

SAĞLIKLI KAN BAĞIŞÇILARINDA NÜKLEİK ASİT AMPLİFİKASYON TEKNOLOJİSİ YÖNTEMİ İLE HEPATİT B VİRUS DNA'SININ ARAŞTIRILMASI

SURVEY OF HEPATITIS B VİRUS DNA IN HEALTHY BLOOD DONORS BY USING NUCLEIC ACID AMPLIFICATION TECHNOLOGY

Selda KARAKADIOĞLU BALI¹, Birsen MUTLU¹, Murat SAYAN²

Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kocaeli

¹ Enfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı

² Hastane Merkez Laboratuvarı, PCR Ünitesi

Anahtar Sözcükler: Hepatit B virus DNA, nükleik asit amplifikasyon yöntemi (NAT), polimeraz zincir reaksiyonu

Keywords: Hepatitis B virus, nucleic acid amplification technology (NAT), polymerase chain reaction

Geliş: 12 Haziran 2008

Kabul: 26 Kasım 2008

ÖZET

Bu çalışmada, kan bankalarında güvenli kan ve kan ürünlerinin elde edilmesi için nükleik asit amplifikasyon yöntemi (NAT) kullanılarak hepatit B virus DNA (HBV DNA) taramasının ülkemiz için kullanılabilirliği araştırılmıştır. Tarama test sonuçları negatif bulunan 3000 bağışçı kan örneği çalışmaya alındı. Elde edilen serum örneklerinden 300 tane havuz oluşturuldu. Havuzlanan serumlar HBV real-time (RT) polimerize zincir reaksiyon (PCR) kiti kullanılarak incelendi. İncelenen 300 havuzdan on yedisi pozitif. HBV DNA pozitif bulunan falkonların içerdiği 170 bağışçı serum örneğinin beşinde HBV DNA pozitifliği saptandı. HBV DNA PCR pozitif bulunan hastalara tekrar ulaşılarak yeni serum örnekleri alındı. Hastaların hiçbirinde HBV yönünden pozitif sonuç rastlanmadı. RT-PCR yöntemiyle HBV DNA yalancı pozitiflik oranı % 0.16 bulundu ve yalancı pozitifliklerin çapraz kontaminasyonla oluştuğu sonucuna varıldı. Bölgemizdeki HBV seroprevalansının düşük olması nedeniyle bu sayıda bağışçıda yapılan çalışma yeterli olmayacaktır. NAT testinin ülkemizde kan bankalarında uygulanabilir hale gelebilmesi için farklı bölgelerden daha geniş örnekle araştırmalara ihtiyaç bulunmaktadır.

SUMMARY

In order to obtain trustable blood and blood products in blood banks, screening for hepatitis B virus DNA (HBV DNA) with nucleic acid amplification technology was tested for its possible application in Turkey. The blood samples taken from 3000 donors whose screening test results were negative were included in the study. With the serum samples 300 pools were prepared, and the pooled sera were studied by using HBV RT-PCR tool. Of the 170 donation serum samples within 17 falcons with positive HBV DNA, five samples were detected to have positive HBV DNA. Donors with positive HBV DNA RT-PZR were recontacted and new serum samples were taken. None of these samples were positive for HBV. Using the RT-PCR method, the artificial positivity ratio of HBV DNA was found as 0.16%, concluding that this artificial positivity was a result of cross contamination. Due to the low HBV seroprevalance, the current number of donors' sera seems to be insufficient. In order to test further the applicability of the NAT in blood banks in Turkey, studies with more sera from different regions of the country are needed.

GİRİŞ

Transfüzyon tıbbının en önemli amaçlarından biri güvenli kan sağlamaktır. Transfüzyon sırasında bulaşan viral hepatitler içinde önemli bir yer alan hepatit B virus (HBV)

infeksiyonu ciddi komplikasyonlara, hatta ölüme yol açabilmektedir (1-4).

Transfüzyonla HBV infeksiyon bulaşı post transfüzyonel infeksiyonların %5-10'unu oluşturmaktadır. Ülkemizde

Nisan 1992'de hepatit B yüzey antijen (HBsAg) taraması uygulamaya girmesine rağmen HBV'nin aylar süren inkübasyon döneminin olması, serolojik testlerin negatif kaldığı bir pencere döneminin olması, depolanan kan ürünlerinde uzun süre kalabilmeleri nedeni ile transfüzyon ile bulaşabilmektedir (3). Transfüzyon ilişkili HBV enfeksiyonu sıklığı transfüzyon yapılan kişi başına % 0.002'dir. Ülkemizde Kızılay Kan Merkez'lerinde yapılan çalışmalarda, beş milyon ünite kanın seroprevalans değerlendirilmesi sonucunda HBsAg oranı %5.1 bulunmuştur (5). Hepatit B virus DNA pozitif bulunan bazı olgularda enfeksiyon belirteçleri mutasyonlar ve hasta immü-nitesi nedeni ile negatif bulunmuştur. Bu olgularda viral DNA düzeyleri genellikle düşük olduğundan (<1000 IU/ml) HBV'yi saptayabilmek için yüksek duyarlılıkta yöntemler kullanmak gerekmektedir (6). Hepatit B virus enfeksiyonu saptayamama nedenleri arasında S bölgesinde mutasyon, HBV DNA'nın konak genomuna integrasyonu (virus, DNA zincirinin yeniden düzenlenmesine neden olabilir), periferik kandaki mononükleer hücrelerde HBV enfeksiyonu, HBV içeren immun kompleksler, konak immun yanıtı (immun yanıtın azalması riski artırır), ko-enfeksiyon (HCV, HDV, HAV ve HIV ko-enfeksiyonu interferensa neden olabilir) gösterilmiştir; ayrıca diğer olası mekanizmalar (HBV genotip D) da vardır (7).

Düşük viral yüke sahip HBV tanısında kullanılmak üzere havuzlama ile toplanan örneklerin PCR ile viral DNA moleküllerini saptayan, nükleik asit amplifikasyon teknolojisi (NAT) geliştirilmiştir. Hepatit B virusu, viral bulaş riski, NAT uygulaması öncesi 1/100.000- NAT uygulaması sonrası <1/1 000 000 olarak tahmin edilmektedir (1, 7-9). Oldukça yüksek duyarlılığa ve özgüllüğe sahip NAT testiyle virusu gösterme pencere dönemini HBV'de 6-15 gün, hepatit C virusu (HCV)'nda 41-60 gün, HIV'de 10-15 gün azaltmaktadır (8).

Bu çalışmada NAT testi ile HBV DNA taramasının kan bankacılığında ülkemiz için kullanılabilirliği araştırılmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmada, Mart 2006 - Eylül 2006 tarihleri arasında, Kocaeli Üniversitesi Hastanesi Kan Bankası'na başvuran 3000 bağışçısı serumu çalışmaya alındı. Bağışçısı sorgulama formundaki sorulara uygun yanıt veren, hemoglobin değeri en az 12.5 g olan gönüllü bağışçıların serumları kullanıldı. Bu çalışmaya alınan 3000 bağışçısının %92.3'ünü erkek, %7.7'sini kadın kan bağışçıları oluşturdu. Katılımcıların yaşları 18 ile 65 arasındaydı. Erkeklerin yaş ortalaması 32.30, kadınların

yaş ortalaması 30.46, tüm kan bağışçılarının yaş ortalaması 32.6 idi.

Alınan kan örnekleri 14 000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi. Tarama testleri ile her bir vericide post transfüzyonel enfeksiyonlar tarandı, negatif sonuçlu örnekler çalışmaya alındı. HBsAg mikropartikül enzim immünoassay (MEIA - Abbott AXSYM® IL, ABD) ile arandı. Bu ticari kitte 2.00 S/N (S/N=Numune Oran/İndeks Kalibratör Ortalama Oran) değerinden küçük örnekler negatif, 2.00 S/N'ye eşit ya da yüksek değerler reaktif olarak değerlendirildi. Spesifikliği 99.95 olan bu testin HBsAg subtip *ad* hassasiyeti 0.19 ng/ml, subtip *ay* hassasiyeti 0.14 ng/ml'dir.

Elde edilen serum örneklerinin her birinden 1 ml alınarak onlu gruplar halinde 50 ml'lik falkon tüplerde havuzlandı. Toplam 300 havuz elde edildi. Eş zamanlı olarak kalan serumlar 1.5 ml hacmindeki Eppendorf tüplere ortalama 1 ml serum örneği alacak şekilde ayrıldı. Havuzlanan ve saklamaya ayrılan bu örnekler çalışma gününe kadar -20° C'de dondurularak saklandı. Çalışma öncesi, örnekler oda sıcaklığına getirildi. Her bir falkon tübün içindeki serum örnekleri, falkon tüp santrifüjünde 15 dakika santrifüj edildi. Bu örneklerle NAT tekniği ile incelendi ve bu amaçla RT PCR kiti (Fluorion HBV QNP 2.0, Almanya) kullanıldı (lineer aralığı 1.7X 10⁸ -1.7X10⁰ IU/ml ve analitik duyarlılığı 1.79 X 10¹ IU/ml, CE lisansı; Doküman kod: PF001v006, Onay tarihi: Nisan 2006). Viral DNA saflaştırma için spin kolon yöntemi (QIAamp® MinElute®Virus Spin, ABD) tercih edildi. Ticari kitin önerdiği çalışma prensiplerine uyularak ve içerdiği kontroller kullanılarak çalışıldı. Spin kolon yöntemi, yüksek konsantrasyonlu nükleik asit kazanımı sağladığı için en düşük 20 µl geri alma hacmi ile sonuçlandırıldı.

Hepatit B virus DNA pozitifliği saptanan bağışçılar tekrar arandı ve yeni serum örnekleri alındı. Hepatit B virus serolojisini değerlendirmek amacıyla HBsAg, anti-HBs, anti-HBcIgM, anti-HBcIgG, HBeAg, anti-HBe belirteçlerine bakıldı. Yeni serum örnekleri ile tekrar HBV DNA PCR yapıldı.

BULGULAR

Hepatit B virus RT PCR testine alınan 300 serum havuzu içinde 17 falkonda HBV DNA pozitifliği saptandı. Pozitif bulunan ürünlerin C_T eşik döngü değerleri 36.7, 38.6, 38.7, 39.2 olarak saptandı. Hepatit B virus DNA pozitif falkonları oluşturan bağışçısı serumlarının tek tek ekstrakte edilmesi ve HBV RT PCR testi sonucunda beş örnekte HBV DNA pozitifliği saptandı. Hepatit B virus RT

PCR pozitif bulunan kişilerde HBV serolojisi değerlendirildi, ancak pozitif sonuca rastlanmadı. Yeni serum örneklerinin hiçbirinde RT-PCR çalışmasında HBV yönünden pozitif sonuca rastlanmadı. Sonuç olarak; çalışmamızda HBV RT-PCR testi ile bulduğumuz HBV DNA pozitiflikleri yalancı pozitif sonuç olarak değerlendirildi ve bunun oranı ilk çalışmada %5.66, ikinci çalışmada % 0.16 olarak belirlendi.

TARTIŞMA

Hepatit B virus enfeksiyonunda kan transfüzyonu oldukça önemli bir bulaş yoludur Kan bağışçılarında HBV belirteçlerinin zorunlu olarak taranması ve yüksek riskli aktivitede bulunanların reddedilmesine rağmen HBsAg negatif asemptomatik taşıyıcı bağışçılara ait kanların transfüzyonu, HBV enfeksiyonu bulaşına neden olmaktadır (10).

Transfüzyonla HBV enfeksiyon bulaşı post transfüzyonel enfeksiyonların %5-10'unu oluşturmaktadır. Düşük düzey HBsAg taşıyıcılığı, serolojik testlerin negatif kaldığı pencere dönemi transfüzyon bulaşına neden olabilmektedir (3). Kan ve kan ürünü alanlarda her alıcı için transfüzyon sonrası B hepatiti olma olasılığı 2/10.000'dir. Transfüzyon sonrası gelişen hepatitlerde HBV'nin oranı %0.3 -1.7'dir. Bu oran bazı yayınlarda %10'lara kadar çıkmaktadır (11-13).

Özbilge ve ark. (14)'nin yaptıkları bir çalışmada; seronegatif ancak HBV DNA pozitif bulunan kişilerin serumlarının deney hayvanlarına verilmesiyle HBV enfeksiyonunun ortaya çıkması; ayrıca HBsAg negatif olup transami-nazları yüksek bulunan bağışçıların %9'unda HBV DNA saptanması moleküler biyoloji tekniklerinin önemini göstermiştir.

Mini havuzlarda RT-PCR tekniği ile viral genom arama yöntemine dayanan NAT testleri; pencere dönemi gibi durumlarda transfüzyon ile geçen HBV enfeksiyonunu saptamada yetersiz kalan HBsAg testinden çok daha hassastır (15).

Havuz formatlarında 16'dan 96'ya kadar değişen örnek sayıları kullanılmıştır. Nükleik asit amplifikasyon yöntemi küçük havuzlarda ve tekil kan bağışçılarında finansal olarak uygulanabilir olmadığından kullanılmamıştır. Liu ve ark. (16), test sisteminin hassasiyetini artırmak amacıyla taramaya yönelik olan havuz hacmi 20 bağıştan oluşan ufak havuzlara düşürmüşlerdir. Japonya'da yapılan başka bir çalışmada (17), HBV için 50 örneklilik havuz NAT negatif iken 20 örnekle hazırlanan havuzlu NAT

pozitif olarak saptanmıştır. Nükleik asit amplifikasyon yönteminin duyarlılığının artırılması için yüksek hacimde örneklerle havuzların hazırlanması, dilüsyon etkisini engelleyebilmek için örnek sayısının düşük tutulması gerektiği bunun için de 25 örnekten daha büyük havuzların hazırlanmaması önerilmektedir (16-21).

İlk kullanımdan bu yana yöntemde hızlı gelişmeler görülmüştür ve günümüzde 18 ülkenin 14'ünde test zorunlu, dört ülkede önerilme şeklindedir. Amerika Birleşik Devletleri'nde testler lisanssız olmasına rağmen Besin ve İlaç Yönetimi (FDA) ve Amerikan Kan Bankaları Birliği (AABB) Mart 1999'dan sonra NAT ile taramayı önermiştir. Hepatit B virus DNA görüntülemenin hepatit B enfeksiyonunun orta ve yüksek endemisitede görüldüğü İtalya ve Pasifik ülkelerinde daha yararlı olacağı düşünülmektedir (18).

HBsAg negatif, anti-HBc pozitif olan kan bağışçılarında HBV DNA kopya sayısı düşük saptanmıştır. Çok düşük HBV DNA'nın tek bağış NAT ile saptanamayacağı yapılan birçok çalışmada belirtilmiştir (17-20, 22).

Ülkemizde, kan bankalarında güvenli kan üretiminde NAT uygunluğuyla ilgili bir çalışmada (23), antijen antikor düzeyi saptanabilir düzeyin altında olan bağışçıların yakalanabilmesinde NAT'ın uygulanabilir olduğu ancak özel ekip ve alt yapı gereksiniminin olduğu sonucuna varılmıştır.

Ülkemizde genel olarak HBsAg pozitiflik oranı %1.7-21 arasında iken (24, 25) bölgemizde yapılan bir çalışmada (26) bu oran %0.37 olarak saptanmıştır. Bizim çalışmamızda, toplanan serumların hiçbirinde pozitifliğe rastlanmaması, HBsAg prevelansındaki bu düşüklük ve test maliyeti nedeniyle taramanın sınırlı sayıda yapılmış olmasındandır.

Bu çalışmada yalancı pozitifliğin merkez laboratuvarından kaynaklı çapraz kontaminasyon olduğu düşünüldü.

Sonuçta; transfüzyon ile HBV bulaşını engellemede NAT kullanımı, maliyet-yarar oranı göz önüne alındığında yüksek endemisite bölgelerinde daha faydalı olacaktır; bağışçı seçim kriterlerinin, havuzlama örneklerinin ve ticari kitlerin standardizasyonunun yapılması gerekmektedir. Buna ek olarak, NAT testinin ülkemizde kan bankalarında uygulanabilir hale gelebilmesi için farklı bölgelerden daha geniş örneklilik araştırmalara gereksinim vardır.

KAYNAKLAR

1. **Kocazeybek B.** Kan ve kan ürünleriyle bulaşan enfeksiyonlar: rutin tarama testleri ve moleküler tanı yöntemleri. *Cerrahpaşa Tıp Dergisi* **2003**; 34: 158-63.
2. **Bayık M.** Güvenli kan. *Damla Kan Merkezleri ve Transfüzyon Dergisi* **2004**; 59: 10-12.
3. **Aksoy A.** Donör seçimi. Armağan A, eds. *Donör Seçim Kriterleri Kan Hizmetleri Yönetimi Türk Kızılayı'nda*. Ankara, Kızılay, **2005**: 4-17.
4. **Anonim.** Transfüzyonla bulaşan enfeksiyonlar. Ankara: T.C. Sağlık Bakanlığı Kan Merkezleri ve Transfüzyon Derneği Türk Kan Vakfı, **2006**: 56-65.
5. **Mıstık R, Balık İ.** Türkiye'de viral hepatitlerin epidemiyolojik analizi. Kılıçturgay K, Badur S, ed. *Viral Hepatit 2001'de*. Ankara: Viral Hepatitle Savaşım Derneği, **2001**: 9-57.
6. **Zanetti AR, Romano L, Zappa A, Velati C.** Changing Patterns of hepatitis B infection in Italy and NAT for testing for improving the safety of blood supply. *J Clin Virol* **2006**; 36: 51-5.
7. **Öztürk R.** Viral hepatitlerde olağan dışı serolojik ve moleküler tanı göstergesi kalıpları. *Viral Hepatit'te*. İstanbul: Orhan Matbaası, **2005**: 151-9.
8. **Thiers V, Nakajima E, Kremsdorf D, et al.** Transmission of hepatitis B from hepatitis B seronegative subjects. *Lancet* **1988**; 2: 1273-5.
9. **Kuhns MC, Busch MP.** New strategies for blood donor screening for hepatitis B virus. nucleic acid testing versus immunoassay methods. *Mol Diagn Ther* **2006**; 10: 7-91.
10. **Hou J, Liu Z, Gum F.** Epidemiology and prevention hepatitis B virus infection. *Int J Med Sci* **2005**; 2: 50-7.
11. **Curry MP, Chopra S.** Acute viral hepatitis. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds. *Principles and Practice of Infectious Diseases*. 6th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone, **2005**: 1426-41.
12. **Sümbül M, Leblebiciođlu H.** Distribution of hepatitis B virus genotypes in patients with chronic hepatitis B in Turkey. *World J Gastroenterol* **2005**; 11: 1976-80.
13. **Turunç T, Sezgin N, Uncu H, Demirođlu YZ, Arslan H.** Kan donörlerinde hepatit B ve Hepatit C seroprevalansı. *Viral Hepatit Derg* **2003**; 8: 171-3.
14. **Özbiđe H, Yıldız FY, Uzala Mızraklı A, Tümkaya B.** Hepatit B virus DNA pozitifliği ve serolojik testler. *Erciyes Tıp Dergisi* **2000**; 1: 17-21.
15. **Comanor L, Holland P.** Hepatitis B virus blood screening: unfinished agendas. *Vox Sanguinis* **2006**; 91: 1-12.
16. **Liu CJ, Chen DS, Chen PJ.** Epidemiology of HBV infection in Asian blood donors: emphasis on occult HBV infection and the role of NAT. *J Clin Virol* **2006**; 36: 33-44.
17. **Sato S, Ohhashi W, Ihara H, Sakaya S, Kato T, Ikeda H.** Comparison of the sensitivity of NAT using pooled samples for HBV and that of a serologic HBsAg assay. *Transfusion* **2001**; 41: 1107-13.
18. **Costa J, Busch MP, Cuijpers HT, et al.** Implementation of donor screening for infectious agents transmitted by blood nucleic acid technology: update to 2003. *Vox Sanguinis* **2005**; 88: 289-303.
19. **Roth WK, Weber M, Petersen D, et al.** NAT for HBV and anti-HBc testing increase blood safety. *Transfusion* **2002**; 42: 869-75.
20. **Gutierrez C, Leon G, Loureiro CL, Uzcategui N, Liprandi F, Pujol FH.** Hepatitis B virus DNA in blood samples positive for antibodies to core antigen and negative for surface antigen. *Clin Diagn Lab Immunol* **1999**; 6: 768-70.
21. **Mine H, Emura H, Miyamoto M, et al; Japanese Red Cross AT Research Group.** High throughput screening of 16 million serologically negative blood donors for hepatitis B virus, hepatitis C virus and human immunodeficiency virus type-1 by nucleic acid amplification testing with specific and sensitive multiplex reagent in Japan. *J Virol Methods* **2003**; 112: 145-51.
22. **Yugi H, Hino S, Satake M.** Implementation of donor screening by blood by nucleic acid technology in Japan. *Vox Sanguinis* **2005**; 89: 265-66.
23. **Yazan Sertöz R, Erensoy S, Göksel S, Özkalay N, Bilgiç A.** Kan bankacılığında havuz yöntemiyle HCV RNA PCR tarama testinin değerlendirilmesi. *Viral Hepatit Derg* **2002**; 8: 529-31.
24. **Taşyaran M.** HBV enfeksiyonu epidemiyolojisi. Tekeli E, Balık İ, ed. *Viral Hepatit 2003'te*. Viral Hepatitle Savaşım Derneği Yayını. İstanbul: Orhan Matbaası, **2003**: 121-8.
25. **Karabay O, Şencan İ, Kayaş D, Şahin İ.** Batı Karadeniz Bölgesi kan donörlerinde HBsAg ve anti-HCV sıklığı. *Viral Hepatit Derg* **2002**; 8: 502-4.
26. **Mutlu B, Meriç M, Willke A.** Kan donörlerinde hepatit B ve C virusu ve sifiliz seroprevalansı. *Mikrobiyol Bül* **2004**; 38: 445-8.

İLETİŞİM

Yrd. Doç. Dr. Murat SAYAN
Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi
Hastanesi Merkez Laboratuvarı PCR Birimi
İZMİT/KOCAELİ
e-posta: sayanmurat@hotmail.com