

## HEPATİT C VİRUS-RNA (HCV-RNA) KANTİTASYONUNDA COBAS AMPLICOR HCV MONITOR TEST v2.0 İLE REALART HCV RG RT PCR TESTİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

### COMPARISON OF COBAS AMPLICOR HEPATITIS C VIRUS-RNA (HCV-RNA) v2.0 WITH REALART HCV RG RT PCR IN QUANTITATION OF HCV RNA

İmre ALTUĞLU<sup>1</sup>  
Hatice ŞAHİN<sup>2</sup>

Rüçhan YAZAN SERTÖZ<sup>1</sup>  
Selda ERENŞOY<sup>1</sup>

Ayşın ZEYTİNOĞLU<sup>1</sup>

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, İzmir

<sup>1</sup> Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

<sup>2</sup> Tıp Eğitimi Anabilim Dalı

**Anahtar Sözcükler:** Hepatit C virus-RNA (HCV-RNA), kantitasyon, gerçek zamanlı PCR

**Keywords:** Hepatit C virus-RNA (HCV-RNA), quantitation, real time PCR

Geliş: 25 Ekim 2004

Kabul: 05 Kasım 2004

## ÖZET

Bu çalışmada Cobas Amplicor HCV Monitor (Roche Diagnostics, ABD) ile Real Art HCV RG PCR testinin (Artus GmbH, Almanya) HCV kantitasyonundaki performanslarının karşılaştırılması amaçlandı. Çalışmaya HCV RNA kantitasyonu amacı ile laboratuara gönderilen kronik HCV enfeksiyonlu 70 hastaya ait kan örneği alındı. Örnekler iki farklı yöntem ile incelendi ve sonuçlar karşılaştırıldı. Real Art HCV testinin tekrarlanabilirliğinin değerlendirilmesi amacı ile altı örnek farklı testlerde, altı örnek aynı test içerisinde çift çalışıldı. İki örneğin 1/10, 1/100, 1/1000 ve 1/10000 sulandırılmaları hazırlanarak kantitasyonu yapıldı. Cobas Amplicor ile 21 örnek, RealArt HCV RG PCR ile 35 örnek 500.000 IU/ml altında bulundu. Negatif değerler çıkartılarak yapılan Spearman korelasyon testinde iki sistem sonuçları arasında korelasyon olmadığı gözlemlendi (korelasyon katsayısı:0.309). Cobas Amplicor ile 500.000 IU/ml altında bulunan değerler ile RealArt HCV RG RT PCR testindeki değerler karşılaştırıldığında logaritmik farkın 0.1 ile 1.3 (median 0.7, ortalama 0.7) arasında değiştiği gözlemlendi. RealArt HCV RG RT PCR yönteminde aynı test içindeki logaritmik fark 0.01 ile 0.07 arasında ve farklı testlerde çalışılan aynı örneklerde ise logaritmik fark 0.04 ile 0.3 arasında saptandı. Wilcoxon testi ile bu örneklerin sonuçları arasında anlamlı bir fark olmadığı saptandı (z=0.178, p=0.859). Yapılan sulandırım çalışmalarında, viral yükteki azalmanın doğrusallık gösterdiği gözlemlendi. Sonuçlar, RealArt HCV testinin tekrarlanabilirliği yüksek ve kantitasyona uygun bir yöntem olduğunu göstermiştir. Ancak iki test arasında kantitasyonda bir korelasyon olmadığı gözlemlenmiş bu da hasta izleminde farklı testlerden elde edilen sonuçların birbirine çevrilmesinin uygun olmadığını göstermiştir.

## SUMMARY

The aim of the study is to compare the performance of Cobas Amplicor HCV RNA v2.0 (Roche Diagnostics, ABD) with Real Art HCV RG RT PCR (Artus GmbH, Germany) in quantitation of HCV RNA. 70 serum samples of patients with chronic hepatitis C that were admitted to the laboratory for HCV RNA quantitation were included in the study. Samples were tested by two different methods and the results were compared. To assess the reproducibility of the test, 6 serum samples were tested in different runs and another six samples in the same run in duplicate. 1/10, 1/100, 1/1000 and 1/10000 dilutions of serum samples were also quantitated. Twenty-one samples with Cobas Amplicor and 35 samples with rotorgene were below the level of 500.000 IU/ml. Spearman correlation test showed no correlation between the two assays when negative samples were excluded (correlation coefficient= 0.309). The logarithmic difference between the Cobas Amplicor System and HBV Monitor Realart HCV PCR test ranged between 0.1 and 1.3 (median 0.7, mean 0.7). For the same samples tested in different runs and in the same run logarithmic differences were 0.04, 0.3 and 0.01, 0.07 respectively. Difference between these results was not significant by Wilcoxon test (z=0.178, p=0.859). In diluted samples regression in viral load was linear. RealArt HCV RG RT PCR is a reproducible assay with a wide dynamic range of HCV RNA quantitation. Because of the lack of correlation between two assays it is not appropriate to convert the test results of different methods for follow up a patient.

## GİRİŞ

Hepatit C virüsü (HCV) kronik viral hepatitlerin en önemli etkenlerinden biridir. Persistan HCV enfeksiyonu, hafif karaciğer hasarından siroz ve hepatosellüler karsinoma ileleyen ciddi kronik hepatite kadar farklı tablolar ile ilişkilidir (1, 2). Hepatit C virüsü enfeksiyonunda antiviral tedavinin etkinliğinin değerlendirilmesinde yararlı iki önemli viral gösterge HCV genotip ve viral yüküdür (3). Tedavi öncesi viral yük ve erken dönemde HCV RNA düzeylerindeki değişiklikler antiviral tedaviye kalıcı yanıt ile ilişkilidir. Tedavinin 12. haftasında viral yükte 2 log<sub>10</sub>'dan daha az bir düşüşün yanıtızlık için bir gösterge olduğu düşünölmektedir (4).

Hepatit C virüsü RNA kantitasyonunda ticari pekçok yöntem bulunmaktadır. Bu testler temel olarak sinyal amplifikasyon (bDNA) veya 'reverse-transcription' polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) temelli testlerdir (5). Kalitatif testler ile daha yüksek duyarlılık elde edilmektedir. Bu nedenle duyarlılıkları kalitatif testler ile benzerlik gösteren kantitatif testlere gereksinim vardır.

Yakın dönemlerde kantitatif, floresan temelli ve farklı formlarda gerçek zamanlı PCR testleri geliştirilmiştir. Bu testler oldukça duyarlı, geniş dinamik aralığa sahip ve HCV genotiplerinin çoğunu saptayabilen testlerdir (6-8). Gerçek zamanlı PCR, kullanım kolaylığı ve geniş dinamik aralık gibi avantajları nedeniyle tanısai viroloji laboratuvarında klasik PCR'nin yerini almak üzeredir. Ancak geçerlilik, güvenilirlik ve standardizasyon sorunu vardır. Bu nedenle daha önce kullanılmakta olan sistemlerle karşılaştırmalı çalışmalara gereksinim vardır. Bu çalışmada Cobas Amplicor HCV Monitor (Roche Diagnostics, ABD) ile Rotorgene Real-Time DNA Detection System (Corbett Research, Australia) için üretilmiş RealArt HCV RG PCR (Rg) testinin (Artus, Almanya) HCV kantitasyonundaki performanslarının karşılaştırılması amaçlandı.

## GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmaya HCV RNA kantitasyonu amacı ile laboratuvara gönderilen kronik HCV enfeksiyonlu 70 hastaya ait kan örneği alındı. Örneklerden test öncesi ticari bir ekstraksiyon kiti (Qiagen Inc., Kanada) ile nükleik asit izolasyonu yapıldı. Örnekler Cobas Amplicor Monitor test v2.0 (Roche Molecular Systems, ABD) ve RealArt HCV RG RT PCR testi (Artus GmbH, Almanya) ile incelendi ve sonuçlar karşılaştırıldı. Real Art HCV testinin tekrarlanabilirliğinin değerlendirilmesi amacı ile altı örnek farklı testlerde, altı örnek aynı test içerisinde çift kez incelendi. İki örneğin 1/10, 1/100, 1/1000 ve 1/10000 sulandırılmaları hazırlanarak kantitasyonu yapıldı.

bilirliğinin değerlendirilmesi amacı ile altı örnek farklı testlerde, altı örnek aynı test içerisinde çift kez incelendi. İki örneğin 1/10, 1/100, 1/1000 ve 1/10000 sulandırılmaları hazırlanarak kantitasyonu yapıldı.

## BULGULAR

RealArt HCV RG RT PCR ile örneklerin 27'si 5X10<sup>5</sup> IU/ml ile 4x10<sup>6</sup> IU/ml arasında, sekizi negatif olarak saptandı. Cobas Amplicor ile örneklerin 40'ı 500.000 IU/ml üzeri, dokuzu negatif olarak saptandı. Cobas Amplicor ile 21 örnek, Realart HCV RG RT PCR ile 35 örnek 500.000 IU/ml altında bulundu. Her iki sistemde elde edilen sonuçların karşılaştırılması Şekil 1'de gösterilmektedir. Negatif değerler çıkartılarak yapılan Spearman korelasyon testinde iki sistem sonuçları arasında korelasyon olmadığı gözlemlendi (korelasyon katsayısı: 0.309).

Cobas Amplicor ile 500.000 IU/ml altında bulunan değerler ile RealArt HCV RG RT PCR testindeki değerler karşılaştırıldığında logaritmik farkın 0.1 ile 1.3 (median 0.7, ortalama 0.7) arasında değiştiği gözlemlendi.

RealArt HCV RG RT PCR testinde aynı test içindeki logaritmik fark 0.01 ile 0.07 arasında ve farklı testlerde çalışılan aynı örneklerde ise logaritmik fark 0.04 ile 0.3 arasında saptandı.

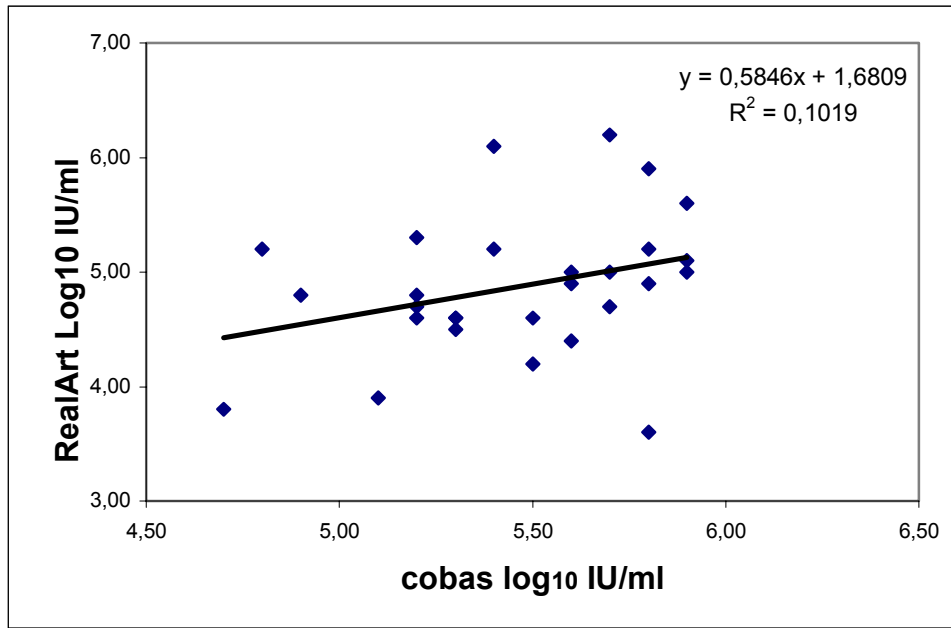
Wilcoxon testi ile bu örneklerin sonuçları arasında anlamlı bir fark olmadığı saptandı (z=0.178, p=0.859).

Yapılan sulandırım çalışmalarında, viral yükteki azalmanın doğrusallık gösterdiği gözlemlendi (Şekil 2).

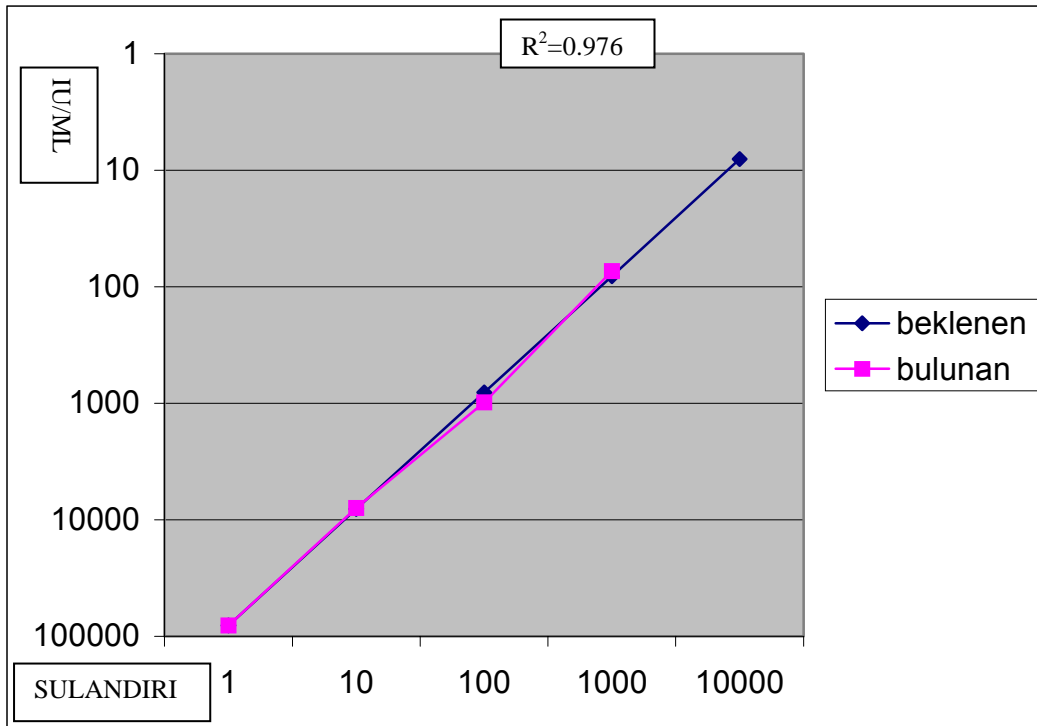
## TARTIŞMA

Hepatit C virüsü RNA düzeylerinin güvenilir olarak kantitasyonu HCV enfeksiyonu olan hastaların tedavilerinin izleminde önemlidir. Tedavi öncesi düzeyler, interferon-ribavirin tedavisine yanıtı değerlendirmede prognostik değere sahip olabileceği gibi, RNA düzeylerinin tedavi sırasında düşüşleri kalıcı virolojik yanıt ile ilişkilidir. Bu yüzden tutarlı ve doğru kantitasyon, tedaviyi yönlendirmede önemlidir (9).

Şu anda kullanılan kantitatif HCV RNA testlerinin alt sınırı 30 IU/ml ile 615 IU/ml arasında, üst sınır 500.000 ile 7.700.000 IU/ml arasında değişmektedir. Bu sınır değerlerin üzerindeki değerlerde örneğin sulandırılarak çalışılması gerekmektedir (10). Ek manipölasyonlar da kontaminasyon riskini artırmaktadır.



Şekil 1. İki sistemde elde edilen sonuçların karşılaştırılması



Şekil 2. Sulandırım ve viral yük ilişkisi

Yakın dönemlerde farklı formatlarda kantitatif, floresan temelli gerçek zamanlı PCR testleri geliştirilmiştir. Bu testlerin duyarlılıklarının yüksek, dinamik aralıklarının geniş ve pekçok HCV genotipini saptayabilir olduğu gözlenmiştir (7,11).

TaqMan problemlerinin ve ABI Prism 7900 Sequence Detection sisteminin kullanıldığı floresan temelli gerçek zamanlı PCR yöntemi ile iki ticari kantitasyon kitinin, bDNA VERSANT HCV RNA ve HCV Monitor testi, karşılaştırıldığı bir çalışmada testin her iki yöntem ile uyumlu sonuçlar verdiği gözlenmiştir (12). Bu çalışmada testin  $4.2 \log_{10}$  dinamik aralığa sahip olduğu gorlmuştur. Bunun tersine Amplicor Monitor HCV RNA testi  $2.9 \log_{10}$  konsantrasyon aralığında lineer olduğu bilinmektedir (13). Taqman (Perkin-Elmer) PCR flojenik gerçek za-

manlı saptama sistemi ile şempanzelerde yapılan bir çalışmada duyarlılık 200 RNA kopya/ml (74 IU/ml) olarak bulunmuş ve yöntemin duyarlı,tekrarlanabilirliği yüksek ve basit olduğu sonucuna varılmıştır (11).

Sonuçlar, RealArt HCV testinin tekrarlanılabilirliği yüksek ve kantitasyona uygun bir yöntem olduğunu göstermiştir. RealArt HCV RG RT PCR üst sınırının yuksekligi nedeni ile hastaların tedaviye başlangıç ve sonrası virolojik yanıtın değerlendirilmesinde uygun bir yöntemdir.

Ancak bu çalışmada Cobas Amplicor ile RealArt HCV RG RT PCR arasında kantitasyonda bir korelasyon olmadığı gözlenmiş bu da hasta izleminde farklı testlerden elde edilen sonuçların birbirine çevrilmesinin uygun olmadığını göstermiştir.

#### KAYNAKLAR

1. Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. Isolation of CDNA clone derived from a blood borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* **1989**; 244: 359-62.
2. Freeman AJ, Dore GJ, Law MG, et al. Estimating progression to cirrhosis in chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology* **2001**; 34: 809-16.
3. NIH Consensus Statement on Management of Hepatitis C. NIH Consensus State Science Statements. **2002** June; 19: 1-46.
4. Pawlowsky JM. Use and interpretation of Virological tests for hepatitis C. *Hepatology* **2002**; 36: S65-73.
5. Beld M, Sentjens R, Rebers S, et al. Performance of the New Bayer VERSANT HCV RNA 3.0 assay for quantitation of hepatitis C virus RNA in plasma and serum:conversion to international units and comparison with the Roche COBAS Amplicor HCV Monitor version 2.0 assay. *J Clin Microbiol* **2002**; 40: 788-93.
6. Kleiber J, Walter T, Haberhausen G, Tsang S, Babiel R, Rosenstraus M. Performance characteristics of a quantitative, homogenous TaqMan RT-PCR test forHCV RNA. *J Mol Diag* **2002**; 2: 158-66.
7. White PA, Pan Y, Freeman AJ, et al. Quantification of hepatitis C virus in human liver and serum samples by using Lightcycler reverse transcriptase PCR. *J Clin Microbiol* **2002**; 40: 4346-8.
8. Kawai S, Yokosuko O, Kanda TJ, Mazeki F, Maru Y, Saisho H. Quantification of hepatitis C virus by Taqman PCR: Comparison with HCV Amplicor Monitor Assay. *J Med Virol* **1999**; 58: 121-6.
9. Arens M. Quantitation of HCV RNA with the microwell plate and COBAS Amplicor HCV Monitor assays. *J Clin Virol* **2003**; 27: 235-41.
10. Pawlotsky JM. Use and interpretation of hepatitis C virus diagnostic assays. *Clin Liver Dis* **2003**; 7: 127-35.
11. Puig M, Mihail K, Yu MY, Feinstone SM, Major ME. Sensitivity and reproducibility of HCV quantitation in chimpanzee sera using Taqman real-time PCR Assay. *J Virol Methods* **2002**; 105: 253-63.
12. Sandrine C, Descamps V, Thibault V, et al. *J Clin Virol* **2004** (basım aşamasında).
13. Lee SC, Antony A, Lee N, et al. Improved version 2.0 qualitative and quantitative AMPLICOR reverse transcription-PCR tests for hepatitis C virus RNA: Calibration to international units, enhanced genotype reactivity, performance characteristics. *J Clin Microbiol* **2000**; 38: 4171-9.

#### İLETİŐİM

Do. Dr. İmre ALTUĞULU  
Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı  
35100 Bornova, İZMİR  
e-posta: altuglu@hotmail.com