

# **Akut ve Kronik Hepatit Tanısında Serolojik ve Moleküler Yöntemler Atipik Profiller**

**Dr Güle Çınar**

**Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi**

**Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları ABD**

# Etkenler

- HAV → akut hepatit
  - HBV
  - HCV
  - HDV
- akut+kronik hepatit
- HEV → akut hepatit
- 
- ```
graph LR; HAV --> AH1[akut hepatit]; HBV --- G1[ ]; HCV --- G1; HDV --- G1; G1 --> AKK[akut+kronik hepatit]; HEV --> AH2[akut hepatit];
```

# Etkenler ve tanı

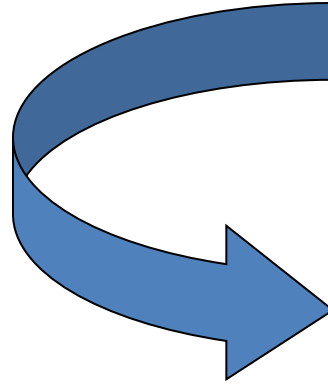
- Hepatit kliniđi ile başvuran bir hastada

Yaş

Meslek

Yaşadığı yer

Öykü



Muhtemel  
tanı ?

- Klinik özelliklerine göre hepatit etkenlerinin tanısı imkansızdır.

# Hepatit virüslerinin ayırımında en sık kullanılan yöntem

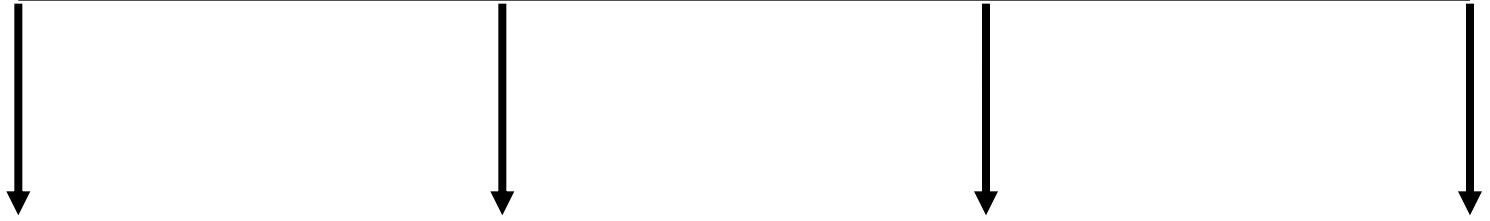
## Serolojik tanı

- Hepatit etkeni virüs
- Hastalığın evresi
- Virüsün infektivite derecesi
- Hastalığın prognozu
- Daha önce viral hepatit geçirmiş ya da hepatite duyarlı kişilerin saptanması mümkündür.

# **Teknolojik ilerlemeye rağmen serolojik tanıda %100 doğruluk oranına ulaşılamamıştır.**

- Yanlış pozitif
- Yanlış negatif
- Belirlenemeyen “indeterminant” sonuçlar

# SEROLOJİK TANI PROBLEMLER



**Etkene bağlı**

- Mutant virüsler

**Hastaya bağlı**

- İmmün yetmezlik

**Laboratuvara bağlı**

**Hekime bağlı**

**İncelenen örneğe bağlı**

**Uygun olmayan örnek**

**Uygunsuz saklama**

**Tetkike bağlı**

**Test kitlerinden**

**kaynaklanan**

**duyarlılık ve özgüllük**

**problemleri**

# Hepatit A Virusu

- **Anti HAV Ig M**

İnfeksiyonun akut döneminin göstergesi

1 yıl pozitiflik devam edebilir

- **Anti HAV Ig G**

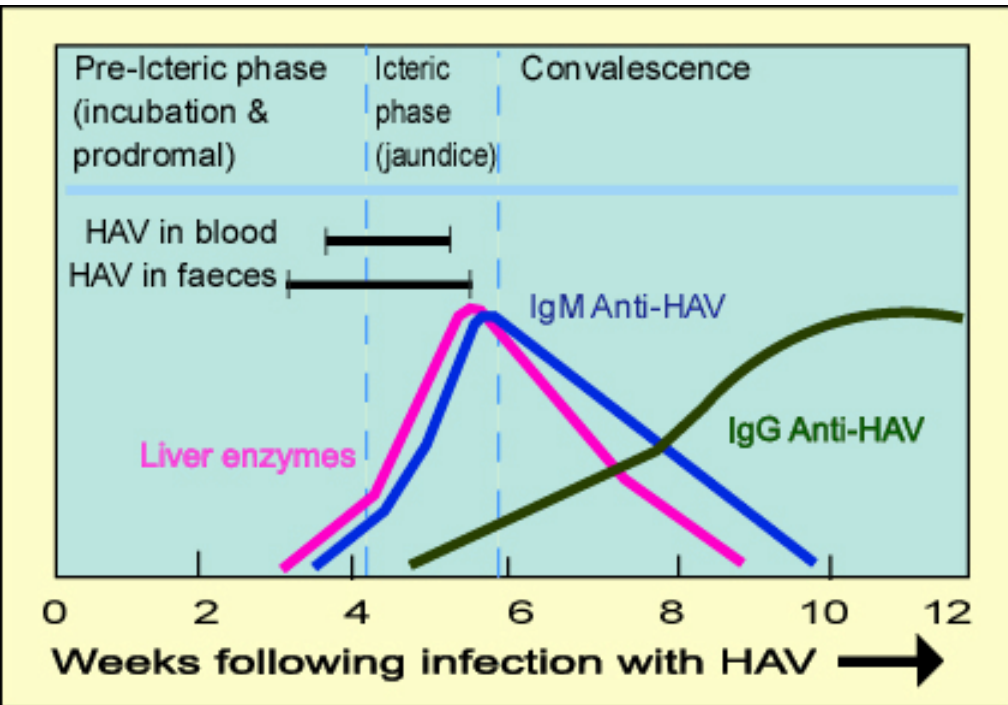
Geçirilmiş infeksiyon göstergesi

Pozitiflik yıllarca devam eder.

- Total IgM-IgG antikor testinin tanı değeri düşük
- HAV PCR testi rutinde kullanılmıyor.



# Anti-HAV IgM

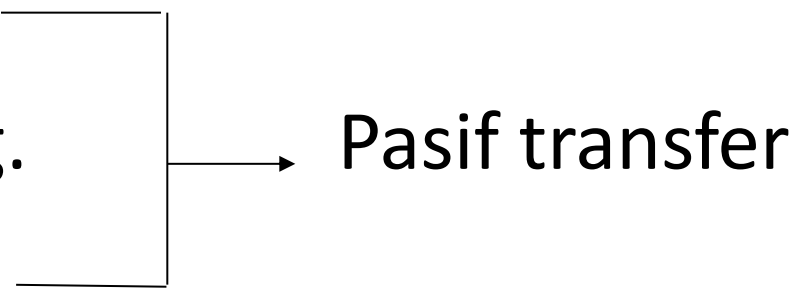


- Uzamış/tekrarlayan hepatitlerde 12 ay pozitif kalabilir.
- Yalancı negatiflik: Başvuru sırasında
- Yalancı pozitiflik:
  - Yeni aşılanmış kişilerde
  - RF,ANA pozitif hastalarda
  - Çok nadir, akut HBV infeksiyonları sırasında çapraz reaksiyon

# Anti-HAV IgG

Yalancı pozitiflik

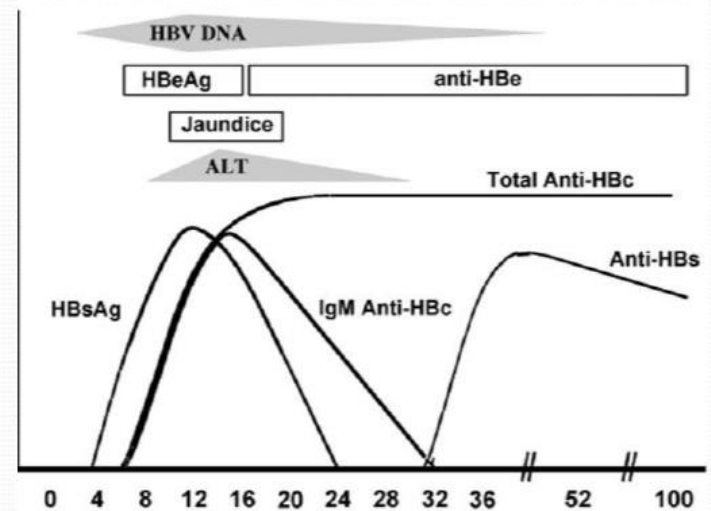
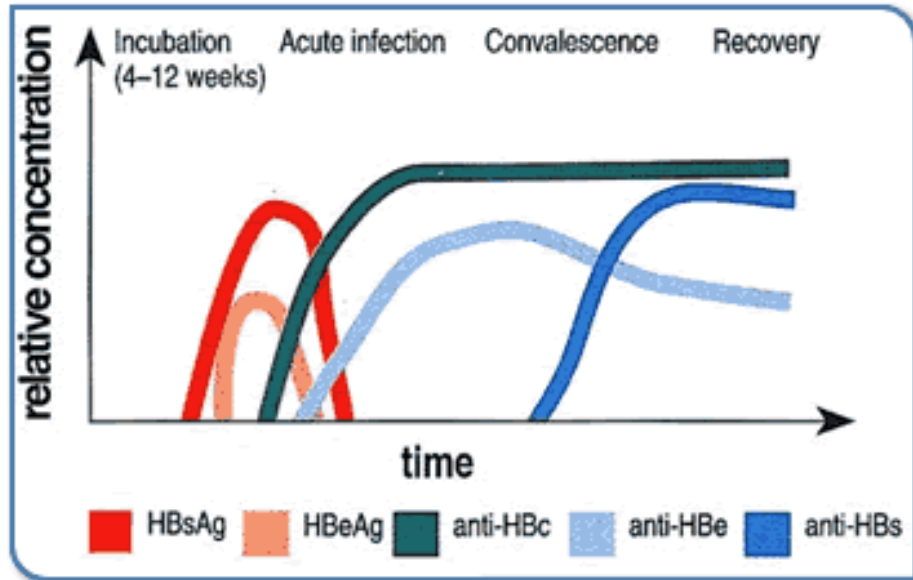
Yakın zamanda

- Kan transfüzyonu
  - İmmunglobulin uyg.
  - Anneden, bebeğe
- 
- Pasif transfer

# Hepatit B Virusu

- HBs Ag → HBV infeksiyonu
- HBe Ag
- Anti-HBe
- Anti-HBc IgM → Akut /yeni geçirilmiş infeksiyon, pencere döneminde HBs Ag, Anti-HBs negatifken
- Anti-HBc → Akut, kronik, geçirilmiş
- Anti-HBs → HBV'ye karşı bağışıklık (doğal / aşı)
- HBV DNA

- HBs Ag'nin varlığı, virion replikasyonu ile eş anlamlı değildir.
- HBs Ag, klinik belirtiler ortaya çıkmadan önce serumda saptanır.
- Serumda saptandıktan 4 hafta sonra klinik hepatit tablosu ortaya çıkar.
- Belirtilerle birlikte HBe Ag, DNA polimeraz ve HBV-DNA saptanabilir.
- HBs Ag , akut viral hepatit B olgularında 2-6 ay içinde kaybolur ve antikor saptanıncaya kadar pencere dönemi oluşur.
- Bu pencere döneminden sonra anti-HBs antikorları pozitif olarak saptanmaya başlar.
- Akut infeksiyon geçiren kişide, altı aydan daha fazla HBs Ag varlığı devam ediyorsa, hastalığın kronikleşmesi söz konusudur.



# Akut Hepatit B

- HBs Ag virusa ait ilk saptanan antijen
- HBV ile temastan 6-12 hafta sonra HBs Ag ve HBe Ag ortaya çıkmasıyla primer HBV infeksiyonu serolojik olarak belirlenebilir.
- Virusla temastan ortalama 10 hafta sonra klinik belirtiler ortaya çıkar.
- Bu dönemde enzim yüksekliği saptanır.
- AntiHBc IgM antikoru saptanır.

- HBsAg'nin ortaya çıkmasından kısa süre sonra HBeAg ortaya çıkar.
- HBeAg nin varlığı; bulaşıcılık, infektivite ve viral replikasyon ile ilişkili
- İyileşen olgularda birkaç hafta içinde kaybolur.
- HBeAg kaybolunca antiHBe belirir ve yıllarca pozitif kalır.
- Akut hepatit B'de HBeAg ve antiHBe'nin her ikisinin negatif olduğu pencere dönemi görülebilir.
- HBeAg ve anti Hbe aynı anda pozitif olabilir.

- HBc Ag serumda saptamak güç
- AntiHBc IgM akut infeksiyonda, akut infeksiyonun pencere döneminde saptanır.
- AntiHBc IgM antikoru kronik HBV infeksiyonunun akut alevlenmeleri sırasında da pozitif bulunabilir.
- AntiHBc IgM düzeyi 12-48 hafta içinde düşerken antiHBc IgG düzeyi yükselir ve ömür boyu serumda kalabilir.
- AntiHBc IgG ve AntiHBs antikorlarının beraber saptanması hastalığın geçirildiğinin ve bağışıklık oluştuğunun göstergesidir.

# İnaktif HBs Ag Taşıyıcılığı

- HBsAg (+) 6 aydan uzun süreli
- HBe Ag (-) / Anti Hbe (+)
- HBV DNA < 2000 IU/ ml
- ALT ve AST düzeyi sürekli olarak normal
- Karaciğer biyopsisinde hepatite özgü bulguların görülmemesi



# Kronik Hepatit B

- Kronik Hepatit B infeksiyonu, HBV yüzey antijeni(HBs Ag)'nin en az 6 ay serumda saptanması olarak tanımlanır.
- Kronik HBV infeksiyonunun tanısı, serumda HBV infeksiyonunun serolojik ve virolojik göstergeleri ile karaciğer hastalığının biyokimyasal ve histolojik göstergelerinin birlikte değerlendirilmesi esasına dayanır.

- HBsAg (+) >6 aydan uzun süreli
- HBeAg pozitif hastalarda serum HBV DNA > 20.000 IU/mL
- HBeAg negatif hastalarda HBV DNA > 2000 IU/mL olması
- Kalıcı veya aralıklı ALT / AST yüksekliği
- Karaciğer biyopsisi: Orta yada ileri düzeyde nekroz ve enflamasyonun gözlendiği kronik hepatit

# Kronik infeksiyon ve HBe Ag

- Vertikal infeksiyon sonrası immüntoleran dönemde HBeAg pozitif ve HBV DNA yüksektir (genellikle milyon üniteler).
- 1-4 dekat sonra gelişen immünaktif fazın akabinde HBeAg serokonversiyonu olur (HBeAg negatifleşir, antiHBe oluşur), HBV DNA düşer.
- Antiviral tedavi HBeAg serokonversiyon oranını arttırabilir.

- C geni 2 polipeptidi kodlar. Translasyon gendeki ilk AUGden başlarsa 25 kd'luk bir prekür protein olan HBeAg oluşur ve seruma sekrete edilir.
- Translasyon gendeki ikinci AUGden başlarsa HBcAg oluşur, bu kana sekrete edilmez.
- HBcAg ile HBeAg'nin büyük bir aa benzerliği vardır .
- Bu iki antijen serolojik olarak farklı antikörlerin üretimine yol açarken bunların TH veya sitotoksik T hücreler tarafından tanınmasında kros reaksiyon olabilir.

# Okült (Gizli)HBV İnfeksiyonu

- HBs Ag negatif olguda HBV DNA'nın pozitif olmasıdır.
- HBV DNA <2000 IU/ml (dalgalanmalar gösterir)
- Nedenleri; S gen mutasyonu, HBV içeren kompleksler, konak yanıtında azalma, koinfeksiyon

| Serolojik Test | Duyarlı | HBV Aşısı | Akut HBV | İyileşmiş HBV | Kronik HBV                     | İnaktif HBsAg taşıyıcılığı     | Okült HBV                      |
|----------------|---------|-----------|----------|---------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| HBs Ag         | -       | -         | +        | -             | +                              | +                              | -                              |
| Anti-HBs       | -       | +         | -        | +             | -                              | -                              | +/-                            |
| Anti-HBc       | -       | -         | +        | +             | +                              | +                              | -/+                            |
| Anti-HBc IgM   | -       | -         | +        | -             | -                              | -                              | -                              |
| Anti-HBe       | -       | -         | -        | +             | -/+                            | +                              | -/+                            |
| HBe Ag         | -       | -         | +        | -             | -/+                            | -                              | -/+                            |
| HBV DNA        | -       | -         | +        | -             | +<br>>10 <sup>5</sup><br>kopya | +<br><10 <sup>4</sup><br>kopya | +<br><10 <sup>3</sup><br>kopya |

# Hepatit B virüsü

## Serolojik tanı problemleri

- İstenilen parametreler açısından uygunsuz zamanlama ve sıklık
- Sonuçların yorumlanmasından kaynaklanan hatalar
- Uyumsuz ya da alışılmadık dışı serolojik profiller
  - laboratuvar
  - mutant virüs
  - konak faktörü

# Atipik profil saptandığında...

- Testlerin aynı örnek ile tekrarı
- Yeni bir örnekte testlerin tekrarı
- Farklı bir kit ile testlerin tekrarı
- Gereğinde HBV DNA



# Tek başına HBs Ag pozitifliği

- Akut HBV infeksiyonunun başlangıç döneminde (ilk 10 gün)
- HBs Ag pozitif transfüzyon yapılanlarda
- Anti HBc cevabı gelişemeyen kronik HBV infeksiyonu
- Kite bağlı yalancı pozitiflik
- Örneğe bağlı kontaminasyon
- Küçük çocuklarda; yüksek doz hepatit B aşısını takiben antijenemi
- HBV-S mutantları

# Tek başına Anti HBs pozitifliği

- Aşı
- Hepatit B hiperimmunglobulini
- Kan ve kan ürünleri
- Anneden bebeğe pasif geçiş

# HBsAg ve AntiHBs'in birlikte pozitifliği

- HBV'nin kılıf proteini mutasyonları sonucu, mutant virüsle ikinci kez infeksiyon
- Deney şartlarında HBsAg-AntiHBs'nin disosiye olması
- İmmunyetmezlikli hasta grubunda
- Hbs Ag pozitifliği bilinmeden aşı yapılanlarda
- Farklı suşlarla infekte olanlarda

# Tek başına Anti HBc pozitifliği

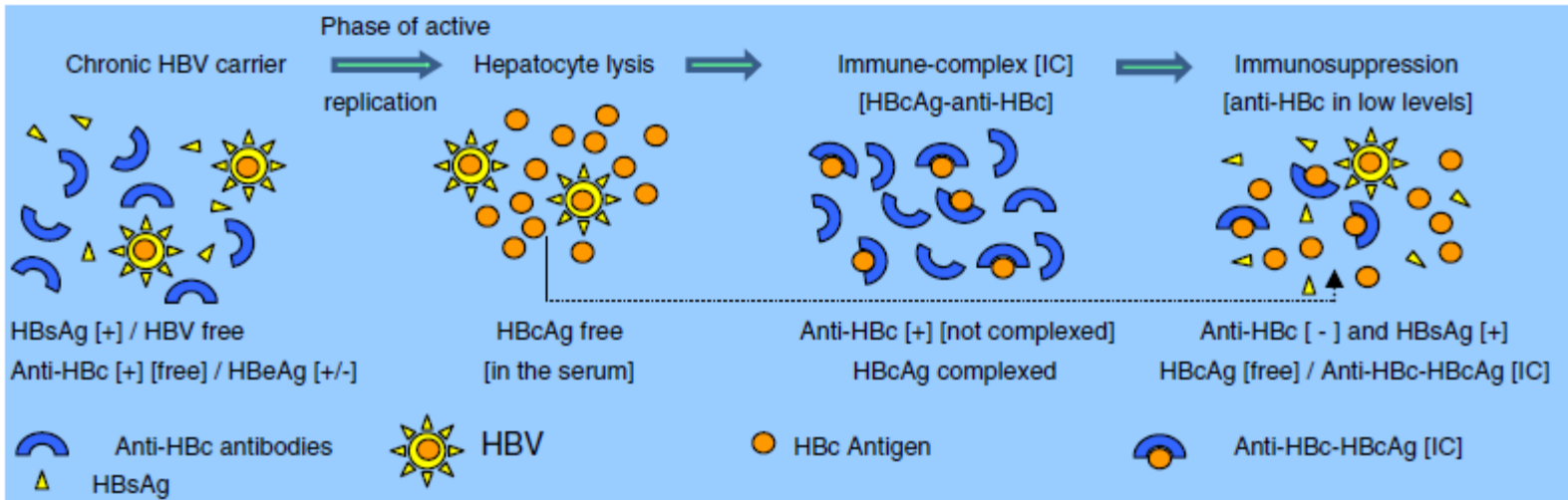
- İzole antiHBc sıklığı çeşitli toplumlarda % 0,1-20 arasında değişmektedir (ülkemizde %3-5)
- Akut HBV infeksiyonunun iyileşmesi (HBs Ag kaybolmuştur, ancak anti-HBs henüz oluşmamıştır (pencere dönemi))
- Kronik HBV infeksiyonu (HBs Ag'nin saptanamayacak düzeyde var olduğu )
- Ditiyotritol, sistein, sodyum metasülfid gibi indirgeyici maddeler kullanımı sonucunda kaybolan ve IgM yapısındaki maddelerin neden olduğu çapraz reaksiyon nedeniyle gelişen ya da tanısal sistemlerden kaynaklanan teknik hatalar sonucu yalancı pozitiflik (%1-2) olabilir.
- Kan ve kan ürünleri transfüzyonu
- Anneden bebeğe pasif geçen antikörlerle

- HBV antijenlerine karşı humoral yanıtta bir bozukluk olması ve diğer antikorların oluşamaması
- Anti-HBs'nin zaman içinde kaybolmuş olması; ya da özellikle diyabetliler ile böbrek hastalarında sık görülen bir durum olan anti-HBs oluşturamama
- HCV ve HIV infeksiyonları sırasında
- HDV infeksiyonları sırasında HBsAg'nin negatifleşmesi
- Düşük düzey taşıyıcılık
- Escape mutantlar

# Anti-HBc yokluğunda HBsAg ve HBV DNA pozitifliği

- Normalde inkübasyon döneminde görülebilen bir profildir. Takip edilirse diğer belirteçler de ortaya çıkar.
- Kronik infeksiyonda HBs Ag ve HBV DNA temizlense bile anti-HBc antikorlarının varlığı devam eder.
- HBV kor antijenine spesifik immünotolerans vardır .
- HBV kor antijenine immünotolerans T hücre anerjisi, spesifik periferal T lenfosit sayısındaki azlık, antijen sunan hücrelerin etkin antijen sunamaması veya lenfokin üretememesi gibi immün yanıtta sorunlardan kaynaklanabilir.
- Anti-HBc antikoru üretimini engelleyen ya da anti-HBc yanıtına yol açmayan HBc Ag üretimi yapan bir mutant suşla infeksiyon vardır.
- Kor geninde nukleotid delesyonu taşıyan bir HBV mutantıyla infeksiyon

- Kronik infeksiyonda HBsAg pozitif iken AntiHBc negatif olmasının bir diğer nedeni serumda HBcAg-antiHBc komplekslerinin oluşumudur. İmmün komplekslerin içindeki antiHBc ticari testlerle tesbit edilemez.
- HBcAg normalde serumda bulunmaz, ya KC hücreleri içinde ya da serumda HBV partikülleri içindedir.
- İmmünsupresyonlu hastada aktif replikasyon olursa hepatosit nekrozu sonucu HBcAg seruma aşırı miktarda karışabilir ve Anti-HBc ile kompleks oluşturur.



- HBe Ag pozitif anneden doğan infantlarda anti HBc negatif olabilir.
- HBc Ag ve HBe Ag farklı antikolarla tanınmalarına karşın, T hücre düzeyinde bunlar birbirine yakın antijenlerdir ve kros reaksiyon olabilir.
- HBe Ag küçük bir molekül olduğu için plasentayı geçer ve HBeAg/HBcAg spesifik Th hücre toleransı nedeniyle hem HBe Ag hem de HBcAg'e karşı fetal immüntolerans oluşur.



# HBe Ag ve Anti-HBe'nin birlikte pozitifliği

- Akut viral hepatit B'de kısa süreli de olsa Hbe Ag ve Anti-HBe birlikte pozitif saptanabilir. HBe Ag'nin azalmaya, anti-HBe'nin artmaya başladığı bir dönemde bu profilin görülebilir.
- HBe Ag üretimini bozan mutasyonlar olan prekor ve/veya bazal kor promoter mutasyonları HBe Ag üretimini azaltmış olabilir.
- Vahşi ve mutant virüsle eş zamanlı infeksiyonlar
- HBeAg ve anti-HBe immün komplekslerinin test koşullarında disosiye olarak ayrı ayrı saptanması
- HBeAg pozitif kabul edilebilir ancak HBe durumundaki deđişikliđi görmek için 3 ay içinde test tekrar edilmelidir.

# HBe Ag ve Anti-Hbe'nin birlikte negatifliđi

- Çok sık görülmemekle birlikte genellikle tedavi esnasında e serokonversiyonu yani antijen kaybolup antikor ortaya çıkarken görülebilmektedir.
- Serokonversiyon veya yeniden e antijeninin ortaya çıkışı ile sonuçlanır.

# HBV DNA

- Hastalığın doğal seyrini izlemede, prognozun belirlenmesinde
- Tedavi seçeneğine karar vermede
- Tedavi etkinliğinin izlenmesi
- Direncin öngörülmesinde
- Okült (gizli) HBV enfeksiyonu tanısında
- Mutant virus tanısında
- HBV DNA'nın gösterilmesi için moleküler teknikler gerekmektedir. Hibridizasyon temelli testler artık az kullanılmakta, amplifikasyon teknikleri (PCR, RT PCR, TMA) daha sık kullanılmaktadır.

# Moleküler Tanı Testleri

Moleküler testlerin kullanım amacı;

- Viral yük tayini
- Direnç mutasyonlarının saptanması
- Genotip belirlenmesi, kor, promoter, prekor veya S antijen mutasyonlarının belirlenmesi şeklinde sıralanabilir.

# Hibridizasyon Yöntemleri

- Hibridizasyon, birbirine uyumlu şifreye sahip iki molekülün özgül olarak birleşmesi anlamına gelir.
- Hibridizasyon yöntemlerinde, DNA veya RNA'dan oluşturulmuş, çeşitli enzimler, antijenler, kemiluminesan bileşikler ya da radyoizotoplarla işaretlenmiş ve aranan hedef nükleik aside özgüllükle bağlanan dizilere sahip problemler kullanılır.

# Nükleik Asit Amplifikasyon Yöntemleri (PCR)

- PCR ( Polymerase Chain Reaction = Polimeraz zincir reaksiyonu) bilinen en eski amplifikasyon yöntemlerinden birisidir.
- Bu yöntem in vitro olarak DNA'nın hedef bölgesinin çoğaltılması ve çoğaltılan bölgenin jel elektroforezinde yürütülerek saptanmasıdır.
- “Home made PCR” tabir edilen ve her laboratuvarın kendi ürettiği “primer”lerle yapılan analizlerde ortaya çıkan yüksek interassay varyasyonlar, sertifikeli olmuş otomatize sistemlerle minimize edilmiştir.
- HBV DNA'nın belirlenmesinde en özgül ve en duyarlı yöntem PCR yöntemidir.
- Bu yöntemle çok düşük miktarlarda HBV DNA 10-50 kopya/mL tespit edilebilmektedir.

- Serum HBV DNA düzeyleri karşılaştırılabilir olması için IU/ml ile ifade edilmelidir, antiviral etkinliği değerlendirmek için aynı hastada aynı tayin kullanılmalıdır.
- İzolasyon sistemine göre alt sınır ve ölçüm aralığı değişebilmektedir.
- Kantitasyon alt sınırı en az 60 IU/ml, mümkünse 10-15 IU/ml olmalıdır.

Kantitatif HBV DNA testinden beklentiler ;

- Yüksek analitik duyarlılık (klinik anlamı değerlendirilerek)
- Geniş dinamik aralık (2 – 8 log<sub>10</sub> kopya/ml)
- Yüksek tekrarlanabilirlik (farklı çalışmalarda <1 log fark olmalı)
- Genotipler arası etkinlik farkı olmaması
- Standardizasyon
- Yöntemlerin sonuçlarının karşılaştırılabilir olması



# Hepatit C Virusu

- Anti-HCV; tarama testi (EİA)
- HCV RNA; kantitatif (viral yük)

|          | Akut HCV                                        | Kronik HCV | Geçirilmiş İnfeksiyon                                        |
|----------|-------------------------------------------------|------------|--------------------------------------------------------------|
| Anti-HCV | Negatif (6-12 haftada pozitifleşir)             | Pozitif    | Pozitif                                                      |
| HCV RNA  | 1-2 hafta içinde pozitifleşir, yüksek viral yük | Pozitif    | Negatif (geçirilmiş infeksiyon demek için 3 ay sonra tekrar) |

# Anti-HCV

- İnfeksiyon olduğunu gösterir, akut/kronik/iyileşmiş olduğunu göstermez.
- Bulaşmadan sonraki 15 hafta içinde hastaların %80'inde ELİSA ile anti HCV saptanır, ELİSA Anti-HCV pozitiflikleri RİBA ile doğrulanmalıdır.

# HCV RNA

- Tedaviye karar vermede
- Tedavi sonrası izlemde ve kalıcı virolojik cevap göstergesi olarak
- Anti-HCV oluşmadan (serokonversiyon) önce
- Saptanabilir düzeyde antikor geliştiremeyenlerde (hemodiyaliz hastaları, immünyetmezlikli hastalar)
- Yenidoğanlarda

## Kalitatif testler (RT-PCR)

- Virusu bulaşmadan sonraki 1 hafta içinde saptar, tek bir test negatif sonucu yeterli sayılmaz, tedavi altındaki hastaların takibinde kullanılır.

## Kantitatif testler(PCR,RT-PCR veya DNA):

- HCV RNA miktarını saptarlar.
- Kalitatif HCV RNA'dan daha az duyarlıdırlar
- Tedaviye cevabın değerlendirilmesinde kullanılır.

# HDV İnfeksiyonu

- HBs Ag taşıyıcısı olgularda çıkar.
- **DELTA KOİNFEKSİYONU:**  
HBs Ag (+), Anti HBc IgM(+), Anti delta(+)
- **DELTA SUPERİNFEKSİYONU:**  
HBs Ag (+), Anti HBc IgM(-), Anti delta(+)

- **HBs Ag(-), Anti delta (+)**  
İyileşmiş infeksiyon  
HBs Ag sentezinin baskılanması
- **Anti HDV(+), HDV RNA(-)**  
İyileşmiş infeksiyon  
Yalancı negatiflik  
Latent infeksiyon

# Hepatit E Virusu

- Tanı metotları direkt ve indirekt olarak ikiye ayrılır.
- Direkt yöntemde, immün-elektron mikroskopi veya RT-PCR ile dışkı ve kan örneklerinde virus, viral proteinler veya nükleik asit aranır.
- İndirekt yöntemde ise anti-HEV IgM ve IgG antikorları aranır.
- Anti-HEV IgM pozitifliği akut infeksiyonu düşündürür.
- IgG varlığı ise virusa maruziyeti gösterir.
- Anti-HEV IgM sarılık başladıktan 4 gün sonra saptanabilir ve 3-5 ay kanda kalır.
- IgM ortaya çıkışından kısa bir süre sonra IgG tipi antikorlar oluşur.
- 4. Hafta civarında pik yapar ve infeskiyondan 1-14 yıl sonrasına dek saptanabilir.

**Teşekkür ederim...**