

Anti HCV pozitifliğinin tespitinde ikinci ve üçüncü jenerasyon ELISA testlerinin önemi

Importance of second and third generation ELISA tests in detection of HCV antibody

Dr. Sedat BOYACIOĞLU, Dr. Münire TURAN, Dr. Gürden GÜR, Dr. Mete ÖZDOĞAN,
Dr. Orhan ÖZGÜR, Dr. Hasan TELATAR

Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları ABD Gastroenteroloji Ünitesi ve Biyokimya Ünitesi, Ankara

ÖZET: Hepatit C virusuna (HCV) bağlı hepatitler yüksek oranda kronikleşmeye eğilimli olmaları nedeni ile önemli bir sağlık problemidir. HCV enfeksiyonunun varlığını tespit etmek için değişik sensitivite ve spesifite-lere sahip serolojik testler mevcuttur. Bu çalışmada 131 hemodiyaliz hastası ve 100 kan bankası donöründe ikinci ve üçüncü jenerasyon ELISA testler kullanılarak Anti HCV pozitifliği saptandı. Hemodiyaliz grubunda ikinci jenerasyon testle 66 (%50.4) hastada Anti-HCV pozitifliği saptandı. Üçüncü jenerasyon test aynı gruba uygulandığında 2. jenerasyonu negatif bulunan iki hastada Anti-HCV pozitif bulundu (üçüncü jenerasyonla Anti-HCV pozitiflik oranı %51.9 olarak saptandı). Kan bankası donörlerinde ikinci jenerasyonla hiçbir hastada Anti-HCV pozitifliği saptanmazken, üçüncü jenerasyonla bir kişide (%1) pozitiflik saptandı. İstatistiksel olarak ikinci ve üçüncü jenerasyon testler arasında farklılık gözlenmemesine rağmen üçüncü jenerasyon test bir miktar daha sensitif olarak gözlenmektedir.

Anahtar Kelimeler: **Hepatit C virusu, ikinci jenerasyon ELISA testi, üçüncü jenerasyon ELISA testi**

HEPATİT C virusu (HCV) biyolojik veya biyofiziksel metodların doğrudan kullanımı olmaksızın moleküler klonlama yöntemiyle varlığı ortaya konan ilk virustur. İlk olarak 1989 yılında tanımlanmıştır (1). Parenteral yolla bulaşan non-A, non-B hepatitlerinin çok önemli bir bölümünün sorumlusudur (2). HCV'ye bağlı olarak gelişen hepatitlerin yaklaşık %60'ı kronikleşir (2). Açık toplumlar-da coğrafik yerleşime göre değişmekle beraber prevalans %0 ile 5 arasında bildirilmektedir (3). Buna karşılık bazı özel gruplarda bu oran daha fazladır. Özellikle hemodiyaliz hastalarında HCV enfeksiyon oranı oldukça yüksektir (4). Hastanemiz hemodiyaliz ünitesinde HCV antikor pozitifliği oranı daha önce %59 olarak bulunmuştur (5).

SUMMARY: Hepatitis C virus (HCV) infection is an important medical problem because of its tendency to chronic hepatitis. Serological tests that are different in sensitivity and specificity are available to detect antibodies against HCV antigens. In this study, second and third generation ELISA tests were compared to detect HCV antibodies in 131 hemodialysis patients in 100 blood donors. HCV antibodies were positive in 66 (50.4 %) of the hemodialysis patients with the second generation tests. Two patients who were HCV antibody negative with the second generation tests were found to be HCV antibody positive with the third generation test. Total 68 (51.9%) hemodialysis patients were positive for anti-HCV with third generation test. There were no HCV antibody positive subjects with the second generation test in the healthy blood donors, whereas one (1%) was found HCV antibody positive with third generation test. We conclude that the difference between two tests was not statistically important but third generation ELISA test seems to be more sensitive than its counterpart and further studies are needed to evaluate probable beneficial effect of third generation tests.

Key Words: **Hepatitis C virus, second generation ELISA test, third generation ELISA test**

Ülkemizdeki diğer merkezlerde de yüksek oranlar bildirilmiştir (6).

HCV enfeksiyonunu belirleyebilmek tanı ve tedavi bakımından çok önemlidir. Günümüzde henüz HCV antijenlerine karşı doğrudan testler yoktur. Buna karşılık, HCV enfeksiyonu olduğundan kuşku duyulan kişilerde HCV antikorlarının varlığı araştırılmaktadır. İlk olarak ortaya konulan birinci jenerasyon testlerde ELISA kullanılarak anti-c 100 antikorlarının varlığı araştırılmaktaydı. Bu testin sensitivite ve spesifitesi düşüktür (2,7). İkinci jenerasyon ELISA testleri ile buna ek olarak c22 ve c33 proteinlerine karşı antikorlar aranmakta olup bu testlerin duyarlılığı çok daha fazladır (8). Fakat buna rağmen hala tanısal olarak tam tatminkar değildirler.

Tablo 1. Hemodiyaliz hastalarında ikinci ve üçüncü jenerasyon testlerle anti-HCV pozitiflik oranları

Jenerasyon	Pozitif n %	Negatif n %	Toplam n
İkinci	66 50.4	65 49.6	131
Üçüncü	68 51.9	63 48.1	131

p>0.05

Viremi ve infektivitenin gösterilmesi için en iyi belirleyici PCR (Polymerase Chain Reaction) tekniği kullanılarak HCV-RNA'sının gösterilmesidir (9). Bu teknik zorluklar taşıyan bir yöntemdir ve ancak sınırlı sayıda merkezce uygulanabilmektedir. Bir diğer handicap ise yüksek maliyetidir.

Son yıllarda geliştirilen üçüncü jenerasyon ELISA testlerinde HCV genomunun NS5 bölgesi ile kodlanan antijenler de kullanılarak testlerin sensitivite ve spesifitelerinde artış sağlanmıştır (10,11,12).

Bu çalışmada, hastanemiz hemodiyaliz ünitesinden rastgele seçilen 131 hastada ve kanbankası donörü 100 kişide HCV antikorlarının varlığı ikinci ve üçüncü jenerasyon testlerle aranmış ve iki test arasındaki olası farklılıklar ortaya konmaya çalışılmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Hemodiyaliz grubu (Grup I). Bu grup kronik böbrek yetmezliği nedeniyle hemodiyaliz tedavisinde olan 131 hastadan oluştu. Yaş ortalaması 42 olup yaşlar 18 ile 75 arasındadır.

Kan bankası grubu (Grup II). Bu grup hastanemiz kan bankasına kan donörü olmak üzere başvuran 100 kişiden oluştu. Yaş ortalaması 36 olup yaşlar 20 ile 58 arasındadır.

Her iki grup oluşturulurken mevcut popülasyonlarından rastgele seçilmişlerdir. Hemodiyaliz hastalarının seçiminde daha önce bakılan HCV antikor sonucu dikkate alınmamış ve hemodiyaliz ünitesinde birgün boyunca tedaviye alınan hastalar çalışmaya rastgele olarak alınmıştır.

Hastaların serumlarında ikinci ve üçüncü jenerasyon testler ile HCV antikorları araştırıldı. Testler tüm hastalarda iki kere tekrarlanmıştır.

II. Jenerasyon test: Abbott IMx HCV testi kullanılmıştır. Bu test "microparticle enzyme immunoassay (MEIA)" olup 4 tip rekombinant HCV proteinini içermektedir. Bunlar c200, c22-3, HC-34 ve HC-31 dir.

Tablo 2. Kan bankası donörlerinde ikinci ve üçüncü jenerasyon testlerle anti-HCV pozitiflik oranları

Jenerasyon	Pozitif n %	Negatif n %	Toplam n
İkinci	0 0	100 100	100
Üçüncü	1 1	99 99	100

p>0.05

III. Jenerasyon test: Abbott HCV EIA 3.0 testi kullanılmıştır. Bu test bir "solid phase enzyme immunoassay (EIA)" olup 4 tip rekombinant HCV proteinini içermektedir. Bunlar HC-34, HC-43, c100-3 ve NS5 dir.

İstatistiksel değerlendirme: İkinci ve üçüncü jenerasyon testler arasındaki pozitiflik oranları ki-kare testi ile karşılaştırıldı.

BULGULAR

I. Grup. Bu grupta ikinci jenerasyon testle 66(%50.4) hastada HCV antikoru pozitif olarak bulundu. Buna karşılık üçüncü jenerasyon testle 68(%51.9) hastada HCV antikoru pozitif olarak bulundu (Tablo I). İki test sonucu bulunan pozitiflik oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı (p= 0.66).

II. Grup: Bu grupta ikinci jenerasyon testle hiçbir kişide HCV antikoru pozitif bulunmadı. Buna karşılık üçüncü jenerasyon testle 1 kişide (%1) HCV antikoru pozitif olarak bulundu (Tablo II). İki test sonucu bulunan pozitiflik oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı (p= 0.99).

TARTIŞMA

Kronik HCV enfeksiyonu kan yoluyla geçen hepatitler arasında önemli yer tutar (2,3). Bu hastalığın bulaşmasının önlenmesi veya hastalığa yakalananların tespit edilebilmesi uygun tanısal yöntemlerin kullanılması ile mümkündür. HCV'nin yapısı hakkındaki bilgiler geliştikçe HCV enfeksiyonunun ortaya çıkarılması için yapılan serum testlerinin de duyarlılığı artmaktadır. HCV antijenlerinin doğrudan tayini günümüzde mümkün değildir, fakat bu antijenlere karşı serumda oluşan antikorların tayini esasına dayanan tarama testleri oldukça yaygın olarak kullanılmaktadır. Başlangıç tarama testi olarak ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) esaslı uygulanan testler kullanılmaktadır. Pozitif sonuçlar daha duyarlı testler olan RIBA (Recombi-

nant Immunoblot Assay) ve/veya mümkünse HCV-RNA (PCR) testleriyle doğrulanmaktadır (13). Fakat bunlar zor ve pahalı yöntemlerdir.

Tarama testi olarak ilk ortaya çıkan ELISA testi birinci jenerasyon olarak anılır. Zamanla geliştirilen testler buna uygun olarak ikinci ve üçüncü jenerasyon olarak adlandırılmıştır. Birinci jenerasyonda sadece c100 antijenine karşı gelişen antikorlar araştırılmaktaydı. Bu testin yetersiz sensitivite ve spesifitesi nedeniyle artık birinci jenerasyon ELISA testi kullanılmaz duruma gelmiştir.

İkinci jenerasyon testlerle buna ek olarak anti-c33, anti-c22 ve anti-NS3 antikorları, üçüncü jenerasyon testlerle bunların subtipleri ve anti-NS5 antikorları aranmaktadır (8,10,11).

Viremi ve infektivitenin gösterilmesinde "altın standart" PCR ile HCV-RNA'sının gösterilmesidir (9). Fakat bu metodun pahalı ve uygulamasında teknik zorluklar taşıyor olması yaygın kullanımını ve tarama testi olmasını engellemektedir. Buna karşılık ikinci jenerasyon ELISA testleri uzunca bir süredir bu amaçla kullanılmaktadır. Fakat bunlarında duyarlılık açısından eksileri malumdur. Üçüncü jenerasyon ELISA testleri bu eksileri ortadan kaldırmak amacıyla geliştirilmiş ve piyasalara sürülmüştür (10,11,12).

Daha önce yapılan ikinci ve üçüncü jenerasyon ELISA testlerinin karşılaştırıldığı bazı çalışmalarda üçüncü jenerasyon lehine farklılıklar gösterilmiştir (14-17). Buna karşılık bir çalışmada ise her iki test arasında bir üstünlük farkı gözlenmemiştir (18). Bizim çalışmamızda gerek hemodiyaliz grubunda gerekse kan bankası grubunda her iki jenerasyon test arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. "Altın standart" sayılan PCR ile HCV-RNA tayini bu çalışmada uygulanmadığı için sensitivite ve spesifite yönünden analiz yapılamamıştır. Bununla beraber

her iki gruptan elde edilen bulgular üçüncü jenerasyon ELISA testinin ikinci jenerasyon teste göre istatistiksel olarak anlamlı olmayan ölçüde daha duyarlı olduğunu göstermektedir. Ancak kesin yargıya varmak için daha çok sayıda denegin kullanıldığı çalışmalara gereksinim vardır.

HCV antikor prevalansı hemodiyaliz hastalarında normal popülasyona göre yüksektir. Literatürde bu hasta grubunda HCV antikorü prevalansının %3.4 ile %62.5 arasında olduğunu gösteren çalışmalar vardır (4,6,19-22). Bu çalışmada hemodiyaliz hastalarında her iki yöntem ile bulduğumuz HCV antikor pozitifliği oranları (%50.4 ve %51.9) daha önceki bulgularımız ile uyumludur (5). Hemodiyaliz ünitelerinde HCV pozitiflik oranını belirleyen en önemli faktörlerin kan transfüzyon sayıları ve hemodiyaliz süresi olduğu bildirilmiştir (20,23).

Kan donörlerinde serolojik taramaların yapılmasına rağmen hemodiyaliz hastalarında HCV enfeksiyonu prevalansının yüksek olmasını şu şekilde açıklamak mümkün olabilir: 1) Mevcut tarama testleri HCV enfeksiyonunun ortaya çıkarılmasında yeterince hassas değildir. Bu nedenle kan ve kan ürünleriyle HCV enfeksiyonu taramalara rağmen bulaştırılabilmektedir. 2) Bu hastaların immun sistemlerinin yetersiz olması ve kapalı bir toplum oluşturmaları kan dışı yollarla bulaşmayı kolaylaştırmaktadır. Bu nedenle, hemodiyaliz hastalarının birbirlerine HCV enfeksiyonu bulaştırma riskini en aza indirebilmek için HCV pozitif hastaların saptanması ve makine ayrılması gibi önlemlerin alınması çok önemlidir.

Bu çalışma sonucunda, HCV enfeksiyonu tarama testi olarak kullanılan ikinci ve üçüncü jenerasyon ELISA testleri arasında önemli fark olmadığı, fakat daha duyarlı olduğu iddia edilen üçüncü jenerasyon testin değerinin başka çalışmalarla da araştırılmasının gerektiği kanaatlerine vardık.

KAYNAKLAR

1. Choo Q-L, Kuo G, Weiner AJ: Isolation of a cDNA clone derived from blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 1989; 244: 359.
2. Sherlock S: Viral hepatitis. *Curr Opin. Gastroenterology* 1993; 9: 341: 348.
3. Ranger S, Martin P, Roussanne MC, Dennis F: Prevalance of hepatitis C virus antibodies in the general population. *Gut* 1993; 34(Suppl 2): 550-551.
4. Tak MC, Lak ASF, Cheng IKP: Prevalance of hepatitis C virus infection in hemodialysis patients. *Hepatology* 1993; 17: 5-8.
5. Özgür O, Özdoğan M, Boyacıoğlu S, Kart H, Turan M, Telatar H, Haberal M: Hemodiyaliz hastalarında hepatit seroprevalansı. *Transplantasyon* 1994; ed. Haberal M. s: 41-42.
6. Özgür G, Çolakoğlu SÖ, Seyrek N, Sağiker Y, Paşdaş S, Akkız H: Hemodiyaliz hastalarında anti-HCV sıklığı. *Türk J Gastroenterol.* 1996; 7: 17-21.
7. Kuo G, Choo QL, Alter HJ: An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non A, non B hepatitis. *Science* 1989; 244: 362-364.
8. Katayama T, Mazda J, Kikuchi S: Improved serodiagnosis of non A, non B hepatitis by an assay detecting antibodies to hepatitis C virus core antigen. *Hepatology*.
9. Mc Guinness PH, Bishop GA, Lien A: Detection of serum hepatitis C virus RNA in HCV antibody seropositive volunteer blood donors. *Hepatology* 1993; 18: 485-490.
10. Lee SR, Page E, Francis B: Improved detection of anti HCV in patients with liver disease by third generation HCV assay. (Abst. 575) *Hepatology* 1994; 20: 240.

11. Borrera JM, Ergilla MG, Francis B: Detection of anti HCV antibodies (third generation test) and HCV RNA in seroconversion of acute hepatitis C (Abst) Hepatology 1994; 20: 237.
12. Craxi A, Valenza M: Third generation hepatitis C virus test in asymptomatic anti HCV positive blood donors. J Hepatology 1994; Nov. 21: 730-774.
13. Cheng C, Hsueh YS, Lumeng L: Detection of hepatitis C virus by polymerase chain reaction in HCV EIA positive sera obtained from volunteer blood donors. Hepatology 1990; 12: 876.
14. Sofreddeni R, Rumi G, Romeo R: Increased sensitivity and spesificity of third generation assays for HCV in renal transplanted patients. J Hepatol 1994; 21: (suppl):34.
15. Courouce A, Le Marrec N, Girault A: Anti hepatitis C virus seroconversion in patients undergoing hemodialysis: comparison of second and third generation anti HCV assays. Transfusion 1994, 34: 790-795.
16. Goffin E, Pirson Y, Cornu C: Significance of Ns3 and Ns5 antigens in screening for HCV antibody. Lancet 1994; 343; 854.
17. Van Der Poel: Hepatitis C virus infection from blood and blood products. FEMS Microbiol Rev 1994 Jul; 14: 241-246.
18. Nordenfelt E, Lofgren B: Hepatitis C virus infection in hemodialysis patients in Southern Swedwn. J Med Virol 1993; 8: 1115-1117.
19. Chauveau P, Courouce A, Lemarec N: Antibodies to hepatitis C virus by second generation test in hemodialysis patients. Kidney Int 1993; 43 (suppl): 149-52.
20. Conway M, Catteral AP, Brown EA: Prevalance of antibodies to hepatitis C in dialysis patients and transplant recipient with possible routes of transmission. Nephrol Dial Transp 1991; 6: 944-947.
21. Knudsen F, Wantzin P, Rasmussen K: Hepatitis C in dialysis patients: Relationship to blood transfusions, dialysis and liver disease. Kidney Int 1993; 43:1353-1356.
22. Brugnano R, Francisci D, Quintaliani G: Antibodies against hepatitis C virus in hemodialysis patients in the central Italian region of Umbria. Nephron 1992; 61: 263-265.
23. Courouce A, Bouchardeau F, Chauveau P: Hepatitis C virus (HCV) infection in hemodialysis patients: HCV-RNA and anti-HCV antibodies. Nephrol Dial Transp 1995; 10: 234-239.