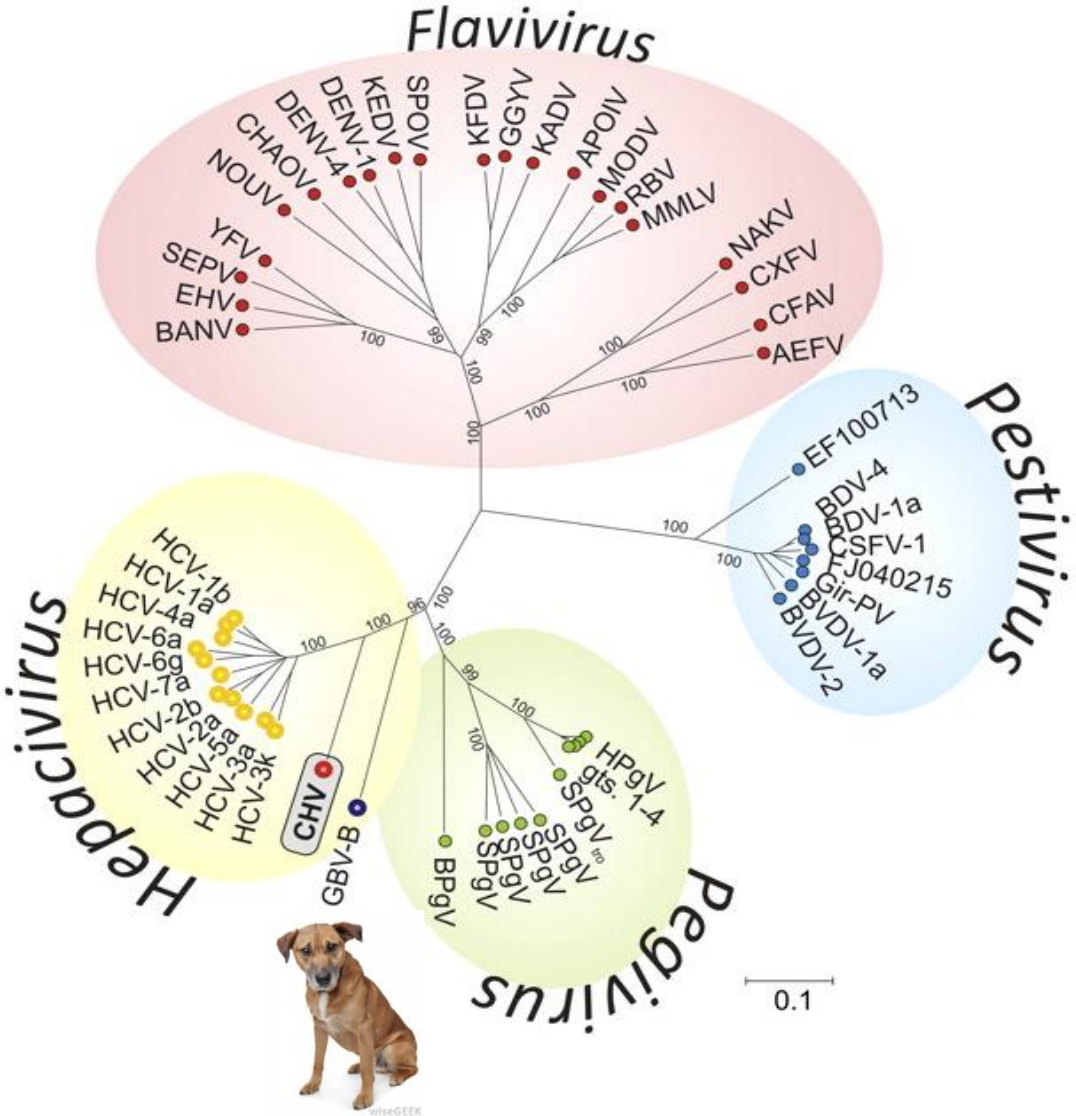




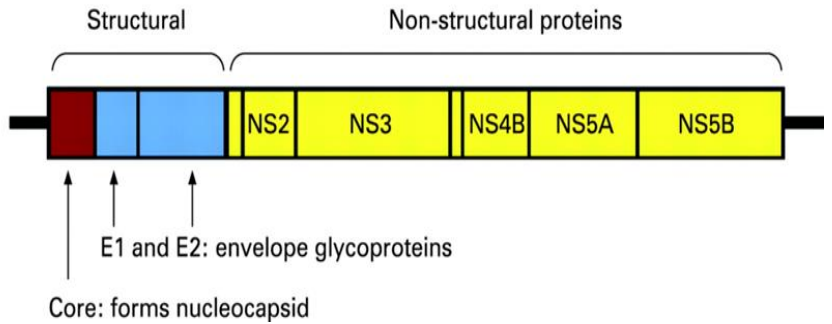
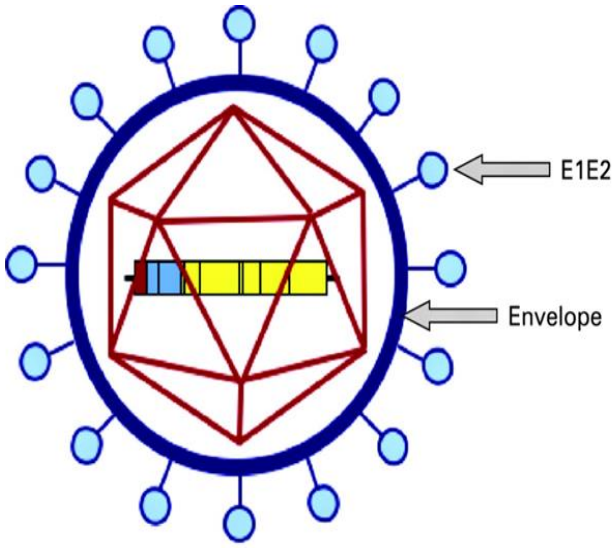
HCV Diagnostic Tests

Dr Houshang Rafatpanah
Immunology Research Center,
Mashhad University of Medical Sciences,
Mashhad, Iran

Hepatitis C



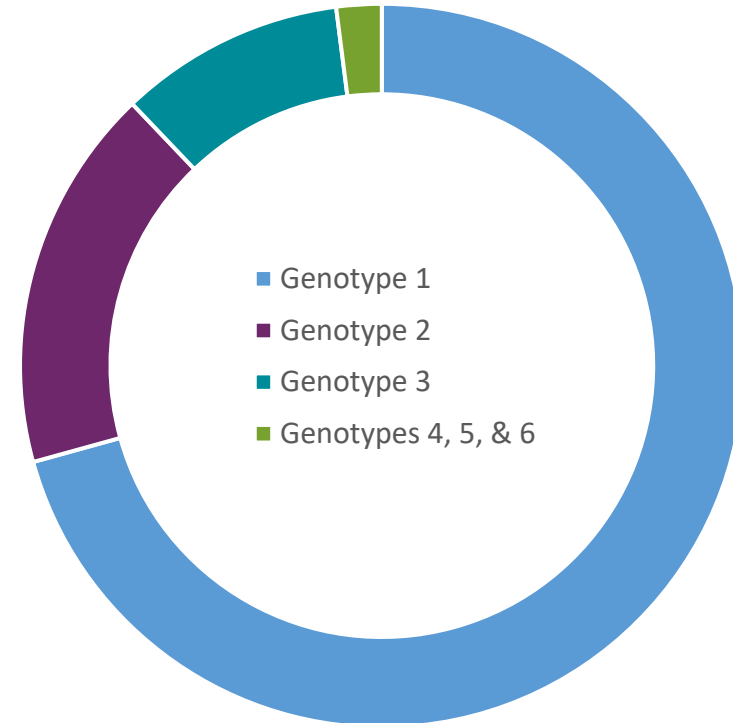
+ sense ssRNA
9.6 kB



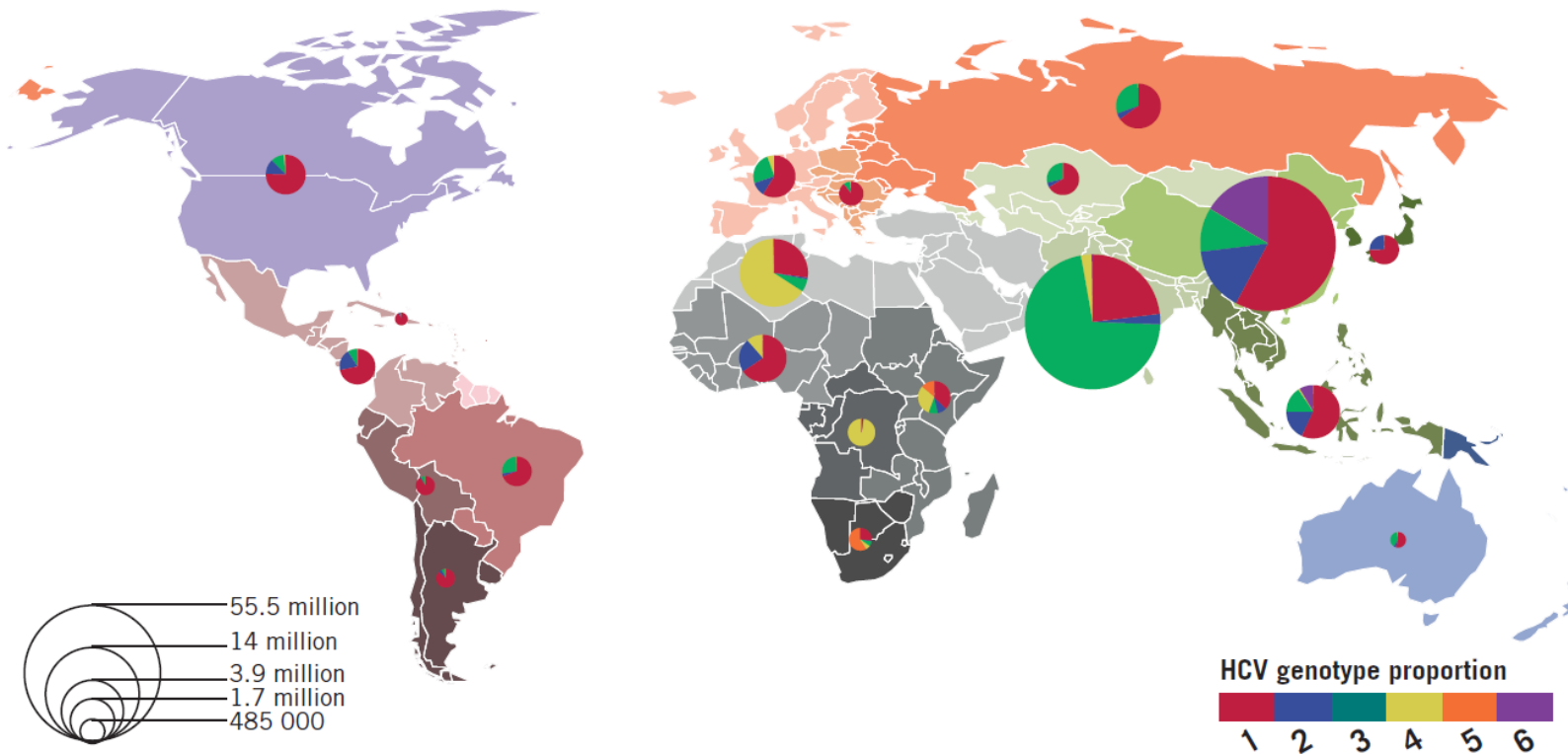
Necessity of HCV Genotyping

Genotypes of HCV are distinct groups of the virus that impact different populations and require specific treatment protocols

Genotyping is often performed as part of RNA testing, and is necessary to optimize treatment

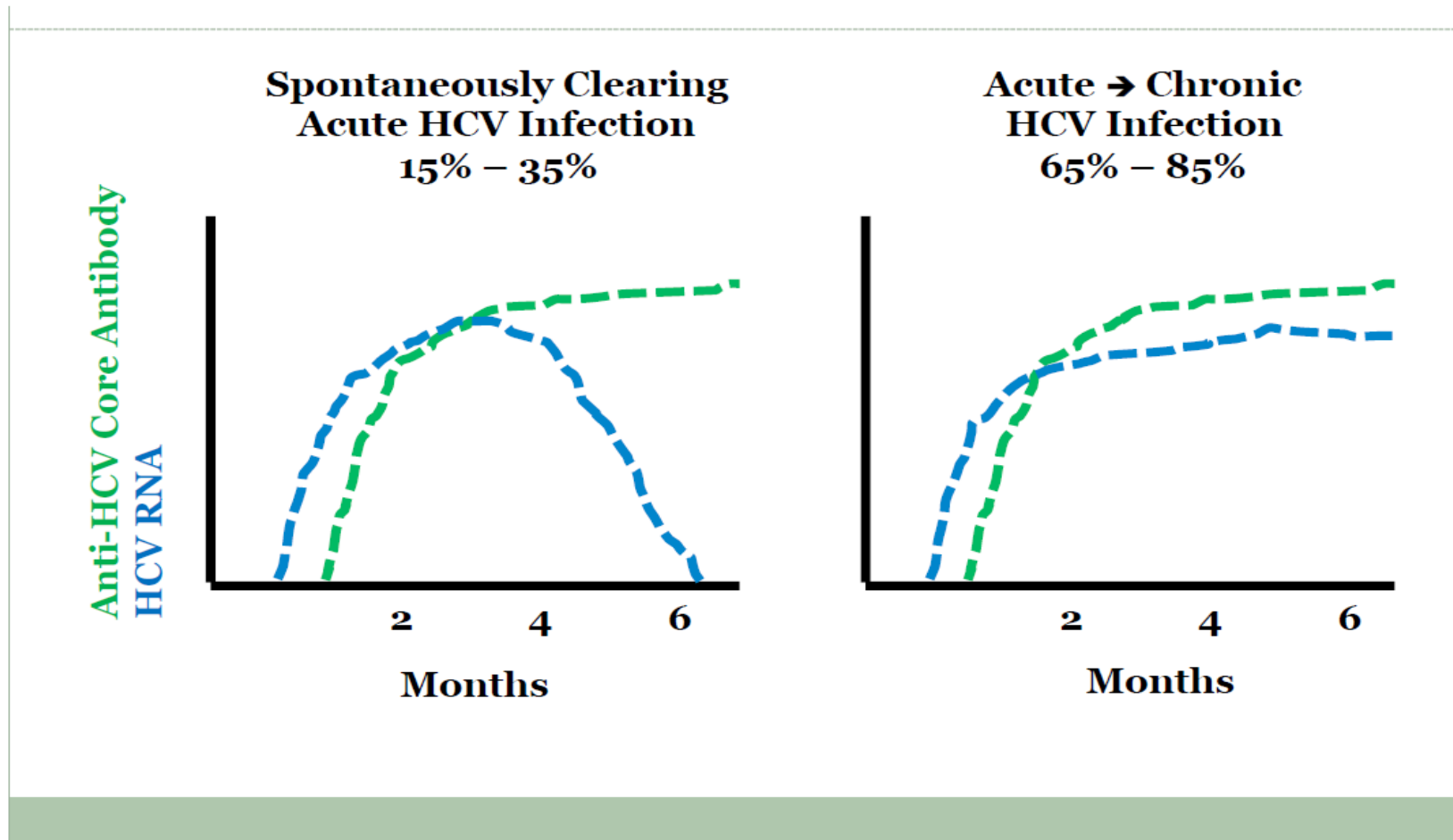


Global Distribution of HCV Genotypes

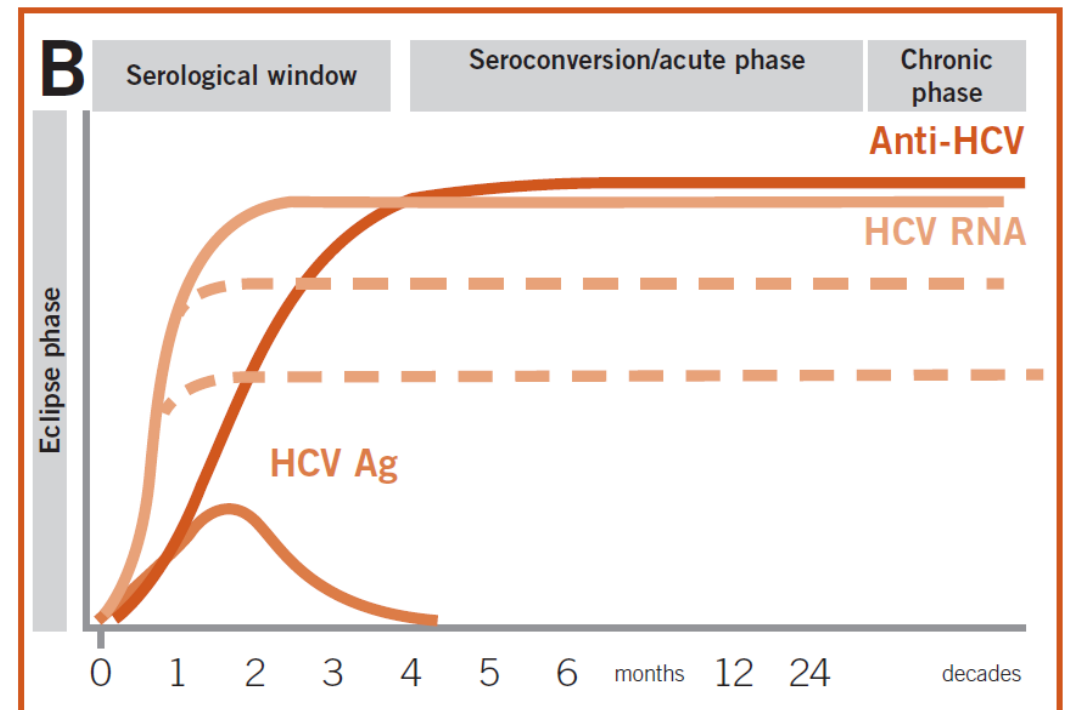
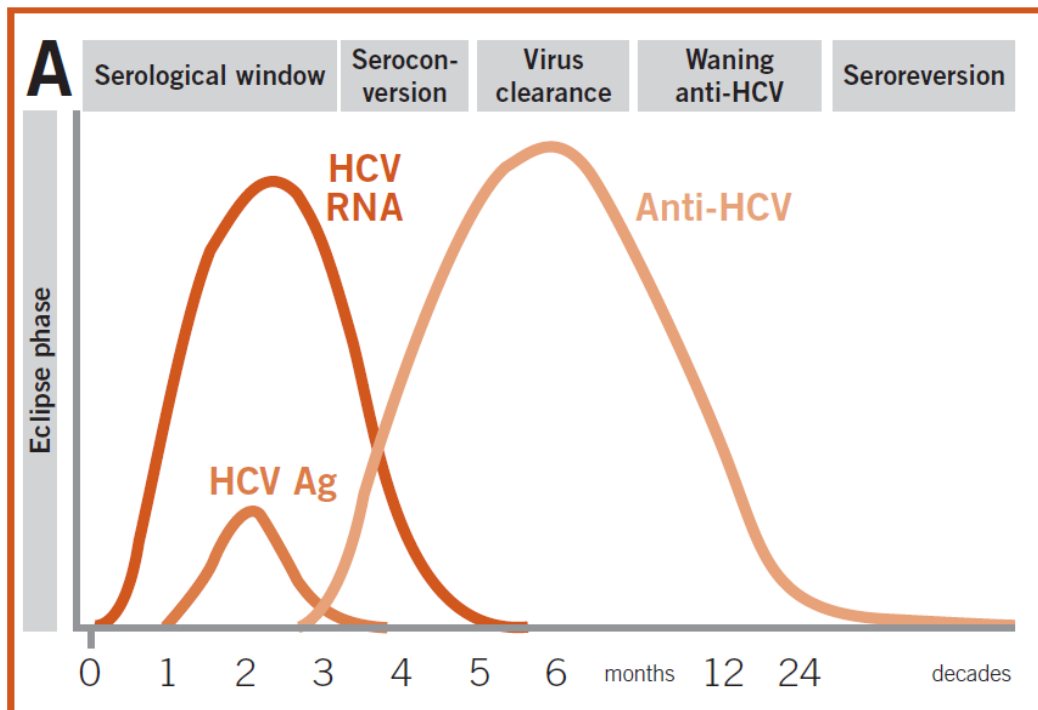


Source: Messina J.P, Humphreys I, Flaxman A, Brown A, Cooke GS, Pybus OG et al. Global distribution and

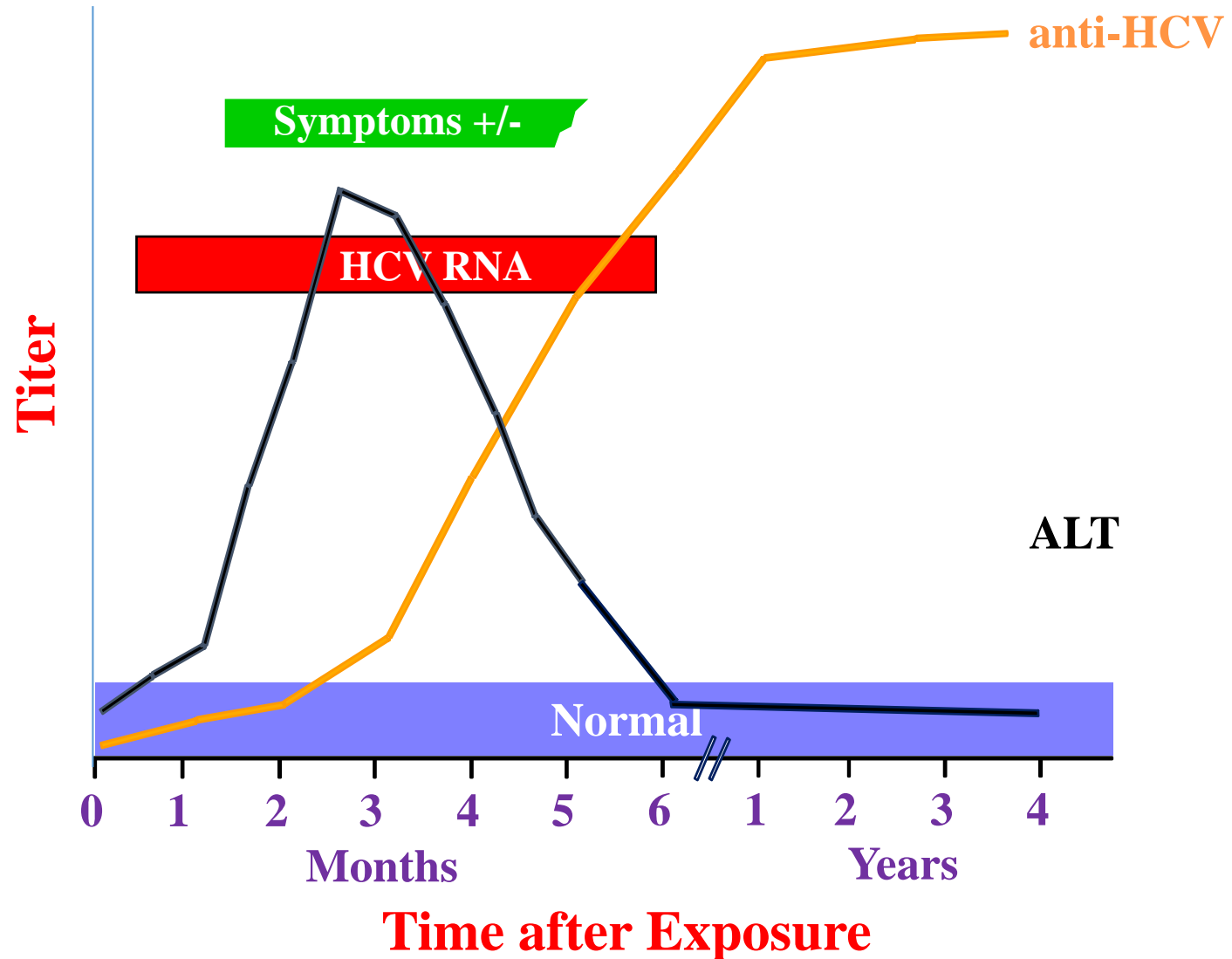
Acute HCV Infection: Viral Clearance or Chronic Infection



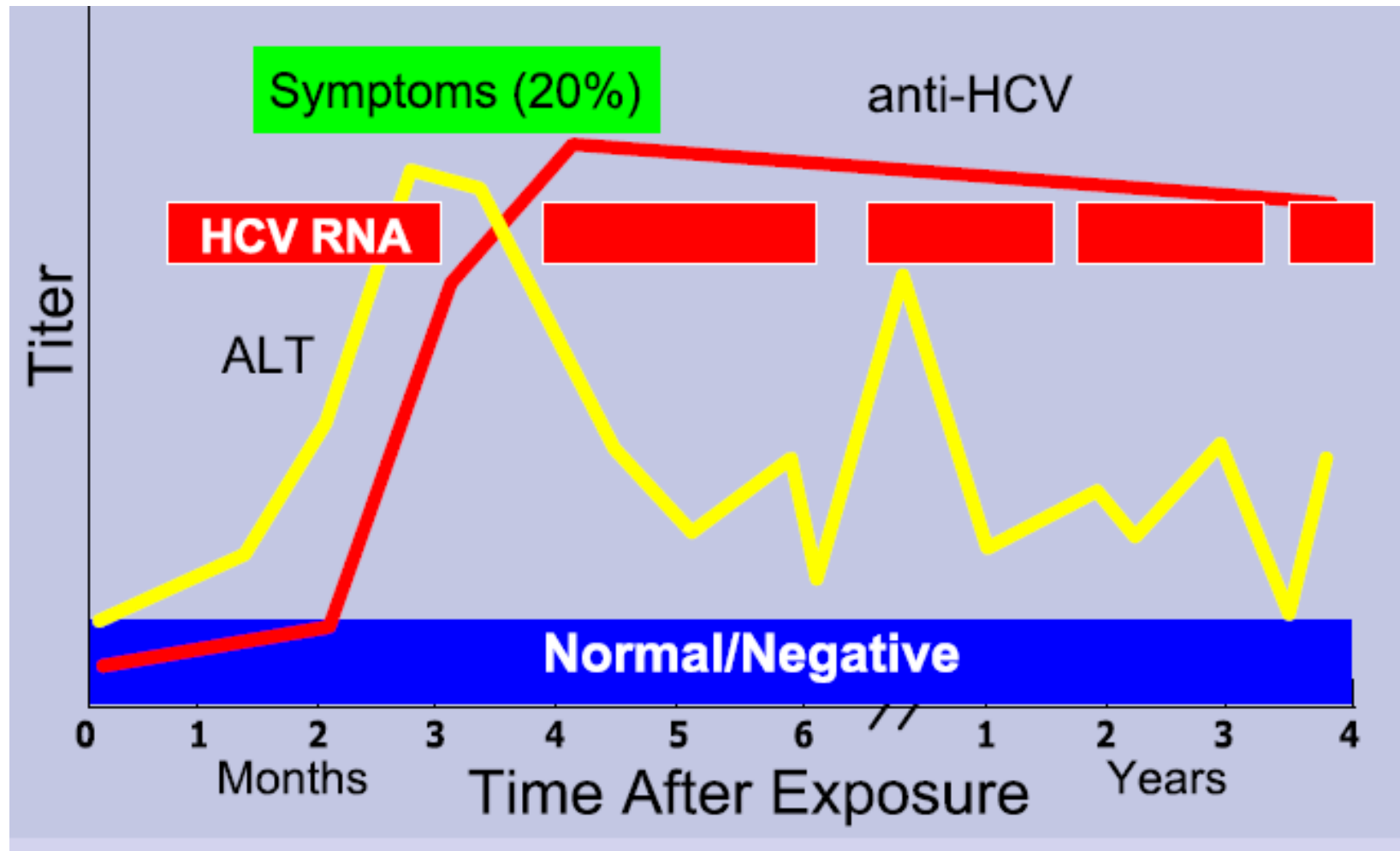
Approximate Time Course of Virological and Immunological Markers of HCV Infection with (A) Self-resolving HCV Infection, and (B) Chronic HCV Infection



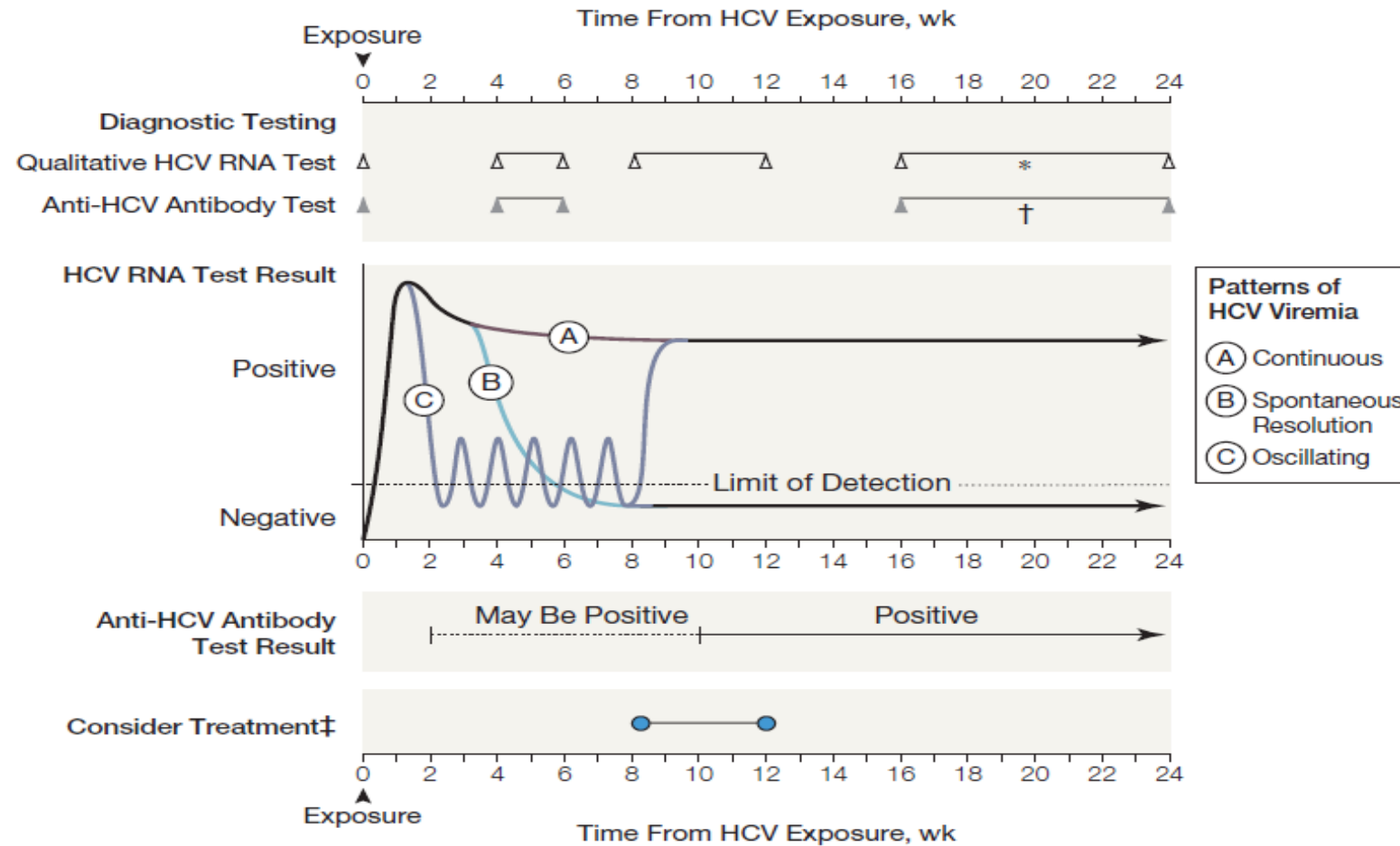
الگوی سرولوژیک عفونت حاد HCV با بهبودی



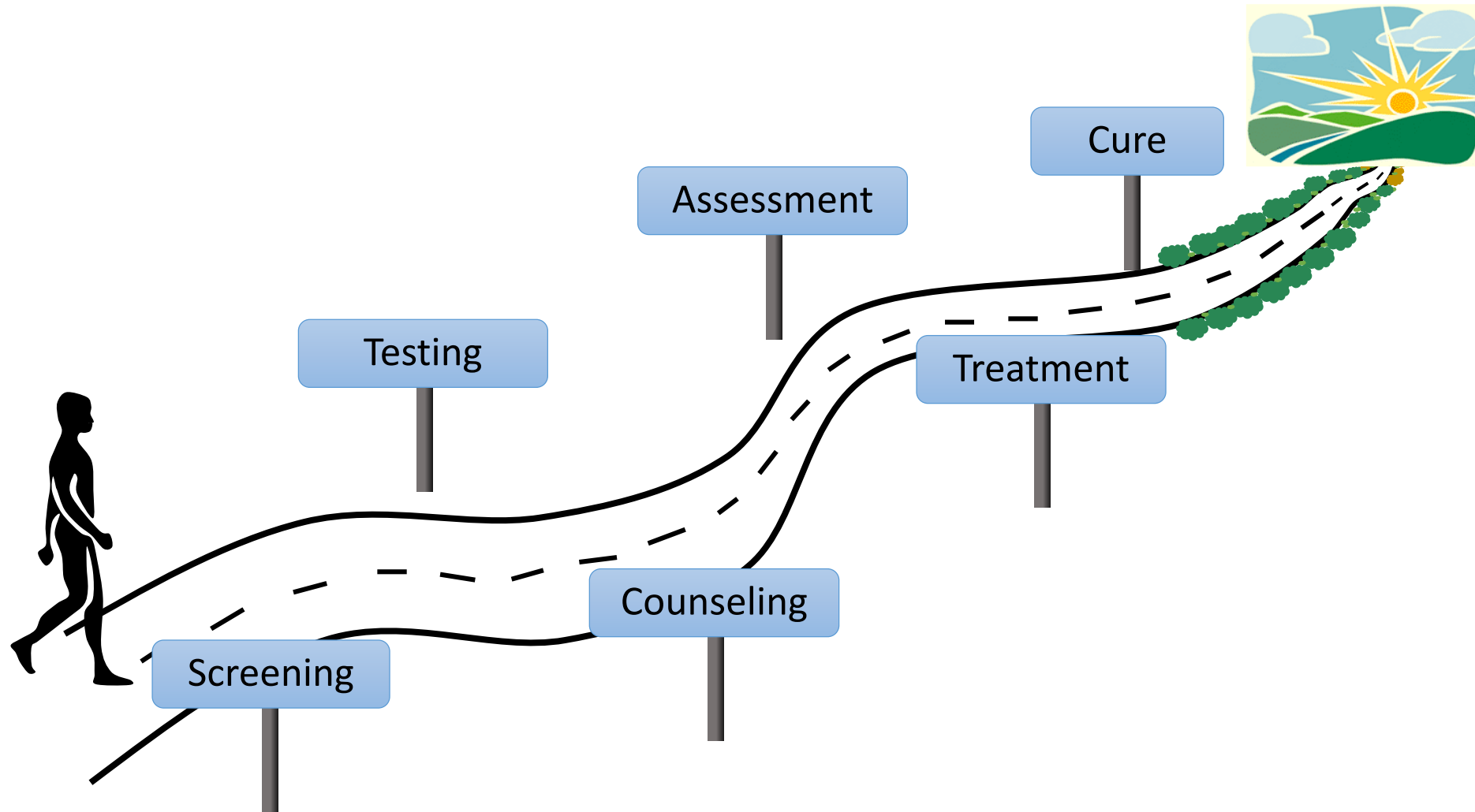
Acute HCV progressing to Chronic HCV Infection



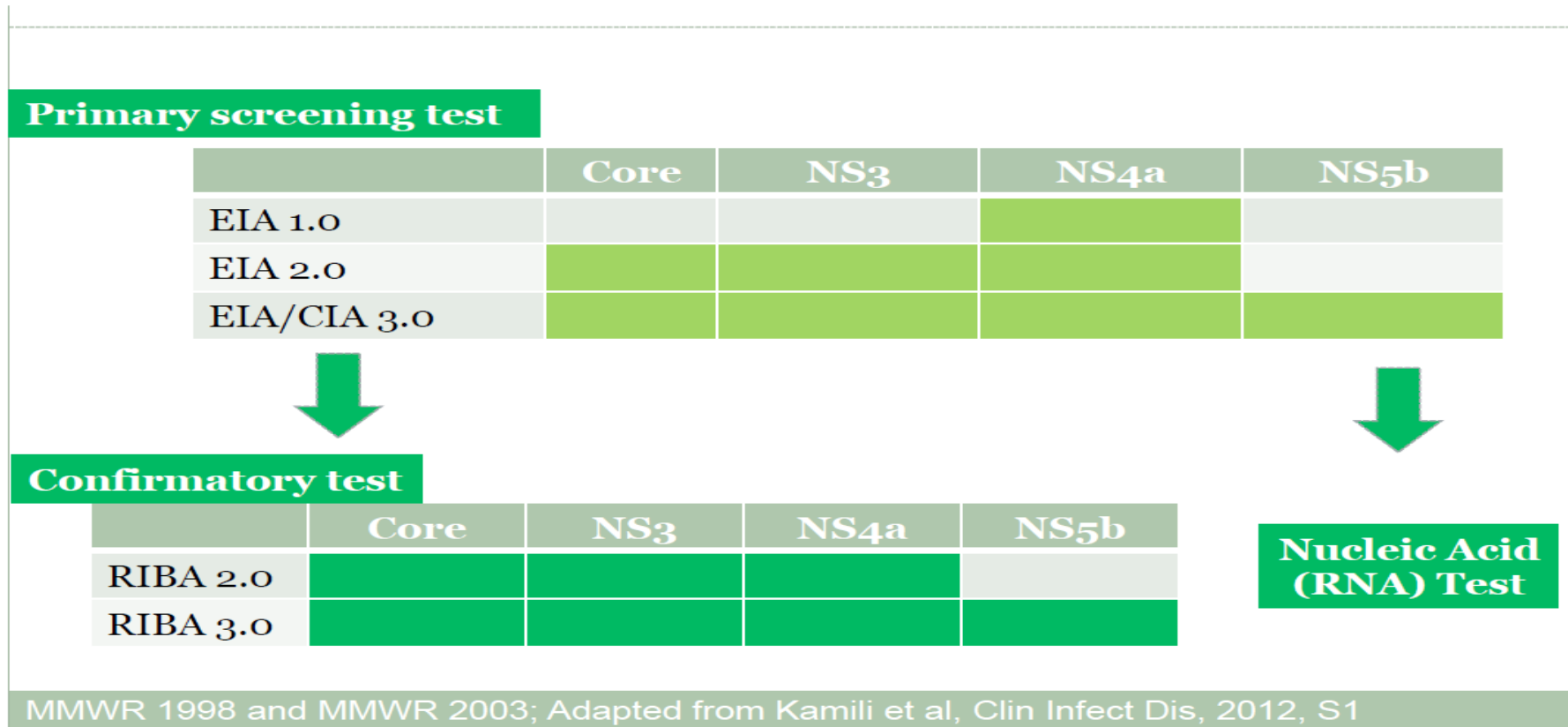
Use of Molecular Tests for Diagnosis of Acute HCV Infection Following Known Exposure



HCV C Screening is the First Step...



Serologic Diagnosis of Chronic HCV Infection



HCV Serologic Diagnostic Tests

سنجش آنتی بادی بر علیه HCV

• آزمایش مثبت Anti-HCV می تواند بیانگر حالات زیر باشد:

➤ عفونت فعال HCV (حاد یا مزمن)

➤ عفونت بهبود یافته HCV (خودبخودی یا درمان شده)

➤ مثبت کاذب

• علل نتایج مثبت کاذب Anti-HCV:

➤ هیپرگاماگلوبولینمی

➤ نمونه های سرم و پلاسمای ذخیره شده در محیط های با دمای متغیر

➤ فاکتور روماتوئید مثبت

➤ بدخیمی های کبد

➤ بیماری های اتوایمیون مانند کلاژنوزها و هپاتیت اتوایمیون

➤ سایر عفونت های ویروسی مانند آنفلوآنزا

➤ دریافت خون و آنتی بادی (ظرف چند هفته منفی خواهد شد)

➤ سایر علل ناشناخته

Confirmatory Test Substitution by Sample-to-Cutoff (S/CO) Ratio

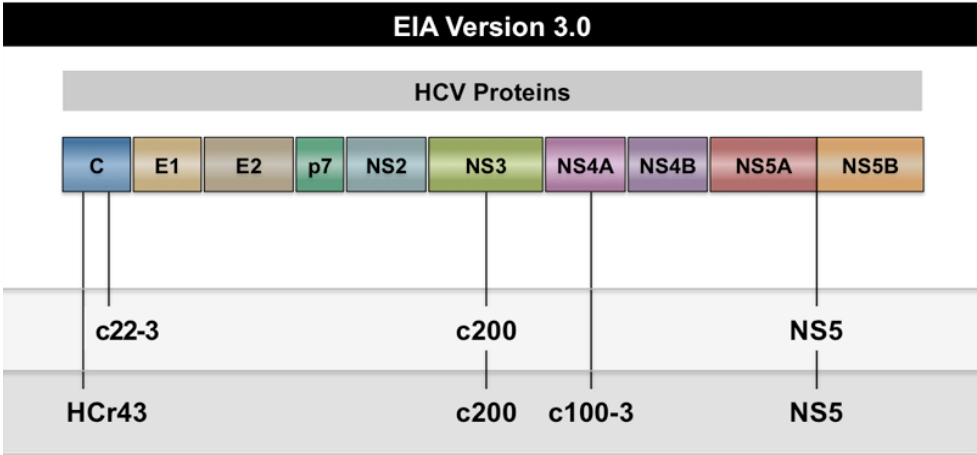
Assay	Manufacturer	S/Co for >95% specificity
Abbott HCV EIA 2.0	Abbott	≥ 3.8
AxSYM Anti-HCV	Abbott	≥ 10.0
Architect Anti-HCV	Abbott	≥ 5.0
Ortho EIA 3.0	Ortho	≥ 3.8
Vitros Anti-HCV	Ortho	≥ 8.0
Advia Centaur HCV	Siemens	≥ 11.0

HCV Serologic Diagnostic Tests

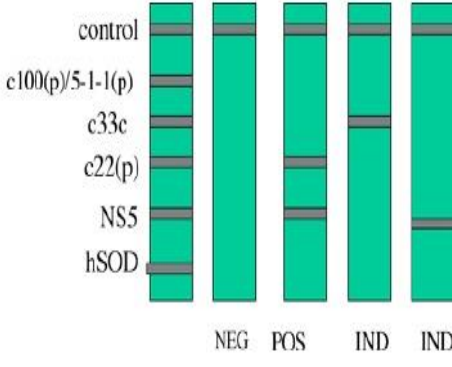
(Recombinant ImmunoBlot Assay) RIBA

- به علت موارد مثبت کاذب در روش آنزیم ایمنوآسی، روشی جهت تایید وجود آنتی‌بادی‌های ضد ویروس به کار گرفته شده تا امکان افتراق واکنش‌های اختصاصی و غیر اختصاصی آنتی‌بادی بیمار با آنتی‌ژن موجود در آزمایش فراهم آید و به‌عنوان آزمایش تاییدی (Confirmatory) و یا تکمیلی (Suplementary) شناخته شده است.
- در این روش که به‌عنوان **Recombinant Immunoblotting Assay (RIBA)** نامیده شده است، از آنتی‌ژن‌های نو ترکیبی و روش نقطه‌گذاری (Blotting) استفاده می‌شود.
- اگر آنتی‌بادی بر علیه هیچ یک از آنتی‌ژن‌های ویروس ساخته نشده باشد، منفی و اگر آنتی‌بادی برای حداقل محصولات دو ژن ویروس وجود داشته باشد به عنوان مثبت تلقی می‌شود.
- فعالیت یک باند اختصاصی، به‌عنوان نتیجه بینابینی (Indeterminate) گزارش می‌شود. در آغاز عفونت و در بیماران با نقص ایمنی هومورال احتمال نتیجه RIBA بینابینی وجود دارد.
- منفی بودن RIBA به همراه Anti-HCV مثبت، معمولاً نشان‌دهنده این است که نتیجه ELISA مثبت کاذب است و نیاز به بررسی‌های بیشتری ندارد.

RIBA



A



B

Anti HCV test ; A: EIA
B: RIBA

HCV Serologic Diagnostic Tests

سنجش آنتی ژن مرکزی ویروس هپاتیت C (HCV core Ag)

- آنتی ژن مرکزی ویروس (p22) چندین روز پس از عفونت با ویروس هپاتیت C و ۱-۲ روز پس از ظهور HCV RNA در خون، قابل سنجش در خون است و سطح سرمی آن، تا حدود زیادی نشان دهنده سطح ویروسی است (ضریب همبستگی در برخی مطالعات تا ۰/۹ گزارش شده).
- نتایج مطالعات نشان می دهد که آنتی ژن مرکزی ۴۰ تا ۵۰ روز زودتر از آنتی بادی بر علیه HCV در مراحل اولیه عفونت ظاهر می شود، بنابراین می تواند شاخص مناسبی برای تشخیص عفونت در مراحل اولیه بیماری باشد (دوره قبل از تبدیل سرمی).
- سنجش آنتی ژن همچنین در تشخیص عفونت در بیمارانی که به علت نقص سیستم ایمنی آنتی بادی بر علیه ویروس ظاهر نمی شود، به کار می رود.
- به علاوه سنجش کمی آن نیز در پیگیری درمان بیماران با داروهای ضد ویروسی کاربرد دارد.
- با پیدایش آنتی بادی بر علیه ویروس، آنتی ژن مرکزی در خون کاهش یافته یا از بین می رود.
- کیت های نسل چهارم الایزا، علاوه بر HCV Ab، قادر به شناسایی HCV Ag نیز هستند.

HCV Virologic Diagnostic Tests

سنجش اسید نوکلئیک ویروس هپاتیت C (HCV nucleic acid testing (NAT))

- همه موارد Anti-HCV مثبت باید با یک روش مولکولی حساس تایید گردد.
- در موارد زیر شناسایی HCV RNA به کار می رود:
 - ۱- ارزیابی عفونت فعلی در بیمار و افتراق آن از موارد بهبودی پس از عفونت
 - ۲- دوره قبل از تبدیل سرمی (در فاصله کوتاهی پس از مواجهه با ویروس و حتی قبل از افزایش آنزیم‌های کبدی و یا تولید آنتی بادی های ضد HCV، سطوح بالای ویرمی در بدن بیمار ایجاد می شود)
 - ۳- ارزیابی نتایج بینابینی در آزمایش HCV RIBA
 - ۴- بررسی انتقال عمودی از مادر مبتلا به فرزند (تا سن ۱۸ ماهگی)
- در حال حاضر روش Reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) روش استاندارد طلایی برای شناسایی ویروس هپاتیت C است.
- دو شیوه کیفی و کمی RT-PCR برای شناسایی HCV وجود دارد.

HCV virologic Diagnostic Tests

سنجش اسید نوکلئیک ویروس هپاتیت C (HCV RNA)

- موارد Anti-HCV منفی و HCV-RNA مثبت:
 - انجام آزمایش با روش‌های غیر حساس
 - دوره پنجره (Window Period) در عفونت حاد HCV
 - عدم تولید آنتی‌بادی (نقص ایمنی، نارسایی کلیه، دریافت پیوند، مصرف داروهای سرکوب‌گر ایمنی)
 - اضمحلال آنتی‌بادی بدون از بین رفتن HCV-RNA (مثل بیماران همودیالیزی)
- بنابراین در موارد شک به عفونت حاد HCV و یا در بیماران با نقص ایمنی، آزمون HCV-RNA باید قسمتی از ارزیابی اولیه باشد.

HCV virologic Diagnostic Tests

سنجش اسید نوکلئیک ویروس هپاتیت C (HCV RNA)

• آزمون PCR منفی همراه با Anti-HCV مثبت :

➤ بهبود عفونت قبلی

➤ موارد مثبت کاذب Anti-HCV

➤ موارد منفی کاذب HCV-RNA (علیرغم مثبت شدن هر دو آزمایش ELISA و RIBA):

❖ حمل و نگهداری نادرست نمونه ها

❖ وجود اشکال آزمایشگاهی در تعیین HCV-RNA

❖ ویرمی مقطعی و گذرا (Intermittent)

❖ سطح پایین ویروس (Low level) در سرم

❖ وجود ویروس فقط در کبد و یا سلول های تک هسته ای

* افراد Anti-HCV مثبت و PCR منفی باید ۳ ماه بعد دوباره از نظر HCV-RNA آزمایش شوند تا بهبود عفونت تایید گردد.

Viral Load Tests

- **Measure HCV RNA (genetic material)**
- **Detects actively replicating virus**
- **2 types:**

A. Qualitative test - detects presence of HCV RNA virus (result: positive/negative)

Nucleic Acid Test (NAT)* for HCV RNA using RT-PCR

- **Detects HCV RNA in the blood**
- **Very sensitive**

B. Quantitative test – measures the amount of virus in 1 ml of blood, use to assess response to treatment

Branched-chain DNA (bDNA)

- **Easy and cheap, especially for large number of samples**
- **Only measures viral loads greater than 50 IU/ml**

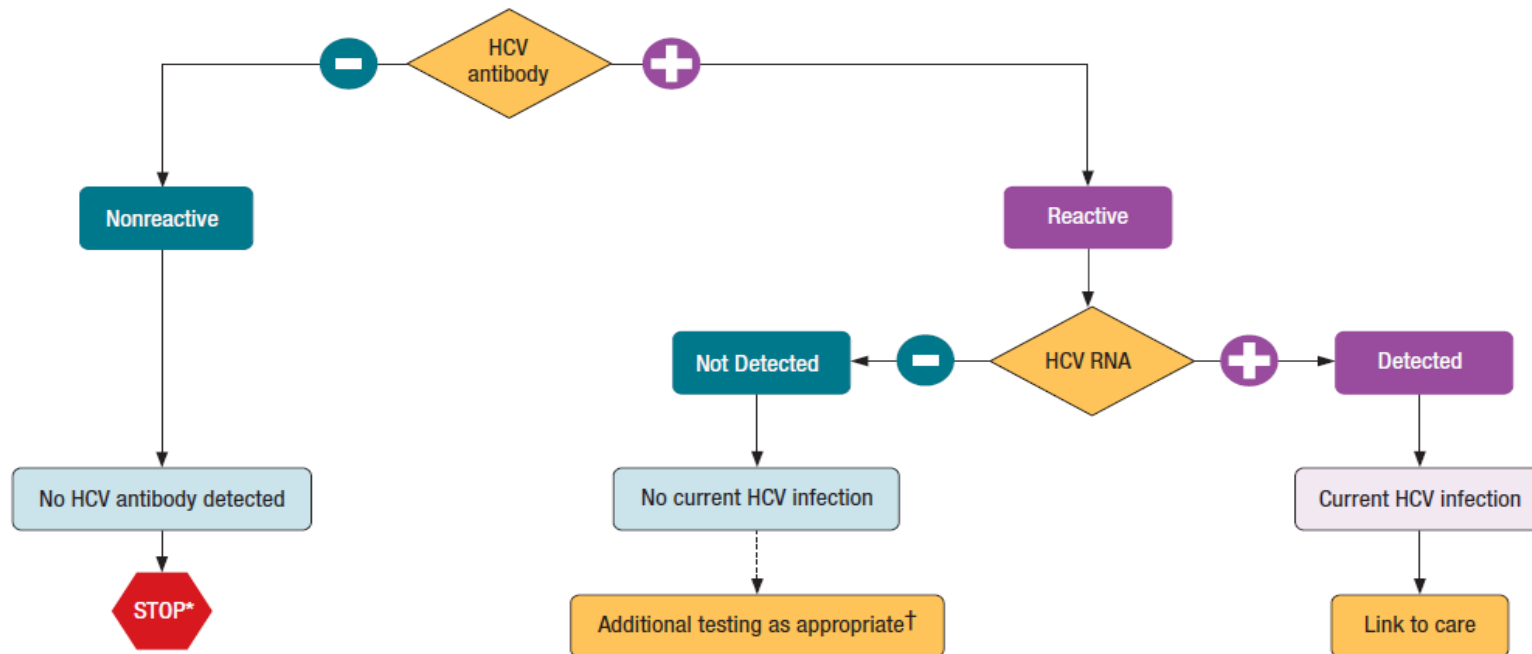
Transcription-mediated Amplification (TMA)

- **New, easy**
- **Amplifies and detects viral genetic material in the blood**
- **Can measure viral loads as few as 5-10 IU/ml**

تعیین ژنوتیپ HCV-RNA

- * تعیین ژنوتیپ در مطالعات اپیدمیولوژیک و همچنین ارزیابی بیمار قبل از درمان، شامل تعیین طول مدت و داروی مناسب برای درمان مفید است.
- * امروزه با معرفی داروهای ضد ویروسی جدید (Direct-Acting Antiviral (DAA) regimens) ، ضرورت انجام آزمایش ژنوتایپینگ کمتر شده است.

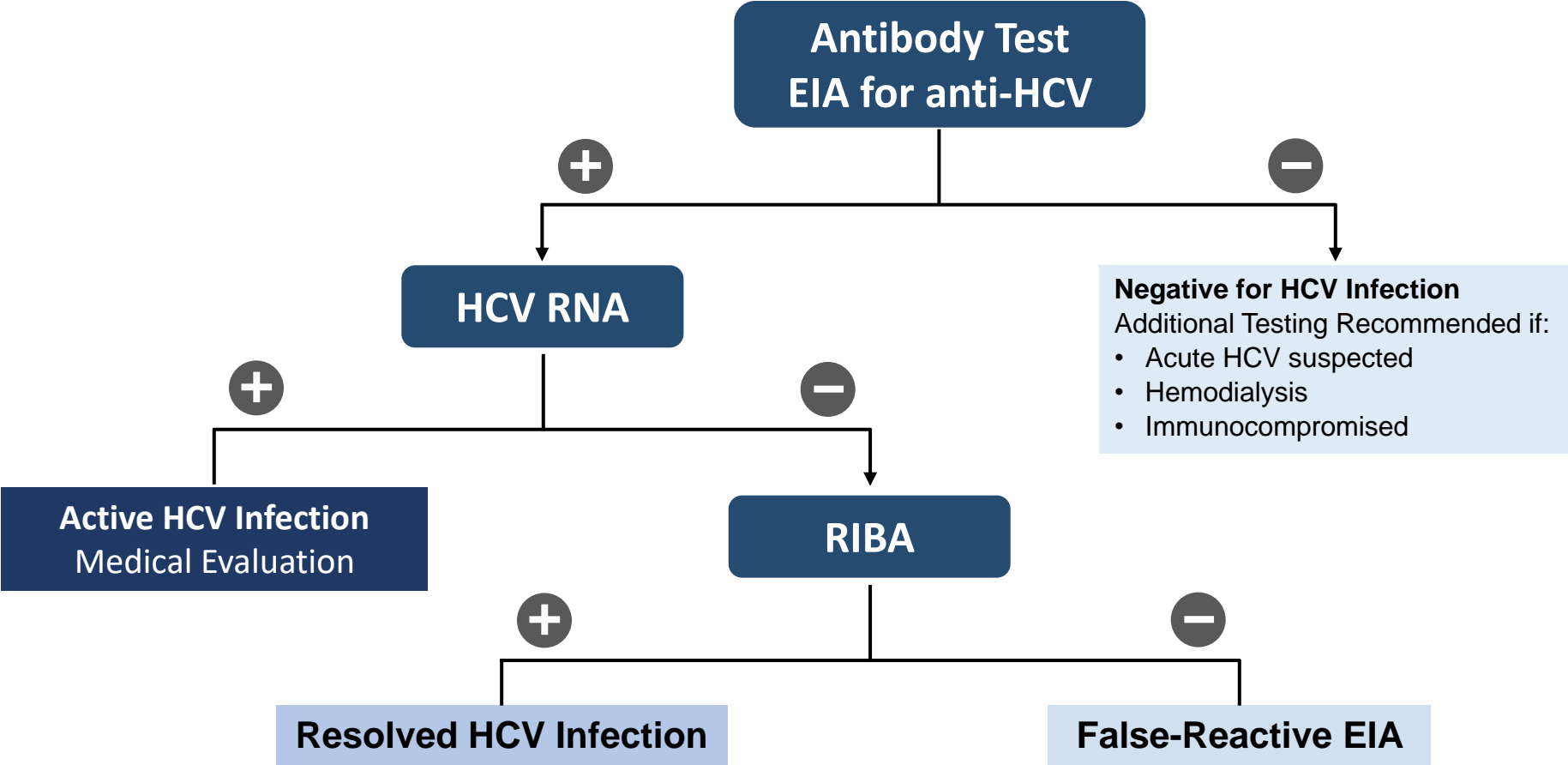
A two-part testing sequence (HCV antibody and HCV RNA confirmatory) is required to confirm an active HCV infection



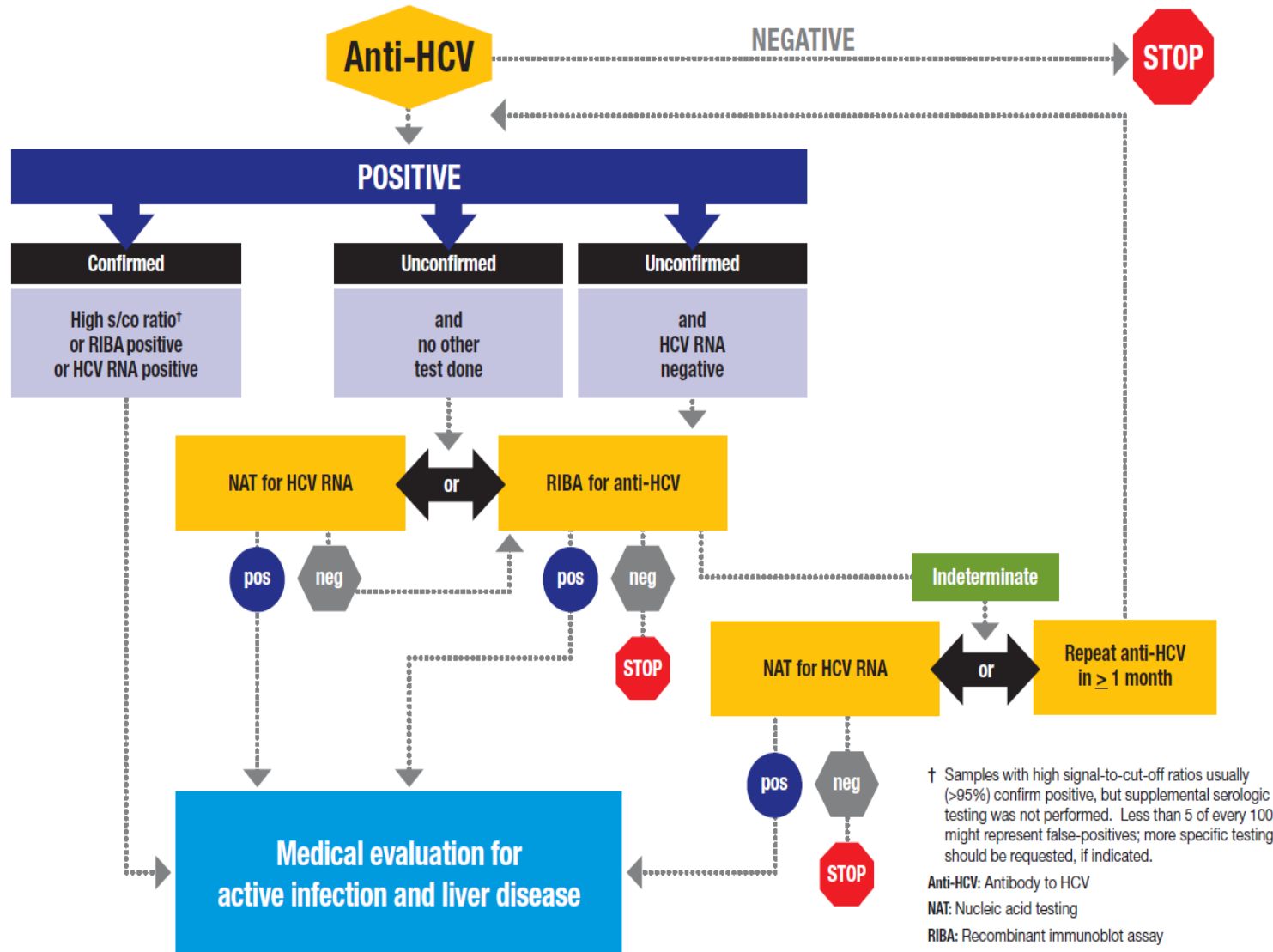
* For persons who might have been exposed to HCV within the past 6 months, testing for HCV RNA or follow-up testing for HCV antibody is recommended. For persons who are immunocompromised, testing for HCV RNA can be considered.

† 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.

HCV Diagnostic Algorithm



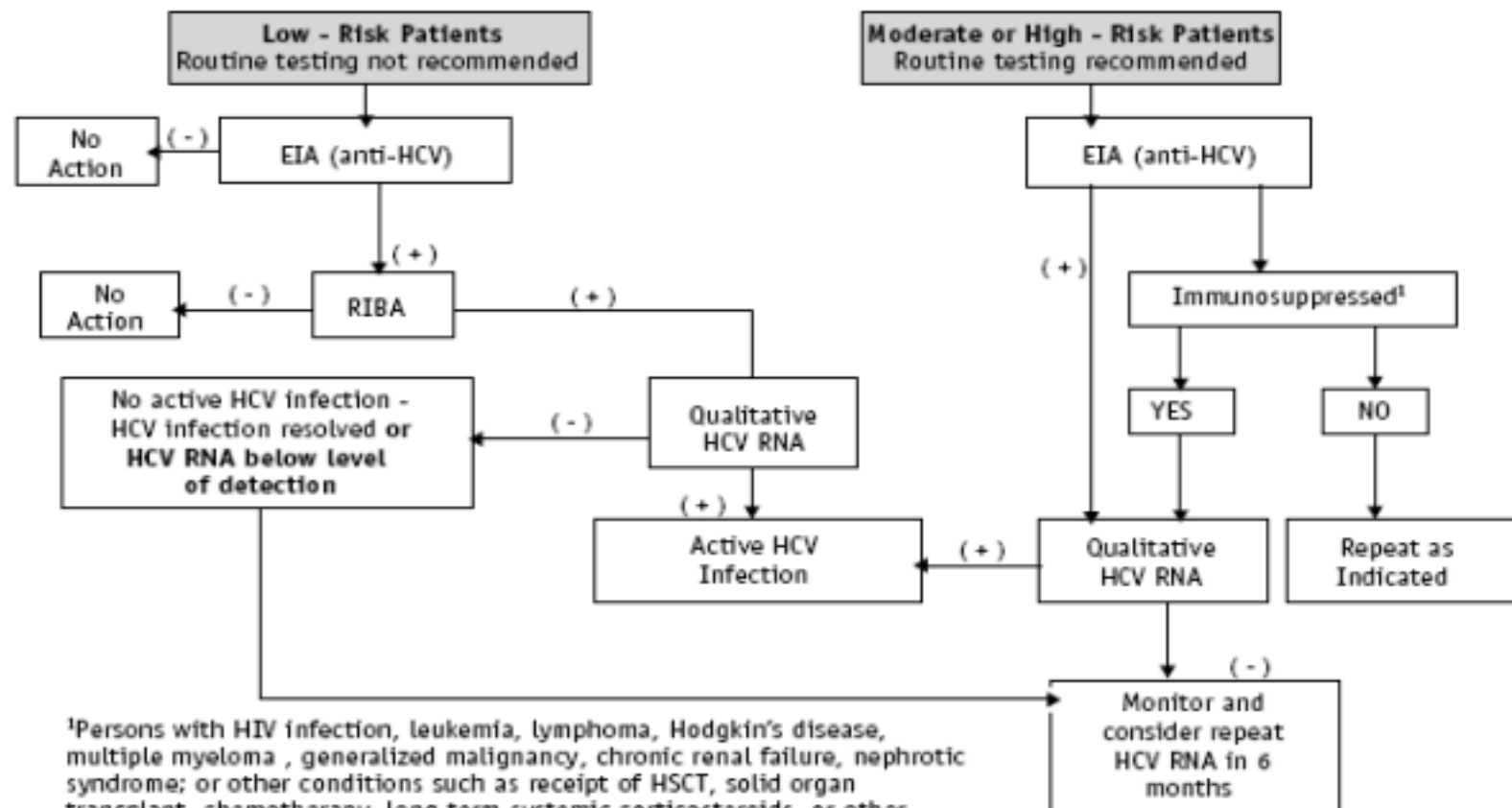
Hepatitis C Virus (HCV) Infection Testing for Diagnosis



† Samples with high signal-to-cut-off ratios usually (>95%) confirm positive, but supplemental serologic testing was not performed. Less than 5 of every 100 might represent false-positives; more specific testing should be requested, if indicated.

- Anti-HCV: Antibody to HCV
- NAT: Nucleic acid testing
- RIBA: Recombinant immunoblot assay
- RNA: Ribonucleic acid

Hepatitis C Screening Algorithm



Reference for Interpretation of Hepatitis C Virus (HCV) Test Results

If Your HCV Test Result Is:			Interpretation		Action
Anti HCV Screening Test*	Anti-HCV Supplemental Test RIBA†	HCV RNA	Anti HCV	HCV Infection	Additional Testing or Evaluation
Negative	Not Needed	Not Needed	Negative	None	No
Positive	Not Done	Not Done	Not Known	Not Known	Supplemental anti-HCV (RIBA) or HCV RNA
Positive	Not Done	Negative	Not Known	Not Known♦	Supplemental anti-HCV (RIBA)
Positive (high s/co ratio§)	Not Done	Not Done	Positive	Past/Current	Evaluate for chronic infection and liver disease
Positive	Negative	Not Needed	Negative	None	No
Positive	Positive	Not Done	Positive	Past/Current	Evaluate for chronic infection and liver disease
Positive	Positive	Negative	Positive	Past/Current♦	Repeat HCV RNA; Evaluate for chronic infection and liver disease
Positive	Positive/Not Done	Positive	Positive	Current	Evaluate for chronic infection and liver disease
Positive	Indeterminate	Not Done	Indeterminate	Not Known	Test for HCV RNA or repeat anti-HCV testing
Positive	Indeterminate	Positive	Positive	Current	Evaluate for chronic infection and liver disease
Positive	Indeterminate	Negative	Indeterminate	Not Known♦	Test for HCV RNA or repeat anti-HCV testing

* EIA (enzyme immunoassay) or CIA (enhanced chemiluminescence immunoassay).

† RIBA (recombinant immunoblot assay), a more specific anti-HCV assay.

♦ Single negative HCV RNA result cannot determine infection status, as persons might have intermittent viremia.

§ Samples with high signal-to-cut-off ratios usually (>95%) confirm positive, but supplemental serologic testing was not performed. Less than 5 of every 100 might represent false positives; more specific testing should be requested, if indicated.

Anti-HCV: Antibody to HCV

RNA: Ribonucleic acid



DEPARTMENT OF HEALTH & HUMAN SERVICES
Centers for Disease Control and Prevention

Division of Viral Hepatitis



www.cdc.gov/hepatitis

