

Düşük titrede Anti-HCV pozitifliği bulunan hastalarda Rekombinant İmmunoblot (RIBA) ve HCV RNA test sonuçlarının değerlendirilmesi

The evaluation of Recombinant Immunoblot assay (RIBA) and HCV-RNA test results in patients with low titer Anti-HCV positivity

Berrin Uzun, Hakan Er, Serdar Güngör, A. Gamze Şener, Selçuk Kaya

ÖZET

Amaç: Hepatit C virüsü (HCV) enfeksiyonlarının laboratuvar tanısında, anti-HCV antikorlarının enzim immün assay (EIA) veya kemilüminesans immün yöntemler ile saptanması dünyada ve ülkemizde yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak rutin tanı laboratuvarlarında ciddi sorun oluşturan anti-HCV testlerinde sınır değerine (Serum/Cut-off; S/C= 1,0) yakın pozitif sonuçların elde edilmesi konusunda ortak bir yaklaşım geliştirilmemiştir. Bu çalışmada, Şubat 2013-Mayıs 2014 tarihleri arasında üçüncü jenerasyon anti-HCV testleri ile "düşük titrede pozitif" olarak saptanan hastaların retrospektif olarak incelenmesi amaçlanmıştır.

Yöntemler: Serum örnekleri anti-HCV açısından Advia Centaur XP (Bayer-Siemens, Germany) otoanalizörü ile, anti-HCV doğrulaması line immunoassay (Inno-LIATM HCV Score, Innogenetics, Belçika) ile, HCV RNA testi ise COBAS AmpliPrep/COBAS AMPLICOR HCV Test (Roche, İsviçre) ile çalışılmıştır.

Bulgular: Toplam 55.631 serum örneği incelenmiştir. Bunların 55 (%0,10)'i anti-HCV düşük pozitifdir (sample/cutoff [S/CO]). S/CO değerleri 1,15-6,15 arasında değişmektedir. Düşük pozitiflik saptanan hastaların 17'si (%31) line immunoassay ile pozitif, 2'si (%4) şüpheli, 36 hasta (%65) negatif olarak tanımlanmıştır. Düşük pozitif ve line immunoblot test pozitif örneklerin hiçbirisinde HCV-RNA saptanmamıştır.

Sonuç: Moleküler testlerin maliyet etkinliği düşünüldüğünde, tekrarlayan reaktivite durumlarında antikor pozitifliğinin doğrulanması gerektiği düşünülmüştür. Sonrasında gerekirse, biyokimyasal analizlerle birlikte hasta değerlendirildikten sonra tanı, takip ve tedavi etkinliği için moleküler testlerin kullanılmasının uygun olacağı sonucuna varılmıştır.

Anahtar kelimeler: Anti-HCV, HCV RNA, Hepatit C virüsü, S/C oranı, RIBA.

ABSTRACT

Objective: Laboratory diagnosis of hepatitis C virus (HCV) infection is based on the detection of anti-HCV antibodies by enzyme immunoassay (EIA) or chemiluminescence immunoassay (CIA) techniques. However, a consensus related to the problem of low titer (Serum/Cut-off; S/C= 1.0) anti-HCV antibodies is still lacking. The study attempts to evaluate the clinical status of the patients with low titer anti-HCV antibodies detected by third generation anti-HCV tests during February 2013- May 2014 retrospectively.

Methods: Serum samples were studied by Advia Centaur XP autoanalyser (Bayer-Siemens, Germany) for anti-HCV, and line immunoassay (Inno-LIATM HCV Score, Innogenetics, Belgium) for anti-HCV confirmatory test, Cobas AmpliPrep/Cobas AMPLICOR HCV Test (Roche diagnostics, Switzerland) for HCV RNA.

Results: A total of 55.631 serum samples were studied, and 55 of them were anti-HCV positive of which with low antibody levels (sample/cutoff [S/CO]). S/CO values ranged from 1.15 to 6.15. Seventeen (31%) of patients who have low antibody levels were defined as positive and 2 (4%) patients were intermittent and 36 (65%) patients were negative with line immunoassay. HCV-RNA was not detected in any of the samples.

Conclusions: It is thought that antibody positivity must be verified in cases of recurrent reactivity when considering the cost-effectiveness of molecular tests. In the study was concluded that the use of molecular tests would be appropriate diagnosis, and the effectiveness of treatment if necessary after evaluation of patients with biochemical analysis. *J Clin Exp Invest 2014; 5 (4): 553-556*

Key words: Anti-HCV, HCV RNA, Hepatitis C virus, S/C ratio, RIBA.

GİRİŞ

Hepatit C virüsü (HCV), hepatit, siroz ve karaciğer kanserinin en önemli etkenidir. Bu virüs, Flaviviridae ailesi içinde yer alan, zarflı tek iplikli bir RNA virüsüdür. Dünya Sağlık Örgütü verilerine göre her yıl yaklaşık dört milyon kişi bu virüs ile enfekte olmaktadır; 350.000 kişi HCV ile ilişkili karaciğer hastalıklarından hayatını kaybetmektedir. HCV ile enfekte olan kişilerde %60-70 oranında kronik karaciğer hastalığı, %5-20 oranında siroz gibi komplikasyonlar gelişmekte; %1-5 oranında ise siroz ya da karaciğer kanserinden ölüm meydana gelmektedir [1]. Ülkemizde 600 bin kişinin HCV ile enfekte olduğu tahmin edilmektedir [2]. Türkiye Anti-HCV seroprevalansı bakımından, kan donörlerinde %0,14-0,63 oranlarında [3,4], poliklinik hastalarında %1,3 [5] ve preoperatif hastalarda %2,3 [6] olmak üzere farklı oranlar tanımlanmakla birlikte düşük prevalansa sahip toplumlar arasında yer almaktadır [7].

HCV enfeksiyonlarının laboratuvar tanısı, hasta serumunda virüse özgül antikorların (anti-HCV) ya da doğrudan vireminin (HCV-RNA) gösterilmesi ile olanaklıdır [8]. Daha ziyade tarama amaçlı olarak kullanılan ve ticari olarak temin edilebilen çok sayıda anti-HCV testleri farklı duyarlılıkta olabilmektedir. Bunlar arasında yaygın olarak 2. ve 3. jenerasyon anti-HCV testleri tercih edilmektedir. İkinci jenerasyon testler NS4 rekombinant proteinlere (5-1-1 ve c100) ek olarak kor (core) bölgesinden türetilmiş bir rekombinant antijen (c22) ile NS3 bölgesinden türetilmiş bir başkasını (c33c veya c200) içermektedir. Üçüncü jenerasyon testlerde ise c100 ve 5-1-1 antijenlerinin yerini c100 peptidi, c22'nin yerini ise c22p peptidi almış olup, c33c'nin yoğunluğu artırılmıştır. Ayrıca NS5 bölgesinden türetilen bir rekombinant antijen de teste dahil edilmiştir [9,10].

Anti-HCV tarama testleri, HCV prevalansının düşük (<%3) olduğu toplumlarda yalancı pozitif sonuçlar verebilmektedir [7]. Anti-HCV testlerinde sınır (cut-off) değerine yakın pozitif sonuçların elde edilmesi, rutin tanı laboratuvarları için ciddi sorunlar doğurmaktadır. Bu değerlerin çoğunun yalancı pozitif olma olasılığına karşı sonuçların RIBA (Rekombinant immunoblot assay) veya LIA (Line immuno assay) gibi yöntemlerle doğrulanması önerilmektedir [7,9,11]. Bu testlerde de ELISA testlerinde kullanılan antijenler kullanılmaktadır. ELISA'da katı faz, polistiren bir bant iken RIBA'da nitroselüloz bir banttır ve antikorlar ayrı ayrı saptanabilmektedir [9,10]. Ayrıca, anti-HCV pozitifliği akut, kronik ya da geçirilmiş enfeksiyonun belirlenmesinde yetersiz kaldığından HCV-RNA tespiti de yapılması gerekli olmaktadır [8]. Öte yandan oldukça maliyetli bir yöntem olan

polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile HCV-RNA araştırılması aktif HCV tanısı için gerekli iken [9,10], eşik değere yakın ve/veya çok düşük anti-HCV pozitifliklerine çoğu zaman eşlik etmemektedir [7].

Bu çalışmada üçüncü jenerasyon anti-HCV testleri ile "düşük titrede pozitif" olarak saptanan hastaların HCV-RIBA doğrulama sonuçlarının HCV-RNA değerleriyle birlikte irdelenmesi ve tanı algoritmasına katkıda bulunulması amaçlanmıştır.

YÖNTEMLER

Çalışma Şubat 2013-Mayıs 2014 tarihleri arasında gerçekleştirilmiştir. Hastanemiz laboratuvarına anti-HCV testi için rutin tarama sırasında gönderilen 55.631 adet serum örneğinin çalışılmasından sonra düşük düzeyde pozitif saptanan 55 hastanın verileri retrospektif olarak incelenmiştir. Çalışma sırasında örnekler geldiği gün çalışılmıştır. Anti-HCV testleri; kemiluminesans tekniği kullanılan Advia Centaur XP Bayer-Siemens (Germany) otoanalizörü ile çalışılmıştır. Test sonuçları Sample/Cutoff (S/CO) üzerinden değerlendirilmektedir. S/CO değeri <1,0 ise nonreaktif; ≥ 1 ise reaktif olarak kabul edilmektedir. CDC, Advia Centaur cihazı için anti-HCV sinyal cut-off değerinin $\geq 11,0$ olduğunda %95 olasılıkla gerçek pozitif olarak değerlendirildiğinden, bu değerdeki sonuçlarda ek çalışmaya gerek duyulmamıştır. Düşük pozitif saptanan örnekler ise tekrar çalışmaya alınmıştır. Yeniden anti-HCV pozitif çıkan örnekler anti-HCV doğrulaması için, HCV core bölgesi antijenlerini (E2 proteinin HVR bölgesi, NS3, NS4A, NS4B ve NS5A bölgeleri) içeren üçüncü jenerasyon line immunoassay (Inno-LIATM HCV Score, Innogenetics, Belçika) yöntemiyle çalışılmıştır. Test, üretici firmanın önerileri doğrultusunda çalışılmış ve yorumlanmıştır.

LIA ile pozitif çıkan örnekler HCV-RNA açısından taranmıştır. HCV-RNA testi COBAS AmpliPrep/COBAS AMPLICOR HCV Test (Roche Diagnostics, İsviçre) ile üretici önerileri doğrultusunda çalışılmıştır. Testin lineer aralığı 43 IU/ml – $6,90E+07$ IU/ml arasındadır. Tüm çalışmalar biyogüvenlik düzeyi Seviye 2 olan laboratuvarımızda gerçekleştirilmiştir. Hastaların dosyaları incelenerek, demografik bilgilerine, tanı ve diğer laboratuvar verilerine ulaşılmıştır. Veri seti, SPSS paket programında tanımlayıcı istatistikler kullanılarak analiz edilmiştir.

BULGULAR

Çalışma süresince toplam 55.631 örnekte anti-HCV çalışılmıştır. S/CO değeri düşük düzey pozitif saptanan 55 (%0,10) hastaya LIA ile anti-HCV doğru-

laması yapılmıştır. Düşük pozitiflik saptanan hastaların tamamının S/CO değerleri 1,15-6,15 arasında değişmektedir. Bu hastaların 28 (%51)'i erkek, 27 (%49)'si kadın olup yaşları 15-78 (ortalama 50) arasındadır. Düşük pozitiflik saptanan hastaların 17'si (%31) LIA ile pozitif, 2'si (%4) şüpheli olarak tanımlanmıştır. Anti-HCV antikor 36 hastada (%65) negatif bulunmuştur. LIA pozitif ve şüpheli 19 olgudan 10'unun HCV-RNA sonucuna ulaşılabilmiştir. Düşük düzey antikor pozitif ve line immunoassay pozitif bulunan bu hastalarda HCV-RNA pozitifliği saptanmamıştır.

TARTIŞMA

Günümüzde HCV enfeksiyonlarının tanısında rutin laboratuvarlarda kullanılan çeşitli testler (anti-HCV, RIBA, nükleik asit testleri) bulunmakla birlikte, bunların her birinin kendine özgü çeşitli kısıtlamaları vardır [8]. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ), "Centers for Disease Control and Prevention (CDC)" ve Amerikan Sağlık Enstitüsü gibi kuruluşlar anti-HCV sonucunun, örneğin optik dansitesinin, "cut-off" değerine oranı ile saptanan sonucun, yüksek pozitif, düşük pozitif ve negatif olarak bildirilmesini önermektedir [8]. Ancak ülkemizde tüm merkezler tarafından uygulanan ortak bir tanısal algoritma yoktur. Anti-HCV testlerinde düşük pozitif sonuç alınan hastalar, testlerin duyarlılıkları ayrı tutulmak üzere, hastalığın erken evresinde (pencere dönemi) veya geçirilmiş HCV enfeksiyonunda antikor düzeyinin düşmesi ile ilgili olabilir [12]. Ancak bu değerlerin çoğunun yalancı pozitif sonuçlar olduğu bildirilmekte, buna rağmen hastaların takibi önerilmektedir [9]. EIA testleriyle alınan bu tür sonuçlar RIBA yöntemiyle doğrulanabilir. RIBA pozitifliği ile viremi arasında iyi bir uyum olmasına karşılık, EIA ile düşük titrede pozitif bulunan örneklerin çoğu RIBA ile de kuşkulu (indeterminate) sonuç verebilmektedir [10]. Tanısal doğrulamadaki yeri tartışmalı olan immüno blot testlerinin duyarlılığının EIA testlerinden daha düşük olduğu bildirilmekte olup, RIBA testinin yapıp yapılmaması ile ilgili farklı görüşler vardır [10,12].

Düşük derecede HCV enfeksiyonu riski olan kan donörlerinde, yanlış pozitifliğe sık rastlandığı için, antikor özgüllüğünün doğrulanması gerekmektedir. Bunlardan en çok bilineni RIBA'dır [10]. Kan bankacılığında, HCV virüsü için Ulusal Kan ve Kan Ürünleri Rehberinde "HCV antijen ve/veya antikoruyla taranmak zorundadır ve HCV enfeksiyonunun doğrulanmasında immüno blot testleri kullanılır." denmektedir [13].

Çalışmamızda anti-HCV düşük titrede pozitif (S/CO değerleri 1,15-6,15 arasında değişen) saptanan 55 hastanın tümüne RIBA testi uygulanmıştır. Bunların %31'i (17 hasta) pozitif, %4'ü (2 hasta) şüpheli, %65'i (38 hasta) negatif saptanmıştır. Pozitif ve şüpheli saptanan hastalar incelendiğinde 10 hastanın ileri incelemelerinin hastanemizde yapıldığı görülmüş, 9 hastanın ise bölgemizdeki diğer üçüncü basamak hastanelerde takibinin yapıldığı bilgisine ulaşılmıştır. Takibi yapılan 10 hastanın hiçbirinde RNA pozitifliğine rastlanmamıştır. RIBA çalışılan 55 hastanın hiçbirinde alanin aminotransferaz (ALT) ve aspartat aminotransferaz (AST) yüksekliği saptanmamıştır. Dolayısıyla bu vakaların yalancı pozitif olduğu desteklenmiştir. Seroprevalansın düşük olduğu durumlarda, romatoid faktörü pozitif hastalarda, immün supresyona bağlı azalmış immün yanıt durumunda, kan ve organ donörlerinde yalancı pozitiflik meydana gelebilmektedir [14]. Aynı şekilde, yalancı pozitif sonuçların, diğer viral enfeksiyonların (CMV, EBV, HIV, hepatit A ve B virüsü) varlığı, sistemik lupus eritematozus ve romatoid faktör pozitifliği ve kısa süre önce aşı (grip aşısı gibi) uygulaması gibi durumlarda ortaya çıkabileceği bildirilmektedir [10,12].

Farklı araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalarda düşük pozitif anti-HCV sonuçlarının hiçbirinde HCV-RNA saptanamamıştır. Myrmel ve ark. 27.978 serum örneğini incelemiş bunların 90 tanesinin S/CO değerini 1-1,5 arasında bulmuştur. Bu örneklerin HCV RNA'larının tümü negatif olarak bildirilmiştir [15]. Dufour ve ark. [11], düşük titrede anti-HCV pozitif hastaların %11,4 (16/140)'ünde HCV-RNA saptarken; Afşar ve ark. [16] benzer özellikteki 65 hastada, Oethinger ve ark. [12] 83 hastada, Köse ve ark. [17] ise 14 hastada nükleik asit testlerini negatif bulduklarını rapor etmişlerdir.

Yalancı pozitifliğe neden olan faktörlerin (otimmün hastalıklar, diğer enfeksiyonlara eğilim gibi) kadınlarda daha sık rastlanması sebebiyle, düşük titre anti-HCV pozitifliği saptanan hastalarımızın çoğunun kadın olması beklenmesine rağmen çalışmamızda düşük titrede pozitiflik saptananların kadın/erkek oranı birbiriyle aynıdır. Hastalarımızın klinik tanıları da oldukça heterojen olduğundan bu veriyi desteklememektedir. Ayrıca yaşlı hasta grubunda düşük titre pozitifliği sıklığının, yıllar önce geçirilen HCV enfeksiyonlarında yıllar içerisinde antikor düzeyinin azalmasına bağlı olduğunu ileri süren yayınlar mevcuttur [8,12].

Ülkemizden bildirilen bir çalışmada [12], üçüncü jenerasyon anti-HCV testleri ile "düşük titrede pozitif" olarak saptanan hastalar HCV-RNA varlığı, ALT

ve AST düzeyleriyle birlikte incelendiğinde, düşük düzey anti-HCV pozitifliğinde, sonuçların RIBA ve HCV-RNA testleriyle doğrulanması şeklinde yapılan uygulamaya ek olarak kesin bir önerinin geliştirilemeyeceği kanısına varılmıştır. Başka bir çalışmada ise, anti-HCV ve HCV-RNA testleri çalışılan ve S/CO değeri 3,8'in (eşik değer: 1,0 S/CO) altında olan hastaların hiçbirisinde HCV-RNA saptanmamıştır. Yazarlar, EIA yöntemi ile düşük ve/veya eşik değere yakın düzeylerde anti-HCV pozitifliğinin saptanması halinde; sonucun doğrulanması için PCR ile HCV-RNA araştırılmasından önce, immunoblot yöntemlerinin kullanılması, serumun başka bir EIA ile çalışılması ya da hastadan alınan yeni bir örneğin çalışılması gibi seçeneklere başvurulmasının daha uygun ve ekonomik olacağı sonucuna varmışlardır [18].

Sonuç olarak, S/CO değerleri 1,15-6,15 arasında değişen hastaların incelendiği çalışmamızda, immunoblot yöntemle antikor saptanmış ve takibi yapılabilen hastaların hiçbirinde HCV-RNA saptanmamıştır. Moleküler testlerin maliyet etkinliği düşünüldüğünde, tekrarlayan reaktivite durumlarında antikor pozitifliğinin doğrulanması, gerekirse biyokimyasal analizlerle birlikte hasta değerlendirildikten sonra tanı, takip ve tedavi etkinliği için moleküler testlerin kullanılmasının uygun olacağı düşünülmüştür.

KAYNAKLAR

1. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs164/en/>
2. İnci M, Aksebzeci AT, Yağmur G, ve ark. Hastane çalışanlarında HBV, HCV ve HIV seropozitifliğinin araştırılması. *Turk Hij Den Biyol Derg* 2009;66:59-66.
3. Uzun B, Güngör S, Demirci M. Seroprevalence of transfusion transmissible infections among blood donors in western part of Turkey: A six-year study. *Transfus Apher Sci* 2013;49:511-515. <http://dx.doi.org/10.1016/j.transci.2013.02.039>.
4. Uzun B, Güngör S, Demirci M. Parameters of infection in replacement and voluntary donors in the western part of Turkey. *Transfus Apher Sci* <http://dx.doi.org/10.1016/j.transci.2014.02.024>.
5. Karaayak Uzun B, Güngör S, Er H, ve ark. Atatürk Eğitim Araştırma Hastanesine başvuran poliklinik hastalarında HBsAg, Anti-HCV, Anti-HIV seroprevalansı. *Viral Hepatit Dergisi* 2013;19:123-125.
6. Karaayak Uzun B, Er H, Güngör S, ve ark. Preoperatif hastalarda HBsAg, anti-HCV ve anti-HIV seropozitifliği. *J Clin Exp Invest* 2013;4:449-452.
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* 2003;52(RR03):1-16.
8. Altuğlu İ. HCV testleri: Tanıda standardizasyon ve strateji belirleme, s: 139-41. 3. Ulusal Viroloji Kongresi. 9-13 Aralık 2007, Kongre Kitabı, Uludağ, Bursa.
9. Scott JD, Gretch DR. Hepatit C ve G virusları. Çeviri: Abacıoğlu H. In: Klinik Mikrobiyoloji (Manual of Clinical Microbiology) editors. Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, et al. [Çeviri editörü: Başustaoğlu A] Ankara: Atlas Kitapçılık 2009. s: 1437-1452.
10. Turkoğlu S. Hepatit C virusu viroloji ve seroloji, s: 228-45. Tabak F, Balık İ, Tekeli E (eds), *Viral Hepatit 2007*. Viral Hepatit Savaşım Derneği, İstanbul.
11. Dufour DR, Talastas M, Fernandez MDA, et al. Low-positive anti-hepatitis C virüs enzyme immunoassay results: an important predictor of low likelihood of hepatitis C infection. *Clin Chem* 2003;43:479-486.
12. Zer Y, Karaoğlu İ, Çiçek H, ve ark. Düşük titrede Anti-HCV pozitifliği tespit edilen hastaların irdelenmesi. *Mikrobiyol Bul* 2009;43:133-139.
13. Mikrobiyolojik Tarama Testleri. Ulusal Kan ve Kan Ürünleri Rehberi 2011:264
14. Lange C, Sarrazin C. Diagnostic Tests in Acute and Chronic Hepatitis C. In: Mauss S, Berg T, Rocks-troh J, Sarrazin C, Wedemeyer H eds. *Short Guide to Hepatitis C*. Germany Flying Publisher, 2011:26-31.
15. Myrnel H, Navaratnam V, Asjøl B. Detection of antibodies to hepatitis C virus: False-negative results in an automated chemiluminescent microparticle immunoassay (Architect® Anti-HCV) compared to a microparticle enzyme immunoassay (AxSYM HCV Version 3.0). *J Clin Virol* 2005;34:211-215.
16. Afşar İ, Şener GA, Gönül B, Kurultay N. Tam otomatik kemiluminesans immunoassay ile düşük düzeyde anti-hepatit C virus (anti-HCV) pozitif saptanan örneklerin HCV RNA düzeylerinin değerlendirilmesi. *İnfeksiyon Derg* 2007;21:85-88.
17. Köse Ş, Ece G, Şamlıoğlu P, Topaloğlu S. Tepecik Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nde düşük düzeyde anti-hepatit C pozitifliği saptanan örneklerin HCV RNA düzeylerinin değerlendirilmesi. *Turk Hij Den Biyol Derg* 2011;68:191-196.
18. Sayan M, Meriç M, Mutlu B, ve ark. Mikropartikül enzim immunoassay ile düşük titrede saptanan Anti-HCV pozitifliği hepatit C Virus enfeksiyonunun tanısında kullanılabilir mi? *Mikrobiyol Bul* 2006;40:81-84.