

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

Dr. Ali Acar

Dışkapı Yıldırım Beyazıt
Eğitim ve Araştırma Hastanesi

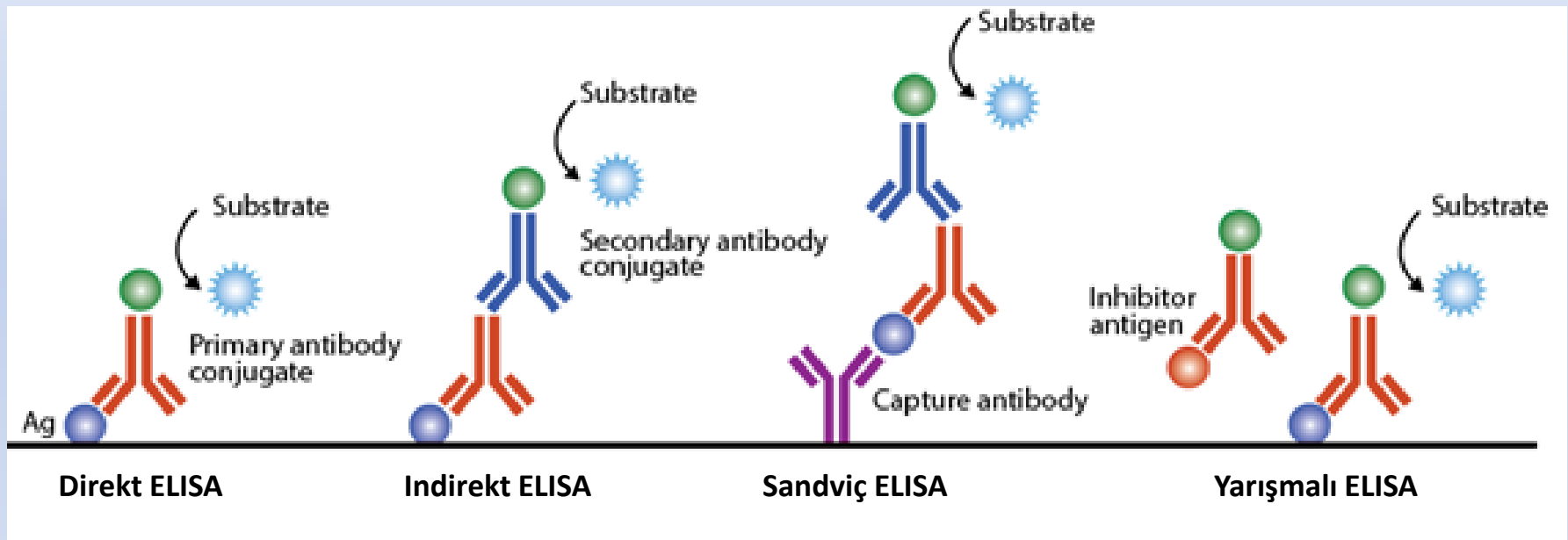
Viral Hepatit Etkenleri

	A	B	C	D	E
Aile	Picornaviridae	Hepadnaviridae	Flaviviridae	Tanımlanmamış	Hepeviridae
Cins	Hepatovirus	Ortohepadnavirus	Hepacivirus	Deltavirus	Hepevirus
Nükleik Asit	RNA	DNA	RNA	RNA	RNA
İnkübasyon süresi	15-48 (30)	30-180 (60-90)	15-160 (50)	30-180 (60-90)	14-60 (40)
Bulaş yolu					
Fekal-oral	Evet	Hayır	Hayır	Hayır	Evet
Seksüel	Muhtemel	Evet	Nadir	Evet	Hayır
Kan	Nadir	Evet	Evet	Evet	Hayır !
Kronik İnfeksiyon	Hayır	Evet	Evet	Evet	Evet
Siroz ve HSK	Hayır	Evet	Evet	Evet	Hayır!

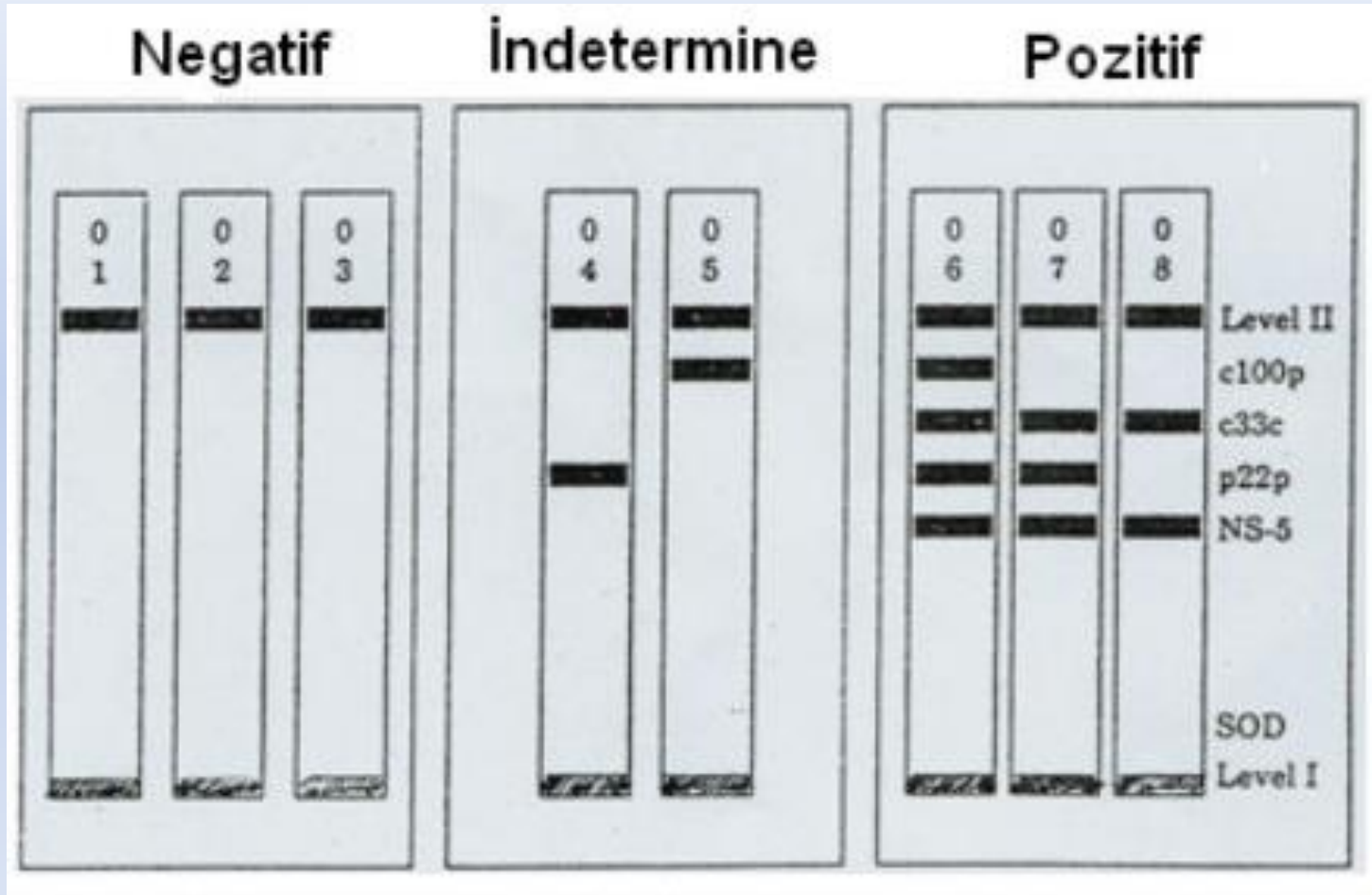
İmmünolojik testler

- **İşaretli immüntestler**
 - İmmünofloresan (IFA)
 - Enzim immünoassay (EIA)
 - Radioimmünoassay (RIA)
 - Kemiluminesans immünoassay (CLIA)
- **İmmün blot testleri**
 - RIBA
 - LIA

ELISA



Immunoblot



Moleküler Testler

- **Prob Hibridizasyon**
 - Southern blot hibridizasyon
 - Northern blot hibridizasyon
 - Dot blot hibridizasyon
 - İn situ hibridizasyon

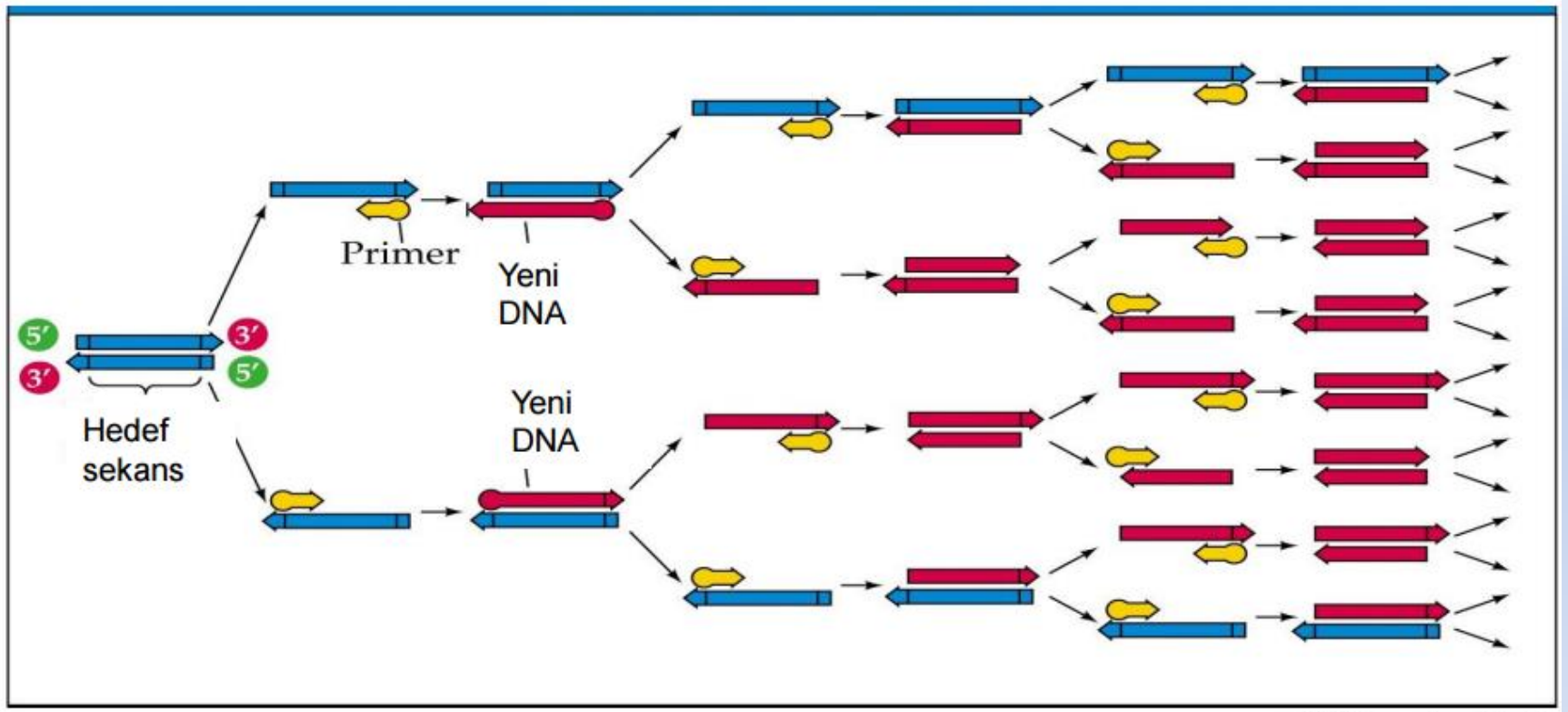
Moleküler Testler

- Amplifikasyona Dayalı Testler
 - Sinyal amplifikasyon
 - bDNA (HBV,HCV,HIV)
 - Hedef amplifikasyon
 - PCR
 - RT-PCR
 - Real-time PCR
 - NASBA
 - TMA
 - Prob amplifikasyon
 - Ligaz zincir reaksiyonu
 - Siklusa katılan prob tekniği

Moleküler Testler

- Gelişmiş test yöntemleri
 - Loop aracılı amplifikasyon (LAMP)
 - Biyosensor temelli testler
 - Mikroarray
 - Multipleks mikrokürecik yöntemi

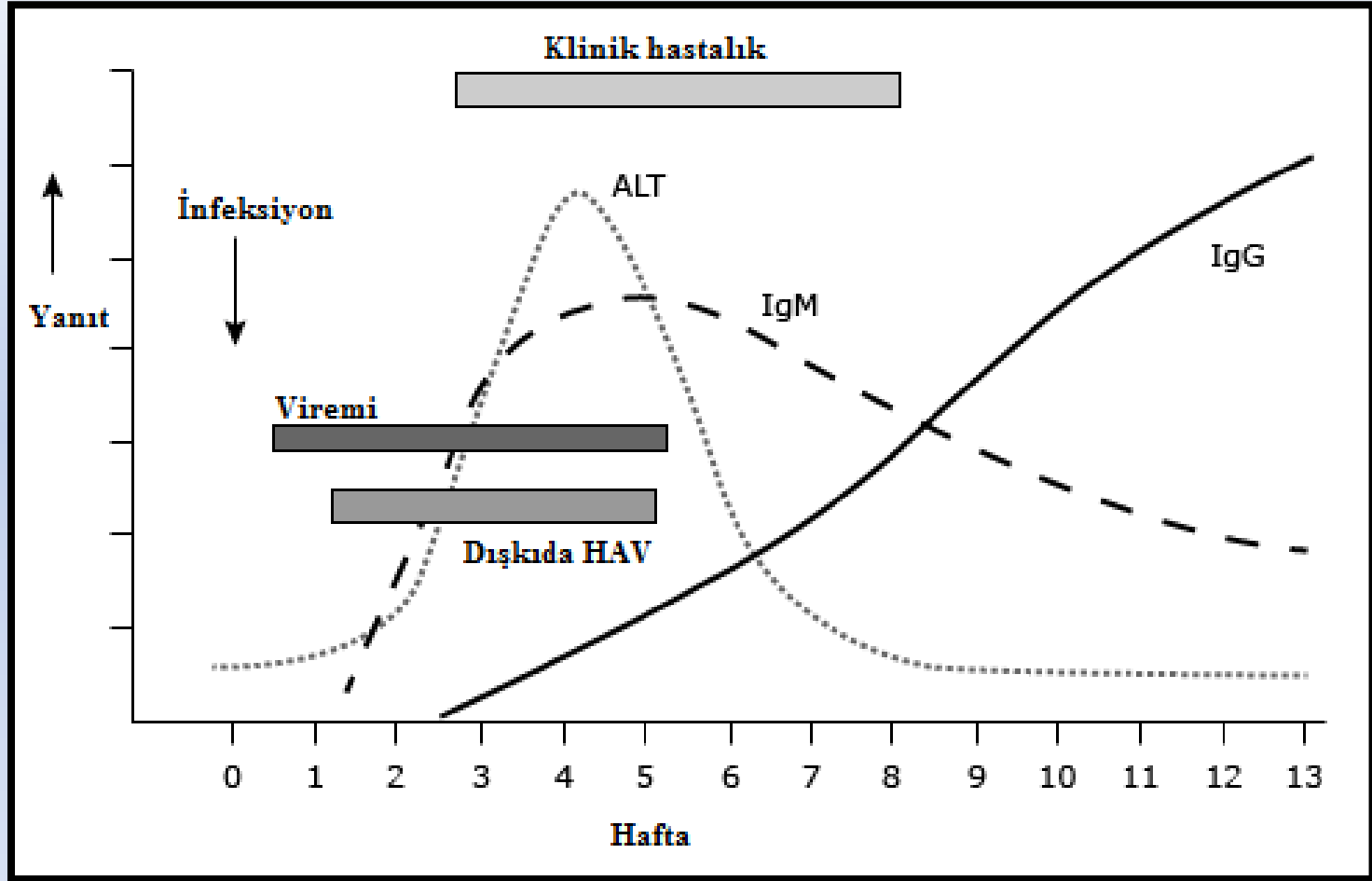
Hedef amplifikasyon: PCR

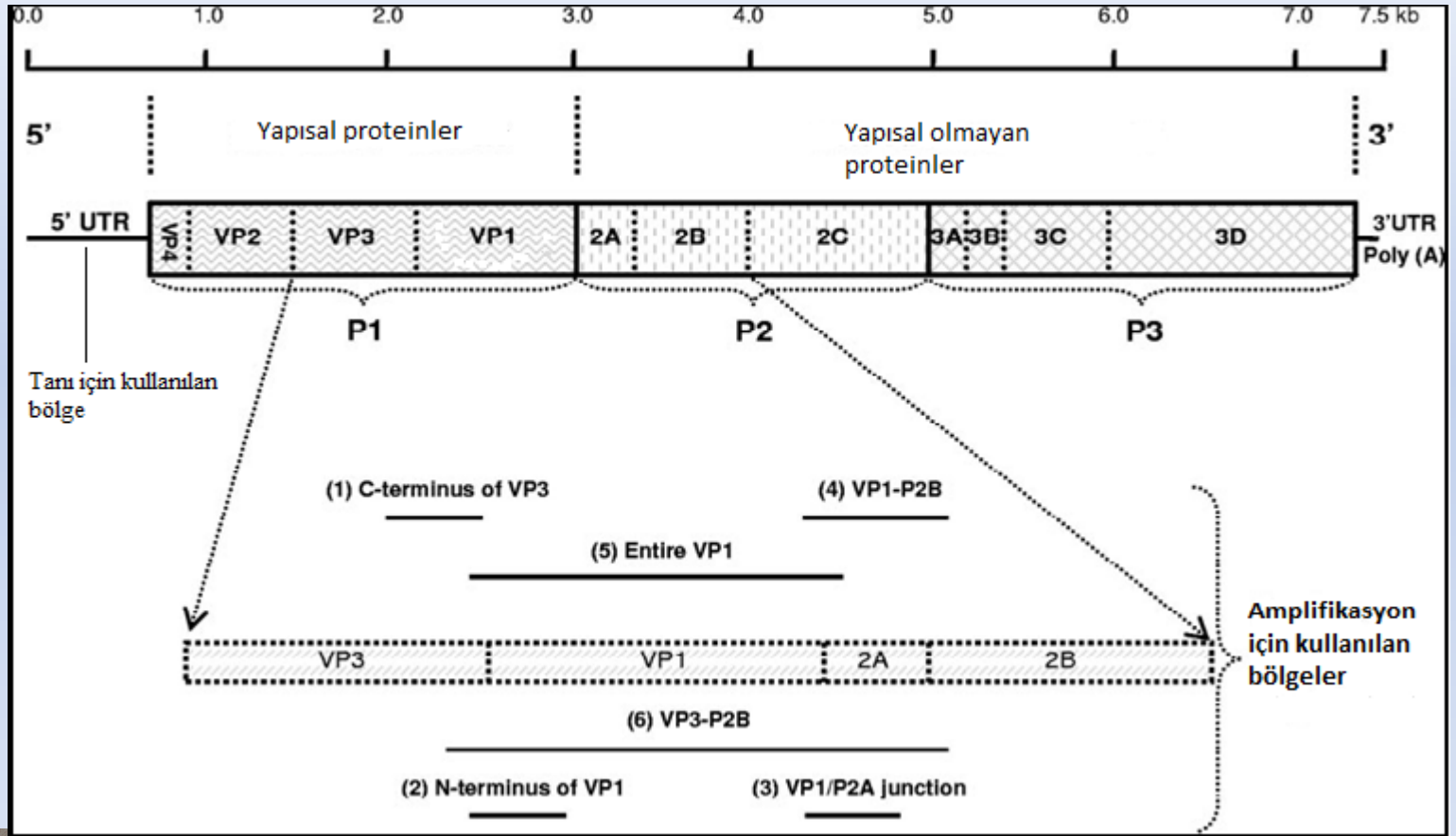


Atipik seroloji

- **Laboratuvar kaynaklı**
 - Örneğin alınması, saklanması, transportu
 - Tanı kitlerinde yetersizlikler
 - Test yapımı esnasındaki hatalar
- **Etken kaynaklı**
 - Çoklu virüs enfeksiyonu
 - Mutant virüsler
- **Konak kaynaklı**
 - Antikor yanıtında yetersizlik, cevapsızlık
 - Pasif antikor geçişi

Hepatit A





Tanı

- **ELISA anti-HAV IgM**
 - Duyarlılık ve özgülük ~ %100
 - *Omana VN. Clin.Microbiol.Rev.2006*
- **Anti-HAV Total (Ig G,M,A)**
 - Semptomatik dönemde IgM ile birlikte
 - Geçirilmiş, bağışık
 - Aşı sonrası koruyucu immünite

Atipik seroloji

- Anti-HAV IgM negatifliği
- Tekrarlayan hepatit (relapsing hepatit);
 - %10-20, (RNA +) *Kassas AL. Acta Med Hung. 1994;50(1-2):93.*
 - Otoimmün hepatit ? (RNA-) *Fainboim L. Hepatology 2001;15:12-17*
- Klinik Semptomların yokluğunda IgM
 - Uzamış IgM pozitifliği
 - Yalancı pozitif
 - RF, ANA pozitifliği
 - Pasif Ab transferi :Kan transfüzyon, Ig tedavisi, transplesantal
 - Poliklonal B h aktivasyonuna neden olan hastalıklar
 - Asemptomatik enfeksiyon

**Akut hepatit kliniđi
ALT/AST yüksekliđi**

VAR

YOK

**ELISA
Anti-HAV IgM +
Anti-HAV IgG +/-**

**ELISA
Anti-HAV IgM -
Anti-HAV IgG +**

**ELISA
Anti-HAV IgM -
Anti-HAV IgG -**

**ELISA
Anti-HAV IgM -
Anti-HAV IgG +**

**ELISA
Anti-HAV IgM +
Anti-HAV IgG -/+**

Akut HAV

**Geçirilmiş HAV
Diđer etkenleri
arařtır**

**1-2 Hft. sonra
tekrarla
Diđer etkenleri
arařtır**

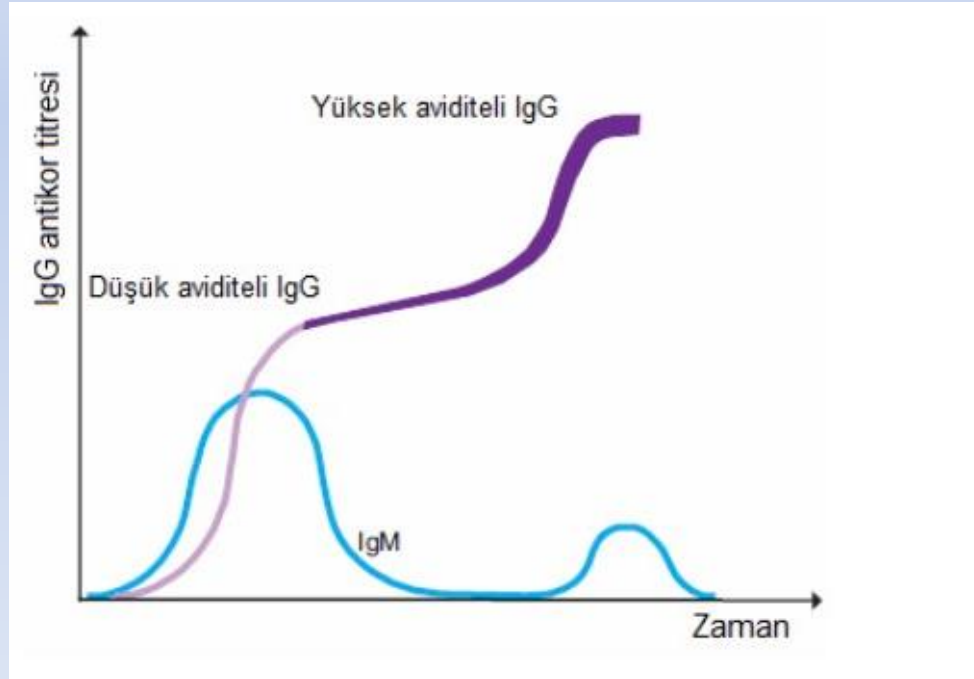
**Geçirilmiş HAV
İmmünizasyon**

**Asemptomatik
Uzamış HAV
Yalancı pozitif**

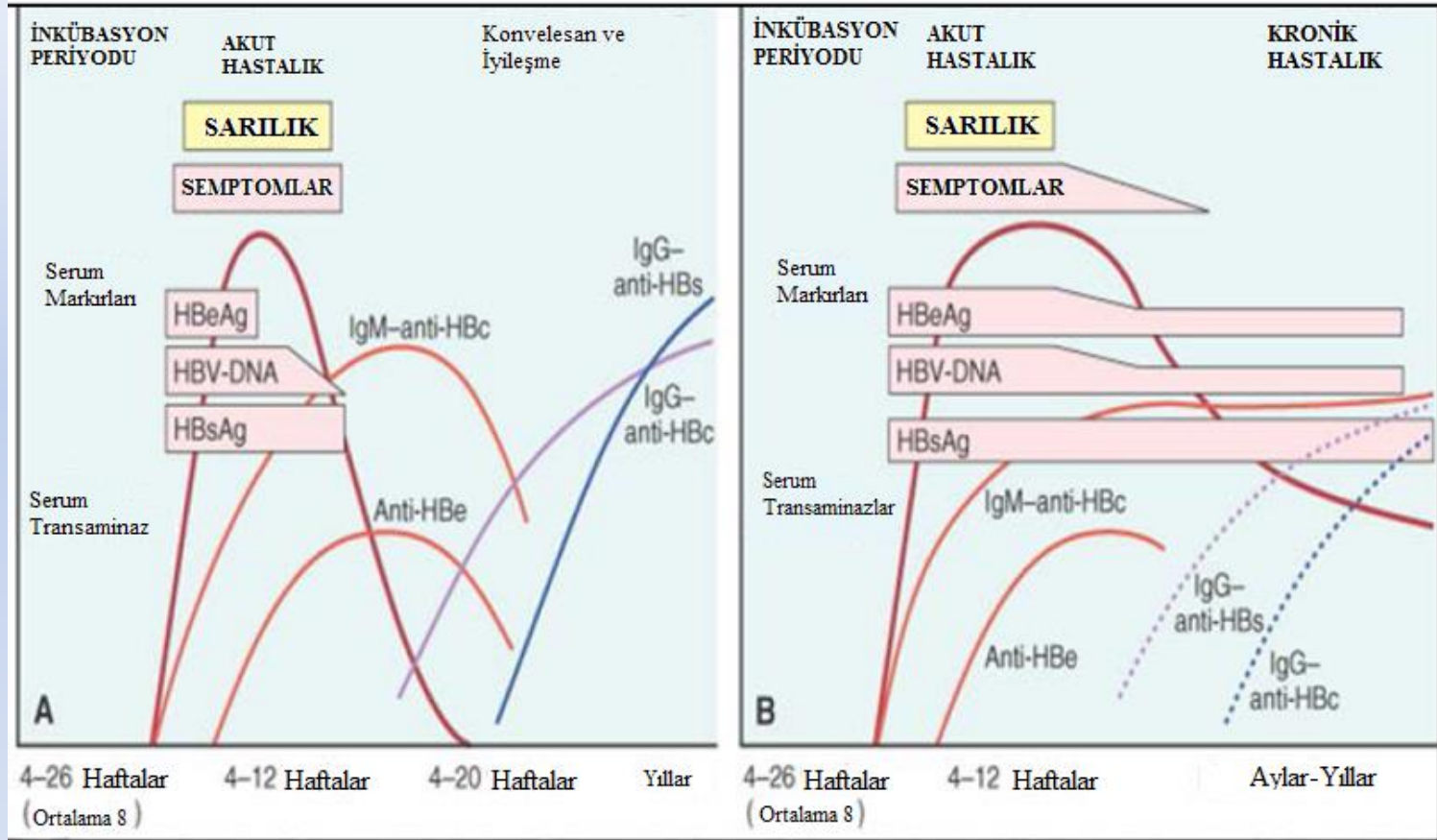
Anti-HAV IgG Avidite

- < %50 yeni infeksiyon < 1 ay
- > %70 eski infeksiyon > 2 ay

RoqueAfonso. Future Virology. 5(2):23342



Hepatit B

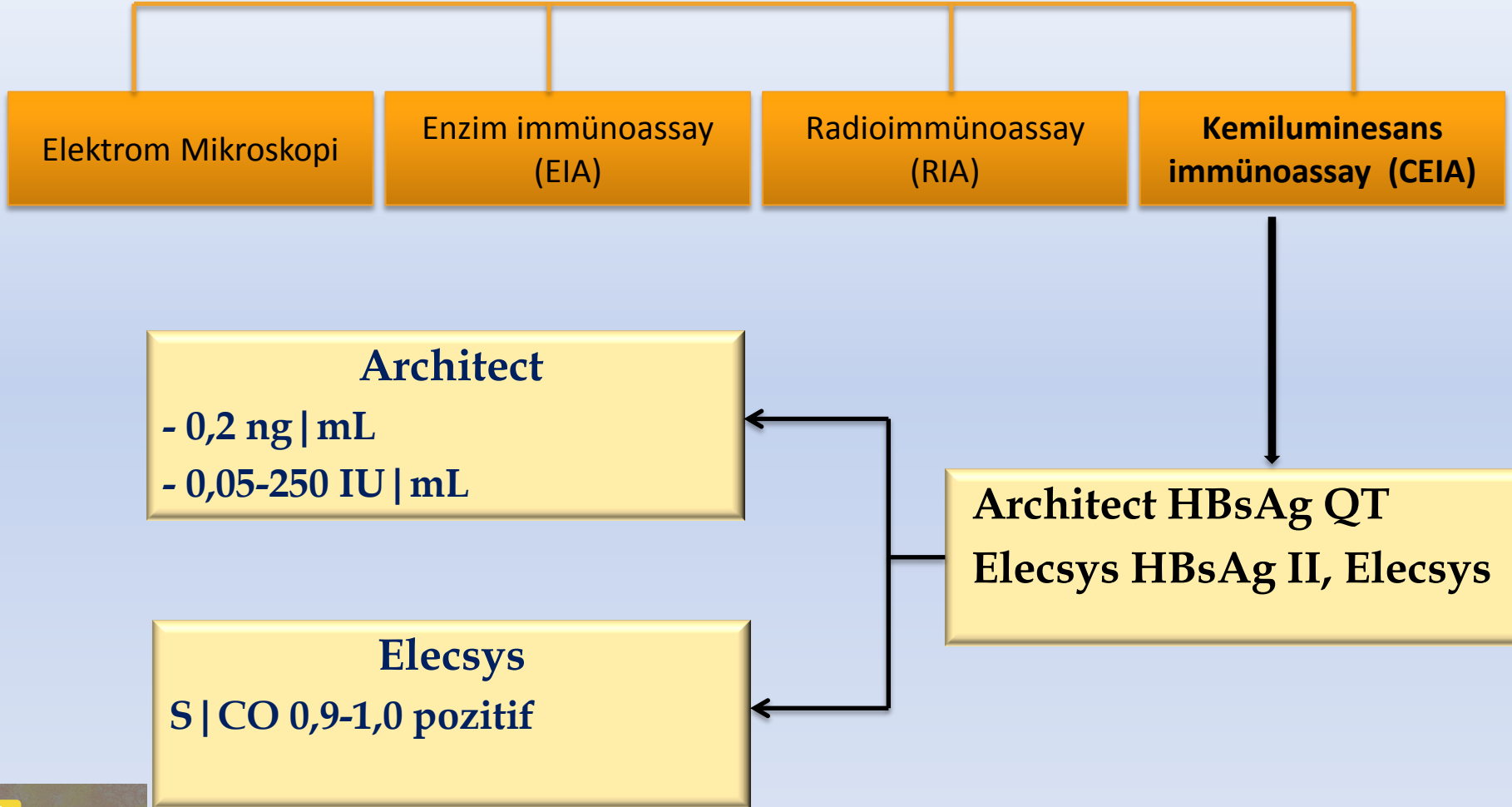


	HBs Ag	HBe Ag	Anti-HBe	Anti-HBc IgM	Anti-HBc	Anti-HBs
Duyarlı	-				-	-
Doğal Bağışık	-				+	+
Aşı ile bağışık	-				-	+
Akut Hepatit	+	+	-	+	+	-
Kronik hepatit	+	+/-	+/-	-	+	-
İzole HBc	-				+	-

Ticari HBV testleri

Firma	Test	Metot	Tarih
Abbott Diagnostics	ARCHITECT HBsAg Qualitative, HBsAg Qualitative Confirmatory, Core, Core IgM, AUSab,	Chemiluminescence Microparticle Immunoassay	2012
	AxSYM Core 2.0., Core M 2.0., HBsAg, HBsAg confirmatory,	Microparticle Enzyme Immunoassay	2004
Bio-Rad Laboratories	GS HBs Ag, MONOLISA Anti-HBc IgM, Anti-HBc, Anti-HBs	Enzyme Immunoassay	2007
Ortho Clinical Diagnostics	VITROS Anti-HBe, HBeAg, HBsAg, Anti-HBs, Anti-HBc,	Chemiluminescence Immunoassay	2001
Roche Diagnostics	Elecsys Anti-HBc, Anti-HBc IgM, HBsAg, Anti-HBs, HBeAg	Electrochemiluminescence Immunoassay	2010
Siemens Healthcare diagnostics	Advia Centaur Anti-HBe, Anti-HBs Anti-HBs-2, HBc IgM, HBc Total HBeAg, HBsAg, HBsAg Confirmatory	Chemiluminescence Immunoassay	2014
	IMMULITE Anti-HBs, Anti-HBc IgM, Anti-HBc Total , Anti-HBs Quantitative, HBsAg, HBsAg Confirmatory	Chemiluminescence Immunoassay	2002

Kantitatif HBsAg



Kantitatif HBsAg

- KHBV klinik fazı belirleme

- HBeAg +

- HBsAg >100 000 IU | mL immün tolerans
 - HBsAg >25000 IU | mL, %90 PPV minimal fibroz

Chan HLY. J Hepatol 2011

- HBeAg-

- HBsAg <1000 IU | mL ve DNA <2000 IU | mL
 - HSK riski düşük
 - İnaktif taşıyıcılık PPV %90
 - HBsAg <100 IU | mL
 - Spontan HBsAg klirensi yüksek
 - HBsAg >1000 IU | mL ve DNA >200IU | mL
 - Reaktivasyon

Brunetto MR.Gastroenterology 2010

Chan HLY. J Hepatol 2011

» %92 duyarlılık ve NPV %96

Michelle MP. Journal of clinical virology 2013



Kantitatif HBsAg

- Tedavi yanıtını öngörme

- IFN HBeAg +

- 12. hft HBsAg <1500 IU | mL

- %57 PPV HBeAg serokonversiyon, %17,6 HBsAg klirensi

- 12. hft HBsAg azalma olmaması,

- Tedaviye yanıt <%5 (genotip A ve D)

- 12. hft HBsAg >20 000 IU | mL

- Tedaviye yanıtı PPV %100 (genotip B ve C)

- IFN HBeAg-

- HBsAg azalma yok; %100 PPV tedaviye yanıtı

- Nükleozid | td analogları HBeAg +

- 12-24. hft HBsAg >1 log azalma HBsAg kaybı ile ilişkili

- Nükleozid | td analogları HBeAg -

HBsAg <100 IU | mL HBV DNA negatifleşen olgularda tedavi kesilebilir



Markus C. Journal of hepatology 2017

Dried Blood Spot Sampling for Hepatitis B Virus Serology and Molecular Testing

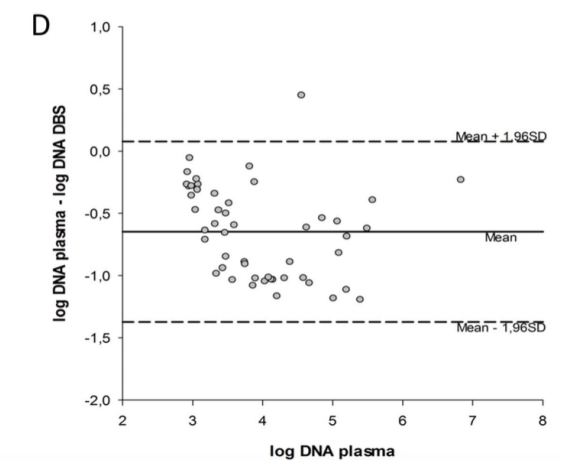
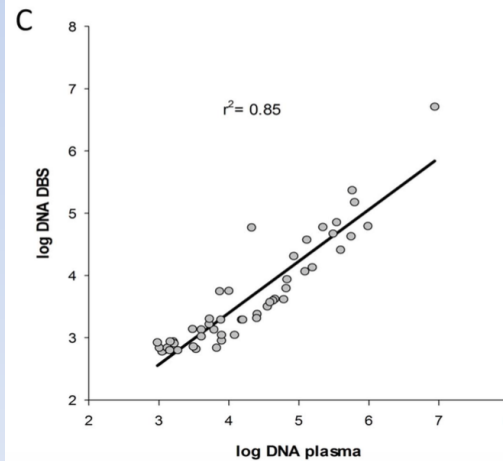
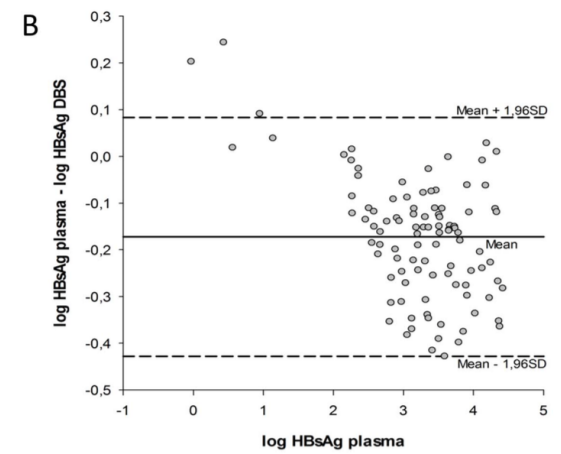
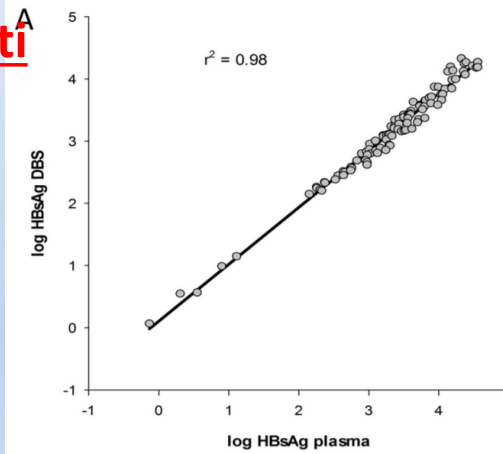
Plos ONE 2013

Sofiane Mohamed^{1,6}, Audrey Raimondo², Guillaume Pénaranda¹, Claire Camus¹, Denis Ouzan³, Sophie Ravet², Marc Bourlière⁴, Hacène Khiri¹, Patrick Dukan⁵, Daniel Olive⁶, Philippe Halfon^{1,5*}

HBsAg ve HBV DNA tespiti

Duyarlılık %98

Özgüllük %100



Atipik serolojik profiller

- **Izole HBsAg pozitifliği**
 - HBcAg karşı immüntolerans
 - HBcAg sentezlemeyen mutant virüs
- **Izole anti-HBs pozitifliği**
 - Okült HBV enfeksiyonu
 - Pasif Ab transferi
 - HBV aşısı

Roberio A. Eur J Clin Mic Inf Dis 2013

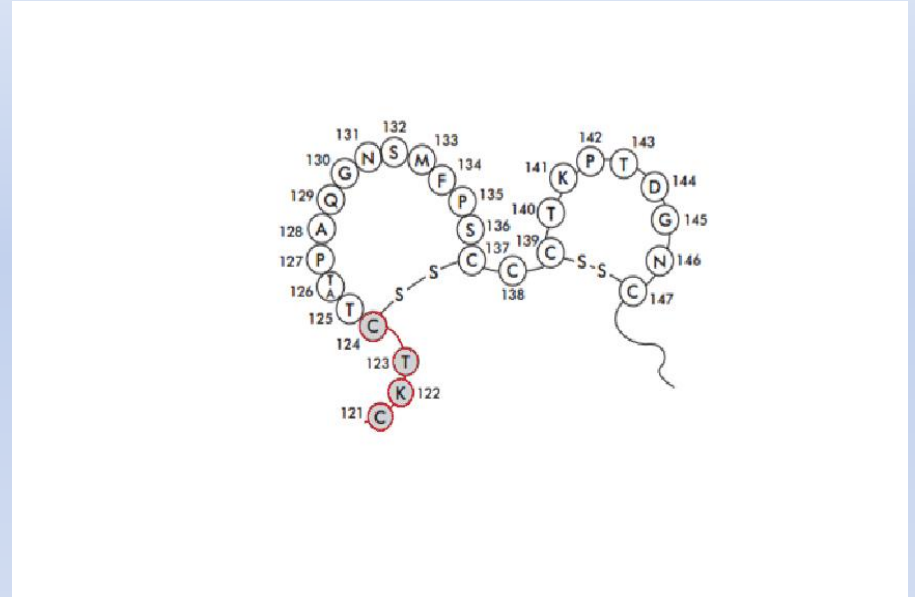
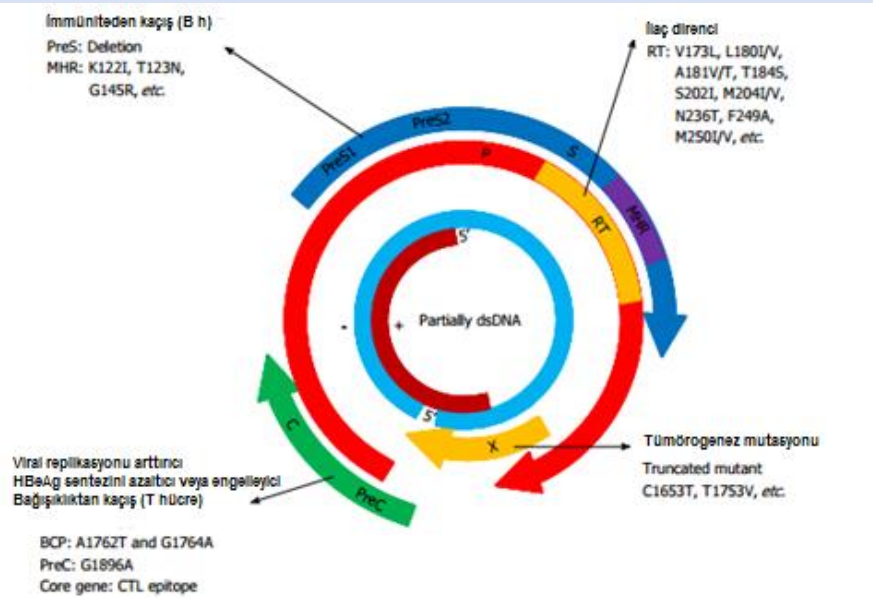
Atipik serolojik profiller

- İzole anti-HBc pozitifliği
 - Akut HBV pencere dönemi (IgM)
 - Okült HBV enfeksiyonu
 - HBsAg saptanamayacak kadar düşük
 - Immün baskılanma
 - Immün kompleksler, Ko-enfeksiyonlar
 - HBV ag.lerine yanıtızsızlık
 - Anti-HBs saptanamayacak seviyeye düşmesi

Roberio A. Eur J Clin Mic Inf Dis 2013

Atipik serolojik profiller

- HBsAg ve anti-HBs pozitifliği



Roberio A. Eur J Clin Mic Inf Dis 2013

Atipik serolojik profiller

- Aşı ve diagnostik testlerden kaçan ve prognozu etkileyen mutasyonlar

Aşıdan kaçış	HBSAg testinden kaçış	Prekor	EnhII/Bazal kor promoter
Asp144Ala	Thr126Ser	C1858T	T1753V
Gly145Arg	Gln129His	G1896A	A1762T
	Met133Leu	G1899A	G1764A
	Asp144Ala		C1766T
	Gly145Arg		T1868A

HBV-Moleküler tanı

- Sinyal amplifikasyon
 - Hibrid yakalama
 - bDNA
- Hedef amplifikasyon
 - PCR

Data S. World J Gastroenterol 2014
Chean CJ. JAMA 2006

HBV-Moleküler tanı

Metot	Ticari isim	Üretici firma	Tespit aralığı (IU mL)	Tespit sınırı (IU\mL)
Yarı otomatize qPCR	COBAS AmpliPrep COBAS Taqman HBV Test v2.0	Roche Molecular System, CL, USA	20-1,7x10 ⁷	20
Yarı otomatize RT-PCR	COBAS TagMan HBV Test	Roche Molecular System, CL, USA	29-1,1x10 ⁷	6
Otomatize RT-PCR	Abbott RT HBV	Abbott Diagnostic	10-1x10 ⁹	10
Dallanmış DNA	VERSANT HBV 3,0	Siemens Healthcare	2000-1x10 ⁸	2000

HBV Genotip tanımlama

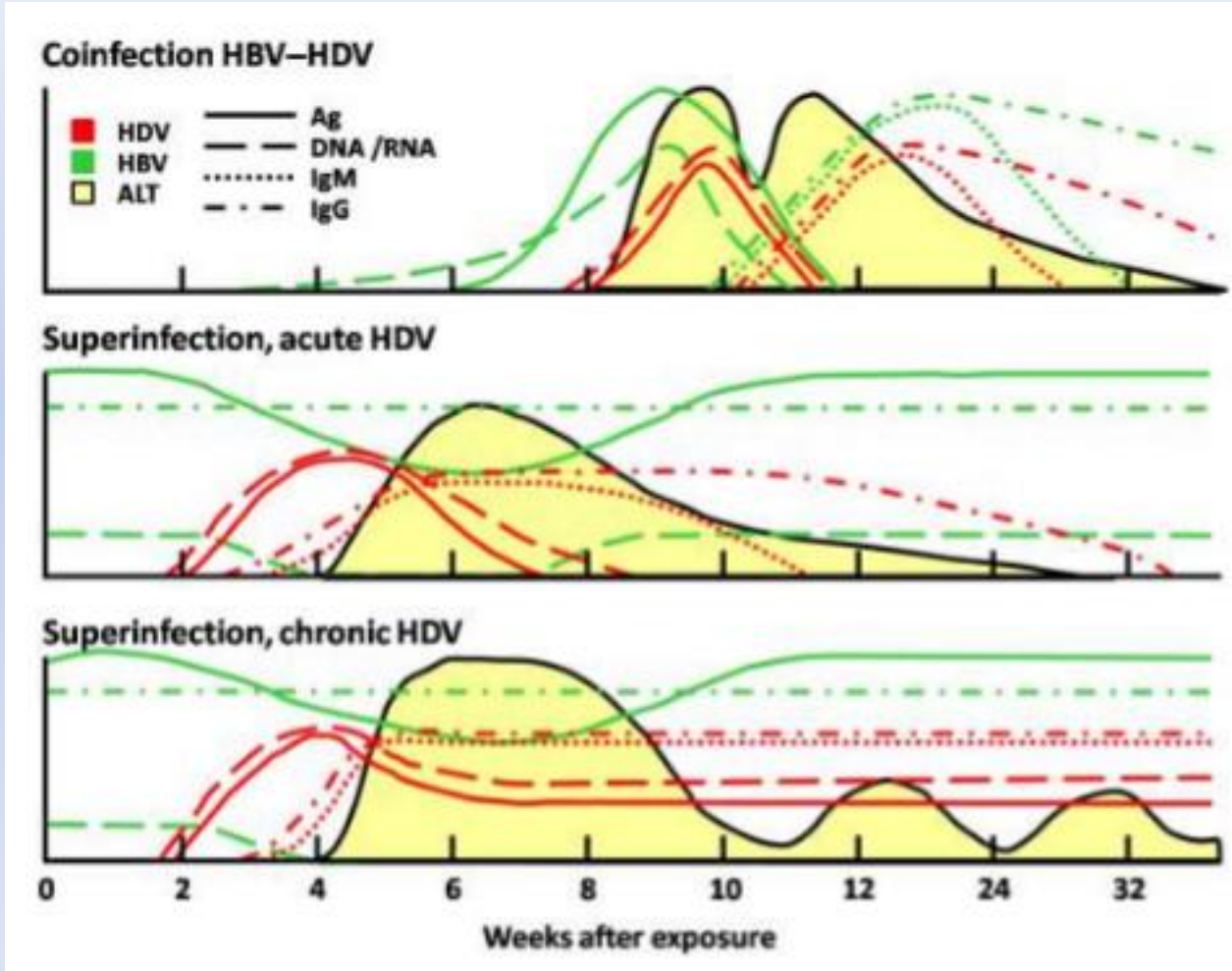
- Genotip **A ve D** X **B ve C** ¹
 - Kronikleşme riski yüksek
- Genotip **C** ²
 - Perinatal infeksiyon
 - Siroz ve HSK
- Genotip **A ve B** X **C ve D** ³
 - IFN yanıtı daha iyi
- Genotip **B ve C** ⁴
 - Tenofovir ted. serolojik yanıt düşük



HBV Genotip tanımlama

Metot	Avantajları	Dezavantajları	Kaynak
RFLP	Tekniği kolay, düşük maliyet, Hızlı	HBV miktarı düşük örneklerde duyarlılığı düşük	Datta S. World J Gastroenterol 2014 Amini B. Hepat Mon 2013
Ters hibridizasyon	Yüksek duyarlılık, otomatize	Orta-yüksek maliyet	Osiowy C. J Clin Microbiol 2003 Ali MM. Virol J 2010
Genotip spesifik PCR	Yüksek duyarlılık, otomatize, kolay, miks genotip enfeksiyonlarda tespit	Yüksek maliyet	Ali MM. Virol J 2010
Sekans analizi	Altın standart, rekombinat genotiplerle enfekte hastaları tanımlar	Zaman alıcı, tekniği tecrübe gerektirir	Ali MM. Virol J 2010

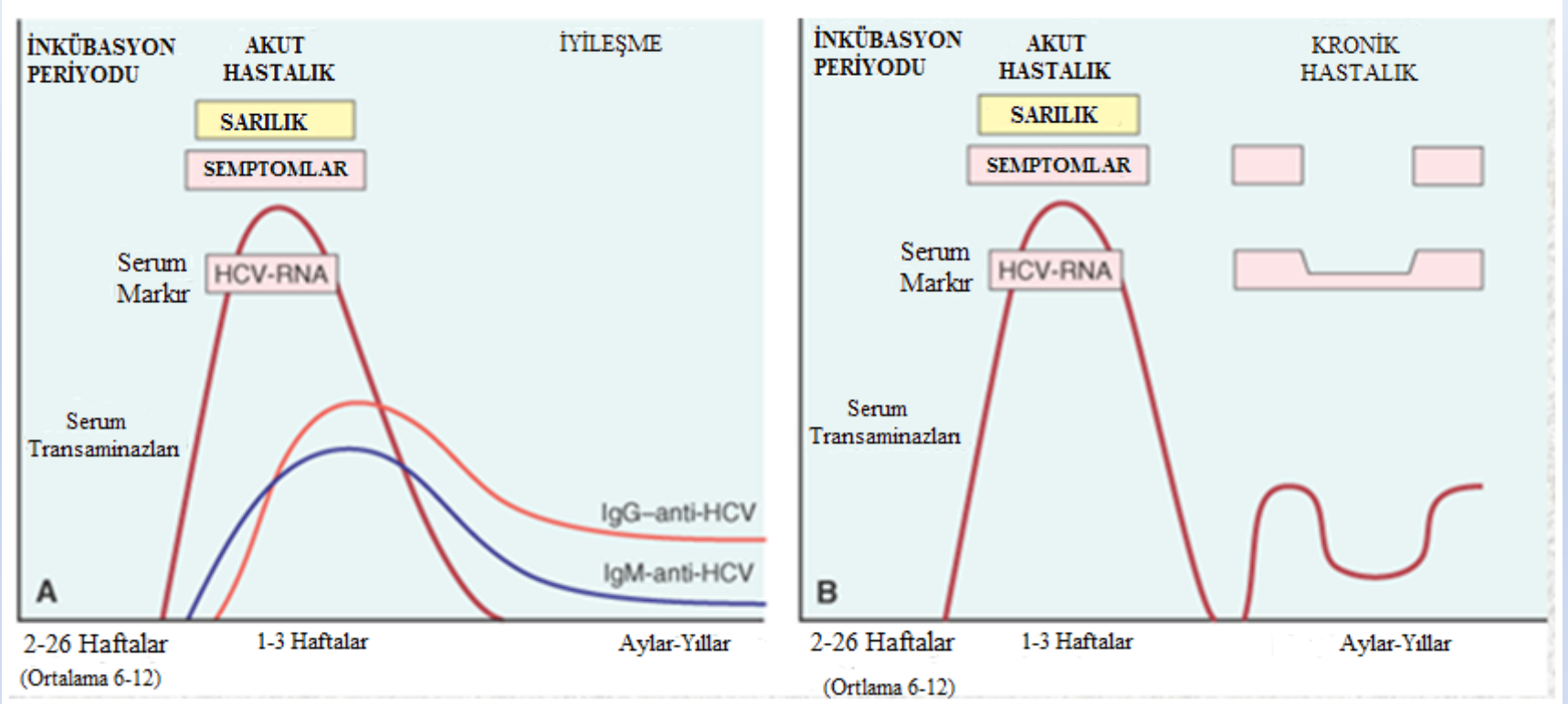
Hepatit D



Tanı

	Koenfeksiyon	Süperenfeksiyon
HBV enfeksiyonu prognozu	Akut Genellikle serokonversiyon	Kronik Genellikle kronik enfeksiyon
HBsAg	Pozitif, Erken, Geçici	Pozitif ve sürekli
Anti-HBcIgM	Pozitif	Negatif
Anti-HBs	İyileşme döneminde Pozitif	Negatif
HDV enfeksiyonu prognozu	Akut %90 serokonversiyon	Akut veya kronik %90 kronikleşir
Serum HDAg	Erken ve kısa süreli	Erken ve geçici
Karaciğer HDAg	Pozitif ve geçici	Pozitif, geç dönemde negatif olabilir
Serum HDV RNA	Pozitif, erken ve geçici	Pozitif, erken ve kalıcı
Anti-HDV	Geç dönem, düşük titre	Erken dönemde, hızlı yükselir, yüksek titrede
Anti-HDV IgM	Pozitif, geçici, pentamerik	Hızlı yükselir, yüksek titre, monomerik

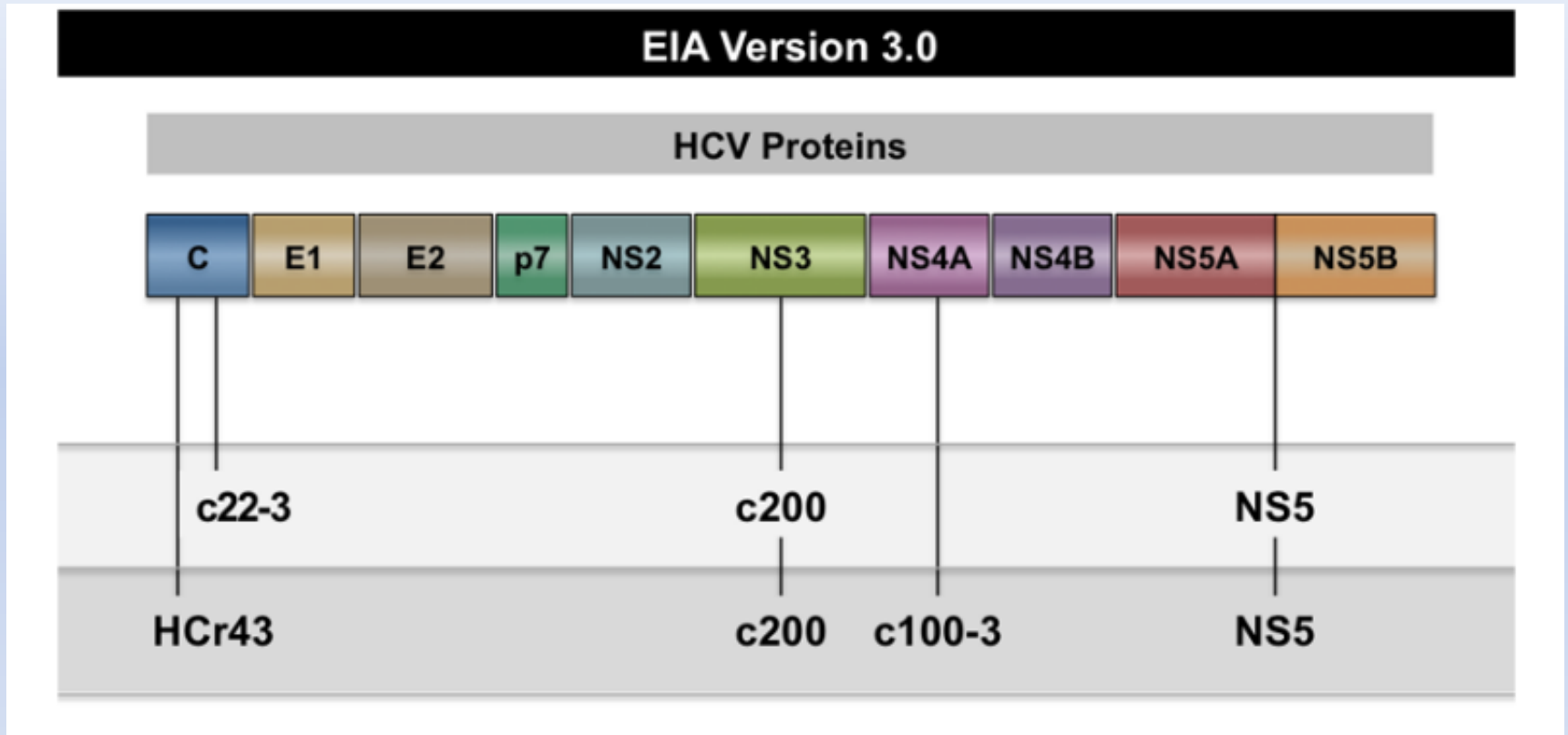
Hepatit C



EASL-2016

- Anti-HCV antikor, ilk seçenek tanısal test (A1)
- Akut HCV şüphesi olan vakalarda veya immünkompromise olgularda, HCV RNA başlangıç tanısal testlerden biri olmalı (A1)
- Anti-HCV (+), HCV-RNA duyarlı moleküler metotlarla araştırılmalı (A1)
- Anti-HCV (+), HCV-RNA (-) kişilerde, gerçek konvelans doğrulamak için 3 ay sonra HCV-RNA tekrarlanmalı (A1)
- **HCV core Ag**, HCV replikasyonun dolaylı göstergesi, Akut ve kronik HCV tanısında HCV-RNA testleri yerine kullanılabilir. (A1)

HCV EIA



HCV Hızlı Tanı Testi

Figure 2 OraQuick HCV Rapid Antibody Test

This image shows the test device after it has been placed into the buffer in the developer solution vial. The test should be read 20 to 40 minutes after it is placed in the buffer.

Source: Image courtesy of OraSure Technologies, Inc.



Figure 3 OraQuick HCV Rapid Antibody Test Device

The OraQuick HCV Rapid Antibody Test can detect HCV antibodies in whole blood (obtained by fingerstick or venipuncture). The test device has control (C) and test (T) zones. If a line is visible only in the C zone (device on left), the test is considered Non-Reactive. If lines are visible in both the T and C zones (device on right), the test is considered Reactive.

Source: Image courtesy of OraSure Technologies, Inc.



REVIEW

Dried blood spot in the genotyping, quantification and storage of HCV RNA: a systematic literature review

Jamie Greenman,¹ Teri Roberts,² Jennifer Cohn^{1,2} and Luke Messac³ ¹Department of Medicine, Hospital of the University of Pennsylvania, Philadelphia, PA, USA; ²Access Campaign, Médecins Sans Frontières, Geneva, Switzerland; and ³Perelman School of Medicine, University of Pennsylvania, Philadelphia, PA, USA.

Received August 2014; accepted for publication September 2014

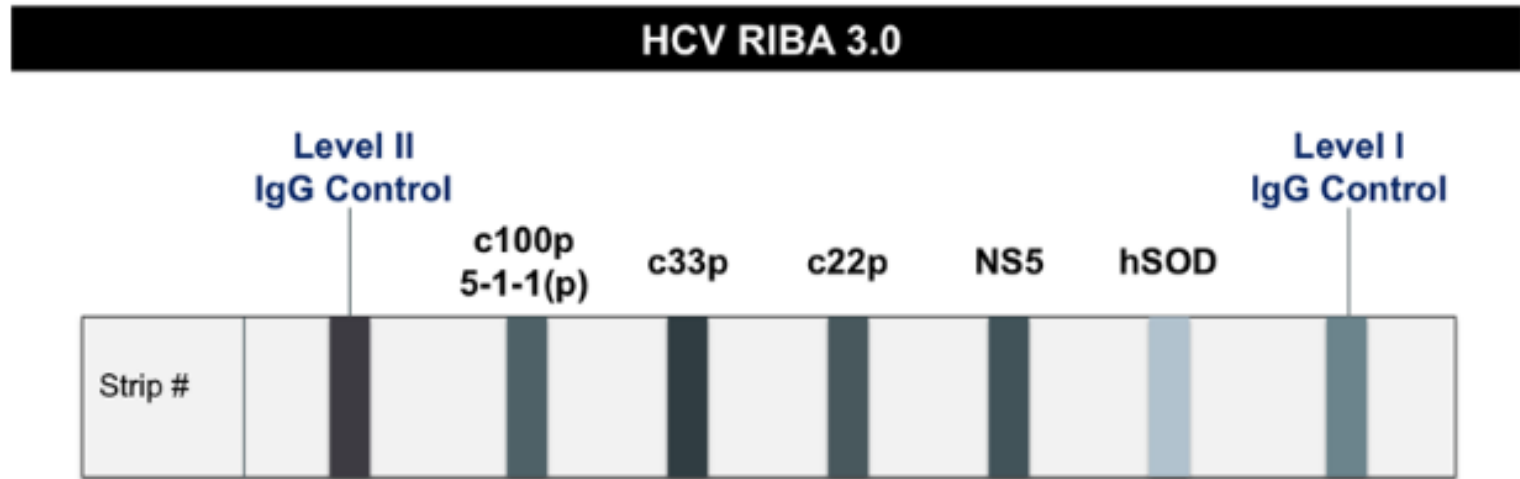
SUMMARY. The entry of new all-oral direct acting antiviral therapy for hepatitis C provides an opportunity to scale up HCV care in low- and middle-income countries. In HIV, use of dried blood spots (DBS) has facilitated the diagnosis and management of HIV in resource-poor settings. DBS may be used in a similar way to facilitate diagnosis and management of HCV. Here, we present a systematic review of the literature of DBS for HCV RNA detection and genotyping. Using an a priori review protocol, three databases were searched for studies published up to August 2013 that reported the use of dried blood and serum spots in genotyping, detection and measurement of HCV RNA, as well as the rate of degradation of HCV RNA when stored in DBS at room temperature. Nine papers were eligible for inclusion; eight studied DBS and one dried serum. Two studies mea-

sured concordance between genotype and subtype determined by DBS and whole plasma and both found 100% concordance. Four studies measured endpoint detection limits of HCV RNA-positive samples by DBS and found positive predictive values of 100% down to 250, 334, 2500 and 24160 IU/mL. Two studies found deterioration of HCV RNA in DBS samples stored at room temperature, while two others failed to detect such deterioration. These results support the potential use of DBS for genotyping and HCV RNA detection. Studies of the use of DBS for HCV RNA viral load measurement and of the rate of degradation of HCV RNA when stored in DBS at ambient temperatures remain inconclusive.

Keywords: dried blood spot, hepatitis C, LMIC, RNA storage, viral load quantification.



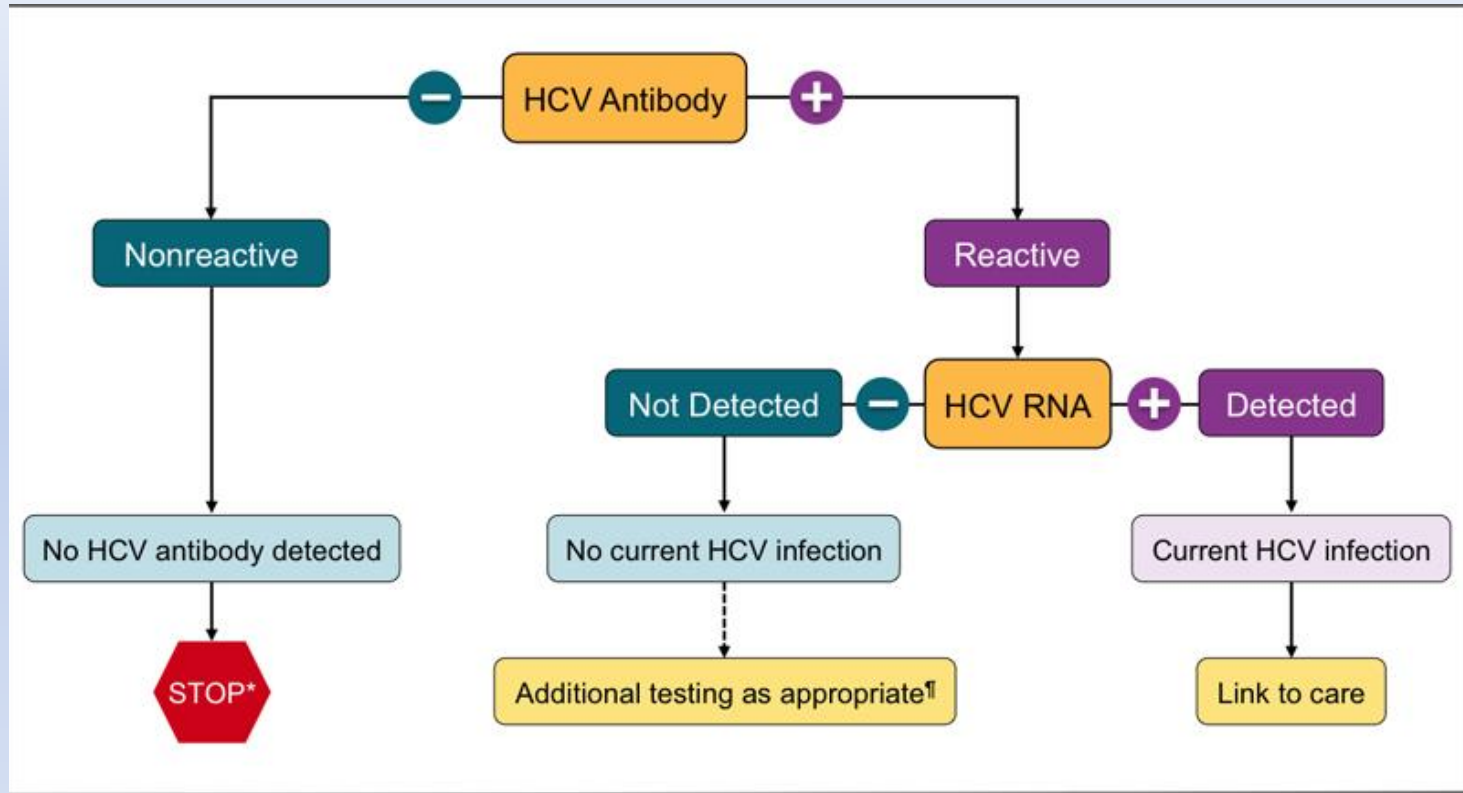
HCV RIBA



HCV-RNA Testleri

Qualitative	Method; Manufacturer	Dynamic Range (IU/mL)*
Amplacor HCV test 2.0	PCR; Roche	≥ 50
COBAS Amplacor HCV test 2.0	PCR; Roche	≥ 50
VERSANT HCV RNA Assay	TMA; Bayer	≥ 5
Quantitative	Method; Manufacturer	Dynamic Range (IU/mL)*
Versant tm HCV RNA 3.0	bDNA; Bayer	615 - 77.7 x 10 ⁶
§COBAS Amplacor HCV Monitor tm	qPCR; Roche	600 - 7 x 10 ⁵
COBAS TaqMan tm HCV	qPCR; Roche	10 - 2 x 10 ⁸
Celera HCV QT ASR	qPCR; Abbott	25 - 5 x 10 ⁸
*Results may vary at the lower limit of detection depending on the laboratory performing the test §Research Use Only - Not approved for patient use bDNA: branched chain DNA PCR: polymerase chain reaction qPCR: quantitative polymerase chain reaction TMA: transcription mediated assay ASR: analyte specific reagent The use of proprietary names does not constitute endorsement by the NYS DOH.		

CDC-Tanı/Test algoritması



CDC.MMWR.2013. Testing for HCV Infection: An Update of Guidance for Clinicians and Laboratorians

Atipik seroloji

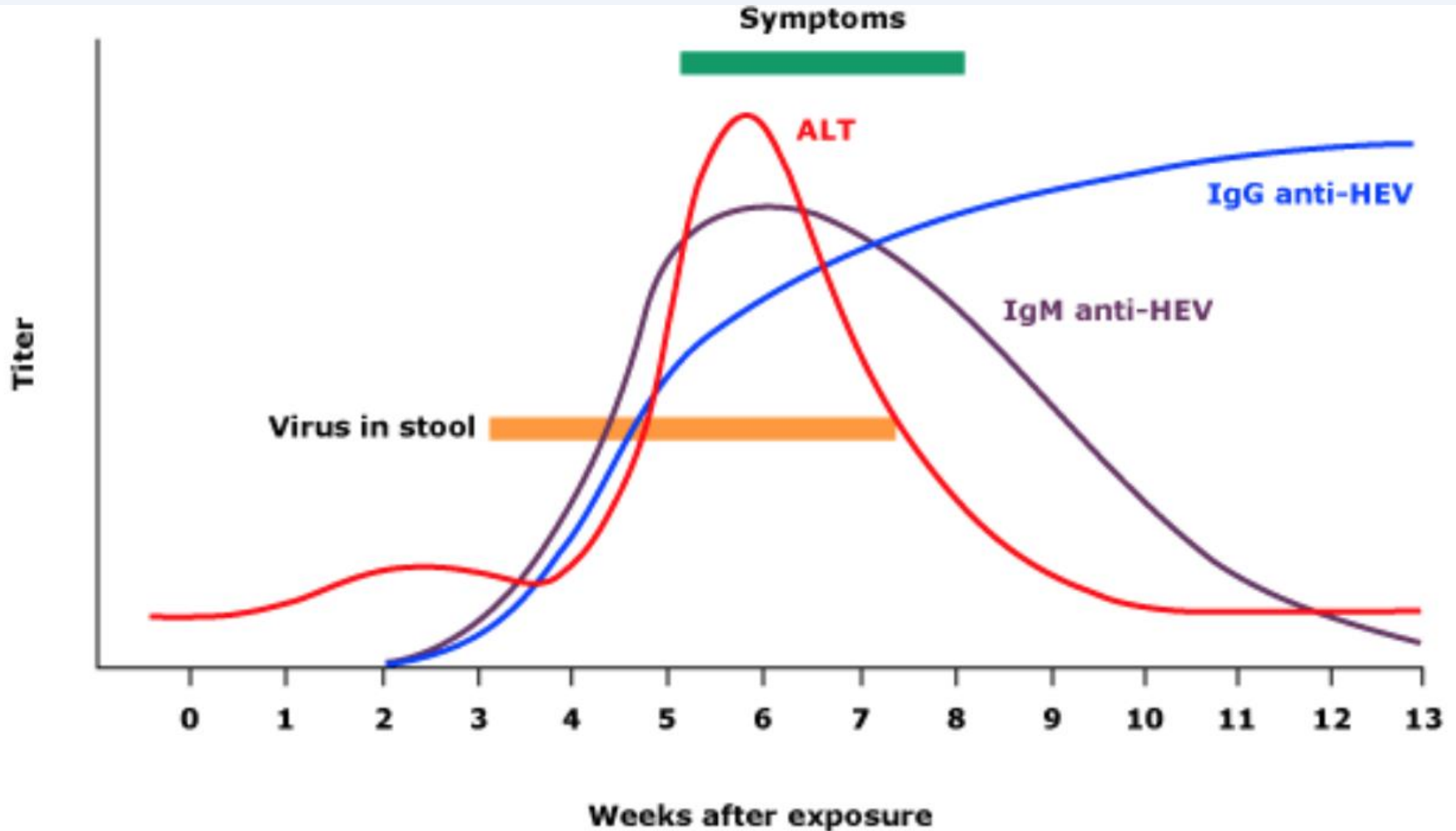
- HCV RNA+ | anti-HCV –
 - Gecikmiş ya da uzamış serokonversiyon
 - İmmün yetmezlikli hastalar
 - IV madde bağımlıları
 - Saptanabilir seviyenin altında
 - İmmün kompleks
 - Yalancı negatiflik
 - İmmün yetmezlik
 - HCV ag.lerine immün tolerans



Atipik seroloji

- Okült HCV enfeksiyonu
 - Anti HCV -, HCV RNA-
 - Anti HCV+, HCV RNA-
 - Karaciğer ve periferik mononükleer hücrelerde HCV RNA varlığı

Viral hepatitis E



Tanı

- **ELISA**
 - Anti HEV IgM
 - Anti-HEV IgG
 - HEV RNA
- **Immüno blot doğrulama testleri**

