

Pandemik A/H1N1 İnfeksiyonlarının Tanısında Hızlı Test “Sorunu”

Quick Test “Problem” in Diagnosis of Pandemic A/H1N1 Infections

Melis Kanturvardar, Meral Akçay-Cıblak, Serkan Asar, Emel Bozkaya, O. Şadi Yenen, Selim Badur

Istanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Viroloji ve Temel İmmünoloji Bilim Dalı, Ulusal İnfluenza Referans Laboratuvarı, İstanbul, Türkiye

Özet

Amaç: Pandemik A/H1N1 infeksiyonlarının laboratuvar tanısında “real-time” RT-PCR tekniği referans tanı yöntemi olarak kabul edilmektedir. Bu arada uygulama kolaylığı ve süratli tanı olanağı sağladıklarından antijen saptamaya yönelik hızlı testlerin söz konusu etkeni araştırmak amacıyla yaygın kullanımı gündeme gelmiş; özellikle ülkemizde bu testlerin çeşitli sağlık kuruluşlarında tanı amaçlı uygulandıkları gözlenmiştir. Çalışmada hızlı testlerin pandemik A/H1N1 tanısı için duyarlılıkları araştırılmıştır.

Yöntemler: Bu çalışmada referans yöntemle pandemik A/H1N1 varlığı saptanan 104 hasta örneği, ülkemizde pazarlanmakta olan dört farklı hızlı testle çalışılmıştır.

Bulgular: Hızlı testlerin pandemik A/H1N1 virusunu saptamada %31.7-50 oranında pozitif sonuç verdiği belirlenmiştir.

Sonuçlar: Bu bulguya dayanarak influenza hızlı testlerinin pandemik suşun araştırılmasında yeterli duyarlılığa sahip olmadıkları belirlenmiştir. *Klimik Dergisi 2009; 22(3): 79-81.*

Anahtar Sözcükler: Pandemik A/H1N1, hızlı test, RT-PCR.

Abstract

Objective: Real-time RT-PCR has been used as reference technique for the detection of pandemic A/H1N1 influenza virus infections. In addition, rapid antigen detection tests such as quick tests have been considered in the diagnosis of pandemic A/H1N1 worldwide due to their ease of use and generation of rapid results. These tests have been used by numerous institutions for the diagnosis of pandemic A/H1N1 in Turkey also. The aim of this study is to compare the sensitivity of quick tests with the reference method.

Methods: A total of 104 positive isolates by real time RT-PCR technique has been tested with four quick tests manufactured by different companies marketed in our country.

Results: The sensitivity of quick tests ranged from 31.7% to 50% in detecting pandemic A/H1N1 infections.

Conclusions: Based on the results of this study, it can be concluded that quick tests are not adequately sensitive in the detection of pandemic A/H1N1 infections. *Klimik Dergisi 2009; 22(3): 79-81.*

Key Words: Pandemic A/H1N1, quick test, RT-PCR.

Giriş

Nisan 2009 döneminde önce Meksika daha sonra ABD’de baş gösteren ve 15 Haziran 2009 tarihinde Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından 6. evrede bir pandemi olarak nitelendirilecek boyutta kısa sürede tüm dünyada yayılan solunum yolları infeksiyonunun etkeni pandemik A/H1N1 suşu olarak adlandırılmıştır. Geçen sekiz aylık sürede birçok ülkede özellikle aşıları konusunda yersiz kuşku, anlamsız tartışmaların söz konusu olduğu etkenin virolojik tanısında evrensel bir algoritma izlenmiş; “real-time” RT-PCR gibi standardize moleküler biyoloji testleri yaygın olarak birçok referans laboratuvarında kullanıma girmiştir (1).

İnfluenza infeksiyonlarının tanısında uygulanacak testlerin kullanılabilirlikleri tartışılırken, incelenecek olguların özelliklerini tanımlayan olası vaka kriterlerinin;

testin yapılacağı muayene maddesi seçiminin, örnekteki virus miktarının, muayene maddesinin alındığı infeksiyon evresinin ve elbette kullanılan testin duyarlılığının önemi bulunmaktadır. Genel anlamda mevsimsel influenza viruslarının antijenlerini saptamak amacıyla hazırlanmış hızlı testlerin, olası pandemi etkeni olabilecekleri var sayılan H5N1 veya pandemik A/H1N1 gibi yeni alt tiplerin saptanmasında da geçerli olup olmayacakları dönem dönem tartışılmaktadır. Nitekim içinde bulunduğumuz 2009 pandemisi süresince, pratik ve süratli olmaları nedeniyle hızlı testler olarak bilinen antijen saptamaya yönelik testler gündeme gelmiş ve ülkemizdeki bazı sağlık kuruluşlarında tanı amacıyla söz konusu testlerden yararlanılmıştır. Bu çalışmada pandemik A/H1N1 infeksiyonlarının tanısında çeşitli platformlarda kullanılabilirlikleri gündeme getirilen hızlı testlere ait du-

Yazışma Adresi / Address for Correspondence:

Selim Badur, İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Viroloji ve Temel İmmünoloji Bilim Dalı, Ulusal İnfluenza Referans Laboratuvarı, Çapa, 34093 İstanbul, Türkiye
Tel./Phone: +90 212 635 25 82 Faks/Fax: +90 212 635 25 82 E-posta/E-mail: selimbador@hotmail.com

rum gözden geçirilerek, ülkemizde pazarlanmakta olan dört farklı hızlı testin duyarlılıkları araştırılmıştır.

Yöntemler

Çalışmada Ulusal Referans Laboratuvarımıza Centers for Disease Control and Prevention (CDC, Atlanta, GA, ABD) tarafından gönderilen "real-time" RT-PCR reaktifleri ve protokolü kullanılarak pandemik A/H1N1 virusu saptanan 104 olguya ait nazal sürüntülerde: [a] Inflü A&B Respi-Strip (Coris BioConcept, Belçika); [b] SD-Bioline Influenza Antigen (SD-Standard Diagnostic, Kore); [c] Directigen EZ Flu A+B (Becton Dickinson, ABD); [d] QuickVue Influenza A+B (Quidel, Almanya) hızlı test kitleri uygulanmış ve bu testlerin duyarlılıkları araştırılmıştır. Yapılan ön çalışmada laboratuvarımıza ulaştırılan ve moleküler biyoloji incelemesi için 1.5 ml besiyerinde süspansiyon edilen örneklerden her bir hızlı test için gerekli miktar alınarak işlemin sürdürülmesinin uygun olmadığı; örneklerin bu yaklaşımla gereğinden fazla sulandırılmış olduğu anlaşılmış ve yaklaşım değiştirilmiştir. Söz konusu sakıncayı gidermek için moleküler tekniklerle pozitif sonuç alındığında, aynı gün içinde hastalara tekrar ulaşılarak dört ayrı eküvyon ile yeniden örnek alınmış ve hızlı testler üretici firmaların prospektüslerindeki yöntemle uyularak çalışılmıştır.

Bulgular

Sonuçta "real-time" RT-PCR ile etken saptanan 104 örnekten, Coris Bio Concept testi ile 33'ü (%31.7); SD-Standard Diagnostic testi ile 35'i (%33.7); Becton Dickinson testi ile 52'si (%50) ve Quidel testi ile 50'si (%48) pozitif bulunmuştur. Sonuçlar Tablo 1'de gösterilmiştir.

İrdeleme

Kuramsal olarak influenza viruslarının neden oldukları infeksiyonların tanısı için antijen saptamaya yönelik hızlı testlerden ve immünofluoresans tekniklerinden (DFA), etkenin üretimine dayanan hücre kültürü uygulamalarından ve RNA araştırmasını hedefleyen nükleik asid amplifikasyon testlerinden yararlanılabilir (2). Bu yöntemler arasında "real-time" RT-PCR uygulamaları, özellikle pandemik A/H1N1 tanısında referans yöntem olarak kabul edilmektedir (3).

Bu arada genel anlamda mevsimsel influenza viruslarının tanısı için optimize edilmiş hızlı testlerin uygulama kolaylıkları nedeniyle pandemik A/H1N1 suşlarını saptamadaki kullanılabilirlikleri gündeme gelmiş ve konu ile ilgili bir dizi çalışma yapılmıştır. Ancak farklı ülkelerde değişik kuruluşlarca üretilen hızlı testler kullanımda olduğundan ve farklı özellikteki hasta grupları ele alındığından, bu testlerin geçerliliğinin araştırıldığı çalışmaları birbirleri ile kıyaslamak doğru olmayacaktır. Örneğin konu ile ilgili olarak CDC tarafından yayınlanan ilk raporda hızlı testlerin pandemik H1N1 tanısındaki duyarlılıklarının %40-69 oranında olduğu (4), okul salgınlarının irdelendiği ikinci raporda aynı test grubu için bu oranın %47 olduğu bildirilmiştir (5). Bu konuda yapılan ilk çalışmalarda

Chan ve arkadaşları (6), QuickVue Influenza A+B, Directigen EZ Flu A+B, Espline Influenza A+B ve Wondfo ticari kitlerinin pandemik A/H1N1 antijeni saptamadaki analitik duyarlılıklarının, mevsimsel grip etkenlerini saptamadaki oranla eşdeğer olduğunu belirtmişlerdir. Ginocchio ve arkadaşları (7), BinaxNOW Influenza A+B ve 3M Rapid Detection Flu A+B hızlı testlerini DFA ve kültür yöntemleriyle karşılaştıkları çalışmalarında, hızlı testlerin duyarlılıklarını %17.8, özgüllüklerini %93.6 olarak belirlemişler; Watcharananan ve arkadaşları (8) ise QuickVue Influenza A+B kitlerini kullandıkları benzer bir çalışmada "real-time" RT-PCR ile kıyasladıkları hızlı test duyarlılığını %62, özgüllüğünü %80 olarak belirlemişlerdir. Hurt ve arkadaşları (9)'nın çalışmalarında hızlı test performansının örneklerdeki virus miktarı ile orantılı olduğu, ancak genel anlamda duyarlılığın hızlı testler için %20-40 dolaylarında olduğu bildirilmiştir. Drexler ve arkadaşları (10), hızlı testler ile olguların ancak %11.1'inde pozitiflik elde ederken, Komiya ve arkadaşları (11)'nin çalışmalarında hızlı testlerin duyarlılığı %77 olarak bildirilmiştir.

Ülkemizde grip referans laboratuvarı olarak kabul edilen ve pandemik H1N1 tanısı için görevlendirilen iki merkez bulunmaktadır: Ankara'da Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezi Başkanlığı Viroloji Laboratuvarı ve İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Viroloji ve Temel İmmünoloji Bilim Dalı'ndaki Influenza Laboratuvarı (12). DSÖ tarafından ulusal merkez olarak kabul edilen bu iki kuruluştaki CDC'den sağlanan reaktifler ile 1 Mayıs 2009 tarihinden itibaren pandemik H1N1 tanısı konulmakta olup, 15 Mayıs 2009 tarihinde ülkemizdeki ilk H1N1 olgusu saptanmıştır (13). Başlangıçtan bu yazının başına girdiği 24 Aralık 2009 tarihine dek, her iki merkezde toplam 18 782 örnek çalışılmış ve 8 630 pozitif olgu saptanmıştır.

Bu süreçte ülkemizde hizmet vermekte olan çeşitli özel sağlık kuruluşları, Temmuz 2009 döneminden başlayarak pandemik H1N1 araştırması yaptıklarını duyurmuşlar ve başvuran kişilerde belirledikleri algoritm uyarınca testler uygulanmaya başlanmıştır. Bu arada bazı kuruluşlar açıklamış oldukları algoritmalarında, örneklerde önce hızlı testleri uyguladıklarını; bu testler ile pozitif sonuç alındığında hangi alt-tipten influenza viruslarının var olduğunu belirlemek için moleküler biyoloji tekniklerine başvurduklarını belirtmişler; bazıları ise tanı için hızlı test uygulamasıyla yetinmişlerdir. Ancak hızlı test kitlerinin hiçbirisi pandemik A/H1N1 saptamaya uygun olduğu şeklinde bir bilgi içermemektedir. Üretici firmanın bu tarz bir veri sağlamamasına karşın yine de söz konusu testleri pandemik A/H1N1 tanısında kullanma eğiliminin dünyada başka bir örneği bulunmadığını belirtmek gerekir.

Bu arada hızlı testlerin duyarlılığının yeterli olmadığını belirten çalışmaların yayımlanmalarını takiben, Sağlık Bakanlığı Temel Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü'nün 10.11.2009 tarih ve B.100TSH0110001/10302/32536 sayılı genelgesiyle bu tip testlerin tanı amacıyla kullanımları uygulanmasına son verilmesi istenmiştir. Biz de söz konusu yaklaşımı ülkemizdeki hızlı testlerle yapılacak bir çalışmayla irdelemek amacıyla ülkemiz-

Tablo 1. RT-PCR ile H1N1 Pozitifliği Saptanan 104 Nazal Sürüntüde Hızlı Test Sonuçları

Üretici	Coris-BioConcept	SD-Standard Diagnostic	Becton Dickinson	Quidel
Pozitif sonuç (%)	33 (31.7)	35 (33.7)	52 (50)	50 (48)

de kullanımda olan dört ayrı hızlı testin duyarlılığını araştırdık. Elde ettiğimiz sonuçlara göre en yüksek duyarlılığa sahip (%50) kitlerin kullanımında bile gerçek H1N1 olgularının yarısının negatif olarak bildirimlerinin söz konusu olduğu saptanmıştır. Nitekim gebelerde yapılan bir çalışmada hospitalize olguların %38'inde hızlı testler ile yalancı negatiflik elde edildiği belirtilerek bu uygulamanın sakıncaları dile getirilmiş (14); benzer bir değerlendirmede, ancak söz konusu salgına yol açan yeni alt-tiplere özgü monoklonal antikorların kit içine eklenmesiyle hızlı testlerin gündeme gelebileceği belirtilmiştir (15).

Bu durumda Sağlık Bakanlığınca alınan "hızlı testlerin H1N1 tanısında kullanımını kısıtlayan" kararının yerinde bir uygulama olduğunu; bir pandeminin gündemde olması durumunda salgının toplumda yayılımını engelleme çabalarının duyarlılığı düşük olan bu tür testlerle olumsuz yönde etkileceğini söylemek uygun olacaktır.

Çıkar Çatışması

Yazarlar, herhangi bir çıkar çatışmasının söz konusu olmadığını bildirmişlerdir.

Kaynaklar

1. CDC Protocol of Realtime RTPCR for Influenza A (H1N1) [Internet]. Geneva: World Health Organization [erişim 12 Kasım 2009]. http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/CDCRealtimeRTPCR_SwineH1Assay-2009_20090430.pdf.
2. Petric M, Comanor L, Petti CA. Role of laboratory in diagnosis of influenza during seasonal epidemics and potential pandemics. *J Infect Dis*. 2006; 194(Suppl 2): S98-S110.
3. Panning M, Eickmann M, Landt O, et al. Detection of influenza A(H1N1)v virus by real-time RT-PCR. *Euro Surveill*. 2009;14(36). pii:19329.
4. CDC. Evaluation of rapid influenza diagnostic tests for detection of novel influenza A (H1N1) virus –United States, 2009. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2009; 58(30): 826-9.
5. CDC. Performance of rapid influenza diagnostic tests during two school outbreaks of 2009 pandemic influenza A (H1N1) virus infection –Connecticut, 2009. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2009; 58(37): 1029-32.
6. Chan KH, Lai ST, Poon LLM, Guan Y, Yuen KY, Peiris JSM. Analytical sensitivity of rapid influenza antigen detection tests for swine-origin influenza virus (H1N1). *J Clin Virol*. 2009; 45(3): 205-7.
7. Ginocchio CC, Zhang F, Manji R, et al. Evaluation of multiple test methods for the detection of the novel 2009 influenza A (H1N1) during the New York City outbreak. *J Clin Virol*. 2009; 45(3): 191-5.
8. Watcharananan S, Kiertiburanakul S, Chantratita W. Rapid influenza diagnostic test during the outbreak of the novel influenza A/H1N1 2009 in Thailand: An experience with better test performance in resource limited setting [Letter]. *J Infect*. (In Press).
9. Hurt AC, Baas C, Deng YM, Roberts S, Kelso A, Barr IG. Performance of influenza rapid point-of-care tests in the detection of swine lineage A(H1N1) influenza viruses. *Influenza Other Respi Viruses*. 2009; 3(4): 171-6.
10. Drexler JF, Helmer A, Kirberg H, et al. Poor clinical sensitivity of rapid antigen test for influenza A pandemic (H1N1) 2009 virus. *Emerg Infect Dis*. 2009; 15(10): 1662-4.
11. Komiya N, Gu Y, Kamiya H, Yahata Y, Matsui T, Yasui Y, Okabe N. Clinical features of cases of influenza A (H1N1)v in Osaka prefecture, Japan, May 2009. *Euro Surveill*. 2009; 23; 14(29). pii: 19272.
12. Countries with PCR Capacity in Place to Diagnose Influenza A(H1N1) Virus Infection in Humans [Internet]. Geneva: World Health Organization [erişim 1 Aralık 2009]. http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/InfluenzaLabsWithPCRcapacityToDetectInfluenzaA_20090513.pdf.
13. Ciblak MA, Albayrak N, Odabas Y, et al. Cases of influenza A(H1N1)v reported in Turkey, May-July 2009. *Euro Surveill*. 2009; 14(32). pii: 19304.
14. Louie JK, Acosta M, Jamieson DJ, Honein MA, the California Pandemic (H1N1) Working Group. Severe 2009 H1N1 influenza in pregnant and postpartum women in California. *N Engl J Med*. (In Press).
15. Arya SC, Agarwal N. Apropos "performance of influenza point-of-care tests in the detection of pandemic (H1N1) 2009 influenza viruses". *Influenza Other Respi Viruses*. 2009; 3(6): 265-6.