

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

Salih Türkoğlu, Mürvet Bozacı, Banu Bayraktar, Ayfer Ataysagın, 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 geliştirdiği HCV-PCR kiti (Amplior (™)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 testle 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, Amplior HCV, HCV-PCR

SUMMARY

Comparison of a commercial assay (Amplior 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 (Amplior (™)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 sıklıkla HCV genomunun klonlanmasıyla elde edilen antijenlerin kullanıldığı ELISA ve RIBA (Recombinant Immunoblotting Assay) testleriyle virusa spesifik antikolar 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 olmayışı, antikor özgüllüğünün gösterilmesinin gerekmesi ve doğrulama testlerinde karşılaşılan 'indeterminate' bulguların yorumlanmasının 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 tanıyı da doğrulayıcı özellik taşımaktadır. Bununla birlikte PCR'in aşırı duyarlı olması test örneklerinin kontaminasyonuna bağlı yalancı pozitifliği artırır. Şu an uygulanan biçimiyle 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 (Amplior 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 taşınmasına bağlı yalancı pozitif reaksiyonları önleyen

asit miktarının azlığı yalancı negatifliğe yolaçabilir. Çeşitli uluslardan 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 kullanılarak çok daha iyi sonuçlar elde etmişlerdir. Bu da HCV-RNA PCR tekniklerinin standardizasyonunun 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 karşılaştırıldığında nested PCR'in amplikon taşınmasına bağlı yanlış pozitifliğe daha açık olduğu muhakkaktır. Ancak çalışmamızda tüm pozitif sonuçlar en az iki kez tekrarlanarak elde edilmiştir. Kontaminasyonu engellemek için tüm kurallara titizlikle uyulmuş(6), ayrıca Kitchin ve Bootman'ın (4) önerdiği gibi negatif kontroller PCR prosedürüne eklenmiştir. Her iki PCR prosedürüyle de 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 enfeksiyonlarının tanısında rutin kullanım için bir teste ihtiyaç vardır ve Amplicor HCV bunun için uygun görünmektedir. Bununla birlikte, maliyetin yüksekliği özellikle Türkiye gibi ülkeler için önemli bir sorundur.

KAYNAKLAR:

1. Choo Q-L, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley 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.