

Hepatit B virus kantitasyonunda iki farklı gerçek zamanlı PCR testinin karşılaştırılması: COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan ve ARTHUS QS-RGQ KİT

Comparison of two different real time PCR tests for hepatitis B virus quantification: COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan AND ARTHUS QS-RGQ KIT

Biçeroğlu S U¹ Yazan Sertöz R² Zeytinoğlu A² Altuğlu İ²

¹Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kan Merkezi, İzmir, Türkiye

²Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye

Özet

Amaç: Çalışmamızda Cobas AmpliPrep/COBAS TaqMan HBV test v.2 (Roche Molecular Systems, ABD) ve Arthus HBV QS-RGQ Kit (Qiagen, Almanya) testlerinin karşılaştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Onsekiz klinik plazma örneği ve sekiz QCMD kalite kontrol örneği çalışmaya dahil edildi. Nükleik asit ekstraksiyonları ve amplifikasyonları firma önerileri doğrultusunda gerçekleştirildi. Arthus HBV QS-RGQ Kit test içi ve testler arası değerlendirmeleri için tüm örnekler aynı çalışmada çift çalışıldı ve başka bir çalışma gününde bir kez daha tekrar edildi. Elde edilen sonuçların log₁₀ değerleri regresyon analizi ile değerlendirildi.

Bulgular: COBAS TaqMan HBV test v.2 sonuçları ile Arthus HBV QS-RGQ Kit sonuçlarının ortalamaları ile karşılaştırıldığında logaritmik fark 0.08-1.26 arasında ve regresyon analizinde katsayı 0.91 (R²=0.91) olarak bulundu. Arthus HBV QS-RGQ Kit testler arası ve test içi değerlendirmelerinde logaritmik farklar sırasıyla 0.07-0.41 ve 0.02-0.19; regresyon analizinde katsayı her iki durum için de 0.99 (R² =0.99) olarak hesaplandı. Arthus HBV QS-RGQ Kit kalite kontrol serumu sonuçları ortalamaları beklenen QCMD sonuçları ile karşılaştırıldığında logaritmik fark 0.60-0.89 arasında ve regresyon analizinde katsayı 0.99 (R² =0.99) olarak bulundu. Arthus HBV QS-RGQ Kit testler arası ve test içi değerlendirmelerinde logaritmik farklar sırasıyla 0.04-0.1 ve 0.01-0.07; regresyon analizinde katsayı her ikisi için de 0.99 (R² =0.99) olarak hesaplandı.

Sonuç: Çalışmamızda Arthus HBV QS-RGQ Kit ile HBV DNA kantitasyonunda elde edilen klinik ve kalite kontrol sonuçlarının güvenilir ve tekrarlanabilir olduğu; COBAS TaqMan HBV test v.2 ve Arthus HBV QS-RGQ Kit sonuçlarının karşılaştırılabilir olduğu görüldü. Bir hasta örneği hariç bütün logaritmik farklar 1 log değeri altındaydı. Çalışmamızda elde edilen karşılaştırılabilir sonuçlara rağmen klinikte hasta takibinde aynı test kullanımı prensibi önemini korumaktadır.

Anahtar Sözcükler: Gerçek zamanlı PCR, kantitasyon, HBV DNA, Cobas, Arthus.

Summary

Aim: The aim of the study is to compare two real time PCR tests, the Cobas AmpliPrep/COBAS TaqMan HBV test v.2 (Roche Molecular Systems-USA) and the Arthus HBV QS-RGQ Kit (Qiagen, Germany).

Materials and Methods: Eighteen clinical plasma samples and eight QCMD samples were included. Nucleic acid extractions and amplifications were performed according to the manufacturer's instructions. Samples were tested in duplicate for intra-assay evaluation of Arthus HBV Kit and once again in a different run for inter-assay evaluation. The log₁₀ IU/ml values of the results were evaluated with regression analysis.

Results: The coefficient of regression analysis for the COBAS TaqMan HBV test v.2 versus the average of the Arthus HBV Kit results was 0.91 (R²=0.91) and the logarithmic difference was 0.08-1.26. The log differences for inter-assay and intra-assay evaluations were 0.07-0.41 and 0.02-0.19 respectively. The coefficient of the regression analysis was 0.99 (R²=0.99) for both inter-assay and intra-assay evaluations. The log differences for the Arthus HBV Kit QCMD results versus expected values were 0.60-0.89 and the coefficient of regression analysis was 0.99 (R² =0.99). The log differences for inter-assay and intra-assay evaluations with QCMD samples were 0.04-0.1 and 0.01-0.07 respectively. The coefficient of the regression analysis was 0.99 (R²=0.99) with QCMD samples for both inter-assay and intra-assay evaluations.

Yazışma Adresi: Servet Uluer BİÇEROĞLU

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kan Merkezi, İzmir, Türkiye

Makalenin Geliş Tarihi: 14.03.2012 Kabul Tarihi: 28.05.2012

Conclusion: The Arthus HBV Kit produced accurate and reproducible results. The results of the COBAS TaqMan HBV test v.2 and Arthus HBV Kit were comparable. All log differences were within 1 log except for one clinical sample. In spite of comparable results, the use of the same test during patient follow-up is still important.

Key Words: Real time PCR, HBV DNA, quantification, Cobas, Arthus.

Giriş

Hepatit B virüsü (HBV) tüm dünyada yaygın kronik enfeksiyonlara neden olmaktadır. Kronik HBV enfeksiyonları siroz ve hepatosellüler karsinom gibi uzun dönem komplikasyonlarına neden olurlar.

HBV DNA kantitasyonunda duyarlı moleküler yöntemlerin kullanılması bu hastalığın tanısına ve tedavisine önemli katkılar sağlamıştır. Kronik Hepatit B enfeksiyonunda antiviral tedaviye başlama kararı verilmesinde, tedaviye yanıtın izlenmesinde ve antiviral direnç saptamada HBV kantitasyonu önemlidir. HBV tedavisi sırasında, seçilen antiviral ajanlara ve tedavi yanıtına bağlı olarak 1-3-6 aylık dönemlerde viral yük testlerinin yapılması önerilmektedir (1,2).

HBV kantitasyonunda kullanılabilir birçok farklı ticari test bulunmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) bu çok sayıda farklı HBV nükleik asit amplifikasyon testleri standardizasyonu için enternasyonal ünite (IU) standardı geliştirmiştir (3). Ticari testler de DSÖ standardına göre normalize edilmiştir (4) ve tüm testler IU/ml standardına göre üretilmektedir.

Nükleik asit amplifikasyon testleri arasında gerçek zamanlı PCR testleri; analitik performansları, düşük saptama düzeyleri, geniş lineer aralıkları yüksek özgüllükleri ve duyarlılıkları nedeniyle güvenilirler ve bu üstünlükleri nedeniyle rutin kullanımları önerilmektedir (5-8).

Viral kantitasyon testleri arasında uyumun iyi olduğunu destekleyen çalışmalar olsa da (6,9) testler arasında değişkenlik gözlemlenebilir (8). Hasta takibinde farklı testlerden elde edilen sonuçların kullanılması uygun değildir ve mümkün olduğu kadar tek test ile takip önerilir (2,7,8). Tedavi sırasında test değişikliği yapılması gerekiyorsa başlangıçta elde edilen hasta örneklerinin yeni kullanılacak test ile değerlendirilmesi önerilmektedir (2).

Çalışmamızda HBV viral kantitasyonunda kullanılan iki farklı gerçek zamanlı PCR testinin karşılaştırılması amaçlanmıştır

Gereç ve Yöntem

HBV DNA düzeyleri Cobas AmpliPrep/COBAS TaqMan HBV test v.2 (Roche Molecular Systems, ABD) ve Arthus HBV QS-RGQ Kit (Qiagen, Almanya) testleri ile çalışıldı. Klinik örnekler ile birlikte QCMD (Quality Control for Molecular Diagnostics, Glasgow, İskoçya) kalite kontrol serumu örnekleri de çalışmaya dahil edildi.

Örnekler: HBV viral kantitasyonu için 26 örnek (18 klinik plazma örneği ve 8 QCMD kalite kontrol serumu) çalışmaya dahil edildi. Arthus HBV QS-RGQ Kit (Qiagen, Almanya) ile çalışılan örnekler toplam üç kez çalışıldı. Örnekler aynı çalışma düzeneğinde iki kez tekrar edilerek test içi (intra-assay); farklı bir çalışmada bir kez daha tekrar edilerek testler arası (inter-assay) uyum araştırıldı.

HBV DNA testleri

Cobas AmpliPrep/COBAS TaqMan HBV test v.2 (Roche Molecular Systems-ABD): Nükleik asit ekstraksiyonu için tam otomatik Cobas AmpliPrep cihazı üretici firma önerilerine göre kullanıldı. HBV DNA amplifikasyonu COBAS TaqMan HBV test v.2 ile gerçek zamanlı PCR cihazında (Cobas TaqMan Analyzer; Roche Molecular Systems, ABD) üretici firma önerilerine uygun olarak amplifiye edildi. Testin analitik duyarlılığı 20 IU/mL ve lineer aralığı $20-1.7 \times 10^8$ IU/mL'dir.

Arthus HBV QS-RGQ Kit (Qiagen, Almanya): Nükleik asit ekstraksiyonu için 'QIASymphony Virus/Bacteria Mini Kit (Qiagen, Almanya) kullanıldı. Ekstraksiyonu tamamlanan örnekler HBV DNA'nın 134 bp'lik kor bölgesini hedefleyen Arthus HBV QS-RGQ Kit (Qiagen, Almanya) ile gerçek zamanlı PCR cihazında (ROTOR GENE Q, CORBETT Research Pty Ltd, Avusturya) üretici firma önerilerine uygun olarak amplifiye edildi. Testin analitik duyarlılığı 10.22 IU/mL ve lineer aralığı $31.6-2 \times 10^7$ IU/mL'dir.

İstatistiksel Analiz: Çalışma sonucunda elde edilen sonuçların \log_{10} IU/mL değerleri elde edildi ve regresyon analizi ile değerlendirildi.

Bulgular

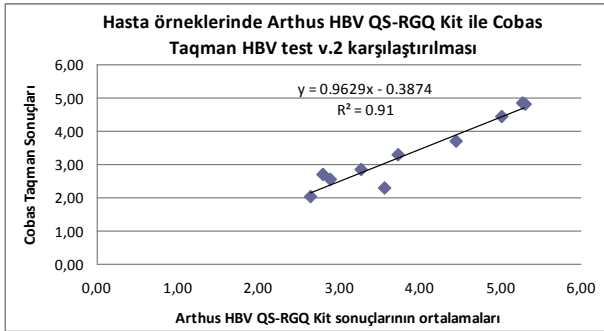
Çalışılan 18 klinik örneğin beşi ve QCMD örneklerin ikisi testlerin dinamik aralıkları dışında değerler elde edildiği için regresyon analizine alınmadı.

Regresyon analizine alınan klinik ve QCMD kalite kontrol örnekleri için \log_{10} IU/mL değerleri hesaplandı ve Arthus HBV QS-RGQ Kit testi ile çalışılan üç testin \log_{10} değerlerinin ortalamaları alındı. İki sistemin uyumunun araştırılması için klinik örneklerin Cobas TaqMan HBV test v.2 ve Arthus HBV QS-RGQ Kit ortalamaları karşılaştırıldı. Arthus HBV QS-RGQ Kit ile elde edilen sonuçların test içi ve testler arası sonuçları karşılaştırılarak testin tekrarlanabilirliği araştırıldı. Arthus HBV QS-RGQ Kit testi ile çalışılan QCMD kalite kontrol örneklerinin \log_{10} değerlerinin ortalamaları beklenen

değerler ile karşılaştırıldı. Ayrıca klinik örneklerde olduğu gibi test içi ve testler arası sonuçlar değerlendirildi.

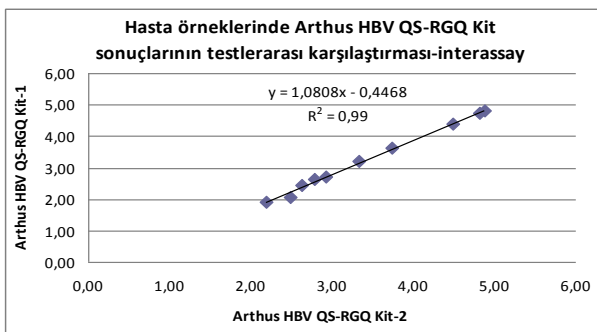
Hasta örnekleri sonuçlarının değerlendirilmesi

Arthus HBV QS-RGQ Kit testi sonuçları Cobas TaqMan HBV test v.2 ile karşılaştırıldığında logaritmik fark 0.08-1.26 (ortalama:0.53, ortanca:0.46) arasında olduğu gözlemlendi. Regresyon analizinde katsayı 0.91 ($R^2=0.91$) bulundu. Cobas TaqMan HBV test v.2 ile Arthus HBV QS-RGQ Kit sonuçları karşılaştırması Şekil-1'de gösterilmiştir.



Şekil-1. Hasta örneklerinde Arthus HBV QS-RGQ Kit ile Cobas TaqMan HBV test v.2 sonuçlarının korelasyonu.

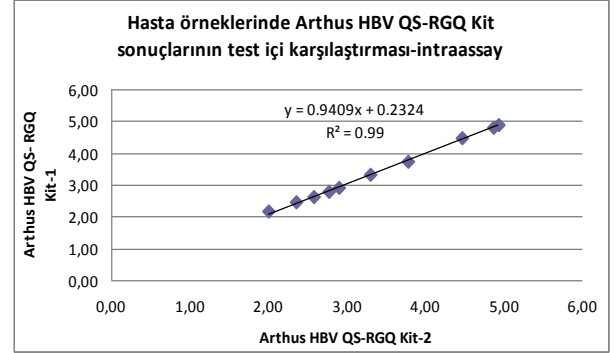
Arthus HBV QS-RGQ Kit sonuçları testler arası ve test içi karşılaştırıldığında ise logaritmik fark sırasıyla 0.07-0.41 (ortalama:0.17, ortanca:0.13) ve 0.02-0.19 (ortalama:0.06, ortanca:0.04) arasındaydı. Regresyon eğri analizinde katsayılar her ikisinde de 0.99 ($R^2=0.99$) bulundu. HBV QS-RGQ Kit sonuçlarının test içi ve testler arası karşılaştırmaları Şekil-2 ve Şekil-3'te gösterilmiştir.



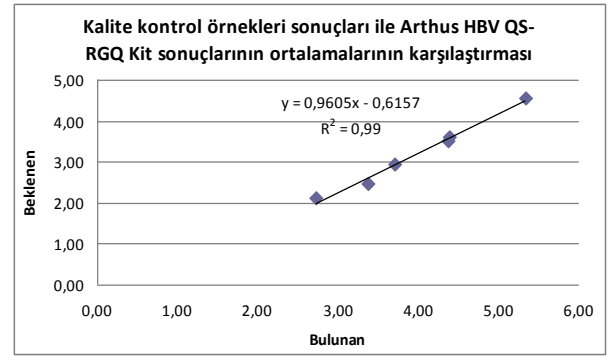
Şekil-2. Hasta örneklerinde Arthus HBV QS-RGQ Kit sonuçlarının testler arası korelasyonu.

Kalite kontrol örnekleri sonuçlarının değerlendirilmesi

Arthus HBV QS-RGQ Kit sonuçlarının ortalamaları beklenen QCMD değerleri ile karşılaştırıldığında logaritmik fark 0.60-0.89 (ortalama:0.77, ortanca:0.77) arasındaydı ve regresyon eğri analizinde katsayı 0.99 ($R^2=0.99$) bulundu. Beklenen kalite kontrol değerleri ile QCMD sonuçlarının karşılaştırılması Şekil-4'te gösterilmiştir.

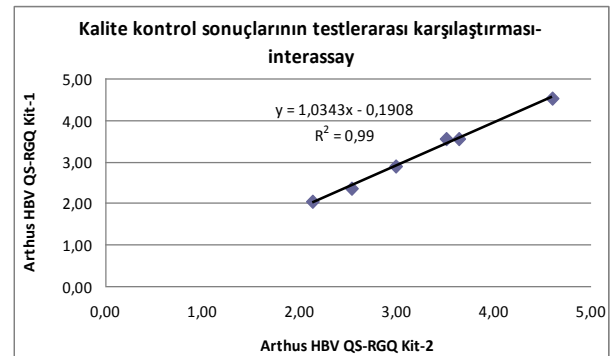


Şekil-3. Hasta örneklerinde Arthus HBV QS-RGQ Kit sonuçlarının test içi korelasyonu.

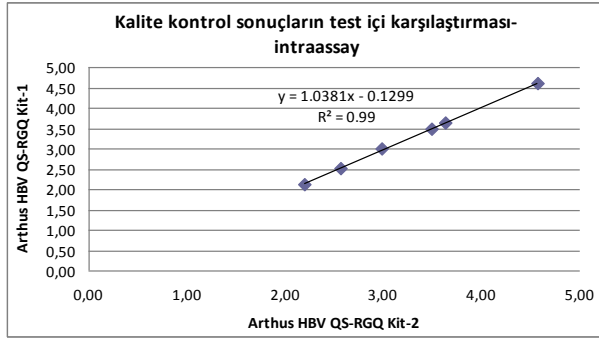


Şekil-4. Kalite kontrol örnekleri sonuçları ile Arthus HBV QS-RGQ Kit sonuçları ortalamalarının korelasyonu.

Arthus HBV QS-RGQ Kit sonuçları testler arası ve test içi karşılaştırıldığında logaritmik fark sırasıyla 0.04-0.18 (ortalama: 0.09 ortanca: 0.09) ve 0.01-0.07 (ortalama: 0.03 ortanca:0.02) arasında bulundu. Regresyon eğri analizinde katsayılar her iki durum için de 0.99 ($R^2=0.99$) olarak hesaplandı. HBV QS-RGQ Kit sonuçlarının test içi ve testler arası karşılaştırmaları Şekil-5 ve Şekil-6'da gösterilmiştir.



Şekil-5. Arthus HBV QS-RGQ Kit ile kalite kontrol sonuçlarının testler arası korelasyonu.



Şekil-6 Arthus HBV QS-RGQ Kit ile kalite kontrol sonuçlarının test içi korelasyonu.

Regresyon analizine alınamayan örneklerin incelenmesi

Testlerin biri ya da ikisinin de dinamik aralıkları dışında kaldığı için regresyon analizine alınamayan örnekler (5 hasta ve 2 QCMD örneği) incelendiğinde, klinik örneklerden bir tanesinin her iki sistemde tüm çalışmalarda saptama sınırının üstünde; birinin de her iki sistemde tüm çalışmalarda saptama sınırının altında olduğu gözlemlendi. İki klinik örnek Arthus HBV QS-RGQ Kit testi ile üç çalışmada da saptama sınırının altında olarak bulunurken Cobas TaqMan HBV test v.2 testinin saptama aralığının içindeydi (2.56 log₁₀ IU/mL). Bir klinik örnek Cobas TaqMan HBV test v.2 testi saptama aralığı altında iken Arthus HBV QS-RGQ Kit testi ile üç çalışmada da saptama sınırının içindeydi (üç çalışmanın ortalaması 2.21 log₁₀ IU/mL). Regresyon analizine alınamayan iki QCMD kalite kontrol örneğinden biri Arthus HBV QS-RGQ Kit ile üç çalışmada da saptama sınırının altında (1.81 log₁₀ IU/mL), bir örnek ise Arthus HBV QS-RGQ Kit ile sadece bir çalışmada saptama sınırının altında bulundu. Cobas TaqMan HBV test v.2 testi ve Arthus HBV QS-RGQ Kit testi ile diğer iki çalışmanın log₁₀ IU/mL'ları sırasıyla 2.39, 1.63, 1.73 idi. Sonuç olarak değerlendirme dışı kalan örnekler içinde bir örnek yüksek viral yük, geri kalan altı örnek düşük viral yük nedeniyle değerlendirme dışı kaldı.

Sonuç

Serumda HBV DNA saptanması ve viral kantitasyon hastalığın tanısında, tedavinin planlanmasında ve antiviral tedavinin etkinliğinin belirlenmesinde gereklidir (1,2,10). Gerçek zamanlı PCR testleri tanı ve tedavinin

yönlendirmesinde oldukça önemlidir. Tedavide amaç öncelikli olarak virolojik baskılanmanın sağlanmasıdır ve bu amaçla viral DNA düzeylerinin gerçek zamanlı PCR testleri ile saptanabilen alt sınırın (10-15 IU/ml) altında değerlere ulaşması hedeflenir (1). Üç aylık tedavi sonrasında HBV DNA düzeyleri, tedavi başlangıcındaki viral DNA düzeylerine göre 1 log₁₀ IU/mL'den daha az oranda düşme göstermişse tedaviye primer dirençten bahsedilir(1). HBV tedavisinde hasta takibi sırasında elde edilen en düşük viral DNA düzeyinin 1 log₁₀ IU/mL üzerinde artış görülmesi sekonder direnç olarak değerlendirilir (1,10). HBV DNA kantitasyonunun tanı ve tedavideki bu önemi nedeniyle rutin uygulamada duyarlı, dinamik aralığı geniş, güvenilir ve tekrarlanabilirliği yüksek bir testin kullanılması önemlidir.

Arthus HBV QS-RGQ Kit klinik örnekler ve kalite kontrol serumlarıyla test içi ve testler arası değerlendirildi ve sonuçlar birbirleriyle uyumlu bulundu. Testin kendi içinde güvenilir ve tekrarlanabilir olduğu sonucuna varıldı. Cobas TaqMan HBV test v.2 ile uyumu araştırıldığında hasta takibinde testlerin birbirleriyle karşılaştırılabilir olduğu görüldü. Hasta örneklerinde testler arasındaki logaritmik fark değerlendirildiğinde bir örneğin logaritmik farkının 1.26 olduğu gözlemlendi. Bu değer HBV tanı ve tedavi rehberlerinde (1,10) direnç ve tedaviye yanıt kriterlerinde tanımlanan 1 log₁₀ IU/ml değerinin üzerindedir. Değerlendirme dışı kalan örnekler için düşük değerlerde rastlantısal örneklemeyle bağlı farklı sonuçlar elde edilebilir (Poisson dağılımı).

Günümüzde ticari gerçek zamanlı PCR testleri DSÖ standardına (3) göre üretilse de testler arasındaki olası farklılıklardan dolayı tedavi takibinde tek test kullanımı önerilmektedir (2,7,8). Bu çalışmada da her ne kadar uyumlu ve karşılaştırılabilir sonuçlar elde edilmiş olsa da, tek bir hasta örneğinde gözlenen 1.26'lık logaritmik fark hasta takibinde tek test kullanılması prensibini desteklemektedir. Hasta takibinde farklı testlerinin güvenle kullanılması için daha fazla sayıda hasta örneği içeren karşılaştırmalı çalışmalara ihtiyaç vardır.

Teşekkür

Teknik destekleri nedeniyle Seyhan Dargı, Ergül Utkun, Alev Çalışkan, Sinan Ercan ve Vildan Adıgüzel'e teşekkür ederiz.

Kaynaklar

1. European Association for the Study of the Liver. EASL clinical practice guidelines: management of chronic hepatitis B. J Hepatol 2009; 50(2):227-42.
2. Virologic monitoring of Hepatitis B virus therapy in clinical trials and practice: Recommendations for a standardized approach. Gastroenterology 2008;134(2):405-15.
3. Saldanha J, Gerlich W, Lelie N, et al. An international collaborative study to establish a World Health Organisation Standard for Hepatitis B virus DNA nucleic acid amplification techniques. Vox Sang 2001;80(1):63-71.

4. Pawlotsky JM. Hepatitis B virus DNA assays (methods and practical use) and viral kinetics. *J Hepatol* 2003;39(Suppl 1):S31-S35.
5. Pawlotsky JM. Molecular diagnosis of viral hepatitis. *Gastroenterology* 2002;122(6):1554-68.
6. Laparche S, Thibault V, Bouchardeau F, et al. Expertise of laboratories in viral load quantification, genotyping, and precore mutant determination for Hepatitis B virus in a multicenter study. *J Clin Microbiol* 2006;44(2):3600-7.
7. Valsamakis A. Molecular testing in the diagnosis and management of chronic Hepatitis B. *Clin Microbiol Rev* 2007;20(3):426-39.
8. Caliendo AM, Valsamakis A, Bremer JW, et al. Multi-laboratory evaluation of real-time PCR tests for Hepatitis B virus DNA quantification. *J Clin Microbiol* 2011;49(8):2854-8.
9. Hui CK, Bowden S, Zhang HY et al. Comparison of real time PCR assays for monitoring serum hepatitis B virus DNA levels during antiviral therapy. *J. Clin. Microbiol.* 2006;44(8):2983-7.
10. Lok ASF, McMahon BJ. Chronic hepatitis B: Update 2009. *Hepatology* 2009;50(3):661-2.