) hale gelmiştir^[21]. Bu testler pencere dönemini 17 güne kadar (ortalama 26.8 gün) kısaltmıştır^[11,19].

Hasta serumunda, ilk tespit edilebilen HCV spesifik antikolar, NS3 bölgesini (anti-c33) ve kor (anti-c22 veya anti-kapsit) antijenlerini hedefleyen antikordur. Daha sonraki dönemde ise NS4 bölgesine ve zarf proteinlerine (E1 ve E2) karşı oluşan antikolar saptanabilir düzeylere ulaşır^[18]. Çoğu hastada viral klerens ve iyileşme sonrası anti-HCV antikoları 10-20 yıl gibi uzun bir süre daha pozitif olarak saptanabilmektedir^[18].

Advia Centaur XP (Bayer-Siemens, Almanya), Architect i2000SR (Abbott, ABD) ve LiaisonXL Murex (DiaSorin, İtalya) kemilüminesans temelli yeni nesil testlere örnek olarak verilebilir^[4,17]. Anti-HCV testlerinde reaktivite eşiği olarak, test örneği (sample) optik dansitesinin eşik değere (cut-off) oranıyla elde edilen S/Co (sinyal-cut off) değeri kullanılmakta ve S/Co değerinin ≥ 1 olması üretici firmaların önerisiyle pozitif olarak kabul edilmektedir^[4]. Test sonucunun %95 olasılıkla gerçek pozitif olarak kabul edildiği S/Co değeri yaygın kullanılan "Food and Drug Administration (FDA)" onaylı ELISA ve CLIA temelli ticari testlerde ≥ 3.8 ile ≥ 11 aralığında değişmektedir^[22].

"Recombinant Immunoblot Assay (RIBA)" ve "Line Immuno Assay (LIA)" Testleri

Düşük pozitif anti-HCV değerlerinin yalancı pozitif olma olasılığına karşı bu sonuçların RIBA veya LIA gibi özgüllüğü daha yüksek testlerle doğrulanmasına gereksinim duyulmuştur^[17]. RIBA-II (Ortho Diagnostic Systems, ABD) ve Matrix HCV (Abbott, ABD) testleri bu amaçla kullanılan ticari immüno blot testleri iken, Inno-LIA HCV Score (Innogenetics, Belçika) ise ticari üçüncü nesil LIA testidir^[17,23].

RIBA testleri ELISA yönteminin modifikasyonuna dayalı bir sistemdir^[7]. RIBA testleri de kullanılan antijenlere göre farklı nesil testler olarak piyasaya sürülmüştür^[24]. Bu testlerin en önemli avantajı farklı rekombinant HCV antijenlerinin her birine karşı oluşan antikor düzeylerini ayrı ayrı ölçebilmesidir^[17]. Birinci nesil RIBA testleri, ELI-

SA'da kullanılanlar ile aynı antijeni ve bir başka ek antijeni kullanır. İkinci nesil RIBA testlerinde ise iki farklı antijen kullanılmıştır^[24]. Özgüllükleri ELISA testlerine göre daha yüksek olan bu testlerin kullanımlarını kısıtlayan en önemli dezavantajları ise duyarlılıklarının göreceli olarak daha düşük olmasıdır^[17]. Ayrıca, ELISA testleri ile düşük titrede pozitif bulunan örneklerin önemli bir bölümü RIBA ile de şüpheli (indeterminate) sonuç vermektedir^[17]. Sonuç olarak, düşük pozitif anti-HCV test sonucu olan bir örnekte HCV-RIBA testinin pozitif çıkması ile infeksiyon varlığı doğrulanır, HCV-RIBA sonucu da negatif ise anti-HCV sonucunun yanlış-pozitif olma olasılığı çok yüksek şekilde değerlendirilir. Geleneksel bir yöntem olarak geçmişte doğrulama testi kullanılan RIBA testlerinin yerini günümüzde periferik kanda HCV-RNA varlığını göstermeye dayalı moleküler testler almıştır^[8].

Kor Antijeninin Saptanması

HCV proteinlerinin üretiminin viral replikasyonun bir göstergesi olması nedeniyle bu proteinlerin kan düzeylerinin ölçülmesi, doğrudan HCV-RNA düzeylerinin belirlendiği testlere bir alternatif olarak düşünülmüştür. HCV kor antijen testi, serum veya plazmada HCV proteinlerinin saptanması için tasarlanmış ve ticari olarak piyasaya sürülmüştür^[7,8]. CLIA bazlı kantitatif bir test olan Architect HCV Ag Testi (Abbott, Almanya) ve farklı HCV kor antijen testleri ile yapılan çalışmalar, kor antijeni düzeylerinin ölçülmesinin HCV-RNA seviyelerinin belirlenmesi gibi hassas ya da kesin sonuçlar sunmadığını, ancak kor antijeni seviyelerinin HCV-RNA düzeyleriyle önemli ölçüde ilişkili olduğunu göstermiştir^[8,11]. NAT yaklaşımlarından daha hızlı ve genellikle daha ucuz olduğu için, HCV kor antijeni testinin özellikle ekonomik kaynakların kısıtlı olduğu bölgelerde aktif infeksiyonu olan kişileri tanımlamada tercih edilebileceği öngörülmektedir^[8].

MOLEKÜLER TANI YÖNTEMLERİ

HCV-RNA testleri tanıda kullanılan en duyarlı yöntemlerdir ve altın standart olarak kabul edilir^[16]. Moleküler tanı yöntemlerinin serolojik testlere en önemli üstünlüklerinden biri akut infeksiyon varlığını viral bulaştan 7-10 gün sonra (pre-sero-konversiyon pencere dönemi) tespit edebilmeleri-

dir, serolojik testlerde bu süre dört haftadan 8-10 haftaya kadar uzayabilmektedir^[7,11,19]. HCV-RNA testleri ayrıca, anti-HCV pozitif hastalarda doğrulayıcı tanıda, tedavi yanıtının izlenmesinde ve “HIV enfeksiyonu ve kronik hemodiyaliz hastaları gibi” antikor üretiminin yetersiz olduğu durumlarda enfeksiyon tanısında kullanılır^[7,16]. HCV ile infekte annelerden doğan yenidoğanlarda enfeksiyon tanısı, organ transplantasyonundan sonra reenfeksiyon tanısı, organa özgü tanı ve değerlendirmeye imkan vermesi, genotip tayini ve virüs kantitasyonu moleküler testlerin diğer önemli üstünlükleridir^[7].

Moleküler tanı testleri için örnekleme uygun malzemeler kullanılarak yapılmalıdır. Stabilitesi zayıf bir molekül olan RNA bütünlüğünün korunması için kan örneğinin uygun koşullarda transportu sağlanmalı ve en kısa süre içerisinde laboratuvara ulaştırılmalıdır. Kan alındıktan sonraki altı saat içinde laboratuvara ulaşamayacaksa plazma (veya serum) nükleaz içermeyen bir tüpe alınmalıdır. Preanalitik süreçteki hatalar yanlış-negatif test sonuçlarına neden olabileceği gibi, infekte kişilerin serum ve plazmalarında HCV-RNA varlığının saptanamadığı özel durumlar da vardır. Kronik hepatit C'nin patolojik formlarından biri de, plazma örneklerinde saptanabilir düzeyde HCV-RNA bulunmadığı halde, periferik kan mononükleer hücreleri (PBMC) ve karaciğer biyopsi örneklerinin HCV-RNA pozitif olduğu okült HCV enfeksiyonudur^[25]. Benzer şekilde tedavi bitiminde hasta serumunda HCV-RNA yokluğu gelecekteki viremiyi dışlamak için yeterli değildir, bu kişiler hala enfeksiyon kaynağı olabileceğinden dolayı tedaviye yanıtının doğrulanması için PBMC'nin HCV-RNA için test edilmesi önerilmektedir^[26].

Kalitatif HCV-RNA Testleri

HCV-RNA testleri kalitatif ve kantitatif testler olarak tasarlanmıştır. Kalitatif HCV-RNA testleri klasik polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), real-time PCR (RT-PCR) ya da “transcription mediated amplification (TMA)” tekniğine dayalı testleri içerir^[19]. Geçmişte rutin tanı laboratuvarlarında kalitatif testler için saptama limitinin en az 50 IU/mL olması gerektiği belirtilirken, günümüzde bu değer 25 IU/mL'ye çekilmiş, hatta 15 IU/mL olmasının ideal olduğu belirtilmiştir^[27]. Kalitatif testlerin tüm genotipler için eşit duyarlılıkta olması ayrıca önemlidir. Akut enfeksiyon durumunda

HCV-RNA varlığı kalitatif RT-PCR ile çoğunlukla ilk haftada doğrulanabilmektedir. HCV genomunun 5' kodlamayan bölgesi (5'UTR) nispeten yüksek korunmuşluğuna bağlı olarak, kalitatif PCR testlerinde tercih edilen bir gen bölgesi olmuştur. Testin duyarlılığı ve özgüllüğünü geliştirme adına nested-PCR tasarımları da yapılmıştır^[7].

HCV-RNA'nın saptanması için ilk standardize RT-PCR testi olan Amplicor HCV (Roche, ABD) 1993 yılında kullanıma sunulmuştur. Bu sistemde, uygun tampon koşulları altında ters transkriptaz ve yanı sıra DNA polimeraz aktivitesine sahip olan *Thermus thermophilus* DNA polimerazı kullanılmıştır^[7]. Bu birinci versiyon testin analitik (saptama) duyarlılığı 1000 RNA kopya/mL idi ve duyarlılık genotip bağımlıydı; test genotip 2 ve 3 izolatlarını, genotip 1'e kıyasla daha düşük duyarlılıkta saptayabiliyordu. İkinci versiyon testlerde tüm genotipler için aynı derecede duyarlılık olmak üzere, analitik duyarlılık 100 kopya/mL'ye kadar yükselmiştir^[7]. Günümüzde rutin tanı laboratuvarlarında saptama duyarlılıkları çok daha üstün olan (10-25 IU/mL) ve aynı zamanda kantitatif sonuç verebilen moleküler testler tercih edilmektedir^[27].

HCV-RNA temelli diğer kalitatif testler arasında “ligase chain reaction (LCR)”, TMA ve “nucleic acid sequence based amplification (NASBA)” temelli yöntemler de denenmiştir^[7,8]. LCR oldukça uygun ve kullanışlı görünse de, en önemli dezavantajı düşük özgüllüğüdür. Bu nedenle LCR'ye dayalı HCV-RNA tespit sistemlerinin gelişimi duraksamıştır^[7]. TMA'nın analitik duyarlılığı, 25 ve 50 kopya/mL'de sırasıyla %93 ve %100'dür. Dünya Sağlık Örgütüne göre bu yöntemin HCV-RNA standart duyarlılığı %96 (5 IU/mL) ve %100 (10 IU/mL)'dür. Bu testin HCV genotipleri (genotip 1a/b, 2b/c, 3a, 4c/d ve 6a) için karşılaştırılabilir etkinlikte sonuçlar sunduğu ve klinik özgüllüğünün %99.5'ten fazla olduğu bildirilmiştir^[7].

Kantitatif HCV-RNA Testleri

Gecmişte HCV enfeksiyonunun primer tanısında daha duyarlı olduğu için kalitatif testler tercih edilmiş, tedavi başlangıcında ve takibinde ise kantitatif testler kullanılmıştır. Günümüzde kalitatif PCR testlerinin yerini duyarlılığı %99, özgüllüğü %98-99'lara ulaşan kantitatif PCR testleri almıştır^[11]. Kantitatif HCV-RNA testleri enfeksiyon

tanısı, tedavi endikasyonu, tedavi süresine ilişkin kararların yönlendirilmesinde ve kalıcı viral yanıt oranlarının optimize edilmesinde kullanılmaktadır^[7,8]. HCV-RNA düzeylerinin kantitatif tayini ile antiviral etkinlik kontrol edilirken, diğer taraftan potansiyel antiviral direnç gelişimi erken aşamada tespit edilebilmekte ve daha uygun tedavi seçeneklerine geçilebilmektedir^[7]. Duyarlı bir testin kantitasyon alt sınırının 25 IU/mL olması istenir. Günümüzde çok sayıda ticari kantitatif HCV-RNA testi kullanıma sunulmuştur. "Roche High Pure system/Cobas TaqMan assay (Roche Molecular Systems), Versant HCV 1.0 kPCR (Siemens), RealTime HCV (Abbott), Artus HCV QS-RGQ (Qiagen), Aptima HCV Quant Dx Assay (Hologic), Xpert HCV Viral Load (Cepheid)" bunlardan bazılarıdır^[27]. Bu testlerin saptama duyarlılıkları 4-20 IU/mL ve kantitasyon alt limitleri 10-25 IU/mL aralığında değişir^[27].

Dallı (branched)-DNA teknolojisi (Bayer Diagnostics), serum ve plazmada HCV-RNA'sının doğrudan kantitasyonu için geliştirilmiş sandviç nükleik asit hibridizasyon prosedürüne dayalı bir sinyal amplifikasyon yöntemidir ve PCR temelli testlere alternatif bir yöntem olarak sunulmuştur^[7,28]. Quantiplex2 HCV-RNA 1.0 (Bayer Diagnostics) ile kronik infekte kişilerin %80-90'ı ve testin ikinci versiyonu ile 95'inden fazlası (antiviral tedavi olmadan) saptanabilmekteydi. Versiyon 1 sadece 350.000 kopya/mL saptama limiti sunarken, versiyon 2 ile 200.000 kopya/mL serum duyarlılığına ulaşılmıştır. Dallanmış zincir DNA testi 2.0 ve sonraki tüm sürümleri, tüm genotipler için eşdeğer etkinlikle kantitasyon yapabilmektedir. Benzer prensiple çalışan bir başka ticari test olan Versant2 HCV-RNA (bDNA 3.0, Bayer Diagnostics) ile 1000-2000 kopya/mL (615 IU/mL) alt saptama limiti ve numune seyreltme gerekmesiz geniş doğrusal dinamik aralık ($< 2 \times 10^3$ - 40×10^6 kopya/mL) elde edilmiştir^[7,28].

HCV Genotip ve Subtip Tanımlama Yöntemleri

Antiviral tedavideki ilerlemelerle birlikte HCV ile infekte kişiler için tedavi başarısı %95'lerin üzerine çıkmıştır, bununla beraber HCV'nin yüksek genetik değişkenliği başarı oranlarını olumsuz yönde etkilemeye devam etmektedir^[29]. Tanısal güçlükler yol açan bu genetik çeşitlilik dolaşımda-

ki genotip-subtip sirkülasyonu, çoklu enfeksiyonlar, rekombinant formlar ve ilaca dirençli çeşitli varyantların varlığı ile ilişkilidir^[30]. Tedavi süresinin belirlenmesinde yol gösteren ve kalıcı viral yanıtın en güçlü göstergesi olarak kabul edilen tedavi öncesi HCV genotipinin belirlenmesi HCV enfeksiyonlarının yönetiminde en önemli basamaklardan biridir^[31]. Yeni HCV tedavilerinin, belirli hastalara uygun ilaç kombinasyonları ve bu kombinasyonların kullanılma süreleri de dahil olmak üzere, tedavi cevabının kritik bir belirleyicisi olan HCV genotipine göre değişen spesifik endikasyonları vardır^[8]. HCV genotip ve alt tiplerinin yanlış tanımlanması, uygun olmayan bir tedavi rejiminin uygulanmasına ve ardından tedavi başarısızlığına neden olabileğinden, genotip ve subtip tayininin doğru olarak yapılması önem kazanmıştır^[30]. Genotip dağılımı coğrafi bölgelere ve intravenöz ilaç kullanıcıları (intravenous-drug users, IVDU) gibi popülasyondaki spesifik gruplara göre değişkenlik gösterir^[3,8]. Örneğin; direkt etkili antiviral ilaçlar (DAA) ile tedaviye göreceli olarak daha dirençli olması nedeniyle epidemiyolojik önem taşıyan genotip 3'ün yayılması, 3a alt tipinin IVDU arasındaki görülme sıklığı ve Hindistan ve Pakistan gibi alt tip 3a'nın baskın olduğu ülkelerden nüfus göçü ile ilişkilendirilmiştir^[3,8,25].

Bugün dizi analizi sonuçlarına göre %30-35'in üzerinde nükleotit dizi farklılığı olan yedi HCV genotipi tanımlanmıştır^[3,32]. Bu gruplar arasında ek alt tipler de (subtip a, b, c ve diğerleri; 67 konfirme ve 20 geçici sub tip) tanımlanmıştır^[3,7,32]. Alt tiplerin homolojisi %80 ila %90 arasında değişir. Daha küçük dizi tutarsızlıklarına başka bir tanım verilmemekte ve HCV türümsüleri (quasispecies) olarak ele alınmaktadır^[7]. Dünya genelinde en sık rastlanan genotip %46.2'lik oran ile genotip 1'dir^[9]. Ülkemizde yapılan çalışmalarda ise en sık genotip 1b saptanmaktadır^[33].

HCV genotip tayini klasik PCR amplifikasyonunu takiben şerit bazlı ters hibridizasyon (LIPA, line probe assay) ve dizi analizi yöntemleri ile yapılabilmekte veya RT-PCR ile doğrudan tanımlanabilmektedir^[8,19]. HCV genotip tayininde genotip spesifik floresans rezonans enerji problemlerinin (FRET) kullanılması, primer-spesifik ekstensiyon, erime eğrisi analizi, PCR-RFLP (restriction fragment length polymorphism), heterodupleks mobi-

lite analizi ve sıvı mikroarray (xMAP Luminex) gibi kendine has avantajları ve sınırlamaları olan çeşitli yöntemler de kullanılmaktadır^[8,19,25]. Genotip tayini için çok sayıda farklı teknik kullanılmasına rağmen HCV izolatlarının yeni nesil dizi analizi günümüzde altın standart yaklaşım olarak görülmektedir^[7]. HCV genotip tanımlamalarında sekans bazlı yöntemler ile sekans bazlı olmayan ticari testler karşılaştırıldığında yanlış tanımlama oranlarının kullanılan ticari testlere göre değişmek üzere %2 ila %10 aralığında olduğu bildirilmiştir^[34]. Standart Sanger dizi analizi zaman alıcı ve emek-yoğun olmasının yanında, sonuçlarının standart olmaması, sadece baskın olan dizinin okunabilmesi, %15-20'den daha az oranda bulunan varyantları saptayamaması ve çoklu genotip infeksiyonlarını ayırt etmedeki yetersizliği gibi dezavantajları nedeniyle rutin analizler için önemini kaybetmeye başlamıştır^[8,32]. Sırasıyla 2005 ve 2011 yılları itibarıyla kullanılmaya başlayan ikinci ve üçüncü nesil dizi analizi teknikleri %1 ya da daha az sıklıkta bulunan varyantları ve dirençli mutantları saptayabilmeleri ile sık tercih edilen güçlü analiz yöntemleri olarak öne çıkmıştır^[30,32]. Bununla beraber, %1 varyantların saptanabilmesi için çok sayıda okuma yapılması gerekmekte ve bu durum ciddi maliyet artışına neden olmaktadır. Naif bireylerde %1 varyant saptamanın klinik önemi belirsizdir ve mevcut rehberler antiviral tedavi rejimlerini seçerken sadece majör varyantların (> %15) dikkate alınması gerektiği belirtilmektedir^[35]. Bu nedenle birçok laboratuvar yeni nesil dizi analizi sistemlerini Sanger eşliğinde kullanmaktadır. Yeni nesil dizi analizinin tedavi öncesi analizlerden ziyade tedavi süresi içinde başarısızlıklarda kullanılması önerilmektedir^[35]. Ion Torrent (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) pirosekanslama, Illumina MiSeq (Illumina, San Diego, CA), HiSeq (Illumina, San Diego, CA) ve NexSeq (Illumina, San Diego, CA) platformları ikinci nesil testlerin yaygın kullanılan örnekleri iken, PacBio (Pacific Biosciences, Menlo Park, CA) ve MinION (Oxford Nanopore Technologies, Oxford, UK) yöntemleri ise 2011 ve sonrasında kullanıma sunulan üçüncü nesil dizi analizi yöntemleridir^[30].

Primer bağlanma bölgelerindeki varyasyonlar nedeniyle PCR ve dizi analizi testleri sekteye uğrayabilmektedir. Bu sorunu aşabilmek için bir-

çok ticari kit iyi korunmuş genomik bölgelerden biri olan 5'UTR bölgesini hedefleyecek şekilde tasarlanmıştır^[19]. 5'UTR bölgesi yüksek düzeyde korunmuş olmasına rağmen seçilecek hedef bölgenin uzunluğu 200 bp'den kısa olmamak koşuluyla genotip düzeyinde tanımlama için genel olarak iyi sonuçlar vermektedir^[36]. Genel olarak kısa diziler için kullanılan sekanslama yöntemleri daha çok 5'UTR bölgesi için tasarlanmıştır. TruGene 5'UTR HCV Genotyping (Siemens, Almanya) yöntemi bunlardan biridir ve 5'UTR bölgesinin sekans karşılaştırması prensibiyle çalışır, ancak bu yöntem subtip identifikasyonunda yetersiz kalmaktadır^[19]. 5'UTR bölgesi dizi analizinin genotiplendirme (örneğin genotip 1 ve 4 ayrımı) ve subtiplendirme için yetersiz kalabilmesi (örneğin genotip 1a ve 1b ayrımı) nedeniyle kodlanan bölgelerin de (NS5B bölgesi ve kor/E1 gibi) de hedef olarak eklenmesi önerilmektedir^[7,36,37]. Buna uygun olarak TruGene2 HCV NS5B (Visible Genetics) yöntemine subtiplendirme için NS5B geninin dizilenmesi eklenmiştir^[7].

Genotip analizinde bir başka yaklaşım RT-PCR yöntemidir. Real-time HCV genotype II kiti (Abbott) genotip spesifik "floresan işaretli oligonükleotitler" kullanılarak altı farklı genotipin ve 1a ve 1b alt tiplerini saptayabilmektedir^[38]. Bu test üç farklı primer seti içerir. Bu primer setlerinden biri 5'UTR bölgesini (tüm HCV'leri), diğeri genotip 1a'nın NS5B bölgesini ve üçüncü primer seti de genotip 1b'nin NS5B bölgesini amplifiye edecek şekilde tasarlanmıştır.

LIPA yöntemi serit (strip) temelli ters hibridizasyon prensibine dayalı bir test olup PCR ile amplifikasyonu takiben elde edilen ürünlerin genotip spesifik problemler ile hibridizasyonunu esas alır^[38]. Katı faz striplere tutunan PCR ampliconlarının kolorimetrik (biotin-streptavidin) bir dedektör aracılığıyla saptanmasını içerir. LIPA testleri ucuzdur, ancak manuel olarak yapılır ve emek-yoğundur ve sonuçların yorumlanması daha subjektiftir^[8]. Birinci nesil LIPA testlerinde primerler 5'UTR bölgesini hedefleyecek şekilde tasarlanmışken, ikinci nesil testler 5'UTR bölgesi ile beraber kor bölgesini de hedeflemektedir. Versant HCV genotipleme testi rutin tanı laboratuvarları için geliştirilen ve 5'UTR bölgesini hedefleyen LIPA temelli ticari bir testtir^[19]. Real time HCV Genotype II (Abbott)

ile karşılaştırıldığında Versant LiPA HCV 2.0 (Siemens, Almanya) testinin genotiplendirme için %99.2 ve alt tiplendirme için %96.1'lik bir uyum oranına sahip olduğu gösterilmiştir^[38]. Inno LiPA II (Innogenetics, Belçika) yönteminde ise HCV-RNA ekstraksiyonundan ve transkripsiyonundan sonra biyotiplenmiş primerler kullanılarak 5'UTR bölgesinin bir fragmanı için cDNA'nın amplifikasyonu gerçekleştirilir. Daha sonra PCR ürünü, nitroselüloz membrana tutturulmuş oligonükleotitlere (ters) hibridize edilir. Bu test, HCV 1-6 genotiplerinin tanımlanmasına imkan verir ve kullanımı oldukça kolaydır. 5'UTR dizisi nedeniyle HCV-1a ve HCV-1b alt tipleri arasındaki farklılaşma özgünlüğü %90'a ulaşır. Test HCV-2a ve HCV-2c alt tiplerini ise güçlü bir şekilde ayırt edemez^[7].

Sorin Biomedica tarafından geliştirilen DNA enzim immünoassay (PCR-EIA) yöntemi kor bölgesini hedefleyen ve PCR sonrası ters hibridizasyon yapılmasına dayalı bir ELISA testidir. Yüksek duyarlılığı olan bu yöntem ile hem genotiplendirme hem de subtiplendirme yapılabilmektedir. İlk olarak HCV-RNA ekstrakte ve ters transkribe edilir, daha sonra bir çekirdek bölgesi dizisi "nested PCR" ile amplifiye edilir. PCR ürünü, bir membrana tutunan genotip spesifik oligonükleotitler tarafından hibridize edilir. Sonunda çift sarmallı DNA'ya bağlanabilen monoklonal antikorlar bu cDNA-DNA hibridlerini saptar. Kor bölgesi HCV genotipleri ve alt tipleri için (HCV-4, 5 ve 6 genotipleri de dahil olmak üzere) çok yüksek özgünlükte diziler içerir^[7].

Çoklu Genotiplerin ve Rekombinant Suşların Tanımlanması

HCV enfeksiyonlu olgularda çoklu HCV genotipleri ve alt tipleri ile enfekte olmuş bireylerdeki popülasyon heterojenitesi de dikkate alınmalıdır. Örneğin; en yaygın genomik varyanta yönelik bir tedavi rejiminin uygulanması, tanımlanamayan varyantların ortaya çıkması için bir fırsat sağlayacaktır^[30]. Genel popülasyonda, çoklu genotip enfeksiyonlarının tüm HCV pozitif hastalarda %2-10 oranında olduğu tahmin edilmekte iken, bu oranın riskli popülasyonlarda çok daha yüksek olduğu bildirilmektedir^[39,40]. Çoklu enfeksiyonların tespit oranı kullanılan metodolojiye ve coğrafi bölgeye göre önemli ölçüde değişkenlik gösterdiğinden dolayı bu enfeksiyonların gerçek prevalan-

sını belirlemek güçtür^[39]. Türkiye'de yapılan ve 23 merkezden 17.578 hepatit C hastasının dahil edildiği bir çalışmada 223 (%1.3) hastada karışık genotip varlığı belirlenmiş ve en yaygın karışık genotip kombinasyonları 1b + 4 (%0.83) ve 1a + 1b (%0.26) olarak bulunmuştur (41). Çoklu tip varlığının DAA tedavisi üzerindeki etkisinin minimal düzeyde olabileceğini öne süren çalışmalar olmakla beraber, bu durumun klinik öneminin ortaya konması için ileri çalışmalara gereksinim duyulmaktadır^[41,42]. Çoklu genotip varlığının tanımlanmasında genotip spesifik PCR ve yeni nesil dizileme teknikleri kullanılmaktadır^[43]. PCR temelli yaklaşımlarla yanlış tanımlamalar yapılabılırken, random primer ve probe zenginleştirme temelli derin (deep) dizileme yöntemleri ile daha başarılı sonuçlar alınmıştır^[39,40]. Sanger dizilemede ise baskın genotip saptanmakta ve bu yöntemle çoklu tip görülen (mixed) enfeksiyonlar veya rekombinant varyantların tanımlanması mümkün olmamaktadır^[30]. Upstream PCR ve klonlama stratejilerinin birlikte uygulanmasını içeren klonal dizileme de tek bir bireyde dolayan tüm viral varyantları saptamada yetersiz kalabilmektedir^[30].

HCV enfeksiyonlarının tanısında güçlükler nedeniyle olan bir diğer faktör olan rekombinasyonun HCV için genel olarak nadir görülen bir olay olduğu düşünülmektedir. Bununla birlikte, bu olgunun, mevcut genotiplendirme stratejilerindeki kısıtlamalar gibi farklı engeller nedeniyle hafife alındığı düşünülmektedir^[30]. Rekombinant suşların ortaya çıkmasına katkıda bulunan faktörlerden biri, bir coğrafi bölgede birden fazla HCV genotipinin veya alt tipinin birlikte dolaşımıdır. Bireylerde çoklu veya ardışık enfeksiyonlar sırasında sitoplazmanın ayrı bölgelerinde çoğalan çoğul genlerin birlikte yerleşimi genom hibridizasyonu için ön koşuldur^[30]. Ticari genotip testlerinin ve amplikon bazlı Sanger dizileme yaklaşımları doğası gereği, sıklıkla HCV genomunun sadece bir veya iki korunmuş bölgesini hedef alır ve bu nedenle, rekombinant virüslerin varlığı gözden kaçabilir. Yeni nesil dizi analizi platformlarının rekombinant formların tanımlanmasında geleneksel uygulamalara kıyasla daha güvenilir olduğu gösterilmiştir^[30]. Bugüne kadar, HCV enfeksiyonlu bireylerde en az sekiz genotip ve dokuz alt tip rekombinant tanımlanmıştır. Yapılan çalışmalarda genotip 2k/1b popülasyonlarının ve

olgu bazı genotip 2/5, 2b/1b, 2b/1a ve 2i/6p rekombinantlarının varlığı gösterilmiştir^[32]. HCV rekombinasyonunun klinik önemi, bu suşların antiviral tedavi başarısızlığına yol açan yanlış tanı ile doğal tip olarak sınıflandırılmasıdır. Örneğin en sık saptanan rekombinant form olan CRF_2k/1b'nin hatalı bir şekilde HCV genotip 2 olarak sınıflandırılmasının, yanlış antiviral tedavi seçimine neden olabileceği ve viral küre oranının %27'ye kadar düşmesine neden olabileceği bildirilmiştir^[30].

Türümsü Analizleri

Kronik HCV infeksiyonundaki viral popülasyon, türümsü (yarı-türler) olarak bilinen ve yakından ilişkili viriyonların heterojen bir karışımından oluşur. Türümsü popülasyonunun çeşitliliğinin (tedaviden bağımsız olarak) karaciğer hastalığına doğal ilerlemeyle ilişkili olduğu bulunmuştur. Yüksek türümsü çeşitliliği hepatit C viriyonlarının hızlı replikasyon oranı, HCV'nin RNA bağımlı RNA polimerazının sınırlı transkripsiyon duyarlılığı ve konak immün yanıtının oluşturduğu baskıdan kaynaklanabilir^[7]. Türümsü izolatların klasik klonlanması ve dizilenmesi, rutin klinik tanı için fazla emek gerektiren bir uygulamadır ve henüz standardize edilmemiştir. Hipervariable genom bölgelerinin (1470-1550 bazlar arası) klonlanması ve dizilenmesi, infekte olmuş bir kişide yarı-türlerin saptanması için tercih edilir. Hipervariable bölge PCR ürünlerinin tek sarmallı konformasyon polimorfizmi (SSCP) ve heterodupleks jel sapması analizinin virüsün küçük popülasyonlarını saptamak için yeterince duyarlı olduğu bulunmuştur^[7].

HCV Serotiplendirme Yöntemleri

HCV tiplendirmesinde moleküler yöntemlerin dışında daha az duyarlı olan serotiplendirme yöntemleri de denenmiştir. NS4 veya kor bölgesi tarafından kodlanan epitoplara ile reaksiyona giren genotip spesifik antikoları hedefleyen serotiplendirme testleri bu yöntemlere örnek gösterilebilir^[44,45]. NS4 proteininin epitop haritalaması, HCV antikolarının iki ana antijenle etkileşime girdiğini ortaya koymaktadır. Birkaç genotipte, bu genom bölgeleri yüksek değişkenliğe sahiptir. Belirtilen bölgelerle uyumlu, genotip spesifik peptitlerin kullanılması ile serolojik genotiplendirme yapılabilmektedir. Serolojik HCV genotiplendirmesi hızlı ve düşük maliyetlidir, ancak alt tipleri ayırt etmede başarısızdır^[7].

RIBA Serotyping S1 Assay (Chiron) yöntemi kor ve NS4 antijenlerine karşı oluşan antikoların saptanmasına dayalıdır. Rekombinant immüno-blot tekniği ile çalışan bu yöntem ile genotiplendirme yapılabilirken subtiplendirme yapılamamaktadır^[7]. Anti-NS4-Serotyping (Murex HCV Serotyping 1-6, Abbott Diagnostics) tekniği ise NS4 bölgesinin saf-laştırılmış HCV antijeni ile kaplanmış mikro titre plakalarına dayanır. Bu kit mevcut altı genotipten beşinin çözünür NS4 antijenleriyle birlikte hasta veya kontrol serumuyla inkübe edilir. Antijen-antikor kompleksi, peroksidaz işaretli ikinci bir antikör vasıtasıyla ve bir kromojenik substratın nihai ilavesi ile saptanır. Bu sistem örneklerin %90'ından fazlasında, HCV-1, 2 ve 3 genotiplerinin yanı sıra HCV-4'ü kesin olarak tanımlayabilmektedir. Üreticiye göre HCV-5 ve HCV-6 genotip karakterizasyonu da mümkündür^[7].

Antiviral Direnc Testleri

Günümüzde antiviral direnc izlemi HCV tanı ve tedavi yönetimin bir parçası haline gelmiştir. Antiviral tedavi sırasında viral replikasyonun etkili bir şekilde durdurulamaması halinde, seçici tedavi baskısı direnc ilişkili varyantların birikmesine ve antiviral tedavinin başarısız olmasına yol açar (30). Bazı araştırma grupları uygun tedavi protokolünün seçimi için tedavi öncesi HCV direncinin araştırılmasının önemini vurgulasa da, güncel rehberler her hasta için tedavi öncesi test yapılmasını önermemektedir^[46]. Tedavi öncesi HCV bazal ilaç direnc testi sadece iki durumda önerilmektedir. Birincisi NS3 varyantı Q80K varlığının belirlenmesi, ikincisi ise HCV1a infeksiyonlarında elbasvir direncinin araştırılmasıdır^[30]. Antiviral direnc testleri daha çok tedavi yanıtı ve relaps durumlarında yapılmaktadır. Onaylanmış ilaçlarda HCV direncinin araştırılması için standardize edilmiş ticari testler bulunmadığından, günümüzde direnc testleri çoğunlukla popülasyon dizilemesi (Sanger) veya yeni nesil derin dizilemeye dayalı kullanıcı tasarımı tekniklerle yapılmaktadır^[46]. HCV antiviral direnc analizi için fenotipik direnc testleri, popülasyon bazı sekanslama, klonal sekanslama, spesifik hedeflerin analizleri gibi farklı yaklaşımlar uygulanmakla beraber, günümüzde maliyet, iş yükü-test süresi, duyarlılık ve veri üretim kapasitesi gibi parametrelerde öne çıkan yeni nesil dizileme teknikleri antiviral direnc analizleri için en uygun

tanısal araçlar haline gelmiştir.^[30,47] Yeni nesil dizi analizi prensibine dayalı Sentosa SQ HCV genotipleme testi (Vela Diagnostics, Singapore) NS3, NS5A ve NS5B gen bölgelerini hedef alır ve viral genotipleme ve ilaç direnci analizi için lisans alan ilk testtir.^[30,48]

Diğer Tanı Yöntemleri

Hasta başı hızlı test platformları (point-of-care test) klinikler ve potansiyel olarak hekim muayenehaneleri için tasarlanmış olup, yaklaşık iki saat içerisinde sonuç verebilmektedir. Bu yaklaşım, merkez laboratuvarına gereksinimi azaltmış olmakla birlikte, yine flebotomize numuneler ve önemli kaynak altyapısı gerektirir, bu da birçok ortamda eksiktir.^[8] OraQuick HCV Rapid Test (OraSure Technologies) FDA tarafından kan örneklerinde HCV tanısı için onaylanmıştır ve HCV salgın algoritmalarında kullanılabilmesi belirtilmiştir.^[49] Chembio DPP HCV TEST (Chembio Diagnostics, ABD), Multiplo Rapid HIV/HCV Antibody Test (MedMira Lab Inc., Kanada) ve Toyo anti-HCV test (Turklab, İzmir, Türkiye) gibi çok sayıda ticari hızlı test geliştirilmiştir, bu testlerin çoğunluğu tam kan veya serum örneklerinde antikor saptamak üzere tasarlanmış olup sonuç verme süreleri genel olarak 3 ila 40 dakika arasında değişmektedir.^[50]

HCV infeksiyonlarında gen polimorfizminin tedavi sonuçları üzerine etkileri doğrudan HCV tanısı ile ilgili olmamakla beraber, ayrı bir konu olarak çalışılmıştır. IL-28B, paraoksonaz-1 (L/M55 ve Q/R192), haptogloblin ve çok sayıda farklı hedefler araştırılmıştır.^[51,52]

OLGU YÖNETİMİ ve ALGORİTMİK TANI

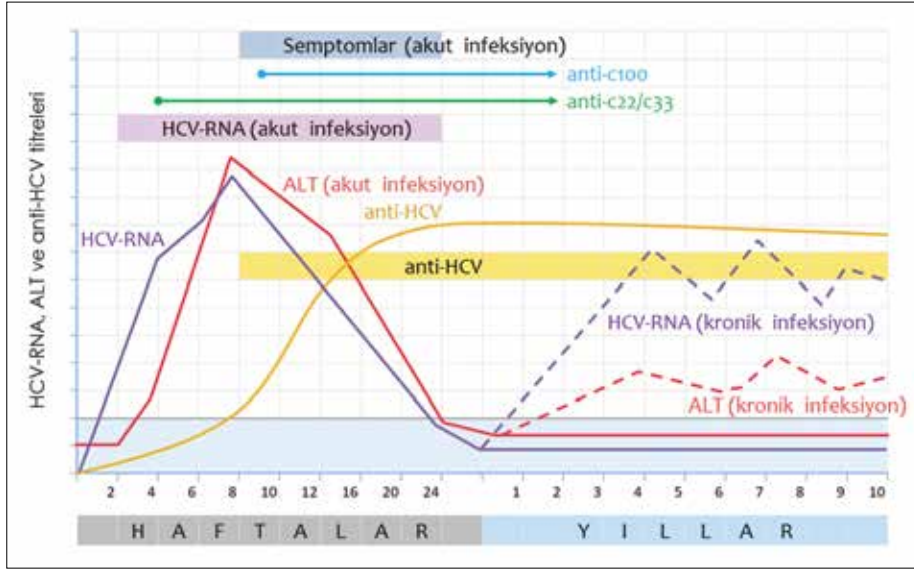
HCV infeksiyonlarının tanı algoritmasında ilk bulaş veya şüpheli maruziyet sonrası erken tanı, infeksiyonun evreleri ve kronikleşme-temizlenme durumunun ortaya konması, antikor üretiminin düşük düzeylerde olduğu spesifik hasta gruplarına yaklaşım ve serolojik testler ile elde edilen düşük-şüpheli pozitif örneklerde test tekrarı süreleri ve doğrulama testleri gibi önemli başlıklar karşımıza çıkar. HCV infeksiyonlarının tanısında geçirilmiş infeksiyon ve tedavi ile iyileşmiş infeksiyonların kronik infekte kişilerden ayırt edilmesi de önem arz etmektedir.^[8]

Akut HCV İnfeksiyonu ve İyileşme

Tüm akut HCV infeksiyonlarının (asemptomatik veya semptomatik) %70-85'i kronikleşirken %15-30'u ilk maruziyetten sonraki 6-12 ay içerisinde tedavi edilmeden temizlenmekte ve infeksiyon kalıcı sekel bırakmaksızın tamamen iyileşmektedir.^[8,10,19] Tedavisiz olarak iyileşen veya antiviral tedavi ile iyileşen kişilerde anti-HCV antikor pozitif olarak kalırken, saptanabilir bir viremi gözlenmemektedir.^[8] İnfeksiyon bulaşını takiben 4-10. haftalardan itibaren anti-HCV pozitifliği gösterilebilir, ancak bu süre 24. hafta sonuna kadar uzayabilir. Bulaş sonrası hasta kanında HCV-RNA varlığı ise 1-2. haftalardan itibaren saptanabilir düzeydedir. HCV maruziyetinden 2-8 hafta sonra yükselmeye başlayan serum aminotransferaz seviyeleri 8-12 hafta kadar normal sınırların üzerinde seyredebilir (maruziyet sonrası 24. haftaya kadar). Akut semptomatik HCV infeksiyonlarında karaciğer enzimleri (özellikle ALT; alanin aminotransferaz) 200 IU/mL veya daha yüksek değerlere ulaşabilir. Transaminazların en yüksek düzeylere ulaşmasından sonra HCV-RNA seviyesinde dikkat çekici bir düşme görülür. Akut HCV infeksiyonlarının %15-30'unda görülen semptomlar genellikle maruziyetten 6-7 hafta sonra görülür, bununla beraber bu aralık 2-26 haftaya kadar geniş olabilir. Bu semptomlar karaciğer enzim yüksekliğinin devam ettiği sürece gözlenebilir. İyileşme ve viral klerens durumunda 24-26. haftalarda serum ALT değeri normal düzeylere döner ve anti-HCV değerlerinin yükselmesi ile beraber HCV-RNA saptanabilir düzeylerin altına iner (Şekil 1)^[10,53].

HCV Persistansı ve Kronik İnfeksiyon

Kronik infeksiyonlarda anti-HCV kalıcı olarak pozitifdir, aynı zamanda HCV-RNA pozitifliği de persiste olur. ALT düzeyleri inişli çıkışlı bir seyir gösterirken, yükselmesi karaciğer inflamasyonunun devam ettiğini gösterir. Bununla beraber kronik infeksiyonlardaki ALT yüksekliği akut infeksiyona göre daha düşük düzeydedir. Serum ALT düzeyleri hastalığın aktivite durumuna göre değişmek üzere dönemsel yükselmeler gösterebilir veya normal olarak da saptanabilir.^[10,53] HCV-RNA düzeyleri akut HCV infeksiyonlarında dalgalı bir seyir gösterebilir, ancak kronik HCV infeksiyonlarında HCV-RNA düzeylerinin seyri daha stabildir



Şekil 1. Akut ve kronik HCV infeksiyonlarında klinik bulguların, karaciğer enzimi (ALT) ve viral belirteçlerin saptanma zamanları ve düzeylerindeki değişiklikler^[7,10,18,53].

ve genel olarak 1 log'dan fazla değişiklik görülmesi beklenmez^[16]. Hafif klinik bulgularla seyreden kronik HCV olgularında, IgM antikorları nadiren bulunurken, agresif karaciğer hastalığı olan hastaların %50'sinden fazlasında IgM varlığı saptanabilmektedir. IgG antikorları ise kronik hepatitli hastalarda genellikle persiste olmaktadır. Kronik HCV infeksiyonunda, HCV antikorlarının varlığı kalıcı viremi (yani HCV-RNA pozitifliği) ile korelasyon gösterir. Sadece düşük HCV viral yükü ile başvuran ihmal edilebilir sayıda kişide ise anti-HCV pozitifliği görülmeyebilir^[7].

HCV İnfeksiyonlarının Rutin Mikrobiyolojik Tanısı

Normal koşullarda HCV infeksiyonlarının tanısı bir tarama testi olarak tanımlanabilen anti-HCV antikor testinin yapılmasıyla başlar. Bu tür bir testin duyarlılığının %95, özgüllüğünün %99, pozitif likelihood ratio değerinin %95, negatif likelihood ratio değerinin 0.05 olması istenir, ki günümüzde bu şartları en iyi sağlayan testler ELISA ve CLIA temelli üçüncü ve dördüncü nesil testlerdir^[6]. Bununla beraber, akut HCV infeksiyonu geçiren kişilerde anti-HCV antikorlarının saptanma oranı ancak altıncı ayın sonunda %100'e ulaşır. Bu nedenle bilinen ve şüpheli maruziyeti olan hastalar da dahil olmak üzere HCV infeksiyonu şüphesi olan kişiler bu oranlar dikkate alınarak takip edil-

melidir^[53]. Anti-HCV sonucu pozitif ise, mevcut infeksiyon HCV-RNA'nın kalitatif bir ölçümü ile teyit edilmelidir. Pozitif bir anti-HCV antikor test sonucu olan, ancak HCV-RNA test sonucu negatif olan hastalarda HCV infeksiyonu olmadığı düşünülür, ancak yanlış-negatif HCV-RNA testi olasılığı unutulmamalıdır (Tablo 1)^[6]. Bu nedenle, test edilen kişinin son altı ay içinde HCV maruziyeti olduğundan şüpheleniliyorsa veya HCV hastalığına dair klinik kanıtlar varsa HCV-RNA testi tekrarlanmalıdır^[8]. Negatif bir anti-HCV antikor testi ile birlikte pozitif bir HCV-RNA testi varlığı ise, akut HCV infeksiyonunun erken dönemine işaret eder^[6]. Son altı ay içinde HCV maruziyeti olan bir hastada anti-HCV antikor test sonucu negatif çıkarsa, HCV-RNA'sı en az altı ay boyunca dört ila sekiz haftada bir ölçülmeli veya 12 hafta içinde anti-HCV antikor testleri tekrar edilmelidir^[6].

Anti-HCV ELISA testlerinde elde edilen düşük pozitif (cut-off değerine yakın) sonuçlar rutin tanı laboratuvarlarında sık karşılaşılan problemlerdendir^[17]. Düşük pozitif anti-HCV test sonucu olan bir hasta (testlerin duyarlılıkları ayrı tutulmak koşulu ile) akut HCV infeksiyonunun erken dönemlerinde (pencere dönemi) olabileceği gibi, bu durum uzun zaman önce geçirilmiş bir HCV infeksiyonu ile ilişkili düşük antikor düzeyleri ile ilgili de olabilir. Bu değerlerin çoğunun yalan-

Tablo 1. HCV enfeksiyonlarının laboratuvar tanısında kullanılan test sonuçlarının yorumlanması^[6-8,53]

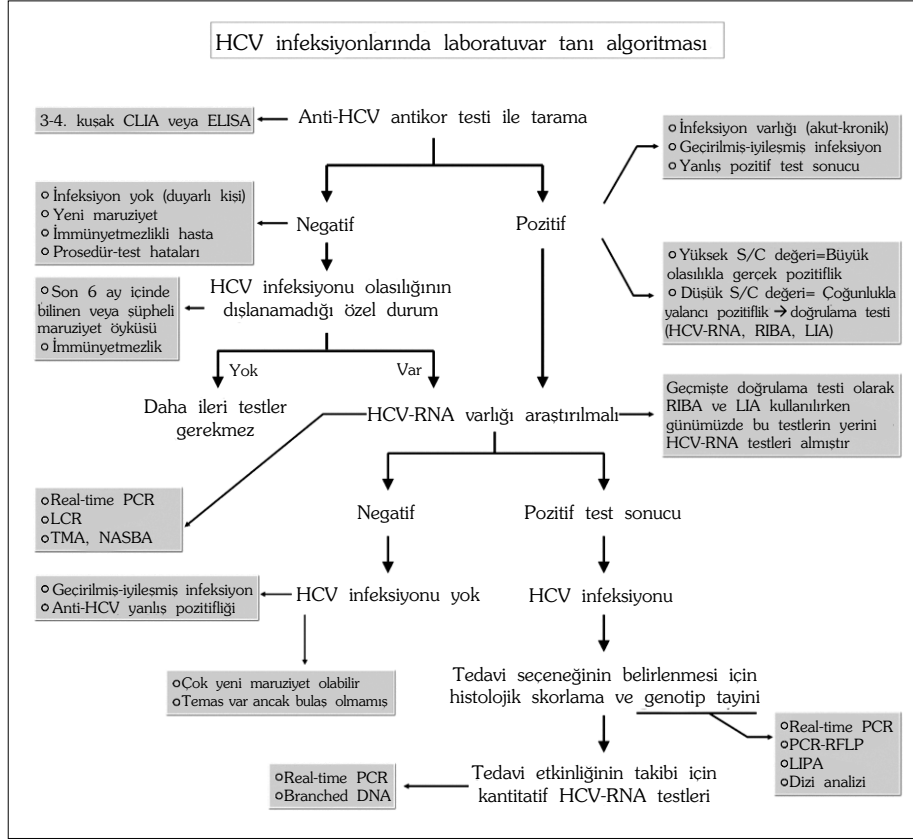
Anti-HCV	HCV-RNA	Süre	Yorumlar ve olasılıklar
+	+	< 6 ay	• Akut HCV enfeksiyonu
+	-	> 6 ay	• Geçirilmiş enfeksiyon • Tedavi ile iyileşme • Yanlış-pozitif anti-HCV testi (genelde düşük titreli**) • Yanlış-negatif HCV-RNA testi
-	+	< 6 ay	• Akut HCV enfeksiyonunun erken dönemi* • Antikor cevabı oluşmayan immünsüpresif hasta • Yanlış-pozitif HCV-RNA testi • Yanlış-negatif anti-HCV testi

* Anti-HCV testinin daha sonraki 8- 12 hafta içerisinde serokonversiyon ile pozitif sonuç vermesi koşulu ile.

** S/Co değerinin 1'e yakın olması durumunu ifade eden düşük titreli pozitif test sonucu tanımlı ticari testler için değişkenlik göstermektedir. Örneğin; CDC'ye göre S/Co değeri ≥ 11.0 olduğunda test sonucunun %95 olasılıkla gerçek pozitif olarak kabul edildiği CLIA temelli Advia Centaur XP testi için S/CO değerinin 1.15-6.15 arasında olması düşük titreli pozitif test sonucu olarak değerlendirilebilirken, ABBOTT HCV EIA 2.0 testi için S/Co değeri ≥ 3.8 olarak bulunduğu test sonucu %95 olasılıkla gerçek pozitif olarak kabul edilir^[17]. Türkiye'de yapılan ve Architect i2000SR (Abbott, ABD) ve LiaisonXL Murex (DiaSorin, İtalya) platformlarının kullanıldığı bir çalışmada ise S/Co değeri 1.0-4.0 aralığında iken HCV-RNA pozitiflik oranı %1.9 ve 7.1-10 aralığında %37.1 ve ≥ 16.1 iken %75 olarak bulunmuştur^[4].

cı pozitif sonuçlardan kaynaklandığı bildirilmesine rağmen bu hastaların takibi ve düşük pozitif test sonuçlarının bir doğrulama testi ile ayrıca değerlendirilmesi önerilmektedir^[17]. ELISA testlerindeki yalancı pozitiflik problemi özellikle HCV seroprevalansının düşük olduğu bölgelerde (< %3) daha sık görülmektedir^[16,17]. ELISA testlerinde "düşük-yanlış" pozitif test sonucu ile ilişkili olabilen durumlar arasında süpresyona bağlı azalmış immün yanıt, yaşlı hastalarda görülebilen düşük titreli test pozitifliği, iyileşmiş HCV enfeksiyonlarında yıllar içerisinde antikor düzeylerinde azalma görülmesi gibi durumlar yer alır^[17]. En önemli nedenlerden biri de tekrarlayan düşük pozitiflik durumları ile de ilişkili olabilen biyolojik yanlış pozitiflik olasılığıdır. Biyolojik yanlış pozitifliğin en sık karşılaşılan nedenleri diğer viral enfeksiyonlara (sitomegalovirüs, Epstein-Barr virüs, HIV, hepatit A virüsü ve hepatit B virüsü) bağlı çapraz reaktivite, sistemik lupus eritematozus hastaları, romatoid faktör pozitifliği olan hastalar ve yakın zamanda yapılan aşı uygulamalarıdır (influenza aşısı gibi)^[17]. Geçirilmiş ve iyileşmiş HCV enfeksiyonunu, HCV antikorunu için biyolojik yanlış pozitiflikten (özgün olmayan antikor-antijen etkileşimlerine bağlı) ayırt etmek için, farklı bir HCV antikor testinin (RIBA, LIA veya farklı bir ticari ELISA testi) yapılması da düşünülebilir^[8]. Geçmişte RIBA veya LIA gibi özgüllüğü daha yüksek testler doğrulama aracı olarak kullanılmıştır^[17]. Bununla birlikte, pozitif anti-HCV ELISA ve negatif veya belirsiz

immünblot test sonucu bulunan kan bağışçılarının %20'sinde HCV-RNA saptanabildiği bildirilmektedir^[7]. Ülkemizde geçmiş yıllarda şüpheli örneklerin doğrulama amaçlı olarak Halk Sağlığı Referans Laboratuvarlarına gönderilmesi şeklinde uygulamalar olmuş ise de RIBA testi günümüz laboratuvar pratiğinde doğrulama testi olarak kullanılmamaktadır^[16]. Günümüzde şüpheli pozitif serolojik test sonuçlarının doğrulanmasında serolojik yöntemlere göre daha duyarlı yöntemler olan ve pencere dönemindeki infekte kişilerde ve immünsüpresif bireylerde daha doğru değerlendirmeler yapılmasına imkan veren HCV-RNA testlerinin kullanımı her geçen gün yaygınlaşmaktadır. Yapılan çalışmalarda düşük pozitif anti-HCV varlığı saptanan örneklerde genel olarak HCV-RNA saptanamazken, bazı çalışmalarda düşük oranlarda HCV-RNA pozitifliği bildirilmiştir. Moleküler testlerin maliyet etkinliği dikkate alınarak, hastanın kliniği, şüpheli maruziyet öyküsü ve biyokimyasal test sonuçları birlikte değerlendirildikten sonra antikor pozitifliğinin doğrulanmasında moleküler testlerin kullanılmasının uygun olacağı belirtilmektedir^[17]. Bağışıklığı baskılanmış kişiler ve hemodiyaliz hastaları için ise anti-HCV sonucuna bakılmaksızın HCV-RNA testinin yapılması düşünülmelidir^[8]. Gereksiz endişelere neden olabilmesi nedeniyle anti-HCV sonuçlarının yüksek pozitif, düşük pozitif ve negatif olarak bildirilmesi de önerilmektedir^[17]. Tedavi kararlarının yönlendirilmesine yardım etmek için tedaviye başlamadan önce



Şekil 2. HCV infeksiyonlarında tanı algoritması ve test sonuçlarının gösterdiği olasılıklar^[6-9,17,19,53]. Kısıtlı imkanlara sahip bölgeler için HCV antikorlarındaki reaktivite sonrası HCV antijenemi (kor) testi önerilse de bu yaklaşım ülkemizde rutin pratikte uygulanmamaktadır^[8,19].

kantitatif HCV-RNA testleri ile bazal viral yükün belirlenmesi ve HCV genotip tayininin yapılması da günümüzde rutin tanının bir parçası haline gelmiştir. Ayrıca, tedavinin aciliyetini belirlemek için karaciğer biyopsisi veya invaziv olmayan bir test ile karaciğer fibrozis derecesinin değerlendirilmesi de gerekebilir^[6]. Klinik laboratuvarlar kalite kontrol uygulamaları kapsamında laboratuvar imkanlarına göre HCV tanı algoritmalarını oluşturmalı ve düzenli olarak güncellemelidir (Şekil 2).

Sonuç olarak, mikrobiyolojik testler HCV infeksiyonlarının tanısı, tedavi planlaması ve takibinde kritik önem kazanmış ve bu önemi her geçen gün artmaktadır. Yeni geliştirilen antiviraller ve tedavi protokollerinin genotip-subtip düzeyindeki etkinlikleri, epidemiyolojik çalışmalar, akut infeksiyonlar ve şüpheli maruziyetlerde erken tanı, tedavi planlaması, tedavi etkinliğinin izlenmesi ve prognoz öngörüsü mikrobiyolojik tanının önemli katkıları olarak sıralanabilir. Düşük veya yanlış

pozitif serolojik test sonuçlarının neden olduğu endişelerin ve ek maliyetlerin asgari düzeylere çekilmesi ve infekte olguların erken tespiti için güncel verilere göre hazırlanan tanı algoritmalarının izlenmesi yararlı olacaktır.

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

KAYNAKLAR

1. Scheel TK, Rice CM. Understanding the hepatitis C virus life cycle paves the way for highly effective therapies. *Nat Med* 2013;19(7):837-49.
2. International Committee on Taxonomy of Viruses, Washington, DC. *Virus Taxonomy: 2018b*, July 2018. Available at: <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/> [Accessed July 26, 2019].
3. Messina JP, Humphreys I, Flaxman A, Brown A, Cooke GS, Pybus OG, et al. Global distribution and prevalence of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology* 2015;61(1):77-87.

4. Şanlıdağ T, Akçalı S, Ecemiş T, Süer K, Erbay Dünder P, Arkan A ve ark. Hepatit C virus (HCV) enfeksiyonunun tanısında anti-HCV düzeyi (S/Co) ile HCV-RNA arasındaki korelasyonun araştırılması. *Mikrobiyol Bul* 2016;50(3):508-10.
5. Tozun N, Özdoğan O, Cakaloğlu Y, Idilman R, Karasu Z, Akarca U, et al. Seroprevalence of hepatitis B and C virus infections and risk factors in Turkey: a fieldwork TURHEP study. *Clin Microbiol Infect* 2015;21(11):1020-6.
6. Wilkins T, Akhtar M, Gititu E, Jalluri C, Ramirez J. Diagnosis and management of hepatitis C. *Am Fam Physician* 2015;91(12):835-42.
7. Huber MK, Sarrazin U, Zeuzem S. Hepatitis C virus (chapter 10). In: Rüksamen-Waigmann H, Deres K, Hewlett G, Welker R (eds). *Viral Infections and Treatment*. New York: Marcel Dekker Inc, 2003:295-367.
8. Cloherty G, Talal A, Coller K, Steinhart C, Hackett J Jr, Dawson G, et al. Role of serologic and molecular diagnostic assays in identification and management of hepatitis C virus infection. *J Clin Microbiol* 2016;54(2):265-73.
9. Ghany MG, Liang TJ. Natural history of chronic hepatitis C. In: Miyamura T, Lemon SM, Walker CM, Wakita T (eds). *Hepatitis C Virus II: Infection and Disease*. Springer Japan, 2016:3-56.
10. Westbrook RH, Dusheiko G. Natural history of hepatitis C. *J Hepatol* 2014;61(1 Suppl):S58-68.
11. Gupta E, Bajpai M, Choudhary A. Hepatitis C virus: screening, diagnosis, and interpretation of laboratory assays. *Asian J Transfus Sci* 2014;8(1):19-25.
12. Ahmed Z, Ahmed U, Walayat S, Ren J, Martin DK, Moole H, et al. Liver function tests in identifying patients with liver disease. *Clin Exp Gastroenterol* 2018;11:301-7.
13. Zhang W, Wang L, Wang L, Li G, Huang A, Yin P, et al. Liver stiffness measurement, better than APRI, fibroindex, Fib-4, and NBI gastroscopy, predicts portal hypertension in patients with cirrhosis. *Cell Biochem Biophys* 2015;71(2):865-73.
14. Lanford RE, Walker CM, Lemon SM. The chimpanzee model of viral hepatitis: advances in understanding the immune response and treatment of viral hepatitis. *ILAR J* 2017;58(2):172-89.
15. Coppola N, Pisapia R, Tonziello G, Masiello A, Martini S, Pisaturo M, et al. Improvement in the aetiological diagnosis of acute hepatitis C: a diagnostic protocol based on the anti-HCV-IgM titre and IgG avidity index. *J Clin Virol* 2009;46(3):222-9.
16. Tanrırcı Baştuğ A, Bodur H. Akut hepatit C tanı ve tedavisi: literatüre bakış. *Viral Hepatit Dergisi* 2007;12(2):62-7.
17. Uzun B, Er H, Güngör S, Şener AG, Kaya S. Düşük titrede anti-HCV pozitifliği bulunan hastalarda rekombinant immunoblot (RIBA) ve HCV-RNA test sonuçlarının değerlendirilmesi. *J Clin Exp Invest* 2014;5(4):553-6.
18. Coşkun Ö, Savaşçı Ü. Hepatit C virüs enfeksiyonunun patogenezi ve doğal seyri. *TAF Prev Med Bull* 2012;11(4):489-98.
19. Kumar A, Rajput MK, Paliwal D, Yadav A, Chhabra R, Singh S. Genotyping & diagnostic methods for hepatitis C virus: a need of low-resource countries. *Indian J Med Res* 2018;147(5):445-55.
20. Yenicesu İ, Ertuğrul Örüç N. Mikrobiyolojik testler. Yenicesu İ, Ertuğrul Örüç N (editörler). *Ulusal Kan ve Kan Bileşenleri Hazırlama, Kullanım ve Kalite Güvencesi Rehberi*. Ankara: Sağlık Bakanlığı Yayınları (Numara: 1016), 2016:154-98.
21. Colquillo Aysallanque B, Sanchez Montano R, Terceros Almanza P. New strategies in the diagnosis and treatment of hepatitis C. Evaluation of RT-PCR and EIA laboratory techniques. *Biofarbo* 2009;17(2):15-22.
22. Tillmann HL, McHutchison JG. Hepatitis C (chapter 31). In: Boyer TD, Manns MP, Sanyal AJ, Zakim D (eds). *Zakim and Boyer's Hepatology: A Textbook of Liver Disease*. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2012:564-98.
23. Delage G. Clinician's guide to diagnostic tests for hepatitis C virus infections. *Can J Infect Dis* 1993;4(3):170-1.
24. Taliani G, Badolato MC, Lecce R, De Bac C, De Marzio E, Balsano C, et al. Recombinant immunoblot assay for hepatitis C virus antibody in chronic hepatitis. *Arch Virol Suppl* 1992;4:232-3.
25. Donyavi T, Bokharaei-Salim F, Khanaliha K, Sheikh M, Bastani MN, Moradi N, et al. High prevalence of occult hepatitis C virus infection in injection drug users with HIV infection. *Arch Virol* 2019;164(10):2493-504.
26. Zayed RA, Rushdy E, Saleh DA. Detection of HCV RNA in the peripheral blood mononuclear cells of serum HCV RNA-negative Egyptian patients under interferon treatment. *Am J Med Sci* 2010; 40(6):435-8.
27. Maasoumy B, Vermehren J. Diagnostics in hepatitis C: the end of response-guided therapy? *J Hepatol* 2016;65(1 Suppl):S67-S81.
28. Germer JJ, Heimgartner PJ, Ilstrup DM, Harmsen WS, Jenkins GD, Patel R. Comparative evaluation of the Versant HCV RNA 3.0, Quantiplex HCV RNA 2.0, and Cobas AmpliCor HCV Monitor version 2.0 Assays for quantification of hepatitis C virus RNA in serum. *J Clin Microbiol* 2002;40(2):495-500.
29. Bartenschlager R, Baumert TF, Bukh J, Houghton M, Lemon SM, Lindenbach BD, et al. Critical challenges and emerging opportunities in hepatitis C virus research in an era of potent antiviral therapy: considerations for scientists and funding agencies. *Virus Res* 2018;248:53-62.
30. Cuyppers L, Thijssen M, Shakibzadeh A, Sabahi F, Ravanshad M, Pourkarim MR. Next-generation sequencing for the clinical management of hepatitis C virus infections: does one test fits all purposes? *Crit Rev Clin Lab Sci* 2019;56(6):420-34.
31. Cebeci İ, Tanoglu A, Şahiner F, Özel M, Öncü K, Yazgan Y ve ark. Kronik hepatit C hastalarında antiviral tedaviye yanıtta etkili olabilecek parametrelerin değerlendirilmesi. *Gülhane Tıp Derg* 2015;57:373-7.
32. Ergünay K, Abacıoğlu H. Hepatit C virusunun genomik varyasyonları ve kliniğe etkileri. *Mikrobiyol Bul* 2015;49(4):625-35.
33. Kabakçı Alagöz G, Karataylı SC, Karataylı E, Celik E, Keskin O, Dinç B, et al. Hepatitis C virus genotype distribution in Turkey remains unchanged after a decade: performance of phylogenetic analysis of the NSSB, E1, and 5'UTR regions in genotyping efficiency. *Türk J Gastroenterol* 2014;25(4):405-10.

34. Quer J, Gregori J, Rodriguez-Frias F, Buti M, Madejon A, Perez-del-Pulgar S, et al. High-resolution hepatitis C virus subtyping using NS5B deep sequencing and phylogeny, an alternative to current methods. *J Clin Microbiol* 2015;53(1):219-26.
35. Cuypers L, Thijssen M, Shakibzadeh A, Sabahi F, Ravanshad M, Pourkarim MR. Next-generation sequencing for the clinical management of hepatitis C virus infections: does one test fits all purposes? *Crit Rev Clin Lab Sci* 2019;56(6):420-34.
36. Chen Z, Weck KE. Hepatitis C virus genotyping: interrogation of the 5' untranslated region cannot accurately distinguish genotypes 1a and 1b. *J Clin Microbiol* 2002;40(9):3127-34.
37. Yang R, Cong X, Du S, Fei R, Rao H, Wei L. Performance comparison of the versant HCV genotype 2.0 assay (LiPA) and the abbot realtime HCV genotype II assay for detecting hepatitis C virus genotype 6. *J Clin Microbiol* 2014;52(10):3685-92.
38. Liu CH, Liang CC, Liu CJ, Lin CL, Su TH, Yang HC, et al. Comparison of abbot real-time HCV genotype II with versant line probe assay 2.0 for hepatitis C virus genotyping. *J Clin Microbiol* 2015;53(5):1754-7.
39. Fernandez-Caso B, Fernandez-Caballero JA, Chueca N, Rojo E, de Salazar A, Garcia Buey L, et al. Infection with multiple hepatitis C virus genotypes detected using commercial tests should be confirmed using next generation sequencing. *Clin Rep* 2019;9(1):9264.
40. Olmstead AD, Montoya V, Chui CK, Dong W, Joy JB, Tai V, et al. A systematic, deep sequencing-based methodology for identification of mixed-genotype hepatitis C virus infections. *Infect Genet Evol* 2019;69:76-84.
41. Kulah C, Altindis M, Akyar I, Gokahmetoglu S, Sayiner A, Kaleli I, et al. The prevalence of mixed genotype infections in Turkish patients with hepatitis C: a multicentered assessment. *Clin Lab* 2019;65(4).
42. Hayashi K, Tachi K, Shimizu Y, Nagano K, Ishizu Y, Kuzuya T, et al. The prevalence of mixed hepatitis C virus genotype infection and its effect on the response to direct-acting antivirals therapy. *Intervirology* 2019;62(1):23-9.
43. McNaughton AL, Sreenu VB, Wilkie G, Gunson R, Templeton K, Leitch ECM. Prevalence of mixed genotype hepatitis C virus infections in the UK as determined by genotype-specific PCR and deep sequencing. *J Viral Hepat* 2018;25(5):524-34.
44. Lin S, Arcangel P, Medina-Selby A, Coit D, Ng P, Nguyen S, et al. Design of novel conformational and genotype-specific antigens for improving sensitivity of immunoassays for hepatitis C virus-specific antibodies. *J Clin Microbiol* 2005;43(8):3917-24.
45. van Doorn LJ, Kleter B, Pike I, Quint W. Analysis of hepatitis C virus isolates by serotyping and genotyping. *J Clin Microbiol* 1996;34(7):1784-7.
46. Pawlotsky JM, Negro F, Aghemo A, Berenguer M, Dalgard O, Dusheiko G, et al. (European Association for the Study of the Liver). EASL recommendations on treatment of hepatitis C 2018. *J Hepatol* 2018;69(2):461-511.
47. Fourati S, Pawlotsky JM. Virologic tools for HCV drug resistance testing. *Viruses* 2015;7(12):6346-59.
48. Dirani G, Paesini E, Mascetra E, Farabegoli P, Dalmo B, Bartolini B, et al. A novel next generation sequencing assay as an alternative to currently available methods for hepatitis C virus genotyping. *J Virol Methods* 2018;251:88-91.
49. Gao F, Talbot EA, Loring CH, Power JJ, Dionne-Odom J, Alroy-Preis S, et al. Performance of the OraQuick HCV rapid antibody test for screening exposed patients in a hepatitis C outbreak investigation. *J Clin Microbiol* 2014;52(7):2650-2.
50. Khuroo MS, Khuroo NS, Khuroo MS. Diagnostic accuracy of point-of-care tests for hepatitis C virus infection: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One* 2015;10(3):e0121450.
51. Kıratlı K, Gül HC, Artuk C, Kozan S, Öztuna A, Tunca Y ve ark. Kronik hepatit C enfeksiyonu olan hastalarda paraoksonaz-1 gen polimorfizmi ile tedaviye yanıt arasındaki ilişkinin Araştırılması. *Mikrobiyol Bul* 2014;48(4):596-605.
52. Lange CM, Zeuzem S. IL28B single nucleotide polymorphisms in the treatment of hepatitis C. *J Hepatol* 2011;55(3):692-701.
53. Centers for Disease Control and Prevention, USA. Available at: <https://www.cdc.gov/hepatitis/resources/professionals/training/serology/training.htm> [Accessed July 25, 2019].

Yazışma Adresi/Address for Correspondence

Doç. Dr. Fatih ŞAHİNER

Sağlık Bilimleri Üniversitesi Gülhane Tıp Fakültesi,
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı,

Ankara-Türkiye

E-posta: fsvirol@gmail.com