

Hepatit C Virusu Enfeksiyonu Serolojik Tanı Yöntemlerinin Karşılıklı Değerlendirilmesi

Rıza Güneli¹, Şaban Çavuşlu¹, M.Fevzi Özsoy¹, Kenan Keskin¹, Salih Türkoğlu², Selim Badur², O. Şadi Yenen¹

Özet: Bu çalışmada hepatit C virusu (HCV) enfeksiyonu için başlıca tanı yöntemi olarak kullanılan serolojik testler karşılıklı olarak değerlendirildi. Üç değişik hasta grubuna ait serum örnekleri farklı tarihlerde çeşitli testlerle çalışıldı. Birinci grupta ikinci kuşak Abbott enzyim-linked immunosorbent assay (ELISA) ile anti-HCV-pozitif bulunan kronik karaciğer ve kronik böbrek hastalarına ait 20 serum örneği UBI, Imotest, Abbott Supplemental, LiaTek, ikinci kuşak recombinant immunoblot assay (RIBA) ve polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile değerlendirildi. İkinci grupta PCR ile HCV-RNA saptanmış 20 serum örneği çalışmaya alındı ve ikinci kuşak Abbott ELISA, MONOLISA (Sanofi Pasteur), AuBioDOT, BioSCREEN ve LiaTek ile değerlendirildi. Üçüncü grupta hemodiyaliz hastalarından ikinci kuşak Abbott ELISA ile anti-HCV pozitif bulunan 24 serum örneği alındı. Bunlar da MONOLISA, BioSCREEN ve AuBioDOT'ın yanı sıra bir kısmı LiaTek, bir kısmı da RIBA ikinci kuşak ile değerlendirildi. Sonuç olarak (a) ikinci kuşak ELISA testlerinin duyarlılıklarının, HCV enfeksiyonu açısından risk grubu oluşturan olgularda genelde yüksek düzeyde olduğu; (b) AuBioDOT'ın ikinci kuşak ELISA testlerine göre daha düşük duyarlılığa sahip olmakla birlikte, uygulama kolaylığı nedeniyle özellikle donör taramalarında yararlı olup olmayacağı konusunda ayrıntılı çalışmalara gereksinim olduğu; (c) Doğrulama yöntemi olarak tanımlanan testlerin destekleyici/tamamlayıcı testler olarak nitelendirilmesinin daha uygun olacağı; (d) HCV-RNA'nın varlığında PCR negatifliklerinin elimine edilmesi ve bu arada donör taramalarının güvenle yapılması amacıyla akut ve kronik C hepatitinin tamsını sağlayacak güvenilir, ucuz ve uygulama kolaylığı olan yeni yöntemlere gereksinim olduğu kanısına varıldı.

Anahtar Sözcükler: Hepatit C, serolojik tanı.

Summary: The comparison of serological diagnostic methods of hepatitis C virus infection. In this study, main serological diagnostic methods used for hepatitis C virus (HCV) infections were evaluated. Serum samples obtained from three different patients' groups analyzed by different methods in different dates. In the first group, 20 anti-HCV positive serum samples by second generation enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) (Abbott) from patients with chronic liver disease and with chronic renal disease were reevaluated by UBI, Imotest, Abbott Supplementary test, LiaTek, second generation recombinant immunoblot assay (RIBA) and polymerase chain reaction (PCR). For the second group, 20 HCV-RNA-positive serum samples by PCR were evaluated by second generation Abbott ELISA, MONOLISA (Sanofi Pasteur), AuBioDOT, BioSCREEN and LiaTek. The third group included 24 anti-HCV-positive serum samples by second generation Abbott ELISA from hemodialysis patients. These samples were also evaluated by MONOLISA, BioSCREEN and AuBioDOT and some of them were evaluated by LiaTek and the others by second generation RIBA. In conclusion, we considered that (a) the sensitivity of second generation ELISA tests are generally high in those cases with high HCV infection risk; (b) AuBioDOT, although less sensitive than second generation ELISA tests, is highly practical and more detailed studies required to determine whether it can be appropriate for donor screening; (c) it can be considered more accurately to rename the so-called confirmatory tests as supportive or complementary assays; (d) more reliable, practical and cheaper methods required to diagnose acute and chronic hepatitis C to eliminate PCR negativity in the presence of HCV-RNA, to screen the donors.

Key Words: Hepatitis C, serodiagnosis.

Giriş

Hepatit C virusu (HCV), posttransfüzyon hepatiti olgularının % 90'ından sorumlu tutulmaktadır (1). Günümüzde henüz özgün ve etkin bir tedavinin olmaması HCV enfeksiyonunun temas öncesi ya da temas sonrası tanısını önemi artırılmakta ve bu konuda yoğun çalışmalar yapılmaktadır. Tarama ve doğrulama amaçlı serolojik testlerle, HCV-RNA'nın karaciğer dokusu ve serumda direkt olarak gösterilmesini sağlayan polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) bilinen başlıca yöntemlerdir. Ancak çeşitli nedenlerle, HCV-RNA'nın saptanmasında PCR rutin olarak kullanılmamaktadır (2). Serolojik tanı yöntemlerine her geçen gün yenileri eklenmekte, daha önce bulunmuş olanların duyarlılığı ve özgüllüğü konusunda tartışmalar ortaya atılmaktadır.

Bu çalışmada, hem hastaların laboratuvar tanısını koyma, hem de donör kanlarında ve çeşitli risk gruplarında tarama amacıyla bilinen serolojik tanı yöntemlerinden elde edilebilenler karşılıklı olarak değerlendirilerek, duyarlılık ve özgüllüğün yanı sıra ülkemiz koşullarında pratik uygulamada kullanılabilirliğin saptanması amaçlanmıştır.

HCV enfeksiyonu klinik olarak ayırt edici pek fazla özellik göstermediği için tanı serolojik yöntemlere dayanmaktadır.

HCV genomunun klonlanması çalışmaları sırasında elde edilen 5-1-1 klonunun immünolojik bir epitopu (ya da epitopları) kodladığının anlaşılması üzerine HCV polipeptidinin bu bölgesi antikolların saptanması için geliştirilecek test sistemine esas alındı. HCV polipeptidinin yapısal olmayan bölgesi içinde yer alan 363 amino asitlik bir bölüm elde edildi ve c-100 adı verildi. Bu parça insan "superoxide dismutase (SOD)" enzimini kodlayan insan geni ile füzyona sokularak rekombinan olarak maya içerisinde ekspresye edildi. Elde edilen füzyon polipeptide c100-3 adı verildi ve bununla kaplanmış mikrotitre plaklarında I125 ile işaretlenmiş koyun anti-human immün globülini kullanarak prototip bir radyoimmünoessey (RIA) geliştirildi (3). Hemen ardından yapılan çalışmalarda da ELISA formatında ticari kitler geliştirildi (4-8).

HCV enfeksiyonunda ilk ortaya çıkan antikolar "core" proteinine karşı oluşanlardır ve HCV'yi saptamak için "core" antikolarını gösterebilen testlerin daha güvenilir olduğu ortaya konulmuştur (9,10). Multiantijenik yapıya sahip testlerin tanıda daha yararlı olduğu ve doğrulama için de HCV-RNA'nın araştırılmasının tercih edilmesi gerektiği bildirilmiştir (11).

Yapılan çeşitli çalışmalarda ELISA formatındaki ikinci kuşak testlerin duyarlılık ve özgüllüğünün % 90'ın üzerinde bulunduğu bildirilmiştir (12,13).

Teorik olarak HCV genomunun daha uç noktasındaki antijenle-

(1) GATA Haydarpaşa Eğitim Hastanesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Servisi, İstanbul

(2) İstanbul Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Viroloji ve Temel İmmünoloji Bilim Dalı, Çapa-İstanbul
II. Ulusal Viral Hepatit Simpozyumu (3-4 Kasım 1994, Ankara)'nda bildirilmiştir.

ri içeren testlerin infeksiyonun herhangi bir döneminde tanıyı daha olanaklı kılacağı varsayılmaktadır. Bu amaçla RNA polimerazı kodlayan NS5 alanıyla ilgili antijenik tanıyı içeren testler kullanıma sunulmaya başlanmıştır; ancak ayrıntılı çalışmalara gereksinim vardır (14).

Yöntemler

Birinci grupta ikinci kuşak Abbott ELISA ile anti-HCV-pozitif bulunarak çalışmaya alınan 20 hastanın 16'sı kronik böbrek hastası, 4'ü kronik karaciğer hastasıydı ve bunlardan 10 olgunun ALT düzeyleri yüksek (88-244 IU/l), diğerlerinki ise normaldi (5-40 IU/l). Bu gruptaki serum örnekleri (ikinci kuşak Abbott ELISA'nın yanı sıra) tanı amacıyla kullanılan UBI ve Innotest, doğrulama amacıyla kullanılan Abbott Supplemental, LiaTek, ikinci kuşak RIBA ve HCV-RNA'yı saptamaya yönelik PCR ile test edildi.

İkinci grupta çeşitli testlerle anti-HCV-pozitif bulunduktan sonra PCR ile HCV-RNA saptanmış 20 örnek çalışmaya alındı. Bu gruptaki serum örnekleri (PCR'nin yanı sıra) tanı ve tarama amaçlı kullanılan ikinci kuşak Abbott ELISA, MONOLISA, BioSCREEN-EN, AuBioDOT ve doğrulama amacıyla kullanılan LiaTek ile test edildi.

Üçüncü gruba, HCV infeksiyonu için önemli bir risk grubu olduğu bilinen hemodiyaliz hastalarından ikinci kuşak Abbott ELISA ile pozitif bulunan 24 serum örneği alındı. Bu gruptaki serum örnekleri (ikinci kuşak Abbott ELISA'nın yanı sıra) tanı ve tarama amaçlı olarak kullanılan MONOLISA, BioSCREEN ve AuBioDOT, doğrulama amacıyla kullanılan LiaTek ve RIBA ikinci kuşak ile çalışıldı. İkinci gruptan farklı olarak PCR uygulanmadı ve olguların bir kısmı LiaTek, bir kısmı da RIBA ile değerlendirildi. Çalışmada aşağıda özelliklerine kısaca değinilen testler, üretici firma kit kılavuzlarındaki yöntemler uygulanarak gerçekleştirildi.

BioSCREEN anti-HCV (Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Küba): Serum veya plazmada HCV antikorlarının kalitatif olarak in vitro saptanmasında kullanılan 192 testlik bir mikro-ELISA sistemidir. Striplerde bulunan kuyucuklar HCV'nin dominant antijenik epitoplarnı taşıyan sentetik peptidlerle kaplanmıştır. Test edeceğimiz örnekler kuyucuklarda inkübe edildi ve pozitif örneklerde HCV'ye spesifik antikorlar katı-faz antijenlerine bağlandı. Bağlanmayan non-spesifik materyal yıkama ile uzaklaştırıldı. Oluşan antijen-antikor kompleksi, konjugat olarak kullandığımız "Protein A: horseradish peroxidase" ile saptanabilir hale getirildi. Enzim-substrat eklenmesi ile renklenme sağlandı.

AuBioDOT anti-HCV (Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Küba): HCV'ye karşı gelişen antikorların saptanmasında görsel olarak kullanılan bir tanı yöntemidir. Kan, serum ve plazma gibi biyolojik sıvılarda anti-HCV'yi in vitro olarak saptar. İndirekt katı-faz yöntemi ile çalışır. Konjugat olarak koloidal altın immünoprotein ve görüntüyü güçlendirici olarak da gümüş iyonları kullanılır. Her biri 12 yüzeyel kuyucuk içeren ve gereğinden ikiye bölünebilen 6 plastik kap, HCV'nin p22 "core" proteininin antijenik yapılarını içeren sentetik peptidlerle kaplanmıştır.

Sonuçlar reaksiyon alanının direkt görsel olarak değerlendirilmesi ile ortaya konmuştur. Metalik parlak koyu veya siyah rengin tüm reaksiyon alanında görüldüğü durumlarda test pozitif olarak kabul edilmiştir.

MONOLISA anti-HCV (Sanofi Diagnostics Pasteur): İmmünoenzimatik teknikle insan serumunda HCV antikorlarının saptanmasına yönelik 96 ve 480 testlik kitleri içeren bir yöntemdir. HCV genomunun yapısal ve yapısal olmayan bölgelerinden seçilmiş klonlardan *Escherichia coli* tarafından üretilmiş iki rekombinan proteini antijen olarak kullanılır. Bunlardan biri, genomun nükleokapsid bölgesinden türetilmiştir ve NC450 adı ile anılır, diğeri ise NS3 bölgesinden elde edilmiş olup 409-1-1 adı verilmiştir.

HCV ELISA İkinci Kuşak (Abbott): HCV genomunun "putative" yapısal (c22c) ve yapısal olmayan (c33c ve c100-3) alanları tarafından tanımlanmış proteinlere karşı oluşan antikorları saptamak

üzere geliştirilmiştir. 100 ve 1000 testlik kitleri bulunmaktadır.

HCV ELISA Supplemental Assay (Abbott): Bu testte HCV genomunun hem yapısal hem de yapısal olmayan bölgeleriyle ilişkili iki ayrı rekombinan antijenin ayrı ayrı kaplandığı boncuklar kullanılır. Yapısal antijen *E.coli*'de bir füzyon proteini olarak ifade edilmiştir ve HCV'nin "core" bölgesinden kökenini alır. Yapısal olmayan antijen ise yine *E.coli*'de bir füzyon proteini olarak ifade edilmiştir ve HCV'nin NS3 ve NS4 bölgeleri temel alınmıştır. Bu farklı antijenik yapılar nedeniyle, oluşan antikorlar ayrı ayrı gösterilebilmektedir.

Innotest HCV Antibody (Innogenetics SA, Belçika): HCV'nin "core", NS4 ve NS5 bölgeleriyle ilişkili antijenlerin kaplandığı kuyucukları içeren polisteren mikropalak stripler 96 testlik olarak hazırlanmıştır.

UBI HCV ELISA (United Biomedical, Inc, New York, ABD): İnsan serum veya plazmasında HCV'ye karşı gelişen antikorların in vitro olarak saptanması için kalitatif bir enzim immünoassay'dır. Antijenik olarak sentetik peptidleri kullanır. Bu peptidler HCV'nin yapısal ve yapısal olmayan bölgelerinin her ikisine birden oldukça yüksek derecede uyum gösterebilecek şekilde olup içeriğinde katı faz antijenik absorban bulunur.

LiaTek HCV (Organon Teknika): İnsan serum veya plazmasında HCV'ye karşı gelişen antikorların saptanmasında sandwich prensibi temeline dayalı bir "line immünoassay"dir. Viral genomun en çok korunmuş alanlarının kodladığı HCV proteinlerinin bir kısmına karşı gelişen spesifik antikorları saptar. Diğer test sistemlerinin doğrulanması amacıyla kullanılan bir yöntemdir. Test stribi üzerinde her biri HCV'nin core, NS4 ve NS5 proteinlerine ilişkin antijen yapıları içeren farklı çizgiler vardır.

Chiron RIBA HCV Test System, Second Generation Assay (Ortho Diagnostics): Tanı yöntemi olarak kullanılmayan, sadece araştırmalarda kullanımı önerilen, insan serum veya plazmasında HCV'ye karşı gelişen antikorları saptamaya yönelik bir "immüno blot assay"dir. 5-1-1, c100-3, c33c, c22-3 ve SOD olmak üzere beş rekombinan antijen içerir.

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR): İn vitro nükleik asid amplifikasyon yöntemidir. Temelde nükleik asitleri in vitro DNA replikasyonunu taklit eden biçimde çoğaltma esasına dayanmaktadır. Yöntemin en önemli özelliklerinden biri, aranan nükleik asid parçasını özgül olarak çoğaltması, böylece yoğun bir arıtma işlemi gerekmeden klinik örnekteki diğer nükleik asid parçalarından kolayca ayırt edilmesini sağlamasıdır.

Yöntemde, çoğaltılması istenen kalıp DNA parçasının her iki ucuna bitişik "primer" denilen oligonükleotidler, DNA polimeraz ve nükleotidler kullanılır. Primer 20-30 nükleotidli bir DNA dizisidir. İn vitro olarak araştırılması istenilen hücrenin içerdiği DNA'ya spesifik olarak sentezlenir. Kalıp olarak kullanılan bu molekül zincirleme reaksiyon ile araştırılan materyalin içinde mevcut olan DNA'nın başlangıçta çok az miktarlarda da olsa kolaylıkla ölçülebilir düzeylere kadar çoğaltmasını sağlar.

Proteinaz K-sodyum dodesil sülfüt (K-SDS) yöntemiyle serumlardan elde edilen HCV-RNA, cDNA'ya dönüştürüldü ve genomun 5' non-coding bölgesinden elde edilen 2 çift eksternal ve internal ("nested") primer kullanılarak iki basamaklı PCR ile amplifiye edildi. Birinci basamakta 289 bp, ikinci basamakta 187 bp olan PCR ürünlerinin büyüklükleri özgül olmayan sonuçlardan sakınılarak her bir testte doğrulandı. Kontrolün tüm basamakları sırasında PCR'ye DNA içermeyen reagent kontrolü de eklendi.

Sonuçlar

Birinci gruptaki 20 serum örneği (ikinci kuşak Abbott ELISA ile tümü pozitif) Abbott Supplemental, Innotest, UBI, LiaTek, RIBA ikinci kuşak ve PCR ile çalışıldı (Tablo 1).

Bu serum örneklerinden sekizi tüm testlerle pozitif, ikisi tüm testlerle negatif; yedisi diğer testlerle pozitif olmasına karşın PCR ile negatif; ikisi Abbott Supplemental, Innotest, UBI ve RIBA ile

pozitif, diğerleri ile negatif (Abbott Supplemental core bölgesi bu serumlardan birinde negatif); bir serum örneği sadece Abbott Supplemental ve UBI ile pozitif (Abbott Supplemental yapısal olmayan bölgesi negatif) bulundu.

Bu gruptaki çalışmayla ilgili dikkat çeken bir özellik, PCR ile HCV-RNA-pozitif bulunan 8 serum örneğinin altısında ALT düzeyleri yüksek iken sadece ikisinde normal olmasıdır.

İkinci gruba alınan (PCR ile tümü pozitif) 20 serum örneği 2. kuşak Abbott ELISA, MONOLISA, BioSCREEN, AuBioDOT ve LiaTek ile değerlendirildi (Tablo 1).

Bu serum örneklerinden sekizi tüm testlerle pozitif; biri tüm testlerle negatif; dördü MONOLISA ile negatif, diğerleriyle pozitif; ikisi AuBioDOT ile BioSCREEN ile negatif, diğerleriyle pozitif; ikisi MONOLISA ve ikinci kuşak Abbott ELISA ile pozitif, diğerleriyle negatif; biri MONOLISA ile pozitif, diğerleriyle negatif; biri ikinci kuşak Abbott ELISA ile pozitif, LiaTek ile şüpheli, diğerleriyle negatif; biri AuBioDOT ile negatif, LiaTek ile şüpheli, diğerleriyle pozitif bulundu.

Üçüncü gruba alınan ve ikinci kuşak Abbott ELISA ile tümü pozitif bulunan 24 serum örneği ise MONOLISA, BioSCREEN, AuBioDOT ile değerlendirildi. Doğrulama için 13 serum örneği LiaTek, 11 serum örneği de RIBA ikinci kuşak ile çalışıldı (Tablo 1).

Bu serum örneklerinden 19'u tüm testlerle pozitif; biri BioSCREEN ve LiaTek ile negatif, diğerleriyle pozitif; biri MONOLISA, AuBioDOT ve BioSCREEN ile negatif, diğerleriyle pozitif; ikisi AuBioDOT ve BioSCREEN ile negatif, diğerleriyle pozitif; biri BioSCREEN ile negatif, AuBioDOT ile şüpheli, diğerleriyle pozitif bulundu.

Bu gruptaki çalışma ile ilgili dikkati çeken özellik AuBioDOT ve BioSCREEN ile negatif sonuç veren serumların, ikinci kuşak Abbott ELISA ile genelde düşük titrede pozitif çıkmasıdır.

İrdeleme

Bu çalışmanın sonuçlarını hem üç çalışma grubunu ayrı ayrı, hem de toplu olarak ele alıp irdelemek daha uygun olacaktır.

Birinci grupta alınan sonuçlar değerlendirildiğinde [1] İkinci kuşak anti-HCV testler genellikle birbirleriyle uyumlu olup HCV enfeksiyonu açısından risk grubu oluşturan olgularda duyarlılıkları oldukça yüksek düzeydedir. [2] İkinci kuşak Abbott ELISA ile yanlış sonuçlar alınmıştır. [3] Doğrulama testlerinin duyarlılıkları, tarama testlerine göre daha düşük olup birbirleriyle ve PCR ile uyumları konusunda da sorunlar vardır. [4] ALT düzeyleri ile PCR (viremi) arasında bir ilişki vardır. [5] Diğer testlerle uyumsuz olarak PCR ile oldukça düşük düzeyde pozitiflik elde edilmiştir.

Irwing ve arkadaşları (15) tarafından yapılan bir çalışmada da anormal karaciğer fonksiyon testlerine sahip hastalarda PCR pozitifliğinin daha yaygın olduğu saptanmış ve ayrıca diğer testlerle pozitif olmasına karşın PCR ile negatif sonuç veren olgular bildirilmiştir. Bunun olası nedenleri arasında (a) akut HCV enfeksiyo-

nu sonrası iyileşen olgularda anti-HCV uzun süre saptanabilmektedir. Alter (4) tarafından iyileşen olgularda c100-3'ün ortalama 4.1 yıl sonra kaybolduğu saptanmış olup, c22-3 ve c33c'ye karşı gelişen antikörlerin muhtemelen daha uzun süre kaldıkları, dolayısıyla pozitif bir sonucun yalnızca vireminin bir işareti olmayıp, aynı zamanda geçirilmiş enfeksiyonun da göstergesi olduğu belirtilmiştir. (b) HCV genomunun en iyi korunan bölgesi olarak bilinen 5' NC bölgesi baz alınarak hazırlanan "primer"ler, aynı bölgeye ait genetik yapısı farklı HCV suşları ile enfeksiyon söz konusu olduğunda birleşmeye giremeyeceğinden PCR sonuçları negatif olarak ortaya çıkar. (c) Serum örneklerinin uygun şekilde saklanamamasının da yanlış sonuçlar açısından önemli olabileceği bilinmektedir. Kan alındıktan sonraki 2 saatlik sürede sıvı azot içerisinde dondurulmuş, -70/-80°C'de saklanmalıdır.

Kolho ve arkadaşları (13) tarafından Ortho ikinci kuşak ELISA ve UBI testleriyle yapılan ve doğrulama testi olarak ikinci kuşak RIBA'nın kullanıldığı bir çalışmada her iki ikinci kuşak ELISA testinin de özgüllüğünün yüksek bulunmasına karşın donör taramalarında bu durumun tanımlanması gerektiği üzerinde durulmuş ve ayrıca düşük prevalanslı ülkelerde kan donörleri ile yapılan çalışmalarda pozitif çıkan ELISA sonuçlarının büyük bir kısmının gerçekte yalnızca pozitiflik olduğu görüşü ileri sürülmüştür.

Badur ve arkadaşları (16) tarafından yapılan bir çalışmada kriptojenik hepatit ve karaciğer sirozu tanısı konulan ve birinci kuşak ELISA testleri ile pozitif bulunan 24 hasta serumu ikinci kuşak Abbott ELISA, UBI, ikinci kuşak RIBA ve PCR ile değerlendirilmiş, bir serum örneği tüm testlerle negatif sonuç verirken ek olarak bir örnek RIBA ile negatif bulunmuş, sonuç olarak ikinci kuşak ELISA testlerinin özgüllük açısından oldukça tatminkar olduğu ve ayrıca RIBA tekniğine oranla daha duyarlı oldukları yönünden görüş bildirilmiştir.

Wejstal (17), HCV enfeksiyonunun tanısında kullanılan çeşitli testlerle (ELISA, RIBA, PCR) yaptığı bir çalışmada, kan donörlerinde tarama testi olarak ikinci kuşak bir ELISA testi ile RIBA'nın birlikte kullanımının basit ve doğru bir yöntem olduğu görüşünü ileri sürmüştür.

Lazizi (18), 10 laboratuvarın katılımıyla yapılan geniş kapsamlı bir çalışmada rekombinan antijenleri ve sentetik peptidleri antijen olarak kullanan dört ayrı ikinci kuşak ELISA testini değerlendirmiş ve doğrulama testleri ile PCR konfirmasyonuna başvurmuştur. İkinci kuşak testlerde ayrı antijenik yapıları kullananlar arasında anlamlı derecede farklar ortaya çıkmış ve taramalarda özgüllüğü artırmak için iki farklı antijenik yapıyı kullanan ikinci kuşak ELISA testlerinin kombine edilmesinin uygun olacağı yönünde görüş bildirmiştir.

Hofmann ve arkadaşları (19) tarafından yapılan bir çalışmada Ortho ve Abbott ikinci kuşak bir test ile pozitif bulunarak 36'sı non-A, non-B hepatit (NANBH)'li hastalardan, 57'si kan donörlerinden alınan serum örnekleri, çeşitli firmalarca üretilen 8 ELISA

testi (Abbott, Ortho, Wellcome, Sanofi Pasteur, Organon, Gen. Biol., Immunogenetics, Sorin) ve iki doğrulama testi (RIBA ikinci kuşak ve LiaTek) ile değerlendirilmiştir.

NANBH'li ve HCV enfeksiyonu için en az bir risk faktörü taşıyan hastaların hemen hepsinde uyumlu sonuçlar alınmış ve 36 serum örneğinden 31'inde tüm testler pozitif sonuç vermiştir. Donörlerde ise 57 serum örneğinden ancak 23'ünde tüm testler pozitif sonuç vermiş ve bu grupta doğrulama testleri arasındaki uyum-

Tablo 1. Serolojik Tanı Yöntemleri ile Çalışma Gruplarında Alınan Sonuçlar

| Testin Adı | Birinci Grup (n=20) | | İkinci Grup (n=20) | | | Üçüncü Grup (n=24) | | |
|---------------------------|---------------------|---------|--------------------|---------|---------|--------------------|---------|---------|
| | Pozitif | Negatif | Pozitif | Negatif | Kuşkulu | Pozitif | Negatif | Kuşkulu |
| 2. Kuşak Abbott ELISA | 20 | - | 18 | 2 | - | 24 | - | - |
| UBI | 18 | 2 | | | | | | |
| Innotest | 17 | 3 | | | | | | |
| Abbott Supplemental | 18 | 2 | | | | | | |
| LiaTek | 15 | 5 | 14 | 4 | 2 | 12 | 1 | - |
| RIBA (2. kuşak) | 17 | 3 | | | | 11 | - | - |
| PCR | 8 | 12 | 20 | - | - | | | |
| Sanofi Pasteur (MONOLISA) | | | 14 | 6 | - | 23 | 1 | - |
| BioSCREEN | | | 13 | 7 | - | 19 | 5 | - |
| AuBioDOT | | | 12 | 8 | - | 20 | 3 | 1 |

suzluk da oldukça yüksek oranda bulunmuştur.

Sonuçlar ayrıntılı olarak değerlendirildiğinde, HCV infeksiyonu şüpheli olgularda tanı amacıyla ikinci kuşak ELISA testlerinin özellikle bir doğrulama yöntemi ile desteklendiğinde uygun olacağı, ancak donör taramalarında yeterli güvenin sağlanamadığı, ayrıca doğrulama testlerinin özellikle uyumsuz ELISA sonuçlarında sınırlı değere sahip olduğu görülmektedir (19).

Sugitani ve arkadaşları (20) tarafından yapılan bir çalışmada kan donörlerinden alınan ve PCR ile pozitif bulunan 19 serum örneği çeşitli testlerle çalışılmış; birinci kuşak ELISA anti-HCV ile 9, ikinci kuşak Abbott ELISA ile 13, UBI ile 13, ikinci kuşak RIBA ile 10 pozitif sonuç elde edilmiştir.

Yine yapılan çalışmalarda yeni kuşak "immunoblot" ve ELISA'ların geliştirilmesi gerekliliği (21), donör taramalarında özgüllüğü artırmak için bir "supplemental" teste gerek olduğu (22) ve alternatif antijenlerle çalışan ELISA testlerinin ve/veya RIBA/LiaTek kombinasyonlarının PCR'ye gereksinimi belirgin bir biçimde azaltacağı (23) yolunda görüşler bildirilmiştir.

Bu çalışmada PCR ile pozitif bulunarak ikinci grupta çalışılan 20 serum örneği ikinci kuşak Abbott ELISA, MONOLISA, BioSCREEN, AuBioDOT ve LiaTek ile değerlendirildi. Abbott ELISA ile 18, MONOLISA ve LiaTek ile 14, BioSCREEN ile 13 ve AuBioDOT ile 12 serum örneği pozitif bulundu. İki serum örneği LiaTek ile şüpheli idi. Sekiz örnek tüm testlerle pozitif, 1 örnek ise tüm testlerle negatif idi (Tablo 1).

Bu grup ile ilgili çalışmayı değerlendirecek olursak [1] İkinci kuşak Abbott ELISA'nın duyarlılığı oldukça yüksektir. [2] LiaTek'in duyarlılığı ikinci kuşak Abbott ELISA'ya göre daha düşüktür. [3] Diğer testlerin duyarlılıkları oldukça düşük düzeylerde bulunmuştur.

Üçüncü grupta hemodializ hastalarından ikinci kuşak Abbott ELISA ile anti-HCV-pozitif bulunan 24 serum örneği alınarak MONOLISA, BioSCREEN ve AuBioDOT ile çalışıldı. Ayrıca 13'ü LiaTek, 11'i de RIBA ikinci kuşak ile değerlendirildi (Tablo 1).

On dokuz serum örneği tüm testlerle pozitif bulundu. Doğrulama testleri baz alındığında genelde yüksek düzeyde duyarlılıklar elde edildi. İkinci kuşak Abbott ELISA ile düşük titrede pozitiflik veren serum örneklerinin AuBioDOT ve BioSCREEN ile negatif sonuçlar verdiği görüldü.

Bu çalışmanın sonuçlarını bir bütün halinde ele alacak olursak:

[1] İkinci kuşak ELISA testlerinin HCV infeksiyonu açısından risk grubu oluşturan olgularda duyarlılıkları genelde yüksek düzeyde bulunmuştur. Toplumsal kökenli HCV infeksiyonunun ikinci kuşak ELISA testleriyle % 10 kadarının gösterilemediği ve özellikle düşük prevalanslı ülkelerde bu testlerle kan donörlerinde büyük oranda yalancı pozitiflikler elde edilmesi (13) normal popülasyon ve kan donörleriyle ilgili daha geniş kapsamlı çalışmaları gerekli kılmaktadır. HCV-RNA sonuçları baz alınarak ikinci kuşak testler değerlendirildiğinde ikinci kuşak Abbott ELISA'nın MONOLISA'ya göre duyarlılığının yüksek, UBI'ye göre ise özgüllüğünün daha düşük olduğu görülmektedir.

[2] Yeni bir görsel yöntem olarak ve "core" bölgesine ait antijenik yapıları kullanması nedeniyle ikinci kuşak ELISA testleriyle karşılaştırılması uygun görülen AuBioDOT'un özellikle ikinci kuşak Abbott ELISA ile düşük titrede pozitif sonuçlar veren örneklerde negatif sonuçlar verdiği görülmüştür. Ancak basit ve kolay uygulanması, çalışma süresinin kısalığı ve ek bir materyale gerek duyulmaması, özellikle donör taramalarında kullanılabilmesi kanısını uyandırmıştır ve bu konuda ayrıntılı çalışmalara gereksinim vardır.

[3] NS5 bölgesine ait antijenik yapıları içermesi nedeniyle bir kısım araştırmacılar tarafından üçüncü kuşak ELISA olarak tanımlanan testlere bir örnek olarak çalışmaya aldığımız Innotest'in duyarlılık ve özgüllüğü diğer ikinci kuşak ELISA testlerine göre daha yüksek olmakla birlikte UBI ile aynı sonuçları verdiğini gördük. Ancak çalışılan örnek sayısının düşük olması nedeniyle alınan so-

nuçlar ikinci kuşak ELISA testlerinden üstün olup olmadığı konusunda yorum yapmamıza yetecek düzeyde bulunmamıştır.

[4] Doğrulama testi olarak sunulan testlerden Abbott Supplemental'in özgüllüğü ikinci kuşak Abbott ELISA'ya göre daha yüksektir, Innotest ve UBI ile hem duyarlılık, hem de özgüllük konusunda aynı sonuçlar alınmıştır. LiaTek ve ikinci kuşak RIBA'nın duyarlılıklarının, ikinci kuşak ELISA testlerine göre daha düşük düzeyde olduğu görülmüştür. Ayrıca doğrulama testi olarak sunulan bu testlerin hem birbirleriyle hem de PCR ile uyumsuz sonuçları nedeniyle bu testlerin "doğrulama testi"nden çok destekleyici ya da tamamlayıcı olarak tanımlanmalarının daha uygun olacağı kanısındayız.

[5] Akut ve kronik dönemde tek ve en güvenilir yöntem olarak HCV-RNA'nın varlığında PCR negatifliklerinin elimine edilmesinin gerekliliği ortadadır. Ya genomun en iyi korunmuş bölge veya bölgelerinden kaynak alan farklı epitoplardan özenle seçildiği "primer"lerin kullanıldığı gelişmiş PCR yöntemiyle ya da "RNA Capture Assay" gibi yeni yöntemlerin gündeme gelmesiyle bunun sağlanması beklenebilir.

Sonuç olarak donör taramalarının güvenle yapılabilmesi amacıyla akut ve kronik HCV infeksiyonunun kesin tanısını sağlayacak güvenilir, ucuz ve uygulama kolaylığı olan yeni yöntemlere gereksinim olduğunu söyleyebiliriz.

Kaynaklar

1. Cuthbert JA. Southwestern Internal Medicine Conference: hepatitis C. *Am J Med Sci* 1990; 299: 346-55
2. Yenen OŞ, Badur S. Prevalence of antibodies to hepatitis C virus in blood donors and risk groups in Istanbul, Turkey. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1991; 10: 93-4
3. Kuo G, Choo L, Alter HJ, et al. An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A, non-B hepatitis. *Science* 1989; 244: 362-4
4. Alter HJ. New kit on the block. Evaluation of second-generation assays for detection of antibody to hepatitis C virus [Editorial]. *Hepatology* 1992; 15: 350-3
5. Garson JA, Tedder RS. The detection of hepatitis C infection. *Med Virol* 1993; 3: 75-8
6. Hoofnagle HJ, Di Bisceglie AM. Serologic diagnosis of acute and chronic viral hepatitis. *Semin Liver Dis* 1991; 11: 73-83
7. Lelie PN, Theo H, Cuypers M, et al. Patterns of serological markers in transfusion-transmitted hepatitis C virus infection using second generation HCV assays. *J Med Virol* 1992; 37: 203-9
8. Wejstal R, Hermodsson S, Iwarson S, Norkrans G. Mother to infant transmission of hepatitis C virus infection. *J Med Virol* 1990; 30: 178-80
9. Claeys H, Volckaerts A, De Beenhower H, Vermeylen C. Association of hepatitis C virus carrier state with the occurrence of hepatitis C virus core antibodies. *J Med Virol* 1992; 36: 259-64
10. Padron G, Aru E, Rivera L, et al. Antibody pattern to hepatitis C virus antigens in patients with acute and chronic liver diseases [Abstract]. In: *FEMS Symposium on Hepatitis C Virus and Its Infection* (June 28- July 2, 1993, Istanbul, Turkey) Abstracts. Istanbul: Turkish Microbiological Society, 1993: 23
11. Bresters D, Reesink HW, Cuypers HTM, et al. Sensitivity of an anti-HCV core peptide ELISA. *J Med Virol* 1992; 37: 187-91
12. Fong TL, Valinluck B, Govindarajan S, et al. Marked improvement in sensitivity of second-generation tests for acute hepatitis C virus infection. *J Infect Dis* 1993; 168: 519-20
13. Kolho E, Naukkarinen R, Krusius T. Specificity and sensitivity of two second-generation ELISA tests in detecting hepatitis C antibodies in blood donors known to be reactive with a supplemental assay. *Vox Sang* 1992; 63: 158-60
14. Dow BC, Follett EAC, Jordan T, et al. Testing of blood donations for hepatitis C virus. *Lancet* 1994; 343: 477-8.
15. Irwing WL, Day S, Eglin RP, et al. HCV and PCR negativity. *Lancet* 1992; 339: 1425
16. Badur S, Ağaçfıdan A, Türkoğlu S, et al. HCV infeksiyonunun serolojik tanısında çeşitli ELISA ve RIBA tekniklerinin değeri ve PCR yön-

- temi ile HCV-RNA'sı araştırılması. *Klimik Derg* 1992; 5: 70-3
17. Wejstal R. Serodiagnosis of hepatitis C virus infection. *Serodiagn Immunother Infect Dis* 1993; 5: 67-70
 18. Lazizi Y. Discordance between four second-generation enzyme immunoassays kits in anti-hepatitis C virus screening. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1994; 13: 280-1
 19. Hofmann H, Konczer A. Commercial tests kits in diagnosis of hepatitis C. *Serodiagn Immunother Infect Dis* 1993; 5: 76-8
 20. Sugitani M, Inchauspe G, Shindo M, Prince AM. Sensitivity of serological assays to identify blood donors with hepatitis C viraemia. *Lancet* 1992; 339: 1018-9
 21. Hallam N, Kurtz J, Dike A, Parker D. Infection with hepatitis C virus. New generation of assays should improve screening. *Br Med J* 1994; 308: 856
 22. Schneeberger P, van der Nat H, van Dijk W, van Loon A. Diagnosis of hepatitis C virus infection using two second-generation enzyme immunoassays with a recombinant immunoblot assay for confirmation. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1994; 13: 118-21
 23. Dow BC, Coote I, Munro H, et al. Confirmation of hepatitis C virus antibody in blood donors. *J Med Virol* 1993; 41: 215-20