

ANTI-HIV ANTİKORLARININ TARANMASINDA PARTİKÜL AGGLUTINASYON
DENEYİNİN KULLANILABİLİRLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

OKUYAN, M., ABACIOĞLU, H., CHARCKHI, G.H.

ÖZET: Jelatin partikül agglütinasyon testinin HIV antikorlarının saptanmasında kullanılabilirliğini saptamak üzere 4039 serum örneği içinden özel olarak seçilen 76 serum örneği indirekt immunofloresans deneyi ile karşılaştırmalı olarak çalışıldı. Indirekt immunofloresans deneyi ile pozitif olan tüm örnekler partikül agglütinasyon ile de pozitif bulundu. Onyeddi örnekte ise partikül agglütinasyon ile yalancı pozitif sonuç alındı. Bu yalancı pozitif sonuçların nedenini saptamak üzere yapılan testlerde romatoid faktör pozitifliğinin etkili olabileceği saptandı. Partikül agglütinasyon deneyi yalancı negatif sonuçlar vermemesi, yanında kolay uygulanabilmesi ve ek donanımlara gerek olmaması, gibi avantajları nedeniyle birinci basamak testi olarak kullanılabilir.

ABSTRACT: Melahat OKUYAN, Hakan ABACIOĞLU, Golamreza, Hashem-poor, CHARCKHI, To search on aplicability of a particle agglutination assay for anti-HIV sreening.

A gelatin particle agglutination assay was compared with indirect immunofluorescence by using 76 sera samples which were chosen among 4039 sera. All of the samples which were positive by indirect immunoflorescence were also positive by particle agglutination. Seventeen samples were found false positive by particle agglutination. Among several factors investigated, rheumatoid factor was found to be a major risk factoral of giving false positive results. Besides the fact that the particle agglutination assay did not give false negave results, it is simple to perform and does not necessiate any specialized equipment. Therefore, it can be used as a primary screening test.

Anahtar sözcükler: Partikül agglütinasyon testi, birinci basamak tarama testi, romatoid faktör.

Key words: Particle agglutination assay, primary screening test, rheumatoid factor.

Prof.Dr.Melahat Okuyan, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı ve AIDS Merkezi Başkanı, Öğretim Üyesi, Araş.Gör.Hakan Abacıoğlu, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, AIDS Lab. Sorumlusu, Doktora öğrencisi Golamreza, Hashem-poor, Mikrobiyoloji Anabilim dalı

AIDS hastalığının etkeni olan HIV kan, semen ve servikal sekresyonlar gibi vücut çıkartılarında bulunabilmekte ve virusun bulaşımı sağlam bireylerin enfekte kişilerin bu tür çıkartıları ile karşılaşması sonucu olmaktadır.

HIV enfeksiyonunun kan ve kan ürünleri ile sağlam bireylere aktarılabilmesi, kan bankalarında kan vericilerinin serumlarının HIV antikörleri yönünden araştırılmasını zorunlu kılmıştır. Bu amaçla HIV antikörlerinin saptanmasına yönelik birçok test yöntemi geliştirilmiştir. Bu yöntemlerin içinde Enzyme Immuno Assay (EIA) testleri en çok kullanılanlarıdır. Doğrulama testleri olarak ta Western blotting (WB), Indirect Immunofluorescence Assay (IFA) ve Radioimmunoprecipitation Assay (RIPA) kullanılmaktadır.

Son yıllarda tarama testi olarak aglütinasyon temeline dayanan testler piyasaya çıkmıştır. Bu testler taşıyıcı bir partikül üzerine HIV antijenleri kaplanması ve bu kaplı partiküllerin insan serumu ile uygun dilasyonlarda karıştırılarak aglütinasyon verip vermemesi temeline dayanmaktadır.

Taşıyıcı partikül olarak jelatin (örneğin, Particule Agglutination, Serodia-HIV, Fujirebio Inc, Japonya), Latex (örneğin, Campridge Bioscience latex agglutination, İngiltere), ya da eritrosit (örneğin, Abbott, Retrocell HIV-1, Abbott, B.Almanya) kullanılmaktadır.

Bu çalışmada aglütinasyon temeline dayalı jelatin partikül aglütinasyon (PA) testinin (Serodia-HIV), Fujirebio Inc. Japon) HIV antikörlerinin aranmasında kullanılabilirliğinin araştırılması amaçlanmıştır.

MATERYAL METOD:

A) Serum Örnekleri:

Anagrup: Mart 1987-Haziran 1989 tarihleri arasında DEÜTF Mikrobiyoloji Anabilim Dalı AIDS Merkezinde çalışılan 4039 serum örneğinden oluşmuştur. PA için deneye alınan serumlar 5 panel içinde gruplaştırılmıştır. Tüm gruplarda PA deneyi yapılmıştır.

Panel 1 serumları: Anagruptan seçilen 76 serum örneğinden oluşmuştur. Bunların 14'ü HIV antikörleri kesin pozitif olan serumlardır. Bu grupta ayrıca IFA deneyi de çalışılmıştır.

Panel 2 serumları: Panel 1 serum örneklerinde PA ile yalancı pozitif sonuç veren 17 serumla birlikte, çeşitli merkezlerde yapılan EIA testlerinde pozitif sonuç alınıp merkezimize doğrulanmak üzere gönderilmiş ve sonuçta HIV antikörleri negatif olarak değerlendirilmiş

24 serumdan oluşmuştur. Kırkbir serumdan oluşan bu gruba EIA ve IFA deneyleri yanısıra yalancı pozitif sonuçların nedenini araştırmak üzere Anti-Nükleer Antikor (ANA), Hepatit-B yüzey antijeni (HB Ag), Rapid Plasma Reagin (RPR), C-Reaktif Protein (CRP) ve Romatoid Faktör (RF) testleri de uygulanmıştır.

Panel 3 serumları: Laboratuvarımız serum bankasından sağlanan 41 adet RF pozitif serumdan oluşmuştur.

Panel 4 serumları: Laboratuvarımız serum bankasından sağlanan 10 adet kuvvetli ANA pozitif serumdan oluşmuştur.

B)Uygulanan Teknikler:

a)Jelatin Partikül Aglutinasyon testi: Serodia-HIV Partikül Aglutinasyon (Fujierebio Inc, Japonya) testi firmanın önerdiği prosedüre göre çalışıldı.Kısaaca,U tabanlı çukür içeren mikropleytlerde 25 mikrolitrelik serum örneği 1/4, 1/8 ve 1/16 oranında sulandırıldı. 1/8'lik dilüsyon içeren çukurlara 25 mikrolitre, antijenle kaplı olmayan kontrol partikülleri, 1/16'lık çukura ise 25 mikrolitre antijenle kaplı partiküller pipetlendi. Oda ısısında en az 2 saat enkübe edildikten sonra çıplak gözle sonuçlar değerlendirildi. Her testte pozitif kontrol serumu kullanıldı.

Yalnızca antijenle kaplanmış partiküllerle aglutinasyon veren serumlar "pozitif"; aglutinasyon oluşturmayan serumlar "negatif"; antijenle kaplanmış ve kaplanmamış partiküllerin her ikisiyle de aglutinasyon olması ise "non spesifik aglutinasyon" olarak değerlendirildi. Non spesifik aglutinasyon veren serumlar antijenle kaplı olmayan partiküllerle absorbe edildikten sonra yeniden çalışıldı.

b)Anti-HIV IFA testi: Testlerin bir kısmı Giessen Üniversitesi Medikal Viroloji Enstitüsünden Dr.W.R. Willems'in hazırladığı kitle, bir kısmı da Diagen firmasından (HIV Inspector/IF test, Diagen B&G, Batı Almanya) sağlanan kitlerle çalışıldı. Serum örnekleri 1/10 oranında sulandırıldıktan sonra 10'ar mikrolitre hem HIV ile enfekte lenfositler içeren çukurlara, hem de enfekte edilmemiş lenfositler içeren çukurlara pipetlendi. Enkübasyon, yıkama ve kurutma basamaklarından sonra her çukura 10 mikrolitre FITC ile işaretli anti-insan IgG'si pipetlendi. Enkübasyon ve yıkamanın ardından lamaların üzerine kaplama tamponu damlatıldı ve lamelle kapatıldı.

Lamlar Leitz Floresan Mikroskopta x 400 büyütmede incelendi. Her çalışmada pozitif kontrol serumu kullanıldı.

c)Anti-HIV EIA testi: EIA testi olarak Wellcozyme Anti-HTLV-III kiti (Wellcome Diagnostics, Dartford, İngiltere) kullanıldı. Test firmanın

Öngördüğü prosedüre göre çalışıldı. Sonuçlar 450 nm dalga boyunda Titertek Uniskan 1 (Flow Laboratories Ltd, İngiltere) optik okuyucu da değerlendirildi.

d)ANA testi: Ortho Fluoreset Antinuclear Antibody (Ortho Diagnostic Systems Inc. Raritan NJ, A.B.D.) kiti kullanıldı.

e)HB Ağ testi: Serodia-HB (Fujirebio Inc, Japonya) kiti kullanıldı.

f)RPR, CRP ve RF testleri: Syphilis Reagin Card Test, CRP Latex test, RA Latex test (Cambridge Biomedical Ltd, İngiltere) kitleri kullanıldı.

SONUÇLAR: Mart 1987-Haziran 1989 tarihleri arasında DEÜTF Mikrobiyoloji Anabilim Dalı AIDS Merkezinde çalışılan 4039 serum örneğinin 3517'si kan donörlerinin serumundan, geriye kalan 522 tanesi ise çeşitli nedenlerle merkezimize başvuran ya da doğrulanmak üzere gönderilen serum örneklerinden 11 olguda Anti-HIV Antikorları pozitif olarak bulunmuştur. Mart 1987'den önce pozitif bulunan 3 olgu ile birlikte bugüne kadar toplam 14 olguda Anti-HIV antikorları pozitif olarak bulunmuştur.

4039 örneklilik anagrubun içinden oluşturulan 76 serumluk Panel 1 grubunda alınan sonuçlar Tablo 1'de gösterilmiştir.

Tablo 1. PA testi ile IFA testinin karşılaştırılması (Panel 1 76 serum örneklerinde).

	IFA(+)	IFA(-)	Toplam	
PA(+)	(GP)	(VP)	31	GP: Gerçek Pozitif
PA(-)	(YN)	(YP)	45	VP: Yalancı Pozitif
	0	45		YN: Yalancı Negatif
Toplam	14	62	76	GN: Gerçek Negatif

Bu verilere göre PA testinin, IFA standart test olarak kabul edildiğinde:

$$\begin{aligned} \text{Duyarlılığı (Sensitivitesi)} &= \frac{GP}{GP+YN} \times 100 = \frac{14}{14+0} \times 100 = \% 100.00 \\ \text{Seçiciliği (Spesifitesi)} &= \frac{GN}{YP+GN} \times 100 = \frac{45}{17+45} \times 100 = \% 72.58 \\ \text{Pozitif sonuçların prediktif değeri} &= \frac{GP}{GP+YP} \times 100 = \frac{14}{14+17} \times 100 = \% 45.16 \\ \text{Negatif sonuçların prediktif değeri} &= \frac{GN}{GN+YN} \times 100 = \frac{45}{45+0} \times 100 = \% 100.00 \\ \text{Süvenilirlik (efficiency)} &= \frac{GP+GN}{GP+YP+YN+GN} \times 100 = \frac{14+45}{14+17+0+45} \times 100 = \% 77.63 \end{aligned}$$

olarak bulunmuştur.

Panel 2 serumlarıyla alınan sonuçlar Tablo 2'de ve Şekil 1'de gösterilmiştir.

Tablo 2: Panel 2 41 serum örneklerinde alınan test sonuçları

	ANA	Hb Ag _s	RPR	CRP	RF	PA	EIA	IFA
Pozitif serumların numaraları	9,10,20 21,27	27	-	13 15	1,2,5,6,11,13 15,19,23,27, 28,30,32,34, 37	1,2,5 6;8;9, 10,11,12,15, 16,20,23,24, 35,39,41	-	-
n	5	1	-	2	15	17	-	-
Pa ile birlikte pozitif olan serumların numaraları	9,10,20	-	-	15	1,2,5,6, 11,15,23			
n	3	-		1	7			

Veriler incelendiğinde ANA'nın 5 örnekte, HB AG'nin 1 örnekte, CRP'nin 2 örnekte, RF'nin 15 örnekte pozitif olduğu görülmektedir (Şekil 1).

Şekil 1. Panel 2 41 serumda Pa ve EIA ile HIV antikorları yanında yabancı enfeksiyon veren HB_s Ag, CRP, ANA, RF pozitifliği

PA'yu pozitif bulunan örneklerin yedisinde RF pozitif (%41.1), üçünde ANA pozitif (%17.6), birinde ise CRP pozitif (%5.8) bulunmuştur (Şekil 2).

Şekil 2. Panel 2 41 serum örneğinde PA pozitif serumda ANA, RF ve CRP pozitifliğinin dağılımı

PA ile RF'nin birlikte pozitiflik oranının göreceli olarak yüksek bulunması nedeniyle bölümümüz serum bankasında alikotları saklanan yalnızca RF testi istenmiş ve RF'leri pozitif bulunmuş 41 serum örneğinden oluşan Panel 3 grubunda PA testi çalışıldı. Bu örneklerin 10 tanesinde (%24.4) PA testi ile pozitif sonuç alındı. Pozitif bulunan serumların Anti-HIV IFA testi ile negatif oldukları saptandı.

Aynı biçimde ANA kuvvetli pozitif 10 serumdan oluşan Panel 4 grubuna da PA testi uygulandı. Tümünde PA negatif bulundu.

TARTIŞMA: Biz bu çalışmamızda standart doğrulama testi olarak IFA testini kullandık. IFA test çabuk sonuç veren ve güvenilir bir yöntemdir (1,2,3). HIV ile enfekte bireylerin hemen tümünde gp 120 ve 160'a karşı antikorlar saptanmaktadır. IFA yönteminde kullanılan enfekte hücreler gp 120 ve gp 160'ı içermektedir. Bu glikoproteinler birçok EIA kiti ve WB yöntemlerinde kullanılan purifiye virus preparasyonlarında yok olmaktadır (4).

Ayrıca kısa sürede uygulanabilmesi ve birim test fiyatının düşük olması WB'a göre ek avantajlarıdır.

IFA testi ile karşılaştırıldığında PA testinin hiç yalancı negatif sonuç vermediği görülmektedir (Bkz.Tablo 2). Benzer sonuçlar PA testinin EIA testleri ile karşılaştırıldığında da elde edilmiştir.Bu açıdan testin duyarlılığı % 100 olarak düşünülebilir. Bununla birlikte kesin pozitif serum sayısının az olduğu (n=14) dikkate alınmalıdır. Bu sonuçlar, PA ile IFA'nın karşılaştırıldığı diğer çalışmalarla uyumludur (5,6,7).

Çalışmamızda 17 yalancı pozitif sonuç elde edilmiştir. Bu açıdan testin seçiciliği % 72.58 olarak bulunmuştur. Ne var ki, tüm duyarlılığı % 100 olarak kabul edilirse, merkezimizde PA ile test edilen 2917 serumda yine 17 yalancı pozitif sonuç elde edilmiş olur ki, bu durumda testin seçiciliği ve güvenilirliği % 99.41'e çıkmaktadır.

Panel 2'yi oluşturan 41 serum örneğinin onyedisinde PA ile pozitif sonuç alınırken EIA ve IFA ile tümü negatif bulunmuştur. Çalışmamızda EIA testi olarak kullanılan Wellcozyme Anti-HI III testi, merkezimizde denenmiş olan birçok değişik EIA kitinde saptadığımız yalancı pozitif sonuçları vermemesi ve IFA ile çok uyumlu sonuçlar vermesi nedeniyle diğer EIA kitlerine tercih edilmiştir.

IFA ve EIA negatif sonuç verdiğiinden PA ile pozitif bulunan 17 örnek yalancı pozitif olarak kabul edilmiştir. PA ile pozitif sonuç veren bu 17 örneğin yedisinde RF pozitif olarak bulunmuştur (%41.1). PA ile RF'nin birlikte pozitiflik oranının göreceli yüksekliği, PA testinde RF yalancı pozitifliğe yolaçabilen bir etken olabileceği sorusunu akla getirmiştir. Bu nedenle RF pozitif 41 serumla PA çalışılmış ve bunların onunda pozitif sonuç alınmıştır (%24.4). Bu bizce anlamlı bir sonuçtur.

Japonya'da yapılan bir yayında 156 RF pozitif serumla (7), yine aynı ülkeden bir başka yayında 50 RF pozitif serumla (6) hiç yalancı pozitif sonuç alınmadığı bildirilmektedir. Sözü edilen çalışmalarda bu konuda ayrıntılı bilgi olmadığından elde ettiğimiz sonuçların, bu çalışmalarla uyumsuzluğunu açıklamak güçtür. Akla yalancı pozitifliğin

RF titresi ile ilişkili olup olmadığı sorusu gelmektedir. Çalışmamızda RF pozitif serumların tümünde yalancı pozitif sonuç saptamamış olmamız da bu sorunun araştırılması gerektiğini vurgulamaktadır.

Çalışmamızda ANA pozitifliğinin PA testinde yalancı pozitif sonuçlara yol açmadığını düşünüyoruz. Test edilen ANA (+) serum sayısının çok az olmasına karşın (n=10), bu serumların kuvvetli pozitif serumlar olması ve bunların hiçbirinde PA ile pozitiflik saptamamış olmamız bu kanımızın temelidir. Daha geniş gruplarla çalışılması kuşkusuz yararlı olacaktır.

Yapılan bazı çalışmalarda partikül aglütinasyon testinin değerlendirilmesinde kigiden kişiye değişebilen sonuçlar alındığı bildirilmektedir (8). Yukarıda belirtilen (8) numaralı kaynakta prozone etkisine bağlı olarak 2 örnekte yalancı negatif sonuç alındığı, ancak bu sorunun serumun ileri sulandırılmalarının yapılması ile (1/64 ve üstü) çözümlendiği bildirilmektedir.

Sonuç olarak, Serodia-HIV Partikül Aglütinasyon testinin yalancı negatif sonuç vermemesi ve yalancı pozitiflik oranının kabul edilebilir sınırlarda olması nedeniyle HIV antikörlerinin aranmasında birinci basamak testi olarak kullanılabilirliğini düşünüyoruz. Bunun yanısıra aglütinasyon temeline dayalı bu ve bunun gibi testlerin klasik EIA testlerine göre bazı avantajları da sözkonusudur. Bunlar özetle: (i) Uygulanması kolaydır. Testler tek basamakta yapılmaktadır. EIA testlerinde uygulanan yıkama; konjugat ve Substrat pipetlenmesi gibi ara basamaklara gerek yoktur. (ii) Ara basamakların olmaması hem hata payını azaltmakta, hem de çalışan kiginin güvenliği için daha az riskli olmaktadır. (iii) EIA testlerinin aksine özel, pahalı teknik donanımlara gerek yoktur. (iv) Serum örnekleri tek tek çalışılabilir.

Bir bütün olarak ele alındığında, bu test yönteminin özellikle küçük hacimli kan bankalarında kullanılmasının yararlı ve pratik olacağını, diğer merkezlerde ise birinci basamak testi olarak kullanılabilirliğini, alan taramalarında pratik değeri olduğunu düşünüyoruz.

KAYNAKLAR

1. Blumberg, R.S. Sandstrom, E.G. Paradis, T.T. Nuemeyer, D.N. Sarngadharan, M.G. Hartshorn, K.L. Byington, R.E. Hirsch, M.S. Schooley, R.T. 1986.
Detection of human T.cell lymphotropic virus type III. related antigens and anti-human T cell lymphotropic virus type III antibodies by anticomplementary immunofluorescence. J. Clin. Microbiol. 23:1072-1077.

2. Gallo, D. Diggs, J.L. Shell, G.R. Dailey, P.J. Hoffman, M.N. Riggs, J.L. 1986.
Comparison of detection of antibody to the acquired immune deficiency syndrome virus by enzyme immunoassay, immunofluorescence and Western blot methods. *J. Clin. Microbiol.* 23:1049-1051.
3. Pan, L.Z. Cheng-Mayer, C. Levy, J.A. 1987.
Patterns of antibody response in individuals infected with the human immunodeficiency virus. *J. Infect. Dis.* 155: 626-632.
4. Jackson, J.B. Salfour, Jr. H.H. 1988
Practical diagnostic testing for human immunodeficiency virus. *Clin. Microbiol. Rev.* 1(1): 124-138.
5. Yoshida, T. Matsui, T. Kobayashi, S. Harada, S. Kurimura, T. Hinuma, Y. Yamamoto, N. 1986.
A novel agglutination test for the human immunodeficiency virus antibody. A comparative study with enzyme linked immunosorbent assay and immunofluorescence. *Jpn. J. Cancer Res. (Gann):* 77: 1211-1213.
6. Kobayashi, S. Yamamoto, N. Evaluation of a kit utilizing particulate agglutination for the detection of antibodies to HIV (the AIDS virus). 1986; *Clin Virology.* 14(4): 454-458.
7. Yoshida, T. Matsui, T. Kobayashi, S. Yamamoto, N. 1987.
Evaluation of passive particle agglutination test for antibody to human immunodeficiency virus. *J. Clin. Microbiol.* 25(8): 1433-1437.
8. Crofts, J.N. Maskill, W.J. Healey, D.S. Gust, I.D. 1987.
Particle agglutination assay for anti-HIV. *Lancet* ii. 797-798.