

HCV Enfeksiyonu Tanısında Anti-HCV Testi ve Eşik Değer

The Threshold Value of Anti-HCV Test in the Diagnosis of HCV Infection

Talat ECEMİŞ,^a
Sinem AKÇALI,^a
Pınar ERBAY DÜNDAR,^b
Tamer ŞANLIDAĞ^a

^aTıbbi Mikrobiyoloji AD,
^bHalk Sağlığı AD,
Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi
Manisa

Geliş Tarihi/Received: 29.11.2011
Kabul Tarihi/Accepted: 27.08.2012

Yazışma Adresi/Correspondence:
Talat ECEMİŞ
Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi,
Tıbbi Mikrobiyoloji AD, Manisa
TÜRKİYE/TURKEY
talat.ecemis@gmail.com

ÖZET Amaç: Hepatit C virüs (HCV) enfeksiyonunun tanısında ilk basamak anti-HCV antikorlarının taranması ve pozitif sonuçların genellikle nükleik asit amplifikasyon testleri ile onaylanması şeklindedir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, anti-HCV enzim immünoassay (EIA) testi için, rutin reaktivite eşiği olan S/Co'nun (signal to cut-off) 1'den büyük değerlerde kullanılmasıyla HCV-RNA testi ile daha uyumlu sonuçların elde edileceği bildirilmektedir. Biz de bu çalışmada anti-HCV EIA testi için, HCV enfeksiyonunu öngören en uygun S/Co değerini tespit etmek istedik. **Gereç ve Yöntemler:** Mikropartikül EIA yöntemiyle anti-HCV ve hibridizasyon yöntemiyle HCV-RNA testleri çalışılmış 387 hastanın sonuçları karşılaştırıldı. HCV enfeksiyonu için HCV-RNA testi altın standart olarak kabul edilerek, EIA testinin özgüllük, duyarlılık ve prediktif değerleri belirlendi ve en uygun reaktivite eşiğini tespit etmek amacıyla istatistiksel "receiver operating characteristic" (ROC) analizi uygulandı. **Bulgular:** EIA sonuçlarına göre; 197 (%49,1) pozitif, 190 (%50,9) negatif sonuç elde edildi ve testin duyarlılığı %94,9, özgüllüğü %60,4 bulundu. Pozitif ve negatif prediktif değerleri sırasıyla %38,1 ve %97,9 olarak hesaplandı. ROC analizine göre en uygun S/Co değeri 5 olarak belirlendi ve bu değere göre duyarlılık %92,4, özgüllük %76,6 bulundu. Pozitif ve negatif prediktif değerleri ise sırasıyla %50,3 ve %97,5 olarak hesaplandı. **Sonuç:** HCV enfeksiyonu tanısında kullanılabilecek en uygun anti-HCV EIA reaktivite değerleri araştırıldı ve S/Co ≥ 5 bulundu.

Anahtar Kelimeler: Hepatit C antikorları; immünoenzimatik yöntem; eşik limit değerler

ABSTRACT Objective: The initial step in the diagnosis of hepatitis C virus (HCV) infection is to screen for anti-HCV antibody, followed by confirmation of positive results with nucleic acid amplification tests. In the recent studies, using reactivity threshold, S/Co (signal to cut-off) ratio greater than 1 has yielded results that are highly consistent with HCV-RNA test. We aimed to determine the most appropriate S/Co level for anti-HCV enzyme immunoassay (EIA) that would predict HCV infection. **Material and Methods:** We compared the results of 387 patients acquired by Anti-HCV using microparticle EIA and HCV-RNA using hybridization methods. Taking the HCV-RNA test as gold standard for HCV infection, the sensitivity, specificity and predictive values of EIA test were determined and receiver operating characteristic (ROC) analysis was performed to detect the best threshold of reactivity. **Results:** EIA test showed 197 (49.2%) positive and 190 (50.9%) negative results, and the sensitivity and specificity were calculated as 94.9% and 60.4%, respectively. Positive and negative predictive values were 38.1% and 97.9%, respectively. ROC analysis revealed that the best S/Co level was 5 and, based on this value, sensitivity and specificity were 92.4% and 76.6%, respectively. Computed positive predictive value was 50.3% and negative predictive values was 97.5%. **Conclusion:** We investigated the best values of reactivity for anti-HCV EIA test and found S/Co ≥ 5 .

Key Words: Hepatitis C antibodies; enzyme-linked immunosorbent assay; threshold limit values

Hepatit C virüs (HCV) enfeksiyonu, dünyadaki önemli sağlık sorunlarından birini oluşturmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü, dünya nüfusunun yaklaşık %3'ünün HCV ile enfekte olduğunu tahmin etmektedir.¹ Türkiye'de ise yaklaşık 600 000 hasta mevcut olup, bu oran %0,3-1,8 arasında değişmektedir.² Enfeksiyon sıklıkla asemptomatiktir, fakat enfekte kişilerin %80'inden fazlasında persistan hale gelebilir ve bu durum, kronik hepatit, siroz ya da hepatoselüler karsinomaya neden olabilir.¹ Mikrobiyoloji laboratuvarı HCV enfeksiyonlarının tanısında önemli bir role sahiptir. Tanıda ilk basamağı, anti-HCV antikorlarının enzim immünoassay (EIA) veya kemilüminesan immünoassay yöntemle tespiti oluşturmaktadır. Günümüzde anti-HCV testlerinin yüksek özgüllük ve duyarlılığa sahip olmasına rağmen, özellikle HCV enfeksiyonu prevalansının %10'dan düşük olduğu toplumlarda yalancı pozitif sonuçlar görülebilmektedir bu nedenle anti-HCV sonuçlarının rekombinant immunblot assay (RIBA) ile veya viremiyi belirleyen nükleik asit amplifikasyon testleri (NAT) ile doğrulanması önerilmektedir.^{3,4}

EIA ile anti-HCV sonuçlarının yorumlanmasında reaktivite eşiği olarak, test örneğinin optik dansitesinin cut-off'a oranıyla elde edilen S/Co değeri kullanılmaktadır.⁴ Üretici firmaların da önerdiği şekilde S/Co \geq 1 olması pozitif olarak kabul edilmektedir. Son zamanlarda bu konuda yapılan çalışmalarda, anti-HCV S/Co değerinin viremiyi kestirmede önemli olduğu ve yüksek S/Co değerlerinin HVR-RNA ile daha uyumlu olduğu belirtilmekte ve HCV enfeksiyonunu tanısında kullanılabilecek en iyi S/Co değerleri önerilmektedir.⁵⁻⁸

Biz de bu çalışmada kullandığımız anti-HCV mikropartikül EIA testinin viremiyi öngörmedeki performansını, ve bu test için duyarlılık ve özgüllük yönünden en uygun S/Co değerini tespit etmek istedik.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji laboratuvarlarında, hem mikropartikül EIA yöntemiyle anti-HCV (AxSYM® System, HCV v3.0, Abbott, ABD) hem de hibridi-

zasyon yöntemiyle HCV-RNA (branched DNA [Versant®, HCV RNA 3.0, Bayer, ABD]) testlerinin rutin çalışıldığı 387 hastanın sonuçları karşılaştırıldı. Üretici firmanın önerilerine göre çalışılan testlerde, anti-HCV için reaktivite eşiği olarak S/Co=1 alındı. Bu değerinin üzerindeki pozitif, S/Co değeri 0,8'den küçük olanlar negatif kabul edildi, bu iki değer arasındakiler "gri bölge" olarak değerlendirildi ve test tekrarı yapıldı.

Veri analizinde, HCV enfeksiyonu tanısında viremiyi belirleyen HCV-RNA testi altın standart olarak kabul edilerek, anti-HCV testinin viremiyi öngörmedeki performansı ve özgüllük, duyarlılık ve prediktif değerleri SPSS v15.0 istatistik programında hesaplanarak belirlendi. Özgüllük ve duyarlılık yönünden en uygun anti-HCV reaktivite eşiğini tespit etmek amacıyla, farklı S/Co değerlerindeki HCV-RNA sonuçlarını değerlendiren ROC analizi uygulandı ve Youden indeksleri hesaplandı. Anti-HCV ile HCV-RNA arasındaki uyum McNemar testi ile değerlendirildi.

BULGULAR

Çalışmadaki 180 (%46,5)'i erkek, 207 (%53,5)'si kadın olan 387 kişiye ait anti-HCV sonuçlarına göre; 197 (%49,1) pozitif, 190 (%50,9) negatif bulundu. Aynı kişilere ait HCV-RNA sonuçları ise; 79 (%20,4)'u pozitif, 308 (%79,6)'i negatifti. HCV-RNA altın standart kabul edilerek anti-HCV testinin duyarlılığı %94,9, özgüllüğü %60,4 belirlendi. Pozitif prediktif değeri (PPD) %38,1, negatif prediktif değeri (NPD) ise %97,9 olarak hesaplandı. Anti-HCV ile HCV-RNA arasındaki uyum istatistiksel olarak anlamlı bulundu (p<0,001) (Tablo 1).

Reaktif anti-HCV testlerine ait S/Co değerleri 1,08 ile 152,15 arasında değişmekteydi. Hastalar S/Co değerlerine göre gruplara ayrılarak, HCV-RNA sonuçlarıyla karşılaştırıldığında; HCV-RNA pozitifliği 1 \leq S/Co \leq 2 grubunda 2 hastada yer alırken, 2,1 \leq S/Co \leq 5 gruplarında hiçbir hastada mevcut değildi ve 5,1 değerinden sonra hasta sayısının gittikçe arttığı gözlemlendi (Tablo 2).

Uygulanan ROC analizinde eğri altındaki alan için 0,852 değeri elde edildi ve istatistiksel olarak anlamlı (p<0,001) bulundu (Şekil 1).

TABLO 1: Anti-HCV ve HCV-RNA sonuçları.

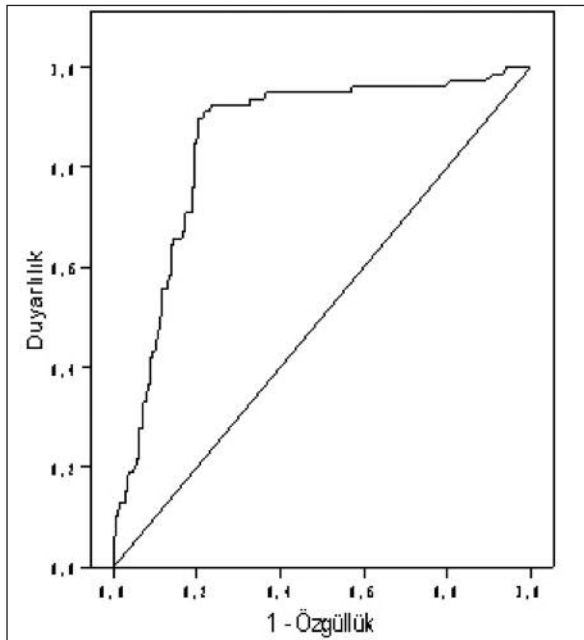
	HCV-RNA			Toplam % (%)
	Pozitif ¹ (%)	Negatif ¹ (%)		
Anti-HCV	Pozitif	75 (94,9)	122 (39,6)	197 (50,9)
	Negatif	4 (5,1)	186 (60,4)	190 (49,1)
Toplam ² (%)		79 (20,4)	308 (79,6)	387 (100)

¹HCV-RNA'daki yüzde oranı,²Toplamdaki yüzde oranı,

p<0,001 (McNemar testi), HCV: Hepatit C virüs.

TABLO 2: Gruplandırılmış anti-HCV S/Co değerlerine göre HCV-RNA sonuçları.

Anti-HCV S/Co	HCV-RNA		Toplam
	Pozitif ¹ (%)	Negatif ¹ (%)	
1,0-2,0	2 (6,7)	28 (93,3)	30
2,1-3,0	-	10 (100)	10
3,1-4,0	-	10 (100)	10
3,1-5,0	-	2 (100)	2
5,1-8,0	2 (25)	6 (75)	8
8,1-20,0	8 (57,1)	6 (42,9)	14
20,1-50,0	3 (60)	2 (40)	5
≥ 50,1	60 (50,8)	58 (49,2)	118
Toplam	75	122	197

¹Anti-HCV kategorisindeki yüzde oranı, S/Co: Signal to cut-of, HCV: Hepatit C virüs.**ŞEKİL 1:** HCV-RNA sonuçlarına göre anti-HCV S/Co değerlerinin ROC analizi.

S/Co: Signal to cut-of, HCV: Hepatit C virüs.

ROC analizinde, HCV-RNA altın standart kabul edilip, toplam 387 kişinin anti-HCV S/Co değerlerindeki duyarlılık ve özgüllükleri belirlenerek, Youden indeksleri hesaplandı ve S/Co=5,06'nın en uygun değer olduğu belirlendi (Tablo 3). Bu değere göre duyarlılık %92,4, özgüllük %76,6 tespit edildi. McNemar testi ile Anti-HCV ile HCV-RNA arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,001$). PPD ve NPD ise sırasıyla %50,3 ve %97,5 olarak hesaplandı (Tablo 4).

TARTIŞMA

HCV enfeksiyonunun laboratuvar tanısında günümüzde uygulanan algoritma, genellikle bir tarama testi olarak anti-HCV antikorlarının tespiti ve pozitiflik halinde daha ileri bir test ile (NAT veya RIBA) doğrulanması şeklindedir.³ Yaptığımız McNemar analizlerinde anti-HCV ile HCV-RNA arasındaki istatistiksel fark anlamlı bulunmuştur.

Epidemiyolojik olarak, bir toplumda hastalığın prevalansı düşükse, hem yanlış pozitiflik oranı artar, hem de testin PPD'si düşer. Ülkemiz, dünyadaki HCV prevalansının düşük olduğu ülkelerden olup, %1 gibi bir prevalans sergilemektedir.² Rutin uygulanan şekliyle, anti-HCV antikorlarının tespiti için üretici firmaların önerileri doğrultusunda reaktivite eşik değeri olarak S/Co=1 kullandığımızda, HCV-RNA'ya göre anti-HCV'nin uyumsuz pozitiflik oranını %39,6 tespit ettik. Benzer sonuçlar daha önce yapılmış çalışmalarda da değişen oranlarda gösterilmiştir.^{5,9,10} Hatta Dufour ve ark.nın çalışmasında, düşük pozitif anti-HCV grubunda HCV-RNA göre negatiflik oranı %86 bulunmuş, ve eşik değer olarak S/Co=3,7 aldıklarında yalnızca pozitiflik oranı %10'a düşüğü tespit edilmiştir.¹¹

Ticari markalara göre uygun S/Co değerleri değişiklik göstermektedir. Çin'de 7 farklı anti-HCV test kiti ile yapılan çalışmada, %95 oranında HCV-RNA tarafından doğrulanan S/Co değerlerin 3,8 ile 14 arasında değiştiği gösterilmiştir.⁵ Ülkemizden yapılan bir çalışmada ise Sayan ve ark.nın bizimkiyle aynı ticari marka anti-HCV kiti ile yaptıkları çalışmada, S/Co için en uygun eşik değeri, 3,8 olarak tespit edilmiştir.¹⁰ Bazı çalışmalar ise duyarlılık ve özgüllüğün arttığı en iyi S/Co değerini 10 civa-

TABLO 3: ROC analizine göre örnek olarak seçilmiş anti-HCV S/Co değerlerinin HCV-RNA'ya göre duyarlılık ve özgüllük oranları.

Anti-HCV S/Co	Duyarlılık %	Özgüllük %	Youden indeksi
1,03	94,9	60,1	0,550
1,97	92,4	68,8	0,612
2,64	92,4	72,1	0,645
3,63	92,4	75,0	0,674
4,05	92,4	76,0	0,684
4,48	92,4	76,3	0,687
5,06	92,4	76,6	0,690
6,27	91,1	77,3	0,684
7,51	91,1	77,9	0,690
8,06	89,9	78,6	0,685
9,73	88,6	79,5	0,681
10,11	88,6	79,9	0,685
22,66	79,7	80,5	0,602

S/Co: Signal to cut-of, HCV: Hepatit C virüs.

TABLO 4: S/Co=5'e göre Anti-HCV ve HCV-RNA sonuçları.

	HCV-RNA		
	Pozitif ¹ (%)	Negatif ¹ (%)	Toplam ² (%)
Anti-HCV	Pozitif 73 (92,4)	Negatif 72 (23,4)	145 (37,5)
	Negatif 6 (7,6)	236 (76,6)	242 (62,5)
Toplam ² (%)	79 (20,4)	308 (79,6)	387 (100)

¹HCV-RNA'daki yüzde oranı,²Toplamdaki yüzde oranı,

p<0,001 (McNemar testi), HCV: Hepatit C virüs.

rında bildirmişlerdir.^{4,6} Viremiyle uyumsuz anti-HCV negatifliklerinin önemli nedeni olarak, anti-HCV testinin antikor oluşumundan önceki dönemde (pencere dönemi) yapılması olabilir veya kronik enfeksiyonlu immün yetersiz hastalarda persistan olarak anti-HCV negatifliği görülebilir. Yanlış negatiflikte immün yetmezlik daha önemli bir neden olabileceği belirtilmektedir.¹²

Çalışmamızın yukarıda söz edilen çalışmalardan önemli bir farkı istatistiksel analiz yöntemidir. İkili sınıflandırma sistemlerinde, ayırım eşik değerinin farklılık gösterdiği durumlarda, eşik değerinin en iyi noktasını tespit edilebilen yöntem olan ROC analizi yapıldı.¹³ Pozitif HCV-RNA testiyle uyumlu en iyi S/Co için "5" değeri elde edildi. Bu değere göre anti-HCV duyarlılığı sadece %2,5

azalarak %92,4 olurken, özgüllüğün %16,5 artarak %76,6'ya çıktığı görülmektedir. Ayrıca testin güvenilirliğinin önemli göstergesi olan PPD %38,1'den %50,3'e çıkmaktadır; buna karşılık NPD ise sadece %0,4 gibi önemsiz oranda azalmaktadır. Daha yüksek S/Co değerlerinde, özgüllükteki küçük artışlara rağmen duyarlılığın daha büyük oranda azaldığı görülmektedir (Tablo 3). Pratik olarak bu sonucun, özgüllükteki önemli artışa rağmen, duyarlılığın değişmediği şeklinde yorumlanması mümkün olabilir. Nitekim, Seo ve ark. daha fazla sayıyla (661 hasta) yaptıkları çalışmaları, %73,7 olan duyarlılığın, benzer şekilde ROC analizi kullanarak tespit edilen en uygun S/Co değerine göre (10,9) %94,4'e çıktığını belirlemiştir.⁴

HCV enfeksiyonu için sadece anti-HCV ile karar vermenin iki önemli sonucu olabilir; birincisi yanlış laboratuvar sonucuna göre klinik tanı, ya da viremiyle uyumsuz pozitif EIA sonuçların yarattığı güvensizlik, ikincisi anti-HCV ile beraber ileri bir testin birlikte istenmesi. Birinci ihtimal imkanı kısıtlı şartlarda söz konusu olabilir ve sonuçları tıbbi, psikolojik ve sosyal açıdan çok daha vahim iken, ikinci ihtimalin en önemli sonucu ise zaman ve ekonomik kayıptır. Hastalık kontrol ve Önleme Merkezleri (DCC) raporunda NAT ya da RIBA test isteklerinin %75'inin laboratuvar önerileriyle değil, klinisyenin kendi isteği doğrultusunda olduğu bildirilmiştir.¹⁴

Rutin uygulanan şekliyle, S/Co=1 kullanıldığında duyarlılık oranı tatmin edici düzeyde görünmektedir (%94,9). Ancak bir toplumda hastalığın prevalansı düşükse, hastaları ayırmak kadar sağlamları da ayırmak önem kazanmaktadır. Özellikle de pozitif anti-HCV sonucunu doğrulama imkanı olmayan şartlarda bunun önemi daha da artmaktadır. HCV-RNA ile uyumsuz, %39,6 olarak bulduğumuz anti-HCV pozitiflik oranı, S/Co=5 olarak %13,4'e düşürülmekte, duyarlılık ise çok düşük düzeyde etkilenmektedir ya da bir çok çalışmada gösterildiği gibi artmamaktadır. S/Co=1-5 aralığındaki değerlerde HCV-RNA pozitifliklerinin bulunduğu göz önüne alınırsa (çalışmamızda 2 hasta), böyle sonuçlarının değerlendirilmesinde, klinik ve biyokimyasal testlerle birlikte ele alınmasının en uygun

yaklaşım olabileceği söylenebilir. Söz konusu ara-
lıktaki şüpheli bir kişide NAT testinin yapılması
uygun olabilir, ancak semptomsuz hastada tarama
amaçlı yapılmış anti-HCV testi sonucunda, bu ara-
lıkta elde edilmiş S/Co değeri kuşkuyla karşılan-
malıdır.

Sonuç olarak çalışmamıza göre, EIA ile yapı-
lan anti-HCV testinde eşik olarak S/Co=5 ve daha
büyük değerlerin kullanılmasının HCV enfeksi-

yonlarını belirlemede daha uygun olacağı sonucuna
vardık. Bu değerlerin altındaki S/Co değerleri için kli-
nik durum göz önüne alınarak ileri bir doğrulama
testinin istenmesi uygun bir yaklaşım olacaktır.
Her laboratuvarın kendi test kitine göre en uygun
S/Co değerini belirlemesi ve anti-HCV testinin
daha iyi değerlendirilmesi için sonuç raporlarında
S/Co değerini belirtmesi ve klinisyeni bu konuda
bilgilendirmesi gereklidir.

KAYNAKLAR

1. Rao HY, Ren FR, Guan WL, Houde M, Du SC, Liu CL, et al. Evaluation of the performance of the EIAgen HCV test for detection of hepatitis C virus infection. *J Virol Methods* 2009;162(1-2):203-7.
2. Atılgan R, Kavak SB, Aygen Ç. [The ratio of hepatitis B and hepatitis C seropositivity in pregnant]. *Türkiye Klinikleri J Gynecol Obst* 2009;19(1):34-7.
3. Watterson JM, Stallcup P, Escamilla D, Chernay P, Reyes A, Trevino SC. Evaluation of the Ortho-Clinical Diagnostics Vitros ECi Anti-HCV test: comparison with three other methods. *J Clin Lab Anal* 2007;21(3):162-6.
4. Seo YS, Jung ES, Kim JH, Jung YK, Kim JH, An H, et al. Significance of anti-HCV signal-to-cutoff ratio in predicting hepatitis C viremia. *Korean J Intern Med* 2009;24(4):302-8.
5. Ren FR, Lv QS, Zhuang H, Li JJ, Gong XY, Gao GJ, et al. Significance of the signal-to-cutoff ratios of anti-hepatitis C virus enzyme immunoassays in screening of Chinese blood donors. *Transfusion* 2005;45(11):1816-22.
6. Bossi V, Galli C. Quantitative signal of anti-HCV by an automated assay predicts viremia in a population at high prevalence of hepatitis C virus infection. *J Clin Virol* 2004;30(1):45-9.
7. Contreras AM, Tornero-Romo CM, Toribio JG, Celis A, Orozco-Hernández A, Rivera PK, et al. Very low hepatitis C antibody levels predict false-positive results and avoid supplemental testing. *Transfusion* 2008;48(12):2540-8.
8. Kim S, Kim JH, Yoon S, Park YH, Kim HS. Clinical performance evaluation of four automated chemiluminescence immunoassays for hepatitis C virus antibody detection. *J Clin Microbiol* 2008;46(12):3919-23.
9. Chiquete E, Sánchez LV, Maldonado M, Quezada D, Panduro A. Prediction of the hepatitis C viremia using immunoassay data and clinical expertise. *Ann Hepatol* 2005;4(2):107-14.
10. Sayan M, Meriç M, Mutlu B, Celebi S, Willke A. [Low positive anti-HCV microparticle enzyme immunoassay results: do they predict hepatitis C virus infection?]. *Mikrobiyol Bul* 2006;40(1-2):81-4.
11. Dufour DR, Talastas M, Fernandez MD, Harris B, Strader DB, Seeff LB. Low-positive anti-hepatitis C virus enzyme immunoassay results: an important predictor of low likelihood of hepatitis C infection. *Clin Chem* 2003;49(3):479-86.
12. Vermeersch P, Van Ranst M, Lagrou K. Validation of a strategy for HCV antibody testing with two enzyme immunoassays in a routine clinical laboratory. *J Clin Virol* 2008;42(4):394-8.
13. Bewick V, Cheek L, Ball J. Statistics review 13: receiver operating characteristic curves. *Crit Care* 2004;8(6):508-12.
14. Alter MJ, Kuhnert WL, Finelli L; Centers for Disease Control and Prevention. Guidelines for laboratory testing and result reporting of antibody to hepatitis C virus. Centers for Disease Control and Prevention. *MMWR Recomm Rep* 2003;52(RR-3):1-13, 15; quiz CE1-4.