

PCR VE HEPATİT C VIRUS GENOTİPİ İLE SEROLOJİK REAKTİVİTE ARASINDAKİ İLİŞKİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Serdar Tuncer*, Cumhuri Özkuyumcu*, Sevtap Arıkan*, Fiona Davidson**, Eddie A. Follett****, Y. Hakan Abacıoğlu***, Şemsettin Ustaçelebi*

ÖZET

Nükleik asit dizilim homolojilerine göre farklı HCV genotiplerinin varlığı gösterilmiş ve bugüne kadar moleküler teknikler kullanılarak çeşitli sınıflandırma sistemleri tarif edilmiştir. Bu çalışmada, 2.kuşak ELISA ile anti-HCV antikorları pozitif bulunan serum örneklerinde RT-PCR ve RIBA testlerinin sonuçlarının karşılaştırılması ve RIBA band paterninin HCV genotipi ve RT-PCR ile olan ilişkisinin araştırılması amaçlanmıştır. ELISA testi ile HCV antikor pozitif 222 serum örneğinin (çoğunluğu yüksek risk grubu hastalardan), 2.kuşak RIBA testi ile 179'u pozitif, 40'ı belirsiz ve 3'ü negatif saptanmıştır. Serum örneklerinden 134'ü virusun 5'NCR bölgesine özgül primerler kullanılarak RT-PCR ile analiz edilmiş ve 115'i (%85.8) pozitif bulunmuştur. RT-PCR sonucu ile serolojik profil ve/veya tek başına RIBA band reaktivitesi arasında anlamlı bir ilişki tespit edilmemiştir. RT-PCR pozitif 58 örnekten yapılan genotiplendirmede sırasıyla, 12'si (% 21) tip 1a, 42'si (% 72) tip 1b, 3'ü (% 5) tip 2, 1'i (% 2) tip 4 olarak saptanmıştır. Tip 1a ve tip 1b örnekleri ile 5-1-1 ve c100 antijenlerine karşı oluşan reaksiyonlar arasında istatistiksel anlamlı fark tespit edilmiştir ve tip 1b örnekler bu antijenlerle daha az reaksiyon vermiştir. Tip 1a ve 1b arasında c33 ve c22 antijenleri ile olan reaksiyonları açısından fark saptanmamıştır. Sonuç olarak, farklı HCV genotipi ile infekte olan hastaların serolojik profillerinin farklı olabildiği saptanmakla birlikte RIBA testleriyle elde edilen serolojik profil ile viremi varlığı arasında belirgin bir ilişki bulunmamıştır.

Anahtar Kelimeler: Hepatit C, ELISA, RIBA, PCR, Genotip

SUMMARY

The relation of serological reactivities with HCV-PCR result and genotypes

On the basis of nucleotide sequence homology HCV has been classified into genotypes with respect to a number of different criteria and nomenclature systems. In this study 2nd generation anti-HCV ELISA positive serum samples (mostly obtained from high risk patients) were analyzed to investigate the relation of RIBA band profiles with RT-PCR and HCV genotypes. Of 222 ELISA positive serum samples 179 positive, 40 indeterminate and 3 negative results were obtained by 2nd generation RIBA. Out of 222, 134 samples were analysed by RT-PCR, 115 (85.8 %) of which gave positive results by using the primer sets designated from 5'-NCR region of the viral genome. No significant association between RT-PCR result and RIBA band pattern and/or single band reactivity was found. By genotyping of RT-PCR positive 58 samples, 12 (21%), 42 (72%), 3 (5%) and 1 (2%) of the samples were identified as type 1a, 1b, 2 and 4 respectively. Reactivity of type 1a and type 1b samples with 5-1-1 and c100 antigens yielded a significantly lower value for type 1b samples compared to that of type 1a. The difference between the reactivity of type 1a and 1b with c33 and c22 was not significant. In conclusion, although patients infected with different HCV genotypes have distinct serological profiles, there was no significant relation between RIBA band pattern and viremia.

* Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara

** Edinburgh and South East Scotland Regional Blood Transfusion Service, Edinburgh

*** Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir

**** SNBTS Microbiology Reference Unit, Regional Virus Lab., Ruchill Hospital, Glasgow

Not: Bu çalışma kısmi olarak 20-22 Temmuz 1995 tarihleri arasında İstanbul'da düzenlenen "Recent Advances in the Diagnosis of Viral Diseases" isimli FEMS Simpozyumunda (poster no:43) bildirilmiştir.

GİRİŞ

Hepatit C virusları (HCV) toplumdan kazanılmış post-transfüzyonel ve sporadik non-A, non-B (NANB) hepatitlerinin en önemli etyolojik ajanlarıdır ve hepatosellüler karsinoma patogenezinde direkt rolleri olduğu öne sürülmektedir. Akut HCV enfeksiyonu geçiren olguların yarısından fazlasında kronik hepatit gelişir ve bunun spontan kür olma oranı %2'nin altındadır (1,2). Moleküler biyolojik tekniklerle saptanmasını izleyen son birkaç yıl içinde virusun yapısı ayrıntılı olarak tanımlanabilmiş ancak biyolojik ve epidemiyolojik özellikleri halen tam olarak aydınlatılmamıştır.

Bugün HCV enfeksiyonu tanısı, viral proteinlere karşı oluşan antikorların (1.kuşak testlerde: C100 veya 5-1-1, 2.kuşak testlerde: ek olarak c22, c33 antijenlerine karşı) serumda gösterilmesi veya viral RNA'nın in vitro nükleik asit amplifikasyon teknikleri kullanılarak saptanmasına dayanmaktadır (3). Virusa özgül antikorların ELISA yöntemi ile gösterilmesini takiben farklı viral protein epitoplarına karşı oluşan antikorların ayrı ayrı saptanmasını sağlayan rekombinant immunoblotting (RIBA) yöntemi ile doğrulama işlemi gerçekleştirilebilmektedir. Serumda veya hepatositlerde viral antijenin saptanmasına ilişkin birkaç çalışma vardır ancak, henüz antijen saptanmasında kullanılacak rutin bir yöntem mevcut değildir (4,5). Viral RNA'nın saptanması ve vireminin gösterilmesi bugün sadece polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) veya NASBA gibi in vitro nükleik asit amplifikasyon yöntemleri ile gerçekleştirilebilmektedir (3).

İlk defa 1989 yılında rekombinant olarak elde edilen bir viral protein (5-1-1) kullanılarak gerçekleştirilen ELISA yönteminin tarif edilmesini izleyen seneler içinde, farklı viral proteinler de yöntem eklemiş ve testlerin duyarlılığı artırılmıştır (6,7). Yapılan çalışmalarla, özgül antikorların saptanması ile NANB enfeksiyonunun klinik tanısı arasında % 90'ın üzerinde uyumluluk olduğu gösterilmiştir (7,8).

Nükleik asit dizilim homolojilerine göre farklı HCV genotiplerinin varlığı gösterilmiş ve moleküler teknikler kullanılarak çeşitli sınıflandırma sistemleri tarif edilmiştir. Tiplendirme yöntemleri olarak; tipe özgül primerlerle amplifikasyon, amplikonların nükleik asit diziliminin çıkarılması veya amplikonların "restriction fragment length polymorphism" (RFLP) analizi tanımlanmıştır (9,10). Son olarak bu konuda çalışan araştırmacıların fikir birliğine varmaları ile ortak bir sınıflandırma sistemi öne sürülmüş ve kabul edilmiştir.

Öne sürülen bu sınıflandırma sistemine göre HCV tipleri 6 ana grup ve ek 6 alt grupta (1a, 1b, 2a...) toplanmıştır (11).

Bazı HCV genotipleri dünya üzerinde yaygın olmakla birlikte (tip 1, 2, 3) diğerleri sadece belirli bölgelerde saptanabilmektedir (10,12). Tip dağılımını belirlemenin aşı geliştirme çalışmalarına katkısı vardır. Bunun yanı sıra, farklı HCV genotiplerinin klinik seyri ve interferon tedavisine yanıtının anlamlı derecede farklı olması nedeniyle tanılmal amaçlı tiplendirme yapılması gerekliliğini destekleyen çalışmaların sayısı gittikçe artmaktadır (13,14).

Bu çalışmada, 2. kuşak ELISA ile anti-HCV antikorları pozitif bulunan serum örneklerinde "reverse transcription-PCR" (RT-PCR) ve RIBA testlerinin sonuçlarının karşılaştırılması ve RIBA band paterninin HCV genotipi ve viremi ile olan ilişkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Serum örnekleri ve serolojik testler. Hacettepe Üniversitesi Hastaneleri Klinik Patoloji Laboratuvarı'nda 1991-1994 yılları arasında 2. kuşak ELISA kiti (Abbott) ile HCV antikor pozitifliği saptanan 222 serum örneği çalışmaya alınmıştır. Serumların 116'sı yüksek risk grubundaki hastalara (79 böbrek transplantasyonu ve 37 hemodializ hastası), 42'si kronik karaciğer hastasına (9'u hemodializ hastası), 7'si akut NANB hepatitli hastaya, 6'sı kan donörü, 3'ü kronik böbrek yetmezliği ve 2'si hemofili hastasına aittir. Elli beş serumun ise klinik bilgilerine ulaşılamamıştır. Bütün örnekler dondurup çözme işleminin sonuçları olumsuz etkilememesi için küçük hacimlere bölünerek, seroloji ve PCR analizleri yapılana kadar -20°C'de saklanmıştır.

Serum örneklerinde 2. kuşak RIBA (RIBA-2, Chiron) testi ile nitroselülöz şeritler üzerinde 5-1-1, c100, c33 ve c22 rekombinant viral antijenlere karşı oluşan antikorlar tayin edilmiştir. RIBA-2 bandları, farklı düzeyde insan IgG'lerini saptayan iki adet kontrol bandının yoğunluğuna göre negatif (-) ve reaktif [1-4(+)] olarak değerlendirilmiştir. RIBA-2 testi sonucunda reaktif band mevcut olmadığında negatif, iki ve daha yüksek sayıda band reaktifliğinde pozitif, 1+ veya daha yüksek reaktivitede band mevcut ancak pozitif kriterine uymuyorsa belirsiz ("indeterminate") olarak değerlendirilmiştir. Yanlış pozitifliği değerlendirmek için kullanılan ve her şerit üzerinde bulunan insan süperoksit dismutaz (SOD) band reaktivitesi de kontrol edilmiştir.

Ayrıca 222 örnekten 85'i, sentetik HCV peptid antijenlerini içeren başka bir 2. kuşak ELISA testi (UBI-HCV-EIA) ile anti-HCV varlığı yönünden değerlendirilmiştir. ELISA testleri üretici firmaların önerileri doğrultusunda uygulanmış ve yorumlanmıştır.

RT-PCR. RIBA-2 sonucu pozitif 111, belirsiz saptanan 21 ve negatif olarak değerlendirilen 2 olmak üzere toplam 134 serum örneği viral RNA varlığı yönünden cDNA sentezi gerçekleştirildikten sonra "nested-PCR" yöntemi ile analiz edilmiştir. Kalan 88 serum örneği uygun olmayan koşullarda transport edildiklerinden veya yetersiz miktarda oldukları için PCR analizine alınmamışlardır. PCR işlemlerinde kullanılan primerler viral genomun korunmuş ("conserved") 5'-NCR (kodlama yapmayan) bölgesine özgül seçilmiştir (15). RNA saflaştırması ile cDNA sentezi ve 1. ile 2. tur amplifikasyonlar Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı içinde farklı laboratuvarlarda gerçekleştirilmiştir. Her RT-PCR çalışmasına başlangıçtan itibaren pozitif ve negatifliği bilinen birer serum örneği, ara basamaklarda ise RNA veya DNA içermeyen reaksiyon karışımları kontrol olarak dahil edilmiştir.

RNA saflaştırması ve cDNA sentezi. "Acid-guanidium thiocyanate-phenol-chloroform" yöntemi ile 200µl serum RNA saflaştırılması işlemine alınmıştır. Serum örneğinin 500 µl denatürasyon solüsyonu (4M guanidine isothiocyanate, 50 mM Tris-HCl pH:7.5, 25 mM EDTA, %0.5 (wt/vol) sarcosyl, 0.1M β-mercaptoethanol, 1 mg/ml tRNA ve 0.1 ünite RNase inhibitörü (Boehringer) ile inkübasyonunu takiben fenol-kloroform ekstraksiyonu ve etanolde presipitasyonu yapılmıştır. Elde edilen RNA çökeleği 20 µl diethylpyrocarbonate (DEPC)-muamele edilmiş su ile süspansiyon edilmiştir (16). Hazırlanan RNA'dan 10 µl'si 200 ünite murine Moloney leukemia virus-MMLV reverse transkriptaz (Pharmacia) ile 20 mM tris-HCl pH:8.4, 2.5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 10 mM DTT, 100 pmol random hexamer [pd(n6)] (GIBCO), her dNTP'den 10 mM (Promega) ve 0.2 ünite RNase inhibitörü içeren 20 µl karışım içinde önce 37°C'de 60 dakika daha sonra 95°C'de 10 dakika bekletilerek cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir (15).

Nested-PCR. Birinci tur amplifikasyon, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH:8.3, 2.5 mM MgCl₂, 20 pmol dış set primerler (939: 5' CTGTGAGGAAC-TACTGTCTT 3', 209: 5' ATACTCGAGGTGCACGGTCTACGAGACCT 3'), 1 ünite taq polimeraz (Promega) ve 10 µl elde edilen cDNA ürününü içeren top-

lam 100 µl'lik karışım içinde gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon karışımları "thermal cyler" içinde (Model 480, Perkin-Elmer Cetus) 36 saniye-94°C, 42 saniye-52°C ve 2 dakika-72°C basamaklarından oluşan 25 döngüye alınmıştır. Birinci tur amplifikasyon ürününden 2 µl'si dış set yerine iç set primerler (940: 5' TTCACGCA-GAAA GCGTCTAG 3', 211: 5' CACTCTCGAG-CACCC TATC AGGCAGT 3') ve 200 µM dNTP eklenen 1. tur reaksiyon karışımı içinde yukarıdaki ısı basamaklarını içeren ikinci tur amplifikasyonuna alınmıştır (12). Amplifikasyon sonuçları, 2. tur amplifikasyon ürününden 10 µl'sinin %2'lik agaroz jelde elektroforezi ve etidyum bromid boyamayı takiben 251-baz çiftlik bölgeye karşılık gelen bandın UV transiluminatör altında aranması ile analiz edilmiştir (Şekil 1).

Genotiplendirme. RT-PCR sonucu pozitif saptanan örneklerden 58'inin 2. tur amplifikasyon ürünleri RFLP yöntemi kullanılarak tiplendirilmiştir. Amplifikasyon ürününden 25 µl'si a) Hae III ve Rsa I; b) *Hinf I* ve *Mva I*; c) *Scr FI* veya d) *Bst UI* restriksiyon enzimleri ile uygun olan 10X enzim reaksiyon karışımı ve ısıda bir saat inkübe edilmiştir. Amplikonların restriksiyon enzimleriyle kesimi sonrası oluşan bandlar 0.5 µg/ml etidyum bromid içeren %4'lük metafor agaroz (FMC Bioproducts) veya %12'lik poliakrilamid jelde elektroforez sonrası UV ışık altında analiz edilmiştir. Oluşan band paternleri ve bandların büyüklüğü McOmish ve ark. tarafından belirlenen tiplendirme analizi ile değerlendirilerek tip tayini gerçekleştirilmiştir (12).

İstatistik analizler. İstatistik analizlerde "SPSS (Statistical Package for Social Sciences) for Windows" paket programında ki-kare (Beklenen sayılar 5'ten küçük ise Fisher kesin ki-kare) ve Mann-Whitney U testi kullanılmış ve P değeri 0.05 altında (p<0.05) saptandığında fark anlamlı kabul edilmiştir.

BULGULAR

Serolojik testler. ELISA (Abbott) testi ile HCV antikor pozitifliği saptanan 222 örneğin, RIBA-2 testi ile 179'u pozitif, 40'ı belirsiz ve 3'ü negatif saptanmıştır. ELISA pozitifliği saptanan serum örneklerinin ait oldukları hasta grubuna göre RIBA-2 sonuçları Tablo 1'de özetlenmiştir. HCV antijenlerine karşı oluşan serolojik profillerin dağılımları Tablo 2'de verilmiştir. Sadece bir örnekte SOD antijenine karşı zayıf reaksiyon [1(+)] altında saptanmış, reaktif olarak değerlendirilmemiştir.

Tablo 1 Anti-HCV ELISA pozitif serum örneklerinin RIBA-2 sonuçları ve ait oldukları hastaların klinik tanılarına göre dağılımları #

	Pozitif	Belirsiz	Negatif	Toplam
Renal Transplant	61	18	-	79
Hemodiyaliz*	33	4	-	37
Kronik karaciğer hastalığı	26	6	1	33
Akut NANB hepatit	7	-	-	7
Kan vericisi	3	2	1	6
Kronik böbrek yetmezliği	3	-	-	3
Hemofili	2	-	-	2
Bilinmeyen	44	10	1	55
Toplam	179(%80.6)	40(%18.0)	3 (%1.4)	222

*Dokuzu kronik karaciğer hastası

Hasta grupları arasında pozitif sonuç yönünden istatistiksel fark bulunamamıştır (p=0.260, $\chi^2=8.898$)

Tablo 2. RIBA-2 pozitif ve belirsiz sonuç alınan 132 örneğin RIBA band reaktiviteleri ve RT-PCR sonuçlarının dağılımları #.

	RIBA band reaktiviteleri				Toplam	PCR	
	5-1-1	c100	c33	c22		pozitif	negatif
+	+	+	+	+	62	57	5
-	-	+	+	+	24	21	3
-	+	+	+	+	10	8	2
+	-	+	+	+	7	5	2
+	-	+	-	-	4	3	1
-	+	+	-	-	2	2	-
-	+	-	+	-	2	1	1
Toplam pozitif RIBA sonucu					111	97(%87)	14
-	-	-	+	+	13	11	2
-	-	+	-	-	6	4	2
-	+	-	-	-	1	1	-
+	-	-	-	-	1	1	-
Toplam belirsiz RIBA sonucu					21	17(%81)	4

#RIBA band profili ve PCR pozitif sonuçlar yönünden gruplar arasında istatistiksel fark bulunmamıştır (Fisher kesin ki-kare, $p>0.05$). Çokgözlü ki-kare, RIBA pozitif grup: $p=0.3536$, $\chi^2= 6.658$, RIBA belirsiz grup: $p=0.707$, $\chi^2= 1.378$.

HCV antikor pozitifliği ELISA (Abbott) ile saptanan 85 örnekten 7'si UBI-HCV-EIA testi ile negatif bulunmuştur. UBI-HCV-EIA ile negatif olduğu saptanan 7 örnekten 5'i RIBA-2 belirsiz (sadece c33 band reaktivitesi), ikisi pozitif (c33'e ek olarak c100 veya 5-1-1 band reaktivitesi) sonuç vermiştir. Bu test ile pozitif saptanan 78 örnekten 13'ü RIBA belirsiz sonuç vermiştir.

RT-PCR. RT-PCR testi sonucunda 134 örneğin 115'inin HCV-RNA içerdiği saptanmıştır. Serum ör-

neklerinin: ait oldukları hasta grubu ve RIBA yorumuna göre RT-PCR sonuçları Tablo 3'de verilmiştir. Hasta grupları arasında RIBA-2 pozitif ve belirsiz sonuç alınan 132 örneğin RIBA-2 antijen reaktiviteleri ile RT-PCR sonuçları Tablo 2'de özetlenmiştir.

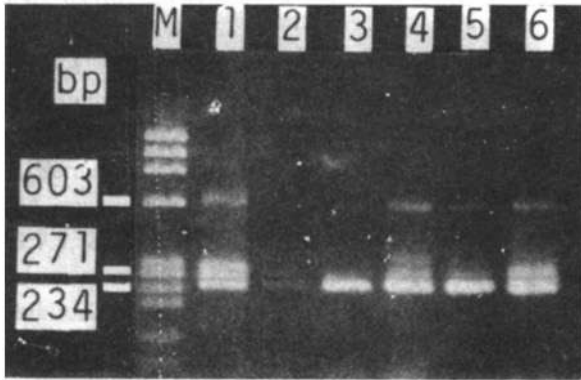
RIBA-2 belirsiz ve RT-PCR negatif 4 örnekte 5-1-1 ve c100 antijenlerine karşı antikor saptanmamıştır. RT-PCR pozitif 114 örneğin c22 ve c33 antikor pozitifliği sırasıyla %91 ve %90, 5-1-1 ve c100 antikor pozitifliği %68 ve %66 oranlarında saptanmıştır (Şekil

Tablo 3. Ait oldukları hasta grubuna göre RIBA-2 ve RT-PCR sonuçlarının dağılımları#.

	RIBA						Toplam
	Pozitif		Belirsiz		Negatif		
	PCR(+)	PCR(-)	PCR(+)	PCR(-)	PCR(+)	PCR(-)	
Renal transplant	41	3	12	1	-	-	57
Hemodiyaliz*	18	6	1	-	-	-	25
Kronik karaciğer hastalığı	19	1	3	1	-	-	24
Akut NANB hepatit	3	2	-	-	-	-	5
Kan donörü	3	-	1	1	-	1	6
Kronik böbrek yetmezliği	2	-	-	-	-	-	2
Hemofili	2	-	-	-	-	-	2
Bilinmeyen	9	2	-	1	1	-	13
Toplam	97	14	17	4	1	1	134

*Yedisi kronik karaciğer hastası

#Hasta grupları arasında PCR sonuçları yönünden istatistiksel fark bulunmamıştır (Fisher kesin ki-kare, $p>0.05$). Çokgözlü ki-kare, toplam PCR pozitif: $p=0.1338$, $x^2= 11.113$, RIBA pozitif grup: $p=0.1642$, $x^2= 10.456$, RIBA belirsiz grup: $p=0.1409$, $x^2= 6.907$.

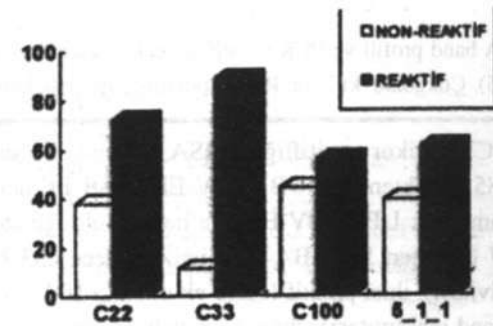
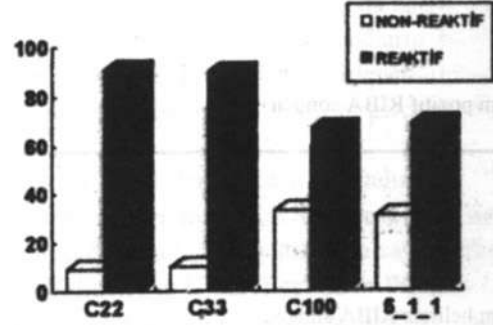


Şekil 1. HCV RT-PCR amplifikasyon ürünlerinin (251 bp) agaroz jel elektroforezde görüntüleri. Kolon M: DNA büyüklük işaretleri (Hae III ile kesilmiş Φ x174DNA), kolon 1 ve 6 pozitif kontrol, kolon: 2-5 serum örnekleri.

2a). RT-PCR negatif 18 örnekte de c22, c33, 5-1-1 ve c100 antikor pozitifliği sırasıyla %72, %89, %61 ve %56 olarak bulunmuştur (Şekil 2b). RT-PCR sonucu ile serolojik profil ve/veya tek başına band reaktivitesi yönünden grup içi veya gruplar arasında anlamlı bir ilişki tespit edilmemiştir ($p>0.05$).

UBI-HCV-EIA negatif 7 örnekte 5'i (3'ü RIBA-2 belirsiz, 2'si RIBA-2 pozitif) ve pozitif 78 örnekte 69'u RT-PCR pozitif bulunmuştur ($p>0.05$).

Genotiplendirme. Genotiplendirme yapılan 58 örneğin sırasıyla, 12'si (% 21) tip 1a, 42'si (% 72) tip 1b, 3'ü (% 5) tip 2, 1'i (% 2) tip 4 olarak saptanmıştır.



Şekil 2. RT-PCR pozitif (a) ve negatif (b) örneklerde saptanan RIBA band (c22, c33, c100 ve 5-1-1) pozitifliğinin oranları.

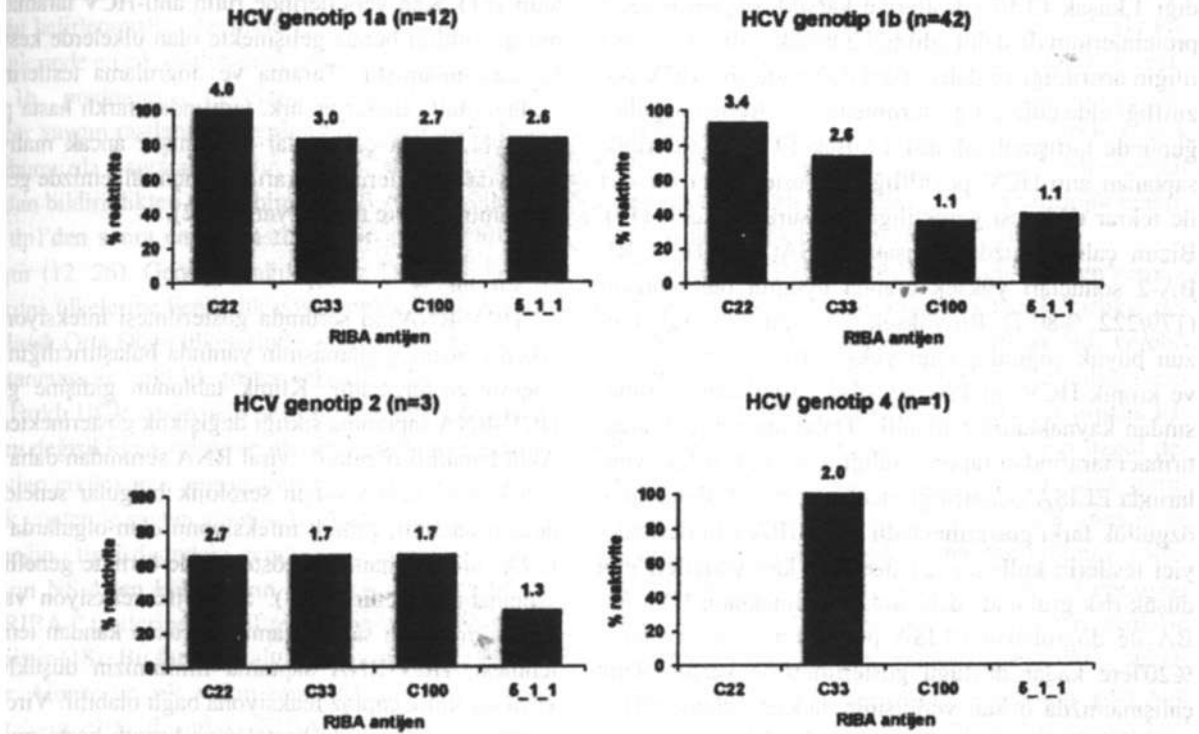
Tablo 4. RT-PCR pozitif 58 örneğin ait olduğu hasta grubu, RIBA paterni ve genotip dağılımı.

RIBA				HCV genotipi			Toplam	Hasta grubu*			
5-1-1	c100	c33	c22	1a	1b	2		4	HD	KKH	AH
+	+	+	+	10	12		22	18	3	-	1
+	-	+	+		3		3	3	-	-	-
+	+	+	-		1	1	2	-	1	-	1
+	-	-	-		1		1	-	1	-	-
-	+	+	+		1	1	2	-	-	2	-
-	+	-	+		1		1	1	-	-	-
-	-	+	+		13		13	11	-	-	2
-	-	+	-		1		2	1	1	-	-
-	-	-	+	2	9	1	12	11	1	-	-

* HD: hemodiyaliz, KKH: kronik karaciğer hastalığı, AH: akut NANB hepatit, KD: kan donörü

CV genotiplerinin 5-1-1, c100, c33 ve c22 antijenleri ile olan reaktivitelerinin sonuçları Tablo 4'de verilmiştir. HCV Tip 1a saptanan örneklerde RIBA-2 ile c22 antijenine karşı 4+ reaktivitede band sonucu alınmıştır. Bu örneklerin %80'den fazlası diğer antijenlerle 1+'ten 4+'e değişen reaktivitede band vermiştir (Şekil 3). Tip 1a ve tip 1b örnekleri ile 5-1-1 ve c100 antijenlerine karşı oluşan reaksiyonlar arasında istatistiksel anlamlı

fark tespit edilmiştir ve tip 1b örnekler bu antijenlerle daha az reaksiyon vermiştir (5-1-1 ve c100 antijenleri için sırayla $p=0.0071$ ve 0.0045). Tip 1a ve 1b arasında c33 ve c22 antijenleri ile olan reaksiyonları açısından fark saptanmamıştır. HCV tip 2 içeren serum örnekleri RIBA-2 testinde genellikle zayıf-orta reaktivitede [1(+)-3(+)], tip 4 ise sadece c33'e karşı 4(+) reaktivitede reaksiyonlar vermiştir (Şekil 3).



Şekil 3. Farklı HCV genotipleri ile infekte hastaların RIBA-2 antijenlerine karşı oluşan serolojik reaktivitelerinin oranları. Kolonlar üzerindeki rakamlar her antijene karşı oluşan reaktivitenin [nonreaktif -(4+)] ortanca değerleridir. Her genotip grubundaki örnek sayısı parantez içinde verilmiştir.

TARTIŞMA

Seroloji

HCV biyolojisi üzerinde yapılan çalışmalar devam ettikçe HCV enfeksiyonunun tanısında kullanılabilircek yeni markerlar ortaya çıkmaktadır. Kullanılmakta olan serolojik testler prototip HCV nükleik asit dizilimlerine dayanarak hazırlanan, rekombinant antijenlere karşı oluşan antikörleri saptamaya yönelik HCV IgG testleridir. Son olarak tanıda kullanılan anti-HCV IgM, kantitatif HCV-IgG saptanması ve serotiplendirmeye olanak tanıyan serolojik testler geliştirilmiştir (3,17,18). Anti-HCV saptanmasını etkileyen en önemli faktör HCV nükleik asit dizilimindeki varyasyonlardan ileri gelir (3). Varyasyonların az rastlandığı özyapı ve NS3 bölgesinden hazırlanan antijenlere (sırasıyla c22 ve c33) karşı antikör saptama oranı daha yüksek olmakla birlikte NS4 bölgesinden hazırlananlarda (c100 ve 5-1-1) bu oran varyasyonların yüksekliği nedeniyle düşüktür (18). Bizim çalışmamızda da anti-HCV pozitifliği saptanan serumların %80'inden fazlasında, büyük çoğunluğu kuvvetli reaktif (3+ veya 4+) olan c22 veya c33 pozitifliği saptanmıştır. Ancak c100 ve 5-1-1 pozitifliği %60 civarında tespit edilmiş ve bunlarda daha zayıf band reaktiviteleri saptanmıştır.

Tek başına c100 veya 5-1-1 antijenlerinin kullanıldığı 1.kuşak ELISA testlerine karşılık özyapı bölgesi proteinlerinin de dahil edildiği 2.kuşak testlerde duyarlılığın artırıldığı ve daha erken dönemde anti-HCV pozitifliği elde edildiği gösterilmiştir (7). Ayrıca özgüllüğünde tartışmalı olması 1.kuşak ELISA testlerinde saptanan anti-HCV pozitifliğinin destekleyici bir test ile tekrar edilmesi gerekliliği öne sürülmektedir (19). Bizim çalışmamızda 2.kuşak ELISA(Abbott) ve RIBA-2 sonuçları yüksek oranda uyumlu bulunmuştur (179/222, %80.7). Bu yüksek oran, çalışma grubumuzun büyük çoğunluğunun yüksek risk grubu hastalar ve kronik HCV enfeksiyonu olan hastalardan oluşmasından kaynaklanıyor olabilir. Daha önce birçok araştırmacı tarafından rapor edildiği gibi HCV enfeksiyonlarında ELISA pozitifliği incelenen risk grubuna göre özgüllük farkı göstermektedir (3). RIBA gibi destekleyici testlerin kullanılması özellikle kan vericileri gibi düşük risk grubunda daha anlamlı olmaktadır (18). RIBA ile doğrulanan ELISA pozitifliğinin bu kişilerde %20'lere kadar düştüğü gösterilmesine karşın bizim çalışmamızda 6 kan vericisinin sadece üçünde RIBA pozitif bulunmuştur. Çalışmamızda, RIBA-2 sonucu negatif saptanan üç örnek mevcuttur ve bu negatiflik

RIBA-2 testi duyarlılığının ELISA'ya göre düşük olmasından kaynaklanıyor olabilir (3,19). Elde ettiğimiz veriler yüksek risk grubu hastalarda alınan 2.kuşak ELISA sonuçlarını doğrulamada maliyeti oldukça yüksek olan RIBA-2 testlerinin ülkemiz imkanlarında gerekliliğini tartışılır kılmaktadır. Aynı yargıya kısıtlı sayıda olması nedeniyle diğer hasta grupları için varılması yanıtıcı olabilir.

Diğer bir anti-HCV ELISA testi olan UBI-HCV-EIA sonuçları 7 hasta dışında ELISA ile uyumlu bulunmuştur. Bu test ile negatifliği saptanan örneklerin ortak özelliği çoğunda (5/7) sadece c33 band reaktivitesinin saptanmış olmasıdır. Bu örneklerin 5'inin PCR pozitif saptanması, sadece anti-c33 aktivitesi olan serumlarda bu testin yanlış negatif sonuç verebileceğini desteklemektedir. UBI-HCV-EIA ile yapılmış olan karşılaştırmalı çalışmalar bu sonuçları desteklemektedir (20). Farklı ticari kitlerle yapılan çalışmalarda, kullanılan rekombinant veya sentetik antijenlerin epitoplara reaktivitelerinin farklılığından dolayı az sayıda da olsa farklı sonuçlar alınabilmektedir. Kan vericilerinde en uygun olan ELISA tarama testini belirlemek için farklı merkezler ELISA ticari kitlerin kombinasyonunu kullanmaktadır. Böylece RIBA, PCR gibi daha ileri doğrulama testleri için şüpheli sonuç veren klinik örnek sayısı dolayısıyla maliyet minimuma indirilmektedir (21). Kan vericilerinde rutin anti-HCV taramasının gerekliliği henüz gelişmekte olan ülkelerde kesinlik kazanmamıştır. Tarama ve doğrulama testlerinin kullanımında Badur ve ark. tarafından farklı hasta popülasyonlarında çalışmalar yapılmıştır ancak maliyet ve fayda analizlerinin çıkarılması için ülkemizde geniş kapsamlı verilere ihtiyaç vardır (22).

Viremi

HCV-RNA'nın serumda gösterilmesi enfeksiyonun erken tanısını sağlamanın yanında bulaştırıcılığın en önemli göstergesidir. Klinik tablonun gidişine göre HCV-RNA saptanma sıklığı değişiklik göstermektedir. Akut hepatitli olgularda viral RNA serumdan daha erken kaybolmasına karşın serolojik bulgular senelerce devam edebilir, kronik enfeksiyonu olan olgularda ise RNA titresi oynamalar göstermekle birlikte genellikle saptanabilmektedir (3,23). Serolojik reaksiyon varlığında vireminin saptanmaması virusun kandan temizlenmesi, HCV-RNA saptama limitimizin düşüklüğü veya serolojik çapraz reaksiyona bağlı olabilir. Viremiyi yüksek risk grubu hastalar ve kronik hasta grubunun %90'ından fazlasında saptamamıza karşılık akut

hepatit ve kan vericilerinin yaklaşık yarısında saptamamız klinik tablo ile vireminin uyumluluğunu yansıtmaktadır.

Çalışmamızda, RIBA-2 reaktif ve belirsiz örneklerde HCV-RNA örneklerin sırasıyla %81 ve %87'sinde saptanmıştır. Yapılan çalışmalarda bu oranlar kan vericilerinde %70-100 ve %5-40 arasında, kronik karaciğer hastalarında ise %90-100 ve %50-75 arasında bulunmuştur (3,20). RIBA-2 ile belirsiz sonuç alınan örneklerde elde ettiğimiz yüksek PCR pozitifliği oranı hasta popülasyonumuzun önemli bir kısmının immün sistemi baskılanmış hastalardan oluşması ve bu hastaların enfeksiyona karşı olan zayıf antikor cevabından kaynaklanıyor olabilir (24). RIBA-2 sonucu ve/veya tek bir band reaktivitesi ile viremi arasında anlamlı bir ilişki saptamamız tek başına serolojik göstergelerle bulaştırıcılık kararına varamayacağımızı desteklemektedir. Ancak son zamanlarda geliştirilen 3.kuşak RIBA testleri ile özgülüğün ve duyarlılığın daha da artırıldığı ve bu testleri kullanarak viremi ile daha uyumlu sonuçlar alınabileceği öne sürülmüştür (25).

Genotip

HCV epidemiyolojisi ile yapılan diğer çalışmalara benzer şekilde bu çalışmada dünya üzerinde yaygın olarak bulunan majör tiplerin toplumumuzda da bulunduğu belirlenmiştir. Özellikle Doğu ve Güney Avrupa ülkelerinde en sık rastlanan genotip olarak rapor edilen tip 1b, predominant tip olarak tespit edilmiştir (12). Diğer yaygın rastlanan tiplerden olan tip 3 ise çalışma grubumuzda saptanmamıştır. Tip 3, ilk defa İskoçya'dan bildirildikten sonra birçok Batı Avrupa ülkesinde tip 1'den sonra en sık rastlanan tip olduğu bildirilmiştir (12, 26). Genotip dağılımımız Doğu ve Güney Avrupa ülkelerine benzerlik göstermekle birlikte, farklı olarak Orta Doğu ülkelerinde yaygın olan tip 4'ün de saptanması ile farklılık göstermektedir (26).

Farklı HCV suşlarında mevcut olan nükleik asit dizilim değişikliği viral proteinlerdeki antijenik determinantları etkileyerek oluşan antikorların kullanılan serolojik yöntemle saptanamamasına neden olabilmektedir. Örneğin, tip 1 dışındaki genotiplerle enfekte olan hastaların NS-4'den köken alan c100 ve 5-1-1 antijenler ile RIBA-2 testlerinde zayıf reaksiyon verdikleri gösterilmiştir (18). Bu farklılık alttip seviyesinde de görülebilir. Alonso ve ark. yakın zamanda tip 1b ile enfekte hastaların c100 dışındaki RIBA-2 antijenlerine karşı tip 1a'ya göre daha yüksek antikor cevabı bulduklarını rapor etmişlerdir (27). Bizim çalışmamızda da alttip

seviyesinde serolojik cevap farkı saptanmıştır. Ancak Alonso ve ark. bulgularından farklı olarak tip 1b ile enfekte serum örneklerinin tip 1a'ya göre 5-1-1 ve c100 antijenlerine karşı daha zayıf reaksiyon tespit edilmiştir. Alttip 1a ve 1b arasında NS4 geninde 5-1-1 bölgesinde %90'nın üzerinde amino asit (aa) homolojisi gösterilmesine rağmen antikor bağlanmasını etkileyen dominant epitoptaki değişikliğin reaksiyonu etkilemesi mümkündür (25,28). Ayrıca serumların çoğunluğunun immün sistemi baskılanmış hastalara ait olması nedeniyle çok kısıtlı antikor cevabı oluşturmaları da bu farklılığa neden olabilir (29). Alttip seviyesinde rastlanan kritik bölgenin 1701-1704. aminoasitler arasında olduğu gösterilmiştir (30). Alttip 1a'da 1703. aa olan arginin 1b'de glutamin ile değişmiştir (25,28). Bu bölge yeni geliştirilen RIBA-3 testlerinde sentetik proteinlerin dominant epitop bölgeleri olarak kullanılmıştır. RIBA-3 ile yapılan serolojik reaktivite değerlendirilmelerinde RIBA-2'ye oranla farklılıklar daha az belirgindir. Böylece RIBA-2 ile farklı HCV genotipleri ile enfekte hastalarda saptanan yüksek reaktivite farklılığı ortadan kaldırılmıştır. Çalışmamızda, tip 1 dışında tiplere sahip örnek sayısının azlığı nedeniyle tipler arası değerlendirme yapılamamıştır.

Farklı serolojik reaktivite virus replikasyon hızındaki değişikliklere de bağlı olabilir. Ancak bunu desteklemeyen bir görüş, hızlı virus replikasyonunda korunmuş bölgeler olan c22 ve c33'e karşı antikor cevabının kuvvetli, NS4'e karşı ise zayıf olacağını öne sürmektedir (31). Bizim bulgularımızdan farklı olarak Mahaney ve ark. tip 1a ve tip 1a'ya göre daha agresif seyreden tip 1b enfeksiyonları arasında serolojik reaktivite açısından fark bulmamışlardır (32).

Özet olarak, RIBA-2 testleriyle elde edilen serolojik sonuç ancak hastalığın klinik evresi ile birlikte değerlendirilirse viremi varlığı hakkında ön fikir verebilir. Farklı HCV genotipi ile enfekte olan hastaların oluşan serolojik profilleri farklı olabilmektedir. Ancak RIBA-2 testlerde bu profil HCV genotipi için özgül değildir ve serolojik profili hastanın immünolojik durumu da etkilemektedir. Yakın gelecekte PCR yöntemine dayanan tiplendirmelere göre daha pratik olması nedeniyle, HCV tipleri ve alttiplerinin dominant epitoplar kullanılarak tipe özgül ELISA veya benzeri testlerin kullanıma girmesi beklenmektedir. Bu testlerin epidemiyolojik çalışmalara getireceği kolaylığın yanı sıra tedavi seçimi ve prognoz belirlemede hastaya da faydası olacaktır.

Teşekkür

Bu çalışmada bilgi ve deneyimlerinden faydalandığımız Ruchill Hastanesi Mikrobiyoloji Referans Ünitesinden Dr. Brian C. Dow ve Edinburgh Üniversitesi Klinik Mikrobiyoloji bölümünden Dr. Peter Simmonds'a teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

1. Alter MJ, Margolis HS, Krawczynski K, et al.: The natural history of community acquired hepatitis C in the United States. *N Engl J Med*, 1992, 327: 1899-1905.
2. Yano M, Yatsushashi H, Inoue O, Inokuchi K, Koga M: Epidemiology and long term prognosis of hepatitis C virus infection in Japan. *Gut*, 1993, suppl: S13-16.
3. Hino K: Diagnosis of Hepatitis C. *Intervirology*, 1994; 37:77-86.
4. Takahashi K, Okamoto H, Kishimoto S, et al.: Demonstration of a hepatitis C virus specific antigen predicted from the putative core gene in the circulation of infected hosts. *J Gen Virol*, 1991, 73: 667-672.
5. Krawczynski K, Beach MJ, Bradley DW, et al: Hepatitis C virus antigen in hepatocytes: Immunomorphologic detection and identification. *Gastroenterology*, 1992, 103: 622-629.
6. Kuo G, Choo QL, Alter HJ, et al.: An assay for circulation antibodies to a major etiologic virus of human non-A, non-B hepatitis. *Science*, 1989, 244: 362-364.
7. Bresters D, Cuypers HJM, Reesink HW, et al.: Enhanced sensitivity of a second generation ELISA for antibody to hepatitis C virus. *Vox Sang* 1992, 62: 213-217.
8. Watanabe J, Matsumoto C, Fujimura K, et al.: Predictive value of screening tests for persistent hepatitis C virus evidenced by viraemia, Japanese experience, *Vox Sang*, 1993, 65, 199-203.
9. Okamoto H, Mishiro S: Genetic heterogeneity of hepatitis C virus. *Intervirology*, 1994, 37: 68-76.
10. Simmonds P, Alberti A, Boninho F, et al.: A proposed system for nomenclature of genotypes for hepatitis C virus. *Hepatology*, 1994, 19: 1321-1324.
11. Lau JYN, Mizokami M, Kolberg JA, et al: Application of six hepatitis C virus genotyping systems to sera from chronic hepatitis C patients in the United States. *J Infect Dis*, 1995, 171: 281-289.
12. Mc Omish F, Yap PL, Dow BC, et al.: Geographical distribution of hepatitis C virus genotypes in blood donors: An International collaborative survey. *J Clin Microbiol*, 1994, 32:884-892.
13. Takada N, Takase S, Enomoto N, Takada A, Date T: Clinical backgrounds of the patients having different types of hepatitis C virus genomes. *J Hepatol*, 1992; 14:35-40.
14. Pozzato G, Kaneko S, Moretti M, et al.: Different genotypes of hepatitis C virus associated with different severity of liver disease. *J Med Virol*, 1994; 43: 291-296.
15. Chan SW, McOmish F, Holmes EC et al. Analysis of a new Hepatitis C virus type and its phylogenetic relationship to existing variants. *J Gen Virol* 1992, 73: 1131-41.
16. Chomczynski P Sachhi N: Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry* 1987, 162: 156-159.
17. Machida A, Ohnuma H, Tsuda F, et al.: Two distinct subtypes of hepatitis C virus defined by antibodies directed to the putative core protein. *Hepatology*, 1992, 16: 886-891.
18. Mc Omish F, Chan SW, Dow BC, et al.: Detection of three types of hepatitis C virus in blood donors: Investigation of type-specific differences in serological reactivity and rate of alanine aminotransferase abnormalities. *Transfusion*, 1993, 33: 7-13.
19. Mimms L, Vallari D, Ducharme L, Holland P, Kuramot JK, Zeldis J: Specificity of anti-HCV ELISA assessed by reactivity to three immunodominant HCV regions. *Lancet* 1990, 336: 1590-1591.
20. Dow BC, Coote I, Munro H, et al.: Confirmation of hepatitis C virus antibody in blood donors. *J Med Virol*, 1993, 41: 215-220.
21. Teo CG, Gabriel FG, Mortimer PP: Confirmation of second generation anti-hepatitis C virus enzyme immunoassays by antigenic crossreactivity. *J Clin Pathol*, 1992; 45:917-920.
22. Badur S, Ağaçfidan A, Türkoğlu S ve ark.: HCV infeksiyonunun serolojik tanısında çeşitli ELISA ve RIBA tekniklerinin değeri ve PCR yöntemi ile HCV-RNA'sı araştırması. *Klinik Derg*, 5: 70-73.
23. Tremolada F, Casarin C, Alberti A, et al: Long term follow-up of non-A, non-B (type C) posttransfusion hepatitis. *J Hepatol*, 1992, 16: 273-281.
24. Vatteroni ML, Pistello M, Maggi F, et al.: Hepatitis C virus serological and polymerase chain reactions in human immunodeficiency virus-positive and negative patients. *Clin Diagn Virol*, 1994; 2: 7-16.
25. Simmonds P, Rose KA, Graham S et al.: Mapping of serotype specific, immunodominant epitopes in the NS-4 region of hepatitis C virus (HCV): use of type specific peptides to serologically differentiate infections with HCV types 1, 2, and 3. *J Clin Microbiol*, 1993, 31: 1493-1503.
26. Dusheiko G, Schmilowitz-Weiss H, Brown D, et al.: Hepatitis C virus genotypes: An investigation of type specific differences in geographic origin and disease. *Hepatology*, 1994; 19: 13-18.
27. Alonso C, Qu D, Lamelin JP et al.: Serological responses to different genotypes of hepatitis C virus in France. *J Clin Microbiol*, 1994, 32:211-212.
28. Yuki N, Hayashi N, Mita E et al.: Clinical characteristics and antibody profiles of chronic hepatitis C patients: relations to hepatitis C virus genotypes. *J Med Virol*, 1995, 162-167.
29. Lelie PN, Cuypers HT, Reesink HW et al.: Patterns of serological markers in transfusion-transmitted hepatitis C virus infection using second generation HCV assays. *J Med Virol*, 1992, 37: 203-209.
30. Sallberg M, Ruden U, Wahren B et al.: Antigenic regions within the hepatitis C virus envelope I and non-structural proteins: identification of an IgG3 restricted recognition site within the envelope I protein. *Clin Exp Immunol*, 1993, 91:489-494.
31. Yuki N, Hayashi N, Kasahar A, et al.: Hepatitis C virus replication and antibody responses toward specific hepatitis C virus proteins. *Hepatology*, 1994, 19:1360-1365.
32. Mahaney K, Tedeschi V, Maertens G et al.: Genotypic analysis of hepatitis C virus in American patients. *Hepatology*, 1994, 20: 1405-1411.