

# Moleküler Tanı Yöntemleri ve Klinik Anlamları

Prof.Dr. Mustafa Kemal ÇELEN

Diyarbakır

# Bakış açısı önemli !

Bu hastanın HIV pozitif olduğunu söylersem, fikriniz değişir mi?



Anti HCV pozitif ve viral yükü negatif bir hastayı nasıl değerlendirirsiniz?

# HCV denince akla ne gelir?

- En ağır formdur...
- Tedavide başarısızdık ancak... işler değişti
- Genotiplendirme
- Standart tedavi, Yeni tedaviler
- HCV RNA...
- Anti HCV
- Direnç

## Antalya Eğitim ve Araştırma Hastanesinde Kronik Hepatit C Hastalarının Genotip Dağılımının Araştırılması

*Tablo 1. HCV Genotip ve Alt Tiplerinin Dağılımı*

Uyruk	Genotip 1			Genotip 2	Genotip 3	Genotip 4	Hasta sayısı
	1	1a	1b				
Yerli, n (%)	13 (9.6)	19 (14.1)	85 (63)	5 (3.7)	10 (7.4)	3 (2.2)	135
Yabancı, n (%)	-	-	5 (38.5)	1 (7.7)	7 (53.8)	-	13
Toplam, n (%)	13 (8.8)	19 (12.8)	90 (60.8)	6 (4.1)	17 (11.5)	3 (2)	148

- HCV infeksiyonu çoğunlukla asemptomatik seyretmektedir
- Anti-HCV
- Core antigeni ve HCV RNA

# HCV

- Oral antiviral tedavi hızla yaygınlaşmaktadır
- Daha hızlı ve hasas sonuç verelen moleküler yöntemlere ihtiyaç var
- Anti-HCV
- nükleik asit saptanmasına dayanmaktadır

- HCV RNA ve HCV kor antijen testlerinin geliştirilmesi viremi döneminde bireylerin tanımlanmasını hızlandıracaktır.
- Validasyon ve maliyet-etkinlik çalışmaları
  - HCV viremisini tespit etmek
  - HCV RNA (-) kişilerdeki yalancı Ak (+)
  - Geçirilmiş HCV arasındaki ayrımı

# HCV Ag saptanması

- HCV Ag seviyesinin saptanması HCV RNA varlığı ve düzeyi ile ilişkilidir
- Ancak bu durum pahalı ve zahmetli bir yöntemdir
- Ayrıca saptanabilir minimum düzeyi, HCV RNA 500-3000 IU/mL seviyesine denk gelmesi nedeniyle hassas bir yöntem değildir.



# IL28B & IP10

## IL28B

- IL28B varyasyonlar virolojik yanıt güçlü tedavi öncesi belirleyicisi olduğu gösterilmiştir

## IP 10

- Gelecek vaat eden IL28B'den bağımsız ve karaciğer fibrozis korelasyonu gösteren negatif prediktif değeri olan bir belirteç

# Önemli iki nokta

- Yeni enfeksiyonu tanımlamak
- İlaça dirençli HCV sürveyansını sürdürmek

Bu iki noktanın çözümlenmesi sürecindeki olumlu gelişmeler, HCV'nin ortadan kaldırılması için umutları güçlendirecektir.

# Klinik Süreç

- Anti-HCV pozitif
  - 1) Akut infeksiyon
  - 2) Geçirilmiş infeksiyon
  - 3) Yanlış pozitiflik
- HCV RNA ise devam eden bir infeksiyonu gösterir
- Negatif ise geçirilmiş, düzelmiş bir infeksiyonu ve veya yanlış pozitifliğe işaret eder

# HCV RNA

- Genelde Anti-HCV pozitifliği sonrasında moleküler yöntemlere başvurulmaktadır
- Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemleri ilgilenilen nükleik asit segmentinin kısa bir zamanda milyonlarca kopyasının elde edilmesine dayanır

# Klinik Tanıda HCV-RNA'nın Önemi

- Artık günümüzde son derece hassas moleküler yöntemlerle 10 IU/ml üzerindeki viral yük saptanabilmektedir
- Saptanabilir viral yükü olan tüm kompanse karaciğer hastaları tedaviye aday olarak kabul edilir
- Diğer bir önemi de tedavisi başlanan hastanın tedavi yanıtını izlemek için başvurulan en değerli yöntem olmasıdır

# HCV tedavilerinde önemli bir terminoloji

- **Saptanamaz HCV RNA seviyesi:** Kullanılan tanı testinin saptama sınırlarının altında kalan HCV RNA yüküdür.
- Bu seviye “negatif” olmak zorunda değildir.

- **EASL HCV kılavuzu:**  
**2.4. The current standard of care and developing therapies., p 246:**  
The primary goal of HCV therapy is to cure the infection, which results in eliminating detectable circulating HCV after cessation of treatment.
- Sustained virological response (SVR), is defined as an undetectable HCV RNA level (<50 IU/ml) 24 weeks after treatment withdrawal.
- **4.4.2. HCV RNA detection and quantification, p 249, Recommendation:**
- HCV RNA detection and quantification should be made by a sensitive assay (**lower limit of detection of 50 IU/ml or less**), ideally a **real-time PCR assay**, and HCV RNA levels should be expressed in **IU/ml** (C1).

HCV RNA kantitasyonunda  
saptama sınırı  
daha da aşağıya çekilmeli midir?

- < 20 - < 25 IU/ml
- < 10 - 15 IU/ml

# Tedavi kararında Gentoplendirme

- HBV'den farklı olarak HCV infeksiyonunda genotiplendirme son derece önemli

GT1 ve GT4 vakalarında tedavi süresi 48 hafta

GT2 ve GT3 vakalarında tedavi süresi 24 hafta



# Tedavi izlemi

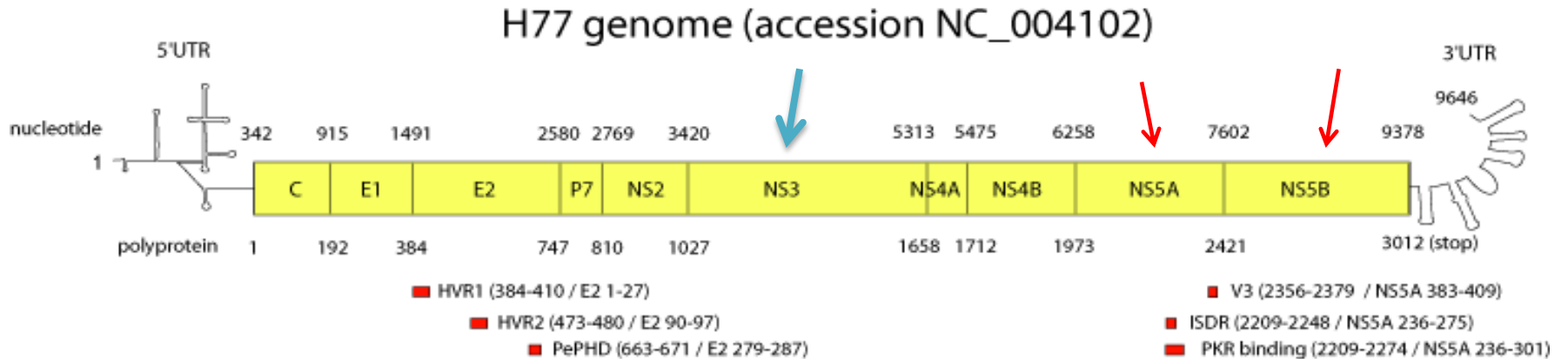
- Sonlanım noktamız SVR'dir (undetectable HCV RNA (<10–15 IU/mL)). Tedavi sonu 24.hafta (-) saptanması %99 eradikasyonu gösterdiği kabul edilir.
- Moleküler izlem tedaviyi yönlendiren asıl parametredir
- Özellikle Doğrudan etkili antivirallerin kullanımında direnç gelişme ihtimalini gösterene en değerli yöntem HCV-RNA düzeyidir

# Direnç

- Direnç çalışmaları HCV tedavisinde son dönemde artan yeni bir tanımlama yöntemidir.
- Tedavide %100 küre doğru giderken tedavi yanıtı sızlığını saptamada önemli bir parametredir
- İleri yöntem sekanslama modelleri ile dirençli ve duyarlı virüs popülasyonlarının dinamiği ortaya konmaktadır

# HCV NS3 ve NS5 inhibitör direnci

- Direkt (populasyon) sekanslama yöntemi;
  - RNA izolasyonu
  - cDNA yapımı
  - HCV PCR (nested)
  - PCR ürün saflaştırma
  - HCV proteaz/RT sekanslama
  - Analiz ve raporlama



- Artık HCV core Ag'nini ve daha hassas HCV-RNA düzeyinin saptanması olası
- Real time target amplification (PCR or TMA) metodu klinik pratikte HCV tedavi izleminde yaygınlaşmaktadır
- Hızlı tarama testleri ile HCV'nin daha erken dönemde saptanması olası hale geldi

## Recombinase polymerase amplification as a promising tool in hepatitis C virus diagnosis

Early diagnosis and treatment of HCV infection can reduce the risk of long-term complication. NAT represent HCV RNA level determination techniques and cost effective could improve and stop transmission point-of-care infected patients in the management.

Zaghloul H *et al.* RPA as a promising tool in HCV diagnosis

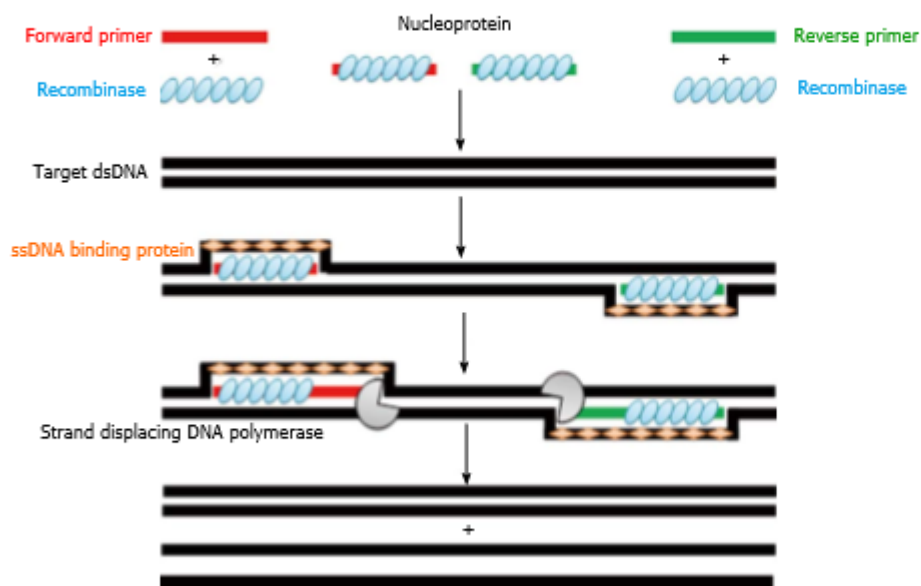
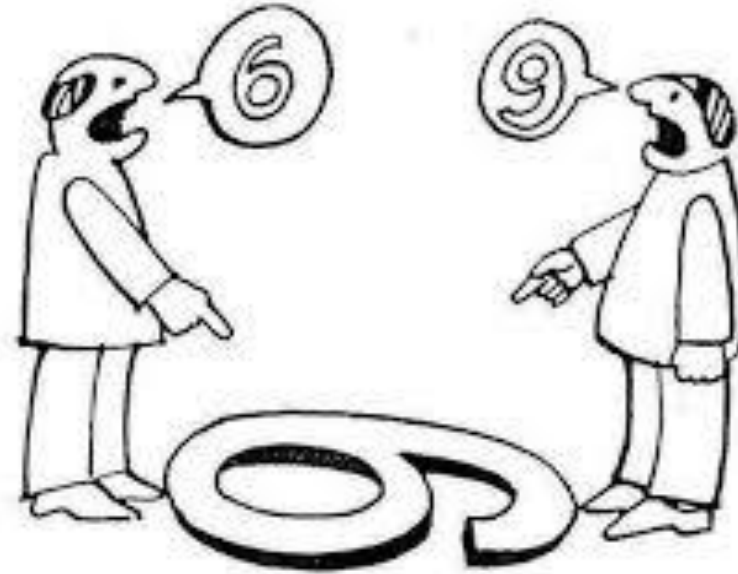


Figure 1 Recombinase polymerase amplification technology amplification cycle (for details, see the text above). dsDNA: Double-stranded DNA.

# Haklı olan kim?



Anti HCV pozitif ve viral yükü negatif hasta taşıyıcı mı? , yanıtı mı ?

# Occult HCV

- Anti-HCV (-), serum HCV-RNA (-), [KCFT](#) ↑
- Kanda mononükleer hücrelerde ve/veya Karaciğerde HCV-RNA (+)
- Seronegatif occult HCV: Anti-HCV (-)
- Seropozitif occult HCV: Anti-HCV (+)
- HD, immün ilişkili glomerulonefrit, immünsüprese hastalarda, IVDU

# Occult HCV

- Hala tartışmaya açık bir konu
- Sero-negatif ? Sero-pozitif ?
- Extrahepatik bir manifestasyon mudur? Yoksa Kronik HCV'nin bir formu mudur?
- Orjini bilinmeyen KCFT yüksekliği olan ve Anti-HCV / Serum HCV-RNA (-) hastalar
- Daha hassas PCR yöntemleri ile serumda HCV-RNA saptanabilir mi?

Yoksa farklı bir immünite mi?



# HCV pozitif eşten, bulaş ?

- Altın standart KC-S dokusunda HCV-RNA varlığıdır, ancak invazif bir işlem
- Periferik Kan Mononükleer hücrelerde (PBMC) HCV-RNA varlığı
- Mısır'da yapılan bir çalışmada Genotip 4 ile infekte 50 indeks vakasının eşleri değerlendirilmiş
- Tamamında Anti-HCV (-)
- Serum HCV-RNA (-)

**PBMC'de %4 HCV-RNA pozitif**

# HIV hastalarında; Occult HCV

- Gürcistan'da HCV oranı %6.7
- Anti-HCV (-) 161 HIV hastası değerlendirildi
- Grup 1: Hepatiti olmayan HIV hastaları (n:98)
- Grup 2: Kriptojenik hepatit + HIV (n:34)
- Grup 3: HBV koinfekte HIV hastaları (n:29)

## PBMC HCV-RNA

**%9.3**

Grup: 1	% 2
Grup: 2	%12
Grup: 3	%31

*Sonuç olarak; HIV hastalarında sadece Anti-HCV'yi değerlendirmek yeterli değil...*

# HCV+HD hastalarında occult HBV?

- Anti-HCV ve HCV-RNA pozitif 33 hasta occult HBV açısından ve YMDD mutasyonu açısından değerlendirilmiş
- Bu hastaların %36.4'ünde occult HBV pozitif
- Occult HBV hastalarının %50'sinde de YMDD mutasyonu saptanmış

# HCV ile ilişkili otoantikörler

## *Anti-nükleer antikörler (ANA)*

- Bazı bağ dokusu hastalıklarında kullanılan heterojen bir oto-antikördür
- Fizyolojik ve patolojik durumlarda pozitifleşir
- >1:160 oto-immun hastalıkla ilişkilendirilir, ancak düşük titre ve negatiflikte ekarte ettirmez
- Yaş ve cinsiyet faktöründen etkilenir

# HCV ile ilişkili otoantikolarlar

## Organ non-spesifik otoantikolarlar

- ANA
- ASMA

## Organ spesifik otoantikolarlar

- Anti-karaciğer böbrek mikrozomal Ak (ALKM)
- Anti-mitokondriyal antikor (AMA)
- ANCA

# HCV ilişkili oto-antikörler

- Anti-HCV pozitif ve negatif toplam 285 serumda
- ANA, SMA, ANCA, LKM, AMA oto-antikör testleri 1:100 dilüsyonla aranmış

ANA pozitifliği; Anti-HCV pozitiflerde anlamlı

ANA pozitifliği, HCV-RNA pozitiflerde anlamlı

- Anti-HCV varlığı ve HCV RNA düzeyinin ANA pozitifliği üzerindeki etkisinin ölçülebilmesi için logistic regression analizi yapılmış
- ANA pozitifliğine göre, HCV RNA düzeyi yüksek olanların %95 güven aralığında Odd ratio değeri 0.2 ile 0.9 arasında bulunmuş. Odd ratio değeri 1'i içermediği, farkın istatistiksel olarak anlamlı bulunmasıyla doğrulandı.

- Bu analize göre, yüksek düzeyde HCV RNA pozitifliđin ANA pozitifliğine etkisi olduğu gösterildi.
- Bununla birlikte, anti-HCV pozitifliğinin ve düşük düzeyde HCV RNA varlığının ANA pozitifliğini etkilemediği anlaşıldı.



Konu gayet net mi ? 😊

[mkcelen@hotmail.com](mailto:mkcelen@hotmail.com)

