

HEPATİT B VE C VİRUS NÜKLEİK ASİT TESTLERİNDE NEQAS ULUSLARARASI DIŞ KALİTE KONTROL DEĞERLENDİRME PROGRAMI SONUÇLARININ ANALİZİ

ANALYSIS OF THE RESULTS OF NEQAS INTERNATIONAL EXTERNAL QUALITY ASSESSMENT PROGRAMME FOR HEPATITIS B AND C VIRUS NUCLEIC ACID TESTS

Murat SAYAN¹, Ayşe WILLKE², Meliha MERİÇ², Nilay ETİLER³

¹ Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, Merkez Laboratuvarı, PCR Ünitesi, Kocaeli. (sayanmurat@hotmail.com)

² Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı, Kocaeli.

³ Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi, Halk Sağlığı Anabilim Dalı, Kocaeli.

ÖZET

Dış kalite kontrol uygulaması, rutin PCR tanı laboratuvarlarında uluslararası akreditasyon sağlamada kritik öneme sahiptir. Bu çalışmada, NEQAS (United Kingdom National External Quality Assessment Scheme for Microbiology) dış kalite kontrol programı kapsamında rutin PCR laboratuvarımıza HBV-DNA kantitasyonu ve HCV-PCR saptanması amacıyla gönderilen örneklerden alınan sonuçların analizinin yapılması ve laboratuvarımızın performansının değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Nisan 2006-Ocak 2008 tarihleri arasında NEQAS tarafından laboratuvarımıza 4 ayrı dağıtımda, HBV-PCR için 16 serum, HCV-PCR için 6 plazma örneği gönderilmiştir. HBV-DNA ve HCV-RNA testleri, gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) platformunda (iCycler IQ, v3.0a-BioRad Laboratories, ABD), Fluorion HBV QNP v2.0 ve Fluorion HCV QNP v2.1 (Lontek AŞ, Türkiye) kitleri kullanılarak çalışılmıştır. Viral nükleik asit ekstraksiyon metodu olarak manyetik partikül teknolojisi (NucliSENS-easyMAG, bioMérieux, Hollanda) kullanılmıştır. HBV-DNA kantitasyonunda elde edilen tüm sonuçlarda NEQAS skorları 2 (çok uygun sonucu ifade eden en yüksek skor) olarak elde edilmiş; lineer regresyon analizi yapıldığında HBV-DNA kantitasyonunda elde edilen değerlerin (\log_{10}) beklenen değerlerle güçlü korelasyon ($r= 0.987$) gösterdiği saptanmıştır. HCV-PCR testinde NEQAS skorları, yalancı negatif olarak saptanan bir örnek dışında (ki bu örnek viral yük değerinin çok düşük -yaklaşık 79 IU/ml- olması nedeniyle NEQAS tarafından skorlanmamıştır) 2 olarak elde edilmiştir. Yapılan değerlendirmede, HBV örneklerinde tanımlama oranı %100 (16/16), HCV örneklerinde ise %83.3 (5/6) olarak belirlenmiştir. Çalışma verilerinin analizi, HBV viral yük testlerinin yüksek doğrulukta sonuçlar verdiğini, ancak HCV-PCR testinde kullanılan kitin analitik duyarlılığın daha da artırılması gerektiğini göstermiştir. Sonuç olarak, rutin PCR laboratuvarlarının, kullandıkları kitleri ve laboratuvar koşullarını denetleyebilmek için, dış kalite kontrol değerlendirme programlarına katılmalarının önemli bir gereklilik olduğunun bir kez daha vurgulanmasının uygun olacağı düşünülmüştür.

Anahtar sözcükler: *Dış kalite kontrol programı, NEQAS, gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu, hepatit B virusu, hepatit C virusu, moleküler tanı.*

ABSTRACT

External quality assessment (EQA) has been playing an increasingly important role in the implementation of nucleic acid amplification techniques (PCR) for clinical diagnosis. In this study, the results of HBV-DNA quantification and HCV-RNA detection tests evaluated by United Kingdom National External Quality Assessment Scheme for Microbiology (NEQAS) were analysed and the performance of our laboratory was evaluated. Between April 2006-January 2008, in four different distribution panels including 16 freeze-dried serum and six plasma specimens for HBV-DNA and HCV-RNA testing, respectively, were received. Viral nucleic acids were extracted by magnetic particle technology (NucliSENS-easyMAG, bioMérieux, Boxtel, Holland). HBV-DNA and HCV-RNA tests were performed by Fluorion HBV quantitative v2.0 and Fluorion HCV quantitative v2.1 (Intek AŞ, Istanbul, Turkey) kits in real-time PCR (iCycler IQ, v3.0a - BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA) platform. The performance scores of all the quantification tests of HBV-DNA were 2 (completely correct result) and a strong correlation ($r= 0.987$) between the quantitative HBV data and the target values was found by linear regression analysis. The NEQAS scores of HCV-RNA testing, except for a false negative result (since the viral load in this specimen was very low -79 IU/ml- it was not scored by NEQAS), were 2 in all specimens. The evaluation of the data revealed 100% detection in HBV-DNA and 83.3% detection in HCV-RNA. In conclusion, the results of this study showed high accuracy of HBV quantification in the samples of HBV infected patients under antiviral therapy. However, the analytical sensitivity of HCV-RNA quantitative kit should be improved for the purpose of reliable HCV-RNA results. External quality control panels are important tools for monitoring the quality of diagnostic laboratory tests. Therefore, PCR laboratories should always have EQA in routine procedures.

Key words: *External quality control assessment, NEQAS, real-time polymerase chain reaction, hepatitis B virus, hepatitis C virus, molecular diagnosis.*

GİRİŞ

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), nükleik asitlerin amplifikasyonuna dayanan, araştırma ve rutin tanı laboratuvarlarında yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir¹. Rutin PCR tanı laboratuvarlarında karşılaşılabilecek sorunlar nedeniyle alınması gereken önlemler bulunmaktadır. Bu önlemlere; in vitro tanı genelgesine (98/79/EC) uygun standart kitlerin kullanılması, kontaminasyon ve inhibisyon kontrol mekanizmalarının oluşturulması, genotiplerden bağımsız olarak etkenin saptanabilmesi ve kantitasyonunun sağlanması, kolaylaştırılmış nükleik asit izolasyon prosedürlerinin kullanılması ve internal amplifikasyon kontrollerinin kullanılması örnek olarak verilebilir^{2,3}. Ancak son yıllarda hak ettiği önemi kazanan yaklaşımlardan biri de PCR tekniğine uluslararası dış kalite kontrol uygulamasının girmesidir^{2,4}. Rutin PCR tanı laboratuvarları, iyi laboratuvar uygulamaları (good laboratory practices) çerçevesindeki test performans parametreleri [özellik (specificity), saptama sınırı (detection limit, analytic sensitivity), kantitasyon sınırı (quantification limit), doğruluk (accuracy), kesinlik (precision), güvenilirlik (reliability), tekrarlanabilirlik (repeatability), doğrusallık (linearity), dinamik aralık (dynamic range), sağlamlık (robustness)] sayesinde kabul edilebilir standartta tanısallık sonuçlar vermektedirler^{2,5-8}. Bu aşamada, dış kalite kontrol uygulaması, rutin PCR tanı laboratuvarlarında uluslararası akreditasyon sağlamada kritik öneme sahiptir.

Dış kalite kontrol değerlendirme programları (DKKDP), katılımcı laboratuvarlara bazı yararlar sağlamaktadır. Bunlar; laboratuvarların kendi performanslarını değerlendirmeleri, lokal ve ulusal standartların sağlanması, akla gelmeyen sorunların saptanması, iyileştirme çabalarının oluşması, internal kalite kontrol prosedürlerinin gözden geçirilmesi, genç meslektaşların eğitimi, meslektaş ve hastalara karşı kaliteyi kanıtlama olarak sıralanabilir⁹⁻¹⁵. DKKDP, özellikle moleküler tanı laboratuvarlarında kullanılan metodolojinin performansını en iyi şekilde gösteren yollardan biridir. Çünkü moleküler tanıda sonuca gitmek için DNA ekstraksiyonu, "in-house" PCR, "real-time" PCR, mutasyon analizi, DNA dizi analizi gibi birden fazla metot kullanılmaktadır^{3,11}.

Moleküler mikrobiyoloji alanında Türkiye'de ulusal ölçekli dış kalite kontrol programları henüz bulunmamaktadır⁹. Ancak moleküler tanı testlerinin uluslararası akreditasyonunda, DKKDP olan organizasyonlar bulunmakta ve katılımcı laboratuvarlara düzenli olarak uluslararası yeterlilikte test panelleri sağlamaktadırlar. Akredite olunabilecek bu organizasyonlar; "Quality Control for Molecular Diagnostics (QCMD, İngiltere), United Kingdom National External Quality Assessment Scheme for Microbiology (NEQAS, İngiltere), Clinical Pathology Accreditation (CPA, İngiltere), National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC, İngiltere), European Union Quality Control Concerted Action (EU-QCCA, İngiltere), External Assessment of Laboratories in Sweden (EQUALIS, İsveç), Institut für Standardisierung und Dokumentation im Medizinischen Laboratorium (INSTAND, Almanya), Paul-Ehrlich-Institute (PEI, Almanya), Instituto Superiore di Sanita (ISS, İtalya), National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, ABD), AcroMetrix (ABD), Boston Biomedica Inc. (BBI, ABD), College of American Pathologists (CAP, ABD), Accutest (DigitalPT, ABD) ve Viral Quality Control (VQC, Hollanda)" olarak sıralanabilir^{2,16-21}. Bunların arasında NEQAS, 30 yıldan fazla bir süredir dış kalite kontrol değerlendirme panelleri üretmekte, bakteriyoloji, antimikrobiyal duyarlılık testleri, viroloji, mikoloji, parazitoloji ve moleküler mikrobiyolojiden oluşan geniş bir yelpazede performans analizi yapmaktadır. NEQAS, hepatit C virusu (HCV)-RNA testini 2000 yılında, hepatit B virusu (HBV)-DNA kantitasyonunu 2002 yılında değerlendirme programına almıştır²²⁻²⁴. Ülkemizde moleküler mikrobiyolojik tanıda 13 üniversite laboratuvarı NEQAS panelleri kullanmakta, bunlardan 11'i HBV-DNA, 12'si HCV-RNA test programına katılmaktadır. Öte yandan Dokuz Eylül Üniversitesi QCMD ile iş birliği sonucunda dış kalite kontrol programları konusunda ulusal bağlantı noktası olarak rol oynamaktadır. Bu amaçla 2007 yılında katılımcılarının çoğunun üniversite hastanelerine ait laboratuvarların olduğu HBV-DNA ve HCV-RNA QCMD panellerine sırasıyla 13 ve 14 laboratuvar katılmıştır⁹.

Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, Merkez Laboratuvarı bünyesinde bulunan PCR laboratuvarımız, 2006 yılından itibaren 2140 laboratuvar koduyla NEQAS'ın HBV kantitasyonu ve HCV-RNA saptama programlarına, yakın zamanda da sitomegalovirus (CMV) kantitasyonu ve mikobakterilerin moleküler tanısı programlarına akredite olmuştur. Bu çalışmada, dış kalite kontrol kullanımının önemi ışığında, PCR laboratuvarımızın NEQAS akreditasyonunun başlamasından itibaren dış kalite kontrol çalışmalarımızın, HBV ve HCV yönünden değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Rutin PCR Laboratuvarı

Laboratuvarımızda yapılan rutin testlerin tamamı gerçek zamanlı PCR (iCycler IQ, v3.0a-BioRad Laboratories, Hercules, CA, ABD) platformunda idi. Ekstraksiyon ve amplifikasyon basamakları ayrı odalarda gerçekleştirildi. Ekstraksiyon metodu olarak manyetik partikül teknolojisi (NucliSENS-easyMAG, bioMérieux, Boxtel, Hollanda) kullanıldı. Uygulamaların tümü tek kullanımlık, pudrasız eldivenlerle ve her aşamada aerosole dirençli filtreli pipet uçları kullanılarak yapıldı.

Gerçek Zamanlı PCR Kitleri

HBV-DNA ve HCV-RNA PCR testleri, Fluorion HBV QNP v2.0 ve Fluorion HCV QNP v2.1 (İontek AŞ, İstanbul, Türkiye) kitleri kullanılarak çalışıldı. Tüm test kitleri -20°C'de saklanmaktaydı.

HBV-DNA testi serum örneklerinde kantitatif olarak çalışıldı. Fluorion HBV QNP v2.0 kitinin (CE lisansı; Doküman kod: PF001v006, Onay tarihi: Nisan 2006) lineer aralığı $1.7 \times 10^0 - 1.7 \times 10^8$ IU/ml (WHO HBV-DNA NAT Standardı, NIBSC Code 97/746 ile kalibre edilmiş serum örneği dilüsyon serisi ile elde edilmiştir) ve analitik duyarlılığı 1.79×10^1 IU/ml (%95 CI) olup, genotip (HBV A-F) performans paneli (PHD 201 E, BBI Diagnostics) ile analiz edilmiş olan bir kit idi. Kitin test içi, testler arası, operatörler arası ve toplam çalışmalar arası değişkenlik verileri varyans katsayısı (%) olarak, kitin en düşük (10^2 IU/ml) ve en yüksek (10^6 IU/ml) kantitasyon standartları için ayrı ayrı belirlendi. Buna göre 10^2 IU/ml standartı için değişkenlik varyans katsayısı; test içi %1.78, testler arası %0.78, operatörler arası %0.66 ve toplam çalışmalar arası %0.83 iken, 10^6 IU/ml standartı için bu değerler sırasıyla; %0.94, %3.72, %2.09 ve %2.91'dir. HBV-DNA testinde DNA polimeraz genininin 205 baz çift (bp)'lik bir bölümü, diziyeye özgü primerler kullanılarak HotStar™ Taq DNA polimeraz aracılığıyla çoğaltıldı ve veri toplama 6-karboksifloresan (FAM) filtresi ile sağlandı. PCR inhibisyonunu kontrol etmek için ekstraksiyon aşamasından itibaren sisteme 508 bp'lik DNA molekülü (insan genomundan 164 bp'lik bir bölge) olan bir internal amplifikasyon kontrolü (İAK) eklendi. Yarışmasız bir şekilde çalışan ve HBV genomu ile benzerlik taşımayan İAK, farklı primer çiftleriyle çoğaltıldı ve veri toplama aşaması siyanin boyası (Cy5) ile yapıldı.

HCV-RNA testleri plazma örneklerinde çalışıldı ve sonuçlar kantitatif olarak verildi. Fluorion HCV QNP v2.1 kitinin (CE lisansı; Doküman kod: PF002v006, Onay tarihi: Nisan 2006) lineer aralığı 10^2-10^7 IU/ml (WHO HCV-RNA NAT Standardı, NIBSC Code 96/798 ile kalibre edilmiş serum örneği dilüsyon serisinde elde edilmiştir) ve analitik duyarlılığı 7×10^2 IU/ml (%95 CI) olup, genotip (HCV 1-6) performans paneli (PHW 202 E, BBI Diagnostics) ile test edilmişti. Kitin 10^3 IU/ml standartı için değişkenlik varyans katsayısı; test içi %1.47, testler arası %1.86, operatörler arası %1.67 ve toplam çalışmalar arası %1.59 iken, 10^6 IU/ml standartı için bu değerler sırasıyla; %0.62, %0.98, %1.17 ve %1.16'dır. Kit aracılığıyla HCV genomu, 5'UTR bölgesininin 90 bp'lik bir bölümü, diziyeye özgü primerler kullanılarak HotStar™ Taq DNA polimeraz aracılığıyla çoğaltıldı ve saptama FAM filtresi ile ger-

çekleştirildi. IAK için HCV genomunun 5'UTR bölgesi ile aynı olan ve 90 bp'lik bir bölgeyi çoğaltan, yarışmalı çalışan ve 413 bp'lik in vitro transkripsiyon ürünü bir RNA kullanıldı.

HCV Genotiplendirme

Bu amaçla virusun 5'UTR bölgesine ait 295 bp'lik bir bölge çoğaltıldı ve bölge, içinden yeni bir dizileme primeri kullanılarak dizilendi. Kullanılan primer dizileri; "forward": CTGTGAGGAACTACTGTCTT, "reverse": TGCACGGTCTACGAGACC- TCC, dizileme: TTCACGCAGAAAGCGTCTAG şeklinde idi. Dizileme, ABI PRISM 310 Genetic Analyzer® (Applied Biosystems, CA-USA) platformunda DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit® (Amersham Pharmacia Biotech Inc, Piscataway, ABD) kullanılarak yapıldı. Dizileme sonuçlarının genotip ve alt tiplendirmeleri, "http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genotyping/formpage.cgi" sayfasında yer alan genotipleme aracında (NCBI genotyping tool), referans HCV dizileriyle karşılaştırılarak yapıldı (referans HCV dizileri: Gen Bankası ulaşım no; AF0096061a, AF0117511a, AF2716321a, AF3568271b, AF1395941b, D902081b, AB0490881b, D148531c, AY0512921c, AF1690041a, D009441a, AB0476391a, AB0476411a, AB0309071b, D109881b, AF2384861b, AY2327301b, D504091c, DQ1555611i, AB0316631k, AF0468661a, D177631a, D289171a, D493741b, D638211k, Y116041a, Y131841a, AF0644901a, Y120831a, D842621b, D842631d, D638221g, D842651h, D842641k).

NEQAS Panelleri

Nisan 2006-Ocak 2008 tarihleri arasında, NEQAS'dan her dağıtımda (HBV için 4, HCV için 3 dağıtım) liyofilize olarak, HBV-PCR için 4 serum (toplam 16 örnek), HCV-PCR için 2 plazma (toplam 6 örnek) örneği gönderildi (Tablo I). Örnekler biyogüvenlik düzeyi 2 olan "laminar flow" kabinde açıldı ve 0.5 ml steril, nükleaz enzimleri içermeyen deiyonize su ile sulandırıldı. Örneklerin çözülmesi için 5 dakika beklendi. Hafifçe homojenize edildikten sonra nükleik asit ekstraksiyonları gerçekleştirildi. HBV ve HCV-PCR testleri bir kez çalışıldıktan sonra örnekler laboratuvarın arşivine konularak saklandı. NEQAS'ın moleküler tanı panelinde HCV'ye yönelik olarak sadece virusun saptanması istenmektedir. Laboratuvarımızda ise HCV-PCR testi kantitatif yöntemle çalışılmakta ve genotiplendirilmesi yapılmaktadır. Bu nedenle HCV için kalitatif test sonuçları kantitatif HCV test sonuçlarına bakılarak belirlendi.

NEQAS Skorlama

Gönderilen her sonuç, NEQAS tarafından -1 ile +2 arasında bir rakamla skorlanmaktadır. NEQAS'ın katılımcılara yolladığı dağıtım sonuç raporlarına göre HCV skorlaması; skor 2: çok uygun sonuç, skor 1: kısmen uygun sonuç, skor 0: sonuç gönderilmedi, skor -1: uygun olmayan (yanlış) sonuç olarak yapılmaktadır. HBV-DNA kantitasyonunda skorlama, gönderilen paneldeki örnek çiftleri (her dağıtımda 4 örnek = 2 örnek çifti) arasındaki konsantrasyonun log farklılığına dayanmaktadır. Dağıtımdaki örneklerin log değerleri alınmakta ve oluşturulan örnek çiftleri arasındaki log değerlerin median farklılığı hesaplanmaktadır. Buna göre HBV-DNA kantitasyonunda skorlama; skor 2: örnek çiftlerinde log median farklılığı ≤ 0.5 log - çok uygun sonuç, skor 1: median farklılığı $> 0.5 - \leq 0.75$ log arasında - kısmen uygun sonuç, skor 0: sonuç gönderilmedi, skor -1: median farklılığı > 0.75 log - uygun olmayan (yanlış) sonuç olarak yapılmaktadır²⁵.

Tablo I. HBV-DNA ve HCV-RNA Testleri İçin Gönderilen NEQAS Örnekleri

Program tipi (Tarih)	NEQAS dağıtım no	NEQAS örnekleri	Genotip	Subtip	Sulandırım oranı
HBV-DNA kantitasyon (Nisan 2006-Ocak 2008)	2062	8026	D	ayw	1:30
		8027	D	ayw	1:100
		8028	D	ayw	1:10.000
		8029	D	ayw	1:300.000
	2143	8306	D	ayw	1:10.000
		8307	D	ayw	1:30.000
		8308	A	B	1:1000
		8309	A	B	1:10.000
	2200	8463	A	B	1:10
		8464	A	B	1:330
		8465	D	ayw2	1:10
		8466	D	ayw2	1:100
	2252	8645	D	ayw2	1:30
		8646	D	ayw2	1:300
		8647	D	ayw2	1:10.000
		8648	D	ayw2	1:100.000
HCV-RNA saptama (Ekim 2006-Ocak 2008)	2095	8134	2 ^b	b	1:2
		8135	2 ^b	b	1:100
	2166	8354	1 ^b	a	1:30
		8355 ^a	-	-	-
	2238	8593	3 ^b	a	1:10
	8594	3 ^b	a	1:100	

* Belirtilmemiştir.
^a HCV-RNA negatif plazma örneğidir.
^b NEQAS'ın bildirdiği genotip sonuçları, HCV genomunun 5'UTR bölgesinde "in-house" RFLP yöntemi ile çalışıldığında elde edilen sonuçlardır.

İstatistiksel Değerlendirme

HBV-DNA testinde beklenen ve gözlenen \log_{10} tabanlı değerlerde linear regresyon analizi yapıldı. Veriler SPSS v11.0 (SPSS for Windows, Rel. 11.0.1. 2001. SPSS Inc. Chicago, ABD) paket programında analiz edildi.

BULGULAR

HBV-DNA kantitasyon çalışmasının sonuçları Tablo II'de verilmiş olup yalancı negatif sonuç saptanmamıştır. Linear regresyon analizi yapıldığında HBV-DNA kantitasyonunda elde edilen değerlerin (\log_{10}) beklenen değerlerle güçlü korelasyon ($r=0.982$) gösterdiği saptanmıştır (Şekil 1). HBV-DNA kantitasyonunda, örnek çiftlerinin (\log değerleri) median farklılığına dayanan NEQAS skorları 2 olarak elde edilmiş, skorlanan tüm HBV serum örneklerinde tanımlama oranı %100 (16/16) olarak belirlenmiştir.

Kalitatif HCV-RNA çalışmasının sonuçları Tablo III'te verilmiş olup yalancı pozitiflik saptanmamış, ancak örneklerden biri yalancı negatif sonuç vermiştir. Bu örnek, NEQAS de-

Tablo II. HBV-DNA Kantitasyonu İçin Gönderilen NEQAS Serum Örneklerinin Referans ve Ölçüm Sonuçları

Programı tipi	NEQAS örnek no	NEQAS referans değerleri (kIU/ml)	Ölçüm sonuçları (kIU/ml)	NEQAS referans median değerleri (log ₁₀ kIU/ml)	Ölçüm sonuçları (log ₁₀ kIU/ml)	NEQAS skoru
HBV-DNA kantitasyon	8026	14100	6710	4.15	3.83	2
	8027	4693	4290	3.67	3.63	
	8028	53.10	42.7	1.73	1.63	2
	8029	2.01	2.02	0.30	0.31	
	8306	55	41.4	1.74	1.62	2
	8307	21.39	19.4	1.33	1.29	
	8308	142.32	78.8	2.15	1.90	2
	8309	19.25	11.2	1.28	1.05	
	8463	245.26	56.5	2.39	1.75	2
	8464	10.29	6.39	1.01	0.81	
	8465	15300	7680	4.18	3.89	2
	8466	1806	283	3.26	2.45	
	8645	5694.65	2920	3.76	3.47	2
	8646	524	249	2.72	2.40	
	8647	22.45	17.9	1.35	1.25	2
	8648	2.43	1.76	0.39	0.25	

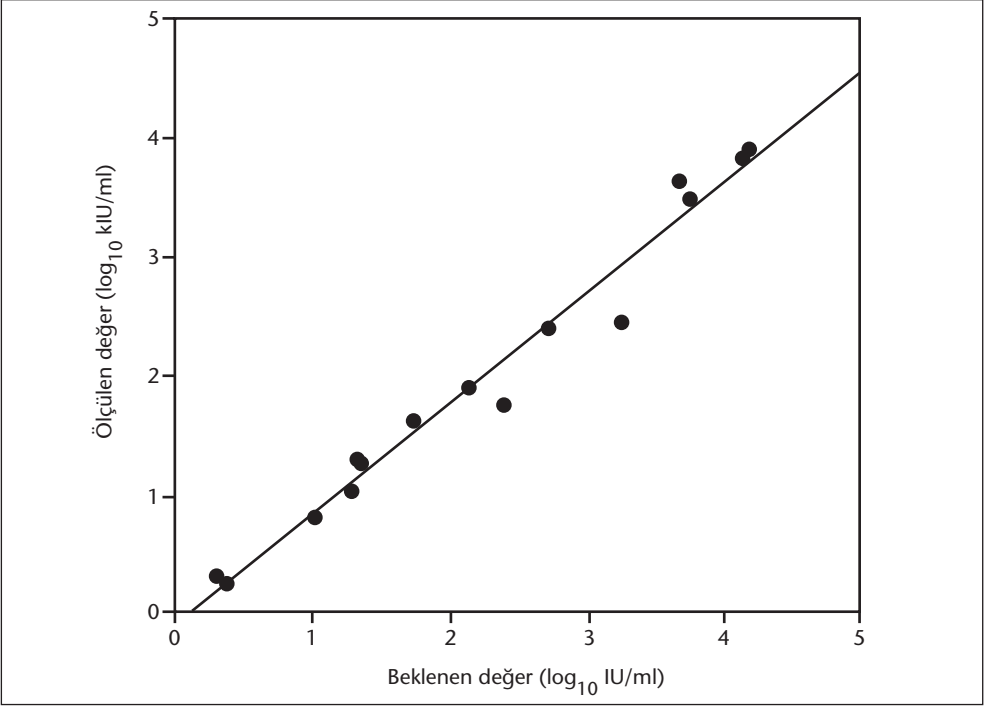
Tablo III. Kalitatif HCV-RNA Çalışması İçin Gönderilen NEQAS Plazma Örneklerinde Referans ve Ölçüm Sonuçları

Program tipi	NEQAS örnek no	NEQAS referans sonuçları	Ölçüm sonuçları	Genotiplendirme sonuçları	NEQAS skoru
HCV-RNA	8134	Pozitif	Pozitif	2b	2
Saptama	8135	Pozitif	Pozitif	2b	2
	8354	Pozitif	Negatif ^a	NEQAS'a bildirilmedi ^b	Skorlanmadı ^c
	8355	Negatif	Negatif	-	2
	8593	Pozitif	Pozitif	3a	2
	8594	Pozitif	Pozitif	3a	2

^a Sadece "in-house" PCR ile pozitif olarak saptanmıştır.

^b NEQAS'a sonuç bildirme tarihinden sonra devam eden çalışmada tip 1a olarak genotiplendirilmiştir. Bu örnek NEQAS'ın 2166 no'lu dağıtım raporunda tip 1a olarak tanımlanmıştır.

^c Bu örnek, viral yük median değerinin çok düşük -yaklaşık 79 IU/ml- olması nedeniyle NEQAS tarafından skorlanmamıştır.



Şekil 1. HBV-DNA gerçek zamanlı PCR testinde beklenen ve ölçülen değerlerin (log₁₀ kIU/ml) lineer regresyonu [$r= 0.987$, $r^2= 0.972$, regresyon katsayısı= 0.924 , sabit: -0.074]. Ölçülen değer= $(-0.074) + (0.924 \times \text{beklenen değer})$].

ğerlendirme skorları alındıktan sonra iki kez daha çalışılmış, yine negatif olarak tanımlanmış; sadece "in-house" PCR ile pozitif olarak saptanmış ve genotiplendirilmiştir. Genotiplendirme çalışmasında ise, tüm pozitif örnekler doğru olarak tiplendirilmiştir (Tablo III). HCV-RNA PCR testinde NEQAS skorları -bir örnek dışında- 2 olarak elde edilmiştir. Buna göre skorlanan tüm HCV örneklerinde tanımlama oranı %100 (5/5), gelen tüm örneklerde ise %83.3 (5/6) olarak belirlenmiştir.

TARTIŞMA

HBV ve HCV-PCR testinde, skorlanan dış kalite kontrol örneklerinde, tanımlama oranlarının %100 olarak belirlenmesi laboratuvarımızın bu testlerdeki tanılal performansını gösteren veriler olarak değerlendirilmelidir. HBV-DNA kantitasyon testinde elde ettiğimiz skorlar, NEQAS'ın ideal skorlarıdır ve beklenen ile ölçülen değerler arasındaki korelasyonun oldukça güçlü olduğu ($r= 0.987$) görülmektedir. Bu sonuçlar antiviral tedavi alan HBV ile enfekte hastalarda viral yük test sonuçlarının doğruluğunu çok iyi yansıtmaktadır.

HCV-PCR testinde yalancı negatif olarak saptandığı için skorlanmayan bir örnek dışında skorların ideal olduğu görülmektedir. Yalancı negatif olarak tanımladığımız örneğin, HCV viral yük değeri, NEQAS tarafından değerlendirme raporlarında yaklaşık 79 IU/ml

olarak belirtilmiştir (NEQAS'ın ilgili dağıtımında bu örnek, iki laboratuvarın belirsiz sonucu vermesi de dahil olmak üzere %77.9 oranında bir doğrulukla bilinmiştir). Bu değer, PCR testinde kullandığımız kitin analitik duyarlılığın altında bir değerdir. Bu nedenle örnek yalancı negatif olarak tanımlanmış olabilir. Bu sonuç, HCV-PCR testinde kullanılan kitin analitik duyarlılığın daha da artırılması gerektiğini gösterebilir. Öte yandan rutin PCR tanı laboratuvarlarının bir çoğunda, HCV enfeksiyonlarının tanısında ve tedavi takibinde hem kalitatif hem de kantitatif gerçek zamanlı HCV-PCR testleri kullanılmaktadır. Zira analitik duyarlılığı yüksek ve dinamik aralığı geniş tek bir HCV-PCR kiti bulunmamaktadır⁵. Bu nedenle zayıf pozitif örneklerin saptanmasında kalitatif ya da "in-house" PCR metodu daha başarılı olabilir. Mancini ve arkadaşlarının¹⁵ çok merkezli çalışmasında, 368 HCV pozitif örneğin ikisinde yalancı negatif sonuç saptandığı ve bu örneklerin zayıf pozitif örnekler (3.0 IU/ml \log_{10}) olduğu belirtilmiştir. NEQAS'ın, 2000-2004 yılları arasında, aralarında ülkemizden laboratuvarların da bulunduğu 159 katılımcı laboratuvardan oluşan HCV-RNA saptama ve genotiplendirme değerlendirme programında, %3.3 oranında yalancı negatiflik, %1.7 oranında ise yalancı pozitiflik saptanmıştır²⁶. HCV genotip 4, 5 ve 6'nın bulunmadığı bu HCV test panellerinde katılımcıların %94.7-100 oranında genotipleri doğru tanımlamış olduğu bildirilmektedir²⁶. Benzer bir sorun, 2 \log_{10} kopya/ml HBV-DNA içeren bir örneği 2007 yılındaki dağıtımına dahil eden QCMD panelinde de saptanmıştır. Katılımcıların özellikle bu örneği doğru belirlemede sıkıntı yaşaması duyarlılık sorununu gündeme getirmektedir⁹. Öte yandan NEQAS, HCV-RNA sonuçlarımızda da görüldüğü gibi viral yük median değeri çok düşük örneklerde skorlama yapmamaktadır. Benzer bir uygulama EU-QCCA tarafından da yapılmakta ve zayıf pozitif ($< 5 \times 10^3$ kopya/ml) örnekleri yalancı negatif olarak tanımlayan laboratuvarlara ceza puanı vermemektedir²¹.

Dış kalite kontrol değerlendirme programları, katılımcı laboratuvarlara, kendilerine yollanan test örneklerinin deneyimli kişilerce çalışılması ve rutin test örnekleri gibi işlem görmesi gerektiğini bildirmektedir²⁷. Laboratuvarımızda NEQAS dış kalite kontrol örnekleri, rutin hasta örnekleri gibi çalışılmaktadır. Bu nedenle HBV ve HCV PCR testleri bir kez çalışılmış ve sonuçları NEQAS'a gönderilmiştir. Ancak test panellerinde sonuca ulaşmak için örnekleri iki ya da üç kez analiz etmenin ve oldukça özenli davranmanın, uygulama ihlali anlamına gelmeyeceği belirtilmektedir²⁷. Öte yandan dondurup çözme ile örnek stabilitesinin kaybolabileceği ve elde edilecek tekrarlı sonuçların hatalı olabileceği endişesi ortaya çıkabilir. NEQAS'ın katılımcılarına yolladığı HBV-DNA örneklerinin oda ısısı, 4°C ve -30°C'de 11 ay, HCV-RNA örneklerinin ise -30°C'de yaklaşık 7 ay stabil kaldığı ve çalışma içi tekrarlarda, sonuçlar arasında yaklaşık 0.5 \log_{10} varyasyon saptandığı belirtilmektedir¹⁸.

Katılımcı laboratuvarlara gönderilen panellerde az sayıda örnek bulunması, gönderilen bazı örneklerin uygunsuzluğu ve sonuçların genellikle yayımlanmaması dış kalite kontrol değerlendirme programlarının dezavantajları olarak öne çıkmaktadır². Laboratuvarımıza gönderilen NEQAS HCV panellerinde genotip 4, 5 ve 6'nın bulunmaması nedeniyle tüm genotipleri sınamamış olmamız bir dezavantaj gibi görünmektedir. Bu nedenle dış kalite kontrol değerlendirme organizasyonlarının, katılımcıların bulunduğu

coğrafyada sık rastlanmayan HCV genotiplerini içerecek örnekleri de yollamaları uygun olabilir. Çalışmamızda, HCV'nin genotiplendirilmesi DNA dizi analizi ile yapılmıştır. DNA dizi analizi, karmaşık ve çok basamaklı prosedürü nedeniyle optimizasyonu güç olan bir tekniktir. Klinik tanı laboratuvarlarında genotiplendirme, polimorfizm ve mutasyon analizlerinde sıklıkla kullanılmaktadır. Artan önemi nedeniyle DNA dizi analizinde dış kalite kontrol değerlendirmesinin zorunlu olması gerektiği önerilmektedir^{20,28,29}. NEQAS'dan gönderilen HBV ve HCV panellerinde sayıca daha çok örnek bulunması, PCR'de yalancı pozitifliğin ve yalancı negatifliğin denetlenmesinde daha yararlı olacaktır. Öte yandan dış kalite kontrol değerlendirme programlarının katılımcı laboratuvarlara gönderdiği test materyallerinin her zaman rutin test materyalleri ile aynı içerikte olması eleştirilmektedir. Örneklemelerin değiştirilebilir olması ile bu sorunun giderilebileceği belirtilmektedir²⁷.

Karşılaştırmalı analizlere dayalı çalışmalarda iyi performans gösteren kitler ve çalışma grupları tarafından yapılan öneriler rutin PCR tanı laboratuvarlarında kullanılacak metotların ve ticari kitlerin hangi kriterlere göre seçileceği konusuna açıklık getirmektedir^{5,6}. Bu aşamada, dış kalite kontrol programların önemi ortaya çıkmaktadır. Kalite değerlendirme programları hem sonuç raporlarında katılımcıların kullandıkları metot ya da kitleri belirtmeleri hem de kendi yaptıkları performans çalışmaları, rutin PCR tanı laboratuvarlarında kullanılacak metot ve ticari kitlerin seçimine yön verebilmektedir^{30,31}.

Sonuç olarak, HBV ve HCV enfeksiyonlarının moleküler tanısında dış kalite kontrol çalışmalarının önemini vurguladığımız bu çalışmada, kendi laboratuvarımızın bu konudaki performansı değerlendirilmiştir. Elde ettiğimiz sonuçlar, HBV-PCR'de viral yük test sonuçlarının oldukça iyi, HCV-PCR testinde ise kullanılan kitin analitik duyarlılığın daha da artırılması gerektiğini göstermektedir. Rutin PCR laboratuvarları, kullanacakları metotları ve kitleri seçmek, kit ve laboratuvar koşullarını denetleyebilmek ve performanslarında iyileşme sağlayabilmek için tarafsız bir değerlendirmeye, kısaca dış kalite kontrol değerlendirme programlarına mutlaka ihtiyaç duymalıdır. Dış kalite kontrol örnekleri, çalışma koşullarını yansıtması ve olası sorunları göstermesi bakımından hasta örnekleri gibi çalışmalı ve sonuçları tekrarlı analizlere dayandırmaktan kaçınılmalıdır. Ayrıca gelecekte NEQAS tarafından dağıtımı yapılacak panellerde, laboratuvarların performansını tam anlamıyla yansıtması bakımından HCV genotip yelpazesi geniş tutulmalı ve daha çok sayıda test örneği bulunmalıdır.

KAYNAKLAR

1. Radström P, Knutsson R, Wolffs P, Lövenklev M, Löffström C. Pre-PCR processing strategies to generate PCR-compatible samples. *Mol Biotechnol* 2004; 26: 133-46.
2. Thon EV. Quality control in nucleic acid testing - where do we stand? *J Clin Virol* 2002; 25: 13-21.
3. Ramsden SC, Daly S, Geilenkeuser WJ, et al. EQUAL-quant: an international external quality assessment scheme for real-time PCR. *Clin Chem* 2006; 52: 1584-91.
4. Schloss L, van Loon AM, Cinque P. An international external quality assessment of nucleic acid amplification of herpes simplex virus. *J Clin Virol* 2003; 28: 175-85.
5. Barbeau JM, Goforth J, Caliendo AM, Nolte FS. Performance characteristics of a quantitative TaqMan hepatitis C virus RNA analyte-specific reagent. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 3739-46.

6. Elbeik T, Surtihadi J, Destree M, et al. Multicenter evaluation of the performance characteristics of the Bayer VERSANT HCV RNA 3.0 Assay (bDNA). *J Clin Microbiol* 2004; 42: 563-69.
7. Howerton D, Anderson N, Bosse D, Granade S, Westbrook G. Good laboratory practices for waived testing sites. *MMWR* 2005; 54: 1-25.
8. Sábato MF, Shiffman ML, Langley MR, Wilkinson DS, Gonzalez AF. Comparison of performance characteristics of three real-time reverse transcription-PCR test systems for detection and quantification of hepatitis C virus. *J Clin Microbiol* 2007; 45: 2529-36.
9. Sayıner AA. QCMD HBV, HCV panellerinde sonuçlar, s:110. 3. Ulusal Viroloji Kongresi. 9-13 Aralık 2007, Kongre Özet Kitabı, Uludağ, Bursa.
10. Tuncel P. Kaliteyi sağlamada ana bileşenler, s: 107. 3. Ulusal Viroloji Kongresi. 9-13 Aralık 2007, Kongre Özet Kitabı, Uludağ, Bursa.
11. Liberec JC. Role of external quality assurance schemes in assessing and improving quality in medical laboratories. *Clin Chim Acta* 2001; 309: 173-7.
12. Orta Mira N, Guna Serrano MR, Perez JL, Gimeno Cardona C. Quality assessment programme of the Spanish Society of Infectious Diseases and Clinical Microbiology. Analysis of results. 2005. *Enferm Infec Microbiol Clin* 2006; 24: 1-7.
13. Snell JJ, De Mello JV, Gardner PS. The United Kingdom national microbiological quality assessment scheme. *J Clin Pathol* 1982; 35: 82-93.
14. Sciacovelli L, Zardo L, Secchiero S, Zaninotto M, Plebani M. Interpretative comments and reference ranges in EQA programs as a tool for improving laboratory appropriateness and effectiveness. *Clin Chim Acta* 2003; 333: 209-19.
15. Mancini C, Pisani G, Azzi A, et al. Inter-laboratory comparison of qualitative and quantitative detection of hepatitis C (HCV) virus RNA in diagnostic virology: a multicentre study (MS) in Italy. *J Clin Virol* 2004; 30: 313-9.
16. Thon EV, Van Loon AM, Schirm J, Reid J, Klapper PE, Cleator GM. European proficiency testing program for molecular detection and quantitation of hepatitis B virus DNA. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 4407-12.
17. Gentili G, Pisani G, Saldanha J, et al. High proficiency in detecting the six major hepatitis C virus genotypes of laboratories involved in testing plasma by nucleic acid amplification technology. *Vox Sang* 2003; 85: 114-6.
18. Vaughan H, Chalker VJ, Mee Z, Rossouw A, James V. Stability of lyophilised specimens for the molecular detection of viral DNA/RNA. *J Clin Virol* 2006; 35: 135-40.
19. Noordhoek GT, Mulder S, Wallace P, van Loon AM. Multicentre quality control study for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples by nucleic acid amplification methods. *Clin Microbiol Infect* 2004; 10: 295-301.
20. Patton SJ, Wallace AJ, Elles R. Benchmark for evaluating the quality of DNA sequencing: proposal from an international external quality assessment scheme. *Clin Chem* 2006; 52: 728-36.
21. Schirm J, van Loon AM, Thon VE, Klapper PE, Reid J, Cleator GM. External quality assessment programme for qualitative and quantitative detection of hepatitis C virus RNA in diagnostic virology. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 2973-80.
22. Chalker VJ, Vaughan H, Patel P, et al. External quality assessment for detection of *Chlamydia trachomatis*. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 1341-7.
23. White LO. UK NEQAS in antibiotic assays. *J Clin Pathol* 2000; 53: 829-34.
24. Walton C, Hawkey PM, James VL. Examination of specimens for mycobacteria in clinical laboratories in 21 countries: a 10-year review of the UK National Quality Assessment Scheme for Mycobacteria Culture. *Clin Microbiol Infect* 2005; 11: 1016-21.
25. James V. External quality assessment programmes for molecular testing in clinical diagnostic microbiology laboratories. *Uydu Sempozyumu*. 1. Ulusal Viroloji Kongresi, 21-25 Eylül 2003, Kuşadası, Aydın.
26. Chalker VJ, Rossouw A, Mee Z, Patel P, Vaughan H, James VL. External quality assessment for the molecular detection of hepatitis C virus. *J Clin Virol* 2007; 39: 141-4.

27. Møller J, Henriksen GM. The end-users' perspective; European Committee for External Quality Assurance Programmes in Laboratory Medicine (EQALM). IFCC Symposium. June 7th, 2007, Amsterdam, Holland.
28. Nejad PA, Beineke AD, Pfeiffer U, et al. Methodologic European External Quality Assurance for DNA sequencing: The EQUALseq Program. Clin Chem 2006; 52: 716-27.
29. Bakker E. Is the DNA sequence the gold standard in genetic testing? Quality of molecular genetic tests assessed. Clin Chem 2006; 52: 557-8.
30. Francis J, Barrett SP, Ogilvie MM, Sutherland S. Best Practice No 175. Guidelines for virological and non-viral serological examination of specimens in routine diagnostic microbiological laboratories. J Clin Pathol 2004; 57: 1-5.
31. Wallace P. Improving the molecular detection of pathogens international external quality assessment schemes, s: 109. 3. Ulusal Viroloji Kongresi. 9-13 Aralık 2007, Kongre Özet Kitabı. Uludağ, Bursa.