



# HIV ve HCV İnfeksiyonlarının Tanısında ELISA Yöntemiyle Antikor Saptanmasında “SMARTube” Kullanımının Etkisi

<sup>1</sup>Uzm. Dr. Nuray Durmaz

<sup>2</sup>Prof. Dr. Burçin Şener

<sup>3</sup>Bio. Betül Gümüştüoğlu

<sup>4</sup>Dr. Aygen Tümer

<sup>5</sup>Prof. Dr. Pınar Zarakolu Köşker

<sup>3</sup>Uzm. Dr. Kezban Tülay Yalçinkaya

<sup>1</sup>Uzm. Dr. Nermin Perçin

<sup>5</sup>Prof. Dr. Serhat Ünal

<sup>1</sup>Deri ve Tenasül Hastalıkları Dispanseri

<sup>2</sup>Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

<sup>3</sup>Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı

<sup>4</sup>Hacettepe Üniversitesi AIDS Tedavi ve Araştırma Merkezi

<sup>5</sup>Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı, İnfeksiyon Hastalıkları Ünitesi

## Giriş

İnsan immünyetmezlik virusu (HIV) ve Hepatit C virusu (HCV) tüm dünyada önemli oranda morbidite ve mortaliteye sahip infeksiyon etkenleridir. Dünya Sağlık Örgütü-UNAIDS Aralık 2010 verilerine göre dünyada 33.3 (31.1-35.8) milyon HIV enfekte kişi yaşamaktadır. HCV enfeksiyon prevalansının ise dünyada %2.2-3 arasında olduğu tahmin edilmekte, bu da yaklaşık 130-170 milyon kişinin HCV pozitif olduğunu göstermektedir.

HIV ve HCV erken tanısı ilgili infeksiyonların kontrolü ve tedavisi yanısıra kan bankacılığı başta olmak üzere toplum sağlığı açısından da önem taşımaktadır. Bu infeksiyonlarda özellikle “pencere dönemi” olarak tanımlanan dönemde infeksiyon tanısında problemler yaşanmaktadır. Pencere dönemi infeksiyon etkeninin vücuda girmesi sonrasında vücudun ölçülebilecek yeterlilikte antikor üretmesine kadar geçen zamandır. Pencere döneminin uzunluğu HIV’da 3 ay (30-180 gün), HCV’de 6 ay (70 -360 gün) olmakla birlikte kişiden kişiye, toplumdan topluma, ülkeden ülkeye değişebilmektedir. Pencere döneminde HIV/HCV antikor testi sonuçları negatif çıkabildiğinden, enfekte bireyler HIV/HCV virüsünü başkalarına bulaştırabilir.

ELISA yöntemi HIV ve HCV tanısında “Altın Standart” olup pencere dönemi bu yöntemle göre

tanımlanmaktadır. HCV enfeksiyonu tanısı, özgül anti-HCV antikorlarının kemiluminesans ya da enzim immünassay yöntemleri ile ve HCV viral nükleik asitin moleküler yöntemlerle saptanmasına dayanmaktadır. Bir HCV tarama kiti, mümkün olan en iyi özgüllükle birlikte yüksek bir duyarlılığa sahip olmalıdır. Günümüzde HCV tanısında en sık karşılaşılan problem düşük-risk grubu hastalarda saptanan yanlış pozitif anti-HCV sonuçlarıdır. WHO (World Health Organization) tüm pozitif ELISA sonuçlarının blot yöntemleri veya HCV-RNA saptayan yöntemlerle doğrulanmasını önermektedir. HCV-RNA sonucunun negatif olduğu durumlarda immünyoblot sonuçları belirsiz, pozitif ya da negatif olabilmektedir. Bu yüzden rutin uygulamada HCV laboratuvar tanısına yönelik problemler hala varlığını sürdürmektedir.

HIV erken tanısı, güvenli kan temini ve hastalığın yayılmasının önlenmesi açısından hayati öneme sahiptir. Duyarlılık ve özgüllüğü yüksek HIV antijen ve antikor saptayabilen kombine yöntemler 2001 yılından beri tanı ve tarama pazarına sunulmaktadır. HIV enfeksiyon seyrinde, HIV p24 antijeni enfeksiyonun erken döneminde, kanda HIV antikorları belirmeden önce ortaya çıkar ve yükselir. İnfeksiyonun devamında HIV antikorlarının yükselmesiyle eş zamanlı olarak p24 antijeni düzeyi düşerek antijen-antikor kombine yöntem-

ler için yeni bir pencere dönemi ortaya çıkarır. Nükleik asit amplifikasyon testleri (NAAT) serokonversiyon öncesinde primer HIV enfeksiyonu saptanmasına yardımcı olarak tarama ve tanı algoritmalarında önemli ve yardımcı bir role sahiptir. Ancak, pek çok ülkede NAAT hala pahalıdır ve düşük prevalansa sahip ülkelerde ekonomik yönü tartışma konusudur.

HIV ve HCV antikorlarının daha erken saptanmasına yönelik olarak geliştirilen "stimmunology" yöntemi antikor saptama testleri öncesi kan örneğine uygulanan bir ön-işlem ile pencere dönemi süresince beklemeden kısa sürede antikor üretimini sağlamak temeline dayanmaktadır. Bu yöntemde dayalı olarak geliştirilen SMARTube™ HIV ve HCV antikorlarının daha erken tespitini sağlayan bir ön-işlem aracıdır. Bu "ön-işlem" sayesinde oluşan Smart plazma, infekte ama ELISA testleri ile seronegatif olarak saptanan bireyler dahil olmak üzere, kan örneklerinde çoğaltılmış antikorlar aracılığıyla HIV/HCV enfeksiyonunun erken tanısını mümkün kılabilir.

Bu çalışmada Ankara'da bulunan iki hastanede HIV ve HCV antikorlarının ELISA yöntemi ile saptanmasında SMARTube uygulamasının değerlendirilmesi amaçlandı.

## Materyal-Metod

**Hasta Popülasyonu:** Mart-Haziran 2010 tarihleri arasında Hacettepe Üniversitesi Hastanesine başvuran hastalardan alınan kan örneklerinden 250 adet anti-HCV testi için, 6 adet örnek de anti-HIV testi için; Nisan 2010 döneminde rutin üç aylık kontroller için Deri ve Zührevi Hastalıklar Dispanserine gelen 512 kişiden alınan kan örnekleri ise anti-HIV ve anti-HCV testleri için çalışmaya alındı.

**Anti-HIV ve Anti-HCV Saptama Yöntemleri:** Alınan örneklerde hem normal plazmada hem de SMART plazmada hastanın endikasyonuna göre anti-HCV ve/veya anti-HIV testleri çalışıldı. Bu amaçla kan örnekleri üretici firmanın önerilerine uygun olarak alındı ve işlemden geçirildi. Kısaca; kan örnekleri heparinli tüplere alındıktan sonra bu tüplerden 1 ml. kan SMARTube™ (SMART Biotech Ltd., Israel)'lere aktarıldı. SMARTube'lerin kapakları gevşetilerek 37°C'deki %5 CO<sub>2</sub>-inkübatöre yerleştirildi ve 3 gün süreyle inkübe edildi. Bu tüplerin üst katmanından stimüle edilmiş SMART plazma toplandı. Testler SMARTube stimülasyonu öncesi

(normal plazma) ve sonrasında (Smart plazma) toplanan plazmalarda çalışıldı.

Hacettepe Üniversitesi Hastanesinde Anti-HCV testi anti-HCV kemiluminesans kiti (Architect i2000SR Abbott Laboratories, Diagnostics Division, IL, USA) kullanılarak gerçekleştirildi. Anti-HCV pozitif örneklerin doğrulaması Western blot assay (HCV Blot 3.0, MP Diagnostics, Cedex, France) ile yapılırken, anti-HIV pozitif örneklerin doğrulaması ise line immunoassay (INNO-LIA, HIV I/II Score, Innogenetics Biologicals, Belgium) ile yapıldı. Deri ve Zührevi Hastalıklar Dispanserinde ise anti-HCV testi DiaPro HCV Ab (Diagnostic Bioprobes, İtalya) ve anti-HIV testi Vironostica HIV Uni-Form II Ag/Ab (Biomerieux, Hollanda) kitleri ile yapıldı. HIV doğrulama testi Western blot yöntemi (Genelabs HIV Blot 2.2, MP Medicals, Singapore) ile gerçekleştirildi. Bütün tarama testleri üretici firmanın talimatlarına göre uygulandı. Belirsiz ve pozitif örnekler için HCV-RNA ve HIV-RNA testleri her iki merkezde de Cobas Ampliprep-Taqman Real-time PCR (Roche Diagnostics, USA) ile gerçekleştirildi.

## Bulgular

Hacettepe Üniversitesi Hastanesinde SMARTube'de stimülasyon öncesi ve sonrasında 250 HCV ve 6 HIV şüpheli plazma test edildi. Normal plazma ile yapılan test sonuçlarından 27'si HCV pozitif olarak değerlendirilirken smart plazma ile yapılan testlerde bu örneklerin 20'si HCV pozitif olarak değerlendirildi. Anti-HCV pozitif tüm örneklerde blot yöntemi ile doğrulama ve biri dışında tümüne HCV-RNA ile kantitasyon çalışması yapıldı. Smart plazma ile negatif bulunan 7 örneğin tamamı doğrulama ve HCV-RNA testleri ile yine negatif sonuç verdi. Sonuç olarak, stimüle edilmiş Smart plazma örnekleriyle daha az sayıda yanlış HCV pozitif sonuç elde edildi (Tablo 1). Örneklerin hiç birinde normal plazmada anti-HCV negatif iken Smart plazmada pozitif değer saptanmadı. Normal ve Smart plazmada pozitif sonuç veren 20 örnekten 18'i immunblot yöntemi ile de doğrulandı. Bu 20 örnekten 5 örnek dışındaki tüm örnekler HCV-RNA pozitif bulundu. Anti-HIV çalışılan örneklerden yalnızca bir örnek hem normal plazmada, hem de smart plazmada pozitif olarak belirlendi ve blot yöntemi ve moleküler testlerle doğrulandı.

Deri ve Zührevi Hastalıklar Dispanseri örneklerinin biri dışında tümü anti-HCV negatif bulun-

**Smart plazma,  
infekte ama  
ELISA testleri  
ile seronegatif  
olarak  
saptanan  
bireyler dahil  
olmak üzere,  
kan  
örneklerinde  
çoğaltılmış  
antikorlar  
aracılığıyla  
HIV/HCV  
enfeksiyonu-  
nun erken  
tanısını  
mümkün kılar.**



**TABLO 1** HCV Pozitif Örneklerde Normal Plazma ve Smart Plazma anti-HCV S/co Değerleri (cut-off <1), İmmunblot Sonuçları ve HCV-RNA Varlığı (Hacettepe Üniversitesi Hastanesi Verileri)

Hasta No.	Normal Plazma anti-HCV <sup>a</sup>	Smart Plazma anti-HCV	Anti-HCV Doğrulama	HCV-RNA
1	1.88	0.32	Negatif	Negatif
2	2.20	0.36	Negatif	Negatif
3	3.35	0.02	Negatif	Negatif
4	3.49	0.82	Negatif	Negatif
5	2.24	0.08	Negatif	Negatif
6	1.43	0.12	Negatif	Negatif
7	3.09	0.46	Negatif	Negatif

a:S/co değeri.

**TABLO 2** Deri ve Zührevi Hastalıklar Dispanseri anti-HIV Şüpheli Sonuçların Dağılımı

Hasta no.	Normal Plazma anti-HIV	Smart Plazma anti-HIV	Cut-off <sup>a</sup>	HIV Doğrulama	HIV-RNA
31	0.072	0.152	0.154	Negatif	Negatif
74	0.212	0.039	0.142	*	*
116	0.045	0.140	0.157	Negatif	
145	0.048	0.452	0.155	Negatif	Negatif

muştur. Bu örnek hem Smart plazmada hem de normal plazmada anti-HCV pozitif sonuç vermiştir. Bu merkeze ait anti-HIV verileri incelendiğinde 512 örnekten 1'inin Smart plazma ile anti-HIV pozitif, normal plazma ile negatif olduğu (hasta no: 145); 1 örneğin ise Smart plazma ile anti-HIV sınırda pozitif, normal plazma ile negatif olduğu (hasta no: 31) görülmüştür (Tablo 2). Bu kişilerden 3 ay sonra alınan kontrol örneğinin ise hem Smart plazma hem normal plazma sonucu anti-HIV negatif, HIV doğrulama testi ve HIV-RNA negatif olarak saptanmıştır. Bir başka örnekte ise normal plazma anti-HIV pozitif olarak saptanırken Smart plazma negatif olarak bulunmuş, bu örneğin HIV konfirmasyon ve HIV-RNA sonuçları da negatif olarak belirlenmiştir.

## Tartışma

Bu çalışmada Deri ve Zührevi Hastalıklar Dispanserine başvuran ve risk grubunda olan kişilerden alınan kan örneklerinden 3'ünde SMARTube'de uyarımı takiben anti-HIV değerlerinde normal plazmaya göre bir artış saptanmıştır. Bu örnekler

arasında 145 no'lu örnekte bu artış cut-off değerini geçerek sonucun anti-HIV pozitif olarak yorumlanmasını desteklemiştir. Bu örnekte SMARTube ile gerçekleştirilen işlem sonucunda plazma antikor düzeyleri net pozitif bir sonuç verecek kadar yükselmiş ve böylelikle olasılıkla pencere dönemindeki infekte bir kişinin tespiti sağlanmıştır. Bu örneğin HIV-RNA değeri negatif olarak saptanmıştır. Nükleik asit testleri kanda virüsü serokonversiyondan yaklaşık 10-12 gün önce saptamaktadırlar. Bu örnekte Smart plazma ile alınan erken anti-HIV pozitif sonuç SMART teknolojinin nükleik asit testlerine duyarlılık yönünden üstünlüğüne işaret edebilir. Ancak kesin bir yorum yapabilmek için bu olgunun serolojik profil ve viral yük açısından izlemi gereklidir. Benzer bir sonuç Mumo ve ark.nın Kenya'daki kan donörlerinde yaptığı HIV tarama çalışmasında da elde edilmiştir. SMARTube uygulaması sonucu anti-HIV pozitif sonuç alınan 15 olgunun 7'sinde eş zamanlı RT-PCR sonuçları HIV-RNA negatif olarak belirlenmiş ve lenfosit kültüründe gerçekleşen duyarlılaştırmanın nükleik asit testlerinden daha duyarlı olabileceği sonucuna varılmıştır. Diğer iki örnek SMARTube uygulamasını takiben yine cut-off de-

ğlerinin altında kalmış ve bunların HIV-doğrulama ve 31 no'lu örnekte HIV-RNA değerleri de negatif bulunmuştur. Bu veriler bu örneklerde anti-HIV varlığını dışlamaktadır.

Çalışmada yer alan merkezlerden Hacettepe Üniversitesi Hastanesinde ise toplam 7 örnekte normal plazmada elde edilen düşük düzey anti-HCV pozitifliğinin Smart plazmada anti-HCV negatif olarak saptandığı izlenmiştir. Bu örneklerin anti-HCV doğrulama ve HCV-RNA sonuçları da negatif olarak saptanmıştır. Benzer bir sonuç diğer merkezde bir örnekte anti-HIV için alınmış ve izlemde bu hastanın da HIV doğrulama ve HIV-RNA sonucunun negatif olduğu belirlenmiştir. Bu veriler ışığında SMARTube uygulaması sonucunda normal plazmada yanlış anti-HCV pozitifliğine yol açan faktörlerin dışlandığı ve antikor saptama testlerinin özgüllüğünün arttığı sonucuna varılabilir. HIV ve HCV infeksiyonlarında mikrobiyolojik testlerin kullanım amaçları transfüzyon/transplantasyon güvenliğinin sağlanması, surveians ve tanı olarak sıralanabilir. Amaçların yanı sıra toplumda infeksiyonun prevalansı ve kullanılacak testlerin duyarlılık ve özgüllüğü testlerin seçimini etkilemektedir. HIV ve HCV infeksiyonlarının tanısında yaygın olarak kullanılmakta olan yöntemler virusa karşı oluşan antikorları saptama esasına dayanan serolojik yöntemlerdir. HIV'a karşı oluşan antikorlar infeksiyondan 2-8 hafta sonra saptanabilir düzeye ulaşır. Bu nedenle akut ya da primer infeksiyon döneminde antikor tespitine dayalı testler yeterince yardımcı değildir.

HIV ya da HCV ile karşılaşmış, in-vivo duyarlı hale gelmiş hücrelerden in-vitro stimülasyon sonucu saptanabilir düzeyde antikor yapımını ve böylece erken dönemde tanıyı sağlayan, ardından kullanılacak standart testlerin duyarlılık ve özgüllüğünü arttıran bir yöntem olarak tanımlanan duyarlılaştırma kan "SMARTube" ile bir ön işleme tabi tutulmaktadır. "SMARTube" kullanımının infeksiyonların pencere döneminde olan seronegatif kişilerin tanısında ve transfüzyon/transplantasyon güvenliğinin sağlanmasında önemli rol oynayacağı ileri sürülmektedir. SMARTube/Stimmunology Teknolojisi, HIV ve/veya HCV ile önceden karşılaşmış ancak virüsler tarafından bloke edilmiş lenfositlerin vücut dışında (in vitro) aktivasyonuna dayanır. Lenfositler, aktivasyon ile erken dönemde antikor üretimini stimüle ederek, antikor düzeylerini tespit edilebilir düzeylere çıkarırlar. Bu aktivasyon işleminin sonucu; serum içerisinde tespit edilebilir düzeyde antikor bulunması ve mevcut tanı kitleri kullanılarak bu antikorların tespit edilebilmesidir. SMARTube ile ön-işlem uygulaması, kullanılan test kitinin HIV/HCV için özgüllüğünü

azaltmadan duyarlılığını artırır ve aynı zamanda yanlış pozitiflik oranlarını azaltır.

Kısıtlı sayıda örnekle gerçekleştirilmiş bu çalışmanın verileri SMARTube ile duyarlılaştırma yönteminin HCV ve HIV antikor saptama testlerinin duyarlılığını ve özgüllüğünü artırdığını göstermektedir. Özellikle HIV ve HCV açısından risk grubunda bulunan popülasyonun taramaları sırasında kullanılacak bir yöntem olan SMARTube ile duyarlılaştırma yöntemi erken tanı, tedavi ve toplum sağlığı açılarından avantaj sağlamaktadır. Bunun yanı sıra özellikle anti-HCV testlerinde görülen düşük düzey pozitiflik ve bunu takiben gereken doğrulama ve HCV-RNA testlerine olan gereksinimi azaltması bakımından maliyet etkin bir yöntem olarak kabul edilebilir.

## Kaynaklar

1. Kuo G, Choo QL, Alter HJ, et al. An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A, non-B hepatitis. *Science*. 1989; 244: 362-4.
2. Lavanchy D. The global burden of hepatitis C. *Liver Int*. 2009; 29 (Suppl 19): 74-81.
3. Mühlberger N, Schwarzer R, Lettmeier B, Sroczynski G, Zeuzem S, Siebert U. HCV-related burden of disease in Europe: a systematic assessment of incidence, prevalence, morbidity, and mortality. *BMC Public Health*. 2009; 22(9): 1-14.
4. Deutsch M, Hadziyannis SJ. Old and emerging therapies in chronic hepatitis C: an update. *J Viral Hepat*. 2008;15(1):2-11.
5. Mıstık R. Türkiye'de viral hepatit epidemiyolojisi - Yayınların irdelenmesi. In: Tabak F, Balık İ, Tekeli E, eds. *Viral Hepatit 2007*. Ankara: Viral Hepatitle Savaşım Derneği. 2007: 10-50.
6. Barut HŞ, Günel Ö. Dünyada ve Türkiye'de hepatit C epidemiyolojisi. *Klinik Derg*. 2009; 22(2): 38-44.
7. Tümer A, Ünal S. HIV/AIDS Epidemiyolojisi ve Korunma. *Güncel Bilgiler Işığında HIV/AIDS* (ed. S.Ünal); Bilimsel Tıp Yayınevi 2006; 9-27.
8. [www.unaids.org](http://www.unaids.org), Aralık 2010
9. Mumo J, Vansover A, Jehuda-Cohen T. Detecting seronegative-early HIV infections among adult versus student Kenyan blood donors, by using stimmunology. *Exp Biol Med* 2009; 234: 931-939.
10. WHO; [http://www.who.int/diagnostics\\_laboratory/publications/en/HIV\\_Report15.pdf](http://www.who.int/diagnostics_laboratory/publications/en/HIV_Report15.pdf)  
[http://www.who.int/diagnostics\\_laboratory/evaluations/en/hcv\\_rep2.pdf](http://www.who.int/diagnostics_laboratory/evaluations/en/hcv_rep2.pdf)
11. Doğrulama kit isimleri: HCV doğrulama kiti: HCV Blot 3.0 Western Blot Assay (MP Diagnostics, Singapur) HIV doğrulama kiti: HIV Blot 2.2 Western Blot Assay (MP Diagnostics, Singapur).

**SmarTube  
teknolojisi,  
HIV ve/veya  
HCV ile  
önceden  
karşılaşmış  
ancak virüsler  
tarafından  
bloke edilmiş  
lenfositlerin  
in vitro  
aktivasyonuna  
dayanır.**

