

# HCV ENFEKSİYONU SEROLOJİ VE NÜKLEİK ASİT TESTLERİNİN KLİNİK KULLANIMI

Dr. Ali KAYA

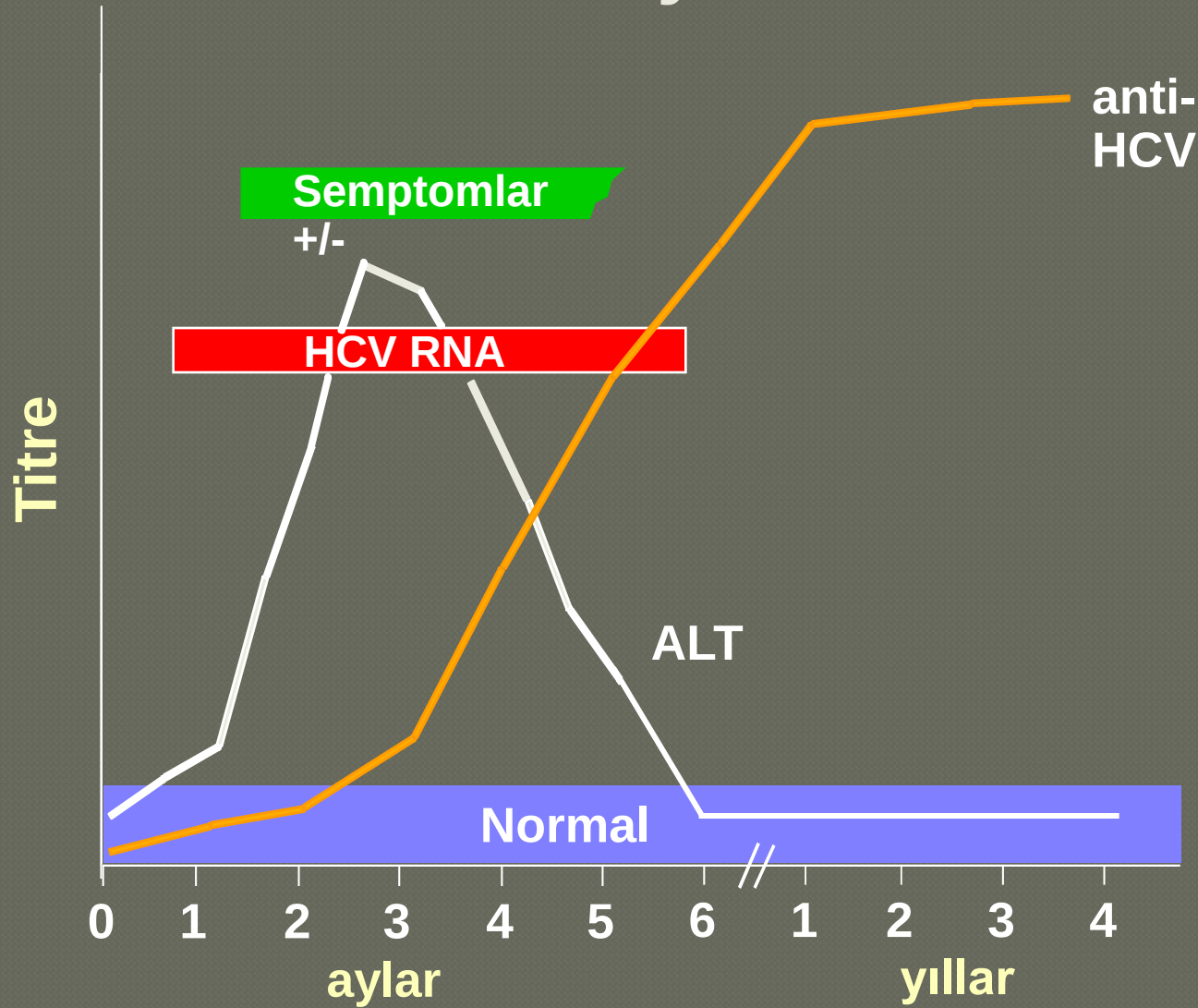
Mersin Ü. Tıp Fak.

Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji AD

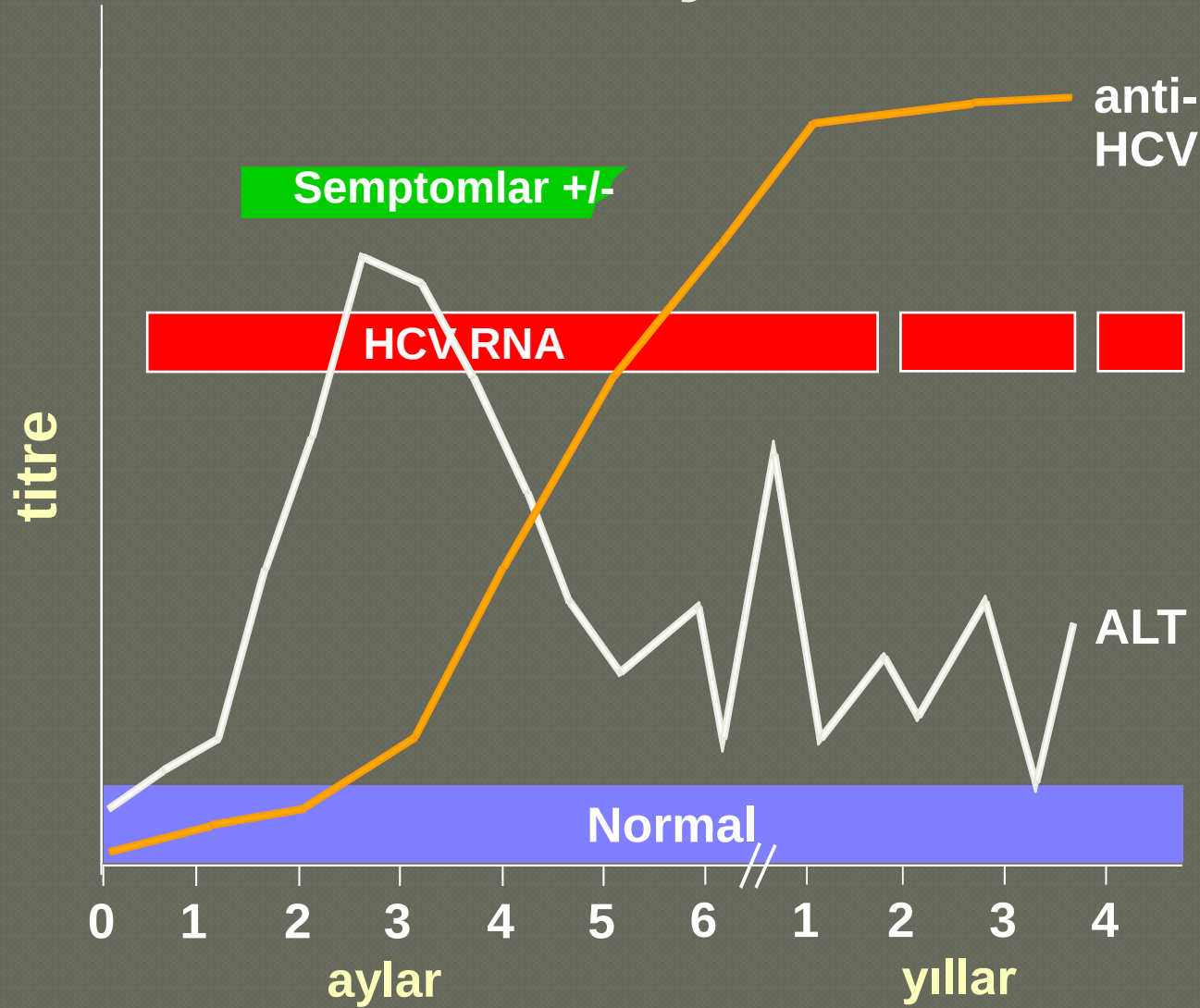
# HCV enfeksiyonu - tanı

- Klinik tanı
  - Klinik bulgular
  - Biyokimyasal testler
  - Histolojik bulgular
- Virolojik tanı
  - Serolojik testler
  - Moleküler testler

# İyileşen Akut HCV enfeksiyonu- Serolojik seyir



# Kronikleşen HCV enfeksiyonu- Serolojik seyir



# HCV genomu

## Serolojik testlerde kullanılan antijenler



EIA 1.0

c-100-3

EIA 2.0

c22-3

c33-c

c-100-3

EIA 3.0

CIA

c22-c

c33-c

c-100-3

NS5

RIBA 2.0

c22-3

c33-c

5-1-1

c-100-3

RIBA 3.0

c22-p

c33-c

c-100-p

NS5

# Serolojik testler

- Anti-HCV antikör
  - Standart testler
    - EIA
    - CLIA
  - RIBA
  - Hızlı testler
- HCV kor antijen
- Kombo (antikör + antijen)
- Serolojik genotip

# Standart antikor testleri - I

- EIA CLIA'dan daha yaygın kullanılır
  - EIA'da renk değişikliği
  - CLIA'da kimyasal reak. sonrası ortaya çıkan ışığın ölçümü
- Üçüncü kuşak testlerde
  - Duyarlılık %98
  - Özgüllük %99

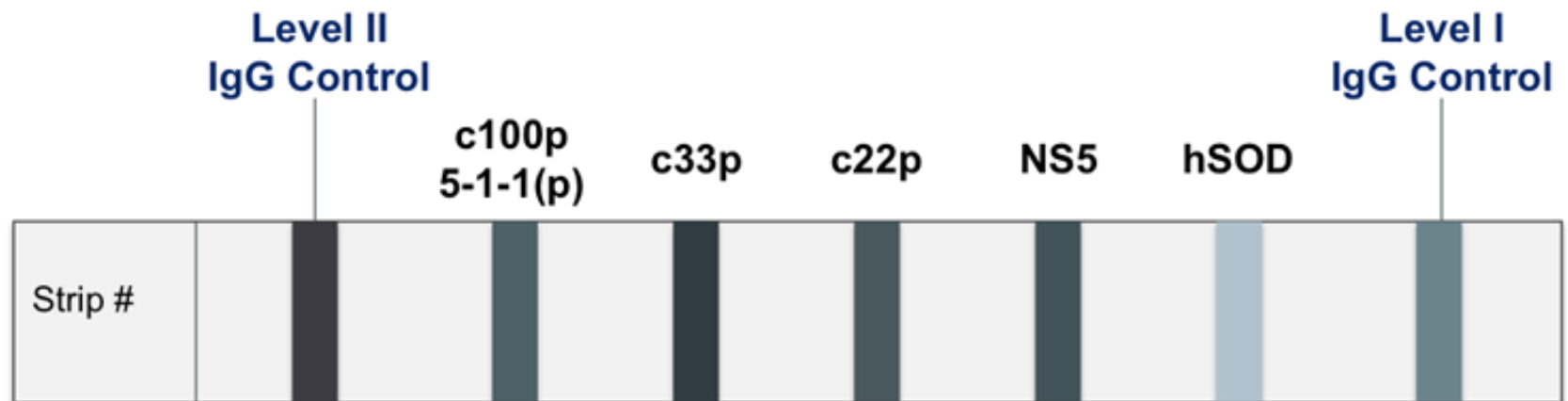
# Standart antikor testleri - II

- Pencere dönemi
  - İkinci kuşak testlerle 10 -24 hafta (ort 82 gün)
  - Üçüncü kuşak testlerle 8-24 hafta (ort. 62 gün)
- IgM antikor
  - akut enfeksiyonda %50-93,
  - kronik enfeksiyonda %50-70 pozitif

# RIBA

- Rekombinan HCV antijenlerinin bir membran üzerinde bantlar oluşturmaları temelli
  - $\geq 2$  protein için reaktivite pozitif sonuç
  - Tek protein için reaktivite indetermine
    - 1 – 6 ay içinde pozitifleşme beklenir

## HCV RIBA 3.0



# RIBA-doğrulama testi

Anti-HCV pozitif, HCV RNA negatif hastada

- RIBA pozitif : geçirilmiş enfeksiyon
- RIBA negatif : yalancı pozitiflik

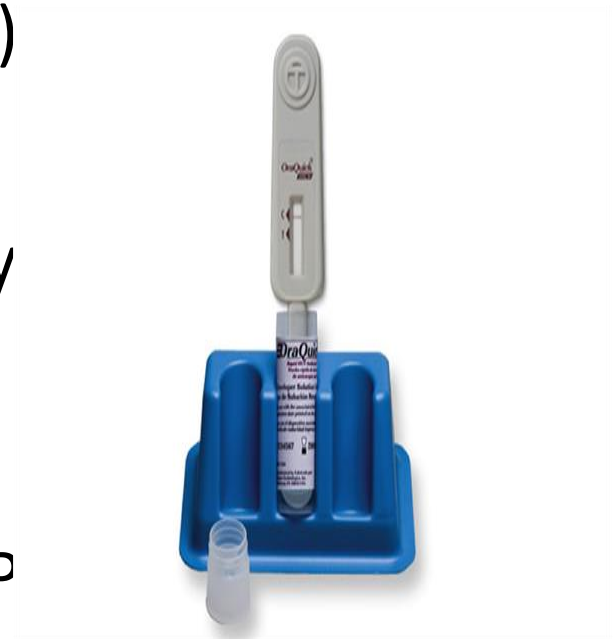
\* pratikte kullanılmamaktadır

# Hızlı antikor testleri

- Kromatografi temelli
- Parmak ucu veya venöz kanda çalışılabilir
- Kullanılan antijenler kor, NS3, NS4 ve NS5
- Duyarlılık %86-99, özgüllük %99
- Pahalı olmaları dezavantaj

# Hızlı testler

- OraQuick HCV Rapid Test (OraSure Technologies, Inc, Bethlehem, PA) (FDA onaylı)
- Multiplo Rapid HIV/HCV Antibody Test (MedMira, Inc, Halifax, Nova Scotia)
- Chembio Dual Path Platform (DPP) HCV Test (Chembio Diagnostic Systems, Inc, Medford, NY)



# Flexible Specimens for Clinical and Non-Clinical Settings

Fingerstick

Venipuncture Whole Blood

## Simple Testing Procedure

### Fingerstick

**Step 1** - Collect sample.



**Step 1b** - Mix sample in buffer.



**Step 2** - Insert the device into the buffer.



**Step 3** - Read between 20 and 40 minutes.



**Non-Reactive**  
Line in the C Zone



**Reactive**  
Line in the C and T Zones

20 – 40 dk. sonra



## Testing and Linkage to Care Table 1. FDA-approved, Commercially Available Anti-HCV Screening Assays

| Assay                                   | Manufacturer                                  | Format                         |
|-----------------------------------------|-----------------------------------------------|--------------------------------|
| <b>Abbott HCV EIA 2.0</b>               | Abbott Laboratories, Abbott Park, IL, USA     | EIA (Manual)                   |
| <b>Advia Centaur HCV</b>                | Siemens, Malvern, PA, USA                     | CIA (Automated)                |
| <b>ARCHITECT Anti-HCV</b>               | Abbott Laboratories, Abbott Park, IL, USA     | CMIA (Automated)               |
| <b>AxSYM Anti-HCV</b>                   | Abbott Laboratories, Abbott Park, IL, USA     | MEIA (Automated)               |
| <b>OraQuick HCV Rapid Antibody Test</b> | OraSure Technologies, Inc, Bethlehem, PA, USA | Immunochromatographic (Manual) |
| <b>Ortho HCV Version 3.0 EIA</b>        | Ortho                                         | EIA (Manual)                   |
| <b>VITROS Anti-HCV</b>                  | Ortho                                         | CIA (Automated)                |

Anti-HCV = HCV antibody; EIA = enzyme immunoassay; CIA = chemiluminescent immunoassay; MEIA = microparticle enzyme immunoassay; CMIA = chemiluminescent microparticle immunoassay

Table prepared by Saleem Kamili, PhD, Centers for Disease Control and Prevention.

# Antijen testleri

- HCV nukleoproteini (kor ag)
- EIA veya CLIA bazlı testler
- Enfeksiyondan iki hafta, HCV RNA'dan 2-8 gün sonra pozitif
- Duyarlılık %80-99, özgüllük %96-100
  - Duyarlılığı HCV-RNA düzeyi ile ilişkili
    - Yaklaşık 1000 IU/ml'lik RNA düzeyi duyarlılık alt sınırı
- NAT yerine kullanım için duyarlılık yeterli değil

# Dördüncü jenerasyon veya “kombo” testler

- Genellikle sandwich EIA kullanılır
- HCV antikorları + HCV kor proteini
- Kor bölgesinden iki epitop, NS3, NS4A, NS4B, NS5A
- INNOTEST Ab IV duyarlılık %100, özgüllük %99.8
- 2. haftadan sonra pozitifleşir

# Nükleik asit testleri (NAT)

- HCV RNA temas sonrası 2-14. günde serumda pozitif
- Aktif HCV enfeksiyonunun altın standart göstergesi
- Yöntemler
  - RT-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction)
  - TMA (transcription-mediated amplification)
  - bDNA (branched DNA signal amplification)
- Kalitatif ve kantitatif sonuç, <10 IU/ml'lik duyarlılık
- Genotip ve subtip tayini
- Antiviral direnç tayini

**Table 2. Qualitative and Quantitative Hepatitis C Virus RNA Assays Available for Clinical Use**

| Assay                                 | Manufacturer      | Method                 | Lower Limit of Detection, <sup>a</sup><br>(Dynamic Range) IU/mL |
|---------------------------------------|-------------------|------------------------|-----------------------------------------------------------------|
| Qualitative                           |                   |                        |                                                                 |
| Amplicor HCV v2.0                     | Roche             | RT-PCR (manual)        | 50                                                              |
| COBAS Amplicor HCV v2.0               | Roche             | RT-PCR (semiautomated) | 50                                                              |
| Ampliscreen <sup>b</sup>              | Roche             | RT-PCR (semiautomated) | <50                                                             |
| Versant HCV RNA                       | Gen-Probe         | TMA (manual)           | 10                                                              |
| UltraQual HCV RT-PCR                  | National Genetics | RT-PCR                 | 10                                                              |
| Procleix HIV-1/HCV <sup>b</sup>       | Gen-Probe         | TMA (manual)           | <50                                                             |
| Quantitative                          |                   |                        |                                                                 |
| Amplicor HCV Monitor                  | Roche             | RT-PCR (manual)        | 50 (600–700 000)                                                |
| COBAS Amplicor HCV Monitor v2.0       | Roche             | RT-PCR (semiautomated) | 50 (600–700 000)                                                |
| Versant HCV RNA 3.0                   | Siemens           | bDNA (semiautomated)   | 615 (615–7 700 000)                                             |
| COBAS Ampliprep/TaqMan                | Roche             | qPCR (semiautomated)   | 18 (43–69 000 000)                                              |
| Real Time HCV/m2000sp/m2000rt         | Abbott            | qPCR (semiautomated)   | 12 (12–100 000 000)                                             |
| HCV SuperQuant                        | National Genetics | RT-PCR (semiautomated) | 20 (20–1 000 000)                                               |
| LCx HCV RNA-Quantitative <sup>b</sup> | Abbott            | RT-PCR (manual)        | 25 (25–2 630 000)                                               |

Abbreviations: bDNA, branched DNA; qPCR, quantitative polymerase chain reaction; RT-PCR, reverse-transcription polymerase chain reaction; TMA, transcription-mediated amplification.

<sup>a</sup> Dynamic ranges are specified in parentheses.

<sup>b</sup> Used for blood screening only.

# Serolojik ve Nükleik Asit Testlerinin Klinik Kullanımı

# Akut HCV enfeksiyonu tanısı

- Hastaların en az üçte ikisi asemptomatik
- Tanı akut hepatitli hastanın testi veya şüpheli bulaş sonrasında takip ile konur
- ALT semptomların başlangıcında genellikle yüksek
- HCV RNA günler (en geç 8 hafta) içinde pozitif
  - İğne batmasından 2 hafta sonra NPV: %100
- Anti-HCV pozitifliği 2-6 ay içinde

# Semptomatik, ALT düzeyi yüksek hastada

- HCV RNA negatif: Akut enfeksiyon ekarte edilir
  - Anti-HCV pozitif: Geçirilmiş enfeksiyon
- HCV RNA pozitif, anti- HCV negatif
  - Akut enfeksiyon muhtemel
  - 12 hafta sonra anti-HCV serokonversiyonu
- HCV RNA pozitif, anti- HCV pozitif
  - Akut-kronik enfeksiyon ayırımı mümkün değil
  - IgG avidite yardımcı olabilir
  - Son 6 ay içinde negatif enfeksiyon göstergesi akut enf. lehine
  - Fibroze ait bulgular kronik enf. lehine

# Şüpheli temas varlığında

- Bir iki gün içinde HCV RNA ve anti-HCV negatif, ALT: N
  - 4 hafta sonra HCV RNA ve ALT (anti-HCV pozitifliği beklenmez)
  - 3-4 ay sonra HCV RNA, anti-HCV ve ALT
  - 6 ay sonra HCV RNA, anti-HCV
- HCV RNA pozitifleşmesi = akut enfeksiyon
  - 12. haftada anti-HCV serokonversiyonu
- Başlangıçta HCV RNA pozitif
  - Anti-HCV pozitif ise kronik enfeksiyon
  - Anti-HCV negatif ise akut enfeksiyon
    - 12 hafta sonra serokonversiyon

# Kronik HCV enfeksiyonu

- Kronikleşme % 50-80
- Hastaların çoğunluğu asemptomatik
- Tanı
  - ALT yüksekliği
  - Ekstrahepatik bulguların değerlendirilmesi (mixed cryoglobulinemia, porphyria cutanea tarda gibi)
  - Riskli grupların taranması

# Taranması önerilen gruplar

- Uyuşturucu ilaç alanlar
- Tarama testlerinden önce kan - organ nakli yapılanlar
- HCV ile enfekte olduğu anlaşılan birinden kan alanlar
- Enfekte anneden doğan bebekler
- Hasarlı deri veya mukozaya şüpheli temaslılar
- Hastaların cinsel eşleri
- Hemodiyaliz hastaları
- HIV pozitif hastalar
- Mahkumlar

# Kronik HCV enfeksiyonu – tanı - I

- İlk adım anti-HCV antikor testi
  - Yanlış negatiflikler
    - Hemodiyaliz hastaları
    - Transplant alıcıları
    - HIV pozitif kişiler
    - İmmün yetmezlik
  - Klinik şüphe varsa başlangıçta NAT
- Doğrulama için NAT

# Kronik HCV enfeksiyonu – tanı - II

- Anti-HCV ve HCV RNA pozitif: aktif enfeksiyon
- Anti-HCV pozitif, HCV RNA negatif
  - HCV RNA yanlış negatifliği beklenen bir sonuç değil
  - Geçirilmiş enf.                      }  
– Yanlış pozitiflik                      }      ikinci bir test, s/co, RIBA
  - Pasif antikör nakli
    - Transfüzyon
    - Transplazental

**Table 1. Signal-to-Cutoff Ratios Established for Food and Drug Administration–Approved, Commercially Available Screening Assays for Detecting Anti–Hepatitis C Virus Immunoglobulin G**

| Assay                     | Manufacturer | Method           | Ratio       |
|---------------------------|--------------|------------------|-------------|
| Ortho HCV Version 3.0 EIA | Ortho        | EIA (manual)     | $\geq 3.8$  |
| Abbott HCV EIA 2.0        | Abbott       | EIA (manual)     | $\geq 3.8$  |
| VITROS Anti-HCV           | Ortho        | CIA (automated)  | $\geq 8.0$  |
| AxSYM Anti-HCV            | Abbott       | MEIA (automated) | $\geq 10.0$ |
| ARCHITECT Anti-HCV        | Abbott       | CMIA (automated) | $\geq 5.0$  |
| Advia Centaur HCV         | Siemens      | CIA (automated)  | $\geq 11.0$ |

Ratios are predictive of true-positive results >95% of the time.

Abbreviations: CIA, chemiluminescence immunoassay; CMIA, chemiluminescent microparticle immunoassay; EIA, enzyme immunoassay; MEIA, microparticle enzyme immunoassay.

# Vertikal geçiş - tanı

- Maternal antikorların klerensi 12. ayda %95
- İlk yıl içinde en az 3 ay ara ile iki HCV RNA
- 15.-18. ayda anti-HCV
- NIH önerisi
  - 2. - 6. aylar arası iki HCV RNA ve/veya 15. ayda anti-HCV

# Donör tarama testleri - I

- Seçilecek yöntem ekonomik güç ile ilgili
- Antikor testleri yaygın
- Gelişmiş ülkelerde antikor testi + NAT
- Antijen testinin yararı NAT kadar değil
- NAT ile pencere dönemi < 1 hafta
  - Bireysel
  - Havuz (6 – 90 örnek)
  - Multiplex (HCV, HBV, HIV)

# Donör tarama testleri - II

- Tarama sonrası rezidüel HCV bulaş riski
  - EIA : 1/59.588
  - Antikor + antijen): 1/320.000
  - Antikor + NAT: 1/540541
- NAT yüksek prevalans bölgelerinde daha yararlı olabilir

# Tedavinin takibi

- Sensitif HCV RNA
- SVR (tedavinin bitiminden 24 hafta sonra negatif HCV RNA)
- SVR elde edilenlerde
  - HCC riskinde %70
  - KC hastalığına bağlı ölüm ve transplantasyon ihtiyacında %90 azalma

# HCV RNA takip aralığı

- PegIFN + ribavirin + sofosbuvir tedavisi (12 hafta)
  - Başlangıç, 4., 12 hafta (tedavi sonu), tedavi sonu 12 veya 24. hafta
- PegIFN + ribavirin + simeprevir (12 hafta + 12 veya 36 hafta IFN/RBV)
  - Başlangıç, 4., 12., 24. hafta (naiv, relapser tedavi sonu; + 48. hafta kısmi yanıtli veya yanitsızlarda) ve tedavi sonu 12. veya 24. hafta)
- İnterferonsuz rejimlerde
  - Başlangıç, 2., 4., 12. veya 24. hafta (tedavi sonu) ve tedavi sonu 12 veya 24. hafta

# Genotip - subtip tayini

- Moleküler (standart yöntem)
- Serolojik
- Tedavi süresi ve yanıt oranına etkili
  - İnterferon/RBV tedavi süresi
    - GT1 ve GT4 vakalarında 48 hafta
    - GT2 ve GT3 vakalarında 24 hafta

# DAA bazlı tedavide genotip

- GT1 nonsirotik hasta
  - Naiv hasta: Sofosbuvir/ledipasvir 12 hafta
  - Proteaz inh. deneyimli: Sofosbuvir/ledipasvir 24 hafta
- GT2
  - Naiv, nonsirotik: Sofosbuvir/RBV 12 hafta
  - Sirotik veya ted deneyimli: Sofosbuvir/RBV 16-20 hafta
- GT3, naiv
  - Sofosbuvir/PegIFN/RBV 12 hafta
  - Sofosbuvir/RBV 24 hafta

# Antiviral direnç - I

- DAA ile kaçınılmaz
- Henüz başlangıçta direnç testi önerilmemekte
- Antivirallerin hedef molekülleri
  - NS3/4A proteaz, NS5A proteini, NS5B polimeraz
- Mutasyonlar spontan veya antiviral baskı ile
- Ticari kitler
  - LabCorp
  - Quest Labs

# Antiviral direnç - II

- Proteaz inhibitör (simeprevir) direnci
  - Q80K : Klinik olarak anlamlı en yaygın mutasyon
  - R155K, A156T/V
- NS5A mutasyonları (daclatasvir direnci)
  - Y93 en önemlisi
  - M28, A30, L31
- NS5B polimeraz mutasyonları (sofosbuvir direnci)
  - S282T, L159F, E341D
  - Klinik anlamları henüz bilinmiyor

# Antiviral direnç - III

- Kombinasyonda Ledipasvir direnç potansiyeli
  - GT1a için: Q30R, Y93H/N, L31M
  - GT1b için: Y93H
  - Naiv hastalarda etkinlik kaybı yok
  - Tedavi deneyimlilerde doz ve süreyi etkileyecek kadar değil
- Ombitasvir /paritaprevir/ritonavir/± dasabuvir
  - NS3'te D168V
  - NS5A'da M28A/T/V, Q30E/K/R
  - NS5B'de S556G/R
  - Henüz klinik anlamları yok