

## II. Kuşak Elisa İle Saptanan Anti-HCV Varlığının Line Immunoassay Yöntemi ile Doğrulanması\*

Güzin Bulubay Gündoğdu, Nail Özgünes, Avse Canan Ücısık

### ÖZET

HCV'ye karşı oluşan antikorları saptamada kullanılan 1. ve 2. kuşak ELISA kitleri ile üremi, paraproteinemi, KAH, alkolik hepatit olgularında ve sebebin henüz bilinmediği bazı durumlarda yalancı pozitiflikler elde edilebilmiştir.

HCV enfeksiyonu, yeni teşhis metodlarının geliştirilmesiyle prevalansı gittikçe artan, sebep olduğu komplikasyonlar bakımından çok önemli bir enfeksiyondur. Çünkü klinik geçiş sessiz ve silik olmasına karşın olguların yarısından çoğu kronikleşmekte, bunlarda da siroz ve karaciğer kanserine dönüşüm sıklıkla gözlenmektedir. Bu yüzden, iyi seçilmiş HCV enfeksiyonlu hastaların tedavi edilmesi konusunda görüş birliği vardır. İyi seçilmiş hasta tanımında yaş, ALT yüksekliğinin süresi, karaciğer biopsisi sonuçları gibi faktörlerin yanında anti-HCV pozitifliğinin gösterilmesi ve bunun doğrulanması kriterleri vardır.

Bu çalışmada ELISA ile anti-HCV pozitif bulunmuş 54 serum, Organon Teknika Lia Tek HCV III doğrulama testiyle çalışılmış ve bunların 51'inin pozitifliği doğrulanmıştır. Üç serumda pozitiflik doğrulanmamış, yani gerçekte negatif olduğu, en çok antikorun nükleokapsid (C1 ve C2) proteinlerine, en az antikorun da E2/NS1 ve NS5 bölgelerine karşı olduğu gösterilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Anti-HCV, ELISA, Line immunoassay

### SUMMARY

*Confirmation of Anti-HCV Positivity Detected By 2nd Generation ELISA Using The Lineimmunoassay Method*

ELISA kits used to detect antibodies against HCV yield false positive results in some circumstances. We designed a confirmation test to assess the false positivity rate, to determine the etiology in patients suspected to have hepatitis C and to establish the certainty of high anti-HCV positivity in dialysis patients. We used the Lia Tek method (Organon Teknika) to confirm the presence of antibodies obtained by 2nd generation ELISA. Lia Tek HCV III line immunoassay method determines qualitatively and semiquantitatively antibodies against HCV in human serum. In this study 54 sera found anti-HCV positive by 2nd generation ELISA were subjected to Lia Tek HCV III confirmation test. The test confirmed 51 samples to be positive. Three samples proved negative. We found that the most and the fewest antibodies were produced against nucleocapsid (C1 and C2) proteins and E2/NS1 and NS5 regions, respectively.

### GİRİŞ

Hepatit C virusu (HCV), henüz tanıya edilememiş, fakat serolojik olarak gösterilebilen, flavivirus ailesinden bir RNA virusudur (1, 2). Genomu basit, uzun tek bir open reading frame (ORF) içeren, baştan 1/3'lük kısma lokalize (5' bölgesi) strüktürel gen ve 2/3'lük kısma da (3' bölgesi) nonstrüktürel gen içerir.

PCR yönteminin uygulanmaya başlanmasıyla çeşitli ülkelerden elde edilen HCV izolatları arasında, genomun değişik bölgelerinde nükleotid ve aminoasit dizilişleri bakımından önemli farklar olduğu görülmüştür (3). İzolatlar arasında en iyi korunmuş bölge 5'-non-coding bölgesidir (5'NCR).

Çekirdek proteini ileri derecede viral RNA içerdiğinden en temel öğedir ve izolatlar arasındaki diziliş

benzerliği de fazladır. Zarf proteini ise diziliş değişkenliği gösterir. Bu protein genellikle major nötralizan antijenleri içerdiğinden çok değişkendir ve bu durum aşılama çalışmalarını da engellemektedir.

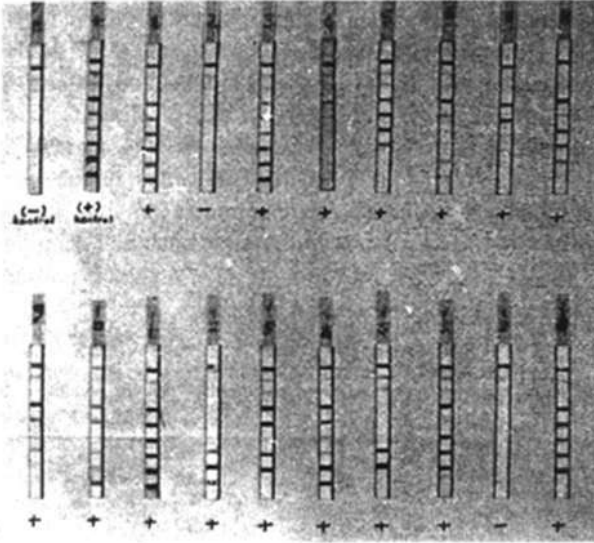
HCV'nin genotipleri ve subtipleri vardır. Sınıflandırmada HCV genomunun beş ayrı bölgesi (5'NCR, C, E1, NS4 ve NS5) kullanılmaktadır. Simmonds sınıflandırmasına göre 11 HCV genotipi belirlenmiştir. Türkiye'de baskın olan tip 1b'dir (3).

### GEREÇ VE YÖNTEM

HCV enfeksiyonu tanısında en yaygın metod 2. kuşak ELISA testiyle anti-HCV araştırılmasıdır. Bu testlerin, yüksek oranda olmasa bile, yalancı pozitiflik gösterebildiği, bu sebeple elde edilen pozitifliğin farklı an-

\* Bu çalışma "FEMS Symposium on Recent Advances in the Diagnosis of Viral Diseases" de sunulmuştur (Temmuz 20-22, 1995, İstanbul).

SSK Göztepe Eğitim Hastanesi, İnf. Hast. ve Kli. Mik. Bölümü, İstanbul



Resim 1: Kullanılan üç Lia Tek kitinden elde edilen sonuçlar.

tijenik yapıdaki bir başka testle doğrulanması önerilmektedir (4-6).

Çalışmamızın amacı 2. kuşak ELISA testleriyle anti-HCV pozitif bulunmuş hasta serumundaki pozitifliğin doğrulanmasıdır. Serum ALT ve AST değerleriyle hastaların yaşı göz önüne alınmadan Organon UBI HCV EIA 2. kuşak anti-HCV kitiyle pozitif bulunmuş 22 kadın, 31 erkek, bir çocuk hastaya ait toplam 54 serum örneği çalışmaya alındı. Toplam serum miktarının 45'i hemodiyaliz ünitesi, beşi infeksiyon hastalıkları servisi, üçü dahiliye servisi, biri de çocuk hastalıkları servisinden gelen hastalara aitti.

İnfeksiyon hastalıkları, dahiliye ve çocuk kliniklerinden elde edilen serum örnekleri, ALT yüksekliği tespit edilmiş, hepatit ön tanısıyla izlenen, A ve B hepatit markerleri negatif olan ve anti-HCV pozitif bulunan hastalara; hemodiyaliz ünitesinden gelen serum örnekleri ise hepatite ait klinik bulguları olmayan ve transaminaz yüksekliği tespit edilmeyen, rutin kontrollerinde anti-HCV pozitif bulunan hastalara aitti.

Doğrulama testi olarak Lia Tek HCV III kiti (Organon Teknika) çalışıldı.

Lia Tek HCV III, insan serum ya da plazmasında bulunan HCV'ne karşı gelişmiş antikörlerin kalitatif ve semikantitatif determinasyonunu sağlayan, sandviç prensibi esasına dayanan bir line immunoassaydir. Alkalen fosfataz ile işaretli anti-human IgG konjugat olarak rol oynarken, bromokloroindolil fosfat (BCIP) substrat olarak kullanılır. Test, viral genomun en iyi korunmuş bölgelerine karşı oluşan spesifik HCV antikörlerini tespit eder ve bir renk reaksiyonu gelişir. Eğer serum spesifik HCV antikörü içermiyorsa renk oluşmaz. Her

bir strip kendi başına, diğerlerinden bağımsız olarak, belirgen renk şiddeti gözle okunarak değerlendirilir (Resim 1, 2, 3).

## BULGULAR

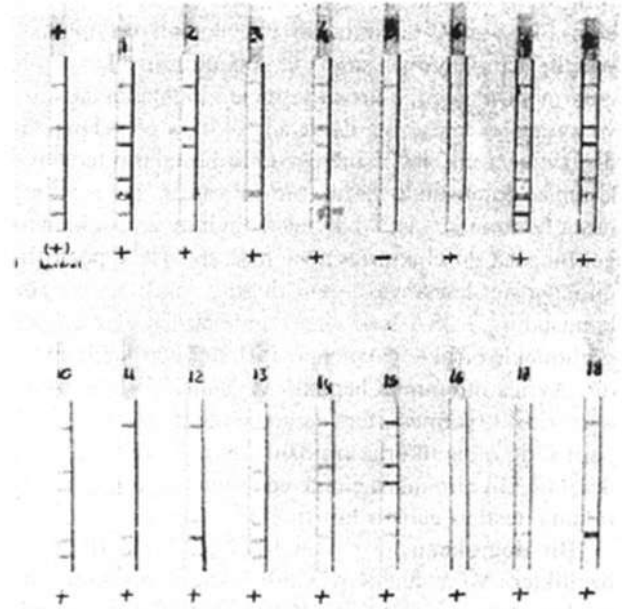
Çalışmamızda, çoğunluğu dializ hastaları olmak üzere infeksiyon hastalıkları kliniği, dahiliye ve çocuk kliniklerinden UBI, HCV EIA kiti ile anti HCV pozitif bulunmuş ve -20°C'de saklanmış 54 serum test edildi. Bunlardan 51'i Lia Tek HCV III ile de pozitif, üçü de negatif bulundu (Tablo 1).

Tablo 1. ELISA ve Lia Tek sonuçlarının servislere göre dağılımı

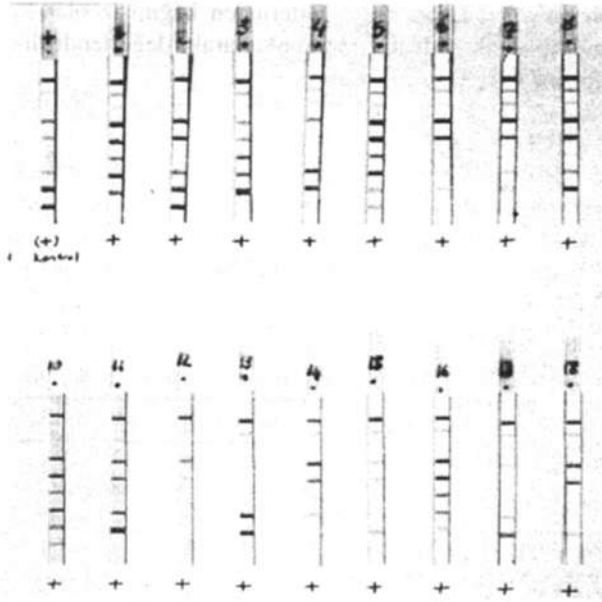
	ELISA (+)	Lia Tek III (+)	Lia Tek III (-)
Dializ	45	44	1
İnfeksiyon hast.	5	4	1
Dahiliye kl.	3	2	1
Çocuk kl.	1	1	-
Toplam	54	51	3

Pozitif sonuç veren 51 serum içinde dializ hastalarına ait olan 44'ünün (% 86.2) ALT ve AST seviyeleri normaldi. UBI HCV Organon kiti ile bulunan anti-HCV pozitiflikleri, Lia Tek HCV III ile de doğrulandığından, bunların asemptomatik taşıyıcı sayılabileceği ve bu sonuca göre toplumda asemptomatik HCV taşıyıcılığı oranının oldukça yüksek olduğu söylenebilir.

Toplam 54 serum kullanılan çalışmamızda elde ettiğimiz verilerle, en çok antikorun kapsid proteinlerine karşı oluştuğu görüldü. C1 antijenine karşı oluşan anti-



Resim 2: Kullanılan üç Lia Tek kitinden elde edilen sonuçlar.



Resim 3: Kullanılan üç Lia Tek kitinden elde edilen sonuçlar.

kor 54 serumdan 45'inde C2 antijenine karşı ise 54 serumdan 42'sinde mevcuttu. NS3'e karşı 54 serumda 42, NS4'e karşı aynı şekilde 54 serumda 42 pozitiflik görüldü. En az pozitiflik ise E2/NS1 ve NS5'e karşı oluşan antikorlardaydı. Her ikisi de 54 serumdan 17'sinde pozitif (Tablo 2).

### TARTIŞMA VE SONUÇ

HCV infeksiyonu, yeni teşhis metodlarının geliştirilmesiyle prevalansı gittikçe artan, sebep olduğu komplikasyonlar bakımından çok önemli bir infeksiyondur. Klinik gidişin sessiz ve silik olmasına karşın olguların yarısından çoğu kronikleşmekte, bunlarda da siroz ve karaciğer kanserine dönüşüm sıklıkla gözlenmektedir. İyi seçilmiş HCV infeksiyonlu hastaların tedaviye alınması konusunda görüş birliği vardır. İyi seçilmiş hasta tanımında yaş, ALT yüksekliğinin süresi, karaciğer biopsisi gibi faktörlerin yanında anti-HCV pozitifliğinin gösterilmesi ve bunun doğrulanması kriteri söz konusudur. ELISA testlerinde, giderek daha az oranda görülmekle birlikte yalancı pozitiflikler görülebilmektedir. Ayrıca otoimmün hepatitlerde anti-HCV'nin yalancı pozitiflik vermesi, tersine seronegatif karaciğer hepatit C'de otoantikorların pozitif olması pek de seyrek değildir. Bu durumları ekarte edebilmek için HCV doğrulama testleri geliştirilmiştir (7).

Bir doğrulama testi olan Lia Tek HCV III'ün ek özellikleri ve avantajları vardır. Diğer testlere göre strüktürel ve nonstrüktürel HCV bölgelerinden beş antijen içerdiğinden fazladan iki bölgesi vardır. Bu da çok yaygın antikor tesbiti ve ayırım spektrumu ile artmış sensitivite ile artmış spesifiklik sağlar. En fazla sayıda

Tablo 2. Test striplerinde oluşan antijen bandlarının değerleri

	No	C1	C2	E2/NS1	NS3	NS4	NS5
KİT I	1	+	+	+	+	+	-
	2	+	+	-	+	+	+
	3	+	+	+	+	+	-
	4	+	-	-	+	+	-
	5	+	+	+	+	+	+
	6	+	+	-	-	+	-
	7	+	+	-	+	+	-
	8	+	+	-	+	+	-
	9	+	-	-	+	-	-
	10	+	+	+	+	+	+
	11	+	+	-	+	+	-
	12	+	+	-	-	-	-
	13	-	-	-	+	+	-
	14	+	+	+	+	-	-
	15	+	+	-	+	+	-
	16	+	+	+	+	+	-
	17	+	+	+	+	+	-
	18	+	+	-	+	+	-
KİT II	1	+	+	-	+	+	+
	2	+	+	-	-	-	-
	3	+	+	-	-	+	-
	4	+	+	-	-	+	-
	5	-	-	-	-	-	-
	6	+	+	-	+	+	-
	7	+	+	+	+	+	+
	8	+	+	+	+	+	-
	9	+	+	-	+	+	-
	10	+	+	-	+	+	+
	11	-	-	-	+	+	+
	12	-	-	-	+	+	+
	13	+	+	-	+	+	+
	14	+	+	-	-	+	-
	15	+	+	-	+	+	-
	16	-	-	-	+	-	-
	17	+	+	-	+	+	+
	18	-	-	-	+	+	-
KİT III	1	+	+	+	+	+	+
	2	-	-	-	-	-	-
	3	+	+	+	+	+	+
	4	+	+	-	-	-	-
	5	+	+	+	+	-	-
	6	+	+	-	-	+	+
	7	+	+	-	+	-	-
	8	+	+	+	+	+	-
	9	+	+	-	+	-	-
	10	+	+	-	+	+	+
	11	+	+	+	+	+	+
	12	+	+	+	+	+	+
	13	+	+	-	+	+	-
	14	+	+	-	-	+	+
	15	-	-	-	+	+	-
	16	+	-	+	+	+	-
	17	-	-	-	-	-	-
	18	+	+	+	+	+	-

HCV genomik bölgelerine ait antijenler içerdiği için halen mevcut doğrulama testlerinin herhangi birine göre çok daha fazla bilgi sağlar görünmektedir.

Çalışmamızda 2. kuşak ELISA HCV kiti ile anti-

HCV pozitif bulduğumuz 54 serumun 51'inin Lia Tek HCV III ile de pozitif, üçünün ise yalancı pozitif olduğunu göstermiş olduk. Bu sonuç rutininde kullanılan ELISA testleri ile % 5.5 oranında yalancı pozitiflik bulunabileceğini gösterir. Fakat chi-square yöntemi kullanılarak yapılan istatistiksel çalışmada bu sonuç istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Daha kesin sonuçlara ulaşmak için daha geniş serilerle çalışılması gerektiğini düşünmekteyiz.

#### KAYNAKLAR

1. Stephen F: The virology of hepatitis J Gastroenterol Hepatol, 1991, 1: 26-27.
2. He LF, Alling D, Popkin T: Determining the size of non-A non B hepatitis virus by filtration. J Infect Dis, 1987; 636-640.
3. Viazov S, Zibert A, Ramakrishnan R: Typing of HCV isolates by DNA-EIA. J Virol Methods, 1994; 48: 81-92.
4. Barrera JM, Ercilla MG, Francis B: Earlier detection of anti-HCV seroconversion in posttransfusional NANBH by a prototype HCV 3rd ELISA. Viral Hep. and Liver Disease, s. 350-351, 1994, Tokyo.
5. Chaundharry RK, Mac Lean C: Evaluation of first and second generation RIBA kits for detection of antibody to HCV. Clin Mic, 1991, 29: 2329-2330.
6. Dow BC, Coote I, Munro H: Confirmation of HCV antibody in blood donors. J Med Virol, 1993, 40: 184-187.
7. Teo CG, Gabriel FGL, Mortimer PP: Confirmation of second generation anti-HCV ELISA by antigenic cross-validation. J Clin Path, 1992, 54: 917-920.