

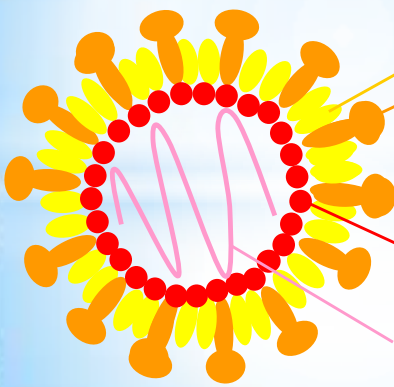



تشخیص عفونت HCV

مرکز تحقیقات عفونت‌های منتقله از خون
سازمان جهاد دانشگاهی خراسان رضوی




Hepatitis C virus



Envelope proteins
E1 (gp31)
E2 (gp70)

Nucleoprotein - Core (p21)

RNA genome



غربالگری عفونت HCV



اولویت اول

- * افراد با سابقه دریافت خون و فرآورده های خونی قبل از سال ۱۳۷۵
- * افراد با سابقه مجروحیت در جبهه، جانبازان و آزادگان جنگ تحمیلی
- * افراد با سابقه حتی یک بار تزریق مواد مخدر
- * افراد با سابقه زندان در بند اعتیاد و یا با سابقه خالکوبی
- * کلیه بیماران هموفیلی، تالاسمی و دیالیزی
- * دریافت کنندگان عضو پیوندی
- * بستگان درجه یک بیماران هپاتیت سی
- * تماس پوستی یا مخاطی با خون و ترشحات آلوده به HCV
- * کودکان متولد شده از مادران مبتلا به عفونت HCV
- * افراد مثبت HIV
- * تظاهرات بالینی عفونت فعال HCV (لیکن پلان، کرایوگلوبولینمی، پورفیری، ...)



غربالگری عفونت HCV



اولویت دوم

- * افراد با سابقه زندان در پندهایی غیر از اعتیاد و بدون سابقه خالکوبی
- * افراد با سابقه خالکوبی و یا با سابقه رفتارهای جنسی پرخطر
- * افراد با بیماری مزمن کبدی غیرقابل توجه از جمله هپاتیت مزمن یا افزایش آنزیم های کبدی

اولویت سوم

- * کارکنان مراکز بهداشتی، تشخیصی و درمانی
- * مشاغل پرخطر دیگر مثل نیروهای نظامی و انتظامی، زندانبانان، ماموران و کارگران شهرداری، آرایشگران، رانندگان ترانزیت و ...
- * سایر گروه های در معرض خطر مثل کودکان خیابانی، زنان خیابانی، کارتن خواب ها، ...
- * مهاجرین از کشورهای دیگر
- * در برخی از گروه های یادشده، غربالگری دوره ای عفونت HCV (حداقل سالی یک بار در گروه های خاص مثل معتادین تزریقی و هر ۵ سال یک بار در مشاغل پرخطر) توصیه می شود.



آزمایشات تشخیصی عفونت HCV



1. آزمون‌های سرولوژی (سنجش آنتی‌بادی ضد ویروس، سنجش آنتی‌ژن ویروس)
 2. آزمون‌های ویرولوژی (شناسایی نوکلئیک اسید ویروس)
 3. ژنوتایپینگ (تشخیص گونه ویروس)
- * اولین قدم برای بررسی از نظر عفونت HCV، در موارد زیر جستجوی آنتی‌بادی بر علیه ویروس (Anti-HCV) در خون است.
- * ۱۵ تا ۲۵ درصد مبتلایان به عفونت با ویروس هپاتیت C در طی کمتر از ۶ ماه بهبود یافته و ویروس قابل شناسایی نیست، اما برای سال‌ها آنتی‌بادی بر علیه ویروس قابل اندازه‌گیری است.
- * معمولاً اولین آنتی‌بادی که در بیماران مبتلا به عفونت HCV قابل شناسایی است از نوع IgM بوده ولی برای افتراق عفونت حاد از مزمن نمی‌توان به کار برد زیرا در ۹۰-۵۰ درصد بیماران مبتلا به هپاتیت مزمن مثبت است.

5

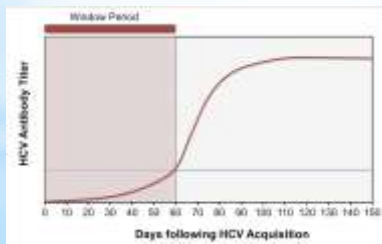


سنجش آنتی‌بادی بر علیه HCV



- * ELISA بیشترین آزمایشی است که به منظور تشخیص عفونت HCV استفاده می‌شود. این آزمایش، یک روش کیفی است و نتایج به صورت مثبت، منفی یا مشکوک گزارش می‌شود.
- * کیت‌های ELISA آنتی‌بادی‌های IgG و IgM بر علیه ویروس را شناسایی می‌کند.
- * HCV Ab حدود ۶ تا ۸ هفته پس از شروع عفونت قابل شناسایی است.

* Sensitivity > 97%





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 پلاسماي ذخیره شده در محیط های با دمای متغیر
- فاکتور روماتوئید مثبت
- بدخیمی های کبد
- بیماری های اتوایمیون مانند کلانوزها و هیاتیت اتوایمیون
- سایر عفونت های ویروسی مانند آنفلوآنزا
- دریافت خون و آنتی بادی (ظرف چند هفته منفی خواهد شد)
- سایر علل ناشناخته

7



Recombinant Immuno Blot Assay (RIBA)



* به علت موارد مثبت کاذب در ELISA، از RIBA به عنوان آزمایش تاییدی (Confirmatory) جهت تایید وجود آنتی بادی های ضد ویروس استفاده می گردد.

* در این آزمایش نوارهای نیتروسلولزی با آنتی ژن های نوترکیبی تثبیت شده بر روی آن به کار می رود.

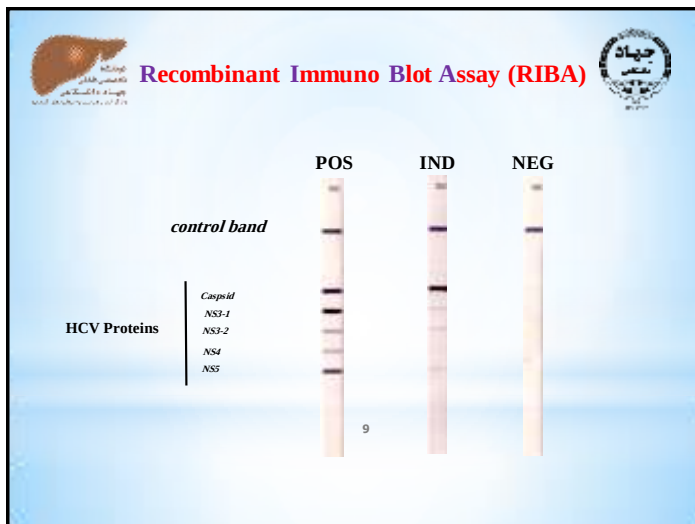
* اگر آنتی بادی بر علیه هیچ یک از آنتی ژن های ویروس ساخته نشده باشد، منفی و اگر آنتی بادی برای حداقل محصولات دو ژن ویروس وجود داشته باشد به عنوان مثبت تلقی می شود.

* منفی بودن RIBA به همراه Anti-HCV مثبت، معمولاً نشان دهنده این است که نتیجه ELISA مثبت کاذب است و نیاز به بررسی های بیشتری ندارد.

* فعالیت یک باند اختصاصی، به عنوان نتیجه بینابینی (Indeterminate) گزارش می شود که اغلب حاصل واکنش غیر اختصاصی نسبت به یکی از آنتی ژن های موجود است.

* در آغاز عفونت و یا در بیماران با نقص ایمنی هومورال نیز ممکن است به علت عدم ساخت آنتی بادی بر علیه تمامی آنتی ژن های ویروس، نتیجه RIBA بینابینی گزارش شود، هر چند بیمار مبتلا به عفونت HCV باشد.

8



سنجش آنتی ژن مرکزی هپاتیت C (HCV core Ag)

* آنتی ژن مرکزی ویروس (p22) ۱-۲ هفته 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).

* بنابراین سنجش آنتی ژن مرکزی HCV می تواند شاخص مناسبی برای تشخیص عفونت در مراحل اولیه بیماری باشد.

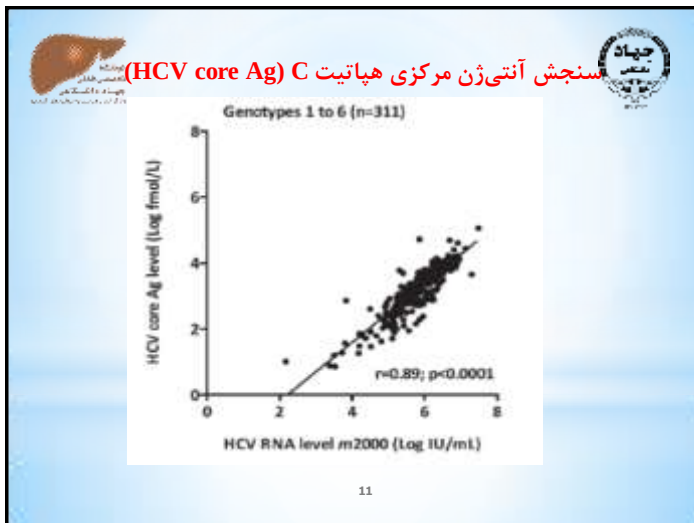
* سنجش آنتی ژن همچنین در تشخیص عفونت در بیمارانی که به علت نقص سیستم ایمنی، آنتی بادی بر علیه ویروس ظاهر نمی شود، به کار می رود.

* 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.

* در مواردی که HCV RNA کمتر از 2000 IU/ml باشد، قابل شناسایی نخواهد بود.

10



آزمون تشخیص سریع HCV (Rapid diagnostic test)

* با آزمایش تشخیص سریع بر روی خون مویرگی انگشت دست، جواب سنجش آنتی بادی یا آنتی ژن در کمتر از ۳۰ دقیقه آماده می شود.

* قابل استفاده در اورژانس، درمانگاه، مناطق روستایی، زندان، مراکز گذری (DIC)، گروه های متمرکز سخت در دسترس

12



13

Performance of RDTs: Meta-Analysis

- More than 13,000 individuals included in 18 studies between 1994 and 2011
 - Stratification according to matrix specimens
 - Whole blood (venous and capillary): 4,259 specimens
 - Saliva: 3,994 specimens

Specimen	Specificity	Sensitivity
Whole blood	99.5%	98.9%
Saliva	98.2%	97.1%

Wongkum et al., Am J Infect Contr 2012;40:100-106



سنجش اسید نوکلئیک HCV (HCV nucleic acid testing (NAT))

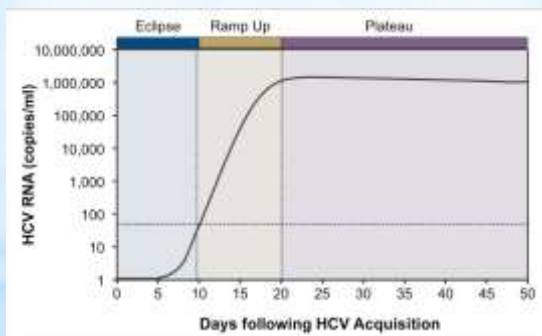


- * همه موارد Anti-HCV مثبت باید با یک روش مولکولی حساس تایید گردد.
- * در موارد زیر شناسایی HCV RNA به کار می رود:
 - ۱- ارزیابی عفونت فعلی در بیمار و افتراق آن از موارد بهبودی پس از عفونت
 - ۲- دوره قبل از تبدیل سرمی در اهدا کنندگان خون و بافت
- * در فاصله کوتاهی پس از مواجهه با HCV و حتی قبل از افزایش ALT و یا تولید آنتی بادی ضد HCV، سطوح بالای ویرمی در بدن بیمار ایجاد می شود.
- ۳- ارزیابی نتایج بینابینی 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 هیپاتیت C است.
- * دو شیوه کیفی و کمی RT-PCR برای شناسایی HCV وجود دارد.

15



سنجش اسید نوکلئیک HCV (HCV nucleic acid testing (NAT))



16



سنجش اسید نوکلئیک HCV (HCV nucleic acid testing (NAT))



Assay	Method	LLD* (IU/ml) ^a	Linearity (IU/ml)
Versant Qualitative (Siemens)	TMA	5 - 10	NA
Amplicor Qualitative v2.0 (Roche)	RT-PCR	50	NA
Ampliscreen (Roche)	RT-PCR	50	NA
Amplicor Monitor v2.0 (Roche)	RT-PCR	600	600-800,000
Cobas Taqman V2.0 (Roche)	RT-PCR	10	25 - 3 x 10 ⁶
Abbott RealTime (Abbott)	RT-PCR	12 - 30	10 - 1 x 10 ⁷
Versant Quantitative v3.0 (Siemens)	bDNA	615	615 - 7,700,000

*LLD = Lower Limit of Detection;

^aConversion factor: IU/ml to copies/ml varies with each assay (e.g. PCR: 1 IU/ml = 2.4 copies/ml; bDNA: IU/ml = 8.3 copies/ml)

S. Chevaliez et al. World J Gastro 2007;13:J
Scott et al. JAMA 2007;297; A. Caliendo et al. J
Clin Microbiol 2006;44

17



سنجش اسید نوکلئیک HCV (HCV nucleic acid testing (NAT))



* موارد منفی کاذب HCV-RNA:

- در مرحله بهبودی با HCV-RNA متغیر که ممکن است به زیر سطح قابل اندازه‌گیری برسد.
- در مرحله انتهایی بیماری کبدی (پیشرفت بیماری کبدی با سطح پایین HCV-RNA)
- حمل و نگهداری نادرست نمونه‌ها
- 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 سلول‌های تک‌هسته‌ای
- * نتیجه مثبت کاذب HCV-RNA گاهی ممکن است به دلیل اشکال در نمونه‌گیری یا روش آزمایش مشاهده شود.

18



سنجش اسید نوکلئیک HCV (HCV nucleic acid testing (NAT))



* موارد Anti-HCV منفی و HCV-RNA مثبت:

- انجام آزمایش با روش‌های غیرحساس
- 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)

* موارد Anti-HCV مثبت و HCV-RNA منفی:

- بهبود عفونت قبلی
- موارد مثبت کاذب Anti-HCV
- موارد منفی کاذب HCV-RNA (علیرغم مثبت شدن هر دو آزمایش ELISA و RIBA)
- * افراد Anti-HCV مثبت و PCR منفی باید ۳ ماه بعد دوباره از نظر HCV-RNA آزمایش شوند تا بهبود عفونت تایید گردد.

* منفی بودن HCV-RNA در دو نوبت یا بیشتر نشان‌دهنده بهبود عفونت قبلی است و انجام آزمایش‌های بعدی غیرضروری است.¹⁹



تفسیر نتایج آزمون‌های تشخیص HCV

تفسیر	HCV RNA	HCV RIBA	Anti-HCV
۱. عفونت حاد HCV (پس از سروکانورشن) ۲. عفونت فعال (مزمن) HCV	+	+	+
۱. عفونت بهبودیافته HCV ۲. عفونت فعال HCV با ویرمی متناوب ۳. عفونت فعال HCV با ویرمی کم	-	+	+
Anti-HCV مثبت کاذب	-	-	+
وضعیت نامشخص (لزوم انجام آزمایشات تکمیلی)	-	بینابینی	+
۱. عفونت حاد HCV (قبل از سروکانورشن) ۲. عفونت مزمن HCV در افراد با نقص ایمنی	+	-	-
عدم وجود عفونت HCV	-	-	-



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.

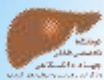
* امروزه شش ژنوتیپ ماژور و بیش از ۱۵۰ ساب‌تایپ از HCV شناسایی شده‌اند.

* در ایران و پاکستان ژنوتیپ ۱ و ۳ از سایر گونه‌های دیگر ویروس شایع‌تر است اما در کشورهای عربی خاورمیانه و شمال آفریقا ژنوتیپ ۴ و ۱ بیشترین شیوع را دارند.

* آزمون‌های فعلی در حدود ۳٪ موارد قادر به شناسایی ژنوتیپ نیستند (Untypeable) و در ۱ تا ۴ درصد موارد ژنوتیپ‌های مختلط (Mixed) گزارش شده است.

* امروزه با معرفی داروهای ضد ویروسی جدید (Direct-Acting Antiviral (DAA) regimens)، ضرورت انجام آزمایش ژنوتایپینگ کمتر شده است.

21

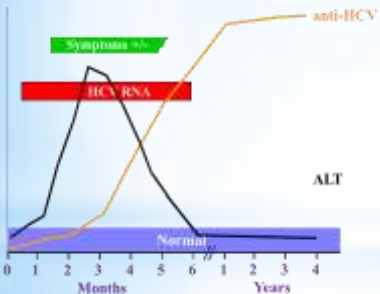


تشخیص عفونت حاد و مزمن HCV

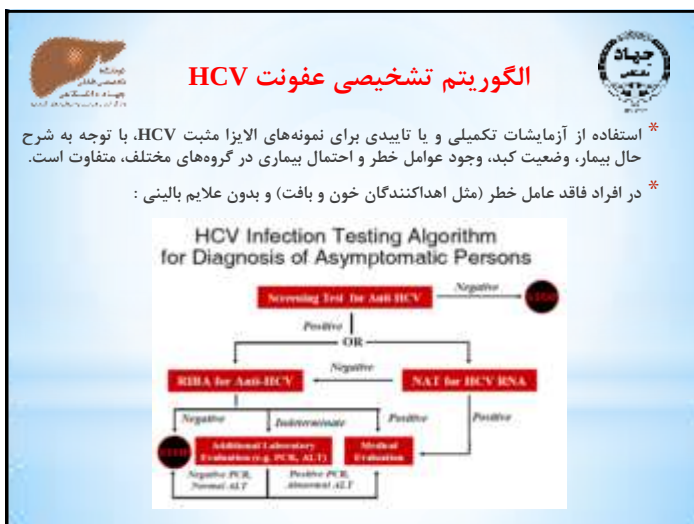
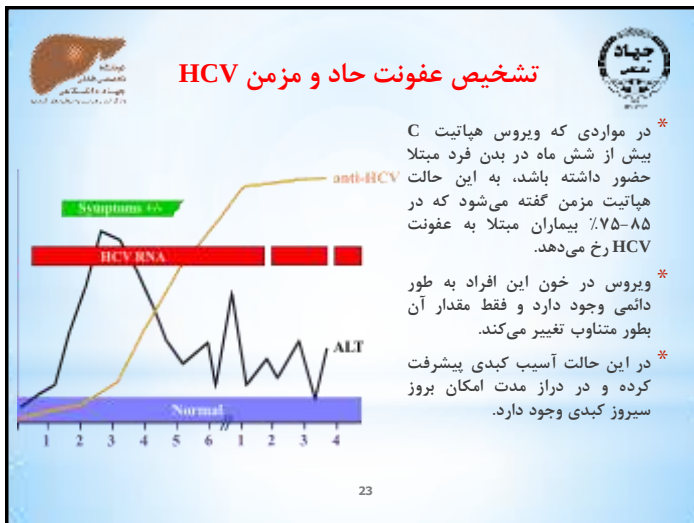


* در بیماری‌هایی که مبتلا به عفونت مزمن نشده و بهبود می‌یابند، آنتی‌بادی تا سال‌ها پس از عفونت مثبت است.

* بنابراین تمام بیمارانی که در آزمایش‌های سروزولوژیک مثبت هستند الزاماً مبتلا به عفونت HCV نبوده و در ۱۵-۲۵ درصد آنان زنوم ویروس قابل شناسایی نیست.



22

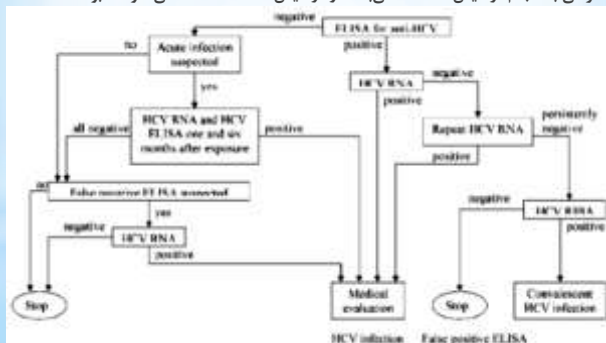




الگوریتم تشخیصی عفونت HCV



* در بیماران در معرض خطر بالا (مثل معتادین تزریقی یا سابقه دریافت خون قبل از ۱۳۷۵)، الزامی به انجام آزمایش RIBA نمی‌باشد و آزمایش HCV RNA کافی خواهد بود.



Quiz



۱- کدام گزینه در مورد سنجش آنتی‌بادی ضد HCV نادرست است؟

- الف- آنتی‌بادی بر علیه ویروس برای سال‌های طولانی قابل اندازه گیری است.
- ب- بهترین راه شناسایی بیماران مبتلا به هپاتیت C، جست و جوی آنتی‌بادی بر علیه ویروس در خون است.
- ج- سنجش آنتی‌بادی از نوع IgM در افتراق عفونت حاد از مزمن کار برد دارد.
- د- ELISA شایع‌ترین آزمایشی است که به منظور تشخیص عفونت HCV استفاده می‌شود.

۲- در حال حاضر روش استاندارد طلایی برای شناسایی HCV چیست؟

- الف- HCV RIBA
- ب- RT-PCR
- ج- HCV core Ag
- د- Genotyping



Quiz



۳- نتیجه Anti-HCV منفی و HCV-RNA مثبت در کدام مورد قابل تصور است؟

الف - Window Period در عفونت HCV

ب - نارسایی کلیه

ج - همودیالیز

د - همه موارد

۴- فردی با آزمایش Anti-HCV منفی مراجعه کرده است. وی سابقه انجام خالکوبی در زندان در حدود ۳ ماه قبل را ذکر می‌کند. اقدام بعدی شما چیست؟

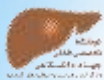
الف - تکرار آزمایش Anti-HCV ۳ ماه دیگر

ب - انجام آزمایش HCV-RNA و در صورت لزوم تکرار آن ۳ ماه دیگر

ج - هر دو مورد

د - پیگیری بیشتر لازم نیست.

27



منابع



- * World Health Organization. Guidelines on hepatitis B and C testing. February 2017
- * World Health Organization. Guidelines for the screening, care and treatment of persons with chronic hepatitis C infection. April 2016
- * Alavian SM, et al. Recommendations for the Clinical Management of Hepatitis C in Iran: A Consensus-Based National Guideline. Hepatitis Monthly. August 2016
- * AASLD/IDSA HCV Guidance Panel. Hepatitis C guidance: AASLD-IDSA recommendations for testing, managing, and treating adults infected with hepatitis C virus. Hepatology. September 2015
- * European Association for Study of Liver. EASL Clinical Practice Guidelines: management of hepatitis C virus infection. Journal of Hepatology. February 2014

* محمود نبوی و همکاران، برنامه راهبردی کنترل هپاتیت B و C، تهران: انتشارات اندیشمند، پاییز ۱۳۹۲

* سید مؤید علویان، مهرداد نورانی‌پور، هپاتیت C ویژه پزشکان و متخصصان، چاپ سوم، تهران: نشر اردوان، پاییز ۱۳۹۰

* صدیقه امینی کافی‌آباد، روش‌های آزمایشگاهی در تشخیص هپاتیت‌های ویروسی، تهران: مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران، ۱۳۸۴

28