

HCV İNFEKSİYONUNUNDA ELISA, RIBA VE b-DNA YÖNTEMLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

Tekin KARSLIĞIL, Ragıp BELGİN, İclal BALCI, Fahriye EKŞİ

Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyolojisi ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Gaziantep

Özet

Hepatit C virüs (HCV) infeksiyonunda kesin tanı, serolojik yöntemlerle antikor yanıtının belirlenmesi ya da moleküler yöntemlerle HCV RNA'nın gösterilmesiyle konmaktadır. Bu çalışmaya, viral hepatit etyolojisi araştırılan, 31 kadın 24 erkek toplam 55 hasta serumunda üç farklı yöntem kullanılarak hepatit C virüsünün varlığı araştırıldı. HCV antikorları, enzim immünoassay (ELISA) ve rekombinan immunoblot assay (RIBA) ile araştırılırken HCV-RNA, branch DNA (b-DNA) sistemiyle tarandı. Olguların %85'i (47/55) ELISA ile, %76'sı (42/55) RIBA ile, %76'sı (42/55) b-DNA ile pozitif bulundu. Bir olguda her üç yöntem de negatifdi (%2). Serumların %58'i (32/55) her üç yöntemle de pozitif bulunurken, %13'ü (7/55) sadece ELISA ve RIBA yöntemiyle, %5'i (3/55) sadece ELISA ve b-DNA yöntemiyle, %5'i de (3/55) sadece RIBA ve b-DNA yöntemiyle pozitif saptandı. Beş olguda tek başına ELISA pozitifliği (%9), dört olguda da b-DNA pozitifliği (%7) bulundu. RIBA ile pozitif bulunan 42 hastanın 39'unda (%93) kapsid bölgesine ait bandın reaktif olduğu, diğer bantlara çeşitli oranlarda reaksiyon geliştiği saptandı. İndetermine olguya rastlanmadı. ELISA yönteminin yüksek duyarlılığı, tanıda uygun bir yöntem olduğunu göstermektedir. Ancak, her ne kadar NS5 bölgesinin ilavesiyle elde edilen 3. kuşak ELISA yöntemlerinin duyarlılığı ve özgüllüğü artırılmış olsa da, HCV infeksiyonlarının tanı ve takibinde yardımcı metotlara gerek duyulabilmektedir. Anti HCV'deki yalancı pozitifliğin doğrulanması ve analitik incelemeler için RIBA'nın, henüz antikor oluşmamış olgularda tanıya yardımcı olması, aktif infeksiyonun ayrılması ve tedavi takibinde ise moleküller yöntemlerin kullanımı uygun olacaktır.

Anahtar Sözcükler: HCV, ELISA, RIBA, b-DNA.

Summary

COMPARISON OF ELISA, RIBA AND b-DNA IN HCV INFECTION

Diagnosis of Hepatitis C virüs (HCV) infection depends on detecting of antibody response through serologic methods or on detecting of HCV-RNA with molecular methods. In this study, the existence of HCV infection was investigated in 31 women and 24 men, totalling 55 patients by three different methods. HCV antibodies were searched with enzyme immunoassay (ELISA), recombinant immunoblot assay (RIBA), and HCV RNA was searched with branch DNA (b-DNA) method. Anti-HCV positivity were 85% (47/55) by ELISA, 75% (42/55) by RIBA and b-DNA. In one sample all three tests were negative (2%). Seropositivity were 58% (32/55) with 3 test and 13% (7/55), 5% (3/55) with ELISA and RIBA, ELISA and b-DNA, RIBA and b-DNA respectively. In 5 sample only ELISA (%9), in 4 sample only b-DNA (7%) were positive. In 39 out of 42 RIBA positive sample (93%) capsid band was reactive. There were no indeterminate sample. Because of the high sensitivity of ELISA, it suggests that a proper method. Although addition of NS-5 band increases the sensitivity and specificity of 3th generation ELISA methods, it is the necessity to additional method in diagnosis of HCV infection. For investigating a false positiveness and for analitic information, RIBA can be used. The purpose of determining previous or active infection before development of antibodies and also follow up to treatment molecular method should be used.

Key Words: HCV, ELISA, RIBA, b-DNA.

Giriş

Hepatit C virüsü, flaviviridae ailesine mensup, 45-55 nm. büyüklüğünde, zarflı RNA virüsüdür (1-3). 9500 nükleotid uzunluğunda ve 3011 aminoasitlik bir poliproteini kodlayan genoma sahiptir (1,3). Bu büyük molekülün proteolitik kesime uğramasıyla virüse ait proteinler oluşmaktadır. HCV genomu, özellikle zarfla ilgili bölümde önemli dizi farklılıkları göstermekte, bu nedenle değişik genotipler saptanmaktadır. Bu değişiklikler, genomun %33'ünü kapsamaktadır (1). Böylece virüs, mutant şekiller geliştirerek immün sistemden kaçmakta, bu da enfeksiyonun kronikleşmesine neden olmaktadır. Yine oluşan değişiklikler tanı yöntemlerinin sonuçlarını, tedaviye verilen cevabı ve aşı çalışmalarını etkilemektedir (1,2).

Hepatit C virüsü yalnız insanda enfeksiyon yapmaktadır. Epidemiyolojik özellikleri Hepatit B virüsüne benzer. Kan transfüzyonu ve seksüel temas yoluyla bulaşabildiği gibi, anneden bebeğine de geçebilmektedir. Enfeksiyonun akut devresi genellikle belirtisiz seyretmekte, tanı kronik evrede konulmaktadır. Olguların %75-90'ı kronikleşmekte, bunların %30'unda siroz gelişmektedir (1-3). Etkenin alınmasından ortalama 10-15 yıl sonra kronik hepatit, 20 yıl sonra siroz, 30 yıl sonra hepatoselüler karsinom gelişmektedir (1,3). Anti HCV seroprevalansı tüm dünyada %0.3-1.5 arasında, yurdumuzda ise sağlıklı bireylerde ve kan donörlerinde yapılan çalışmalarda %0.3-1.8 arasında saptanmaktadır (2-4).

Hepatit C virüsüne karşı serumda oluşan antikorların ELISA ile saptanması, serolojik tanıda önemli bir yer tutmaktadır. NS5 bölgesinin de ilavesiyle elde edilen üçüncü kuşak ELISA'larda duyarlılık %95'in üzerine çıkmıştır. HCV'nün henüz kültürü yapılamadığından tanı yöntemlerinde kullanılan antijenler rekombinant DNA teknolojisiyle mayalarda üretilmektedir. HCV bulaşından sonra anti-HCV antikorlarının ortaya çıkması için geçen süre çeşitli kaynaklara göre farklı olmasına rağmen ortalama 12 hafta olup, 6 aya kadar uzayabilmektedir (2-5). HCV RNA'sı pozitif olan hastaların %5-10'unda, immünsuprese hastaların da %20'sinde ve böbrek nakili hastalarda antikor yanıtı gelişmemektedir (4). Tanıda taramalar için geliştirilmiş hızlı immünokromatografik yöntemler de bulunmakta, ancak bunların duyarlılığı için ileri araştırmalara ihtiyaç duyulmaktadır (4). Kan donörlerinde, hipergamaglobulinemi ve otoimmün hastalıklarda, yalancı pozitifliklerin kontrolü amacıyla, antikorların analitik olarak değerlendirilmesini sağlayan Rekombinant Immunoblot Assay (RIBA) yöntemi kullanılmaktadır (2-5). HCV RNA'sının saptanması, HCV enfeksiyonunun tanısında en erken ve en duyarlı yöntemdir. Bu amaçla, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), b-DNA ve dot-blot hidridizasyon yöntemleri kullanılmakta ve kantitasyon yapılabilmektedir. Ancak HCV'nin oldukça düşük viremi ile karakterize olması zaman zaman bu metodların da yetersiz kalmasına neden olmaktadır (2,4).

Biz çalışmamızda, viral hepatit etyolojisi araştırılan hastalarda farklı yöntemlerin HCV tanısına ne oranda yardımcı olacağını araştırdık.

Gereç ve Yöntem

Çalışmamıza, Mayıs 1999-Haziran 2000 tarihleri arasında Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi polikliniklerinden, hepatit ön tanısıyla laboratuvarımıza gönderilen ve akut hepatit A, hepatit B ve Hepatit E serolojik göstergeleri negatif bulunan 31 kadın, 24 erkek toplam 55 hasta dahil edilmiştir. Bu hastalarda Hepatit C virüsüne ait diğer belirleyiciler de araştırılmıştır.

HCV antikorları üçüncü kuşak ELISA (Dia-Sorin, İtalya) kitleriyle üretici firmanın önerisi doğrultusunda çalışılmıştır.

Rekombinan Immunoblot Assay (RIBA) (HCV Blot 3.0 Genelabs Diagnostics, Singapur) rekombinant HCV antijenlerinin (Core NS3-1, NS3-2, NS4 ve NS5) emredildiği nitroselülüz şeritlerde üretici firmanın önerisi doğrultusunda çalışılmış ve bu bantlara karış hasta serumunda oluşmuş antikorlar araştırılmıştır. Şerit üzerindeki antijen bantlarından bir bandın renk reaksiyonu

vermesi indetermine, iki veya daha fazla antijen bandının reaksiyon vermesi pozitif olarak değerlendirilmiştir.

HCV-RNA, hidridizasyon Chiron Quantiplex HCV-RNA 2.0 Assay (b-DNA) sistemiyle taranmıştır. Bu sistemde, sentetik oligonükleotid proplar ve dallanmış DNA molekülleri kullanılarak hibridizasyon yapılmakta ve sonuç MEq/ml cinsinden kantitatif olarak verilebilmektedir.

Bulgular

Çalışmamızda 55 hastanın 47'sinde ELISA ile, 42'sinde RIBA ile, 42'sinde de b-DNA ile pozitiflik saptanmıştır. Bir olguda her üç yöntem de negatif bulunmuştur (Tablo 1).

HCV RNA'sı pozitif hasta serumlarını %83'ü ELISA ve RIBA yöntemleriyle pozitif bulunmuştur. ELISA ile negatif bulunan sekiz hasta serumunun yedisinde (%87.5), RIBA ile negatif bulunan 13 hasta serumunun yedisinde (%53.8) HCV RNA pozitif bulunmuştur (Tablo 2).

Bu çalışmada, vireminin tespitini sağlayan HCV RNA sonuçları altın standart olarak kabul edilirse, ELISA'nın duyarlılığı %83.3, özgüllüğü %77.7, RIBA'nın duyarlılığı %83.3, özgüllüğü %46.2 olduğu görülmektedir.

RIBA ile 55 hastanın 13'ünde kontrol bandının dışında bant reaktivitesine rastlanmamış, negatif olarak değerlendirilmiştir. Pozitif bulunan 42 hastanın 39'unda (%93) kapsid bölgesine ait bantın reaktif olduğu, diğer bantlara çeşitli oranlarda reaksiyon geliştiği saptanmıştır. İndetermine olguya rastlanmamıştır (Tablo 3).

Tartışma

HCV infeksiyonunun tanısı, ELISA ile HCV ve karşı oluşmuş antikorların saptanması sonucu konur. Diğer yöntemler genellikle rutin uygulamalarda kullanılmamaktadır.

Bunun nedeni bu tür yöntemlerin pahalı olması ve ekipmana gereksinim duymasındır. NS-4 bölgesine ait C100-3 rekombinant antijenlerle yapılan 1. Kuşak ELISA yöntemleri, başta otoimmün hastalıklar, alkolik karaciğer hastaları ve uzun süre saklanan veya tropikal bölgelerde yaşayan insanların serumlarında yalancı pozitifliklerin çok fazla görülmesi nedeniyle güvenilirliğini yitirmiş, yerini NS3 ve core bölgesine ait antijenleri de içeren 2. Kuşak yöntemlere bırakmıştır (2-4). NS-5 bölgesinin de eklenmesiyle oluşan 3. kuşak ELISA yöntemleri, daha az yalancı pozitiflik saptanması ve serumların saklanma sürelerinin daha az etkilenmeleri nedeniyle daha duyarlı yöntemlerdir (1). Anti-HCV antikorları, infeksiyondan 6 hafta sonra hastaların ancak %70'inde saptanabilir düzeyde olmaktadır (2). Çalışmamızda, viral hepatit etyolojisi araştırılan ve A, B ve E hepatitine ait serolojik gösterge bulunmayan 55 hastanın 47'sinde (%85) anti HCV saptanmıştır. Anti HCV pozitif 47 hastanın 39'unda (%83) RIBA ile pozitiflik bulunmuştur. Badur ve ark., 1991 yılında 1. kuşak yöntemlerle yapmış oldukları çalışmada; düşük titredeki ELISA pozitifliklerinde (O.D<1) %15, yüksek titredeki ELISA pozitifliklerinde de (O.D>2) %83.3 RIBA ile pozitif sonuç almışlardır. (7). Çolak ve ark.'nın 3. Kuşak yöntemlerle yapmış olduğu benzer bir çalışmada olguların %87.9'unda ELISA pozitifliği saptanmış, bunların %79.2'sinde RIBA pozitif bulunmuştur (8). Yine, Tuncer ve ark.'nın çalışmasında ELISA ile RIBA arasında %80.7 uyum görülmüştür. (9). Yurt dışında Goncales NS ve ark.'nın kan donörlerinde yapmış olduğu çalışmada ELISA pozitif olguların %96.8'inde RIBA pozitifliği saptanmış, %3.2 indetermine olguya rastlanmıştır (10). Yine Tobler ve ark., HCV 3.0 EIA ile pozitif buldukları 245 olgunun 165'ini (%67.3) RIBA-3 yöntemiyle pozitif bulmuşlardır. Aynı çalışmada RIBA-2 ile indetermine bulunan 43 örneğin 32'sinde (%74) ve RIBA-2 ile negatif bulunan 36 örneğin 4'ünde (%11) RIBA-3 ile pozitiflik saptanmıştır (11). RIBA yöntemleri ELISA yöntemi ile alınan sonuçların doğrulanması amacıyla kullanılan analitik yöntemlerdir ve rekombinant HCV antijenlerinin nitroselülöz membran üzerine aktarılmasıyla hazırlanmıştır (2). ELISA'da olduğu gibi 1., 2 ve 3. kuşak RIBA yöntemleri geliştirilmiştir (2). Bu yöntemlerin duyarlılığının ELISA'ya göre daha düşük olduğu belirtilmektedir (4). Yine RIBA'nın ELISA ile düşük pozitif saptanan olgularda negatif veya indetermine sonuç verebildiği belirtilerek bu yöntemin bir doğrulama yöntemi olup olamayacağı sorgulanmaktadır (6,12). Badur ve ark.'nın çalışmasında ELISA ile 490 nm.de optik dansite < 1 olan pozitif hastaların sadece %15'inde RIBA ile pozitif sonuç alınmış, %30 indetermine sonuca rastlanmıştır (7). Yaptığımız çalışmada ELISA ile

pozitif saptanan sonuçların tümünün OD. değeri 1'in üzerinde bulunmuştur. ELISA ve b-DNA ile pozitif bulunan 35 olgunun üçünde (%8.6) RIBA negatif saptanmıştır. Bu nedenle RIBA'nın bir doğrulama yöntemi olup olamayacağı sorgulanmalıdır. RIBA yönteminin analitik özelliği araştırmalarda kullanılabilir. Çalışmamızda RIBA ile 42 hastanın 39'unda (%93) kapsid bölgesine ait bandın reaktif olduğu saptanmıştır. Bu bölgenin (c22-3) antijenik özelliğinin daha fazla olduğu ve daha iyi antikor cevabı oluşturduğu görülmektedir. Bu nedenle, aşı çalışmalarında kullanılabilir bir antijen olabileceği düşünülmektedir.

Hasta serumunda bulunan viral RNA'nın çeşitli yöntemlerle saptanması tanıyı kesinleştirmekte, hastalığın tedavisi ve takibinde kantitatif olarak kullanılabilir. Bu amaçla değişik metodları kullanan çeşitli kitler geliştirilmiştir. PCR'nin yanı sıra ticari olarak, b-DNA (Chiron), Amplicor (Roche) ve NASBA (nükleik acid sequence based amplification-Organon tekniği) gibi hibridizasyon ve amplifikasyon temeline dayalı kitler bulunmaktadır (2,3). Bu yöntemlerle hastalarda serokonversiyon öncesinde pozitifliğin saptanması, anti-HCV pozitifliğin doğrulanması, aktif enfeksiyonun saptanması, hasta tedavi takibinin yapılması mümkün olmaktadır. Ancak bazı hastalarda görülen viremi dalgalanmaları nedeniyle yanlış negatif sonuçlar da alınabilmektedir. Yine, zaman alması ve pahalı olması yöntemin dezavantajlarını oluşturmaktadır. Çalışmamızda b-DNA yöntemi kullanılarak HCV RNA'sı araştırılmıştır. Bu yöntem hibridizasyon temeline dayalı olup, serumda 2×10^5 virüs/ml genomu saptayabilmektedir (3,6). Yöntemin duyarlılığı PCR temelli yöntemlere oranla daha düşüktür (3). Çalışmada ELISA ile pozitif bulunan 47 hastanın 35'inde (%74.5) b-DNA yöntemiyle HCV RNA pozitif bulunmuştur. %25 oranındaki negatif sonucun, yöntemin duyarlılığına ya da düşük düzeydeki viremiye bağlı olabileceği düşünülmektedir. Tuncer ve ark. ELISA ile pozitif saptadıkları 222 olgunun 115'inin (%85.8) HCV RNA'sını pozitif bulmuşlardır (9). Bu oran Çolak ve ark.'nın yapmış olduğu çalışmada %66.7 olarak saptanmıştır (8). Dolayısıyla, viral etyolojisi araştırılan durumlarda anti-HCV pozitifliği saptanan olguların yaklaşık %75'inde viremi saptandığı görülmektedir. Bu çalışmalarda yöntemler ve bu yöntemlerin duyarlılıkları farklıdır. Yine, hastalığın hangi aşamada olduğu bilinmemektedir. Bu nedenle çalışmalarda ELISA ve RIBA'ya ait verilen duyarlılık ve özgüllüğün tartışmalı olduğu düşünülmektedir. Hastalığın erken döneminde ya da immünsüprese hastalarda HCV RNA pozitif, ancak antikor cevabı gelişmemiş olgular duyarlılığı düşürürken, kullanılan moleküler yöntemin duyarlılığı ya da düşük düzeydeki viremi ile seyreden olgular, özgüllüğü etkileyecektir. Çalışmamızda, ELISA ve RIBA ile negatif bulunan 7 hastada (%12.7) HCV RNA pozitif bulunmuştur. Bu sonuca, enfeksiyonun başlangıç döneminde olunması, henüz antikor cevabının gelişmemesi ya da hastanın immün sisteminin baskılanmış olması neden olabilir. HCV enfeksiyonunun laboratuvar tanısı, temel olarak ELISA yöntemi ile rekombinant HCV peptidlerine karşı oluşmuş antikorların saptanması sonucu konulmaktadır. Ancak, klinik olarak viral hepatit etyolojisi düşünülen hastalarda tek başına ELISA negatifliğinin anlamlı olmadığı, ileri araştırmalarının gerekliliği görülmektedir. Yine, ELISA pozitifliğinin gerçek pozitiflik olduğunun araştırılması da gerekmektedir. Bu konuda algoritmalar oluşturulmaya başlanmıştır (5,6). Bu algoritmalar, bölgedeki HCV prevalansının düşük veya yüksek oluşuna göre düzenlenmiştir. Her iki algoritmada da ilk önce ELISA ile anti-HCV taranması esastır. Düşük prevalansa sahip bölgelerde anti-HCV negatifliği kabul edilirken yüksek prevalansa sahip bölgelerde, akut enfeksiyon şüphesi varsa HCV RNA önerilmektedir (5).

Sonuç olarak, HCV enfeksiyonu tanısında öncelikle ELISA ile anti HCV araştırılmalı, pozitif olgularda ya da başka nedene bağlanamayan HCV şüpheli durumlarda ileri araştırmalar (RIBA ve HCV RNA) yapılmalıdır.

KAYNAKLAR

1. Samasti M.: Hepatit C virüsü; Günümüzde Virüs Hepatitleri, "Yücel A, Tabak B (ed). Yayın No: 11, s 10-11, 1998, İstanbul Bulaşıcı Hastalıklarla Savaş Derneği, İstanbul.
2. Serter D.: C Tipi Viral Hepatit; Virüs Riketsiya ve Klamidya Hastalıkları kitabında, s 195-201, 1997, Nobel Tıp Kitabevleri Ltd Şti, İstanbul.

3. Abacıoğlu H: Hepatit C Virüsü, "S. Ustaçelebi (ed), Temel ve Klinik Mikrobiyoloji 1. Baskı" kitabında s 881-888, 1999, Güneş Kitabevi Ltd. Şti. Ankara.
4. Öztürk R.: Virüs Hepatitlerinin Laboratuvar Tanımı, "Yücel A, Tabak B (ed)" Yayın No: 11, s 61-64, 1998, İstanbul Bulaşıcı Hastalıklarla Savaş Derneği, İstanbul.
5. Thomas DL, Lemon SM: Hepatitis C, "Mandel GL, Bennet JE, Dolin R (ed)" Mandel Douglas and Bennet's Principles and Practice of Infectious Disease, Fifth ed. p 1737-1759, 2000, by Churchill Livingstone.
6. Türkođlu S: Viroloji ve Seroloji, "Kılıçturgay K, Badur S (ed.)" Viral Hepatit 2001, 1. Baskı, s 182-192, 2001, Viral Hepatitle Savaşım Derneği.
7. Badur S, Ağaçfıdan A, Yılmaz G, Türkođlu S ve ark.: HCV İnfeksiyonlarının Tanısında Birinci Jenerasyon ELISA ve "Recombinant Immunoblot Assay" (RIBA) Testleri ile Elde edilen Bulguların Karşılaştırılması. Klimik Dergisi 1991; 4(2): 68-71.
8. Çolak D, Öđünç D, Gültekin M, Er D, Mutlu G: Hepatit C Virüsü (HCV) İnfeksiyonunun Tanısında Enzim İmmuassay (EIA), Immunoblot (IB) ve Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Yöntemlerinin Karşılaştırılması. Viral Hepatit Dergisi 1998, 4 (1): 5-8.
9. Tuncer S, Özkuyum C, Arıkan S ve ark.: PCR ve Hepatit C Virüs Genotipi ile Serolojik Reaktivite Arasındaki İlişkinin Deđerlendirilmesi. Viral Hepatit Dergisi 1996, 2(1): 10-18.
10. Goncales NS., Costa FF., Vassallo J., Goncales FL Jr. Diagnosis of hepatitis C virüs in Brazillian blood donors using a reverse transcripase nested polymerase chain reaction: Compharison with enzyme immunoassay and recombinant protein immunoblot assay. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo, 2000, Sep-Oct; 42 (5): 263-7.
11. Tobler LH, Lee SR, Stramer SL, Peterson J, at al. Performance of second and third-generation RIBAs for confirmation of third-generation HCV EIA-reactive blood donations. Transfusion 2000 Aug; 40(8): 917-23.
12. Cecille A, Wendling MJ, Panabieres O, Gut JP. Retrospective study of the value of the RIBA-3 test in 68 patients with discordant serologies with regard to hepatitis C obtained with third generation ELISA tests. Is there still a value in RIBA-3. Pathol Biol (Paris) 1999 May; 47 (5): 508-11.