

# EPSTEIN-BARR VİRUS VİRAL KAPSİD ANTİKORLARININ SAPTANMASINDA İMMÜNOBLOT YÖNTEMİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

## EVALUATION OF IMMUNOBLOT-BASED ASSAY FOR DETECTING EPSTEIN-BARR VIRUS VIRAL CAPSID ANTIBODIES

İmre ALTUĞLU<sup>1</sup>, Ayşegül AKSOY<sup>1</sup>, Ayşın ZEYİNOĞLU<sup>1</sup>, Mehmet ORMAN<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir. (imre.altuglu@ege.edu.tr)

<sup>2</sup> Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Bilişim ve Biyoistatistik Anabilim Dalı, İzmir.

### ÖZET

Epstein-Barr virus (EBV) enfeksiyonlarının serolojik tanısında, immünofloresan (IFA) tekniklere alternatif olabilecek, uygulanması daha pratik ve değerlendirmesi daha objektif yeni alternatif yöntemler denemektedir. Bu çalışmada, EBV viral kapsid antijenine karşı antikor varlığının (anti-VCA IgM ve anti-VCA IgG) saptanmasında immünoblot (IB) temelli bir testin, serolojik altın standart olarak kabul edilen IFA ile karşılaştırmalı performansının değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Çalışmaya, Ege Üniversitesi Hastanesi Seroloji Laboratuvarına EBV enfeksiyonu serolojik durumunun saptanması amacıyla gönderilen yaşları 3 ay ile 89 yıl (ortalama 28 yıl) arasında değişen 104 kadın, 173 erkek hastaya ait 277 serum örneği alınmıştır. Tüm örnekler, IB (Euroline IgM ve IgG; Euroimmun, Almanya) ve IFA (EBV-CA IgG ve IgM, Euroimmun, Almanya) testleri ile çalışılmış ve sonuçlar phi ( $\Phi$ ) ilişki katsayısı kullanılarak karşılaştırılmıştır. IB yöntemiyle VCA IgM pozitif bulunan 216 olgunun sadece 34 (%15.7)'ü IFA IgM ile doğrulanırken, 162 (%75)'si IFA ile negatif, 20 (%9.3)'si ise şüpheli olarak saptanmıştır ( $\Phi = 0.167$ ; düşük ilişki). Buna karşın IB yöntemiyle VCA IgG pozitif bulunan 85 olgunun 82 (%96.5)'si IFA IgG ile doğrulanmış, 2 (%2.3)'si negatif ve 1 (%1.2)'i şüpheli olarak tespit edilmiş; IB ile negatif bulunan olguların %33.3 (6/18)'ü IFA IgG ile de negatif sonuç vermiştir ( $\Phi = 0.441$ ; anlamlı ilişki). IFA ile alınan şüpheli sonuçlar değerlendirme dışı bırakıldığında; IB VCA IgG ile IFA IgG sonuçları arasındaki uyum %85.4 (88/103) ve IB VCA IgM ile IFA IgM sonuçları arasındaki uyum %27.3 (69/253) olarak hesaplanmıştır. IB VCA IgM yönteminde bantların reaksiyon şiddeti ile IFA IgM pozitifliği arasındaki ilişki incelendiğinde; IB testinde bant koyuluğu (1+'den 3+'e doğru) arttıkça IFA testindeki pozitiflik oranlarının da arttığı (p19 bandı için %9.9'dan %29.5'e; gp125 bandı için %24'ten %85.7) gözlenmiştir. IB VCA IgM testinde, 165 örnekte tek başına p19 bant pozitifliği belirlenmiş, bunlardan 135 (%81.8)'inin IFA ile negatif, 15 (%9.1)'inin pozitif ve 15 (%9.1)'inin şüpheli sonuç verdiği izlenmiştir. IB temelli testler otomatize platformları ve bir serum örneğinde farklı IgG panellerinin saptanabilmesi gibi özellikleri nedeniyle IFA'ya alternatif olmakla beraber, çalışmamızda VCA IgM testinde yalancı pozitiflik oranının oldukça yüksek olduğu (%75) gözlenmiştir. Sonuç olarak, tarama testi olarak IB yönteminin kullanıldığı rutin laboratuvarlarda, VCA IgM testi ile pozitif sonuç (özellikle de tek başına p19 bandı pozitifliği) veren örnekler ile düşük şiddette bant oluşturan örneklerin IFA ile doğrulanması gerektiği kanısına varılmıştır.

**Anahtar sözcükler:** Epstein-Barr virus, immünoblot testi, immünofloresans testi, anti-VCA antikorları.

## ABSTRACT

Various attempts have been made to improve Epstein-Barr virus (EBV) serodiagnosis by developing more practical and objective methods than immunofluorescence-based assays. In the present study, the performance of immunoblot-based assays were evaluated by comparing the results obtained by the gold standard immunofluorescence antibody (IFA) test for the detection of IgM and IgG antibodies against EBV viral capsid antigen (anti-VCA). Serum samples of 277 patients admitted to Ege University Hospital for routine EBV diagnosis were included in the study. The age range of the patients was 3 months-89 years (mean 28 years) and 104 of them were females and 173 were males. All the samples were assayed by commercial immunoblot (Euroline IgM and IgG; Euroimmun, Germany) and IFA (EBV-CA IgG and IgM, Euroimmun, Germany) methods. Crosstabulation, chi-square test and phi ( $\Phi$ ) measures in SPSS 16.0 statistical package programme were used for data analysis. Of the 216 samples that were interpreted as positive with immunoblot-based IgM assay, only 34 (15.7%) were confirmed as positive with IFA, whereas 162 (75%) were negative, and 20 (9.3%) were equivocal ( $\Phi= 0.167$ ; low correlation). Of the 85 samples that were anti-VCA IgG positive with immunoblot assay, 82 (96.5%) were positive, 2 (2.3%) were negative and 1 (1.2%) were equivocal with IFA ( $\Phi= 0.441$ ; significant correlation). When the indeterminate results obtained by IFA test were excluded from the evaluation, the correlation between immunoblot VCA IgG and IFA IgG was 85.4% (88/103) and between immunoblot VCA IgM and IFA IgM was 27.3% (69/253). When the intensities of bands were evaluated for IgM testing, it was noted that as the intensity of the bands increased (1+ to 3+), IFA VCA IgM reactivity rates increased (from 9.9% to 29.5% for p19 band; from 24% to 85.7% for gp125 band). For immunoblot VCA IgM testing, 165 samples were found to be positive only for VCA p19 band. Of these samples, 135 (81.8%) were negative, 15 (9.1%) were positive and 15 (9.1%) were equivocal with IFA. It is observed that even though immunoblot assays with automated blotting and scanning systems can be a convenient alternative to immunofluorescence assay, the rate of false positivity obtained for VCA IgM was high (75%). It was concluded that in laboratories which apply immunoblotting as a primary screening test for EBV serodiagnosis, the positive VCA IgM results (particularly isolated p19 band positivity) and the presence of low intensity bands, should be confirmed by IFA testing.

**Key words:** Epstein-Barr virus, immunoblot test, immunofluorescence test, anti-VCA antibodies.

## GİRİŞ

İnsan Herpesvirus ailesinin üyelerinden biri olan Epstein-Barr virus (EBV) tüm dünyadaki erişkinlerin %95'ini enfekte etmektedir. EBV, akut ve kendini sınırlayan enfeksiyonlardan, Burkitt lenfoma ve nazofarenks karsinomu gibi malign neoplazmalara kadar çok geniş bir klinik hastalık spektrumuna sahiptir. EBV enfeksiyonlarının çoğu, çocukluk döneminde ve asemptomatik olarak geçirilir. Ancak enfeksiyonların semptomatik olduğu durumlarda, benzer semptomları oluşturan pek çok patojen olduğundan, EBV ile ilişkili enfeksiyöz mononükleoz tanısını koymak önemlidir<sup>1,2</sup>. Akut enfeksiyöz mononükleozun tanısı, immün sistemi normal hastalarda EBV'ye özgül antikorların saptanmasıyla konur<sup>2,3</sup>. Antikor testlerinin spektrumu, özgül olmayan ve uzun süredir uygulanan heterofil antikor testlerinden, farklı substratlar, antijenler ve değerlendirme kriterlerine sahip EBV'ye özgül yöntemlere kadar değişiklik göstermektedir.

EBV enfeksiyonunda serolojik profilin belirlenmesinde özellikle üç serolojik parametrenin; viral kapsid antijeni (VCA)'ne özgül IgG, VCA'ya özgül IgM ve EBV nüklear antijen 1 (EBNA-1)'e özgül IgG'nin belirlenmesi önemlidir. EBV enfeksiyonunda oluşan hümmoral yanıt, genellikle altın standart olarak kabul edilen indirekt immünofloresan (IFA) veya en-

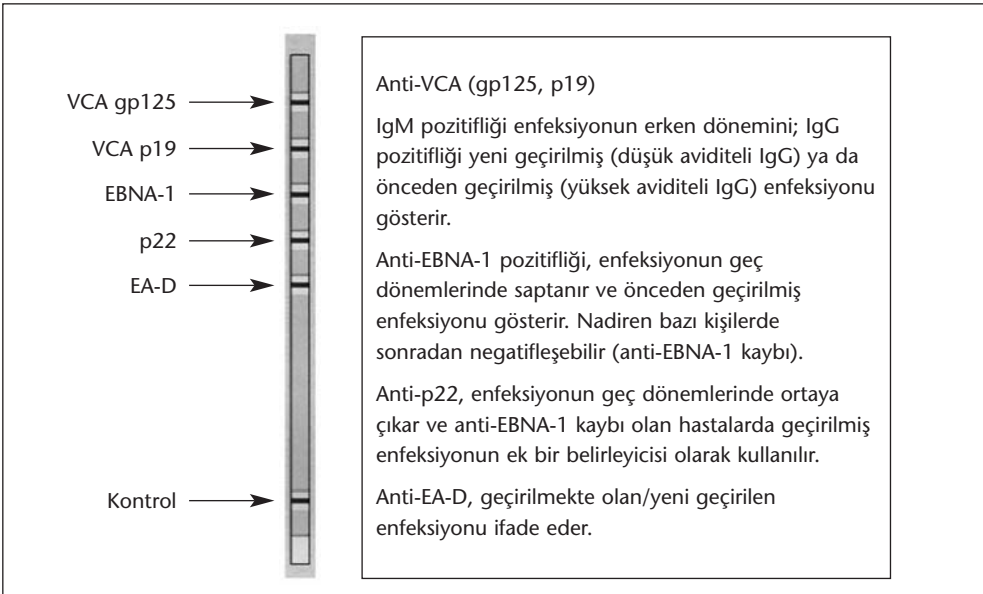
zim immünassay (EIA) formatındaki testler ile değerlendirilir<sup>4</sup>. Ancak özellikle IFA, çok fazla miktarda örneğin test edilmesine ve otomasyona olanak vermediğinden ve ayrıca, antijen çeşitliliği ve değerlendirmenin subjektif olmasına bağlı olarak standardizasyona uygun değerdir. Bu amaçla, EBV enfeksiyonlarının serolojik tanısında IFA'ya alternatif olabilecek yeni yöntemler denenmektedir<sup>5,6</sup>. Bu çalışmada, immünoblot temelli bir testin anti-VCA IgM ve IgG saptanmasında, serolojik altın standart olarak kabul edilen IFA ile karşılaştırmalı performansının değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

## GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmaya, Ege Üniversitesi Hastanesi Seroloji Laboratuvarına EBV enfeksiyonu serolojik durumunun saptanması amacıyla gönderilen, yaşları 3 ay ile 89 yıl (ortalama 28 yıl) arasında değerşen 104 kadın, 173 erkek hastaya ait 277 serum örneği alındı.

Örneklerde immünoblot (IB) testi, Euroline IgM (Euroimmun, Almanya) ve Euroline IgG (Euroimmun, Almanya) kitleleriyle üretici firmanın önerileri doğrultusunda çalışıldı. Euroline IgM kiti ile, iki farklı EBV kapsid antijenine (gp125, p19) özgül IgM antikoları; Euroline IgG ile ise beş farklı EBV antijenine (VCA gp125, VCA p19, EBNA1 p22 ve EA-D) özgül IgG antikoları kalitatif olarak saptandı (Şekil 1). İşlemler Euroblot Master (Euroimmun, Almanya) cihazında gerçekleştirildi ve oluşan bantlar koyuluk şiddetine göre (+/-, +, ++, +++) derecelendirildi.

Daha sonra aynı serum örnekleri, IFA temelli ticari bir test (EBV-CA IgG ve IgM, Euroimmun, Almanya) ile yine üretici firmanın önerilerine göre çalışılarak sonuçlar karşılaştı-



Şekil 1. İmmünoblot EBV-IgG ve EBV-IgM yönteminde kullanılan antijenler ve antikor pozitifliklerinin yorumlanması (Euroline EBV Profile 2, Euroimmun).

ıldı. Ayrıca, IgM ve IgG Euroline VCA p19 ve VCA gp125 bantlarının pozitiflik şiddeti ile IFA sonucu arasındaki ilişki değerlendirildi.

Veri analizinde SPSS 16.0 programında çapraz tablo, ki-kare testi ve phi ( $\Phi$ ) ilişki katsayısı kullanıldı.

## BULGULAR

Çalışılan serumlarda IB ve IFA yöntemleri ile alınan EBV IgM ve IgG sonuçları Tablo I'de gösterilmiştir. IB yöntemiyle anti-VCA IgM pozitif bulunan (p19 veya gp125 bandının tek başına veya birlikte pozitifliği) 216 olgunun sadece 34 (%15.7)'ü IFA IgM ile de pozitif bulunurken, 162 (%75)'si IFA ile negatif, 20 (%9.3)'si ise şüpheli olarak saptanmıştır. Buna karşın IB ile anti-VCA IgM negatif olarak bulunan 37 örneğin 35 (%94.6)'i IFA IgM ile de negatif bulunmuştur (Tablo I). Yapılan değerlendirmede (IFA ile alınan şüpheli sonuçlar değerlendirme dışı bırakıldığında), IB VCA IgM ile IFA IgM sonuçları arasındaki uyum %27.3 (69/253) ve ilişki katsayısı düşük ( $\Phi= 0.167$ ) olarak saptanmıştır (Tablo I).

Diğer taraftan, IB yöntemiyle anti-VCA IgG pozitif bulunan 85 olgunun 82 (%96.5)'si IFA IgG ile de pozitif olarak saptanırken; IB ile negatif bulunan 18 olgunun 6 (%33.3)'si IFA IgG ile de negatif sonuç vermiştir (Tablo I). Buna göre IB VCA IgG ile IFA IgG sonuçları arasındaki uyum %85.4 (88/103), ilişki katsayısı ( $\Phi= 0.441$ ) ise istatistiksel anlamlılık düzeyinde bulunmuştur.

IB VCA IgM yönteminde bantların reaksiyon şiddeti ile IFA IgM pozitifliği arasındaki ilişki incelendiğinde; IB testinde bant koyuluğu (1+'den 3+'e doğru) arttıkça IFA testindeki pozitiflik oranlarının da arttığı (p19 bandı için %9.9'dan %29.5'e; gp125 bandı için %24'ten %85.7) gözlenmiştir.

**Tablo I.** İmmünoblot ve IFA Yöntemleri ile Alınan EBV IgM ve IgG Sonuçlarının Karşılaştırılması

	IFA-IgM			Toplam
	Negatif	Pozitif	Şüpheli*	
<b>İmmünoblot VCA IgM</b>				
Negatif	35	1	1	37
Pozitif	162	34	20	216
Toplam	197	35	21	253
	IFA-IgG			Toplam
	Negatif	Pozitif	Şüpheli*	
<b>İmmünoblot VCA IgG</b>				
Negatif	6	12	0	18
Pozitif	2	82	1	85
Toplam	8	94	1	103

\* (+/-) olarak değerlendirilen sonuçlardır.

## TARTIŐMA

EBV enfeksiyonu serolojik tanısında rutin olarak uygulanan ve farklı teknikleri kullanan pek çok ticari yöntem bulunmaktadır<sup>7-10</sup>. Bunlar arasında yer alan geleneksel testler olan IFA ve EIA, iyi tanımlanmış oldukça güvenilir testler olmakla beraber, çalışılan her parametre için ayrı ayrı örnek ve reaktifite gereksinim duyulması, uygulanan her test için harcanan zaman ve iŐ gücünü artırmaktadır<sup>11</sup>. IFA sonuçlarının değerlendirmesinin deneyim gerektirmesi ve subjektif olması da, bir baŐka dezavantaj olarak karŐımıza çıkmaktadır. İmmünoblot (IB) yöntemleri ise, oldukça zgl olarak kabul edilen ve genellikle doğru-lama amacıyla uygulanan yöntemlerdir<sup>4</sup>. Bauer<sup>12</sup>, rekombinant antijenlerin kullanıldığı IB yöntemlerinin EBV serolojisinde yeni bir altın standart olarak kabul edilebileceğini ne sürmüŐtür. Laboratuvarımızda yürütülen ve sınırlı sayıda örnekte yapılan bir baŐka çalışmada, IFA ve IB testleri arasındaki uyum, anti-EBNA ve anti-VCA IgM için güçlü, anti-EA ve anti-VCA IgG için ise orta düzeyde saptanmıştır<sup>13</sup>.

Bu alıŐmada, IB yöntemi ile VCA IgG pozitif sonuç veren örneklerin çoğunun (82/85; %96.5) IFA ile doğrulandığı görülmüŐtür. Buna karşın, IB ile VCA IgG negatif bulunan örneklerin %66.7 (12/18)'si IFA ile pozitif olarak saptanmıŐ ve alınan sonuçlar arasındaki bu farklılığın, kullanılan antijen sistemlerinin farklılığından kaynaklanabileceği düŐünülmüŐtür. Zira, Euroline test stripleri natif VCA'dan saflaŐtırılmıŐ gp125 ve rekombinant VCA p19 antijenlerini içerirken; VCA IFA test lamalarında, her ukurcukta EBV kapsid antijenini eksprese eden hücreler kullanılmaktadır. Dolayısıyla, zellikle IB ile atipik profil saptanan (rn. VCA IgG negatif, EBNA IgG pozitif) rneklerin, IFA ile tekrar çalıŐılmasının gerekliliği öngörülmüŐtür.

ÇalıŐmamızın bir diğer bulgusu, IB ile VCA IgM pozitif olarak bulunan 216 örneğin büyük çoğunluğunun (%84.3) IFA ile (162 negatif, 20 Şüpheli sonuç) dođrulanmamıŐ olmasıdır. IB ile VCA IgM pozitif sonuç veren örneklerin %76.4 (165/216)'nde pozitiflik tek başına p19 bandına bağlıdır. Bir bütün olarak Euroline VCA IgM pozitif olguların %75 (162/216)'i ve izole p19 bandı pozitif örneklerin %81.8 (135/165)'i, IFA ile tekrar test edildiğinde negatif olarak saptanmıştır. Dolayısıyla, IB ile VCA IgM pozitif olarak bulunan, özellikle de tek başına p19 bandında pozitif sonuç veren örnekler ile düşük Őid-dette bant oluşturan örneklerin IFA ile doğrulanması uygun olacaktır.

Sonuç olarak, IB temelli testler, çok sayıda örneğin çalıŐılabilmesi, uygulama kolaylığı, otomatize platformları ve bir serum örneğinde farklı IgG panellerinin saptanabilmesi gibi özellikleri nedeniyle IFA'ya alternatif oluŐturmakla birlikte, alıŐmamızda IB yöntemini-nin IFA ile uyumluluk oranı VCA IgG için %85.4, VCA IgM için ise %27.3 olarak hesaplanmıştır. ÇalıŐmamızın sınırlamaları arasında, IB ile alınan VCA IgG ve IgM negatif örnek sayılarının az olması ve örneklerde ELISA gibi bir baŐka yöntemin daha uygulanamamıŐ olması sayılabilir. Yine de elde ettiğimiz veriler, tarama testi olarak IB yönteminin kullanıldığı rutin laboratuvarlarda, özellikle anti-VCA IgM testi ile alınan pozitif sonuçların, yüksek yalancı pozitiflik oranı dikkate alınarak IFA ve/veya ELISA ile doğrulanması gerektiğini vurgulamaktadır.

## KAYNAKLAR

1. Ooka T, Turenne-Tessier M, Stolzenberg MC. Relationship between antibody production to Epstein-Barr virus (EBV) early antigens and assessment. *Springer Semin Immunopathol* 1991; 13: 233-47.
2. Linde A. Epstein-Barr virus, pp: 1331-40. In: Murray, PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC (eds), *Manual of Clinical Microbiology*. 2003, 8<sup>th</sup> ed. ASM Press, Washington DC.
3. Haque T, Crawford DH. Epstein-Barr virus, pp: 123-46. In: Zuckerman AJ, Banatvala JE, Schoub BD, Griffiths PD, Mortimer P (eds), *Principles and Practice of Clinical Virology*. 2009, 6<sup>th</sup> ed. John Wiley and Sons Ltd, UK.
4. Hess RD. Routine Epstein-Barr virus diagnostics from the laboratory perspective: still challenging after 35 years. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 3381-7.
5. Binnicker MJ, Jespersen DJ, Harring JA, Rollins LO, Beito EM. Evaluation of flow immunoassay for detection of Epstein-Barr virus specific antibodies. *Clin Vaccine Immunol* 2008; 15: 1410-3.
6. Farber I, Hinderer W, Rothe M, Lang D, Sonneborn HH, Wutzler P. Serological diagnosis of Epstein-Barr virus infection by novel ELISAs based on recombinant capsid antigens p23 and p18. *J Med Virol* 2001; 63: 271-6.
7. Buisson M, Fleurent B, Mak M, et al. Novel immunoblot assay using four recombinant antigens for diagnosis of Epstein-Barr virus primary infection and reactivation. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 2709-14.
8. Debyser Z, Reynders M, Goubau P, Desmyter J. Comparative evaluation of three ELISA techniques and an indirect immunofluorescence assay for the serological diagnosis of Epstein-Barr virus infection. *Clin Diagn Virol* 1997; 8: 71-81.
9. Gartner BC, Fischinger JM, Roemer K, Mak M, Fleurent B, Mueller-Lantsch N. Evaluation of a recombinant line blot for diagnosis of Epstein-Barr virus compared with ELISA, using immunofluorescence as reference method. *J Virol Methods* 2001; 93: 89-96.
10. Weber B, Brunner M, Preiser W, Doerr HW. Evaluation of 11 enzyme immunoassays for the detection of immunoglobulin M antibodies to Epstein-Barr virus. *J Virol Methods* 1996; 57: 87-93.
11. Baetens DG, Van Renterghem LM. Coupled particle light scattering: a new technique for serodiagnosis of Epstein-Barr virus infection. *J Med Virol* 2001; 64: 519-25.
12. Bauer G. Simplicity through complexity: immunoblot with recombinant antigens as new gold standard in Epstein-Barr virus serology. *Clin Lab* 2001; 47: 223-30.
13. Altuglu I, Bozkurt H, Samlioglu P, Zeytinoglu A. Evaluation of three different assays for the assessment of Epstein-Barr Virus immunological status. *New Microbiologica* 2007; 30: 393-8.