

## Anti-HCV tarama testi eşik değerinin HCV-RNA ve Line Immunoassay testi ile belirlenmesi

### Determination of Anti-HCV scanning test cut-off value by HCV-RNA and Line Immunoassay tests

Alper SARIBAŞ<sup>1</sup>, Altan AKSOY<sup>2</sup>

#### ÖZET

**Amaç:** Anti-HCV yalancı pozitif test sonuçlarını azaltabilmek ve gereksiz ek test isteminin önüne geçebilmek için ülkemize en uygun anti-HCV eşik değerinin tespit edilmesi amaçlanmıştır.

**Yöntem:** Çalışmaya 202 hastaya ait anti-HCV pozitif örnek dahil edilmiştir. HCV antikorlarının tespiti için Architect anti-HCV kitleri kullanılmıştır ve  $\geq 1$  kesme noktası (S/CO) değerine sahip numuneler reaktif kabul edilmiştir. Ayrıca örneklerin HCV-RNA ve Line immunoassay testleri (LIA) çalışılmıştır.

**Bulgular:** Anti-HCV pozitif 202 örneğin 60 (%29,7)'i HCV-RNA pozitif ve 124 (%61,4)'ünde LIA pozitif bulunmuştur. Anti-HCV S/CO düzeyi 1-5 arasında olan 84 (%41,6), 5-10 arasında olan 29 (%14,4) ve 10'un üstünde olan 89 (44,1) kişi çalışmaya alınmıştır. Anti-HCV seropozitifliği açısından yaş grupları arasında en yüksek oran 40 yaş üzeri (%73,8) grupta tespit edilmiştir. HCV-RNA negatif olan grubun medyan anti-HCV düzeyi (3,2), HCV-RNA pozitif olan grubun medyan anti-HCV düzeyine (13,7) göre anlamlı oranda daha düşük bulunmuştur. LIA pozitif olan grubun medyan anti-HCV düzeyi (13,3) ile karşılaştırıldığında LIA negatif olan grup (2,1) arasındaki fark istatistiksel

#### ABSTRACT

**Objective:** In this study, we aimed to determine optimal anti-HCV cut-off value in our country to reduce anti-HCV false positive test results and prevent unnecessary additional testing.

**Methods:** The study group consisted of samples of 202 anti-HCV positive patients. Detection of HCV antibodies was performed with Architect anti-HCV kits and samples with  $\geq 1$  S/CO were considered as reactive. Samples were also studied with HCV-RNA and Line Immunoassay (LIA) tests.

**Results:** The anti-HCV (S/CO) levels of 84 patients (41.6 %) were between 1 and 5, 29 patients (14.4 %) were between 5 and 10, 89 patients (44.1 %) were more than 10. Among anti-HCV positive 202 patients, total number of HCV-RNA positive patients and total number of LIA positive patients were 60 (29.7 %) and 124 (61.4 %), respectively. The highest rate of anti-HCV seropositivity (73.8 %) was found in the above 40 years age group. The median of the anti-HCV levels (3.2 S/CO) of the HCV-RNA negative patients was significantly lower than the median of the anti-HCV levels (13.7 S/CO) of the HCV-RNA positive patients. The difference between the median of anti-HCV levels of LIA negative patients

<sup>1</sup>Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları ve Biyolojik Ürünler Dairesi Başkanlığı, Ulusal Tüberküloz Referans Laboratuvarı, Ankara  
<sup>2</sup>Ankara Şehir Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Ankara



İletişim / Corresponding Author : Altan AKSOY  
SBÜ Ankara Şehir Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Kliniği Ankara - Türkiye  
E-posta / E-mail : aksoyalta@gmail.com

Geliş Tarihi / Received : 20.03.2019  
Kabul Tarihi / Accepted : 05.01.2020

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2020.67778

Sanbaş A, Aksoy A. Anti-HCV tarama testi eşik değerinin HCV-RNA ve Line Immunoassay testi ile belirlenmesi  
Turk Hij Den Biyol Derg, 2020; 77(3): 319-324

olarak anlamlı bulunmuştur. ROC analizi sonucunda, Architect anti-HCV testi için en iyi S/CO değeri 7,8 olarak belirlenmiştir ve bu durumda duyarlılık %98,3, özgüllük %68,3, pozitif tahmini değer %56,7, negatif tahmini değer %99 ve doğruluk %77,2 olarak hesaplanmıştır.

**Sonuç:** Anti-HCV seropozitifliği yaş ile birlikte anlamlı oranda artmıştır. Anti-HCV eşik değerine yakın sonuçlara HCV-RNA ve LIA pozitifliği genellikle eşlik etmemiştir. Architect anti-HCV tarama testi için eşik değeri 7,8 olarak belirlendiğinde çok az örneğin doğrulama gerektireceği tespit edilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Hepatit C virüs, eşik değer, anti HCV, Line Immunoassay

(2.1 S/CO) and the median of anti-HCV levels of the LIA positive patients (13.3 S/CO) was statistically significant. By ROC analysis, the best cut-off value for the Architect anti-HCV test was determined as 7.8 S/CO and with this calculated cut-off value, sensitivity (98.3%); specificity (68.3%); positive (56.7%) and negative (99%); predictive value and the accuracy (77.2%) were calculated.

**Conclusion:** Anti-HCV seropositivity increases significantly with age. HCV-RNA and LIA positivity generally do not accompany the results minimally above anti-HCV cut-off values. A few samples will require verification if the cut-off value for Architect anti-HCV screening test is determined as 7.8.

**Key Words:** Hepatitis C virus, cut-off, anti HCV, Line Immunoassay

## GİRİŞ

Hepatit C virüsü (HCV) Flaviviridae ailesinden pozitif polariteli bir RNA virüsüdür(1). Enfeksiyon genellikle asemptomatik bir seyir izlediğinden enfekte kişilerin yaklaşık %70'inde persistan hale gelmekte ve bu durum kronik karaciğer hastalığına ve hepatosellüler karsinoma yol açabilmektedir(1, 2).

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ), dünya nüfusunun yaklaşık 71 milyonunun kronik HCV hastası olduğunu belirtmiş ve 2030 yılına kadar enfekte olguların %90'ının tanı almasını amaçlamıştır. Türkiye'de ise yaklaşık 514.000 (%0,7) kişinin HCV ile enfekte olduğu tahmin edilmektedir(2).

HCV enfeksiyonlarının tanısında ilk basamağı anti-HCV antikorlarının enzim immünoassay (EIA) veya kemilüminesan immünoassay yöntemle tespiti oluşturmaktadır. Anti-HCV sonuçlarının yorumlanmasında reaktivite eşik olarak, test örneğinin optik dansitesinin cut-off'a oranıyla elde edilen S/CO değeri kullanılmaktadır(3,4). DSÖ, Centers for Disease Control and Prevention (CDC) ve Amerikan Sağlık

Enstitüsü gibi kuruluşlar anti-HCV sonucunun yüksek pozitif, düşük pozitif ve negatif olarak bildirilmesini önermektedir (4). Ancak ülkemizde ortak bir tanısal algoritma bulunmamaktadır.

Hepatit C virüsüne karşı oluşan antikorları tarayan testler, ülkemizin de içinde yer aldığı HCV prevalansının düşük olduğu toplumlarda yüksek oranda yalancı pozitif sonuçlar vermektedir(2,3). Anti-HCV testlerinde sınır (cut-off) değere yakın pozitif sonuçlar rutin tanı laboratuvarları için ciddi sorunlar doğurmaktadır. Dolayısıyla tanının doğrulanması için oldukça maliyetli bir test olan HCV-RNA yöntemine başvurulmak zorunda kalınmaktadır. Fakat HCV-RNA varlığı, sınır değere yakın veya düşük anti-HCV pozitifliklerine çoğu zaman eşlik etmemektedir (5).

Bu çalışmada, Anti-HCV yalancı pozitif test sonuçlarını azaltabilmek ve gereksiz ek test isteminin önüne geçebilmek için ülkemize en uygun anti-HCV eşik değerini tespit etmek amaçlanmıştır.

## GEREÇ ve YÖNTEM

Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji laboratuvarına 1 Haziran 2012- 28 Şubat 2013 tarihleri arasında gönderilen 90 (%44,6)'ı kadın, 112 (%55,4)'si erkek olmak üzere toplam 202 hastaya ait anti-HCV pozitif örnek çalışmaya dahil edildi. Örneklerin HCV-RNA sonuçları kaydedildi ve -80°C'de saklanan plazma örnekleri daha sonra 3. Kuşak LIA kiti (INNO-LIA, HCV Score, InnogeneticsGhent, Belgium) ile test edildi. Çalışma grubu, sağlıklı donörler ile Enfeksiyon hastalıkları ve diğer kliniklere ait anti-HCV'si pozitif ve HCV-RNA'ları çalışılmış hasta örnekleri olmak üzere iki grup halinde oluşturuldu.

### Anti HCV Tespiti:

HCV antikorlarının tespiti kemilüminesan mikropartikül enzim immunoassay (CMIA) yöntemi ile çalışan Architect anti-HCV (Abbott, ABD) kitleri ile üretici firmanın talimatları doğrultusunda çalışıldı. <1 S/CO değerine sahip numuneler non reaktif kabul edilirken  $\geq 1$  S/CO değerine sahip numuneler ise reaktif kabul edildi. Başlangıçta reaktif tespit edilen örnekler tekrar çalışıldı. Test tekrarı sonucu reaktif bulunan numuneler anti-HCV için pozitif olarak nitelendirildi.

### HCV-RNA'nın Kantitatif Tespiti:

HCV Rotor- Gene RT PCR (Qiagen, Hilden, Germany) ile üretici firmanın talimatları doğrultusunda çalışıldı. Kitin alt saptama sınırı 44 kopya/ml idi.

### LineImmunoAssay (LIA):

Anti-HCV pozitif örnekler HCV genomunun C1, C2, E2, NS3, NS4, NS5 bölgelerini içeren 3. Kuşak LIA HCV Score (InnogeneticsGhent, Belgium) test kitleri ile üretici firmanın talimatları doğrultusunda çalışıldı.

Değerlendirmede HCV antikorları için negatif kabul, tüm HCV antijen bantlarının negatif reaktivite derecesinde olması veya NS3 hariç, diğer HCV antijen bantlarından birinin  $\pm$  reaktiviteye sahip olması durumudur.

HCV antikorları için pozitif kabul, en az iki HCV antijen bandında  $\pm$  ya da daha yüksek reaktiviteye sahip olması durumudur.

HCV antikorları için belirsiz (indeterminate) kabul, herhangi bir HCV antijen çizgisi 1+ ya da daha yüksek reaktivite derecesine sahip veya NS3 bandı  $\pm$  ya da daha fazla reaktiviteye sahipken tüm diğer antijen çizgilerinin negatif olması durumudur.

### İstatistiksel Analiz:

Verilerin analizi "SPSS for Windows 11.5" paket programında yapıldı. Sürekli değişkenlerin dağılımının normale yakın olup olmadığı Kolmogorov Smirnov testi ile araştırıldı. Gruplar arasında medyan değerler yönünden farkın önemliliği bağımsız grup sayısı iki olduğunda Mann Whitney U testi ile ikiden fazla grup arasındaki farkın önemliliği ise Kruskal Wallis testi ile incelendi. Kruskal Wallis test istatistiği sonucunun önemli bulunması halinde farka neden olan durumları tespit etmek amacıyla Conover'in çoklu karşılaştırma testi kullanıldı. Kategorik değişkenler Pearson'un Ki-Kare testiyle değerlendirildi.

HCV-RNA ve LIA sonuçlarına göre olguları ayırt etmede anti-HCV ölçümlerinin belirleyici olup olmadığı ROC analizi ile değerlendirildi. Eğri altında kalan alanın önemli bulunması halinde en iyi kesim noktası Youden İndeks kullanılarak saptandı.

$p < 0,05$  için sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

## BULGULAR

Çalışmamıza, anti-HCV S/CO düzeyi 1- 5 arasında olan 84 (%41,6), 5- 10 arasında olan 29 (%14,4) ve 10'un üstünde olan 89 (44,1) kişi olmak üzere toplam 202 kişi dahil edilmiştir. Anti-HCV pozitif 202 örneğin 60 (%29,7)'i HCV-RNA pozitif ve 124 (%61,4)'ü LIA pozitif saptanmıştır. LIA testi belirsiz olanlarda ise HCV-RNA sonuçlarının tamamı negatif bulunmuştur.

Anti-HCV antikorları pozitif olan kişilere ait medyan S/CO düzeyi ile yaş, cinsiyet, HCV-RNA ve

LIA sonuçları arasındaki ilişki Tablo 1’de belirtilmiştir. Buna göre 0- 20 yaş arasındaki grubun medyan anti-HCV düzeyi 21- 40 ve 40 yaş üstü gruplara göre anlamlı olarak daha düşüktür. Cinsiyet ile anti-HCV düzeyleri arasında anlamlı bir ilişki yoktur. HCV-RNA negatif olan grubun medyan anti-HCV düzeyi (3,2) ile HCV-RNA pozitif olan grubun medyan anti-HCV düzeyine (13,7) göre anlamlı oranda daha düşüktür. LIA pozitif olan grup ile karşılaştırıldığında LIA negatif olan ve LIA belirsiz olan grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır.

HCV-RNA açısından ROC analizi sonucunda anti-HCV için 7,8 S/CO değeri kullanıldığında HCV-RNA

pozitif ve HCV-RNA negatif grupları ayırt etmede anti-HCV’nin istatistiksel olarak anlamlı bir belirleyici olduğu görülmüştür ( $p<0,001$ ). Anti-HCV için 7,8 S/CO değerlerinde, duyarlılık %98,3 özgüllük %68,3 pozitif tahmini değer %56,7 negatif tahmini değer %99 ve doğruluk %77,2 olarak hesaplandı (Tablo 2).

LIA açısından ROC analizi sonucunda, LIA belirsiz olan olgular negatif kabul edildiğinde, LIA pozitif ve negatif grupları ayırt etmede anti-HCV için S/CO değeri 7,2 (%95 güven aralığında) olarak belirlendi. >7,2 S/CO değerlerinde, duyarlılık %85,5, özgüllük %98,7, pozitif tahmini değer %99,1, negatif tahmini değer %81,1 ve doğruluk %90,6 olarak hesaplandı.

**Tablo 1.** Demografik ve klinik değişkenlere göre ortalama anti-HCV düzeyleri

Değişkenler	Olgu Sayısı	Anti-HCV S/co düzeyi mean (min- max)	P değeri
<b>Yaş</b>			
0-20	8	1,68 (1,1-12,9)	
21-40	45	4,22 (1-17,35)	0,004
>40	149	9,25 (1,2-17,8)	
<b>Cinsiyet</b>			
Erkek	112	7,77 (1,1-17,8)	0,625
Kadın	90	9,04 (1-17,5)	
<b>Gruplar</b>			
Sağlıklı donör	57	2,09 (1-17,3)	<0,001
Enf. H. ve diğer	145	11,61 (1,2-17,8)	
<b>HCV-RNA</b>			
Pozitif	60	13,74 (6-17,8)	< 0,001
Negatif	142	3,24 (1-17,5)	
<b>INNO LIA</b>			
Pozitif	124	13,34 (1,3-17,8)	
Negatif	63	2,14 (1-8,4)	< 0,001
Belirsiz	15	1,87 (1,1-6,2)	

**Tablo 2.** HCV- RNA'ya ve INNO-LIA'ya göre negatif ve pozitif olguların ayırt edilmesinde anti-HCV'nin tanısal performans düzeyleri

Göstergeler	HCV-RNA	INNO-LIA
Eğri Altında Kalan Alan	0,827	0,941
%95 Güven Aralığı	0,773-0,882	0,908-0,975
En İyi Kesme Noktası (S/CO)	7.8	7.2
Olgu Sayısı	202	202
Duyarlılık (%)	98,3	85,5
Seçicilik (%)	68,3	98,7
PTD (%)	56,7	99,1
NTD (%)	99	81,1
Doğruluk (%)	77,2	90,6
p değeri	< 0,001	< 0,001

PTD: Pozitif Tahmini Değer, NTD: Negatif Tahmini Değer.

## TARTIŞMA

Çalışmamızda anti-HCV seropozitifliği açısından yaş gruplarına bakıldığında en yüksek oran 40 yaş üzeri (%73,8) grupta tespit edilmiştir. Tunç ve ark.'nın (6) yaptığı çalışmada anti-HCV pozitif kişilerin yaş ortalaması 48 olarak bulunmuştur. Asan ve ark.'nın (7) yapmış olduğu çalışmada anti-HCV seropozitif olan kişilerin %54'ünü 50 yaş ve üzeri grubun oluşturduğu saptanmıştır. Bizim sonuçlarımızla uyumlu olan bu çalışmalardaki sonuçlara göre anti-HCV pozitifliği ileri yaşlarda daha fazla görülmektedir.

Çalışmamızda anti-HCV seropozitifliğinin cinsiyete göre farklılık göstermediği tespit edildi. Bazı araştırmacılar anti-HCV seropozitifliğinin cinsiyete göre dağılımında farklılıklar gösterdiğini ifade etmişlerse de bazı araştırmacılar saptadığımız sonuçlarla uyumlu olarak cinsiyete göre dağılımda anlamlı bir farklılığın olmadığını ifade etmiştir (8).

Çalışmamızda, HCV-RNA negatif olan grubun medyan anti-HCV düzeyi (3,2 S/CO) HCV-RNA pozitif

olan gruba (13,7 S/CO) göre daha düşük bulundu. LIA pozitif olan grubun medyan anti-HCV düzeyi (13,3 S/CO) LIA negatif (2,1 S/CO) ve LIA belirsiz (1,9 S/CO) gruplara göre daha yüksek bulundu. Buna göre medyan anti-HCV S/CO değerinin artırılması halinde LIA pozitifliği ve HCV-RNA pozitifliğinin yakalanma oranının da artacağı söylenebilir.

CDC, Architect anti-HCV tarama testi için eşik değerini  $\geq 5$  S/CO olarak belirlemiştir. CDC verilerine göre her ülke tarama testleri için kendi S/CO oranlarını belirlediğinde çok az örneğin doğrulama gerektireceğini ve bu durumun gelişmekte olan ülkeler için daha ekonomik olacağını belirtmiştir (9).

Amerikan Kızılhaç'ı ve Amerika Kan Merkezi tarafından yapılan bir çalışmada, 47.041 anti-HCV pozitif örneğin, sadece %49,3'ünde RIBA ile pozitiflik ve bunlarında %79,2'sinde HCV-RNA pozitifliği saptanmıştır (10). Benzer şekilde Çin'de yapılan çok merkezli bir çalışmada, anti-HCV pozitif örneklerin, sadece %39'unda RIBA veya NAT ile gerçek pozitiflik saptanmıştır (11). Ülkemiz verilerine bakacak

olursak, Emektaş ve ark.'nın (12) yaptıkları çok merkezli bir çalışmada 10.050 anti-HCV tekrarlayan pozitif örneğin %67'si RIBA ile doğrulanmıştır. Bizim anti-HCV pozitif örneklerin %61'inde LIA pozitifliği ve %30'unda HCV-RNA pozitifliği tespit ettik. Bu sonuçlara ek olarak çalışmamızda elde ettiğimiz HCV-RNA negatif olan grubun medyan anti-HCV düzeyi (3,2) ile HCV-RNA pozitif olan grubun medyan anti-HCV düzeyi (13,7) istatistiksel olarak daha düşük bulunmuştur. Elde edilen veriler ışığında anti-HCV sınırda pozitifliklerinde yalancı pozitiflik oranının oldukça yüksek olduğu görülmektedir.

Alter ve ark. (13) tarafından yapılan ve CDC tarafından yayınlanan, 24.700 hastayı içeren ve HCV prevalansı düşük olan grupta HCV-RNA pozitifliği %42, RIBA pozitifliği %66 olarak bulunmuştur. Tarama

testleri ile ortalama S/CO oranı  $\geq 3,8$  olduğunda HCV-RNA pozitifliği %80'e RIBA pozitifliği ise %97'ye yükselmiştir. Seo ve ark.'nın (4) anti-HCV testi (Abbott) pozitif 661 hasta ile yaptıkları çalışmada viremi varlığını belirlemede en uygun cut-off değerini 10,9 tespit etmişler ve bu durumda duyarlılığın %94,4'e çıktığını belirlemiştir.

Sonuç olarak çalışmamızda, HCV-RNA açısından ROC analizi sonucunda, HCV-RNA pozitif ve HCV-RNA negatif grupları ayırt etmede anti-HCV için S/CO değeri 7,8 (%95 güven aralığında) olarak belirlenmiştir. Bu değer üstündeki S/CO değerleri için klinik durum göz önüne alınarak ileri bir doğrulama testinin istenmesi uygun bir yaklaşım olacaktır. Her ülkenin kendine en uygun S/CO değerini belirlemesi kit sarfiyatını ve hasta maduriyetini azaltacaktır.

## KAYNAKLAR

1. Tozun N, Ozdogan O, Cakaloglu Y, İdilman R, Karasu Z, Akarca U, et al. Seroprevalence of hepatitis B and C virüs infections and risk factors in Turkey: a fieldwork TURHEP. Study. Clin Microbiol Infect, 2015;21: 1020-6.
2. World Health Organization. Guidelines for the care and treatment of persons diagnosed with chronic hepatitis C virüs infection. 2018.
3. cdcinfo@cdc.gov. The guide to comprehensive hepatitis C counseling and testing.
4. Seo YS, Jung ES, Kim JH, Jung YK, Kim JH, An H, et al. Significance of anti-HCV signal-to-cut off ratio in predicting hepatitis C viremia. Korean J Intern Med, 2009;24 (4): 302-8.
5. Centers for Disease Control and Prevention. Guidelines for laboratory testing and result reporting of antibody to hepatitis C virus (anti-HCV). MMWR 2003; 52 (RR3): 1-13.
6. Tunç N, Eraydın H, Çetinkaya E, Oduncu MK, Toy Ş. Siirt Devlet Hastanesi'ne Başvuran Hastalarda HBsAg, Anti-HBs, Anti-HCV ve Anti-HIV Seroprevalansı. Viral Hepat J, 2011; 17(1): 7-11.
7. Asan A, Akbulut A, Saçar S, Turgut H. Tunceli Devlet Hastanesine Başvuran Kişilerde HBsAg ve Anti-HCV Seroprevalansının Değerlendirilmesi. Viral Hepat J, 2011; 17: 52-6.
8. Turan DB, Kuruoğlu T, Gümüş D, Kalaycı F, Şerefhanoglu K. Seroprevalence of HBsAg and anti-HCV for patients who admitted to third step hospital: Six year retrospective data. Ege Tıp Derg, 2019; 58(2): 149- 53.
9. Memikoğlu KO, Arabacı H, Azap A, Yeşilkaya A, Birengel S, Balık İ, Türkiye'de Hepatit C Tanısı: Nasıl Yardımcı Olur? Viral Hepat J, 2007; 12(2): 68- 72.
10. Kleinman SH, Stramer SL, Brodsky JP, Caglioti S, Busch MP. Integration of nucleic acid amplification test results in to hepatitis C virus supplemental serologic testing algorithms: implications for donor counseling and revision of existing algorithms. Transfusion, 2006; 46: 695- 702.
11. Nelson KE, Shan HUA. Confirmatory testing of hepatitis C virus positive enzyme immuno assay results in limited- resource countries: should it be attempted? Transfusion, 2008;48: 1239- 44.
12. Emektas G, Çavuşlu S, Öncül O, Artuk Ç, Aksoy A. Trends in hepatitis B and hepatitis C virus among blood donors over 16 years in Turkey. Eur J Epidemiol, 2006;21(4): 299- 305.
13. 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(No. RR3): 1- 15.