



HBV İnfeksiyonu Tanısında Kullanılan Serolojik ve Moleküler Yöntemler

Dr. Orçun BARKAY



Sunum planı

- Giriş
- Serolojik yöntemler
- Moleküler yöntemler
- Tanıda kullanılan yeni belirteçler
- Sonuç



Giriş

- Hepatit B virusu (HBV)
- Hepadnaviridae ailesi → Çift sarmallı **DNA**

- Akut ve kronik hepatit,
- Siroz,
- Hepatoselüler karsinom (HCC)

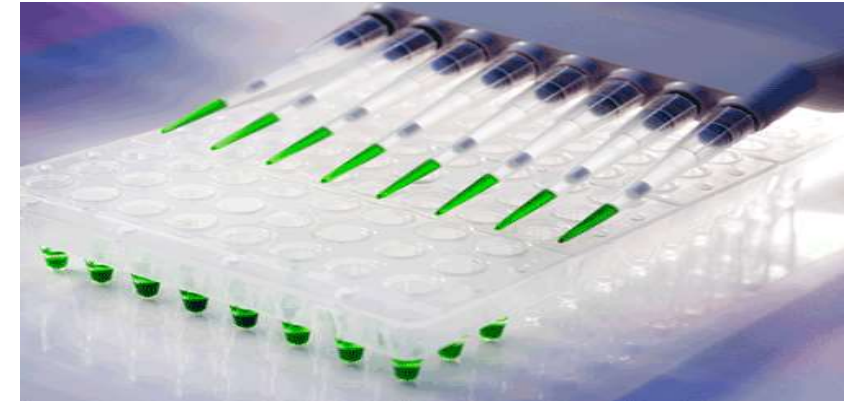


gibi ciddi komplikasyonlar

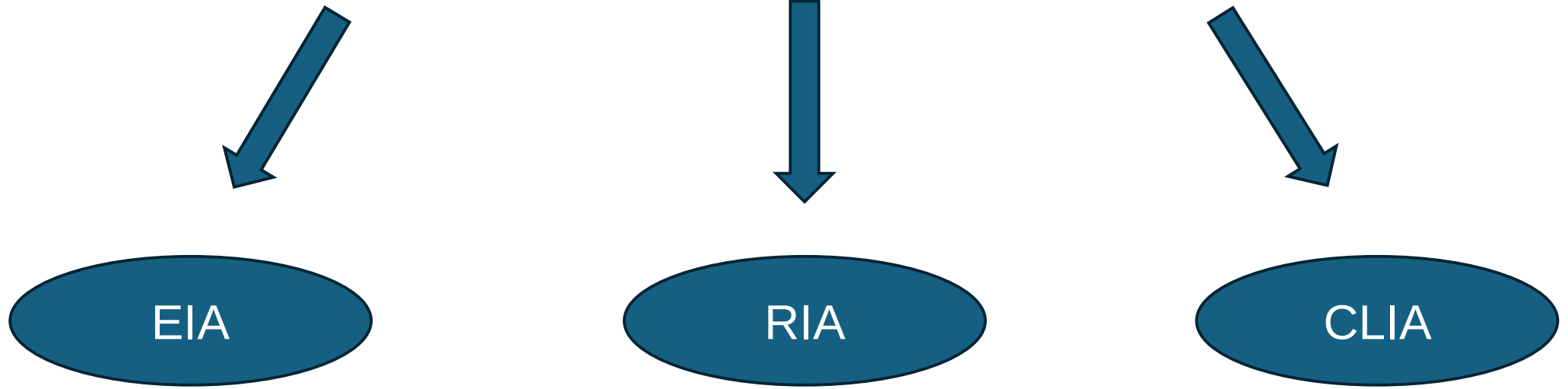


Giriş

- Tanı sürecinde
 - serolojik testler,
 - moleküler analizler ve
 - biyokimyasal belirteçler kullanılır.
- Serolojik testler → HBV'ye özgü antijen ve antikorların tespit edilmesi
- Moleküler yöntemler → Viral genomun doğrudan tespiti



SEROLOJİK TESTLER

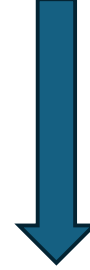


MOLEKÜLER TESTLER



- PCR
- NASBA
- TMA
- bDNA

HİSTOPATOLOJİK TESTLER



İnvaziv/Non-invaziv

Serolojik testler

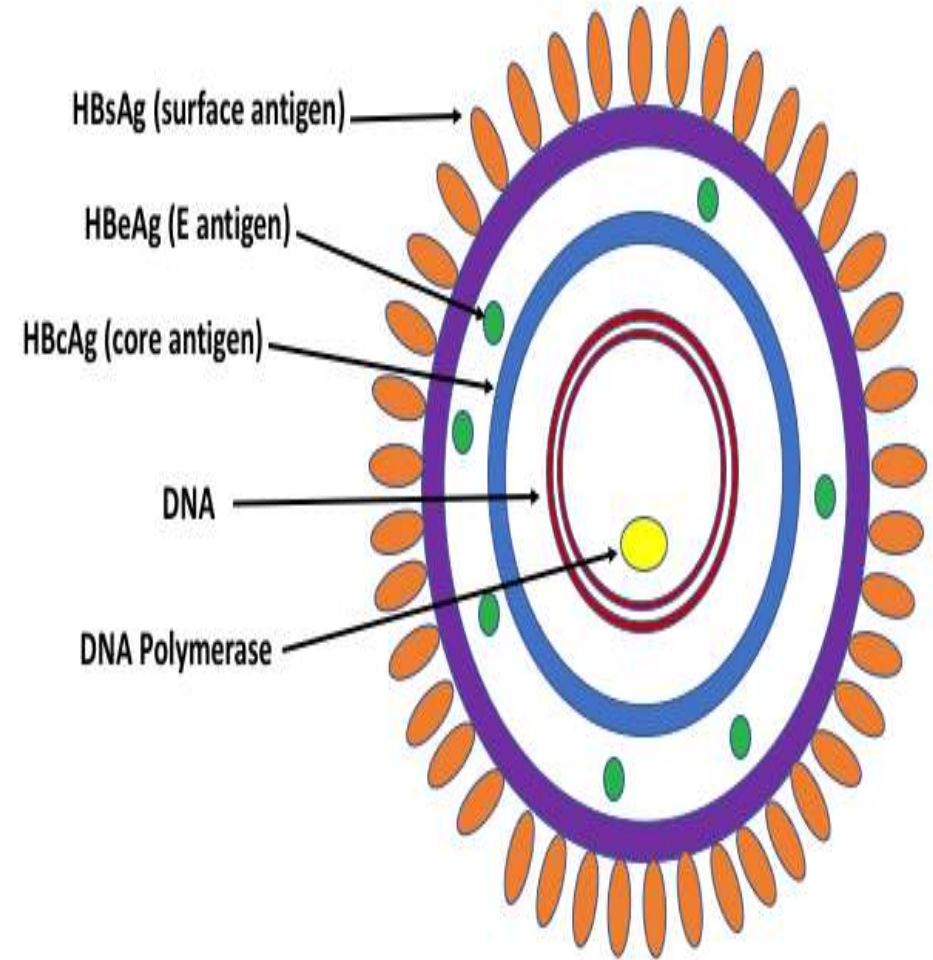
- HBV infeksiyonunun tespit edilmesi,
- Hastalık evresinin belirlenmesi,
- Başışıklık durumunun değerlendirilmesi,
- Tedavinin planlanması,
- Tedaviye yanıtın değerlendirilmesi

amacıyla kullanılır.



Serolojik testler

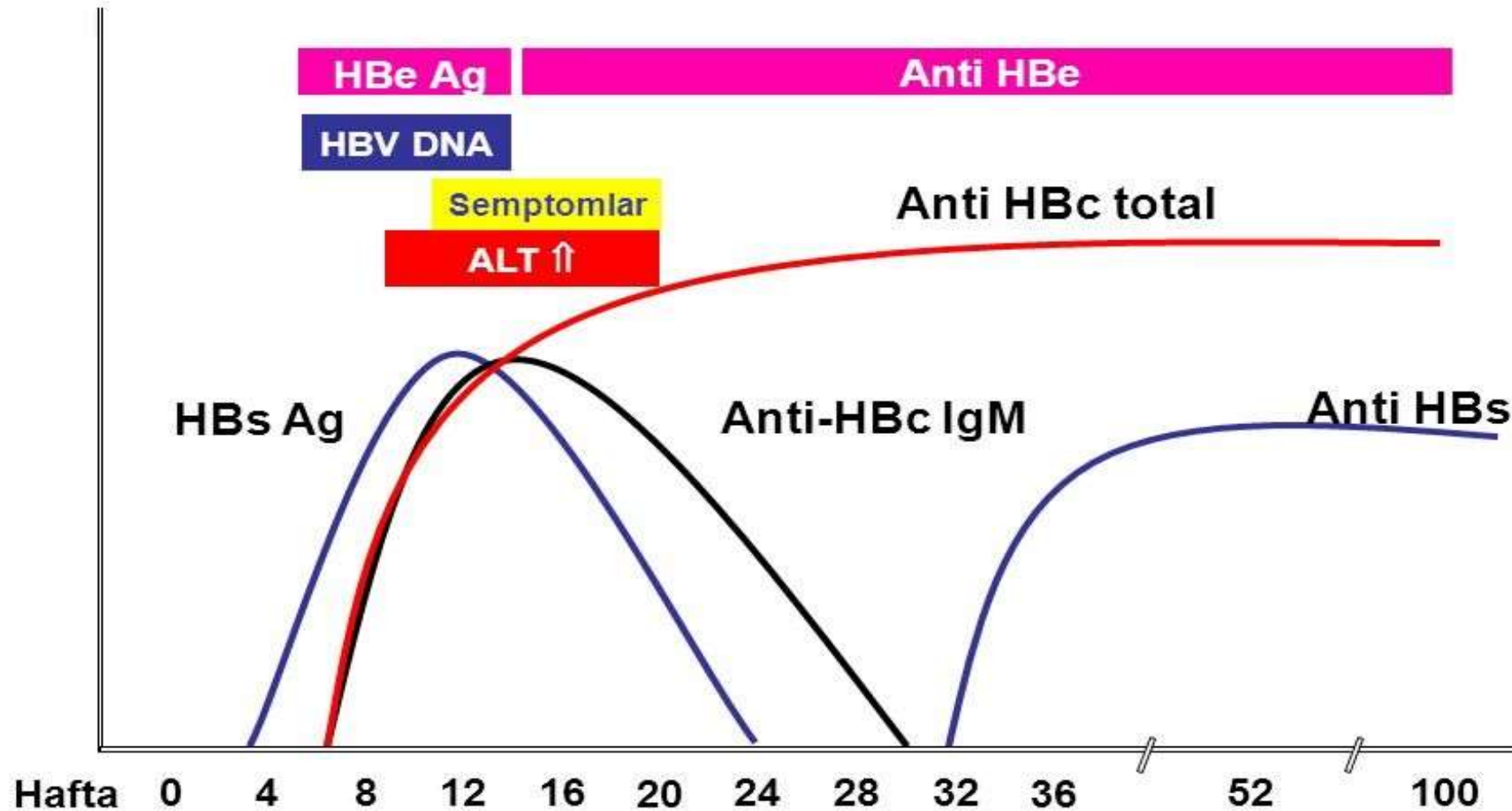
- HB^sAg.....**S**
- Hb^eAg.....**E**
- anti-HB^cIgM.....**C**
- anti-HB^cIgG
- anti-Hb^e.....**E**
- anti-HB^s.....**S**



Dang et al. Hepatitis B Serologic Testing Methods. Infectious Diseases. 2021.



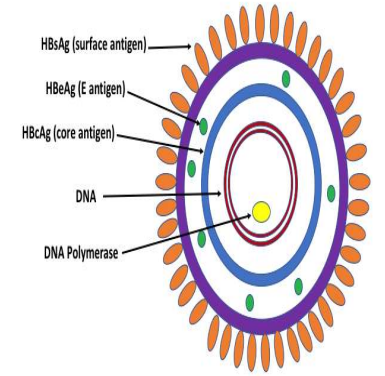
AKUT HEPATİT B SEROLOJİSİ



Weinbaum, et al. Recommendations for identification and public health management of persons with chronic hepatitis B virus infection. Hepatology. 2009 May;49(5 Suppl):S35-44.

HBsAg (Hepatit B surface Antigen) SE-C-ES

- Yüzeyde yer alan zarf proteinini
 - ≠ replikasyon!
- EIA ile tespit edilir.
- HBV'ye akut maruziyetten **1 ila 10 hafta** sonra (+)
- Semptomların başlamasından / ALT yükselmesinden önce (+)
- İyileşen hastalarda genellikle 4-6 ay sonra tespit edilemez.
- HBsAg'nin **6 aydan** uzun süre (+) → **kronik** infeksiyon
 - Kronik HBV hastalarında **negatifleşme oranı** yılda yaklaşık **%0,5**



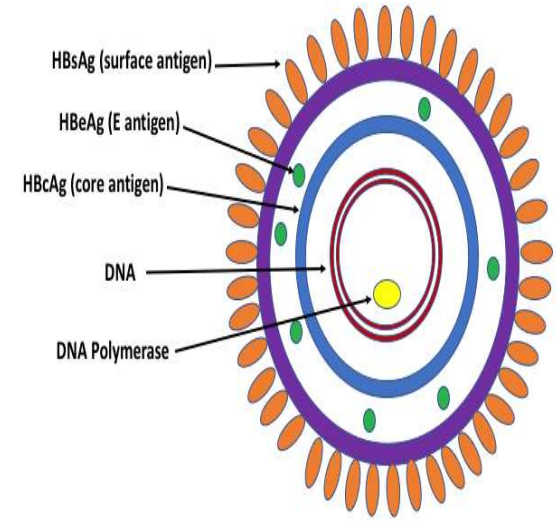
HBeAg (Hepatit B envelope Antigen) SE-C-ES

- Hepatit B early Antigen → temas sonrası 6-12 haftada (+)
- Hepatit B enfeksiyöz Antigen = enfektivite → **Yüksek HBV-DNA!**
- Prekor proteininden işlenen bir sekretuar proteindir.

- KHB evresini belirleme
 - HBeAg (+) kronik infeksiyon/hepatit
 - HBeAg (-) kronik infeksiyon/hepatit
- Tedavi başlama/Tedaviye yanıtı değerlendirme
- Prekor/kor bölgesi mutasyonları → HBeAg ↓ / - → HBV-DNA ↑

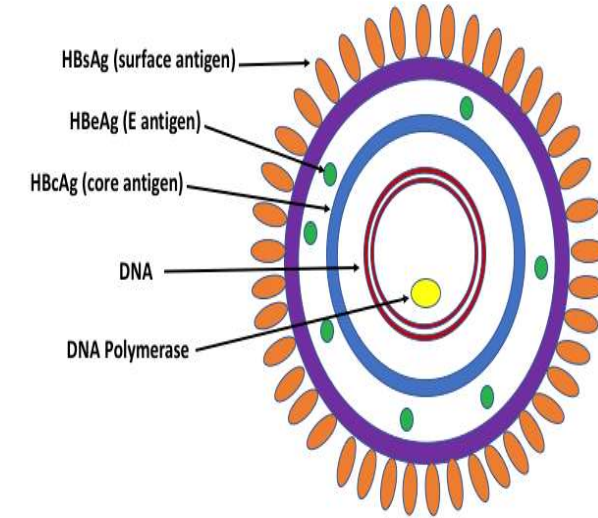
Anti-HB_c SE-C-ES

- Hepatit B ile **karşılaşmayı** gösterir.
 - Pozitiflik ömür boyu sürebilir.
 - Aşı aracılığıyla karşılaşmada **negatif!**
- Anti-HBc IgM
- Anti-HBc IgG



Anti-HBc IgM

- Akut infeksiyon
 - Akut alevlenme!
- Pencere dönemi
- 6 ay süreyle tespit edilebilir.

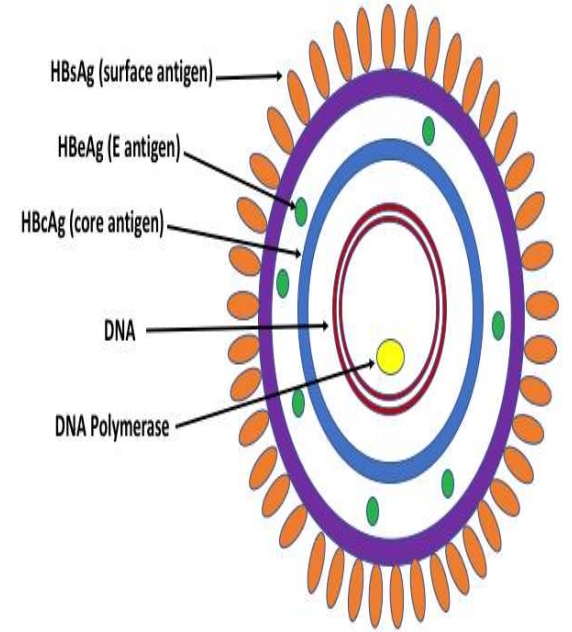


Anti-HBc IgG

- İntrahepatik cccDNA varlığı ile ilişkili
- İyileşme
- Okült hepatit

- İzole Anti-HBc IgG (+)
- Akut hepatit bulguları (+)
- ALT yüksekliği (+)

Anti-HBc IgM bakılmalı!

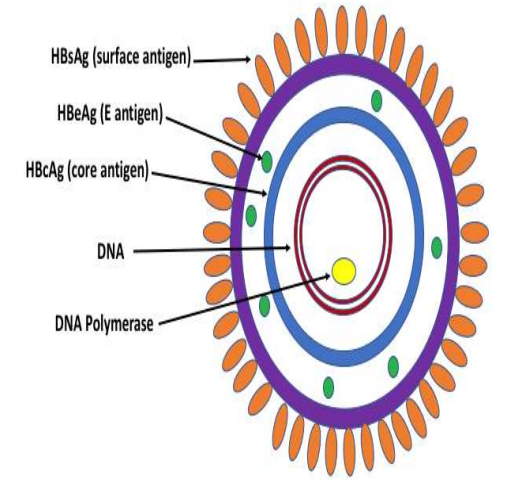


Anti-HB_s

SE-C-ES

Nötralizan antikor

- Uzun süreli bağışıklık
- Aşılama → 4-8 hf sonra (+) → ≥ 10 IU/L
- HBIG → 4-6 ay (+) → 6 ay süreyle anti-HBs bakılmamalı!
- Doğal bağışıklık → Anti-HBc IgG (+)



HBcAg (Hepatit B cor Antigen)

HBcrAg (Hepatit B core-related Antigen)

HBcAg

- İntrasellüler → serumda yok!

HBcrAg

- 3 komponent → HBcAg + HBeAg + p22^{cr}
- İntrahepatik cccDNA ile korele → HBsAg ve HBV-DNA ile güçlü korelasyon!
 - HBsAg/HBV-DNA yokluğunda (+)
 - Antiviral alanların %78'inde (+)

Natural History

Antiviral therapy

Doğal seyirde

- Spontan HBeAg serokonversiyonu tanımlanması
- Spontan HBsAg kaybı olan hastaların %21'inde (+)

Antiviral tedavi alan hastalarda

- Tedavinin indüklediği HBeAg serokonversiyonu tanımlanması
- HBsAg kaybı tanımlanması (PEG-IFN ± NA tedavisi verilen hastalarda)
- NA kesilmesi sonrası relapsın tanımlanması

HCC hastalarında

- HCC gelişimi tanımlanmasında
- Küratif cerrahi sonrasında nüksün tanımlanmasında

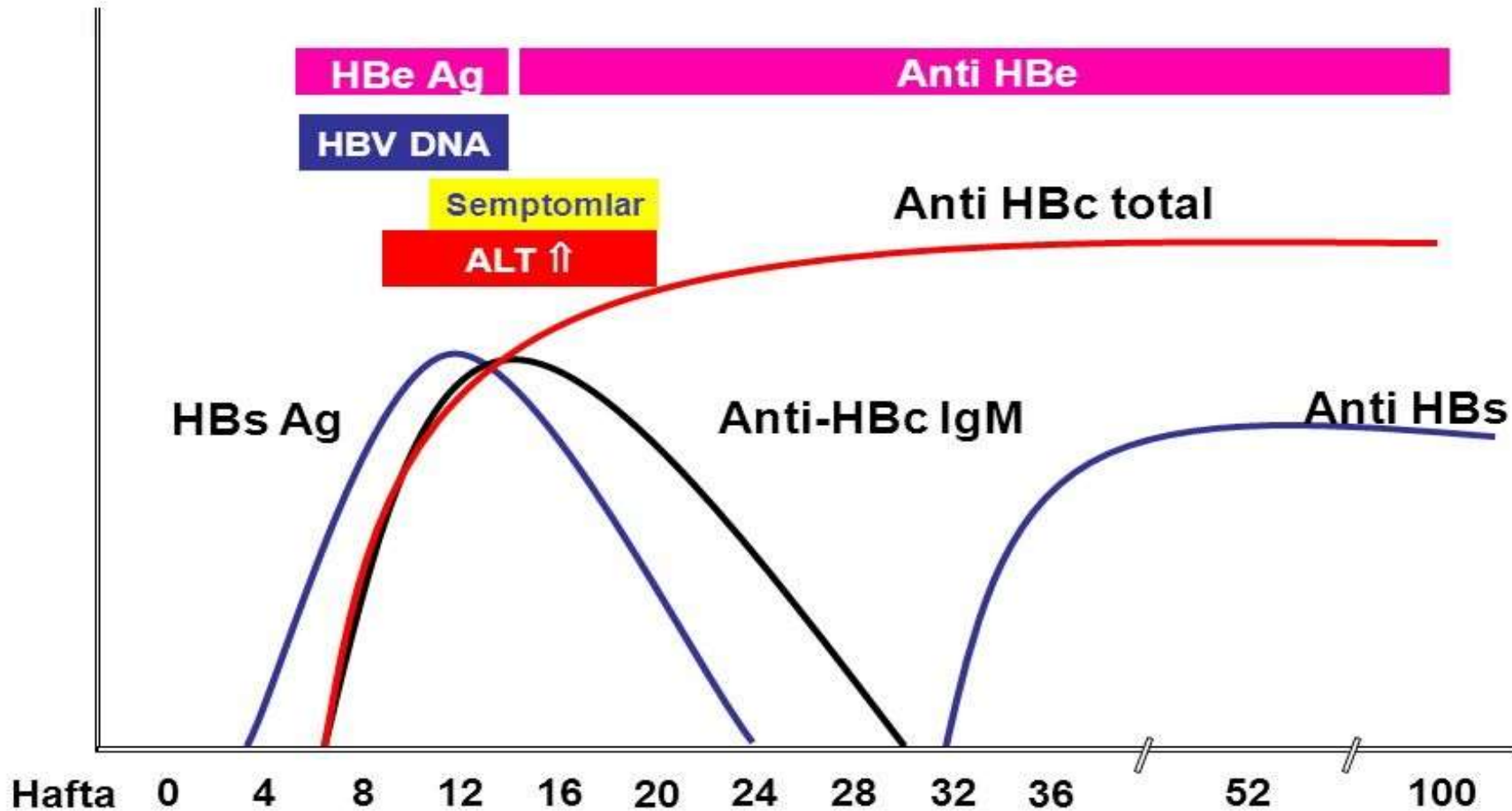
İmmünosupresif tedavi alan hastalarda

- Okült hepatit alevlenmesinin tanımlanmasında

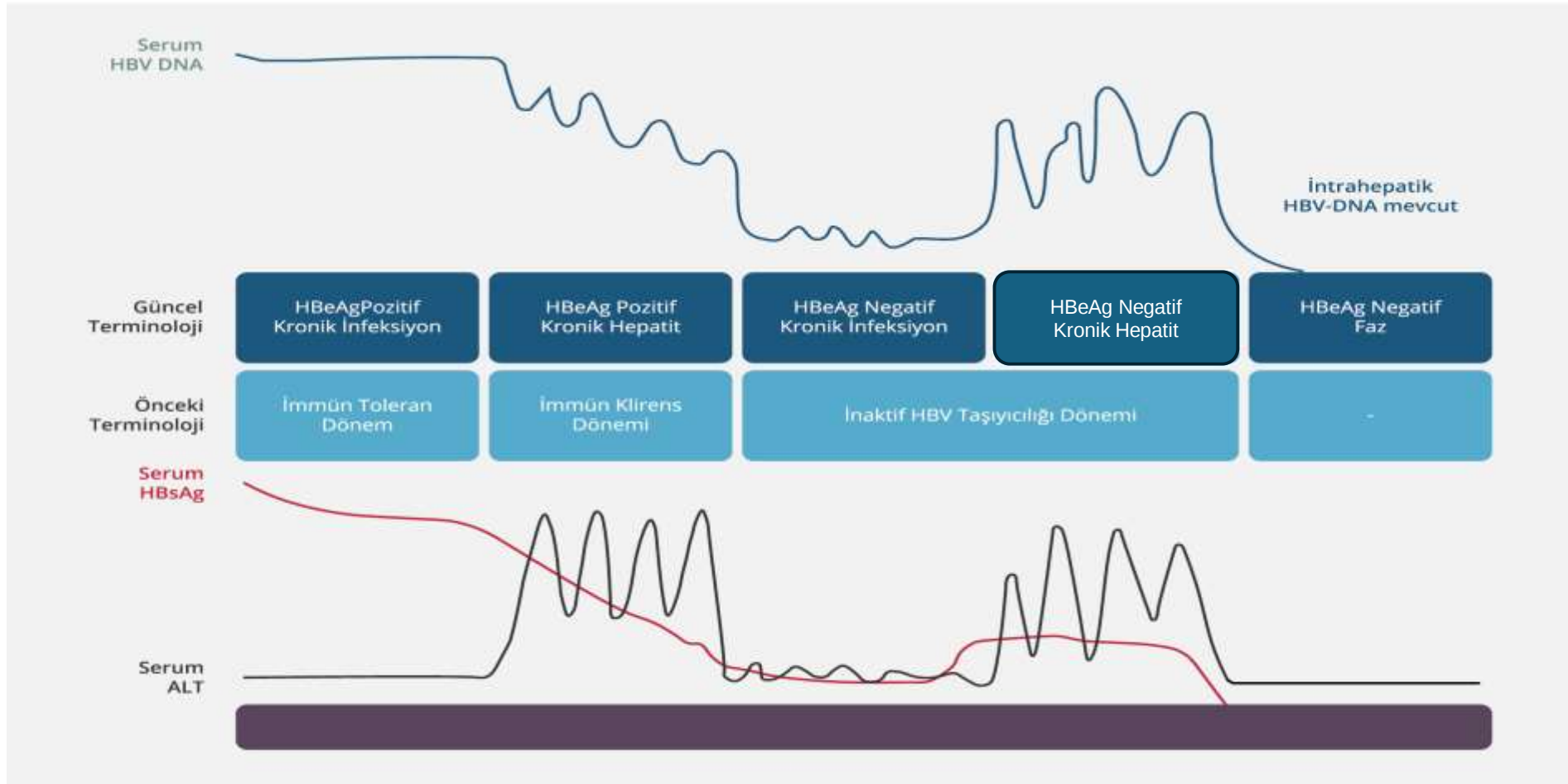
HBsAg-HBeAg
antigen, HCC
Words shown in italic represent dynamic change of HBcrAg
References of corresponding findings linked to reference list of main text



AKUT HEPATİT B SEROLOJİSİ



KRONİK HEPATİT B SEROLOJİSİ



HEPATİT B SEROLOJİSİ YORUMU

	HBsAg	Anti-HBs	Anti-HBc	HBeAg	Anti-HBe
Akut HBV	+	-	IgM (+)	+	-
Pencere Dönemi	-	-	IgM (+)	-	+
Kronik HBV (Yüksek enfektivite)	+	-	IgG (+)	+	-
Kronik HBV (Düşük enfektivite)	+	-	IgG (+)	-	+
Hastalığı Geçirerek Bağışıklık	-	+	+	-	+
Aşılanarak Bağışıklık	-	+	-	-	-



Moleküler Testler

- HBV-DNA miktarının belirlenmesi,
- Genotip analizi,
- İlaç direnci mutasyonlarının tespiti,
- “Precor/cor” mutasyon analizi

} için kullanılabilir.



Hedef amplifikasyon

- **PCR**
 - Virusun lizisi → DNA'nın saflaştırılması ve çoğaltılması → Jel elektroforezinde yürütülerek ölçülmesi
 - **Real-time PCR** (en çok tercih edilen)
- **Nükleik asit sekans bazlı amplifikasyon (NASBA)**
 - Bir karışımdaki nükleik asitlerin **tek bir sıcaklıkta** (-41 °C) sürekli amplifikasyonu için kullanılabilen primer-bağımlı yöntem
- **Transkripsiyon aracılı amplifikasyon (TMA)**
 - **İzotermal** bir reaksiyonda RNA polimeraz ve ters transkriptaz kullanarak DNA veya RNA hedeflerini çoğaltan bir RNA transkripsiyon amplifikasyon yöntemidir.

Hedef amplifikasyon avantajları

- Yüksek duyarlılık
- Yüksek özgüllük
- Kantitatif analiz imkanı
- Çeşitli nükleik asit türleri ile çalışabilme

Sinyal amplifikasyonu

Branched DNA (bDNA)

- Nükleik asitlerin kantitatif tespiti için kullanılan bir **hibridizasyon bazlı** amplifikasyon yöntemi
- Özellikle **düşük konsantrasyondaki** viral RNA veya DNA'nın belirlenmesinde kullanılır.
- PCR'den farklı olarak, hedef nükleik asit dizisini çoğaltmak yerine, **sinyali amplifiye ederek** ölçüm yapar.

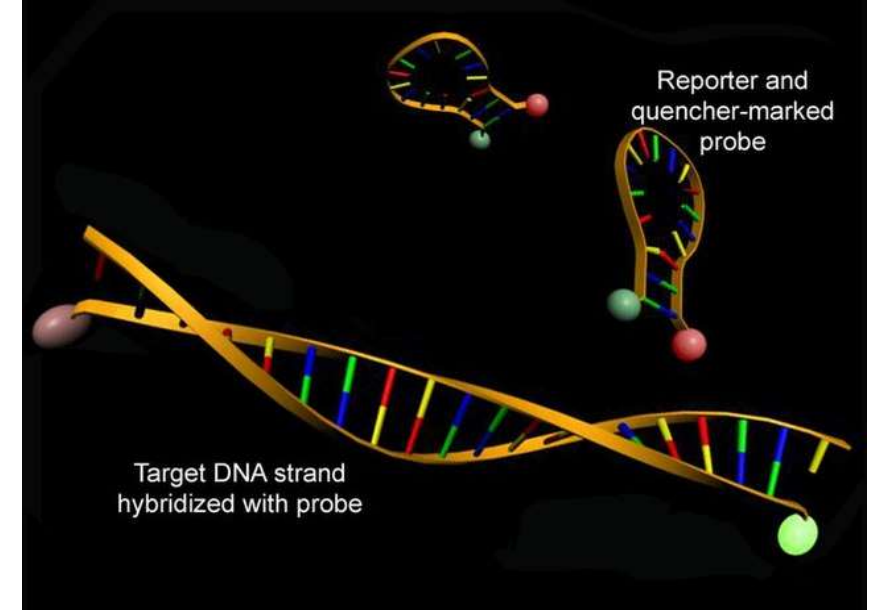
Sinyal amplifikasyonu avantajları

- Yüksek özgüllük
- Amplifikasyon hatası riski düşük
- Hassas ölçüm

G. Grech. The power of multiplexing and applications of the QuantiGene Plex Assay in oncology research and diagnostics [Webinar], Presented at Protein and Cell Analysis Education Series. 2017.

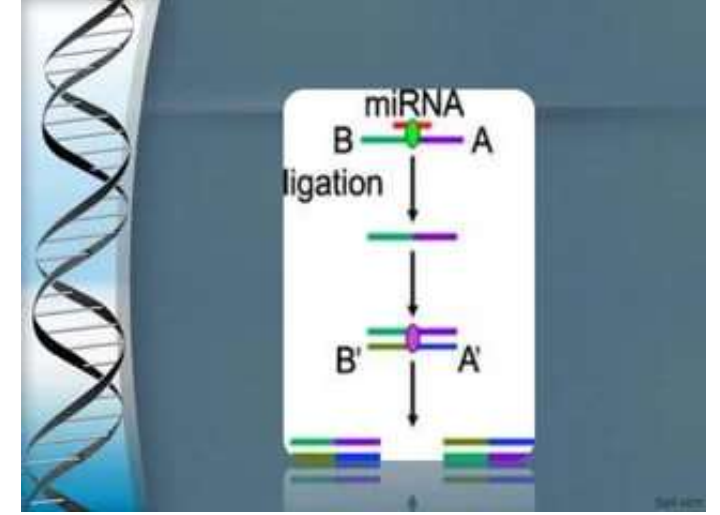
Prob amplifikasyon

- Ligaz zincir reaksiyonu
- Siklusa katılan prob tekniđi



Ligaz zincir reaksiyonu

- DNA veya RNA dizilerinin amplifikasyonu için kullanılır.
- **DNA ligaz** enzimi kullanarak hedef diziyi çoğaltır.
- **PCR gibi sıcaklık döngülerine dayanır**, ancak polimeraz yerine ligaz kullanılır.



Siklusa katılan prob tekniđi

- Hedef DNA veya RNA'nın spesifik olarak parçalanmasını ve floresan sinyal üretmesini sağlayan **izotermal** bir amplifikasyon yöntemidir.
- PCR veya LCR'den farklı olarak, hedef nükleik asidi çoğaltmak yerine, spesifik problemlerin sürekli yıkımıyla sinyal üretir.

Siklusa katılan prob tekniği avantajları

- İzotermal olması
- Hızlı ve kantitatif analiz sağlaması
- Hedef DNA çoğaltılmadığı için kontaminasyon riskinin düşük olması

Yeni biyobelirteçler

HBV Biomarker	Summary of Uses and Limitations
Serum HBV RNA	- Surrogate of cccDNA transcriptional activity - Serum HBV RNA levels can be used to differentiate HBeAg-negative phases of CHB - Prediction of HBeAg seroconversion - Prediction of SVR in patients on peg-IFN and/or NAs - Larger cohorts and improved sensitivity required - No standardized assay to date
HBeAg	- Correlates with cccDNA - Levels can distinguish between active and inactive disease - Prediction of HBeAg or HBsAg seroconversion, development of cirrhosis - Monitoring of response to treatment - Many factors may lead to faulty interpretation (i.e., anti-HBe, mutations affecting expression of HBeAg) - Limited availability of assay - Should be further investigated with larger and more diverse cohorts
HBV-NRAg	- Higher sensitivity than PreS1 manual ELISAs - Highly correlates with HBV DNA positivity - Positivity associated with liver abnormalities - Qualitative test - Clinical utility remains to be further evaluated with larger cohorts
qHBsAg	- Monitoring of response to treatment and SVR - Prediction of HBsAg loss - Prediction of development of liver fibrosis and HCC - May reflect cccDNA levels in the liver
Ultrasensitive HBsAg	- Limit of detection 0.2–5 mIU/mL - Early detection of acute infection - To monitor for reactivation or subclinical levels of HBsAg following seroclearance
qAHBc	- Correlates with ALT during treatment - Prediction of development of liver fibrosis and necro-inflammation - Monitoring treatment and SVR - Identification of occult HBV - Wantai assay has narrow range of quantification

Serum HBV-RNA

- cccDNA aktivitesi
- Kronik hepatit B'nin HBeAg (-) evrelerinin ayrımı
- HBeAg serokonversiyonu tahmini
- Antiviral alan hastaların kalıcı viral yükünün tahmini

HBV nükleik asit ilişkili antijen (HBV-NRAg)

- Kalitatif bir test
- HBV-DNA ile yüksek korelasyon

Kantitatif HBsAg (qHBsAg)

- İntrahepatik cccDNA düzeyini yansıtır
- HBsAg kaybı, fibrozis ve HCC gelişimi tahmini

Ultrasensitif HBsAg

- Akut enfeksiyonun erken saptanması
- Seroklirensi takiben subklinik HBsAg seviyesi/reaktivasyon monitörizasyonu

Kantitatif Anti-HBc (qAHBc)

- Tedavi esnasında ALT ile korele
- Fibrozis tahmini
- Tedavi ve kalıcı viral yanıt monitörizasyonu
- Okült HBV tanısı



Sonuç



- Serolojik testler, **infeksiyon evresini belirlemede** ve **bağışıklık durumunu değerlendirmede** kritik rol oynar.
- Moleküler yöntemler, **HBV DNA varlığını ve miktarını tespit ederek** hastalığın takibi ve tedavi yanıtının değerlendirilmesini sağlar.
- HBV-RNA, HBV-NRAg ve qHBsAg gibi yeni biyobelirteçler, HBV'nin seyri ve tedaviye yanıt açısından daha hassas öngörüler sunmaktadır.
- Erken teşhis ve bireyselleştirilmiş tedavi yaklaşımları için serolojik ve moleküler testlerin birlikte kullanımı giderek önem kazanmaktadır.



TEŞEKKÜRLER...

