

Tanıda Serolojik ve Moleküler Yöntemlerin Yeri

Dr. Ziya Kuruüzüm
DEÜTF Enfeksiyon Hastalıkları ve
Klinik Mikrobiyoloji AD

Hepatit Akademisi 2019: Temel Bilgiler
10-13.01.2019, Margi Otel, Edirne

Sunum Planı

- DSÖ HCV hedefleri
- HCV genomu
- HCV genomunun antijenik bölgeleri
- Serolojik testler
- Moleküler testler
- HCV enfeksiyonunun serolojik seyri
- Alternatif örneklem ve test yöntemleri
- Tanı ve tanıda karşılaşılan zorluklar
- DSÖ önerileri

HCV - Mevcut Durum

- 71 milyon viremik kronik hepatit C olgusu
- Avrupa ve Doğu Akdeniz’de yoğunlaşan olgular
- Yaşamı tehdit eden komplikasyonlar
 - HCC
 - Siroz
- 470,000 ölüm /yıl
- Artış beklentisi

HCV - DSÖ Hedefleri

- Olguların sadece % 20'si test edilmiş ve farkında
- Hedef: 2030 itibariyle HCV'nin halk sağlığı tehdidi olmaktan çıkarılması
 - Mortalitede % 65 azalma
 - İnsidanda % 90 azalma (2015'e göre)

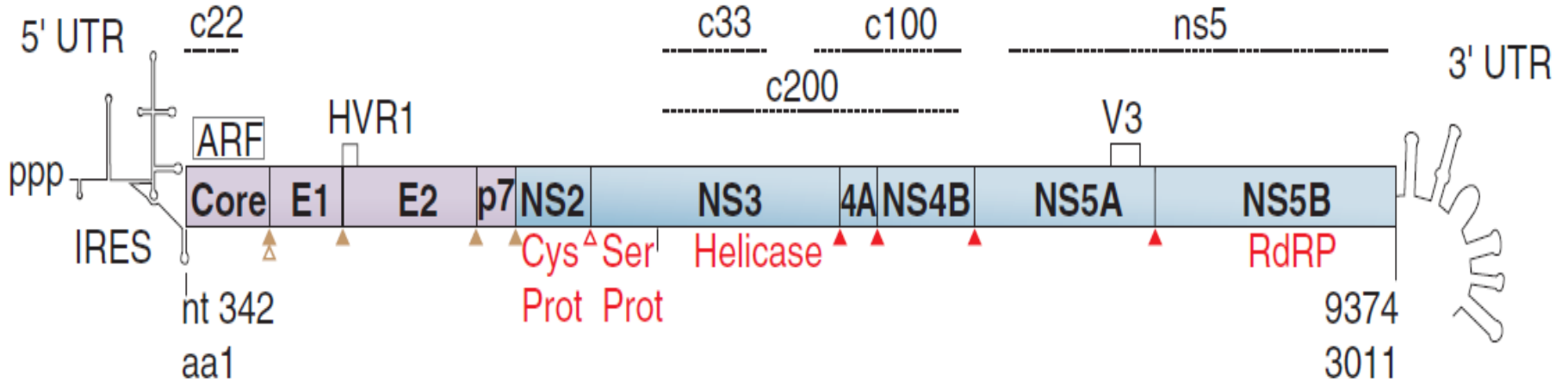
DSÖ Hedeflerine Ulaşma Yolları

- Testlerin yaygınlaştırılması - Yeni olgulara ulaşabilme
- Yeni test yöntemlerinin geliştirilmesi
 - Alternatif örneklem yöntemleri
 - Düşük maliyetli
 - Yüksek duyarlıklılı
 - Sağlık kuruluşunda yapılması gerekmeyen

HCV Virüsü

- Flaviviridae ailesi
- Hepacivirus cinsi
- Pozitif iplikçikli RNA virüsü

HCV Genomik yapısı



- HCV virüsünün klonlanması
- Antijenik bölgelerin ve epitopların belirlenmesi
- Bu epitopları içeren rekombinant ve sentetik proteinlerin (antijenlerin) sentezlenmesi
- Anti-HCV testlerinin geliştirilmesi

HCV Testlerinin Gelişimi

- Serolojik testler 1990 yılından beri kullanılmaktadır
- Kullanılan yöntem immünassay temelli yöntemlerdir
- Rekombinan HCV proteinlerine karşı oluşmuş antikorların (Anti-HCV) tespitiine dayanır

Serolojik Test Yöntemleri

- Hızlı Tanı Testleri (RDTs)
- Laboratuvar Temelli Enzim İmmunoassay (EIA)
 - Renk oluşumunun ölçülmesi
- Kemilüminesans İmmunoassay (CLIA)
 - Kimyasal reaksiyonun oluşturduğu ışığın ölçülmesi
- Elektro Kemilüminesans İmmunoassay (ECL)

Hızlı Tanı Testleri (RDTs)

- Testlere daha fazla erişim kolaylığı
- Basitlik
- Düşük maliyet
- Serum ya da plazma kullanılabilmesi
- Parmak ucundan alınan kan ile yapılabilmesi
- Kaynakların kısıtlı olduğu bölgeler/kurumlar
- Özellikle enstrümanlara gereksinim duyulmaması

Laboratuvar Temelli Yöntemler (EIA, CLIA, ECL)

- Olağanüstü duyarlılık
- Üstün güvenilirlik
- Hızlı sonuç alınabilme
- Yüksek kapasiteli laboratuvarlar için hızlı çözüm
- Ful otomasyon

Testlerde Kullanılan Gen Bölgeleri



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

Birinci Kuşak ELISA testleri



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

Anti-C100-3 akut infeksiyonda en geç ortaya çıkan antikordur

İkinci Kuşak ELISA testleri



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

Anti-C22c ve anti-C33c akut dönemde ilk ortaya çıkanlardır

Üçüncü Kuşak ELISA testleri



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

Anti-NS5 daha geç ortaya çıkmaktadır

ELISA Testlerinin Duyarlılıkları

- Birinci kuşak ELISA testleri: % 70-80
- İkinci kuşak ELISA testleri: % 92-95
- Üçüncü kuşak ELISA testleri: % 97

Üçüncü Kuşak ELISA Testleri

- Günümüzde kullanılan testler
- Standardizasyonları iyi
- Duyarlılıkları % 98.9, özgüllüğü %100

Dördüncü Kuşak ELISA Testleri

- Eş zamanlı olarak hem HCV core antijenini (HCVcAg) hem de Anti-HCV'yi saptamaktadır
- Kor bölgesinden iki farklı epitop, NS3, NS4A, NS4B, NS5A gibi üçüncü kuşak testlerde kullanılan proteinler daha da çeşitlendirilerek, NS3 ve NS4 proteinleri de eklenerek hazırlanmıştır

Dördüncü Kuşak ELISA Testleri

- HCV RNA kadar erken pozitifleşebilmektedir
- Yüksek riskli gruplarda akut enfeksiyonu daha erken saptayabilmektedir
- Üçüncü kuşak testlere göre HCV enfeksiyonunu 6-7 hafta erken saptayabilmektedir
- INNOTEST Ab IV'ün duyarlılığı %100, özgüllüğü %99.8
- 13 günden sonra saptayabilme

Is HCV core antigen a reliable marker of viral load? An evaluation of HCV core antigen automated immunoassay

[Emilia Hadziyannis](#), [Martha Minopetrou](#), [Anastasia Georgiou](#), [Fotini Spanou](#), and [John Koskinas](#)

[Author information](#) ► [Article notes](#) ► [Copyright and License information](#) ►

❖ 105 anti-HCV pozitif hastada HCV RNA (bDNA, Versant, Siemens) ve HCV kor antijen(Architect HCV Ag test, Abbott Laboratories), tayini yapılmış

Is HCV core antigen a reliable marker of viral load? An evaluation of HCV core antigen automated immunoassay

[Emilia Hadziyannis](#), [Martha Minopetrou](#), [Anastasia Georgiou](#), [Fotini Spanou](#), and [John Koskinas](#)

[Author information](#) ► [Article notes](#) ► [Copyright and License information](#) ►

- ❖ 89 hastada HCV RNA (+), 16 hastada (-)
- ❖ 89 hastanın 83'ünde HCV kor antijen (+)
- ❖ 4 hasta gri zon, 2 hasta HCV kor antijen (-)
- ❖ 16 HCV RNA negatif hastanın hiçbirinde HCV kor antijen pozitifliği yokmuş

Dördüncü Kuşak Testler ve HIV

- HIV/HCV co-enfeksiyonlu kişilerde HCV serokonversiyonu gecikmektedir
- Bu tür olguların tanısında konvansiyonel testlere göre daha üstündür

Anti-HCV IgM Testi

- Akut enfeksiyonda anti-HCV IgM testi: %50-93 (+)
- Kronik enfeksiyonda anti-HCV IgM testi: %50-70 (+)
- Güvenilir bir gösterge değildir
- Kullanımdan kalkmıştır

Riba Testleri

- Üçüncü Kuşak RIBA testlerinde 4 rekombinant protein ile işaretlenmiş nitrosellüloz striplerler kullanılır
 - C33c
 - C100-3
 - NS5
 - Kor bölgesinden bir peptit

Chiron® RIBA™ 3.0 SIA #930600



Hızlı Tanı Testleri (RDTs)

ABD’de OraQuick HCV Rapid Test (OraSure Technologies, Inc, Bethlehem, PA) FDA tarafından onaylanmıştır

Çeşitli vücut sıvılarında çalışılabilse de FDA onayı venöz kan ve parmak ucundan alınan kan içindir

Strip test şeklindedir ve ilave donanım gerekmez

Testin duyarlılığı %99.7-%99.9 ve özgüllüğü %99.9 bulunmuştur

Duyarlılığı tükürükte biraz daha düşük %98.1 bulunmuştur

Lee SR. Et al. J Clin Virol 2010



Hızlı Tanı Testleri (RDTs)

Diğer hızlı tanı testleri;

- Multiplo Rapid HIV/HCV Antibody Test (MedMira, Inc, Halifax, Nova Scotia)
- Chembio Dual Path Platform (DPP) HCV Test (Chembio Diagnostic Systems, Inc, Medford, NY)'dir

Lee SR, et al. J Virol Methods 2011
Smith BD, et al. J Infect Dis 2011



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

Flexible Specimens for Clinical and Non-Clinical Settings

Fingerstick

Venipuncture Whole Blood

Simple Testing Procedure

Venipuncture Whole Blood

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

Hastanın Örneği Kendi Aldığı Testler



HOME ACCESS HEALTH CORPORATION

[HOME](#) | [REGISTER](#) | [LOGIN](#)

[VIEW CART](#)

[CHECK MY RESULTS](#)

[PRODUCTS](#) : [HOW IT WORKS](#) : [MARKETS](#) : [ABOUT](#) :

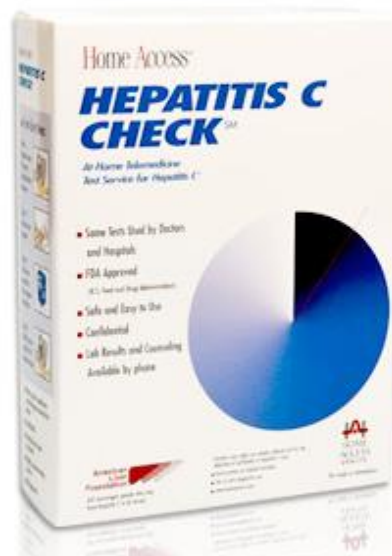
[BUY NOW](#)

HIV-1 Test System

Express (next day) HIV-1 Test

Hepatitis C

FDA Cleared Cholesterol Panel



The Home Access® Hepatitis C

FDA Approved - The only telemedicine Hepatitis C **counseling and testing** service approved by the U.S. Food and Drug Administration for use directly by consumers.

Accurate - As accurate as tests used by Doctors and Hospitals.

Anonymous - You are identified only by a code number that comes with your kit.

Help Line - Toll-free telephone support for test and result questions.

Easy - A non-invasive, simple fingerstick sample is all that is needed

Additional Information

- [How It Works](#)
- [FAQ's](#)
- [Informational Resources](#)
- [Risk Assessment](#)

- ❖ FDA tarafından onaylanmıştır
- ❖ Örnek laboratuvara gönderilir ve sonuçlar 4-10 işgünü sonrası alınır
- ❖ Bu testlerin doğruluğu laboratuvar temelli testlere yakındır

Virolojik Test Yöntemleri

- Laboratuvar temelli yöntemlerdir
- Yapılabilmeleri kalifiye eleman gerektirir
- Yüksek maliyetli testlerdir
- Kısıtlı bütçeli ülkeler/kurumlar için uygun değildir

Virolojik Test Yöntemleri

- Viral nükleik asitin (NAT) saptanmasına yönelik testlerdir (HCV RNA)
- Yüksek oranlı doğruluk ve duyarlılık içerir
 - Varlık/yokluk (kalitatif)
 - Düzey tespiti (kantitatif)
- Tedavi kararına yön verir
- Tedavi yanıtını izler
- Kürü tespit eder

2017 DSÖ Hepatit Test Kılavuzu

- Tek bir in-vitro, serolojik test kullanılmalıdır
 - Laboratuvar temelli test ((EIA veya CLIA)
 - Hızlı tanı testi (RDT)
- Minimum performans kriterlerini sağlamalıdır

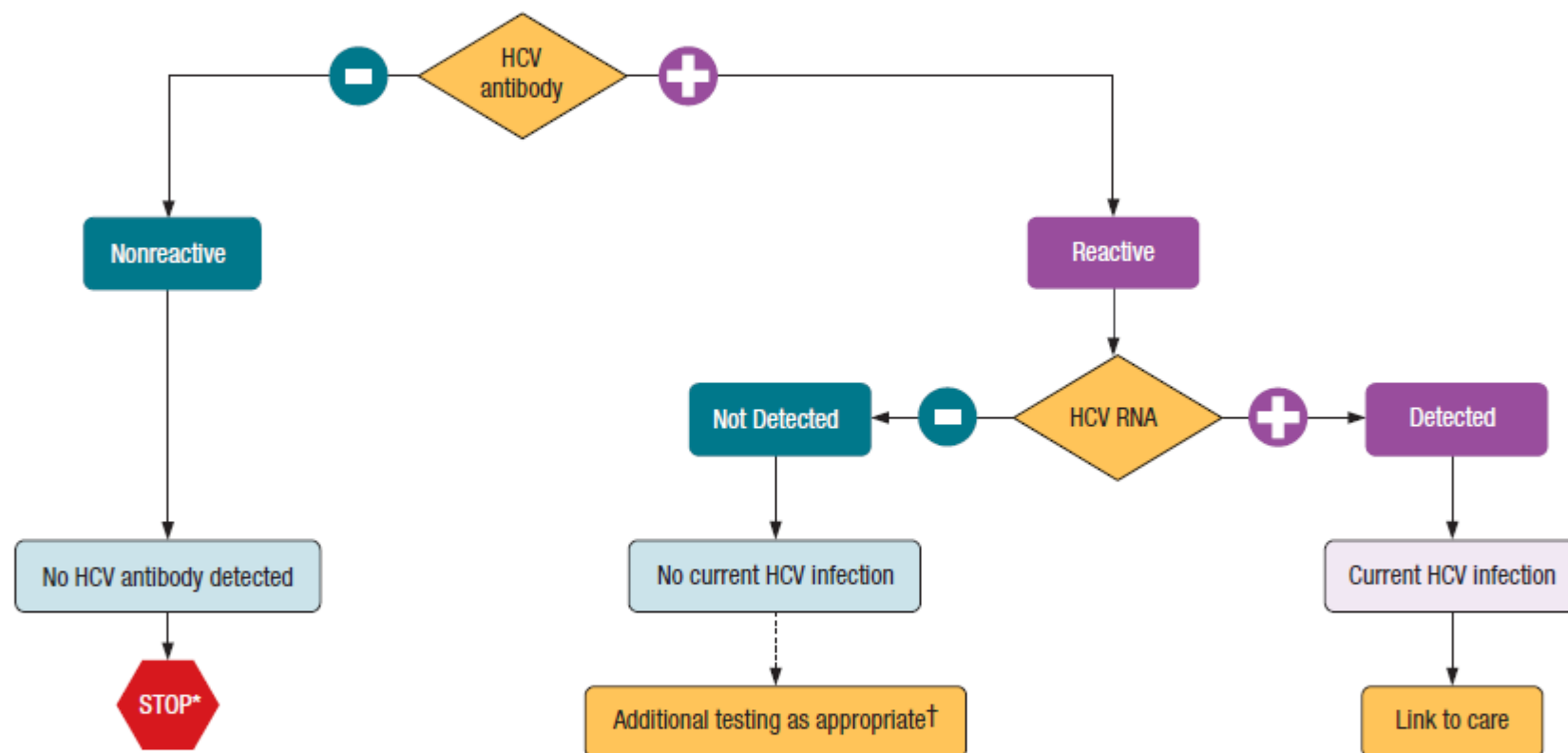
2017 DSÖ Hepatit Test Kılavuzu

- Serolojik testle elde edilen reaktif bir sonuç mutlaka kalitatif ya da kantitatif bir **NAT** ile doğrulanmalıdır
- Yüksek etkili DAA çağında kalitatif testler yeterlidir

Recommended Testing Sequence for Identifying Current Hepatitis C Virus (HCV) Infection



U.S. Department of
Health and Human Services
Centers for Disease
Control and Prevention



* For persons who might have been exposed to HCV within the past 6 months, testing for HCV RNA or follow-up testing for HCV antibody is recommended. For persons who are immunocompromised, testing for HCV RNA can be considered.

† To differentiate past, resolved HCV infection from biologic false positivity for HCV antibody, testing with another HCV antibody assay can be considered. Repeat HCV RNA testing if the person tested is suspected to have had HCV exposure within the past 6 months or has clinical evidence of HCV disease, or if there is concern regarding the handling or storage of the test specimen.

Source: CDC. Testing for HCV infection: An update of guidance for clinicians and laboratorians. *MMWR* 2013;62(18).

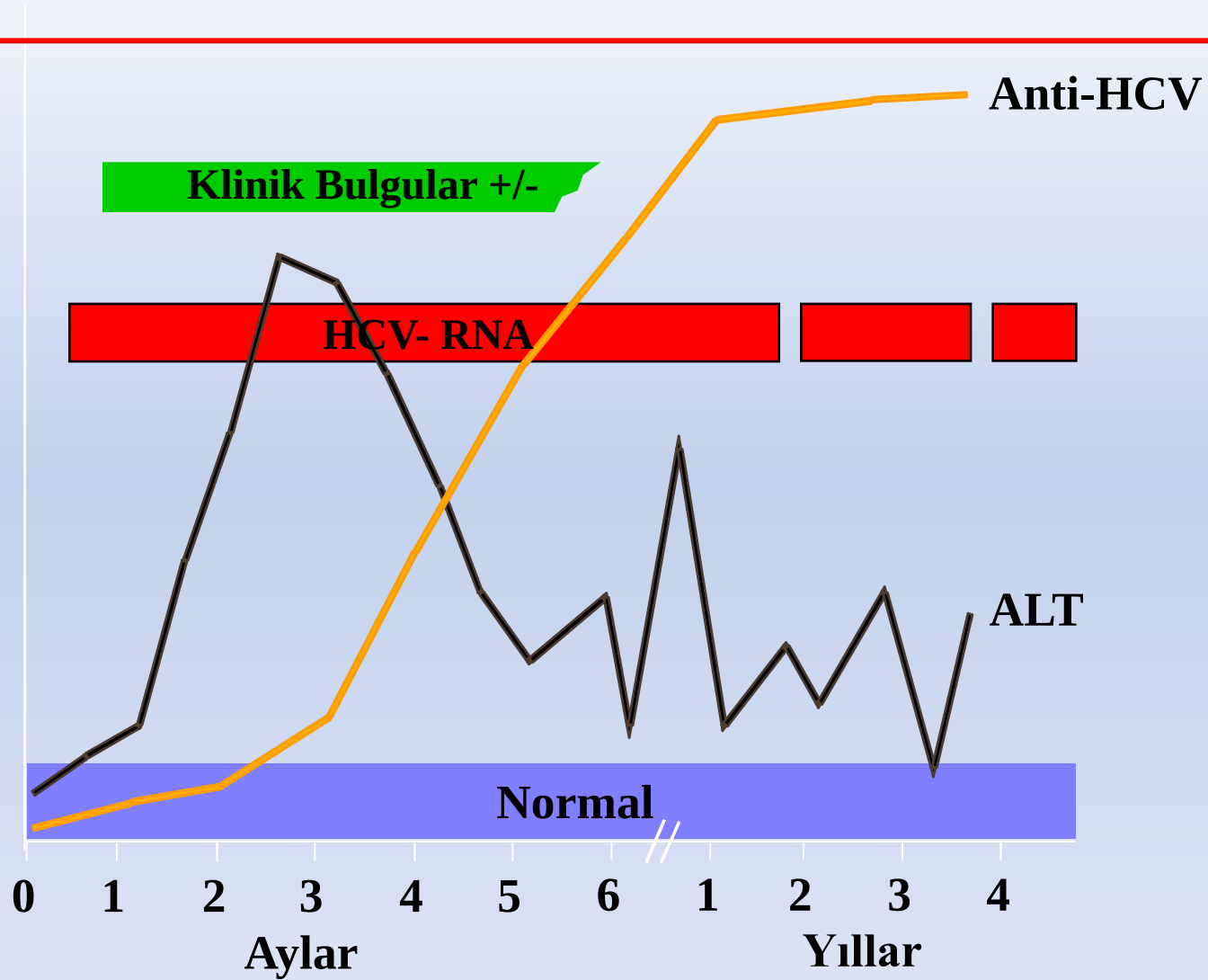
Kalitatif/Kantitatif NAT

- Kantitatif NAT testlerinin saptama sınırları: 600-1100 IU/ml
- Kalitatif NAT testlerinin saptama sınırları: 10-15 IU/ml
- Güncel kantitatif NAT testlerinin saptama sınırları: 10-15 IU/ml
- Kronik hepatit C enfeksiyonlarının çoğunda (%95) HCV RNA seviyeleri >10,000 IU/ml

2017 DSÖ Hepatit Test Kılavuzu

- Serolojik testle elde edilen reaktif bir sonuç **NAT** ile doğrulanamıyorsa, HCVcAg alternatif olabilir
- Bir sistematik derlemede 7 ticari HCVcAg testi ile NAT testlerinin karşılaştırılmasında bazı HCVcAg testlerinin duyarlılıkları %93.4, özgüllüğü ise %98 olarak saptanmıştır

HCV İnfeksiyonunun Serolojik Seyri



Tanıda Karşılaşılan Zorluklar - Yalancı Negatiflik

- İmmünsupresyon, HIV pozitif kişiler ve transplant alıcıları ve hemodiyaliz alanlarda yalancı negatif sonuçlara neden olabilir

Tanıda Karşılaşılan Zorluklar - Yalancı Pozitiflik

- Hastalığın düşük prevalanslı görüldüğü bölgelerde (<%10) yalancı pozitiflik % 35
- HCV pozitif anneden doğan çocuklarda bir yıla kadar anti-HCV pozitifliği görülebilir

Seronegatif HCV İnfeksiyonu Sıklığı

Popölasyon	Seronegatif HCV infeksiyonu %	Referans
HIV/HCV koinfekte Kişiler	3.2-13.2	Bonacini et al.(2001), Chamie et al.(2007), George et al.(2002), Hadich et al.(2007)
Hemodiyaliz Hastaları	1-15	Carnerio et al.(2001), Fabrizi et al.(1999), Hanuke et al.(2002), Schröter et al.(1997)
Organ Donörleri	0.2-0.9	Aswed et al.(2005), Challine et al.(2004), Legler et al.(2000)
Kan Donörleri	0,0004-0,08	Bröjer(2005), Seyfried et al.(2005), Stramer et al.(2004)

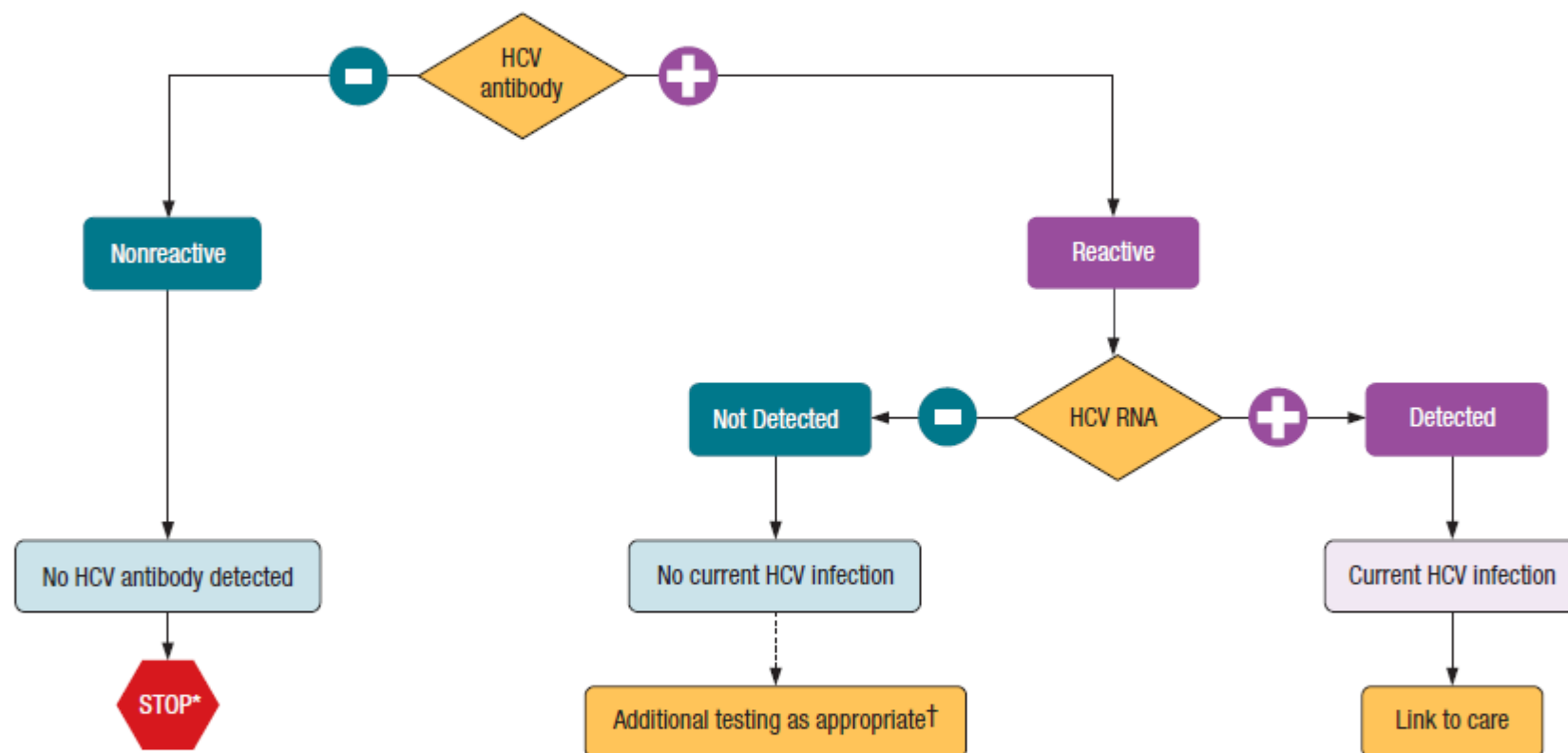
Testlerin Duyarlılığı

Tarama test kiti adı	üretici	Deney Formatı	Sinyal-cut-off oranı ≥% 95 fazla doğrulukla gerçek pozitiflik habercisi
Ortho HCV Version 3.0 ELISA Test System	Ortho	EIA (Enzyme Immunoassay)	≥ 3.8
Abbott HCV EIA 2.0	Abbott	EIA (Enzyme Immunoassay)	≥ 3.8
VITROS Anti-HCV	Ortho	CIA (Chemiluminescent Immunoassay)	≥ 8.0
AxSYM Anti-HCV	Abbott	MEIA (Microparticle Immunoassay)	≥ 10.0
Architect Anti-HCV	Abbott	CMIA (Chemiluminescent Microparticle Immunoassay)	≥ 5.0
Advia Centaur HCV	Bayer	CIA (Chemiluminescent Immunoassay)	≥ 11.0

Recommended Testing Sequence for Identifying Current Hepatitis C Virus (HCV) Infection



U.S. Department of
Health and Human Services
Centers for Disease
Control and Prevention



* For persons who might have been exposed to HCV within the past 6 months, testing for HCV RNA or follow-up testing for HCV antibody is recommended. For persons who are immunocompromised, testing for HCV RNA can be considered.

† To differentiate past, resolved HCV infection from biologic false positivity for HCV antibody, testing with another HCV antibody assay can be considered. Repeat HCV RNA testing if the person tested is suspected to have had HCV exposure within the past 6 months or has clinical evidence of HCV disease, or if there is concern regarding the handling or storage of the test specimen.

Source: CDC. Testing for HCV infection: An update of guidance for clinicians and laboratorians. *MMWR* 2013;62(18).



Sabrınız için teşekkürler