

HCV ENFEKSİYONUNDA MİKROBİYOLOJİK TANI

Dr. Güneş Özçolpan

Aydın Adnan Menderes Üniversitesi

Tıp Fakültesi

Tıbbi Mikrobiyoloji AD

THE LANCET

Volume 312, Issue 8095, 21 October 1978, Pages 853–856

Originally published as Volume 2, Issue 8095



HEPATITIS "C" ANTIGEN IN NON-A, NON-B POST-TRANSFUSION HEPATITIS

Ryoichi Shirachi^{a, b, c}, Akira Tateda^{a, b, c}, Hiroyuki Shiraishi^{a, b, c}, Kaneo Kikuchi^{a, b, c}, Nakao Ishida^{a, b, c}

^a Department of Microbiology, Miyagi Prefectural Institute of Public Health, Sendai, Japan

^b Surgical Clinic of National Sendai Hospital, United Kingdom

^c Department of Bacteriology, Tohoku University School of Medicine, Sendai, Japan

nonA - nonB hepatitli hastaların serumunda ...

yeni bir “hepatit spesifik antijen” tanımlanmış

“Hepatit C antijeni” terimi önerilmiş

HEPATİT C VİRÜSÜ

- 1989 ...
- nonA - nonB hepatitli hastaların serumlarıyla enfekte edilmiş şempanzelerin plazmalarından → HCV genomu tanımlandı



Harvey J. Alter, Michael Houghton ve Charles M.

2020 Nobel Tıp Ödülü

SINIFLANDIRMA (ICTV)

2022 EC 54, Online meeting, July 2022;
Email ratification March 2023 (MSL #38)

Renamed

Realm: *Riboviria*
Kingdom: *Orthomovirae*
Phylum: *Kitrinoviricota*
Class: *Flasuviricetes*
Order: *Amarillivirales*
Family: *Flaviviridae*
Genus: *Hepacivirus*
Species: *Hepacivirus hominis*

Proposal: [2022.0075.Flaviviridae_1genren_srenamed](#)

Export lineage: [Copy to the clipboard](#) or [Download](#)

2020 EC 52, Online meeting, October 2020;
Email ratification March 2021 (MSL #36)

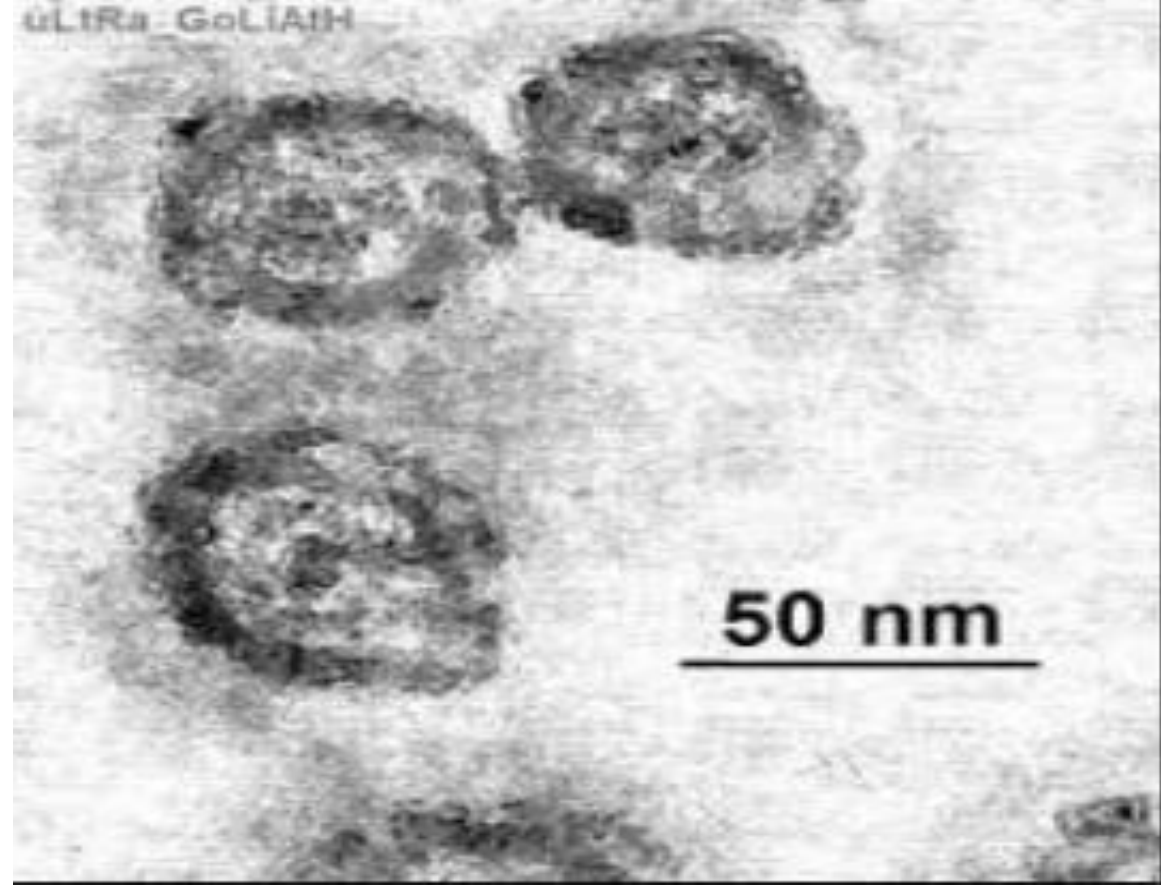
Removed as Type Species

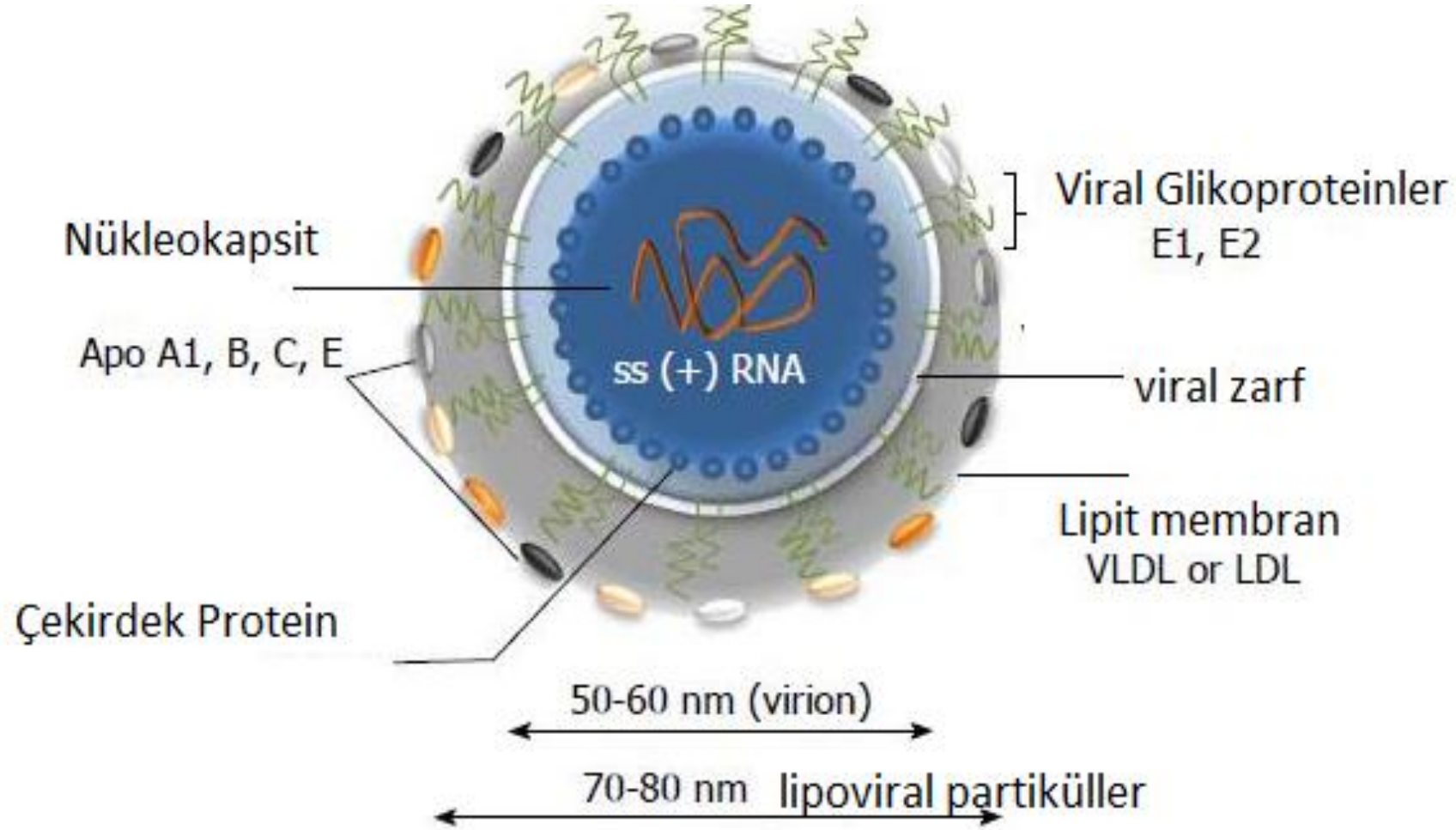
Realm: *Riboviria*
Kingdom: *Orthomovirae*
Phylum: *Kitrinoviricota*
Class: *Flasuviricetes*
Order: *Amarillivirales*
Family: *Flaviviridae*
Genus: *Hepacivirus*
Species: *Hepacivirus C*

Proposal: [2020.0016.R.Abolish_type_species](#)

HCV YAPISI

55 nm apında
Küresel yapı
Zarflı
Pozitif polariteli
Tek iplikikli
RNA virüsü

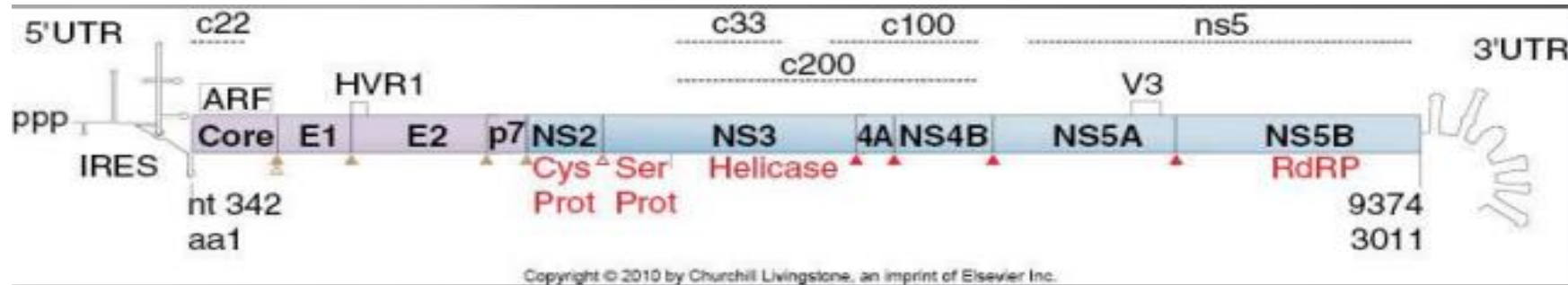




HCV GENOM ORGANİZASYONU

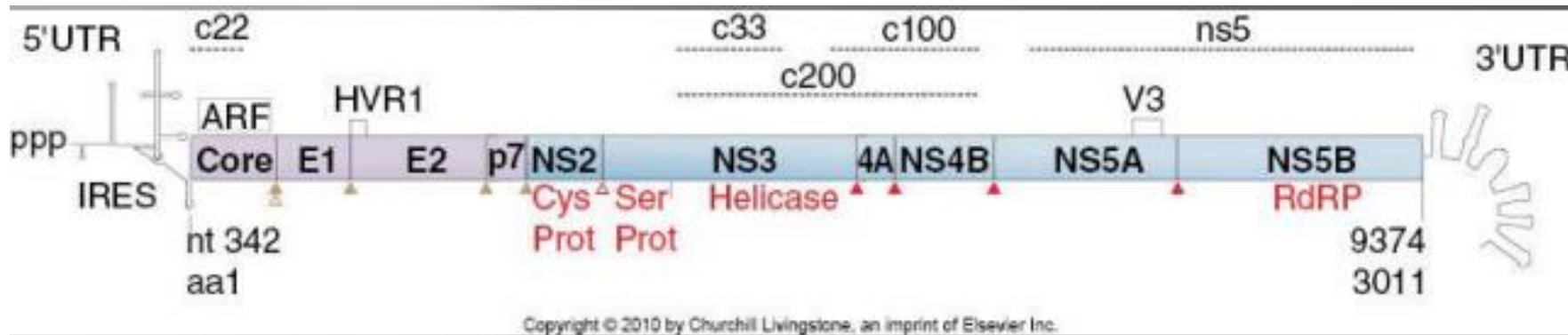
HCV genomu 9600 nükleotid uzunluğunda

- 1 açık okuma çerçevesi (ORF) → yaklaşık 3000 aminoasitlik tek bir **viral polipeptid prekürsörünü** kodlar

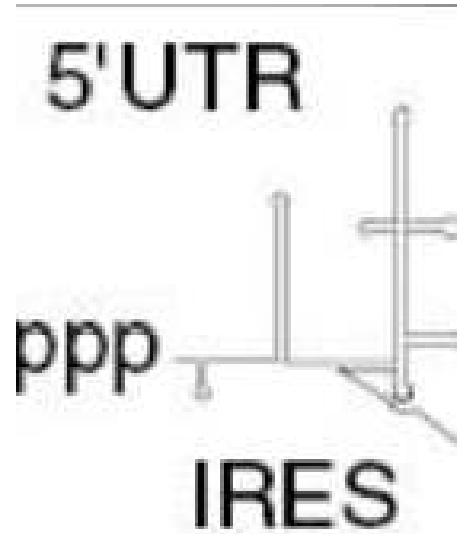


HCV GENOM ORGANİZASYONU

- HCV genomunun 5' ve 3' uçlarında protein kodlamayan (*non-coding region*; NCR ya da *untranslated region* ; UTR) bölgeler bulunur
- İyi korunmuş bölgeler
- Viral proteinlerin translasyonunda ve virüsün replikasyonunda görev alır

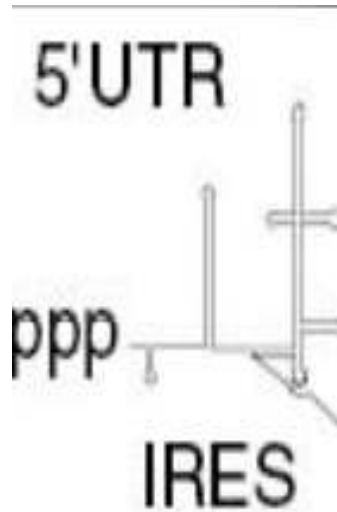


5'UTR BÖLGESİ



- Yaklaşık 340 nükleotid uzunluğunda
- Üst üste binen **iki ayrı fonksiyonel bölgesi** var
 - Birinci bölge 125 nükleotid uzunluğunda ve viral replikasyon için gerekli
 - **RNA'nın viral replikaz tarafından tanınmasını sağlar**

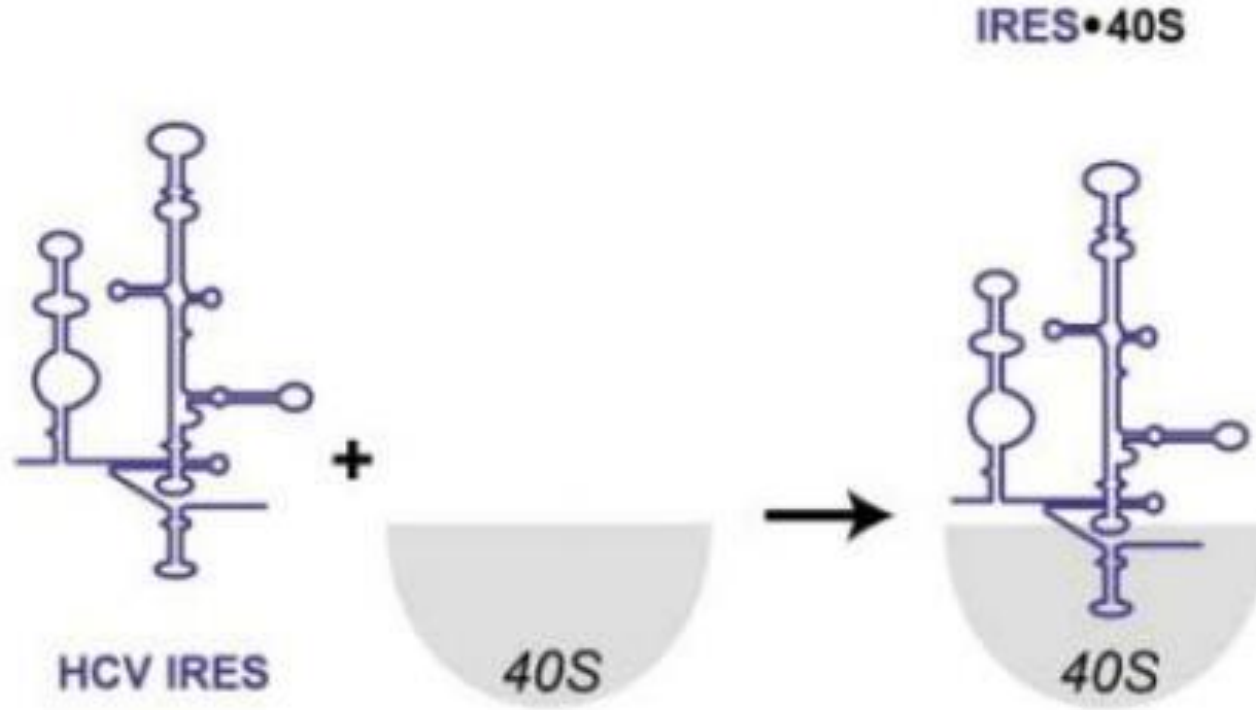
IRES (INTERNAL RIBOSOMAL ENTRY SITE)



İlk bölge ile çakışan 300
nükleotidlik ikinci bölge



***“Internal Ribozomal Entry Site
(IRES)” bölgesi***



IRES translasyon başlatıcı faktöre gerek duymadan, **doğrudan** ökaryotik ribozomun 40S alt ünitesine **bağlanma** yeteneğinde

3' UTR BÖLGESİ

- 3' UTR bölgesi, 30-60 nükleotidlik bir segment
- Bunu izleyen değişken 50-100 nükleotidlik polyU/UC segmenti vardır
 - PolyU/UC segmentinin HCV'nin temel "patojen ilişkili moleküler yapı (PAMP)" sı olduğu gösterilmiş
 - Bu yapı, "insan sitoplazmik yapı tanıma reseptörü (PRR)" RIG-1 tarafından tanınır



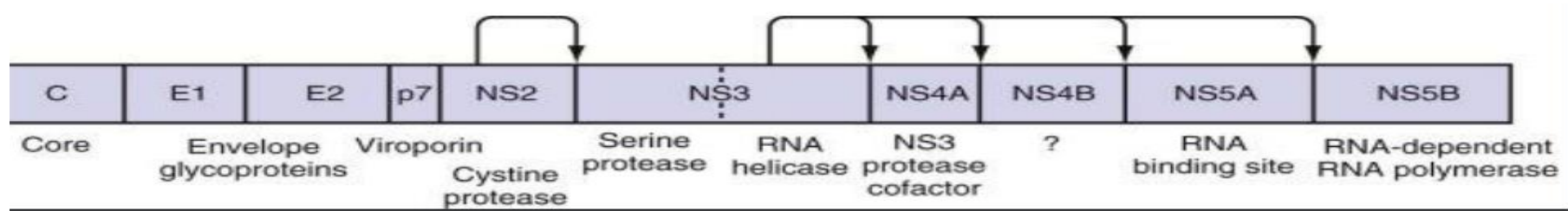
- PolyU/UC segmentinin sonunda iyi korunmuş 98 baz sekanslı (3'-X bölgesi) bulunur
 - 3'-X bölgesi HCV genomundaki en iyi korunmuş segment

TRANSLASYON VE POLİPROTEİN OLUŞUMU

- Ribozom 5' UTR bölgesindeki **IRES'e** bağlanır ve translasyon başlar ... **Tek bir poliprotein**
- Konağa ve virüse ait proteazlar tarafından kesilir
 - **10 adet yapısal ve yapısal olmayan proteine ayrılır**

TRANSLASYON VE POLİPROTEİN OLUŞUMU

- **Yapısal proteinler**
 - **C:** Core/Çekirdek/Kapsit
 - **E1 ve E2:** Zarf proteinleri
 - **hücresel proteazlar** tarafından kesilir
- **Yapısal olmayan proteinler virüs tarafından kodlanan proteazlar** tarafından kesilir
 - NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A ve NS5B



YAPISAL PROTEİNLER

C proteini

- RNA ile birlikte nükleokapsitin ana yapısını oluşturur
- **IFN üretimini baskılar**
- Hücre içinde **lipid birikimi ve insülin direnci** ile ilişkili

YAPISAL PROTEİNLER

E1 ve E2 Proteinleri

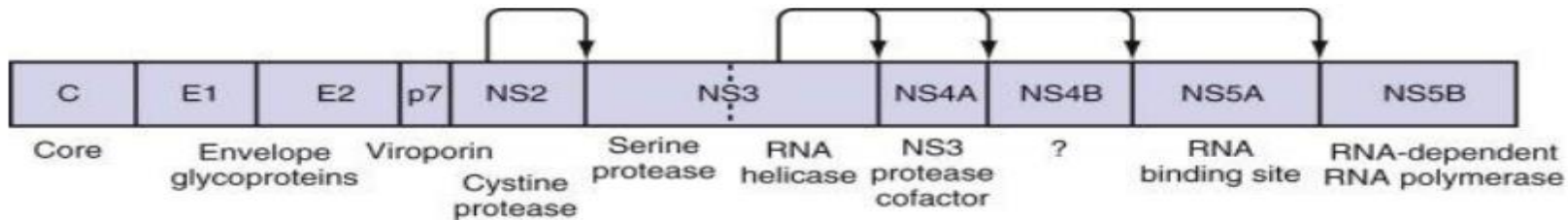
– Hücre **yüzey reseptörlerine bağlanma ve füzyondan** sorumlu

E2 → Hücresel reseptörlere bağlanmada

E1 → Füzyonda rolü var

NS3

- Serin proteaz, RNA helikaz ve nükleozid trifosfataz (NTPaz) aktiviteleri gösterir
- NS3, NS4A'ya bağlanarak **serin proteaz** aktivitesi gösterir
 - Bu serin proteaz enzimi **kendisinden sonraki NS proteinlerin poliproteinden kesilerek ayrılmasından** sorumlu -
- **Helikaz** aktivitesi ile konak DNA'sını açar



NS5A

- Replikasyonda önemli
- İnfekte hücrelerde apoptozisi inhibe eder
- IFN yanıtıyla ilişkili

NS5B

- RNA bağımlı RNA polimeraz
- 5'- 3' ekzonükleaz aktivitesinin olmaması
 - Replikasyon sırasında yüksek oranda mutasyona neden olur

GENOTİPLER

- HCV **yüksek mutasyon hızına** sahip
 - RNA bağımlı RNA polimeraz enziminin hata düzeltme özelliği yok
 - **Yüksek viral turnover** → günde 10^{10} - 10^{12} virion oluşmakta
 - HCV'nin serumdaki yarı ömrü **45 dakika**

... Genetik çeşitlilik....

Genotipler virüsün evrimi sırasında ortaya çıkmış

- HCV kökenlerinde **genetik farklılıklar** yaygın
- **7 genotip** ve **çok sayıda alt tip**
- Genotipler, **%70**; alt tipler, %85 sekans benzerliği gösterir

- Genotiplendirmede **altın standart tüm genomun dizi analizi**
 - Ancak pahalı olduğundan **çekirdek, E1 ve NS5** gibi protein kodlayan bölgelerden **en az birinin** dizi analizi yapılması önerilmekte
- Virüsün **5'-UTR** bölgesinin kullanıldığı genotipleme yöntemlerinin doğruluğu yaklaşık **%95**

PATOGENEZ

- HCV sitopatik etki oluşturmaz
- Kronik hepatit C patogenezindeki temel süreç, **immün sistem aracılı inflamatuvar hasar**
- Karaciğerdeki **lenfomononükleer infiltrasyon** esas olarak **CD8 T lenfositler tarafından** oluşturulur

PATOGENEZ

HCV enfeksiyona bağlı karaciğer hasarında

- Steatoz
- Safr kanalalı hasarı
- Portal yolların içinde lenfoid foliküller

Enfeksiyon → Siroz → Hepatoselüler karsinom

HCV BULAŞ YOLLARI

Perkütan

Nazokomiyal

Perinatal

Cinsel

- **Gelişmiş ülkelerde** en önemli bulaş yolu **intravenöz uyuşturucu** kullanımı
- **Gelişmekte olan** ülkelerde **iyatrojenik** nedenler ön planda

HCV TANISI

Tablo 1 Hepatit C Virüsü (HCV) tanısının tarihsel perspektifi Yıl

Teşhis yöntemi	Açıklama
1989 HCV'nin tanımlanması	HCV ilk kez tanımlanarak odaklanmış araştırmaların başlangıcı oldu
1990'ların Serolojik Testleri	HCV antikorları için ELISA ve RIBA dahil olmak üzere çeşitli serolojik test yöntemlerinin geliştirilmesi
1992 ELISA Testi	HCV'ye karşı antikorlar için ilk serolojik taramaya olanak tanıyan ilk kan testinin başlatılması
2000'ler PCR Testi	HCV RNA'nın tespiti için Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) testinin kullanıma sunulması ve teşhis doğruluğunun artırılması
2010'lar Doğrudan Etkili Antiviraller (DAA'lar) İzleme	Viral yükün ve tedaviye yanıtın izlenmesi, tedaviye başlanmasıyla mümkün hale gelmiştir yönetim stratejilerinin iyileştirilmesi, DAA'ların
2020'lerin Gelişmiş RNA Tespit Yöntemleri	HCV RNA'nın saptanması için RT- dahil olmak üzere hızlı ve hassas yöntemlerin geliştirilmesi Düşük kaynaklı ortamlarda kullanım için LAMP testleri

Serolojik testler

Anti-HCV

Standart testler (EIA, CLIA)

RIBA /LIA

Hızlı testler

HCV kor antijen

Kombo (antikor + antijen)

ELISA ve CLIA Temelli Testler

- **1. kuşak testler...** 1992 ... NS4 bölgesi... rekombinant c100-3'e karşı gelişen antikorları saptar
 - Duyarlılığı %70-80 ... yanlış negatif ve yanlış pozitif sonuçlar
 - Antikor varlığını saptama süresi enfeksiyon başlangıcından 15-16 hafta sonrası
- **2. kuşak testler...** NS4 rekombinant proteinlere (5-1-1 ve c100) + kor bölgesinden (c22-3) + NS3 bölgesinden (c33c veya c200) türetilmiş iki rekombinant protein daha içerir
 - İkinci nesil testlerle akut enfeksiyonlarda enfekte bireylerin %92-95'i tespit edilebilir olmuş
 - pencere dönemi de 10 haftaya kadar kısalmıştır
- **3. kuşak testler...** 1996 ... E2 proteininin HVR bölgesi + NS4A, NS4B ve NS5A bölgelerine ait antijenler + yeniden yapılandırılmış kor ve NS3 proteinleri
 - Üçüncü nesil testlerin geliştirilmiş duyarlılığı (%97)... NS3 antijeninin artan reaktivitesine atfedilirken,
 - NS5 antijeninin ilave yanlış-pozitif sonuçlar üretebileceği öne sürülmüştür
 - Yalancı pozitiflik oranlarının yükselmesi nedeniyle bazı firmalar test içeriğinden NS5 antijenini çıkarıp, antijen kompozisyonunda küçük değişiklikler yaparak duyarlılık ve özgüllüğü arttırmışlardır
 - Üçüncü nesil testler pencere dönemini 4-8 haftaya kısaltmıştır

- **4. kuşak testler...** Kor bölgesinden iki antijen + NS3, NS4A, NS4B, NS5A + genotip 1a, 1b, 2 ve 3'e ait genotip spesifik NS3 ve NS4 proteinleri eklenmiştir
 - Böylece testlerin duyarlılıkları üçüncü kuşak testlere göre daha yüksek (%99-100) hale gelmiştir
 - Bu testler pencere dönemi ortalama 26.8 gün

Anti-HCV testlerinde reaktivite eşiği

- Hasta örneği (sample) optik dansitesinin eşik değere (cut-off) oranıyla elde edilen S/CO değeri kullanılmakta
 - S/CO değerinin ≥ 1 olması üretici firmaların önerisiyle pozitif olarak kabul edilmektedir
- Düşük S/CO aralığında Anti HCV pozitiflikleri..... yalancı pozitiflik olabiliyor
 - Damar stresi yaratan (hastalıklar veya tedaviler) durumlarda yalancı Anti HCV pozitiflikleri daha sık
- FDA onaylı ELISA ve CLIA temelli ticari testlerde, test sonucunun **%95 olasılıkla gerçek pozitif** olarak kabul edildiği S/CO değeri ≥ 3.8 ila ≥ 11 aralığında değişmekte

Hızlı antikör testleri (Lateral Flow tabanlı immunokromatografik Testler)



OraQuick ADVANCE® Rapid HCV Antikör Testi



plazma

tam kan

parmak ucu veya topuk kanı

Oral sıvı

Kullanımı kolay

Ekipman ihtiyacı yok

Hızlı

Duyarlılık ve özgüllük iyi (onaylı testler)

RIBA (Rekombinant İmmunblot Testi)

Anti-HCV testinde,

S/Co oranı >3.8 ise RİBA testi pozitifliği $>95\%$

Nükleik asit testlerinin yaygın olmasından dolayı RIBA testi kullanımı sınırlandı

Alter MJ, Kuhnert WL, Finelli L. Guidelines for laboratory testing and result reporting of antibody to hepatitis C virus. Centers for Disease Control and Prevention. MMWR Recomm Rep. 2003 Feb 7;52(RR-3):1-13.

HCVcAg Testi

ELISA veya CLIA yöntemiyle çalışılır

PCR yerine daha ucuz bir alternatif

Viral replikasyonu saptama ve viral tedavi takibi için geliştirilmiş

Architect HCV core antigen assay

- Duyarlılık NATT den düşük
- Analitik duyarlılık ... 3000 IU/mL HCV RNA

HCV RNA

- Real-Time PCR
- Transkripsiyon aracılı amplifikasyon (TMA)
- ddPCR

Anti HCV Pozitif örneklerde,

Viral replikasyonu doğrulamak

Pencere döneminde akut enfeksiyon tanısı

(Bulaş sonrası 7-10 gün)

**Güncel tedavi sırasında HCV RNA ölçümleri
gerekli değildir**

**HCV eradikasyonunu doğrulamak amacıyla
tedavinin bitiminden 3 ay sonra önerilir**

HCVcAg testi HCV RNA alternatifi olabilir mi?

- Kanda HCVcAg'nin saptanması, HCV RNA'nın saptanmasına eşdeğerdir
- HCVcAg, HCV RNA ile iyi bir korelasyon gösterir
- HCV RNA testinden daha ucuz
- HCV antikor testleri ile aynı örnek üzerinde yapılabilir
 - Duyarlılık düşük; yaklaşık 3000 IU/mL HCV RNA'ya eşdeğer analitik duyarlılık
 - HCVcAg testinin duyarlılığı HCV RNA ile karşılaştırıldığında %87 ile %94 arasında değişmekte
 - Genotip 3, HIV coinfeksiyonu ve siroz varlığında düşük viral yük
 - POC HCVcAg testlerinin geliştirilmesi zor ...
- **HCVcAg-negatif/HCV antikor-pozitif örneklerde HCV RNA testi gerekecektir**

Dünya Sağlık Örgütü Hedefi

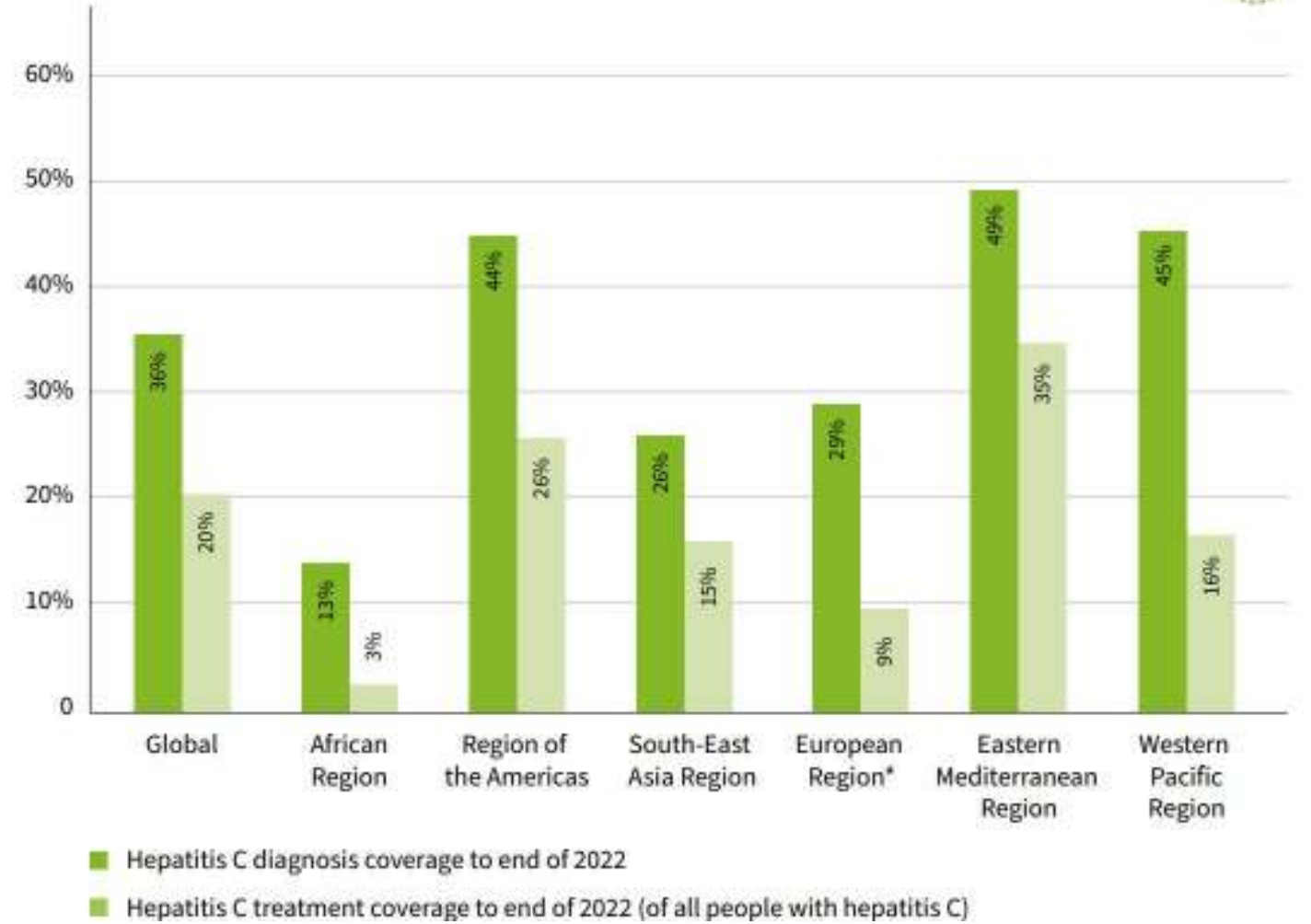
- 2016 yılında DSÖ, HCV eliminasyonu amacıyla hedefler belirledi
- **2030.... HCV enfeksiyon oranlarının %90 azaltılması ve HCV mortalitesinin %65 oranında azaltılması...**
- Toplumsal farkındalık oluşturulması
- Etkili devlet politikaları
- Etkin ve hızlı tanı ve tedaviye erişim

HCV mikrobiyolojik tanısında beklentiler

- Örnek alımının/taşıınması/işlemlenmesinin hızlı ve kolay olması
 - Serum/plazma yerine kurutulmuş kan, parmak ucu kanı vb
- Tek örnekle, en kısa sürede, az ekipman ve iş gücü gereksinimiyle, ucuz, analitik duyarlılık ve özgüllüğü yüksek yöntem
- Tüm dünyada ulaşılabilirlik

- **Yetersiz tanı** tek sorun değil
- Çoğu zaman hepatit C tanısı konulduktan sonra tedavi uygulanamamaktadır

Fig. 2.6. Coverage of hepatitis C testing and treatment by WHO region, 2022



HCV mikrobiyolojik tanı yönetimi

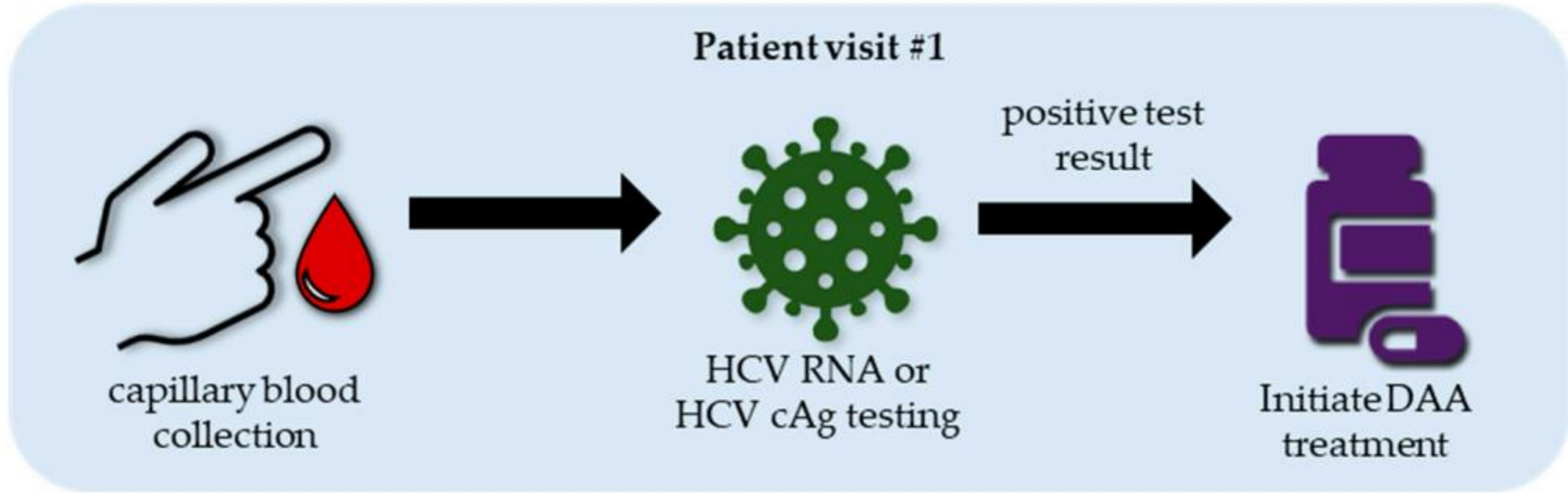
- Klasik olarak iki aşamalı bir algoritma
- İlk aşamada
 - Anti HCV testi (Otomatize sistemler... 1 iş günü), Hızlı Ab testleri... dakikalar içinde)
 - Hastanın **daha önce HCV ile karşılaştığını** gösterir
 - HCV antikorları enfeksiyonun **4-10 haftalarında saptanabilir** düzeye gelir
 - **Aktif ve geçirilmiş enfeksiyon ayrımı yapılamaz**

- **Anti HCV testi pozitifse...** ardından aktif enfeksiyonu doğrulamak için ikinci bir test yapılır
- **HCV RNA**
 - HCV RNA testi için **kan örneği alınması ek bir hasta ziyareti** gerektirir
 - Sonuçlanma birkaç gün veya hatta hafta sürebilir
 - Sonuçları almak için tekrar bir ziyaret gerekli
 - Birçok hasta bu süreçte takipten çıkıyor... Uyuşturucu kullananlar, düşük sosyoekonomik düzey, kırsal ve uzak bölgelerde yaşam...

REFLEKS HCV RNA TESTİ

- Anti HCV antikoru saptandığında otomatik olarak (refleks) HCV RNA testi çalışılması
- HCV antikoru pozitif çıkan kişilerin %20'si ile %50'si arasında değişen oranlarda takip HCV RNA testi yapılmamaktadır
 - ABD'de Quest Diagnostics laboratuvarında refleks HCV RNA testi çalışılmasıyla 30 gün içinde takip HCV RNA testi oranı %40'tan %95'e yükselmiş
 - İspanya'da HCV RNA refleks test uygulamasıyla, RNA testinin oranının %52'den %91'e çıktığını göstermiştir

B. Point-of-care HCV test and treat



- İdeal olarak, HCV viremisi POC test, tedavi gerektiren aktif enfeksiyonu olanları tanımlamak için bir tarama testi olarak kullanılabilir
 - HCV tedavisi öncesi ek testlerin (HBV, HIV, fibrozis değerlendirmesi dahil temel laboratuvar testleri) POC cihazları kullanılarak yapılabilmesi durumunda, tedavi hemen başlatılabilir

- **HCV RNA testi** teorik olarak HCV tanısı için tek adımlı bir araç olarak kullanılabilir
 - Maliyet yüksek
 - Popülasyon taramasında HCV RNA testinin büyük çoğunluğu negatif olacaktır

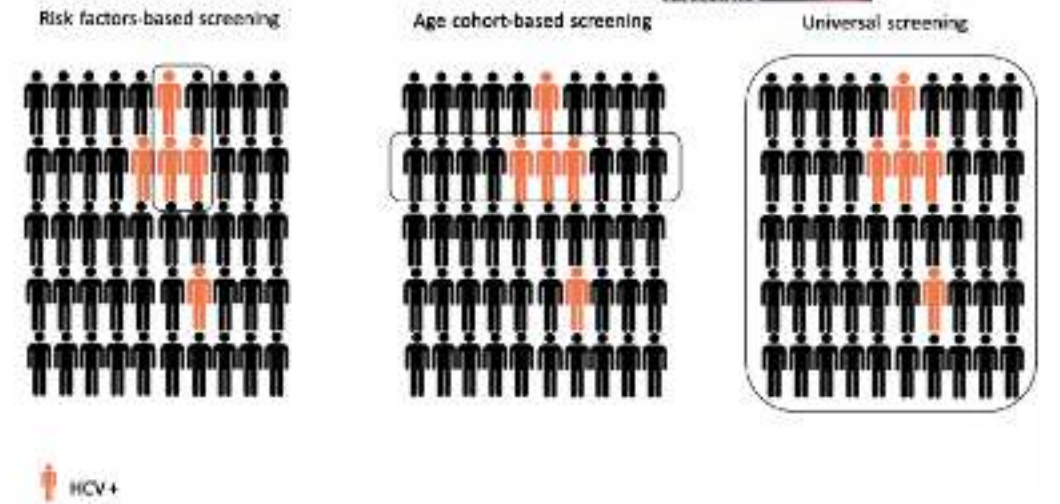
- **HCV tanısında sadece HCV RNA araştırılırsa**
 - HCV RNA negatif olup Anti HCV pozitif ancak (RNA–/Ab+) olanlar belirlenemez
 - **Geçirilmiş HCV enfeksiyonu ve spontan viral temizlenme**
 - Geçmiş öyküde riskli davranış olasılığı
 - HCV enfeksiyonu sırasında, bazı dönemlerde, **geçici olarak HCV RNA negatif olabilir**
 - Pozitif bir antikor sonucu, antikor sonucu tekrarlayan HCV RNA testi yapılmasını teşvik edecektir

Hasta başı testler

anti-HCV	Rapid Anti-HCV Test (InTec Products, Xiamen, China)	venous or capillary blood, plasma, or serum	15–20
anti-HCV	Standard Q HCV Ab Test (SD Biosensor, Suwan, Republic of Korea)	venous or capillary blood, plasma, or serum	5–20
anti-HCV	OraQuick HCV Rapid Antibody Test (OraSure Technologies, Bethlehem, PA, USA)	venous or capillary blood, plasma, serum, or oral fluids	20–40
anti-HCV	Bioline HCV (Abbott Diagnostics, Abbott Park, IL, USA)	venous or capillary blood, plasma, or serum	5–20
HCV RNA	Genedrive HCV ID kit (Genedrive, Manchester, United Kingdom)	plasma and serum	90
HCV RNA	Xpert HCV Viral Load (Cepheid, Sunnyvale, CA, USA)	plasma or serum	105
HCV RNA	Xpert HCV VL Fingerstick (Cepheid, Sunnyvale, CA, USA)	venous or capillary blood	60–75

HCV antikor taraması

- ✓ 18 yaş ve üzeri tüm bireyler için tek seferlik Anti HCV testi önerilir
- ✓ HCV enfeksiyonu riski yüksek olan 18 yaşından küçük tüm bireyler için önerilir
- ✓ Her gebelikte Anti HCV testi önerilir
- ✓ Riskli gruplarda tekrarlayan Anti HCV testi, önerilir
 - ✓ uyuşturucu kullanıcıları, parenteral tedavi alanlar, HCV pozitif anneden doğan çocuklar (18 aya kadar HCV RNA ile) gibi



Paigi et al, Liver International, 2020

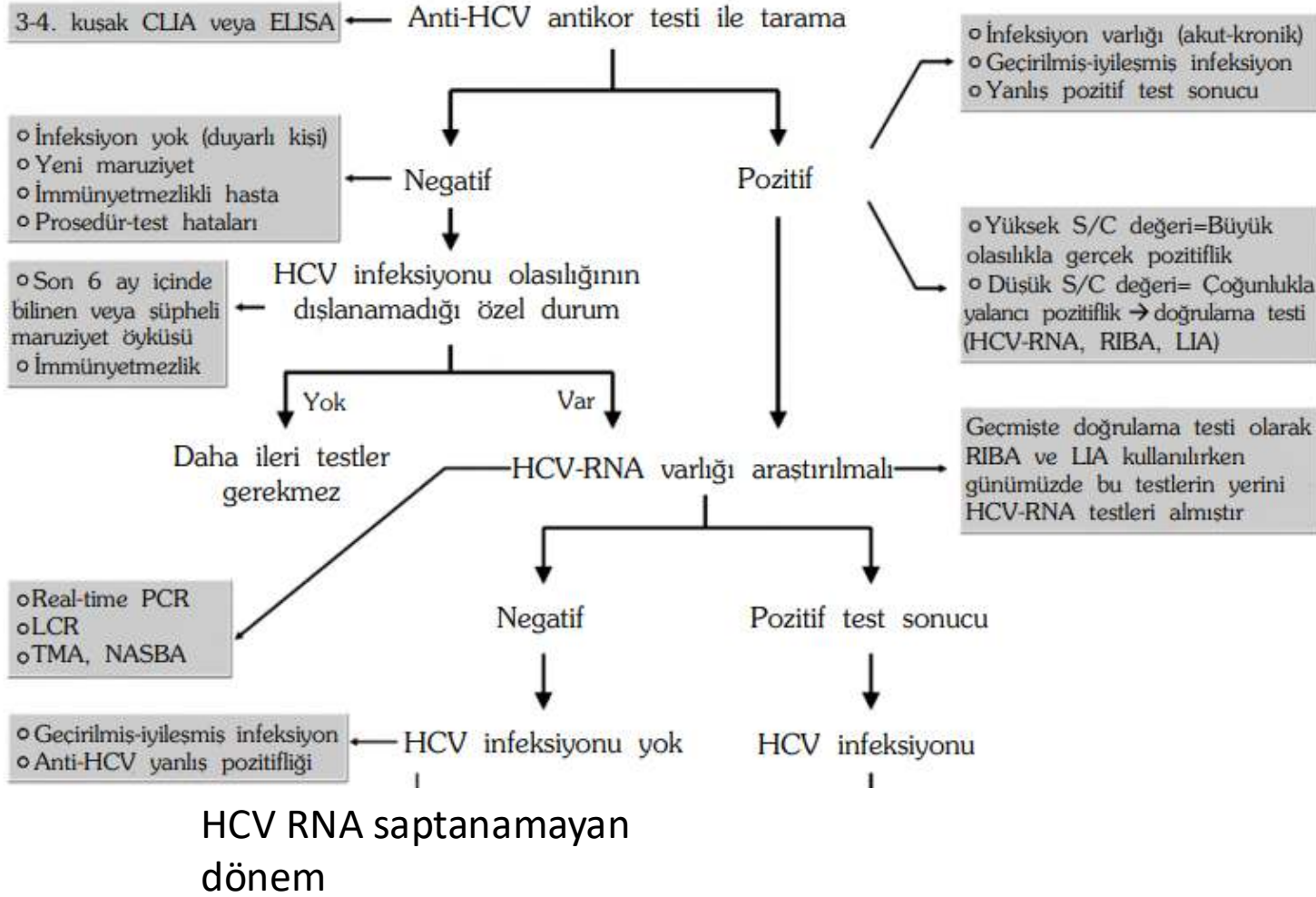
<https://www.hcvguidelines.org/evaluate/testing-and-linkage>

Türkiye Hepatit C Tanı ve Tedavi Klavuzu

Anti HCV tarama

- Sağlık kuruluşlarına baş vuran bütün hastalara riskli davranışları yoksa en az bir kere Anti-HCV
- Karaciğer hastalığı olan bireyler
 - Bütün kronik karaciğer hastaları
 - Transaminaz yüksekliği olanlar
- Risk grupları taramalı
 - Damar içi uyuşturucu kullanımı
 - Hemodiyaliz hastaları
 - Ortak kapalı alanlarda yaşayanlar (hapishane, kreş, bakımevi, askeri koğuş vb.)
 - 1996'dan önce kan ve kan ürünü alanlar,
 - 2000 yılından önce ameliyat öyküsü olanlar
 - Aile içi temas riski olanlar,
 - Ko-enfeksiyon varlığı (HBV, HIV)
 - Anti-HCV pozitif annelerin çocukları
 - Sık kan ve kan ürünü transfüzyonu olanlar
 - Riskli cinsel davranış öyküsü olanlar (Eşcinsel/biseksüel erkekler, çoklu cinsel partner, seks işçileri)
- Riskli davranışı devam eden hastalar daha önce tedavi alsalar bile hepatit C açısından 6 ayda bir değerlendirilmelidir

HCV infeksiyonlarında laboratuvar tanı algoritması





Claude Lorrain . 72