

# Alternatif Bir Anti-HIV Doğrulama Yöntemi: “Line Immunoassay”

## *An Alternative Anti-HIV Confirmation Method: Line Immunoassay*

İrfan Sevinç Saim Dayan

GATA Kan Eğitim Merkezi ve Kan Bankası Müdürlüğü, Etlik-Ankara

**Özet:** Bu çalışmada, hem enzyme immunoassay hem de western blot ile anti-HIV saptanan 46 serum örneğini line immunoassay yöntemi ile değerlendirdik. Ayrıca enzyme immunoassay ile anti-HIV olumlu, western blot ile olumsuz bulunan 24 serum örneğini de line immunoassay ile değerlendirdik. Western blot olumlu 46 serumun tümü line immunoassay ile olumlu bulundu (duyarlılık: %100). Western blot olumsuz örneklerin tümü line immunoassay ile de olumsuz bulundu (özgüllük: %100).

**Anahtar Sözcükler:** HIV, western blot, line immunoassay

**Summary:** In this study, we examined 46 serum samples by line immunoassay which were anti-HIV positive both by enzyme immunoassay and western blot tests. Another 24 serum samples which were positive by enzyme immunoassay but negative by western blot were also examined by line immunoassay. All western blot positive 46 samples were found positive by line immunoassay (sensitivity: 100%). All western blot negative samples were also negative by line immunoassay (specificity: 100%).

**Key Words:** HIV, western blot, line immunoassay

**A**nti-HIV tarama testlerinin %0.1-1.0 oranında yalancı-olumlu sonuçlar verdiği bildirilmektedir (1). Tarama testlerinin duyarlılık ve özgüllüklerinin Avrupa ve Amerika Birleşik Devletleri'nde %98'in üzerinde olduğu, ancak Afrika'luların serumlarında özgüllüğün azalarak yalancı olumlulukların arttığı, bu durumun düşük sıklıkta anti-HIV bulunan ülkelerde de görülebildiği bildirilmiştir (2). Bu nedenle gerçek anti-HIV varlığından söz edebilmek için, tarama testleri ile olumlu bulunan sonuçların doğrulanması gereklidir. Bugün için, dünyaca benimsenmiş doğrulama yöntemi western blot (WB) testidir. Radio immunopresipitasyon (RIPA) yönteminin, laboratuvar personeli için zararlı etkileri vardır. Buna karşın, benimsenen doğrulama yöntemi olan WB yönteminin de

beğenilmeyen özellikleri vardır. HIV preparatlarının kimisinde HLA proteinlerinin bulunması ve elektroforetik ko-migrasyon nedeniyle HLA antikorlu içeren serumlar yanlış olumlu sonuçlara yol açabilmektedir (3). Ayrıca glikoprotein (gp) 120 ve gp 160 gibi yüksek ağırlıklı moleküllerin blot zarlarına aktarılması da zordur. Bu durum, dış proteinlere karşı antikor saptama duyarlılığını azaltabilmektedir (4). WB yöntemi standardize edilmiş olduğundan, duyarlılığı ve özgüllüğü değişkenlik gösterir (3,5). Değerlendirme ölçütleri konusunda da tam bir görüş birliği olmadığından, kimi serolojik görünümün yanlış değerlendirilebilir (6). Son yıllarda, HIV antikorlarının taranması için, aynı anda hem HIV-1 ve hem de HIV-2 antikorlarını tarayabilen enzyme immunoassay

(EIA) kitlerinin kullanımı yaygınlaşmıştır. Bu yöntemler ile antikor saptanan serumların, sonradan hem HIV-1 ve hem de HIV-2 antikorları yönünden doğrulanması gerekmektedir. Bu yüzden genellikle, WB yöntemi ile her iki tür virus için ayrı ayrı inceleme yapılmaktadır. Bu uygulama hem laboratuvar giderlerini, hem de iş yoğunluğunu artırmakta ve daha uzun zaman gerektirmektedir.

Son yıllarda, sentetik ve rekombinant HIV antijenlerinin bir strip üzerine sıralanmasıyla hazırlanan ve line immunoassay (LIA) adı verilen bir yöntem geliştirilmiştir (7-10). Bu yöntem ile HIV-1 ve HIV-2 antikorları aynı çalışmada doğrulanabilmektedir. Ayrıca HIV-1 WB ile saptanamayan HIV-1 subtip-O antikorları da LIA ile saptanabilmektedir (11).

Bu çalışma, anti-HIV doğrulama testi olarak WB ve LIA yöntemlerini karşılaştırmak için gerçekleştirilmiştir.

### Gereç ve Yöntem

GATA'da EIA ile anti-HIV saptanan, ve HIV-1 WB ile anti-HIV varlığı doğrulanmış 46 serum ile anti-HIV-1 ya da anti-HIV-1/2 EIA testleri olumlu bulunup anti-HIV-1 WB ile olumsuz bulunan 24 serum örneği, LIA yöntemi ile yeniden değerlendirildi. Bu amaçla INNO-LIA HIV1/HIV2 Ab (Innogenetics, Belgium) kiti üretici firmanın önerdiği biçimde kullanıldı.

LIA striplerinde üç rekombinat protein çizgisi (gag: p24, p17 ve pol: p31) ve iki sentetik peptid çizgisi (HIV-1 için gp41 ve HIV-2 için gp36) koşut olarak yer almaktadır. Bu HIV antijenlerine ek olarak, her stripte bir zayıf cut-off (insan IgG), bir zayıf olumlu kontrol (1+ insan IgG), bir kuvvetli olumlu kontrol (3+ IgG) ve bir de serum eklenip eklenmediğini kontrol eden (2+ anti-insan IgG) olmak üzere toplam 4 kontrol çizgisi vardır.

### Bulgular

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) ölçütlerine göre WB ile anti-HIV-1 olumlu bulunan 46 serumun tümü, LIA ile anti-HIV-1 yönünden olumlu bulundu. EIA ile anti-HIV-1/2 olumlu, WB ile olumsuz bulunan 24 olgunun serumları, LIA ile hem HIV-1 ve hem de HIV-2 yönünden olumsuz bulundu.

### Tartışma

Çalışmamızda, WB ile anti-HIV-1 olumlu bulunan 46 olgunun tümü LIA yöntemi ile de anti-HIV-1 yönünden olumlu bulunmuştur. Bu durumda, WB standart alın-

dığında, LIA yönteminin duyarlılığının WB ile %100 uyumlu olduğu görülmektedir.

Pollet ve ark. WB ile doğrulanmış 309 anti-HIV-1 ve 25 anti-HIV-2 olgusunun serumunu LIA ile incelemişler ve yalancı olumsuz sonuç bulmamışlardır. Aynı bir 698 serumluk panel ile de yalancı olumlu sonuç görmediklerini bildirmişlerdir (8). Fransen ve ark.'da, WB sonuçlarını DSÖ ölçütlerine göre standart sayarak, 1066 anti-HIV-1, 192 anti-HIV-2, 64 her ikisi olumlu ve 678 her ikisi olumsuz serumu LIA ile değerlendirmişler ve LIA'nın duyarlılığını %99.77, özgüllüğünü %100 bulmuşlardır (9). Bu çalışmada anti-HIV-2 için duyarlılık %100 bulunmuştur. Nkengasong ve ark. ise %13'ü anti-HIV-1 ve %2.5'u anti-HIV-2 olumlu 400 serum üzerinde LIA ve WB'in duyarlılıklarını eşit (%100) bulmuşlardır (12).

Çalışmamızda, EIA ile anti-HIV-1/2 olumlu ancak WB ile olumsuz sonuç vermiş 24 serumun tümü, LIA yöntemi ile olumsuz bulunmuştur. Bu durumda, WB altın standart olarak alındığında, LIA yönteminin özgüllüğünün de WB ile %100 uyumlu olduğu görülmektedir. Fransen ve ark.'da, WB'i standart alarak LIA'yı %100 özgül olarak bulmuşlardır (9).

Anti-HIV-1 ve anti-HIV-2 WB yöntemlerinde toplam 18 antijen olmasına karşılık, LIA yönteminde daha az ancak özgül antijenlerin kullanılması, LIA'nın olumsuz yanı gibi değerlendirilebilir. WB yönteminde antijenler birbirlerinden ayrılmış olmakla birlikte, LIA yönteminde antijenlerin belirli bir yoğunlukta ve daha uygun aralıkla yerleştirilmiş olması, özgül olmayan tepkimelerin LIA ile azalabileceğini, daha kolay ve daha doğru değerlendirileceğini düşündürmektedir. Örneğin, gp41 çizgisi LIA yönteminde net olarak ayırt edilebilir iken, WB yönteminde yaygın bir kuşak olduğundan yanılgılara yol açabilir. Kendi çalışmamızda gp41 çizgisi olumluluğu LIA ve WB için ayrıcalık göstermemiştir. Fransen ve ark. LIA ile %98.4, WB yöntemiyle de %96.1 oranında olumluluk saptamışlardır (9). Pollet ve ark.'da anti-gp41'in LIA yönteminde WB'dan daha önce saptanabildiğini bildirmişlerdir (8).

LIA için gerekli olan antijenlerin rekombinant ya da sentetik olarak elde edilmiş olmaları, viral lizat kitlerindeki insan gözesi antijenlerinin, yalancı olumlu sonuçlara yol açma riskini ortadan kaldırmaktadır. Ancak, LIA yönteminde rekombinant antijenlerin kullanılması nedeniyle anti-E.coli antikorlarının yalancı olumlu sonuçlara yol açabileceği düşünülebilir. Buna karşın, Pollet ve ark.

elde edilen antijenlerin yeterince saf olduklarını ve anti-E.coli antikollarının LIA çizgileri ile tepkime vermediğini bildirmişlerdir (8).

HIV ile ilgisiz çeşitli sayrılıkları olan bireylerin serumlarının WB ile kimi çizgilerde yalancı olumlu sonuçlara yol açtığı bildirilmiştir (10,13). Pollet ve ark. WB'in tersine, LIA ile çok az sayıda sayrıda p24 etkileşimi saptamışlar ve indeterinant oranının daha az olduğunu bildirmişlerdir (8).

WB yönteminin olumsuz bir yanı da, serum konulması unutulduğunda, testin olumsuz olarak değerlendirilme riskinin olmasıdır. LIA yönteminde ise, test ortamına serum eklenmesi unutulursa, değerlendirme aşamasında anti-IgG çizgisinin görülmemesi nedeniyle yanlışlık ayırt edilmektedir.

Yakın zamanlara değin EIA yöntemi ile anti-HIV saptanan serumlar birçok referans laboratuvarında yalnız HIV-1 WB ile değerlendirildiğinden, anti-HIV-2 olumlu

serumlar ya negatif ya da kimi çapraz tepkimeler nedeni ile anti-HIV-1 yönünden olumlu olarak saptanırdı(14,15). Bugün artık, anti-HIV-1/2 EIA olumlu serumlara hem HIV-1, hem de HIV-2 WB testleri uygulanmaktadır. Bu durumun laboratuvar giderlerini, iş yoğunluğunu ve zaman yitimini artırdığı bilinmektedir. Bunun yerine LIA yönteminin uygulanması ile bu olumsuzluklar giderilebilecektir.

LIA sonuçları, kalitatif olarak çıplak gözle değerlendirilebilmekle birlikte, bir dansitometre ile yarı niceliksel olarak da derecelendirilmektedir. Ancak, WB dansitometre ile değerlendirildiğinde lotlar arası ve stripler arası ayrıcalıklar olduğu gözlenmiştir (8,9).

Sonuç olarak: LIA'nın yüksek düzeyde duyarlı ve özgül oluşu, HIV-1 ve HIV-2 antikollarını bir tek çalışmada saptayabilmesi, daha az para, zaman ve iş gücü gereksinmesi nedenleriyle, doğrulama için WB'in yerini alabilecek bir yöntem olduğunu düşünmekteyiz.

## Kaynaklar

- Hellings JA, Theunissen H, Keur W, Siebelink-Liauw A. New Developments in ELISA verification of anti-HIV screening of blood donors. *J Virol Methods* 1987; 17: 11-17.
- World Health Organisation. Operational characteristics of commercially available assays to detect antibodies to HIV-1 and/or HIV-2 in human sera. Report 2, Geneva 1990; GPA/BMR/90.1.
- Blomberg J, Klasse PJ. Specificities and sensitivities of three systems for determination of antibodies to human immunodeficiency virus by elektrophoretic immunoblotting. *J Clin Microbiol* 1988; 26:106-110.
- Britz JA, Rolon N, Hill T, Page E, Geltoski J. Interpreting HIV ELISA reactivity: Alternatives to western blot. *J Clin Lab Anal* 1988; 2: 174-181.
- Wittwer CT, Ash KO. Evaluation of three commercial kits for the confirmation of antibodies to human immunodeficiency virus (HIV-1). *Clin Chem* 1988; 34: 1930.
- Benesson AS, Peddecord KM, Hofnerr LK, Ascher MS, Taylor RN, Hearn TL. Reporting the results of human immunodeficiency virus testing. *J Am Med Assoc* 1990; 262: 3435-3438.
- Nranck R. Evaluation of a line immunoassay for the differential detection of antibodies to human immunodeficiency virus. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1990; 9: 674-676.
- Pollet DE, Saman EL, Peeters DG, Warmenbol HM, Hyendrickx LM, Wonters CJ, Beelaert G. Confirmation and differentiation of antibodies to human immunodeficiency virus I and II, using a strip based assay including recombinant antigens and synthetic peptides. *Clin Chem* 1991; 37: 1700-1707.
- Fransen K, Pollet DE, Peeters M, van Kerckhoven I, Beelaert G, Vercauteren G, Piot P, van der Groen G. Evaluation of a line immunoassay for simultaneous confirmation of antibodies to HIV-1 and HIV-2. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1991; 10: 936-46.
- Josephson SL, Swack NS, Ramirez MT, Hansler WJ. Investigation of atypical western blot (immuno blot) reactivity involuting core proteins of human immunodeficiency virus type 1. *J Clin Microbiol* 1989; 27: 932-937.
- Loussert-Ajaka I, Ly TD, Chaix ML, Ingrand D, Saragosti S, Courouce AM, Brun-Vezinet F, Simon F. HIV-1/HIV-2 seronegativity in HIV-1 subtype O infected patients. *Lancet* 1994; 343: 1393-1394.
- Nkengasong J, Kerckhoven IV, Vercauteren G, Piot P, Groen G. Alternative confirmatory strategy for anti-HIV antibody detection. *J Virol Methods* 1992; 36: 159-170.
- Courouce AM, Muller J, Richard D. False-positive western blot reactions to human immunodeficiency virus in blood donors. *Lancet*.1986; 2: 921-922.
- Böttige B, Karlsson A, Andreasson P. Envelope cross reactivity between human immunodeficiency virus types 1 and 2 detected by different serological methods. Correlation between cross-neutralization and reactivity against the main neutralizing site. *J Virol* , 1990; 64: 3492-3499.
- Schmidt G, Amiraian K, Frey H, Stevens RW, Berns DS. Densitometric analysis of western blot (immunoblot) assay for human immunodeficiency virus antibodies and correlation with clinical status. *J Clin Microbiol* 1987; 25: 1993-1998.

## Yazışma Adresi:

Yzb. Uzm. Vet. Hek. İrfan Sevinç  
GATA Kan Bankası Müd. Yrd.  
Etilik-Ankara