

TAM OTOMATİK KEMİLUMİNESANS İMMUNASSAY İLE DÜŞÜK DÜZEYDE ANTI-HEPATİT C VİRÜS (ANTI-HCV) POZİTİF SAPTANAN ÖRNEKLERİN HCV RNA DÜZEYLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

EVALUATION OF THE HCV RNA LEVELS OF ANTI-HCV POSITIVE SPECIMENS AT LOW LEVELS BY FULL AUTOMATIC CHEMILUMINESCENCE IMMUNOASSAY

İlhan AFŞAR Aslı Gamze ŞENER Berna GÖNÜL Nükhet KURULTAY
Metin TÜRKER

Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Yeşilyurt, İzmir

Anahtar Sözcükler: Anti-hepatit C virüs (Anti-HCV), HCV RNA, yalancı pozitiflik, kemiluminesans immunoassay

Keywords: Anti-hepatit C virus (Anti-HCV), HCV RNA, false positivity, chemiluminescence immunoassay

Geliş: 02 Aralık 2006

Kabul: 07 Mayıs 2007

ÖZET

Bu çalışmanın amacı VITROS anti-HCV assay version 3.0 (Ortho-Clinical Diagnostics) ile incelenip anti-hepatit C virüs (anti-HCV) düşük pozitif saptanan örneklerinde (S/Co<5) HCV RNA düzeylerinin saptanmasıdır. Anti HCV tam otomatik kemiluminesans immunoassay, HCV RNA ise Real Time (Gerçek Zamanlı) PCR yöntemi ile çalışıldı. Çalışma süresinde 65 serum örneğinde anti-HCV düşük düzeyde (S/Co<5) saptandı. HCV RNA'sı çalışılan 65 serum örneğinin hiç birisinde HCV RNA pozitif olarak saptanmadı. VITROS anti-HCV assay version 3.0 (Ortho-Clinical Diagnostics) ile araştırılan anti-HCV'nin düşük pozitifliklerinde (S/Co<5) yalancı pozitifliğin yüksek olabileceğinin göz önünde bulundurulması gerektiği sonucuna varıldı.

SUMMARY

The aim of this study was to determine the hepatitis C virus (HCV) RNA levels at low levels of anti-HCV (S/Co< 5) which were detected by the VITROS anti-HCV assay version 3.0 (Ortho-Clinical Diagnostics). Anti-HCV was found at low levels (S/Co<5) in 65 serum samples. HCV RNA positivity was not detected in none of the 65 serum samples , which were found to be positive for HCV by the Real Time PCR method. It is concluded that the false positivity rate might be high for the low positivity of anti-HCV (S/Co<5) which was determined by the VITROS anti-HCV assay version 3.0 (Ortho-Clinical Diagnostics).

GİRİŞ

Hepatit C virüsü (HCV) pozitif sarmallı, zarflı, Flaviviridae ailesine ait bir RNA virusudur. Kronik non-A, non-B hepatitlerin %90'ından sorumludur (1). Dünyada 170 milyondan fazla insanın HCV ile infekte olduğu düşünülmektedir (2). Hepatit C virüs infeksiyonu çoğu kez asemptomatiktir, buna karşın HCV ile infekte bir çok bireyde (%85) persistent kronik infeksiyon ve kronik hepatit gelişir (3). Hepatit C virüs antikorunun saptanmasında kul-

lanılan testlerin ilki Amerikan "Food and Drug Administration" (FDA) tarafından 1990 yılında kullanımına izin verilmiştir (4). Bu zamandan sonra bir çok test kullanımına girmiş "Centers for Disease Control and Prevention" (CDC) serolojik kanıtın yalnız anti-HCV tarama testinin pozitif olması ile olabileceğini ve doğrulama testlerinin daha spesifik serolojik testler (Recombinant immunoblot assay –RIBA- ve nucleic acid test –NAT-) ile yapılmasını önermektedir (5). Amerika Birleşik Devletleri'nde FDA ta-

rafından tarama testi olarak iki enzim immün assay (EIA) (Abbott HCV EIA 2.0 and ORTHO HCV version 3.0 EIA) ve bir "enhanced chemiluminescence immunoassay" (CIA) (VITROS anti-HCV assay; Ortho-Clinical Diagnostics) testleri kullanıma girmiştir (6, 7).

HCV prevalansının yüksek olmadığı bölgelerde, özellikle %10'dan düşük prevalansa sahip bölgelerde anti-HCV taramalarında yüksek yalancı-pozitifliğe sık rastlanmaktadır.

Hepatit C virüs genomu yedi fonksiyonel bölgeyi kapsar. Bu bölgeler çekirdek, zarf (E₁ E₂), yapısal olmayan bölge (NS₂, NS₃, NS₄, NS₅). CIA (VITROS anti-HCV assay; Ortho-Clinical Diagnostics) testinde üç rekombinant HCV antijeni kullanılmaktadır. Bu üç rekombinant antijen; c22-3, c200 ve NS-5 tir. Yazarların laboratuvarında anti-HCV tarama testi olarak; FDA onayını 2001 yılında almış Ortho Vitros anti-HCV, CIA testi ve ileri değerlendirme için nükleik asit testi olarak gerçek zamanlı (real time) polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) tekniği ile çalışılmaktadır. İmmunometrik bir teknik olan CIA (VITROS anti-HCV assay; Ortho-Clinical Diagnostics) kemiluminesan yöntemle çalışmakta ve en az geleneksel EIA testleri kadar özgül ve duyarlı olduğu belirtilmektedir (1).

Bu çalışmanın amacı; yüksek anti-HCV prevalansına sahip olmayan yazarların hastanesindeki CIA (VITROS anti-HCV assay; Ortho-Clinical Diagnostics) ile çalışılan S/Co oranı < 5 olan sonuçların HCV RNA düzeylerini değerlendirmektir.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmada Ocak 2005-Temmuz 2006 tarihleri arasında İzmir Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda anti-HCV bakısı yapılan ve anti-HCV düzeyleri (S/Co<5) saptanan hastaların HCV RNA düzeyleri incelenmiştir.

Anti-HCV kemiluminesan tekniği ile VITROS anti-HCV assay version 3.0 (Ortho-Clinical Diagnostics) ile yapıldı.

Hepatit C virüsü RNA düzeyleri kantitatif (10⁹ – 10³ genom/ml) olarak gerçek zamanlı (real time) polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) tekniği ile ölçüldü. Kısaca; nükleik asit eldesi için hasta serumlarından 200 µl örnek RoboGene® Quantification kit (Roboscreen, Almanya) kullanılarak ve üretici firmanın önerileri doğrultusunda yapıldı. Hepatit C virüsü RNA'nın saptanması için 20 µl (miks, primer ve taqMan prob) (Roboscreen, Almanya) ve 5 µl ekstraksiyon ürünü karışımı ABI prism 7700 (Applied, Biosystems, Foster City, CA, ABD) ile çalışıldı.

BULGULAR

Çalışmada düşük düzeyde anti-HCV saptanan 65 hastanın serumunda HCV RNA düzeylerine bakıldı. Üç hastanın HCV RNA'sı düşük düzeyde pozitif olarak saptandı. Hastaların HCV RNA düzeyleri 2.4 x 10², 8.2 x 10 ve 5.4 x 10 genom/ml olarak saptandı. Hepatit C virüsü RNA düşük düzeyde saptanan üç hastanın yeni serumunda testleri tekrar edildi ve anti HCV düzeylerinin yine düşük düzeyde pozitifliği ile beraber HCV RNA düzeyleri negatif olarak saptandı. Hastaların klinik bilgileri HCV enfeksiyonu ile ilgili olmadığı düşünüldüğü için ilk HCV RNA düzeylerinin yalancı pozitiflik olduğu sonucuna varıldı. Böylece 65 hastanın hiç birisinin HCV RNA'sının pozitif olarak saptanmadığı sonucuna varıldı.

TARTIŞMA

Hepatit C virüsünün non-A ve non-B hepatitlerinin büyük bir bölümünden sorumlu olduğu bilinmektedir. Çalışmalar HCV'nin kan ve kan ürünleri sıkı bireysel temas ile geçtiği bildirilmiştir. Anti-HCV'nin saptanması bireyin enfekte olduğunu ve bulaştırma kapasitesinin olduğu bilinmektedir (8). Bu yönüyle incelendiğinde HCV'nin kesin tanısı bireyin tüm yaşantısını değiştirmektedir.

Hepatit C virüsü enfeksiyonlarının artan karmaşık tanı yöntemleri direkt olarak hasta takibi ve yönetimini etkilemektedir. Eldeki testlerin dikkatli ve doğru kullanımı kesin tanı ve takip için gereklidir. Çalışmada 65 hastada anti-HCV test sonucu S/Co<5 olarak saptanmış ve klinikle laboratuvar hasta hakkında kesin sonuca varamamıştır. Çünkü bu hastalar genelde HCV enfeksiyonu belirtisi vermeyen ve tarama yapılması sonucu düşük pozitiflik S/Co<5 veren hastalardır. Her ne kadar HCV enfeksiyon beklentisi içinde olmasak da yalancı pozitiflikle beraber, enfeksiyonun erken evresinde (serokonversiyonun tam olarak sağlanmaması), immunsupresyona bağlı azalmış immün yanıt ve enfeksiyonun gerilemesi (sağaltım?) ile düşük düzeyde anti-HCV pozitifliği olabileceği düşünülmelidir. Bu gibi durumlarda nükleik asit testleri HCV RNA varsa saptayıp tanıya yardımcı olur ya da kuvvetli pozitiflikte aktif HCV enfeksiyonunun kanıtlanması için kullanılır (9).

Düşük pozitiflik oranı bölgenin anti-HCV prevalansı ile ters orantılı olduğu bildirilmiştir. Örneğin; yüksek prevalansa sahip grupta %4.9, orta prevalansa sahip çalışma grubunda %8.7 ve düşük prevalansa sahip grupta ise %21.5 olarak saptanmıştır (7). Yapılan çalışmalarda Türkiye'deki prevalansın %2'nin altında olduğu bildirilmiştir (10). Bu yönüyle bakıldığında, laboratuvarımızda tarama testi

olarak kullandığımız CIA yönteminde yalancı pozitiflik oranına sık rastlanmasını bekleriz. Ismail ve ark. (1)' çalışmasında, CIA (VITROS anti-HCV assay; Ortho-Clinical Diagnostics) ile Abbott EIA yöntemi karşılaştırılmış ve anti-HCV taraması yönünden %100'e karşın %98.9 daha iyi duyarlılık göstermiştir; buna karşılık, Abbott EIA %100-%98.1 oranları ile daha iyi özgüllük sağlamıştır (1). Oethinger ve ark. (6)'nın yaptığı çalışmada, S/Co<5 olan 83 hastanın hiç birisinde HCV RNA'sı saptanmamıştır. S/Co<8 olan 19 hastanın birinde HCV RNA pozitif olarak saptanmıştır. Bununla birlikte CDC CIA yöntemiyle çalışılan ve S/Co>8 olan anti-HCV sonuçlarında tanı amaçlı ek testlere gereksinim olmadan pozitif olarak değerlendirilmesini önermesine karşın Dufour ve ark. (11) yaptığı çalışmada anti-HCV yüksek pozitif 684 hastanın yirmibeşinde HCV RNA saptanmamışlardır. Bu yönüyle irdelendiğinde, CDC önerilerine göre, S/Co>8 pozitif kabul edilseydi 25 hasta yalancı pozitif olarak değerlendirilmiş olacaktı. Bu yüzden bazı araştırmacılar S/Co<20 olan tüm hastaların ek testlerle doğrulanması gerektiğini belirtmektedirler (6). Ek testlerin (HCV RNA) tüm merkezlerde yapılamaması, alt yapıya ve yetişmiş personele gereksinim duyması yanında ekonomik yük getirmektedir. Örneğin tarama testleri ortalama 5\$, tarama testlerinin tekrarı 15\$, RIBA ile ileri araştırma 65\$-158\$ ve NAT ile araştırma 50\$-295\$ ekonomik yük getirmektedir (7). Türkiye koşulları düşünüldüğünde ek testleri isterken hem klinisyen hem de laboratuvar sorumluları iyi değerlendirme yapmaları gerekmektedir.

Hasta sonuçlarının değerlendirilmesinde ekonomik yükler göz önünde bulundurulması yanında kesin ve en doğru sonuca da ulaşılması temel hedeftir. Bu nedenle, tarama testi doğrulama testleri ile desteklenmelidir. Buna karşılık, HCV enfeksiyonu olan bireylerde HCV RNA'nın saptanamaması enfeksiyonun akut fazında ve sağaltım alan özellikle interferon sağaltımı alan hastalarda göz-

lemlenebilir olduğuda göz önünde bulundurulmalıdır. Bu nedenle seri HCV RNA takibi önerilmektedir (12).

Moleküler testlerde örneklerin saklama ve taşıma koşulları, çalışma koşulları, kullanılan "primerler" testin sonucuna etki eder. Testlerimiz 2005 yılı kalite kontrol (QCMD) çalışma programına alınmış ve eksternal kontrolü yapılmıştır ve ayrıca tüm çalışmalarımızda internal kontrolleri yapılmıştır. Testimizde HCV RNA kantitasyonu 10^3 genom/ml'ye kadar olmasına karşın daha düşük düzeyler saptanabilmektedir. Hepatit C virüsü RNA'nın 10^3 genom/ml'den az olması durumunda testin kantitasyon aralığının dışında olması nedeniyle kontaminasyon, primer uyumsuzluğu gibi nedenlerden dolayı yalancı düşük pozitiflik akla gelebilir. Bu durumda testin tekrarı ve takibi önerilmektedir. Çalışmada 65 hastanın üçünde HCV RNA saptanmıştır. Hepatit C virüsü RNA düzeyi iki hastada 10^1 genom bir hastada 10^2 genom olarak saptanmıştır. Hastaların ALT düzeyleri normal düzeyde idi. Hastaların HCV RNA düzeylerinin daha sonra tekrar edilmesi sonucunda hiç birisinde HCV RNA pozitif olarak saptanmadı. İlk test sonuçlarının düşük düzeyde yalancı pozitiflik olduğunu düşündü.

Yukarıda belirtilen nedenlerden dolayı NAT testlerinde yalancı negatifliğide düşünmeliyiz. Bayram ve ark. (13)'nin yaptığı çalışmada anti-HCV pozitifliği bulunan hastaların %23.2'sinde HCV RNA saptanmamıştır.

Oethinger ve ark. (6) CIA (VITROS anti-HCV assay; Ortho-Clinical Diagnostics) ile anti-HCV'yi S/Co<5 saptandığında kuvvetli yalancı pozitiflik düşünmekle beraber hasta takibini bırakmamayı önermektedirler. Bu çalışmadan edindiğimiz sonuçlara göre, anti-HCV S/Co<5 olduğunda HCV enfeksiyon belirtisi olmayan ALT düzeyleri normal olan tarama yapılmış hastaların anti-HCV sonuçlarının yalancı pozitiflik yönünde değerlendirilebileceği, yinede hastanın ve toplumun önemli bir sağlık problemi olan HCV'yi diğer testlerle doğrulamadan saf dışı bırakamayacağımızı düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

1. Ismail N, Fish GE, Smith MB. Laboratory evaluation of a fully automated chemiluminescence immunoassay for rapid detection of HBsAg, antibodies to HBsAg, and antibodies to hepatitis C virus. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 610-7.
2. Thomas DL, Leman SM. Hepatitis C. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds. *Principles and Practice of Infectious Diseases*. Fifth ed. Philadelphia: Churchill Livingstone, 2000; 1736.
3. Lauer GM, Walker BD. Hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 2001; 345: 41-52.
4. CDC. Public Health Service inter-agency guidelines for screening donors of blood plasma, organs, tissues and semen for evidence of hepatitis B and hepatitis C. *MMWR* 1991; 40: 1-17.
5. CDC. Recommendations for prevention and control of hepatitis C virus (HCV) infection and HCV-related chronic disease. *MMWR Recomm Rep* 1998; 47: 1-39.
6. Oethinger M, Mayo DR, Falcone J, Barua PK, Griffith BP. Efficiency of the ortho VITROS assay for detection of hepatitis C virus-specific antibodies increased by elimination of supplemental testing of samples with very low sample-to-cutoff ratios. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 2477-80.

7. **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**; 52: 1-13.
8. **Choo QL, Weiner AJ, Overby LR, Kuo G, Houghton M, Bradley DW.** Hepatitis C virus: the major causative agent of viral non-A, non-B hepatitis. *Br Med Bull* **1990**; 46: 423-41.
9. **Tanaka E, Ohue C, Aoyagi K, et al.** Evaluation of a new enzyme immunoassay for hepatitis C virus (HCV) core antigen with clinical sensitivity approximating that of genomic amplification of HCV RNA. *Hepatology* **2000**; 32: 388-93.
10. **Akkız H.** Epidemiyoloji ve korunma. Kılıçturgay K, Badur S, ed. *Viral Hepatit 2001*'de. İstanbul: Viral hepatit savaşım derneği yayını, **2001**: 193.
11. **Dufour DR, Talastas M, Fernandez MD, Harris B.** Chemiluminescence assay improves specificity of hepatitis C antibody detection. *Clin Chem* **2003**; 49: 940-4.
12. **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.
13. **Bayram A, Ekşi F, Karşılıgil T, Balcı İ.** HCV enfeksiyonunda enzim immunoassay (EIA) ve otomatize RT-PCR yöntemi olan cobas ampliCor HCV monitor test sonuçlarının karşılaştırılması. *Türk Mikrobiyol Cem Derg* **2000**; 30: 304-8.

İLETİŞİM

Uz. Dr. İlhan AFŞAR
İzmir Eğitim ve Araştırma Hastanesi
Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Bölümü
35360 Basın Sitesi, İZMİR
e-posta: iafsar@yahoo.com