

Human Immunodeficiency Virus (HIV) İnfeksiyonlarının Tanısında Karşılaşılan Güçlükler

Güliden Yılmaz, Selim Badur, Enver Tali Çetin

Özet: İstanbul Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Viroloji ve Temel İmmünoloji Bilim Dalında 13012 serumun incelenmesi sonucu elde edilen 41 'undetermined-kesin olmayan WB sonucu veren' serum ikinci farklı bir EIA kiti ile anti-HIV-1 antikorları yönünden, EIA yöntemi ile HIV antijeni yönünden ve EIA yöntemi ile anti-HIV-2 antikorları yönünden incelenmiştir. İkinci EIA kiti ile 41 serumdan 18'inde anti-HIV-1 antikorları yönünden pozitiflik elde edilmiştir. 41 serumda HIV antijeni ve anti-HIV-2 antikorları saptanmamıştır.

Anahtar Sözcükler: WB (Western blot), kesin olmayan WB sonucu

Summary: In the Virology and Immunology Unit, Department of Microbiology, Istanbul Faculty of Medicine, 41 sera were found to be 'undetermined' by WB as a result of screening 13012 sera for the presence of anti-HIV-1 antibodies. These 41 sera were tested by a second EIA kit for anti-HIV-1 antibodies, by EIA for the presence of HIV antigen and anti-HIV-2 antibodies. From these 41 sera 18 were found to be anti-HIV-1 positive. HIV antigen and anti-HIV-2 antibodies were not detected in any of these sera.

Key Words: WB (Western blot), undetermined WB result

Giriş

1981 yılında ilk kez tanımlanmasından sonra, Bağışıklık Yetmezlik Sendromu 'Acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS)', olguların çok hızlı artış göstermesi nedeni ile günümüzün en önemli tıbbi ve sosyal problemi haline gelmiştir (1,2). AIDS etkeni Human Immunodeficiency Virus tip 1 (HIV-1) 1983, Human Immunodeficiency Virus tip 2 (HIV-2) 1986 yılında izole edilmiştir (3,4). Virusların biyolojisi ve neden oldukları hastalığın özellikleri konusunda çok kısa sürede çok şey öğrenilmiş ve viruslara karşı gelişen antikorların saptanmasında kullanılan duyarlı ve özgül kitle geliştirilmiştir. HIV enfeksiyonunun tanısında anti-HIV antikorlarının tayininde ilk aşamada Enzim Immunoassay (EIA) yöntemi kullanılmaktadır (5). Çoğu EIA kitinin özgüllüğü % 99.8'e ulaşmıştır ancak az oranda da olsa görülebilecek yanlış pozitiflikleri elemek için sonucun daha güvenilir bir yöntemle doğrulanması gerekmektedir. Bu amaçla en sık olarak Western blot (WB) yöntemi kullanılmaktadır. WB yöntemi, HIV'in herbir yapısal polipeptidine karşı gelişen antikorların ayrı ayrı görülmesine olanak sağlamaktadır (6). HIV'in başlıca üç yapısal ve çeşitli düzenleyici genleri vardır. Yapısal genleri 'gag', 'pol' ve 'env' genleridir. WB kitleleri yapısal gen ürünlerine karşı gelişen antikorları tayin etme özelliğindedir. 'gag' geni koru oluşturan polipeptidleri kodlar. 'gag' geni ürünü 55 kd'luk bir polipeptiddir. Virusun olgunlaşması sırasında daha ufak polipeptidlere parçalanır: 18 kd ve 24 kd'luk polipeptid. 'pol' geni diğer adı ile polimeraz geni virusun enzim kompleksini kodlar. 'pol' geni ürünü, revers transkriptaz enzimi-p68 ve onun türevi p52 ve endonükleaz aktiviteli p34 den oluşur. 'env' geni kılıf glikoproteinlerini kodlar. Kılıf glikoproteinleri 160 kd'luk ana glikoprotein ve onu oluşturan 120 kd'luk yüzey glikoproteinini ve 41 kd luk transmembran komponentden oluşur. Doğrulama testi için kullanılan WB şeridinde bu ürünler yer almaktadır. Önceleri her zaman kesin sonuç veren bir doğrulama testi olduğu düşünülen WB yöntemi ile de zaman zaman kesin sonucun alınmadığı durumların söz konusu olduğu anlaşılmıştır (6,7). Bu çalışmada İstanbul Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim

Dalı, Viroloji ve Temel İmmünoloji Bilim Dalı'nda serumların anti-HIV antikorları açısından incelenmesi sırasında karşılaşılan 'undetermined-kesin olmayan WB' sonuçları incelenmiştir.

Yöntemler

Bu çalışmada İstanbul Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Viroloji ve Temel İmmünoloji Bilim Dalı'nda 13012 serumun anti-HIV-1 antikorları yönünden incelenmesi sırasında 'undetermined' WB sonucu veren 41 serum incelenmiştir. 1289 serumun rutin çalışma sırasında Rapid Elavia (Pasteur Diagnostics) kiti ile tarandığı bilinmektedir. 11723 serum ise rutin çalışma sırasında anti-HIV-1 antikorları yönünden Vironostika anti-HTLV-III (Organon Teknika) ve Abbott Recombinant HIV 1 EIA (Abbott Diagnostics) kiti ile taranmıştır. İncelenen 41 serumdan ikisi Du Pont (Du Pont Company) kiti ile, 39'u New Lav Blot 1 (Pasteur Diagnostics) kiti ile doğrulama testi uygulanması sonucu 'undetermined' WB sonucu vermiştir. Bu 41 serum anti-HIV-1 antikorları yönünden ikinci bir kitle daha incelenmiştir. Bu amaçla bir kuyucuğun virus antijeni ve diğer kuyucuğun virusu üretmek için kullanılan infekte edilmiş kontrol hücreleri ile kaplı olduğu iki kuyucuğun kullanıldığı Elavia 1 (Pasteur Diagnostics) kiti ile HIV-1 antijeni ve Elavia 2 (Pasteur Diagnostics) kiti ile anti-HIV-2 antikorları araştırılmıştır.

Sonuçlar

13012 serumun Anti-HIV-1 antikorları yönünden incelenmesi sonucu elde edilen 41 'undetermined' sonucun ikisi 11723 serumun önce dönem dönem Vironostika anti-HTLV-III veya Abbott Recombinant HIV-1 EIA kiti ile anti-HIV-1 antikorları yönünden taranması ve Du Pont WB kiti ile doğrulama testinin uygulanması sırasında saptanmıştır. 39'u ise 1289 serumun Rapid Elavia kiti ile anti-HIV antikorları yönünden incelenmesi ve New Lav Blot 1 kiti ile doğrulama testinin uygulanması sırasında 'undetermined' sonuç vermiştir. Bu 39 serumdan 32'si Viroloji ve İmmünoloji Bilim Dalına başka hastanelerde EIA yöntemi ile anti-HIV-1 antikorları yönünden pozitif buldukları için doğrulama amacı ile gönderilen serumlardır (Tablo 1).

Undetermined sonuç alınan serumların WB band paternle-

Tablo 1. 'Undetermined-Kesin Olmayan WB Sonucu Elde Edilen Serumlar

İncelenen serum sayısı	Kullanılan kitler EIA	WB	Kesin olmayan WB sonucu alınan serum
11723	Vironistika anti-HTLV-III	Du pont	2
1289	Abbott HIV 1 EIA	New Lav Blot	39*
13012	Rapid Elavia		41

*39 serumdan 32'si doğrulama testi için gönderilmiştir.

ri Tablo 2'de gösterilmiştir. Bu 41 serum anti-HIV-1 antikorları yönünden Elavia 1 kiti ile incelendiğinde 18 serumda pozitif sonuç elde edilmiştir. Bir serumla hem kontrol çukurunda hem de antijen çukurunda pozitiflik saptanarak nonspesifik sonuç elde edilmiştir. Bu 41 serumda EIA ile HIV antijeni ve anti-HIV-2 antikorunu araştırması negatif sonuç vermiştir.

İrdeleme

WB ile doğrulanan tipik pozitif sonuçta, nitroselüloz şerit üzerinde antijenlerin bulunduğu tüm bölgelerde band oluşur

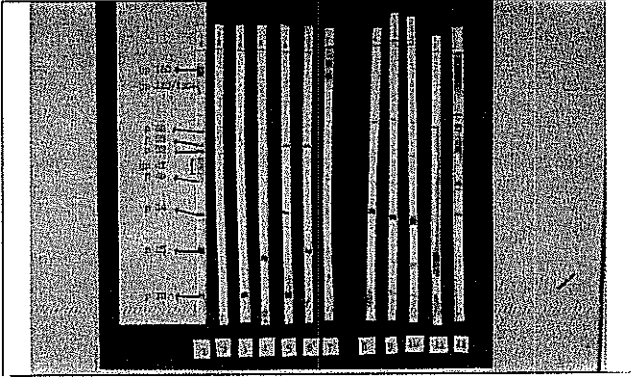
(Şekil 1-1,12). Ancak HIV enfeksiyonlu kişilerin serumlarında her zaman virusun tüm antijenlerine karşı antikor bulunmayabilir. Buna bağlı olarak da WB şeridinde tüm bandlar elde edilmeyebilir. Hiçbir band içermeyen şerit negatif kabul edilir (Şekil 1-2). Pozitiflik kriterinde tam bir birlik sağlanmamıştır (Tablo 3) (6).

Asemptomatik dönemde genelde farklı kriterlerle bile tüm seropozitiflikler pozitif olarak değerlendirilecektir. Ancak enfeksiyonun erken ve geç dönemlerinde farklı kriterler kullanıldığında farklı yorumlar ortaya çıkabilmektedir.

Çünkü enfeksiyonun başlangıcında tüm antikorlar birden oluşmamaktadır. Önce kor antikorları oluşmakta ve klinik bulgular ortaya çıktıkça bu antikorlar kaybolabilmektedir (6,8). Bu nedenle WB sonuçlarının dikkatle yorumlanması gerekmektedir. Örneğin Şekil 1-7'deki sonuç iki kılıf antikorunu bulunduğu için pozitif olarak değerlendirilmektedir. Pozitiflik ve negatiflik kriterlerine uymayan sonuçlara 'undetermined-kesin olmayan WB sonucu' denilmektedir. Öncelikle her zaman kesin sonuç veren bir doğrulama testi olduğu düşünülen WB yöntemi ile de zaman zaman kesin sonucun alınmadığı durumların söz konusu olduğu anlaşılmıştır. Bu tür sonuçların önemini saptamak amacı ile şu sorulara yanıt aranmaktadır:

Tablo 2 - 'Undetermined-Kesin Olmayan WB Sonucu' Elde Edilen Serumların Band Paterni

p18	p24	p34	p40	gp41	p52	p55	p68	gp110/120	gp160	Hasta sayısı
+										3
+	+									1
+						±				2 (Şekil 1-3)
+						+				2 (Şekil 1-1)
±									+	1
±	+		+			+				2 (Şekil 1-9)
±						+			±	1
+			+			+				1 (Şekil 1-5)
+			±			+				3
+			p40	altı		+			±	1
+		+							±	1
p18	altı		p40	altı		+				1
	+									3
	±									2
					+					1
						+				2
	+					±				1
	+		±			+				1 (Şekil 1-6)
	+		+			+				1 (Şekil 1-8)
	±			±					+	1
	±					±				1
+	+	+				+			±	2
		+				+			±	1
	+						+			1 (Şekil 1-4)
	+	±		±		+				1
	+			±		+				1
+	+		+	±		+				1 (Şekil 1-10)



Şekil 1. Undetermined-kesin olmayan WB sonucu elde edilen serumların WB sonuçları

No: 1, 12: Pozitif kontrol

No 7: Pozitif serum

No 3,4,5,6,8,9,10,11: 'undetermined-kesin olmayan WB sonucu' veren serumlar

1. Böyle bir sonuç HIV infeksiyonunu mu göstermektedir.

2. Bu sonuç laboratuvar yönteminden mi kaynaklanmaktadır?

3. Bilinen diğer retroviruslar ile infeksiyonu mu göstermektedir (HIV-2, HTLV-1, HTLV-II)?

4. Şu anda bilinmeyen başka bir retrovirusla infeksiyonu mu göstermektedir? (9)

Bu konuda şu ana kadar çeşitli çalışmalar yapılmış ve devam etmektedir:

1. Kesin sonuç alınmayan kişilerin ele alındığı çeşitli çalışmalarda HIV ile infeksiyonun olup olmadığı HIV antijen tayini, kültür, polimeraz zincir reaksiyonu, DNA hibridizasyon yöntemleri ile ortaya koyulmaya çalışılmıştır. Bu kişilerin büyük çoğunluğunda HIV-1 ile infeksiyon saptanmıştır. Biz de bu çalışmada 'undetermined' sonuç veren 41 serumu HIV-1 antijeni yönünden inceledik ve negatif sonuç elde ettik.

Kesin olmayan WB sonucunun öneminin saptanan band-

lara bağlı olduğu görülmüştür. Risk grubunda kişiler ele alındığında WB ile tayin edilen ilk reaktivite, sonradan serokonversiyonun gerçekleştiği kişilerde p24 bandında olmaktadır. Buna 'pol' ve 'gag' geni ürünlerine karşı antikor bandları eşlik edebilir veya etmeyebilir.

2. 'undetermined' sonuçların sıklığı kullanılan EIA ve WB kitlelerine bağlı olarak değişebileceği gösterilmiştir. Viroloji ve İmmünoloji bilim Dalı'mızda incelenen serum sonuçları değerlendirildiğinde de bu doğrulanmaktadır. 1289 serum Rapid Elavia kiti ile anti-HIV-1 antikorları yönünden tarandığında ve doğrulama testi için New LAV blot kiti kullanıldığında elde edilen 'undetermined' WB sonucu 7 iken, 11723 serum Vironostika anti-HTLV-III ve Abbott Rec HIV-1 EIA kiti ile anti-HIV-1 antikorları yönünden tarandığında ve doğrulama için Du pont kiti kullanıldığında 2 'undetermined' WB Sonucu elde edilmiştir. Ayrıca Rapid Elavia kiti ile pozitif sonuç alınan 41 serumdan 22'sinde Elavia kiti ile negatif sonuç elde edilmiştir.

3. Yapılan çeşitli çalışmalarda 'undetermined' sonuç alınan serumlarda HIV-2, HTLV-1 ve HTLV-II infeksiyonuna raslanılmamıştır. Bu çalışmada da 41 'undetermined' sonuç veren serumda anti-HIV-2 pozitifliğine raslanılmamıştır.

4. 'Undetermined' WB sonucunun şu ana kadar bilinmeyen başka bir retrovirusa bağlı olup olmadığına anlaşılabilmesi için bu bulgunun bulaşıcı olup olmadığı araştırılmıştır. Çalışılan kişi sayısı az ise de bulaşıcılık saptanmamıştır (9).

Centers for Disease Control, kesin sonuç alınmayan WB sonucu elde edilen kişilerin serumlarının 6 ay sonra tekrar incelenmesini önermektedir. 6 ay sonra karakteristik band paterni gelişmez ise ve kişi de risk grubuna girmiyorsa HIV infeksiyonunun olmadığı ileri sürülmektedir (10). Ancak kişide HIV infeksiyonunun var olup olmadığı kesin bir şekilde doğrulanması büyük önem taşımaktadır. Söz konusu kişiye kesin bir sonuç verilememesi, kişiyi son derece tedirgin etmekte ve 6 ay gibi uzun bir süre beklemek de bu tedirginliği arttırmaktadır. Kesin olmayan WB sonuçlarının üç grupta incelenmesi önerilmektedir:

1) p24 ve bir kılıf antikoruna varsa: Muhtemelen bir HIV infeksiyonu söz konusudur. Kişi bu konuda uyarılmalıdır.

2) Sadece p24, ya da p24 ve gag geni ürünlerine karşı antikor bulunan ya da p24 ve pol genleri ürünlerine karşı antikor saptananlar: Düşük olasılıkla HIV infeksiyonu söz konusudur.

3) p18, p34, p52, p55, p68 bandaları saptananlar: HIV

infeksiyonuna söz konusu olmadığı ve takibe gerek olmadığı ileri sürülmektedir. Ayrıca 6 aylık sürenin çok uzun olduğu ve 2-3 ay sonra ikinci kan örneğinin alınmasının yeterli güvenilirlikteki sonucu vereceği vurgulanmaktadır (9). Pasteur Enstitüsünde 'undetermined' sonuç alınan kişilerden ikinci kan örneği bir ay sonra alınıp incelenmekte ve değişiklik olmaz ise bu sonuç yalnızca pozitiflik olarak değerlendirilmektedir. Viroloji ve İmmünoloji Bilim Dalı'mızda 41 'undetermined' sonuç alınan kişi 6 ay sonra kontrole çağırılmıştır. Pasteur Enstitüsünden yakın zamanda edinilen bilgi ışığında bundan sonra ikinci kan örneğinin bir ay sonra alınmasına karar verilmiştir.

Tablo 3. WB Sonuçlarının Yorumlanması (6)

Kuruluşun ya da kiti adı	Bir WB sonucunun pozitif kabul edilmesi için gereken minimum bandlar
CDC ¹	p24, gp41, ya da gp 120/160 dan ikisi
CRSS ²	p24 ya da p31 ve gp41 ya da gp120/160 dan biri
Du pont ³	p24 ve p31 ve gp41 ya da gp120/160 dan biri
ARC ⁴	p17, p24 ya da p55 den biri ve p31, p51 ya da p68 den biri ve gp41 ya da gp120/160 dan biri
Lav blot ⁵	gp41, gp160 ya da gp 120 den ikisi

1- CDC: Centers for Disease Control Atlanta

2- CRSS: Consortium for Retrovirus Serology Standardization, California

3- Du Pont: Kit markası

4- ARC: American Red Cross, Washington

5- Lav blot: kit markası

Kaynaklar

1. Center for Disease Control. Kaposi's Sarcoma and Pneumocystis pneumonia among homosexualmen-New York City and California. *MMWR* 1981; 30: 305-7
2. Husson RN, Comeau AM, Hoff R. Diagnosis of Human Immunodeficiency Virus infection in infants and children. *Pediatrics* 1990; 86: 1-10
3. Barré-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F et al. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 1983; 220: 868-71
4. Clavel F, Guetard D, Brun-Vezinet F et al. Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. *Science* 1986; 233: 343-6
5. Smith RS, Parks DE. Synthetic peptide assays to detect Human Immunodeficiency Virus types 1 and 2 in seropositive individuals. *Arch Pathol Lab Med* 1990; 114: 254-8
6. Dodd RY, Fang CT. The Western Immunoblot Procedure for HIV antibodies and its interpretation. *Arch Pathol Lab Med* 1990; 114: 240-5
7. Gallo RC, Wong-staal F, Montagnier L, Haseltine WA, Yoshida M. HIV/HTLV gene nomenclature. *Nature* 1988; 333: 504-9
8. Petersen C, Hielsen CM, Vestergaard BF et al. Temporal relation of antigenemia and loss of antibodies to core antigens to development of clinical disease in HIV infection. *Br Med J* 1987; 295: 567-70
9. Kleinman S. The significance of HIV-1 indeterminate Western blot results in blood donor population. *Arch Pathol Lab Med* 1990; 114: 298-303
10. Centers for Disease Control. Interpretation and use of the Western blot assay for serodiagnosis of human immunodeficiency virus type 1 infections. *MMWR* 1989; 38: 1-7