

İnfluenza A (H1N1) pdm09 Tanısında Hızlı Antijen Testi ile RT-PCR Testinin Karşılaştırılması §

Begüm NALÇA ERDİN*, Ö. Alpay ÖZBEK**, Murat DUMAN***, A. Arzu SAYINER*

* TC Sağlık Bakanlığı Tuzla Devlet Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı

** Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı

*** Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

ÖZET

Amaç: İnfluenza A (H1N1) pdm09 enfeksiyonunun virolojik tanısı için revers transkriptaz-polimeraz zincir tepkimesi (RT-PCR) yöntemi referans test olarak kabul edilmektedir. Ancak yüksek maliyet, özel altyapı ve deneyimli personel gereksinimi nedeniyle yalnızca belirli laboratuvarlarda kullanılabilir. Bu nedenle influenza virus enfeksiyonlarının tanısında hızlı antijen testleri sıklıkla kullanılmaktadır. Hızlı antijen testlerinin mevsimsel influenza tanısındaki duyarlılık ve özgüllüklerinin değişken olduğu bilinmektedir. 2009 yılında influenza A (H1N1) pdm09 virusunun ortaya çıkması ile birlikte, bu testlerin performanslarının yine değerlendirilmesine gereksinim duyulmuştur. Bu çalışmanın amacı, influenza A (H1N1) pdm09 enfeksiyonu tanısında hızlı antijen testlerini, gerçek zamanlı RT-PCR ile karşılaştırarak, testin duyarlılık, özgüllük ve prediktif değerlerini belirlemektir.

Gereç ve Yöntem: Çalışmada, Kasım 2009 - Ocak 2010 aylarında, çocuklardan alınan 68 nazofarengeal aspirat, hızlı antijen tanı testi ile influenza A açısından ve gerçek zamanlı RT-PCR ile hem influenza A/B hem de influenza A (H1N1) pdm09 virüsü yönünden incelendi. Sonuçlar, antijen testinin performans özelliklerini belirlemek amacıyla karşılaştırıldı.

Bulgular: Hızlı antijen testi 26/68 (%38.2) örnekte pozitif iken, 40 örnek influenza A/B RT-PCR testinde influenza A pozitif, 41 örnek ise influenza A (H1N1) pdm09 pozitif bulundu. Hızlı antijen tanı testinin, influenza A/B RT-PCR testine göre duyarlılığı %62.5, özgüllüğü %96.2, influenza A (H1N1) pdm09 RT-PCR testine göre duyarlılığı %63.4, özgüllüğü %100 olarak hesaplandı. Antijen testinin, influenza A (H1N1) pdm09 RT-PCR testine göre pozitif prediktif değeri (PPD) %100, negatif prediktif değeri (NPD) %64.2 idi.

Sonuç: Bu çalışma hızlı antijen testinin, salgın durumunda pediyatrik hasta grubunda influenza A (H1N1) pdm09 enfeksiyonunun tanısında yardımcı olabileceğini göstermiştir. Ancak, duyarlılığın düşük olması nedeniyle negatif örneklerin RT-PCR ile doğrulanması gereklidir.

Anahtar kelimeler: İnfluenza A (H1N1) pdm09, hızlı antijen tanı testi, PCR

SUMMARY

Comparison of Rapid Antigen Test with RT-PCR in the Diagnosis of Influenza A (H1N1) pdm09 Infection

Objective: Reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) is accepted as a reference test for the virologic diagnosis of influenza A (H1N1) pdm09 virus infection. Yet because of the high cost, the need for special infrastructure and experienced personnel these tests can only be used in specific laboratories. As an alternative, rapid antigen tests have been widely used in the diagnosis of influenza virus infection. The sensitivity and specificity of rapid antigen assays in the diagnosis of seasonal influenza are known to be variable. In 2009, after the emergence of influenza A (H1N1) pdm09 virus, reevaluation of performance of antigen tests has been needed. The aim of this study is to compare the antigen test with real-time RT-PCR in the diagnosis of influenza A (H1N1) pdm09 infection and to determine the sensitivity, specificity and predictive values of the test.

Material and Method: In this study, 68 nasopharyngeal aspirate samples collected from pediatric patients between November 2009 and January 2010 were tested with a rapid diagnostic antigen test for influenza A and a real-time RT-PCR assay which detects both influenza A/B and influenza A (H1N1) pdm09. Results were compared in order to determine the performance characteristics of the antigen assay.

Results: Rapid antigen test was positive in 26/68 (38.2%) of samples while 40 samples were positive for influenza A with influenza A/B RT-PCR assay and 41 were positive for influenza A (H1N1) pdm09. The sensitivity and the specificity of the rapid antigen test were 62.5% and 96.2% compared to influenza A/B RT-PCR and 63.4% and 100% compared to influenza A (H1N1) pdm09 RT-PCR assay. Positive predictive value of the antigen test was 100% and negative predictive value was 64.2% compared to influenza A (H1N1) pdm09 RT-PCR test.

Conclusion: This study showed that rapid antigen test could be helpful in the diagnosis of influenza virus A (H1N1) pdm09 infection in pediatric patients during an epidemic. Nevertheless, because of its low sensitivity, negative results should be confirmed with RT-PCR.

Key words: Influenza A (H1N1) pdm09, rapid antigen diagnostic test, PCR

Alındığı tarih: 29.02.2016

Kabul tarihi: 05.06.2016

Yazma adresi: Arzu Sayiner, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İnciraltı 35340 İzmir

Tel: +90 232 412 45 07

e-posta: arzu.sayiner@deu.edu.tr

§Bu araştırma TTB-Pandemik İnfluenza A H1N1v Bilimsel Danışma ve İzleme Kurulu'nun 2010 Pandemik Çalışma Raporu'nda poster olarak yer almıştır.

GİRİŞ

2009 yılı Nisan ayında ilk kez Amerika’da saptanan influenza A (H1N1) pdm09 virusu hızla tüm dünyaya yayılmıştır. İnfluenza A enfeksiyonunun hızlı tanısı, antiviral tedavinin başlanması ve enfeksiyon kontrol önlemlerinin alınabilmesi açısından önem taşımaktadır. Hücre kültürünün yanı sıra revers transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) influenza virus enfeksiyonlarının tanısında duyarlı ve özgül olması nedeniyle referans test olarak değerlendirilmektedir. Ancak RT-PCR yöntemi pahalıdır, özel ekipman ile personel gerektirir ve sonuçlanması yaklaşık 4-6 saat alır^(1,2). Kaset esaslı tam otomatik PCR testleri, klasik PCR yöntemlerinden hız, kolaylık, altyapı gereksinimi açısından üstün olmakla birlikte maliyet hâlâ önemli bir kısıtlayıcı faktördür.

Hızlı antijen tanı testleri, influenza virus enfeksiyonlarının tanısında, hızlı, kolay olması ve klinik karar vermede yardımcı olabilmesi nedeniyle kullanılmaktadır. Hızlı antijen testlerinin en önemli dezavantajı, duyarlılıklarının düşük olması nedeniyle enfeksiyon olasılığını dışlamada yetersiz kalmalarıdır⁽³⁾. Hızlı antijen testlerinin mevsimsel influenza tanısındaki duyarlılık ve özgüllükleri değişkenlik gösterebilmekte olup, sırasıyla %60-83 ve %90-95 civarında rapor edilmektedir⁽⁴⁾. Yeni genomik ve antijenik özellikler gösteren influenza A (H1N1) pdm09 virusunun ortaya çıkması ile birlikte, hızlı antijen testlerinin pandemik virusun tanısındaki duyarlılık ve özgüllüklerinin değerlendirilmesine gereksinim duyulmuştur. İnfluenza A (H1N1) pdm09 virus salgını sırasında antijen testlerinin duyarlılığının %18 ile %77 arasında olduğu bildirilmiştir⁽⁵⁾. İnfluenza A (H1N1) pdm09 virusu halen mevsimsel influenza viruslarından biri olarak önemini korumakta, kuzey yarımkürede içinde bulunduğumuz 2015-2016 influenza sezonunda baskın virus olarak saptanmaktadır⁽⁶⁾. Bu çalışmada, influenza A

(H1N1) pdm09 virusu enfeksiyonu tanısında hızlı antijen tanı testi ile gerçek zamanlı RT-PCR testi karşılaştırılarak, antijen testinin duyarlılık, özgüllük ve salgın dönemindeki prediktif değerleri belirlenmiştir.

GEREÇ ve YÖNTEM

Kasım 2009 ve Ocak 2010 tarihleri arasında, Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi Merkez Laboratuvarı’na gönderilen, tamamı çocuklardan alınan 68 adet nazofarengeal aspirat, hızlı antijen tanı testi (Becton Dickinson Directigen EZ Flu A+B, Almanya) ve gerçek zamanlı RT-PCR testi (Artus Influenza/H1 LC/RG RT-PCR Kit, Qiagen, Almanya) ile mevsimsel ve influenza A (H1N1) pdm09 virus pozitifliği açısından değerlendirildi. Antijen testi, viral nükleoprotein antijenleri saptamakta, influenza A ve B ayırımı yapabilmekteydi. Testler, üreticilerinin önerileri doğrultusunda çalışıldı. Kullanılan RT-PCR kiti, influenza A/B ve influenza A (H1N1) pdm09 saptamasını ayrı tüplerde yapmakta, ayrıca internal kontrol içermekteydi. Testte amplifikasyon ile elde edilen hedef bölgeleri, influenza A için 143 bp, influenza B için 94 bp, influenza A (H1N1) pdm09 için hemagglütinin-1 genom bölgesine ait 80 bp’lik fragmanlardı. Nükleik asid ekstraksiyonu 200 mikrolitre örnek ile High Pure Viral RNA Kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Almanya) kullanılarak yapıldı. RT-PCR testi Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Qiagen, Almanya) cihazında gerçekleştirildi.

BULGULAR

Altmış sekiz örneğin, 26’sı hızlı antijen testi ile 40’ı influenza A/B RT-PCR testi ile influenza A pozitif bulundu. Hızlı antijen tanı testi ile pozitif bulunan örneklerden bir tanesi influenza A/B RT-PCR testinin influenza A/B saptama kısmı ile negatif bulunurken, influenza A (H1N1) pdm09 kısmı ile pozitif saptandı (Tablo 1 ve

Tablo 1. Antijen testi ile influenza A/B RT-PCR testi sonuçlarının karşılaştırılması.

| | İnfluenza A RT-PCR testi pozitif | İnfluenza A RT-PCR testi negatif | Toplam |
|-----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|--------|
| İnfluenza A antijen testi pozitif | 25 | 1 | 26 |
| İnfluenza A antijen testi negatif | 15 | 27 | 42 |
| Toplam | 40 | 28 | 68 |

Tablo 2. Antijen testi ile pandemik influenza A (H1N1) pdm09 RT-PCR testi sonuçlarının karşılaştırılması.

| | H1N1/09 RT-PCR pozitif | H1N1/09 RT-PCR negatif | Toplam |
|-----------------------------------|------------------------|------------------------|--------|
| İnfluenza A antijen testi pozitif | 26 | 0 | 26 |
| İnfluenza A antijen testi negatif | 15 | 27 | 42 |
| Toplam | 41 | 27 | 68 |

Tablo 2). Hızlı antijen tanı testinin, influenza A/B RT-PCR testine göre duyarlılığı %62.5, özgüllüğü %96.2, influenza A (H1N1) pdm09 RT-PCR testine göre duyarlılığı %63.4, özgüllüğü %100 olarak hesaplandı. Antijen testinin, influenza A (H1N1) pdm09 RT-PCR testine göre pozitif prediktif değeri (PPD) %100, negatif prediktif değeri (NPD) %64.2 idi.

TARTIŞMA

İnfluenza virus enfeksiyonlarının tanısında antijen/antikor testleri, hücre kültürü ve RT-PCR gibi birçok yöntem kullanılmaktadır^(7,8). Bunlar arasında hücre kültürü ve RT-PCR altın standarttır. İnfluenza A (H1N1) pdm09 virusunun yayılması ile birlikte RT-PCR, özgül, duyarlı ve hücre kültüründen daha hızlı tanı sağladığı için referans yöntem olarak kabul edilmiştir^(4,9). Ancak influenza enfeksiyonu tanısında antijen testleri, özellikle salgınlar sırasında ve RT-PCR testi kullanma olanağının sağlanamadığı durumlarda, hızlı ve kolay uygulanabilmeleri nedeniyle birçok merkez tarafından kullanılmaktadır. Bu testlerin duyarlılık ve özgüllükleri, optimize edildikleri mevsimsel influenza tanısı için bilmekle birlikte, farklı antijenik özellikler gösteren suşlarda yeniden değerlendirilmeleri gerekmektedir. İnfluenza A (H1N1) pdm09 virusunun yayılması ile birlikte, bu etkeni saptamadaki performansları gündeme gelmiş ve farklı ticari

antijen testleri ile, değişik yaş ve hasta gruplarında çalışmalar yapılmıştır. CDC'nin konuyla ilgili olarak yayınladığı ilk çalışmada, hızlı testlerin duyarlılıklarının %40-69 arasında olduğu bildirilmiş, iki okul salgınında bu oran %47 olarak saptanmıştır^(10,11). İnfluenza A (H1N1) pdm09 salgını sırasında yapılan çeşitli çalışmalarda, antijen testlerinin duyarlılığının %18 ile %77 arasında olduğu bildirilmiştir⁽⁵⁾. Çalışmamızda, "Directigen EZ Flu A+B Test" hızlı antijen tanı testinin, mevsimsel influenza A RT-PCR testine göre duyarlılığı %62.5, özgüllüğü %96.2 olmuş, influenza A (H1N1) pdm09 RT-PCR testine göre ise duyarlılıkta önemli bir değişiklik olmazken, özgüllük %100'e yükselmiştir. Salgının merkezimizde tepe yaptığı aylarda gerçekleştirilen bu çalışmada, influenza A (H1N) pdm09 RT-PCR testi esas alındığında, antijen testinin pozitif prediktif değeri %100, negatif prediktif değeri %64.2 olarak bulunmuştur. "Directigen EZ Flu A+B Test" hızlı antijen tanı testi ile ilgili olarak yurt içi ve yurtdışından yapılmış olan başka çalışmalar da bulunmaktadır. Berktaş ve ark.'nın⁽¹²⁾ acil servise influenza A enfeksiyonu şüphesi ile başvuran 52 hastada yapmış olduğu çalışmada, antijen testinin duyarlılığı %49, özgüllüğü %100 olarak bulunmuştur. İstanbul Üniversitesi Ulusal İnfluenza Referans Laboratuvarı'nda yapılan çalışmada ise RT-PCR ile influenza A (H1N1) pdm09 pozitifliği saptanan 104 örneğin %50'si "Becton Dickinson"

hızlı antijen testi ile pozitif bulunmuştur⁽⁷⁾. Dünyada “Directigen EZ Flu A+B Testi”nin de içinde bulunduğu farklı antijen testleri ile farklı hasta gruplarında yapılan çalışmalarda, hızlı antijen testlerinin influenza A (H1N1) pdm09 saptamadaki duyarlılıklarının %10-70 arasında değiştiği, özgüllüğün ise %95-100 arasında olduğu bildirilmiştir^(4,12). Hızlı antijen testlerinin performanslarını etkileyen faktörler; kullanılan testin özellikleri, virusun antijenik özellikleri, örnek tipi ve enfeksiyonun hangi döneminde alındığı (içerdiği virus miktarı), popülasyonun yapısı, enfeksiyonun prevalansı, yöntemin doğru uygulanıp uygulanmadığı, transport sıvısı kullanılıp kullanılmadığı (dilüsyon faktörü) olarak sıralanmıştır^(2,3,8). Çalışmalar, özgüllüğün duyarlılıktan daha iyi olduğunu göstermektedir. Bu nedenle, özellikle prevalansın arttığı dönemlerde pozitif sonuçların enfeksiyon kanıtı olarak kullanılabilmesi, ancak negatif sonuçların enfeksiyon olasılığını dışlayamayacağı kabul edilmektedir.

Çalışmamızdaki örneklerin tamamı çocuk hastalardan elde edilmiştir. Çocuk hastalarla yapılan çalışma sayısı sınırlıdır. İspanya’da 140 çocuk hastada, RT-PCR ile “Directigen EZ Flu A+B Testi”ni karşılaştıran bir çalışmada, bulgularımıza benzer olarak, duyarlılık %70.4, özgüllük %100, NPD %76.6 ve PPD %100 olarak rapor edilmiştir⁽¹³⁾. Merkezimizden 2009 yılında yapılan ve influenza A antijeni pozitif pediatrik hastaların klinik özelliklerini değerlendiren bir çalışmada, $\geq 39^{\circ}\text{C}$ ateş, miyalji, kusma-ışhal bulgularını gösteren çocuklarda antijen testinin pozitif saptanma olasılığının arttığı bildirilmiştir⁽¹⁴⁾.

Sonuç olarak, çalışmamız, hızlı antijen testlerinin pediatrik hasta grubunda tanıya yardımcı olarak kullanılabilmesi göstermiştir. Çalışmanın yapıldığı dönemde antijen testinin yalancı pozitifliğinin olmaması, ancak duyarlılığının düşük olması, antijen pozitif olguların enfekte olarak

kabul edilebileceğini, ancak negatif örneklerin RT-PCR ile doğrulanması gerektiğini göstermektedir. Prediktif değerler enfeksiyonun prevalansı ile değişkenlik gösterdiği için, çalışmamızda elde edilen prediktif değerlerin, çalışmanın yapıldığı pandeminin tepe dönemine ait olduğu dikkate alınmalıdır.

KAYNAKLAR

1. Chartrand C, Minion P, Pai M. Rapid diagnostics for influenza: What are the options? *Future Microbiol* 2010; 5:1451-5. <http://dx.doi.org/10.2217/fmb.10.120>
2. Chartrand C, Leeftang MM, Minion J, Brewer T, Pai M. Accuracy of rapid influenza diagnostic tests: a meta analysis. *Ann Intern Med* 2012; 156:500-11. <http://dx.doi.org/10.7326/0003-4819-156-7-2012-04030-00403>
3. World Health Organization. Use of influenza rapid diagnostic tests, 2010. (http://www.who.int/publications/2010/9789241599283_eng.pdf)
4. Us AD. Pandemik influenza enfeksiyonunda etyopatogenez ve laboratuvar tanı yöntemleri. *Hacettepe Tıp Derg* 2010; 41:13-27.
5. Leonardi G P, Wilson AM, Mitrache I, Zuretti AR. Comparison of the Sofia and Veritor direct antigen detection assay systems for identification of influenza viruses from patient nasopharyngeal specimens. *J Clin Microbiol* 2015; 53:1345-7. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.03441-14>
6. World Health Organization. Influenza update No:256, 17 February 2016. (http://www.who.int/Influenza/surveillance_monitoring/updates/latest_update_GIP_surveillance/en)
7. Kanturvardar M, Akçay-Ciblak M, Asar S, Bozkaya E, Yenen OŞ, Badur S. Pandemik A/H1N1 enfeksiyonlarının tanısında hızlı test “sorunu”. *Klinik Derg* 2009; 22:79-81.
8. Nam MH, Jang JW, Lee JH, Cho CH, Lim CS, Kim WJ. Clinical performance evaluation of the BD Veritor System Flu A+B assay. *J Virol Methods* 2014; 204:86-90. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2014.04.009>
9. World Health Organisation. Protocol of realtime RTPCR for influenza A (H1N1), 2009. (http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/CDCRealtime RTPCR_SwineH1Assay-2009_20090430.pdf)
10. MMWR. Evaluation of rapid influenza diagnostic tests for detection of novel influenza A (H1N1) virus -United States, 2009. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2009; 58:826-9.
11. MMWR. Performance of rapid influenza diagnostic tests during two school outbreaks of 2009 pandemic influenza A (H1N1) virus infection-Connecticut, 2009.

MMWR Morb Mortal Wkly Rep 2009; 58:1029-32.

- 12. Berktaş M, Çıkman A, Yaman G, Güdücüoğlu H.** Pandemik influenza A (H1N1) tanısında Directigen™ EZ Flu A+B hızlı antijen tanı testinin değerlendirilmesi. *Türkiye Klinikleri J Med Sci* 2011; 31:548-52. <http://dx.doi.org/10.5336/medsci.2009-16600>
- 13. Blázquez D, Diaz J, Cruz J, Folqueria D, Acosta J, Marin M.** Rapid influenza diagnostic tests for detection

of novel influenza A (H1N1) virus in children. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2010; 28:698-700.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.eimc.2010.02.018>

- 14. Duman M, Gençpınar P, Ozbek OA, Özdemir D, Sayiner AA.** Value of rapid antigen test for pandemic influenza A (H1N1) 2009 in the pediatric emergency department. *Pediatr Emerg Care* 2013; 29:612-6. <http://dx.doi.org/10.1097/PEC.0b013e31828e9b69>