

HEPATİT C VİRUSU İNFEKSİYONUNUN TANISINDA TİCARİ BİR KİT (AMPLICOR HCV) İLE NESTED PCR'İN KARŞILAŞTIRILMASI

Salih Türkoğlu, Mürvet Bozaci, Banu Bayraktar, Ayfer Ataysağın, Selim Badur

ÖZET

Hepatit C virusu (HCV) infeksiyonlarında RT-PCR, vireminin gösterilmesi için başvurulabilecek en önemli tekniktir.

Bu çalışmada, bilim dalımızda uygulanmakta olan tek tüp nested RT-PCR ile, Roche tanı sistemlerinin geliştirtiği HCV-PCR kiti (Amplicor (TM)HCV, Roche Diagnostics) 71 kronik hepatitli olgunun serumları kullanılarak karşılaştırılmıştır. Bu amaçla 54 anti-HCV pozitif ve 17 negatif serum örneği test edilmiştir. Her iki teste 47 serum örneği pozitif, 16 serum örneği negatif bulunmuştur. Sekiz serum örneği yalnızca nested RT-PCR'la pozitif sonuç vermiştir ve kullandığımız nested-PCR'in Roche kitine göre daha duyarlı olduğu sonucuna varılmıştır.

Anahtar kelimeler: Nested RT-PCR, HCV-RNA, Amplicor HCV, HCV-PCR

SUMMARY

Comparison of a commercial assay (Amplicor HCV) with nested PCR in the diagnosis of hepatitis C virus infection.

RT-PCR is the most significant assay for detection of circulating viral RNA in Hepatitis C virus infection. In this study we compared our single tube nested RT-PCR assay with a commercial HCV-PCR kit (Amplicor (TM)HCV, Roche Diagnostics) for detection of HCV-RNA in sera from 71 chronic hepatitis patients. 54 anti-HCV positive and 17 negative sera were tested in both HCV PCR's. 47 sera were positive and 16 sera negative in both assays. Eight sera were positive only in the single tube nested PCR. In conclusion, we found that our in-house nested PCR is more sensitive than the Roche kit.

GİRİŞ:

Hepatit C virusu (HCV) parenteral yolla bulaşan ne-A, ne-B hepatitlerinin en önemli etkenidir (1). İnfeksiyonun tanısı sıkılıkla HCV genomunun klonlanmasıyla elde edilen antijenlerin kullanıldığı ELISA ve RIBA (Recombinant Immunoblotting Assay) testleriyle virusa spesifik antikorlar gösterilerek konur (2). Serolojik tanının duyarlılığı ve özgüllüğü anti-HCV saptayan ikinci ve üçüncü kuşak testlerle önemli ölçüde artmıştır. Ancak infeksiyonun erken evrelerinde hastaların seronegatif oluşu, serokonversiyonun bazı olgularda uzun sürede gerçekleşmesi, HCV antijenini ve virus replikasyonunu gösteren serolojik testlerin olmaması, antikor özgüllüğünün gösterilmesinin gereklmesi ve doğrulama testlerinde karşılaşılan "indeterminate" bulguların yorumlanmasıının güçlüğü serolojik testlerin

tanıdaki yerini sınırlamaktadır. Bu noktada RT-PCR ile HCV-RNA saptanması ve miktarının belirlenmesi viremi ile ilgili başvurulabilecek en önemli teknik olduğu gibi serolojik tanımı da doğrulayıcı özellik taşımaktadır. Bununla birlikte PCR'in aşırı duyarlı olması test örneklerinin kontaminasyonuna bağlı yalancı pozitifliği artırır. Şu an uygulanan biçimde HCV-RNA PCR'ı karmaşık, zaman alıcı, fazla işgücü gerektiren ve pahalı bir testtir. Yakın zamanda Roche tanı sistemleri (Roche diagnostic systems) ticari bir HCV PCR kiti (Amplicor HCV) geliştirmiştir (8). Bu kit reverse transkripsiyon ve polimeraz zincir reaksiyonu için tek bir termostabil enzimin kullanıldığı basit bir RT-PCR prosedürüyle çalışmaktadır. Kitin içerisinde kolorimetrik mikrokuyucuk hibridizasyon testi ile amplikon tısnmasına bağlı yalancı pozitif reaksiyonları önleyen

Urasil N glikozilaz (UNG)-dUTP antikontaminasyon sistemi bulunmaktadır. Biz çalışmamızda tek tüp nested-PCR deneyi ile Roche kitini kronik hepatitli hastaların serumlarını kullanarak karşılaştırdık.

GEREÇ VE YÖNTEM:

Serum Örnekleri:

Yetmiş bir kronik hepatitli hastadan alınan serum örnekleri uygun steril tüpe alınarak deney yapılincaya kadar -20°C de saklanmıştır.

HCV Serolojisi:

Ticari ikinci kuşak ELISA testi ile serumlarda anti-HCV (Sanofi HCV) aranmış, pozitif sonuçlar ikinci kuşak recombinant immunoblotting testi (RIBA, Ortho Diagnostics) ile doğrulanmıştır.

HCV-RNA eldesi:

HCV-RNA tek aşamalı asit guanidyum tiosiyantan-fenol-kloroform metoduyla (RNazol B) ekstrakte edilmiştir. Bu amaçla 100 µl serum, 900 µl.RNazol B ve 100 µl. kloroform ile karıştırılmış ve ekstraksiyon üretici firmanın önerilerine göre sürdürülmüştür. Son olarak RNA çökeltisi 20 µl. DEPC ile muamele edilmiş ve distile suda çözülmüştür.

RT-PCR:

Revers transkripsiyon 10 µl. denatüre edilmiş RNA (70°C de 5 dk.), 400 µM dATP, dCTP, dGTP ve dTTP, 10 U RNase inhibitörü, 10 mM DTT, 50 mM Tris-HCl pH 8,3 , 75 mM KCl, 2 pM dış antisans primer (SR1) ve 200 U Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase (Gibco BRL) ile 37°C de 1 saat bekletilerek gerçekleştirilmiştir. Sonra revers transkriptazı inaktive etmek için 95°C de 5 dk. ısıtılmış ve revers transkripsiyon ürününün 5 µl. si, 10 mM Tris-HCl pH 8,2, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 1,25 unite Taq DNA polimeraz (Boehringer Menheim) ve 1pM dış antisans ve sans primer (SR1 ve SF1) içeren toplam 50 µl. hacimli PCR tamponuyla karıştırılarak birinci aşama PCR için hazırlanmıştır (35 siklus: denatürasyon 94°C de 1 dakika, hibridizasyon 55°C de 1 dakika ve uzama 72°C de 1 dakika). İkinci PCR'da aynı tüpte ve tamamıyla yukarıdaki yöntem uyarınca gerçekleştirilmiştir. Farklı olarak ikinci PCR aşamasında birinci PCR ürününün iç bölgesinden (internal) primerler kullanılmıştır (SR2 ve SF2). Değerlendirme için 10 µl.lik PCR ürünü % 1,5'luk agaroz jel elektroforezinde yürütülmüş ve bantlar UV transilluminatörde 302 nm

de incelenmiştir.

Amplicor HCV PCR deneyi:

Amplicor HCV PCR testi üreticinin önerilerine uygun olarak yapıldı.

SONUÇLAR:

54 anti-HCV pozitif ve 17 negatif serum her iki HCV PCR'ı ile test edildi (Tablo 1). 47 serumda (44 anti-HCV pozitif, üç anti-HCV negatif) her iki deneye pozitiflik saptandı. 16 serum örneği (14 anti-HCV negatif, iki anti-HCV pozitif) her iki testle negatifti. Sekiz serum örneği (yedi anti-HCV pozitif ve bir negatif) her iki PCR'la ikişer kez test edildi ve yalnızca tek tüp nested PCR'la pozitif sonuç verdi. Nested PCR'la ilk test edildiğinde negatif bulunan (iki anti-HCV pozitif, bir negatif) üç serum örneği tekrarlanan testlerde pozitif sonuç verdi. Yine, önce pozitif bulunan (bir anti-HCV pozitif ve bir negatif) iki örnek tekrarlanan testlerde negatif sonuç verdi. İlk test edildiğinde negatif olan, hepsi de anti-HCV pozitif olan beş örnek Roche kiti ile tekrar test edildiğinde pozitif sonuç verdi.

Tablo 1 . Nested PCR ve Amplicor HCV karşılaştırılmasının sonuçları

	nested	PCR
	Pozitif	Negatif
Amplicor	47 ¹	-
Pozitif		
HCV	8 ²	16 ³
Negatif		
¹ anti-HCV (+) 44	² anti-HCV (+) 7	³ anti-HCV (-) 14
anti-HCV (-) 3	anti-HCV (-) 1	anti-HCV (+) 2

TARTIŞMA:

HCV-RNA PCR'ı HCV infeksiyonlarının tanısında ve tedavinin takibinde yaygın olarak kullanılmaktadır. HCV ile infekte bireylerin serum ve karaciğerlerinde HCV nükleik asidini, duyarlılığı 1-5 genom molekülü olan bu teknikle belirlemek mümkündür. Yüksek duyarlılığı nedeniyle PCR sıklıkla amplikon taşınmasına bağlı yanlış pozitif sonuç verebilir. Bununla birlikte, en duyarlı tekniklerle bile infeksiyonun her evresinde HCV-RNA serumda saptanamayabilir. Hedef nükleik

asit miktarının azlığı yalancı negatifliğe yolaçabilir. Çeşitli ulislardan 31 laboratuvarın katıldığı çok merkezli bir HCV-RNA PCR kalite kontrol çalışmasının sonuçları yakın zamanda yayınlanmıştır (5). Yalnızca 5 laboratuvarın (%16) tüm paneli hatasız olarak tamamlaması cesaret kırıcı olmuştur. Benzer bir çalışma Fransa'da 9 laboratuvar arasında yapılmış; HCV-RNA saptanmasında revers nested PCR kullanılmıştır (3). Laboratuvarlarda 3 farklı panel test edilmiştir. Birinci panel tamamlandığında laboratuvarlar kendi PCR prosedürlerinde bazı değişiklikler yapmışlar, ikinci ve üçüncü panelde standardize reaktif ve prosedürleri kullanarak çok daha iyi sonuçlar elde etmişlerdir. Bu da HCV-RNA PCR tekniklerinin standartizasyonunun ve optimizasyonunun mümkün olduğunu göstermektedir. 1994 yılında Wolfe ve arkadaşları (7) 294 kişilik hasta grubunda Roche kiti ile nested PCR sonuçlarını karşılaştırmışlar; nested PCR'la dokuz, Roche kitiyle sekiz fazla pozitiflik saptamışlardır. Nested PCR'la elde ettikleri bazı pozitifliklerin kontaminasyona bağlı yanlış pozitiflik olduğu ve Roche kitinin daha duyarlı olduğu sonucuna varmışlardır. Tilston ve arkadaşları (9) benzer bir çalışmada nested PCR ile üç tane daha fazla pozitiflik saptamıştır.

Bu çalışmada yedisi anti-HCV pozitif, biri negatif sekiz örneği tek tüp nested PCR'la pozitif saptadık ve bunun Roche kitine göre daha duyarlı olduğu sonucuna vardık. Roche kitiyle karşılaşıldığında nested PCR'in amplikon taşınmasına bağlı yanlış pozitifliği daha açık olduğu muhakkaktır. Ancak çalışmamızda tüm pozitif sonuçlar en az iki kez tekrarlanarak elde edilmiştir. Kontaminasyonu engellemek için tüm kuralara titizlikle uyulmuş(6), ayrıca Kicthen ve Bootman'ın (4) önerdiği gibi negatif kontroller PCR prosedürüne eklenmiştir. Her iki PCR prosedürüyle eşit oranda uyumsuz sonuçlar elde ettik. Bu, çalışmanın başlangıcında, Roche kitiyle-özellikle ekstraksiyon prosedürüyle-deneyimsiz olmamıza bağlanabilir. Anti-HCV ve nested PCR pozitif, Roche kitiyle negatif bul-

duğumuz beş örnek Roche kitiyle yeniden çalışıldığında pozitif sonuç vermiştir.

Sonuç olarak nested PCR kadar duyarlı olmasa da, Roche kiti basit olması ve amplikon kontaminasyon riskinin azlığı gibi büyük avantajlara sahiptir. HCV infeksiyonlarının tanısında rutin kullanım için bir teste ihtiyaç vardır ve Amplicor HCV bunun için uygun görülmektedir. Bununla birlikte, maliyetin yüksekliği özellikle Türkiye gibi ülkeler için önemli bir sorundur.

KAYNAKLAR:

1. Choo Q-L, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradly D. W, Houghton M: Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 1989; 244: 359-362
2. Kuo G, Choo Q L, Alter H J, et al An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A, non-B hepatitis. *Science* 1989; 244: 362-364
3. French Study Group for the Standardization of hepatitis C virus PCR. Improvement of hepatitis C virus RNA polymerase chain reaction through a multicentre quality control study. *J Virol Meth.* 1994; 49:79-88
4. Kitchin PA, Bootman JS. Quality control of the polymerase chain reaction. *Rev Med Virol.* 1993; 3: 107-14
5. Zaaijer HL, Cuypers HT M, Reesink HW, Winkle IN, Gerken G, Lelie P N. Reliability of the polymerase chain reaction for detection of hepatitis C virus. *Lancet* 1993; 341: 722-724
6. Kwok S, Higuchi R. Avoiding false positives with PCR. *Nature* 1989; 339: 237-238
7. Wolfe L, Tamatsukuru S, Sayada C, Ryff JC: Detection of HCV DNA in serum using a single-tube, single enzyme PCR in combination with a colorimetric microwell assay. "Hepatitis C virus" kitabında s 83, 1994, GEM-HEP, John Libbey Eurotext, Paris.
8. Young KKY, Resnick RM, Myers TW: Detection of hepatitis C virus RNA by a combined reverse transcription-polymerase chain reaction assay. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 882-886.
9. Tilston P, Morris DJ, Klapper PE, Corbitt G: Commercial assay for hepatitis C virus RNA. *Lancet* 1994; 344, 201-202.