

Hepatit C İnfeksiyonu Şüpheli Olgularda Enzim Immunoassay (EIA) ve COBAS AMPLICOR HCV-RNA Test Sonuçlarının Karşılaştırılması

Banu BAYRAKTAR(*), Ayfer EREN ŞENSOY(**), Emin BULUT(*),
Alper GÜNDÜZ(**), Engin SEBER(**)

(*) Şişli Etfal Eğitim ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarı, İstanbul
(**) Şişli Etfal Eğitim ve Araştırma Hastanesi Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği, İstanbul

ÖZET

Hepatit C virusu (HCV) enfeksiyonu geçirdiğinden şüpheli edilen 95 hastadan alınan serum örnekleri çalışmaya dahil edilmiştir. 73 anti-HCV pozitif, 22 anti- HCV negatif örnekte PCR yöntemiyle vireminin araştırılması amaçlanmıştır. Seroloji ve PCR metodlarının her ikisiyle 75 örnekte uyumlu sonuç elde edilmiştir. Bu sonuçlardan 58'i pozitif, 17'si negatiftir. Anti- HCV pozitif olduğu halde, 14 örnekte HCV-RNA saptanmamıştır. HCV-RNA pozitif iki örnekte anti-HCV negatif bulunmuştur. Anti-HCV EIA ile HCV-RNA PCR sonuçları % 82,4 oranında uyumlu saptanmıştır.

Anahtar kelimeler: HCV enfeksiyonu tanısı, HCV RNA, PCR, Seroloji

SUMMARY

Comparison of Enzyme Immunoassay (EIA) and COBAS AMPLICOR HCV- RNA Test Results in Patients with suspected Hepatitis C Infection

Serum samples obtained from 95 patients with suspected HCV infection were analyzed. 73 anti-HCV positive, 22 anti-HCV negative samples were examined with PCR for the absence or present of viremia. Serology and PCR methods gave concordant results for 75 samples, 58 of them were positive and 17 of them were negative in both assays. In 14 anti- HCV positive cases HCV- RNA was detected negative. A negative result in the HCV- EIA was observed in two HCV- RNA positive samples. When compared to the patients serological status, as assessed by anti-HCV EIA, the results of PCR showed an overall concordance rate of 82,4%.

Key Words: Diagnosis of HCV infection, HCV RNA, PCR, Serology

GİRİŞ

HCV enfeksiyonlarının tanısının, tek başına HCV EIA kullanılarak güvenilir bir şekilde yapılması, her zaman mümkün olmamaktadır (1, 2, 3).

Her ne kadar Anti-HCV antikorlarının varlığı, bireyin HCV ile karşılaşmış olduğunu göstermekteyse de, tek başına akut bir enfeksiyon varlığını göstermekte yetersiz kalmaktadır. Akut bir enfeksiyonda antikorların saptanabilir düzeylere ulaşması altı haftayı bulabilmektedir. Ayrıca serolojik testlerle düşük risk gruplarında çapraz reaksiyon veren antikorlara bağlı yalancı pozitif sonuçlar, serokonversiyon öncesi dönemde ve bağışıklığı baskılanmış hastalarda

yalancı negatif sonuçlar alınabilmektedir (1, 3, 4, 5).

HCV enfeksiyonlarının kesin tanısı için HCV-RNA'nın varlığının gösterilmesi esastır. Bu amaçla kullanılan moleküler biyolojik yöntemlerden olan in-house PCR testleri teknik olarak zor, ampikon kontaminasyonuna açık ve standardizasyondan yoksundur (1,2,6). COBAS AMPLICOR amplifikasyon ve saptama işlemlerini otomatik olarak yapan, standardize bir sistemdir. İçerdiği urasil-N-glikozilaz enzimi ile önceki reaksiyonlardan kalan ampikonların yok edilmesi oluşabilecek kontaminasyonları, diğer bir deyişle yalancı

pozitiflikleri önlemektedir. Ayrıca bu kitlerde örneğe bağlı inhibisyonu saptamaya yarayan internal kontrol (IC) mevcuttur (2, 6, 7).

GEREÇ VE YÖNTEM

Serum Örnekleri: HCV infeksiyonu geçirdiğinden şüphe edilen, transaminazları yüksek (alani-aminotransferaz > 45U/I) ya da sarılık, üst abdominal ağrı gibi klinik bulguları olan ya da kronik hemodiyaliz, kan transfüzyonu gibi parenteral geçişe sebep olabilecek risk faktörlerine sahip 95 hastanın kan örnekleri çalışmaya alınmıştır. Hastaların 49'u erkek ,45'i kadındır. Serum örnekleri uygun koşullarda ayrıldıktan sonra test edildikleri güne kadar -70°C de saklanmıştır.

Serolojik Test: Anti-HCV EIA; Innostest HCV Ab IV (Innogenetics, Belçika) kiti ile üretici firmanın önerileri doğrultusunda uygulayarak tüm serum örneklerinde anti-HCV varlığı araştırılmıştır.

COBAS AMPLICOR HCV-RNA PCR (Roche Diagnostic): Serum örnekleri üretici firmanın önerileri doğrultusunda COBAS AMPLICOR HCV-RNA PCR ile incelenmiştir. 200 ml serum örneği internal kontrol (IC) içeren lizis buffer ile inkübe edilmiştir. Daha sonra RNA izopropanol ile santrifüj edilerek çöktürülmüştür. Pellet, %70'lik etanol ile bir kez yıkanmıştır ve 200 ml dilüent içinde tekrar süspanse edilmiştir. HCV genomunun iyi korunmuş 5'UTR (untranslated region) bölgesinin 244 bp'lik bölümü KY 78 (Biyotinle işaretli), KY 80 primerleri ile amplifiye edilmiştir. Amplifikasyon sonrasında cihaz otomatik olarak çift iplikli ürünü denatüre etmiştir. Biyotinle işaretlenmiş olan ürün, HCV(veya IC) için spesifik oligonükleotid proplarla kaplı magnetik partikül süspansiyonu tarafından tutulmuştur. Bağlanmamış olan materyal yıkanarak uzaklaştırılmıştır. Biyotin işaretli amplikon, avidin-horseradish peroxidase conjugate-tetramethyl benzidine H₂O₂ kolorometrik reaksiyonu ile saptanmıştır. Her örneğin 660 nm'deki absorbansı önceden belirlenmiş cut-off değeri ile karşılaştırılarak hem HCV hem de IC için pozitif ve negatif sonuçlar saptanmıştır.

BULGULAR

HCV infeksiyonu şüphesi olan hastalardan elde edi-

len serumlar eş zamanlı olarak EIA ve COBAS AMPLICOR yöntemleriyle incelenmiştir. 95 serum örneği için anti-HCV ve HCV-RNA sonuçlarının karşılaştırmaları Tablo 1 de gösterilmiştir. Örneklerin dördünde (% 4) PCR inhibe olduğundan sonuç alınamamıştır. İnhibisyon saptanan dört serum örneğinden yapılan ikinci ekstraksiyon ve PCR sonucu değiştirmemiştir.

Tablo 1. COBAS AMPLICOR (HCV- RNA) ile elde edilen sonuçların, EIA (Anti- HCV) sonuçları ile karşılaştırılması.

TARTIŞMA

HCV infeksiyonu tüm dünyada yaygın , majör bir

| | | Anti- HCV | |
|---------|---------|---------------|---------------|
| | | Pozitif | Negatif |
| HCV-RNA | Pozitif | 58 (%63.7) | 2 (%2.2) |
| | Negatif | 14 (%15.4) | 17 (%18.7) |

sağlık sorunudur. Dünya nüfusunun %3'ü Anti HCV pozitifken, ülkemiz için bu rakam yaklaşık %1'dir. HCV akut viral hepatitlerin %20'sinden, kronik hepatitlerin % 70'inden sorumludur. Olguların yaklaşık % 85'inde hastalık kronikleşmektedir. Bu nedenle, HCV infeksiyonu tanısının erken dönemde, doğru olarak konulması ve takibi son derece önemlidir (8, 9, 10).

EIA testleri, kullanımının kolay ve ucuz oluşları nedeniyle tanıda ilk tercih edilecek testlerdir. Bugüne kadar HCV tanısı için üç kuşak EIA testi geliştirilmiştir. Bizim de kullandığımız üçüncü kuşak testler, ikinci kuşak testlerden farklı olarak kor (c22- 3) ve NS3 (c-33-c) bölgesinden proteinler yanında NS5 bölgesinden bir rekombinant protein içerir (10). Ancak üçüncü kuşak testlerle bile serokonversiyonun saptanması 5- 6 haftayı bulmaktadır. Anti – HCV pozitifliği saptansa bile akut bir infeksiyonun mu yoksa persistan bir infeksiyonun mu göstergesi olduğu ayırt edilememektedir (1). Bu nedenle PCR ile serumda HCV- RNA'nın araştırılması, viral replikasyonun ve aktif infeksiyonun varlığını göstermede çok önemli bir parametre olarak kabul edilmektedir (4). Ayrıca PCR ile HCV-RNA, infeksiyo-

nun başlangıcından 1-2 hafta gibi kısa bir süre sonra saptanabilmektedir (1, 4, 10).

Çalışmamızda EIA ve PCR yöntemlerinin her ikisiyle de 58 örnekte pozitif, 17 örnekte negatif sonuç elde edilmiştir. 14 örnekte anti- HCV pozitif olduğu halde, HCV-RNA saptanmamıştır. Bu durum latent veya inaktif enfeksiyonda seropozitifliğin devam etmesi, HCV viremi düzeyinin kullanılan yöntemin sapta-yabildiği düzeyden düşük olması veya HCV virusunun aralıklı olarak sirkülasyona salınımıyla aynı hasta için değişken PCR sonuçları elde edilmesi ile açıklanabilir (2, 6).

COBAS AMPLICOR testinin önemli bir özelliği IC içermesidir. Normal koşullarda IC'ün her reaksiyonda amplifiye olması beklenir. Ancak herhangi bir nedenle PCR reaksiyonu inhibe olursa internal kontrol çoğalmaz. IC, sentetik bir RNA transkripti olup primer bağlanma bölgeleri HCV hedef dizisi ile aynı, internal dizisinin uzunluğu ve baz kompozisyonu hedef HCV dizisine benzerdir. Özel prob bağlanma bölgesi IC'ü hedef amplicondan ayırmaya yarar (2). Bizim örneklerimizin dördünde (%4) inhibisyon saptanmıştır. IC varlığı bu hastalara yalancı negatif sonuç vermemizi engellemiştir (2,6,7). PCR reaksiyonunun inhibe olduğu serumlar hemodiyaliz hastalarına aittir. Diyaliz sırasında hastalara heparin verilmektedir. Heparinin PCR reaksiyonunu doza bağlı olarak inhibe ettiği ve HCV kopya sayısı düşük örneklerde bu etkinin daha fazla görüldüğü gösterilmiştir (11).

İki olguda anti-HCV negatifken HCV-RNA pozitif bulunmuştur. Olguların her ikisi de hemodiyaliz hastasıdır. Schroter ve ark (3,12) seronegatif hemodiyaliz hastalarının %5'inde HCV-RNA saptamışlar ve hemodiyaliz hastalarında HCV enfeksiyonu tanısında PCR'in gerekli olduğunu vurgulamışlardır. HCV-RNA pozitifken serolojik test sonucunun negatif oluşu diyaliz hastalarının immun sistemlerinin baskılanmış olmasıyla açıklanmıştır.

Sonuç olarak, anti-HCV pozitif hastalarda HCV-RNA'nın rutin olarak araştırılması takip ve tedavi açısından gereklidir. Anti-HCV negatif olsa bile Hepatit C enfeksiyonu şüphesi devam eden , bağışıklığı baskılanmış hasta gruplarında HCV-RNA bakılması uygundur.

KAYNAKLAR

- 1- Kraiden M, Zhao J, Bourke C et al: Detection of hepatitis C virus in second-generation enzyme immunoassay-seropositive blood donors by using matched pairs of fresh frozen plasma and pilot tube sera. *J Clin Microbiol* 34: 2191 (1996).
- 2- Albadalejo J, Alonsa R, Antinozzi R et al: Multicenter evaluation of the COBAS AMPLICOR HCV assay , an integrated PCR system for rapid detection of HCV –RNA in the diagnostic laboratory. *J Clin Microbiol* 36 :862 (1998).
- 3- Schröter M, Feucht H, Schafer P et al: Definition of false –positive reactions in screening for HCV antibodies. *J Clin Microbiol* 37: 233 (1999).
- 4- Arslan H ,Tunçbilek S ,Hızal N:HCV enfeksiyonunda Anti-HCV ile HCV-RNA ilişkisi. *Vir Hepa Derg* 1:1 (1998).
- 5- Çolak D, Ögünç D, Gültekin M ve ark: HCV enfeksiyonunun tanısında EIA, IB ve PCR yöntemlerinin karşılaştırılması. *Vir Hepa Derg* 1:5 (1998).
- 6- Kessler H H, Jungkind D, Stelzl E et al: Evaluation of AMPLILINK software for the COBAS AMPLICOR system. *J Clin Microbiol* 37: 436 (1999).
- 7- Gerken G, Rothaar T, Rumı M G et al: Performance of the COBAS AMPLICOR HCV MONITOR test, version 2.0, an automated reverse transcription – PCR quantitative system for HCV load determination. *J Clin Microbiol* 38: 2210 (2000).
- 8- Akkız H, Epidemiyoloji ve Korunma: “ K Kılıçtırgay, S Badur (ed) *Viral Hepatit 2001* , 1. Baskı” Kitabında , s 193- 208. *Viral Hepatitle Savaşım Derneği*, İstanbul (2001).
- 9- Ökten A, HepatitC- Giriş. “ K Kılıçtırgay, S Badur (ed) *Viral Hepatit 2001* , 1. Baskı” Kitabında , s 180-181. *Viral Hepatitle Savaşım Derneği*, İstanbul (2001).
- 10- Türkoğlu S , Viroloji ve Seroloji. “ K Kılıçtırgay, S Badur (ed) *Viral Hepatit 2001* , 1. Baskı “ Kitabında , s 182- 192. *Viral Hepatitle Savaşım Derneği*, İstanbul (2001).
- 11-Miyachi H, Masukawa A, Ohshima T et al. Monitoring of inhibitors of enzymatic amplification in polymerase chain reaction and evaluation of efficacy of RNA extraction for the detection of hepatitis C vrrus using the internal control. *Clin Chem Lab Med* 36:571 (1998).
- 12-Schroter M, Feucht HH, Schafer P et al.High percentage of seronegative HCV infections in hemodialysis patients:the need for PCR. *Intervirology* 40: 277 (1997).