



**T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
KLİNİK BAKTERİYOLOJİ ve ENFEKSİYON HASTALIKLARI
ANABİLİM DALI**

**ANTİ-HCV NEGATİF KAN DONÖRLERİNDE REAL-TIME PCR
YÖNTEMİYLE HCV-RNA ARANMASI VE SONUÇLARIN KAN
BANKACILIĞI AÇISINDAN ÖNEMİNİN TARTIŞILMASI**

Dr. Zekiye Mine KABAŞ

UZMANLIK TEZİ

BURSA 2007



**T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
KLİNİK BAKTERİYOLOJİ ve ENFEKSİYON HASTALIKLARI
ANABİLİM DALI**

**ANTİ-HCV NEGATİF KAN DONÖRLERİNDE REAL-TIME PCR
YÖNTEMİYLE HCV-RNA ARANMASI VE SONUÇLARIN KAN
BANKACILIĞI AÇISINDAN ÖNEMİNİN TARTIŞILMASI**

Dr. Zekiye Mine KABAŞ

UZMANLIK TEZİ

Danışmanlar

Prof.Dr.Okan TÖRE

Yrd.Doç.Dr.Yasemin HEPER

BURSA-2007

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	ii
SUMMARY.....	iii-iv
GİRİŞ.....	1-16
GEREÇ VE YÖNTEM.....	17-20
BULGULAR.....	21
TARTIŞMA VE SONUÇ.....	22-35
KAYNAKLAR.....	36-42
TEŞEKKÜR.....	43
ÖZGEÇMİŞ.....	44

ÖZET

Hepatit C virüsü (HCV)'nün transfüzyonla geçişi günümüzde azalmış olsa da transfüzyon tıbbının en önemli sorunlarından biridir ve halen posttransfüzyon hepatitlerin büyük çoğunluğu HCV ile oluşmaktadır. Bu geçişi önlemek amacıyla tüm donörlerde anti-HCV taranmakta, ancak bu uygulama HCV enfeksiyonunun doğal seyrinin özellikleri nedeniyle yetersiz kalabilmektedir. Yapılan çeşitli çalışmalar anti-HCV'nin negatif olduğu bilinen donörlerden yapılan transfüzyonlarda da hepatit C virüsünün bulaşabildiğini göstermektedir. Bu durumun önüne geçebilmek amacıyla donör kanlarından hazırlanan havuzlarda Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile HCV-RNA bakılması gibi yöntemlerin etkinliği araştırılmış ve anti-HCV negatif olgularda Nükleik Asit Amplifikasyon Tekniği (NAT) yöntemiyle virüsün varlığı gösterilmiştir. Bugün PCR teknolojisinin kan bankacılığında rutin kullanıma girmesi gündemdedir ve maliyet-etkinliği yaygın olarak tartışılmaktadır. Bu çalışma ile amacımız bölgemizde anti-HCV negatif olan kan donörlerinde HCV-RNA pozitifliği oranını saptamak ve ülkemiz kan bankacılığı açısından önemini tartışmaktır.

Bu amaçla, anti-HCV negatif bulunmuş olan tüm donör örneklerinden 24'lü havuzlar oluşturularak havuzlarda Real-Time PCR yöntemi ile HCV-RNA çalışılmıştır.

Türkiye'de anti-HCV pozitifliği görülme oranının %1 olduğu dikkate alınarak fakültemiz Biyoistatistik Anabilim Dalı ile görüşülmüş ve istatistiksel olarak anlamlı olabilmesi açısından en az 2592 donör kanının çalışılmaya alınması uygun görülmüştür. Çalışmada, 2592 adet anti-HCV negatif donör serumu içeren havuzların 1 tanesinde pozitiflik saptanmış, bu havuzu oluşturan 24 ayrı serum örneği ayrıca tek tek çalışıldığında herhangi pozitiflikle karşılaşılmamış ve bu pozitif sonuç yanlış pozitiflik olarak değerlendirilmiştir. Yapılan maliyet değerlendirmesi sonucunda NAT'ın çok pahalı bir test olduğu şimdilik ülkemiz kan bankalarında uygulanabilir olmadığı fikrine varılmıştır.

Anahtar kelimeler : Anti-HCV, HCV-RNA, Transfüzyon

INVESTIGATION OF HCV-RNA BY REAL-TIME PCR METHOD IN ANTI-HCV NEGATIVE BLOOD DONORS AND DISCUSSION OF THE RESULTS REGARDING BLOOD BANKING

SUMMARY

Although the transmission of HCV virus by transfusion has been decreased nowadays, it is still one of the major problems of transfusion medicine, and the most important part of the post transfusion hepatitis are caused by HCV. In order to prevent this transmission, all of the blood donors are screened for anti-HCV antibodies but sometimes this screening procedure may be insufficient because of the features of the natural progress of HCV infection. Some studies showed that Hepatitis C virus can be transmitted by the transfusion from the known anti-HCV negative blood donors. To prevent this possible transmission, the presence of HCV-RNA in anti-HCV negative donors was investigated by PCR and the presence of HCV virus was shown by Nucleic Acid Amplification Testing (NAT) in some other studies. Today the PCR technology is used routinely in some countries but its cost-effectivity is widely discussed. In this study our aim is to detect the prevalence of HCV-RNA positivity in anti-HCV negative blood donors and to discuss the importance of this in blood banking in our region.

For this purpose, HCV-RNA positivity was examined by real-time PCR in anti-HCV negative blood donors. This screening was done in pools with a pool size of 24 serum samples.

Taking into the consideration that the prevalence of anti-HCV antibody is %1 in Turkey 2592 anti-HCV negative blood donors have been included into this study to reach statistically significant results. In our study, real-time HCV-RNA PCR test was performed in 180 serum pools with 24 donors sample in each one. There was one positivity result in those 108 pools. But when the 24 serum sample were studied one by one, no positivity was detected and this positivity was accepted as a false positive result. As a result of cost-

effectivity evaluation we found out that NAT is too expensive and not applicable for HCV screening in the blood banks in our country.

Key words: Anti HCV, HCV RNA, Transfusion

GİRİŞ

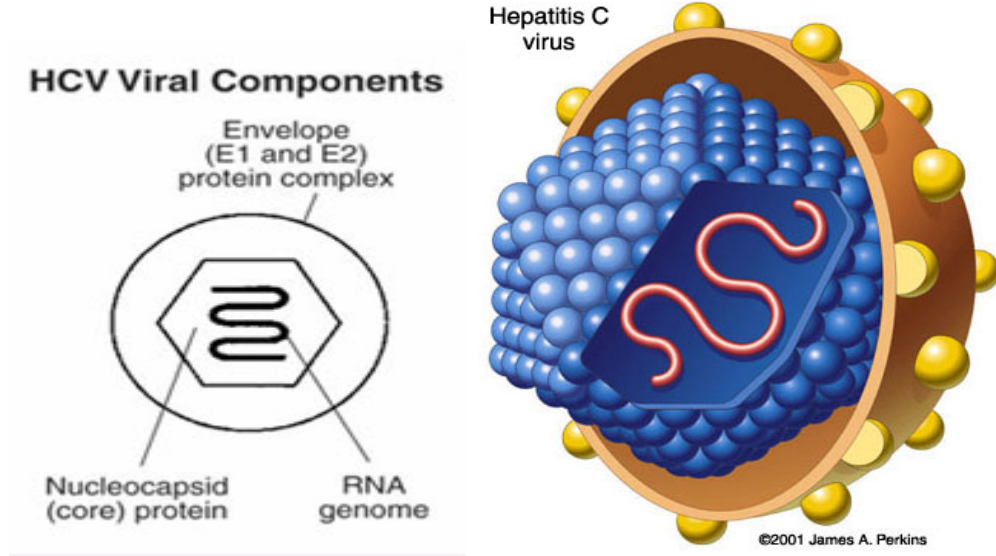
1970'li yıllarda Hepatit A virüsü (HAV) ve Hepatit B virüsü (HBV) enfeksiyonlarının tanısında spesifik tanı testlerinin kullanılmasının ardından kan transfüzyonu sonrası gelişen hepatit olgularının hepsinin, bu virüslere ve bilinen diğer viral ajanlara bağlı olmadığı netlik kazanmış, literatürde bu olgular non-A, non-B hepatiti (NANBH) olarak adlandırılmıştır. Çalışmalarda NANBH ekeninin, şempanzelere bulaşabilen küçük, zarflı bir virüs olabileceği yönünde kanıtlar elde edilmiş, ancak konvansiyonel immünolojik yöntemlerle spesifik viral antijenler ve antikorlar tanımlanamamıştır. Virüs ilk kez, 1989 yılında Choo ve ark. tarafından, non-A, non-B hepatitli insan kanları ile enfekte edilen şempanzelerin plazmalarından moleküler klonlamayla keşfedilmiş ve HCV (Hepatit C virüsü) olarak adlandırılmıştır (1).

Virüsün Özellikleri

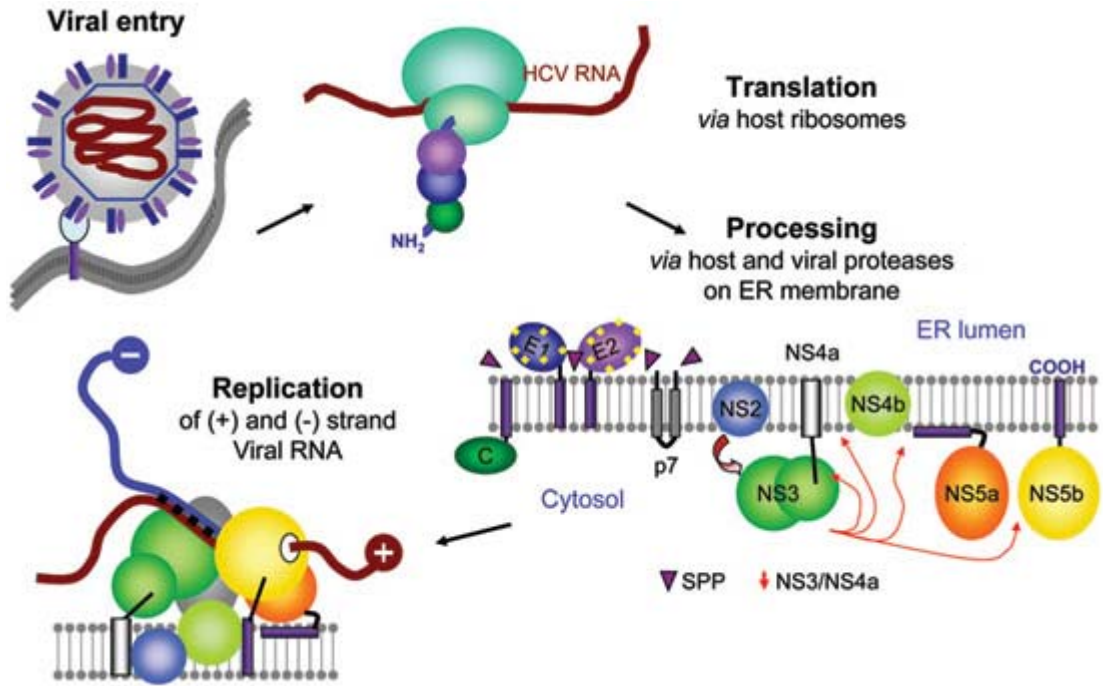
Hepatit C virüsü, Hepacivirüs genusunun tek üyesidir (2,3). Flaviviridae ailesinden, 40-50 nanometre büyüklüğünde, lipid bir zarf taşıyan küçük bir RNA virüsüdür. Yaklaşık 35 nanometre çapındaki nükleokapsidi (C, core) lipid yapıda bir zarf (E, envelope) çevreler. Zarf yapısında virüs tarafından kodlanan iki ayrı protein (E1 ve E2) de yer alır. Viral genom 9379-9481 nükleotid uzunluğunda tek iplikçikli pozitif polariteli bir RNA molekülünden oluşmuştur. Bu genom yaklaşık 3000 aminoasitten oluşan tek bir büyük poliprotein kodlar (4). Bu poliprotein, multiple, yapısal ve yapısal olmayan (NS) proteinlere post-translasyonel olarak bölünür. Yapısal proteinler, bir nükleokapsid cor (C) ve 2 zarf glikoproteininden (E1 ve E2) oluşurken, NS proteinleri, NS2'den NS5'e (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B) kadar adlandırılan proteinlerden oluşmuştur. Yapısal proteinlerden E2 zarf proteininin "hypervariable region" (HVR) 1 ve 2 olarak adlandırılan iki bölgesi, virüs spesifik antikorlara yanıt olarak oldukça yüksek mutasyon oranına sahiptir (2).

NS proteinlerinin spesifik fonksiyonları tam olarak aydınlatılamamıştır. NS3, hem helikaz hem de proteaz aktivitesine sahiptir (2). NS4A, NS4B ve

NS5A arası bölünmede gerekli olan bir serin proteaz için kofaktördür (5). NS5B bölgesi, RNA replikasyonunda gerekli olan RNA bağımlı RNA polimeraz aktivitesi gösterir. NS5A'nın fonksiyonu bilinmemektedir. Son gözlemler, interferon tedavisine duyarlılığın bu bölgedeki mutasyonlara bağlı olduğu yönündedir (2,6).



Şekil 1. HCV genomik yapısı



Şekil 2. HCV genomik yapısı ve replikasyonu

1991 yılında Choo ve ark. tarafından tam HCV genomunun saptanmasının ardından, dünyanın farklı bölgelerinden, farklı HCV izolatları elde edilmiş ve sekanslanmıştır. Bu dizilerin karşılaştırılması ile birbirinden farklı virüs tipleri tanımlanmıştır (7). HCV varyantları arasında %34'ün üzerinde dizi farklılıkları olduğu gösterilmiştir (6). Dizi farklılıklarının en fazla E ve bazı NS bölgelerde toplandığı görülmüştür (8). Bu çeşitlilik aslında RNA virüslerinin temel özelliklerindedir. RNA virüsleri, doğada bilinen en yüksek mutasyon hızına sahip virüslerdir (9). Bu temel olarak, RNA polimerazların 3'-ekzonükleaz etkinliğinin olmamasına bağlıdır (10). Böylece yeni sentezlenen RNA sarmallarına yanlış girmiş bazıları uzaklaştıran önemli onarım mekanizması çalışmamakta, HCV sürekli olarak mutasyona uğramaktadır (11).

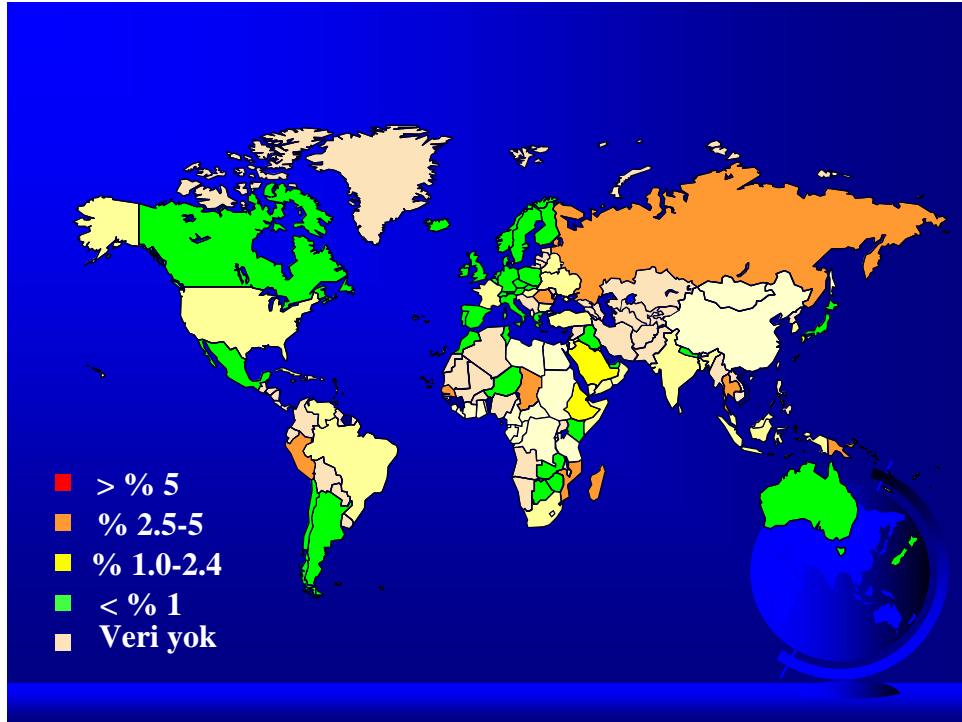
HCV'nin 6 ana genotipi, 100'den fazla subtipi bulunmaktadır. HCV suşları için farklı araştırmacılar tarafından geliştirilen ve kullanılan klasifikasyon sistemlerinin literatürde karmaşıklığa neden olması üzerine, İkinci Uluslararası HCV ve İlişkili Virüsler Konferansı'nda ortak bir terminoloji oluşturulmuştur. Bu sisteme göre HCV "genotip" adı verilen major genetik gruplar içinde, nükleotid zincirlerinin benzerliğine göre sınıflandırılmış olup, bazı tipler içinde daha yakın olarak ilişkili HCV suşları "subtip" olarak adlandırılmıştır. Genotipler 1,2,3 gibi rakamlarla, subtipler ise a,b,c gibi küçük harflerle gösterilmiştir (7).

Bunların dışında HCV ile enfekte bir kişide, sürekli devam eden mutasyonlar sonucu "quasispecies" (türümsü) adı verilen küçük genomik farklılıkları olan HCV alt grubu gelişebilmektedir. Olasılıkla, "quasispecies"lerin varlığı immün sistemden HCV'nin kaçışına izin vermektedir (9).

Epidemiyoloji

Dünyada HCV genotiplerinin coğrafik dağılımı farklılıklar gösterir. Bunun nedeni tam olarak bilinmemekle birlikte viral bulaş yollarındaki ve konak immün yanıtındaki varyasyonlara bağlı olabileceği belirtilmektedir (12). ABD’de en sık genotip 1 saptanırken, genotip 1a ve 1b yaklaşık olarak eşit oranda görülmektedir. Avrupa’da da genotip 1 siktir ancak özellikle genotip 1b belirgindir. Genotip 3 özellikle İskandinavya’da yaygındır. Ülkemizde ise en sık genotip 1b’e rastlanmaktadır. HCV genotip 1 daha virülan bir genotiptir(13). Genotip 1b ile meydana gelen enfeksiyon ise diğer genotiplerden daha agresif seyir göstermektedir(7).

Hepatit C virüs (HCV) enfeksiyonu tüm dünyada yaygın, önemli bir sağlık sorunudur. WHO(Dünya Sağlık Örgütü) dünya popülasyonunun %3’ünün; yani 210 milyon insanın HCV ile kronik olarak enfekte olduğunu tahmin etmektedir (14).



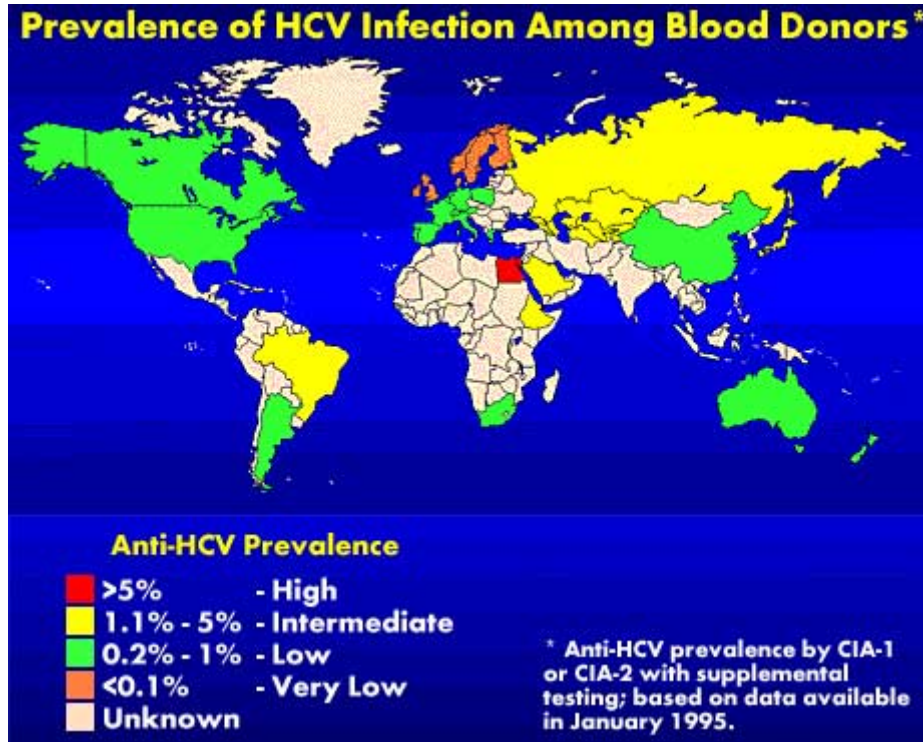
Şekil 3 .Dünyadaki HCV seroprevalansı

Çoğu gelişmiş ülkede, serumda anti-HCV prevelansı %1 ile %2 arasında değişmektedir (15). Doğu Avrupa’nın bazı bölgeleri ve Afrika’da ise

enfeksiyon oranı çok daha yüksektir (5). Mısır'da genel popülasyondaki HCV prevalansı yaklaşık %20'dir (16). ABD'de bu oran % 1,8'dir (5). CDC (Centers for Disease Control) verilerine göre ABD'de 3.9 milyon kişide anti-HCV pozitif olup, bunların 2.7 milyonu viremiktir. Ülkemizdeki ise anti-HCV pozitifliği ortalama % 1 civarında olup (17) çeşitli gruplarda yapılan çalışmalarda anti-HCV sıklığı %0.05 ile %51.6 arasında bildirilmiştir. Saptanan oranlar, çalışılan risk grubu ve bölgesel özelliklere bağlı olarak farklılık göstermektedir. Kölgeliler ve ark.'nın (18) Erzurum bölgesinde sağlıklı popülasyonda yaptıkları çalışmada anti-HCV sıklığı %1.2 bulunmuş iken Aslan ve ark.'nın (19) Şanlıurfa ilinde sağlıklı popülasyonda yaptıkları tarama da anti-HCV pozitifliği %2.6 olarak saptanmıştır. Şencan ve ark.'nın (20) yaptığı çalışmada sağlık çalışanları arasında seropozitiflik oranı %1 saptanmışken Özsoy ve ark. (21) tarafından yapılan aynı tarz bir çalışmada %0.2 gibi pozitiflik oranıyla karşılaşılmıştır. Hemodiyaliz hastalarında saptanan seropozitiflik oranı normal popülasyona göre daha yüksektir. Kadanalı ve ark. (22) hemodiyaliz hastalarında %6.8 gibi bir pozitiflik oranı saptarken Şencan ve ark. (23) benzer bir grupta yaptığı çalışmada %51.6'lık bir pozitiflik oranını bulmuştur. Seyyal ve arkadaşlarının (24) çalışmasında da normal popülasyon ve değişik yaş gruplarında anti-HCV pozitifliği %0.17-1.7 arasında bulunmuştur. Kan donörlerinde de oranlar genellikle %1 civarındadır. Kökoğlu ve ark.'nın Diyarbakır ilinde kan donörlerinde yaptıkları ve 58.320 örneğin çalışıldığı bir araştırmada donörler arasında %0.62'lik bir seropozitiflik bulunmuştur (25). Bayat ve ark.'nın benzer bir çalışmasında bu oran %0.8 olarak saptanmıştır (26). Cumhuriyet Üniversitesi tıp fakültesi kan merkezinde 2000 yılında anti-HCV seropozitifliği %0.05 saptanırken (27) Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Raşit Durusoy Kan merkezinde yapılan ve 1998-2003 yıllarını içine alan bir çalışmada (28) 123.778 donör incelenmiş ve yıllara göre anti-HCV seropozitiflik oranları sırayla %0.74, %0.72, %0.71, %0.8, %0.65, %0.8 olarak bulunmuştur. Gülcan ve ark.'nın kan donörlerinde yaptığı başka bir çalışmada seropozitiflik oranı ise %1.52 olarak saptanmıştır (29).

Hepatit C virüsünü posttransfüzyon hepatitlerinin en önemlisi nedenidir. HCV posttransfüzyon hepatitlerinin %90'undan sorumludur. Kalan %10'luk bölümü ise HBV, CMV, EBV ve HAV oluşturmaktadır (30).

AABB(American Association of Blood Banks) ise 1981-94 yılları arasında posttransfüzyonel hepatit olgu sayısını 4987 olarak açıklamış ve bunun %24'ünün HBV, %43'ünün HCV'a bağlı olduğunu bildirmiştir (31).

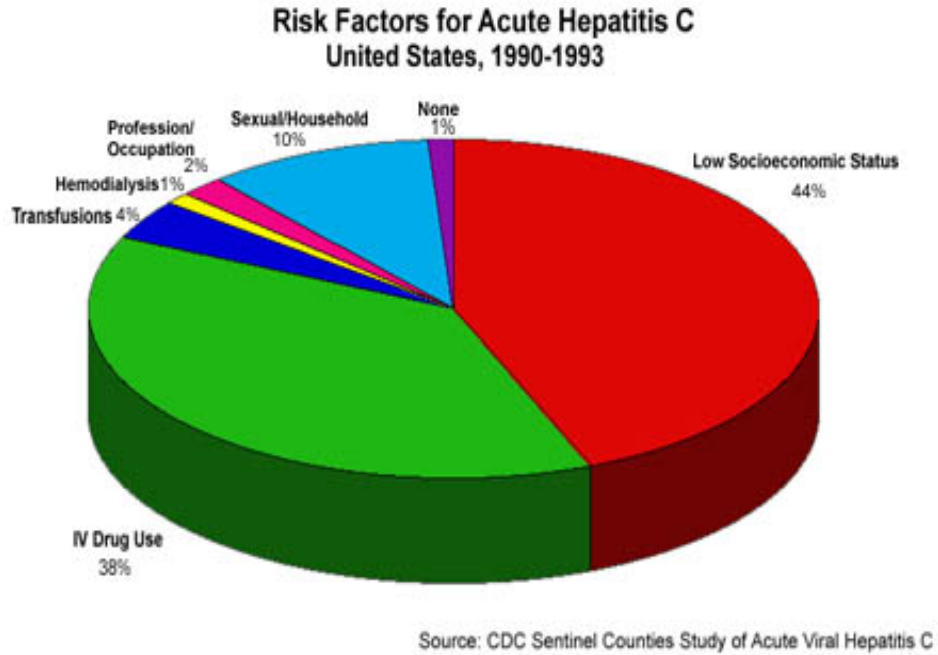


Şekil 4. Kan donörleri arasındaki HCV seroprevalansı

HCV Enfeksiyonu

HCV'nin temel bulaş yolu parenteraldir. Ayrıca tükürük, idrar ve semen gibi vücut salgılarında virusun bulunması, yakın temas ve cinsel ilişki gibi yollarla bulaşın olabileceğini düşündürmektedir. HCV enfeksiyonunun risk faktörleri arasında; kontamine kan ve kan ürünlerinin transfüzyonu, damar içi uyuşturucu kullanımı, hemodiyaliz, tатуaj, yüksek riskli cinsel davranışlar, geçirilmiş cerrahi öyküsü, kontamine iğnelerin batması ve HCV pozitif vericilerden yapılan organ transplantasyonları sayılabilir. Ne var ki, HCV ile enfekte hastaların %40-50'sinde bilinen risk faktörlerinin herhangi biri

tanımlanmamıştır. Düşük HCV prevalansına sahip ülkelerde HCV ile enfekte kişilerin %40-50'sine bulaşın kan transfüzyonu ile olduğu bilinmektedir. Bu virüs, eritrosit süspansiyonu, trombosit süspansiyonu, plazma ve kryopresipitatta bulaşabilmektedir. Viral inaktivasyon tekniklerinin kullanımından önce, faktör konsantreleri ve immünglobulin preparatlarıyla da bulaşabildiği bilinmektedir. Ancak enfekte hastaların en az üçte birinde enfeksiyonun kaynağı belli değildir ve sporadik vakalar olarak bilinmektedirler(32).

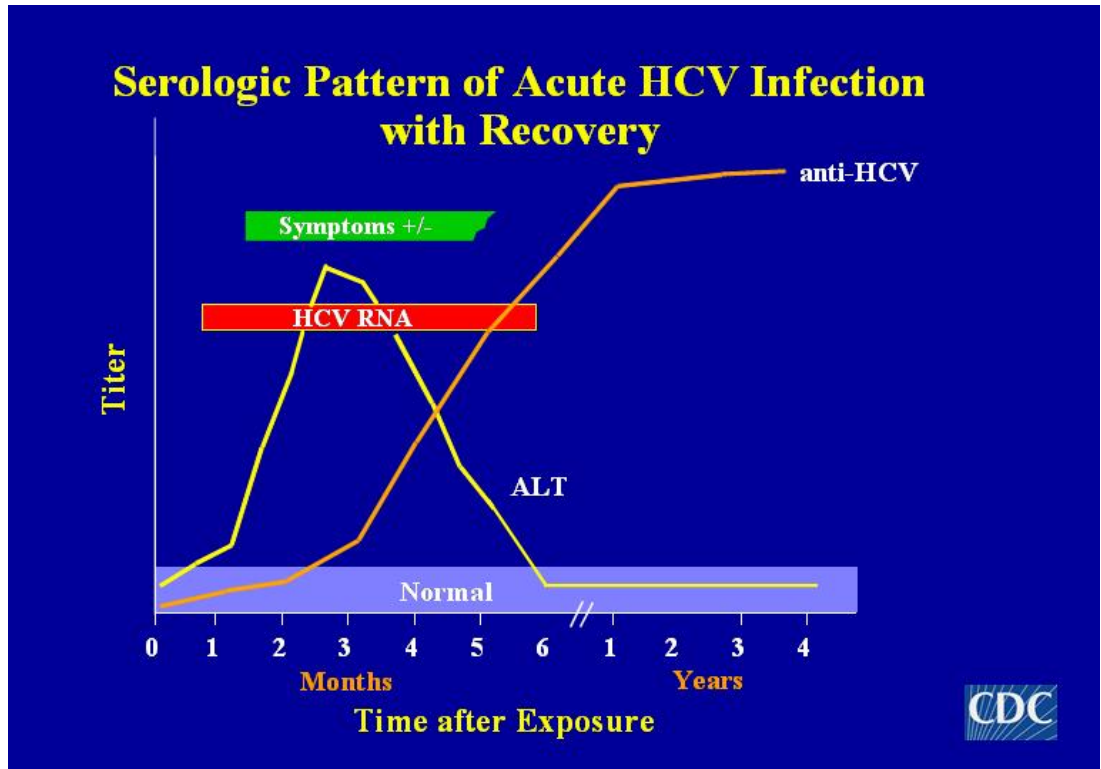


Şekil 5. Akut HCV enfeksiyonu için risk faktörleri

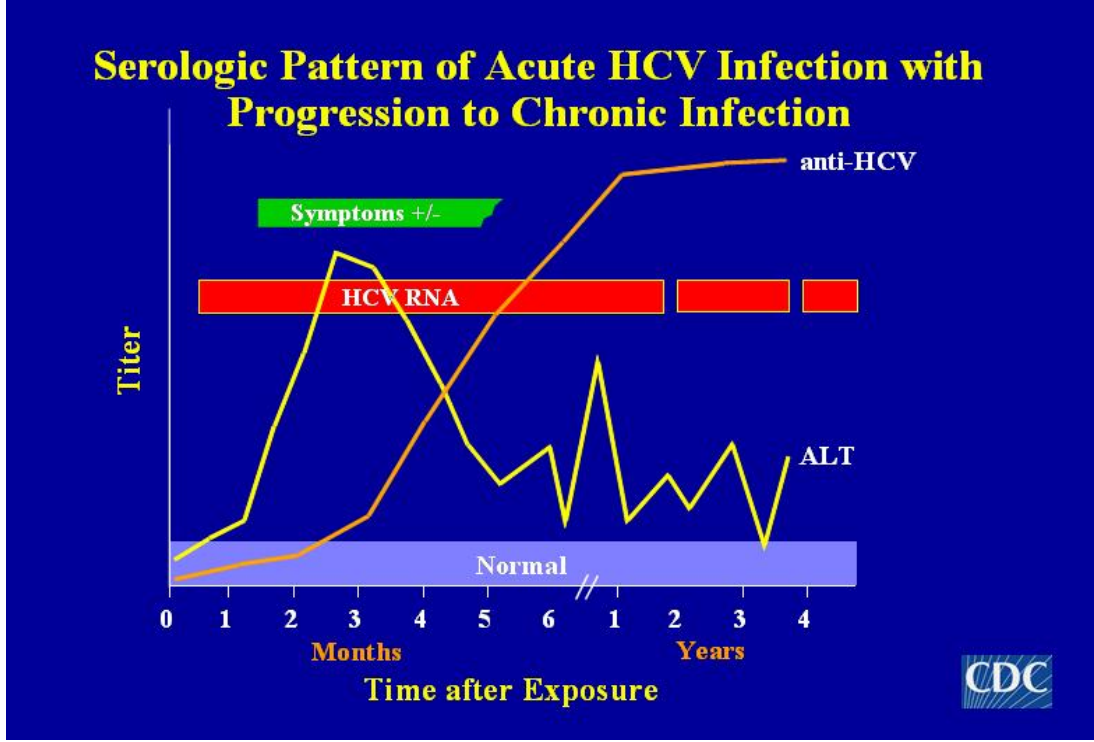
HCV enfeksiyonlarında ortalama 6-8 haftalık bir inkübasyon periyodunun ardından akut hepatit gelişir. Akut C hepatiti genellikle belirtisizdir. Bu durum kan bankacılığı açısından HCV'yi önemli kılar. Enfeksiyonun belirtisiz seyretmesi nedeniyle enfekte ve bulaştırıcı olan böyle kişiler rahatlıkla donör olarak kabul edilebilirler. Olguların ancak %20-30 kadarında klasik hepatit yakınmaları (halsizlik, iştahsızlık, bulantı) bulunur. Yakınmaları olan hastaların yaklaşık yarısında sarılık ortaya çıkar. Serum bilirubin düzeyleri ender olarak 10 mg/dl'nin üzerindedir ve genellikle 4 hafta içinde normal

değerlere döner. Akut C hepatitli hastalarda ALT düzeyleri 100-1000 IU/L arasında değişir. Fulminan hepatit gelişme riski çok düşüktür (33).

HCV'nin en önemli özelliklerinden birisi yüksek oranda kronik enfeksiyon gelişimine neden olmasıdır. HCV ile enfekte kişilerin yaklaşık % 85'inde persistan enfeksiyon gelişir. Yaşlılarda, vireminin yüksek olduğu hastalarda ve erkeklerde kronikleşme riski daha yüksektir. Virüs bulaşından sonra klinik olarak belirgin kronik hepatititin ortaya çıkması için geçen süre ortalama 18 yıldır. Uzun dönem komplikasyonları ise, karaciğer sirozu ve hepatosellüler karsinomadır (34). Hastaların %20'sinde siroz gelişirken, sirozlu hastaların yılda %1 ile %5'inde hepatosellüler karsinoma gelişmektedir (35).



Şekil 6. Akut HCV enfeksiyonu serolojisi



Laboratuvar Tanı

HCV; in vitro insan embriyonik karaciğer hücrelerinde, hepatoblastoma, T-lenfoma ve B-lenfoma hücre dizilerinde çoğaltılabilmektedir. Ancak virus bu hücrelerde düşük hızlarda çoğaldığından, HCV replikasyonuna ilişkin bilgilerin çoğu, klonlanmış viral genlerin memeli hücrelerinde eksprese edilmesi ya da in vitro transkripsiyon-translasyon sistemleri kullanılarak elde edilmektedir. Sonuç olarak; önemli ilerlemelere rağmen, HCV tanısında henüz güvenilir kültür sistemi mevcut değildir. Tanı ve tedavi için günümüzde kullanılan laboratuvar testleri; serolojik testler, moleküler testler ve genotiplendirme teknikleridir. Ayrıca HCV core antijenini saptayan spesifik yöntemler de bulunmaktadır (36). Genel olarak, RNA virüslerine ilişkin proteinler stoplazmada birikirken, DNA virüsleri (pox virüs hariç) viral antijenlerini nükleusta biriktirirler. Yine virüs antijenleri hasarlı hücrelerden vücut sıvıları yada sekresyonlara sızabilir. Enfekte hücrelerdeki antijenler immuno floresans (IF) yöntemlerle, vücut sıvıları yada dolaşımda bulunanlar ise katı yüzey immunolojik testlerle (solid phase immunoassay) gösterilebilirler. Ayrıca virüse ait antijenlerin gösterilmesinde ELISA da

kullanılabilmektedir. HCV antijenini serumda saptayabilmek için geliştirilen kitlerle yapılan ön çalışmalarda serumda HCV antijeninin başarıyla saptanabildiği gösterilmiştir (37,38). Yapılan çalışmalarda HCV ile enfekte PCR pozitif seronegatif olguların %95'inde HCV core antijenin saptandığı görülmüş; HCV core antijen saptanmasının enfeksiyonun erken evrelerinde enfeksiyonun tanımlanmasında, dolayısıyla kan ve kan komponentlerinin güvenliğinin sağlanmasında yararlı olabileceği fikri doğmuştur (39).

Serolojik testlerde amaç başlıca rekombinant HCV peptidlerine karşı oluşan antikorların saptanmasıdır (40). Bugüne kadar, her birinde artan duyarlılıkta üç kuşak enzim immunoassay (EIA) yöntemi geliştirilmiştir (41). Üçüncü kuşak EIA, günümüzde en yaygın kullanılan tarama testidir (5). Yüksek prevalanslı toplumlarda, duyarlılığı %97'dir (5,36). Ancak yine de EIA ile HCV'nin serolojik tanısı çoğunlukla klinik için yetersiz sonuçlar verir. Hepatit C virüs enfeksiyonu seyri sırasında, serumda HCV antikorunu saptanmaya kadar uzun bir seronegatif dönem bulunmaktadır. Bu dönem antikor tarama testleriyle ortalama 70-82 gün olup oldukça uzun bir süredir. Bu dönem HIV için 20-25 gün ve antijen tarama testleri ile ortalama 16-17 gün iken HBV için ortalama 56 gündür (42).

Serolojik yöntemlerle elde edilen anti-HCV pozitifliğinin geçirilmiş bir enfeksiyonun serokonversiyonun göstergesi mi yoksa persistan bir enfeksiyonun belirleyicisi mi olduğunu ayırt etmek mümkün değildir. Ayrıca kronik HCV replikasyonuna rağmen bu testler; enfeksiyonun pencere döneminde, bazı kronik HCV enfeksiyonu gelişmiş kişilerde, hemodiyaliz hastalarında, HCV ile ilişkili esansiyel miksoyoglobulinemide ve derin immun yetmezliği olan hastalarda yalancı negatif sonuç verebilir (43,44). Anti-HCV EIA testlerindeki ciddi sorunlardan biri de yalancı pozitifliktir. Hipergamaglobulinemi, otoimmün hepatit gibi klinik durumlarda yanlış pozitif sonuçlarla karşılaşılabilir (45). Tekrarlayan pozitif örneklerin, onaylanmış ve kullanılan EIA ile aynı jenerasyonda bir RIBA (Rekombinant Immuno-Blot Analiz) ile doğrulanması gerektiği bildirilmiştir. RIBA pozitiflikleri

doğru kabul edilmekle birlikte, bunların ancak %70-90'ının HCV RNA'ya sahip olduğu PCR ile gösterilebilmektedir. Doğrulama amacıyla RIBA'ya alternatif olarak iki farklı EIA ile reaktif sonuçlar irdelenebilir. Bununla birlikte bazı merkezlerde iki farklı EIA ile pozitif bulunan sonuçlar RIBA yapılmaksızın HCV RNA PCR ile desteklenme yoluna gidilmektedir (16). HCV RNA reaktif donörlerin %98'inin RIBA pozitif olduğunun bilinmesinden dolayı RIBA'nın HCV RNA reaktif donasyonlar üzerinde uygulanmasının gereksiz olacağı sonucuna varılmıştır (46).

Virüse karşı oluşan antikorların gösterilmesinin yanı sıra, viral nükleik asit de moleküler yöntemlerle belirlenebilir. Antikor saptanamayan olgularda HCV RNA gösterilmesi oranı, hastaların özelliklerine ve virüs ile karşılaşma sürelerinin uzunluğuna göre değişiklik göstermektedir. Hepatit C virüs enfeksiyonu seyri sırasında, serumda HCV antikorunu saptanmaya kadar uzun bir seronegatif dönem bulunmaktadır (47).

Bu testlerle, amplifikasyon yoluyla vücut sıvılarında viral genom saptanır ve miktarı ölçülür. Amplifikasyon yöntemlerinden polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile çok sayıda viral genom, siklik enzimatik bir reaksiyonla amplifiye edilir (48). PCR ile serumda HCV RNA'nın tespiti, kronik hepatit semptomları olan anti-HCV pozitif hastalarda, viral replikasyonun değerlendirilmesinde ve anti-HCV negatif olgularda HCV enfeksiyonunun tanısının doğrulanmasında önemli bir parametre olarak kabul edilmektedir (49). Hepatit C virüs RNA'sının serumda gösterilmesi enfeksiyonun erken tanısının en önemli göstergesidir. HCV RNA varsa kanın enfektivitesi %100'dür (50). Anti-HCV'si pozitif saptanan hastalarda hepatit C virüs RNA'sının saptanamamasının nedeni olarak, virüsün kandan temizlenmesi, geçirilmiş HCV enfeksiyonunun rezolüsyonu veya HCV RNA'nın yalancı negatifliği olabileceği düşünölmektedir. HCV RNA'nın yalancı negatifliğini açıklayacak bazı fikirler ileri sürölmüştür. Bunlar hastaların serumlarında HCV RNA ekstraksiyonunu etkileyen faktörlerin varlığı, örneğin; heparinli kan, hastanın interferon tedavisi görüyor olması, kanın laboratuvara ulaştırılması sırasında soğuk

zincirde meydana gelen aksaklıklar, testin standardizasyonundaki metodolojik bazı problemler bunların başında gelir. Bunların yanında kanda PCR ile yakalanamayacak kadar düşük titrede virüsün olması, vireminin dalgalanma göstermesi, kanda virüs olmaksızın HCV'nin karaciğerde persistans göstermesi virüse ait negatiflik nedenleri olarak düşünülmektedir (51).

İn vitro nükleik asitlerin amplifiye edildiği PCR ve benzeri yaklaşımlar (LCR-ligase chain reaction-, NASBA- nucleic acid sequence-based amplification-, TMA- transcription-mediated amplification), NAT (nucleic acid amplification testing) adı altında birleştirilmiştir (42). Kan bankacılığında NAT, özellikle tarama testleriyle yakalanabilmesi için antikor gelişmesi gereken, yani donörün enfekte olmasına rağmen henüz antikorlar oluşmadığı için seronegatif olarak saptanabileceği HCV, HIV gibi virüslerin direkt olarak genetik materyallerinin gösterilmesine yarayan yeni bir test tekniği olarak gündeme gelmiştir. 1980'li yıllarda AIDS'in ortaya çıkması, posttransfüzyonel hepatitlerin çoğunun HCV'ye bağlı olması, 1990'larda ise moleküler biyoloji laboratuvarındaki teknolojik gelişmeler NAT'ın kan bankacılığında tarama amaçlı kullanımı düşüncesini doğurmuştur (42).

Kan Bankacılığı ve HCV

Alıcıya zarar verebilecek herhangi bir mikroorganizma veya kimyasal madde içermeyen kan ve kan ürünleri olarak tanımlanan "Güvenli Kan" a ulaşmak bugün kan bankacılığının en önemli hedefi durumundadır. Donör sorgulama ve mikrobiyolojik tarama testleri bu hedefe ulaşmak için kullanılan iki önemli yoldur. Ülkeler bu amaçla kan bağışçılarını kendi sağlıkları ve alıcı açısından taşıyabilecekleri risklerle ilgili olarak ayrıntılı olarak sorgulamakta ve çeşitli enfeksiyöz tarama testleriyle tarayarak, kullanıma sunulan kanı mümkün olduğu kadar güvenli hale getirmeye çalışmaktadırlar. ABD, Avrupa Birliği ve ülkemizde bu amaçla kullanılan testler bazı farklılıklar gösterir. Bunun nedeni enfeksiyon etkenlerinin farklı epidemiyolojik özellikler ve fiyat-yarar-etkinlik değerlendirmeleri ile elde edilen verilerdir (52). Birçok ülkede

rutin olarak çalışılan HBsAg, Anti-HCV, Anti-HIV ve RPR/VDRL gibi testlere ek olarak Brezilya'da bölgede endemik olarak bulunan Chagas Hastalığı'na, ABD'de HTLV I/II'ye ve sıtmanın endemik olduğu bölgelerde, hatta 1987 yılına kadar ülkemizde de sıtmaya yönelik taramaların kan donörlerinde rutin olarak yapılması enfeksiyöz tarama testlerinin ülkeler arasındaki esitliliğine örnek olarak gösterilebilir.

ABD'nde 1971 yılında tüm kan donörlerinde HBsAg taranması zorunlu hale getirilmiş ancak Non-A Non-B Hepatit (NANB) virüslerine ilişkin taramalar uzun yıllar yetersiz kalmıştır. Posttransfzyon hepatitlerle ilgili alışmalar ALT düzeyi yüksek ve/veya anti-HBc pozitif donörlerden kan alan kişilerde posttransfüzyon hepatit gelişme oranının, ALT düzeyi normal ve anti-HBc negatif kan alanlara oranla 3-4 kat daha fazla olduğunu göstermiş, bunun üzerine 1987 başlarında ALT ve anti-HBc testleri indirekt-nonspesifik testler olarak donör tarama testlerine dahil edilmiştir. Ancak HCV'nin tanımlanması ve 1990 yılında 1. jenerasyon test kitlerinin 1992'de 2 ve 1994'de 3. jenerasyon anti-HCV test kitlerinin kullanıma sunulmasıyla ALT ve anti-HBc testleri önemini kaybetmiş ve anti-HCV rutin tarama testi olarak kan bankacılığında yerini almıştır.

Ülkemizde, 2857 sayılı Kan ve Kan rnleri Kanunu ve ilgili yönetmeliklerinde, kan bağışlarında çalışılması zorunlu enfeksiyöz tarama testleri, HBsAg, Anti-HCV, Anti-HIV ve RPR/VDRL olarak belirtilmiştir. Ülkemizde 1990'dan beri donör kanlarında anti-HCV taraması rutin olarak yapılmaktadır. Bu testlere ek olarak herhangi bir destekleyici ve/veya doğrulama testi zorunluluğu getirilmemiştir.

Son 20 yılda tarama testlerindeki ilerlemeler sayesinde transfüzyonla bulaşan enfeksiyonlar belirgin olarak azalmıştır. Ancak sıfırlanmamıştır. Örneğin ABD'de HBV ve HCV için transfüzyonla bulaş riski uygun donör değerlendirmesi ve duyarlı serolojik tarama testlerine rağmen 100.000 nitede 1, HIV için 1.000.000 ünitede 1 olarak hesaplanmıştır (53,54).

Virüsle enfekte olduktan sonra antikorların gösterilebilir düzeye gelmesine kadar geçen süreye preserokonversiyon pencere dönemi denir. HCV için pencere dönemi oldukça uzundur (70-82 gün). Bu süre immünyetmezlikli hastalarda 6-12 aya kadar uzayabilir (55). Transfüzyonla bulaş riskinin en büyük nedeni de pencere dönemidir. HIV ve HBV için bulaş riskinin %90'ının pencere dönemindeki kanlardan kaynaklandığı, HCV'de bu oranın %75 olduğu bildirilmiştir. HCV prevalansı relatif olarak yüksek olduğundan kalan %25'in immunolojik olarak sessiz enfeksiyonlar ya da laboratuvar hatalarından kaynaklandığı düşünülmektedir. Tarama testlerinin sensitivitelelerinin oldukça yüksek olmasına rağmen, NAT ile gösterilen antikor yanıtı değil, dolaşımdaki virüsün kendisi olması nedeniyle pencere dönemi kısaltılıp serokonversiyon öncesi enfeksiyöz donör belirlenebilir ve transfüzyonla bulaş riski azaltılabilir (56).

Kan bankalarında donörlerden elde edilen kan komponentlerinden (eritrosit süspansiyonu, taze donmuş plazma, trombosit süspansiyonu, kriyopresipitat) farklı olarak, plazma ürünlerinin (albumin, gama globulin, pıhtılaşma faktör preparatları gibi) elde edildiği plazma fraksinyasyon tesislerinde binlerce plazma havuzlanmakta, ardından da ürünlere ayrıştırılmaktadır. Plazma havuzuna katılacak bir enfekte plazmanın tüm lotu enfekte edebileceği bir gerçektir. Bu nedenle plazma fraksinyasyonunda, kan bankacılığında farklı olarak viral inaktivasyon işlemleri uygulanmakta ve risk minimize edilmeye çalışılmaktadır. Ancak yine de sıfırlanmadığı bilinmektedir.

Özellikle donörlerde anti-HCV çalışılmış olmasına rağmen, ticari immünglobulin preparatları ile hastalara HCV enfeksiyonu bulaştığının gösterilmesinden sonra Avrupa Birliği Proprietary Medicinal Products Komitesi (CPMP) 1 Temmuz 1999'dan sonra fraksinyasyonda kullanılacak tüm plazmaların HCV-NAT ile taranması zorunluluğunu getirmiştir. Bu zorunluluk Avrupa Birliği'ne bağlı ülkeler için geçerliyse de ABD'ndeki çoğu

üretici firma ve kan bankaları ürünlerini Avrupa'ya sattığından NAT'ın ABD'nde hızla kullanıma girmesi gerekmiştir (57). Başlangıçta HCV NAT'ın plazma ürün havuzlarında çalışılması binlerce ürünün imhası ve donörün kaybıyla sonuçlanmış, sonuçta 6-96 donasyon içeren mini-pool NAT (MP-NAT) sistemi geliştirilmiştir (58). PCR'ın yüksek sensitivitesi ve HCV enfeksiyonunun erken evrelerindeki yüksek viral yük varlığı NAT testini havuzlarda çalışabilmeyi mümkün kılmaktadır (59,60).

Ayrıca single donör NAT (SD-NAT) uygulamaları da mevcuttur. Ancak NAT'ı her donör için tek tek çalışmanın güçlüğü havuzlama yönteminin daha yaygın kullanılmasına yol açmıştır. Havuzlama yöntemiyle hem maliyet düşmüş hem de insandan kaynaklanan hatalar minimale inmiştir. Havuz büyüklüğünün testin sensitivitesi ile yakın ilişkisi olduğu da bilinmektedir. Küçük ölçekli havuzlar kullanarak bu problemin üstesinden gelinebilir. 50 örnekten küçük havuzlar bir konsantrasyon basamağı gerektirmez ve bu sayede de 50'nin altındaki örneğin havuzlandığı NAT'larda NAT'ın sensitivitesinin azaltmadığı bildirilmektedir (42).

Anti-HCV negatif kişilerde çeşitli nedenlerle HCV-RNA'nın bulunabildiğinin değişik çalışmalarla gösterilmesi, kan donörlerinde anti-HCV tarayarak transfüzyon güvenliğini sağlamaya çalışmanın yeterli olmadığını algılamak açısından önemlidir. Bu dünyada yapılmış olan değişik çalışmalara çıkış noktası oluşturduğu gibi, bizim için de, "ülkemizde kan donörlerinde HCV RNA taranması, transfüzyon ile HCV bulaşını önleme açısından anlamlı olabilir mi?" sorusuna yanıt olabilecek bu çalışmayı planlamada temel düşünceyi oluşturmuştur.

Ülkemizde kan donörleri arasında bu konuda yapılmış bir çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle biz bu çalışmamızda anti-HCV negatif kan donörlerinde HCV-RNA çalışarak serokonversiyonun henüz oluşmadığı pencere periyodunda bulunan kanlardaki virüs pozitiflik oranını saptamayı ve bu çalışma ile, ülkemizde uygulanmakta olan donör tarama testlerinde bir

düzenlemenin gerekip gerekmediği konusundaki tartişmalara ışık tutacak bir veri oluşturmayı amaçladık.

GEREÇ VE YÖNTEM

Serum Örnekleri

Bu çalışmada, Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dr. Rasit DURUSOY Kan Merkezine basvuran kan bağışçılarından mikrobiyolojik tarama testleri için alınan test serumları kullanılmıştır. Çalışma için donörlerden ek bir kan örneği alınmamış, rutin tarama testlerinden artan serum örnekleri kullanılmıştır. Çalışma grubu anti-HCV'si negatif olarak saptanmış 2592 donörün serumundan oluşturulmuş ve bu rakam fakültemiz Biyoistatistik Anabilim Dalı ile görüşülerek belirlenmiştir.

Donasyon öncesinde alınmış ve rutin olarak anti-HCV bakılmış serumlardan anti-HCV testi negatif sonuçlanmış 2592 adet donör serumundan, herbiri 24'er örnek içeren toplam 108 adet serum havuzu elde edilmiştir. Havuzları oluşturmak için her örnekten 100'er µL alınmıştır. Ayrıca HCV RNA'sının negatif olduğu bilinen 24 serum örneğinden negatif kontrol ve 23 adet HCV RNA'sı negatif ve bir adet HCV RNA'sı pozitif olduğu bilinen serum örneğini içeren pozitif kontrol havuzu elde edilip oluşturulan havuzlar steril RNAase free tüplere konup ve çalışılncaya kadar -80 °C'de saklanmıştır.

Anti-HCV Testi

Donörlerde anti-HCV, kan merkezinin rutin uygulaması içinde, Abbott-AxSYM System (Abbott, Max-Planck-Ring 2, 65205 Wiesbaden, Germany) kullanılarak, üretici firmanın kit prosedürlerine uygun olarak çalışılmıştır.

HCV-RNA Çalışılması

HCV-RNA ekstraksiyon işlemi otomatik ekstraksiyon kitleri (Abbott Laboratories Diagnostics Division Abbott Park, IL 60064, USA) ile üretici firma önerilerine uygun olarak yapılmış, Real-Time PCR cihazında (Abbott m2000rt. Germany) yine üretici firma önerilerine uygun olarak HCV-RNA izole edilmiştir.

HCV-RNA Ekstraksiyonu

80°C'lik derin dondurucuda saklanmakta olan serum havuzları çıkartılarak oda ısısında çözümleri beklenmiştir. Kullanılacak reaktifler homojen bir çözelti elde edebilmek amaçlı köpürtmeden karıştırılmıştır. Sıcaklık kontrollü kuru ısıtma blokları açılmıştır. 12x75 mm tüp bloğu 50°C'ye, 1.5 mL tüp bloğu 75°C'ye ayarlanmıştır. Gerekli tüm tüpler etiketlenip; lysis ve wash 1 aşamaları için örnek başına bir adet 12x75 mm reaksiyon tüpü, wash 2 ve elüsyon tamponu aşamaları için örnek başına bir adet 1.5 mL ependorf tüpü, eluat için örnek başına bir adet 1.5 mL ependorf tüpü ve 96 well plate hazırlanmıştır. Lysis şişesine 500 µL internal kontrol ilave edilip 5-10 kez köpürtmeden karıştırılmıştır.

Lysis

Mikropartikül şişesi homojen hale gelene kadar köpürtmeden karıştırılmıştır. Her bir tüpe 100 µL mikropartikül eklenip oda sıcaklığında normal raklara yerleştirilmiş ve her bir tüpe 2.4 mL lysis ilave edilmiştir. Her bir tüpe, örnekler seçilen protokole göre (numuneler, kalibratörler ve/veya kontroller) ilave edilip 2-3 defa pipetaj yapılmıştır. Tüpler 50°C'lik ısıtma bloğuna yerleştirilip 20 dakika inkübe edilmiş ve 1-2 dakika partiküllerin tüpün kenarına toplanmasını sağlamak için manyetik standda yerleştirilmiştir. Tüplerde toplanan sıvı mikropartiküllere dokunmadan pipet ucuyla alınmış ve tüpler manyetik raktan normal raka alınmıştır.

1. Yıkama (iki kez yapılmıştır)

Her tüpe 700 µL Wash 1 ilave edilip, partiküller süspanse edilmiş ve pipet ucuyla dağıtılıp her biri 1.5 mL'lik ependorf tüpüne aktarılmıştır. Ependorflar 1-2 dakika manyetik standda yerleştirilmiştir. Daha sonra ependorflardaki sıvı uzaklaştırılıp, ependorflar manyetik raktan normal raka alınmıştır.

2. Yıkama (iki kez yapılmıştır)

Her tüpe 700 µL Wash 1 ilave edilip, partiküller süspansedilmiş ve pipet ucuyla dağıtılmıştır. Her bir tüp 1.5 mL'lik eppendorf tüpüne aktarılmıştır. Eppendorflar 1-2 dakika manyetik standda yerleştirilip, eppendorflardaki sıvı uzaklaştırılmış ve eppendorflar manyetik raktan normal raka alınmıştır.

Elusyon 1. Aşama

Örneklere 25 µL Elusyon buffer eklenip, süspansedilmiştir. Eppendorflar normal raka yerleştirilmiştir. Eppendorflar 75°C'lik ısıtma bloğunda 20 dakika inkübe edilip, sonrasında bloktan alınıp normal raka yerleştirilmiştir.

Elusyon 2. Aşama

Örneklere 63 µL Wash 2 ilave edilip, aspire edilmiştir. Tüpler normal raka yerleştirilmiştir. Eppendorflar 1-2 dakika manyetik standda yerleştirilmiş, eppendorflardaki eluetler ayrılıp, eluetler yeni bir eppendorfa aktarılmıştır.

Master Mix Hazırlama

1 nolu şişeden 271 µL ve 2 nolu şişeden 949 µL alınıp 3 nolu şişeye pipetlenmiş ve iyice karıştırılmıştır. Karışımın tümü eppendorf veya santrifüj tüpüne alınıp vortekslenmiştir.

Ekstraksiyon işlemi tamamlanan serumlar amplifikasyon ve sonuçların değerlendirilmesi için Abbott M2000 rt 'ye aktarılmıştır.

İstatiksel Analiz

Çalışmaya başlamadan önce çalışılacak donör sayısını belirlemek açısından yapılan istatiksel değerlendirmede toplumda HCV görülme sıklığı %1 kabul edildiğinde 2.100.000 nüfüsü barındıran bir şehir olan Bursa'da yapılan bu çalışmada %0.1'lik anlamlılık seviyesinde % 0.5 hata payıyla örnekler mevcudu 2592 olarak belirlenmiştir.

Çalışılan havuzların 1'inde HCV-RNA pozitifliği saptanmıştır. Cihaz bu havuzda 30 IU/ml altında bir replikasyon varlığını göstermiştir. Pozitif

havuzda çalışma tekrarlanmış ve ikinci kez pozitif bulunan bu havuzdaki 24 serum rneği ayrıca tek tek çalışıldığında tümünün negatif olduğu görülmüştür. Dolayısıyla gerçek HCV-RNA pozitifliği saptanamadığından yapılan çalışma sonucunda bir değişkenlik gözlenmediği için istatistiksel bir değerlendirme yapılamamıştır.

BULGULAR

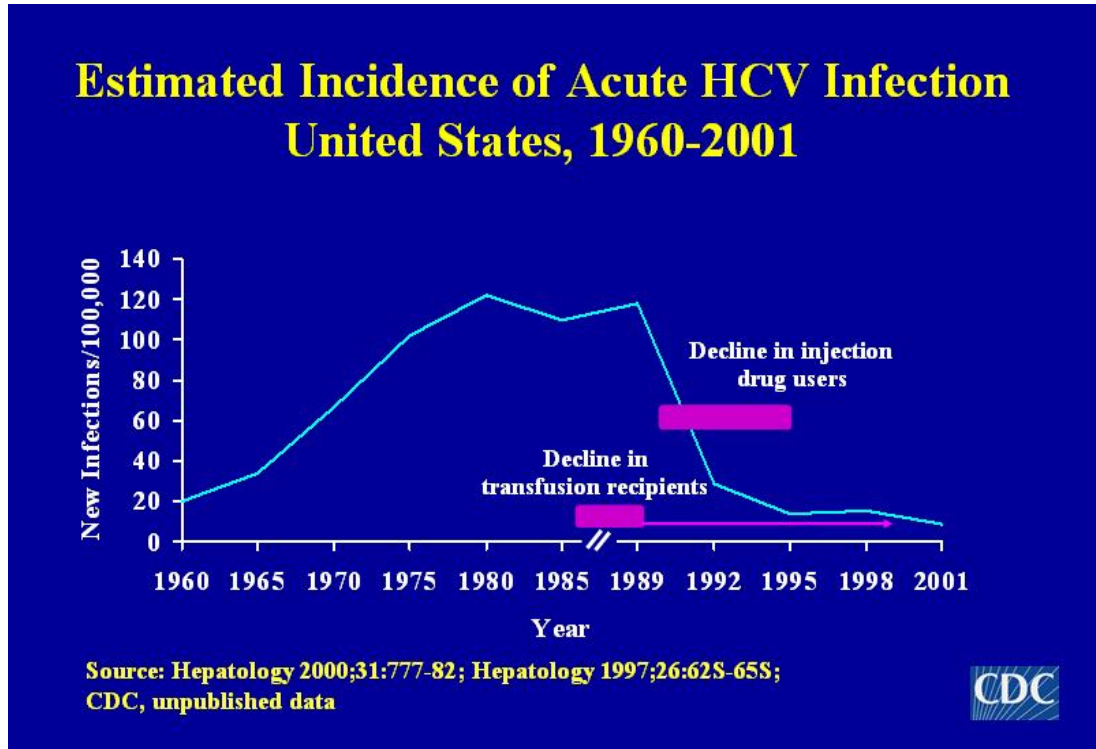
Çalışmaya, Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Raşit Durusoy Kan Merkezine donasyon amaçlı başvurmuş ve III. Jenerasyon ELISA ile anti-HCV negatif saptanmış 2592 donör alınmıştır.

Çalışılan serum havuzlarında R-T PCR yöntemiyle gerçek HCV-RNA pozitifliği saptanmamıştır. Çalışmaya alınan 108 havuzun 1’de başlangıçta pozitiflik saptanmış olup bu havuzdaki tüm örnekler (24 ayrı serum örneği) tek tek çalışıldığında pozitiflik saptanamamıştır.

TARTIŞMA VE SONUÇ

Kan ve kan komponentlerinin transfüzyonunun pek çok istenmeyen etkisinin olduğu bilinmektedir. Transfüzyon tıbbının temel hedefi bu olumsuz etkileri minime indirmek ve transfüzyon güvenliğini, yani "güvenli kan"ı sağlamaktır.

Günümüzde ayrıntılı değerlendirmelerle yapılan donör seçimi, son derece duyarlı yöntemler ile çalışan serolojik ve immunohematolojik testler, kanın alınması, komponentlere ayrılması ve saklanması ile ilgili titiz uygulamalar ve mevcut gelişmiş teknolojiler yanında; kanın lökositlerden arındırılması, gerekli olduğu durumlarda ışınlanması ve plazmaya karantina uygulanması gibi yöntemler transfüzyon güvenliğinde dev adımlar atılmasını sağlamış ve enfeksiyon/enfeksiyon dışı pek çok istenmeyen etkinin önüne önemli ölçüde geçilebilmiştir. Enfeksiyon bulaş riskinin en azından standart yöntemleri uygulayan gelişmiş ülkelerde çok azalmış olmasına rağmen, transfüzyon ile bulaşabilen enfeksiyonlar halen güncelliğini korumaktadır (61).



Şekil 8. ABD'de yıllara göre akut HCV enfeksiyonu insidans

Transfüzyon ile virüsler başta olmak üzere bakteriler, parazitler, riketsiyalar ve funguslar bulaşabilmektedir (52). Transfüzyonla bulaşan viral etkenlerden en önemlileri Hepatit B Virüsü (HBV), Hepatit C Virüsü (HCV), Human Immunodeficiency Virüs tip 1-2 (HIV1-2)'dir (62). Bunları Citomegalovirüs (CMV), Ebstein-Barr Virüs (EBV), Parvovirüs B19, Human-T Cell Lymphotropic Virüs (HTLV1-2) vb izler. Son yıllarda Hepatit G virüs (HGV), Transfüzyon Transmitted Virüs (TTV), Human Herpes Virüs Tip 8 (HHV-8), Multiple Sclerosis Related Virüs (MSRV), Sen-V virüsler, prionlar ve SARS gibi etkenler eklenmiştir.

Transfüzyon ile bulaşabilen çok sayıda ve türde mikroorganizmanın varlığına rağmen tüm dünyada kan bankalarında rutin olarak sadece Hepatit B ve C, HIV, Sifiliz ve bazı ülkelerde HTLV I/II ve Chagas hastalığı gibi sınırlı sayıda enfeksiyon etkeni taranmaktadır. 2857 sayılı Kan ve Kan Ürünleri Kanunu ve ilgili yönetmelikler gereğince ülkemizde kan ürünlerinde taranması zorunlu testler HBsAg, Anti-HCV, Anti-HIV 1-2 ve Syphilis antikorlarıdır.

1990'dan önce, yani anti-HCV taramalarının yapılmadığı dönemde kan transfüzyonu yoluyla enfeksiyon bulaşı sık olmuştur. Bulaş oranı coğrafi bölgelere göre farklılık göstermektedir. Bu oranlar İngiltere'de % 0.5 iken, Avustralya'da %1.1, ABD'de %3.4, Japonya'da %7.7, İspanya'da %11, Yunanistan'da %13 olarak bildirilmiştir (63,64).

1990'dan sonra Anti-HCV açısından kan donörlerinin rutin taranması, transfüzyon sonrası hepatit C bulaşma riskini dramatik olarak azaltmıştır (49).

Tüm tarama testlerine karşın kan ve kan ürünleri ile virus bulaş riski günümüzde halen az da olsa devam etmektedir. Gerek yöntemlerin duyarlılığı gibi testlere ait, gerekse pencere dönemleri gibi bu hastalıkların doğal seyirlerine ait çeşitli nedenlerle, rutin olarak taranan enfeksiyonlarda negatif çıkan test sonuçları kanın taranan enfeksiyonu bulaştırmayacağını %100 garantileyememektedir. Serolojik tarama testleri negatif olan kan

ürünlerinden enfeksiyon bulaşma riskleri HCV için ABD’de 1/103000, İngiltere’de 1/200000, Almanya’da 1/113000’dir (65-68).

Tablo 1. Seronegatif kanlardan enfeksiyon bulaş riskleri (65-68).

Serolojik tarama testleri negatif kan ürünlerinden bulaş riski	ABD	İngiltere	Almanya
HIV	1/676.000	1/2.000.000	1/1.000.000-2.000.000
HBV	1/63.000	1/50.000-170.000	1/134.000-630.000
HCV	1/103.000	1/200.000	1/113.0000

Alıcının tarama testi yapılan bu virüslerden herhangi birini kapma olasılığı 1/34.000’dir (68). Bir “transfüzyon epizodunda” hastanın ortalama 5 donöre ait komponent aldığı göz önüne alındığında ise, bir epizodda virüs kapma olasılığı 1/6.800 gibi oldukça yüksek bir orana çıkmaktadır (69).

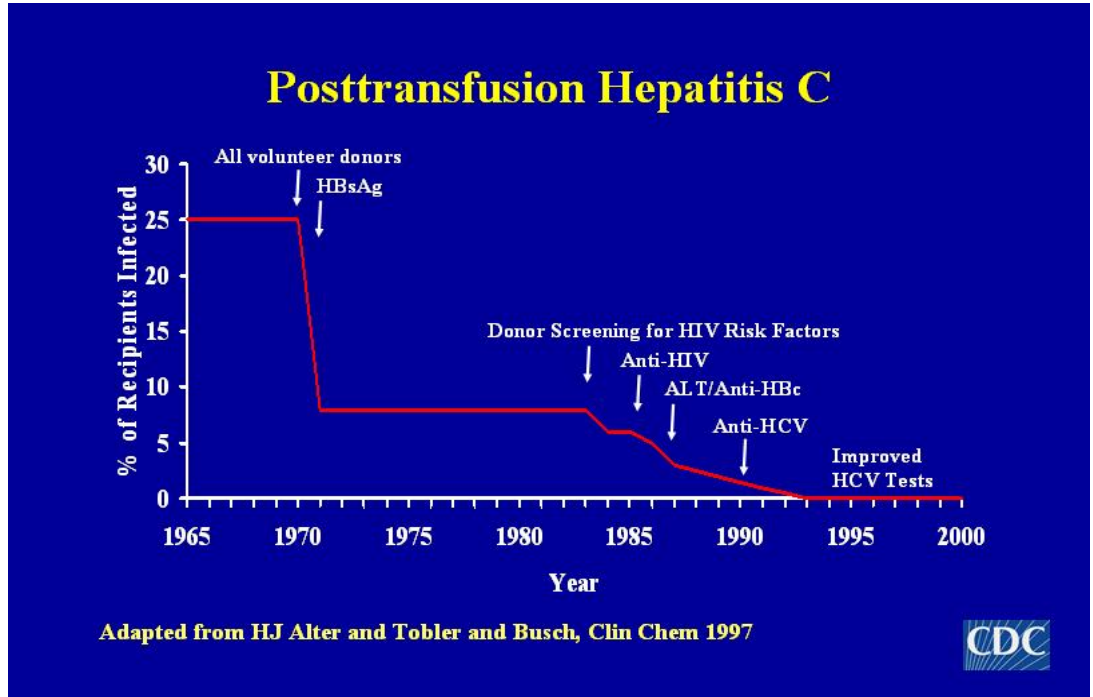
Kan bankacılığında hedeflenen, enfeksiyon bulaş riskinin sıfırlanmasıdır. O nedenle donör kanlarının güvenliği açısından pencere döneminin mümkün olan en kısa süreye indirilmesi için kan bankacılığı çalışmalarına NAT teknolojisi girmiştir.

1998-2000’de çeşitli çalışmalar ile ABD, Kanada, Avustralya, Japonya ve Avrupa’nın çoğu ülkesinde serolojik testlerle atlanabilen belirgin enfeksiyon ve düşük seviyeli kronik taşıyıcıların MP-NAT ile saptanabildiğinin gösterilmesi NAT’ın kan güvenliği açısından yararlı olabileceği görüşünü doğrulmuş, başlangıçta yalnızca plazma fraksinasyon ürünlerinde viral yükü azaltma metodu olarak ortaya konmuş olan NAT’ın kullanım amacı gelişmiş ülkelerde zamanla tüm komponentlerin güvenliğini sağlamaya dönüşmüştür (70).

Transfüzyonla virüs bulaşma riski hesaplamalarında HCV için bulaşın %75 oranında pencere dönemindeki kanlardan kaynaklandığı gösterilmiştir. HCV prevalansı rölatif olarak yüksek olduğundan kalan % 25'in immunolojik olarak sessiz enfeksiyon ya da laboratuvar hatalarından kaynaklanabileceği düşünülmektedir. NAT ile saptanan antikor yanıtı değil, dolaşımdaki virüsün kendisi olduğundan, pencere dönemi kısaldı serokonversiyon öncesi enfeksiyöz ürün belirlenebilmekte ve transfüzyonla bulaşma riski azaltılabilmektedir (56).

1999'da kullanıma sunulan nükleik asit teknolojisi ile transfüzyonla HCV geçişin 5-10 kat daha (1/500.000-1/1.000.000) azaltılabileceği hesaplanmıştır (71).

Busch ve ark. 'nın yaptığı çalışmada da benzer bir sonuca ulaşılmış ve HCV için transfüzyonla bulaş riskinin NAT'ın kullanımı ile 1/100.000'den 1/500.000-1/1.000.000'a indiği gösterilmiştir (56).



Şekil 9. Yıllara göre posttransfüzyon hepatit C oranları

NAT'ın etkinliği hem pencere döneminin süresi hem de o enfeksiyonun toplumdaki prevalansı ile ilişkilidir. HCV için pencere döneminin uzun olması (70-82 gün) ve prevalansının nispeten yüksek olması NAT kullanımının neden özellikle HCV'de gündeme geldiğini açıklamaktadır. NAT kullanımı ile preserokonversiyon pencere dönemi 11 güne kadar inmiştir (42). Pencere dönemleri HBV için ortalama 56 gün, HIV için antikor tarama testleri ile 20-25 gün, antijen tarama testleri ile ise ortalama 16 gündür.

NAT testiyle pencere dönemi HIV'de 10-15 gün, HCV'de 41-60 gün ve HBV'de 6-15 gün kısalmaktadır (65-68).

Tablo 2. İki farklı yöntemle belirlenen preserokonversiyon pencere dönem süreleri (65-68).

Preserokonversiyon pencere dönemleri	Antikor tarama testleri ile	NAT ile
HIV	20-25 gün	10-12 gün
HCV	70-82 gün	11 gün
HBV	56 gün	40-50 gün

NAT'ı her donör için tek tek çalışmanın güçlüğü havuzlama yönteminin geliştirilmesine yol açmıştır. Havuzlama yöntemiyle hem maliyet düşmüş hem de insandan kaynaklanan hatalar minimize edilmiştir ancak havuz büyüklüğünün testin sensitivitesi ile yakın ilişkisi olduğu bilinmektedir. Ek olarak yöntemin sensitivitesinin test sırasında uygulanan ultrasantrifügasyon işlemine bağlı olarak virüslerin konsantre edilmesinden etkilendiğine inanan gözlemciler de vardır (57). HCV santrifüj sırasında çöktürde konsantre olmaz ve plazmada bulunan yağlara bağlanabilir. Bu lipitler santrifüj sırasında yüzeğe göç ederler ve kaptan kaba aktarma ve yıkama basamaklarında atılırlar. Bu sırada lipitlere bağlanmış olan HCV de kaybedilebilir. Laboratuvarların küçük ölçekli havuzlar kullanarak bu problemin üstesinden gelebileceği, 50 örnekten küçük havuzların bir

konsantrasyon basamağı gerektirmemesi nedeniyle NAT sensitivitesinin azalmadığı bildirilmiştir (42). Biz de çalışmamızda 24'er örnekten oluşan küçük havuzlar oluşturarak çalıştık.

Anti-HCV negatif plazmalardan elde edilmiş olmasına rağmen, ticari immunglobulin verilen hastalara HCV bulaştığının bildirilmesini takiben 1 Temmuz 1999'dan itibaren, Avrupa Birliği'nde dağıtımı yapılan tüm plazma fraksinyasyon ürünlerinin NAT'la HCV-RNA negatif olan plazmadan elde edilmesi gereği şart koşulmuştur.

Ancak bulaş riskinin sadece plazma fraksinyasyon ürünleri ile değil, kan bankalarında elde edilen kan komponentlerinde de var olduğu bilinmektedir. En sık kullanılan kan komponentleri olan eritrosit süspansiyonu ve taze donmuş plazma tek donörden elde edilip, farklı hastalara gitmektedir. Yani bir enfekte donör tek donasyonda 2 kişiyi, trombosit de ayrılır ise 3 kişiyi enfekte edebilir. Aynı donörün yılda birkaç kez bağışta bulunma (yılda en çok 4 kez) olasılığı da vardır. Trombosit süspansiyonu bağışında bulunan bir aferez donörünün ise 3 gün ara ile defalarca (yılda en çok 24) trombosit vermesi söz konusudur. Ek olarak, transfüzyon ile enfeksiyon kapamış kişilerin enfeksiyonu başkalarına da bulaştırabilecekleri unutulmamalıdır. NAT'ın transfüzyon ile enfeksiyonun bulaşmasını engellemedeki rolü yanında enfekte kişinin enfeksiyonun çok erken döneminde tanı almasını sağlaması da ayrı bir avantajdır (72).

ABD'de FDA politikaları pencere periyodunu azaltmak yada elimine etmek için bu teknolojiyi desteklemektedir (73).

NAT'ın dünya çapındaki uygulanması ile ilgili yapılan değerlendirmede 18 ülkeden 17'sinin HCV, 13 ülkenin HIV-1, Almanya ve Japonya'nın HBV için NAT uyguladığı görülmüştür (70).

Bugüne kadar anti-HCV negatif kanlarla HCV enfeksiyonu geçisini, diğer bir deyişle anti-HCV negatif kişilerde HCV'nin varlığını tespit etmek için çok sayıda çalışma yapılmış, farklı ülkelerde farklı sonuçlar elde edilmiştir. Bu ülkelerden NAT kullanımına ilişkin bazı örnekler şöyle sıralanabilir.

ABD'de 1999 ilkbaharından başlayarak, Amerikan Kızılhaçı ve Amerika Kan Bankaları Birliği (AABB) üyesi 16 laboratuvar donör kanlarında HIV-1 ve HCV'yi saptamak için NAT'ı kullanmaya başlamışlardır (74). ABD'de HCV için NAT'ın işleme konulmasından beri Amerikan Kızılhaç NAT programınca 48 milyondan fazla donör test edilmiş ve 196 adet HCV-RNA pozitif seronegatif donör saptanmıştır. Bu da 245.000 donörde 1 RNA pozitif donör bulunabileceği anlamına gelmektedir. Bu zaman zarfında MP-NAT nonreaktif komponentinden bildirilen dökümanente edilen tek bir HCV geçişi olan vaka vardır (75). Bu vakada testin yapıldığı dönem serumda çok düşük bir viral yükün olduğu düşünülmüştür. ABD'de NAT'ın kullanıma girmesiyle HCV için rezidüel risk yaklaşık 1/2.000.000 donasyona düşmüştür (53). ABD'de NAT ile saptanabilen HCV ile enfekte donör oranınının 1/270.000 olduğu bildirilmiştir (76).

Almanya'da 1996 yılında NAT çalışmaya 422 örnekten oluşan büyük havuzlarla başlanmış ve çalıştıkları havuzların %95'inde negatiflik saptamıştır. Havuzlarda HIV pozitifliği saptanmazken, 69 donörde HCV-NAT pozitif bulunmuş ve bunların yalnızca 3'ünde anti-HCV'nin pozitif olduğu görülmüştür. Daha sonraki çalışmalarda havuzlardaki örnek sayısı azaltılarak ve çeşitli modifikasyonlarla NAT'ın kullanılabilirliği kolaylaşmış ve PCR'ın kan donörlerinin rutin taramasında uygun olduğu fikrine varılmıştır (77). Almanya'da 1998 yılında bir değerlendirme yapılmıştır. O zaman kadar 1.134.102 donörde HCV, HIV, HBV için NAT testi uygulanmış olup 24 seronegatif donörde NAT pozitifliği saptanmıştır (2 HBV, 22 HCV) (78,79). Alman Kızılhaç örgütü çalışmalarında 100.000 anti-HCV negatif kandan 121'inin HCV bulaşına neden olduğunu saptamıştır (80). Bunun nedeni olarak; preserokonversiyon pencere dönemindeki kan bağışları, varyant

virüsler, atipik (immunolojik sessiz) serokonversiyon ve %0.1 oranında laboratuvar yanlışlıkları gösterilmiştir. Bunlardan pencere dönemi en büyük sorunu oluşturmuştur (81).

Fransa'da Temmuz 2001'den itibaren tüm kan donasyonlarında HIV-1 ve HCV için NAT uygulanmaya başlanmıştır. Pillonel ve arkadaşlarının Fransa'da yaptığı 1992-2003 yıllarını içine alan çok merkezli çalışmada; 2001-2003 yılları arasındaki periyotta NAT olmaksızın rezidüel riskler HIV için 1.700.000 donasyonda 1, HCV için 1.560.000 donasyonda 1 ve HBV için 640.000 donasyonda 1 dir. MP-NAT ile birlikte bu oranlar HIV için 3.150.000 ve HCV için 10.000.000 da 1 bulunmuştur. Bu da HIV için Fransada yılda birden az potansiyel enfekte donasyonu, HCV için ise dört yılda bir olabilecek potansiyel enfekte donasyonu gösterir. Bu risk 1990'dakinin 1/10'undan daha azdır (1/311.000) (82). Bu azalma gelişmiş donör seçiminin ve test yöntemlerinin sensitivitesindeki artışın sonucu olarak yorumlanmıştır. Bu sensitif testler pencere periyodunu 1990'daki ortalama 45 günden 1992'de 22 güne ve NAT minihavuz ile 12 güne indirmiştir. Yine de NAT'lı yada NAT'sız rezidüel risk farkları HIV için ($p=0.7$) ve HCV için ($p=0.2$) anlamlı bulunmamış ve rezidüel risk pencere periyodunun uzunluğuna bağlanmıştır (83). Fransa'da Temmuz 2001'den Aralık 2003'e kadar 2 HIV ve 3 HCV pozitif donasyonun NAT pozitifliği sayesinde engellendiği bildirilmiştir. Bu da NAT'ın HIV için 3.07 milyonda 1, HCV için 2.05 milyonda 1 vaka yakalayabildiğini göstermektedir (83).

Japonya'da 1999 Temmuz'da JRC(Japanese Red Cross Society) tarafından kan donörlerinde HBV, HCV, HIV-1 için NAT testi kullanılmaya başlanmıştır. (84). Japonya'da Hitoshi ve arkadaşları tarafından Şubat 2000-2001 Nisan yıllarını içine alan bir çalışmada serolojik testleri negatif olan 6.805.010 gönüllü kan donöründen kan alındıktan sonra 24 saat içinde 50 örneklik mini havuzlar oluşturularak ve HBV ,HCV ,HIV 1 için multiplex NAT çalışılmıştır. 112 donörde HBV-DNA, 4 donörde HIV ve 25 donörde HCV-

RNA pozitifliği saptanmış, transfüzyon engellenerek olası bulaş önlenmiştir (85).

Öte yandan Heyns ve arkadaşlarının Güney Afrika'da yaptığı çalışmada 6 aylık bir periyotta 362.129 donasyon HIV1-2, HCV ve HBV için antikor tarama sistemleri ve SD-NAT ile taranmış ve HCV için anti-HCV negatif iken, HCV SD-NAT testi pozitif saptanan herhangi bir donör olmamıştır (86).

Bütün çalışmalara rağmen, tüm bu olumlu yönlerine karşılık NAT halen donör taranmasında rutin kullanım için gelişimin erken basamaklarındadır. Yeteri kadar maliyet-etkin, otomatik bir sistem henüz yoktur. Kan merkezlerinin üzerine büyük yük bindiren çeşitli ekonomik ve teknik nedenler şöyle sıralanabilir:

- 1- NAT moleküler biyolojik tekniklerde yetişmiş uzmanlar ve kan bankası laboratuvar düzeni için alışık olunmayan bir ekipman gerektirir.
- 2- Ticari NAT analizlerinin yapılabilmesi için 6-12 saate ihtiyaç vardır, bu da kanın kullanıma sunulabileceği süreyi ciddi olarak geciktirir
- 3- Ayıraç hazırlanması , örnek toplanması, genomik amplifikasyon ve saptama gibi işlemler ampikonların çapraz kontaminasyonunu önlemek için farklı odalarda yapılmayı gerektirir. Bu da geniş çalışma alanları gerektirir.
- 4- Ticari NAT testinin maliyeti en pahalı EIA testinden yaklaşık 10 kat fazladır.
- 5- NAT'in etkinliği, havuzdaki örnek sayısı, viral yük, testin duyarlılığı, testin tipi, bulaştırıcılık oranı ve viral temizleme potansiyeli gibi birçok faktöre bağlıdır. Referans standartların oluşturulması, duyarlılık ve özgüllük oranlarının belirlenmesi ve yeterlilik testlerinin düzenlenmesiyle ilgili kriterlerin ortaya konması gibi konularda halen tam bir görüş birliği yoktur (87).
- 6- Kan donörlerinde HCV-RNA PCR çalışılmasını destekleyen birçok çalışmaya rağmen Hepatit C virüs enfeksiyonu sırasında vireminin aralıklarla olabileceği (88) ve vireminin olmadığı veya çok düşük düzeylerde olduğu dönemlerde PCR ile HCV-RNA saptanamayabileceği unutulmamalıdır. Dolayısıyla HCV-RNA negatifliği, HCV virüs enfeksiyonu yokluğunu tamamen garanti edememektedir.

7- Yanlış pozitiflik oranları oldukça yüksektir ve bu da ek harcama ve zaman kaybına neden olmaktadır (42).

8- Kontaminasyondan dolayı yanlış pozitif sonuçlar yanında, serumların saklanması yada çalışılması sırasındaki aksaklıklara bağlı HCV-RNA yıkımından ya da virüsün farklı genotipleri arasındaki antijenik farklılıklardan kaynaklanan yanlış negatif sonuçlar yöntemin diğer önemli bir dezavantajıdır (89).

Havuzlanmış örneklerin kullanımıyla ilgili ek bir problem de başlangıç testinde pozitif, ama daha küçük havuzlardaki ikincil testde negatif olan havuzların yorumlanması ve değerlendirilmesidir. Bu problemle başlangıç ve ikincil testte pozitif, ama tek tek bakıldığında negatif olan havuzlar şeklinde de karşılaşılabilir. Bu olay kan merkezlerine büyük bir ekonomik yük bindirmektedir. NAT pozitif örneklerin yaklaşık %50'sinin yalancı pozitif olduğu tahmin edilmektedir (42). Biz de çalışmamızda böyle bir sorunla karşılaştık. Pozitif saptadığımız havuzdaki serumları tek tek çalıştığımızda herhangi bir pozitiflik olmadığını ve bu pozitifliğin yalancı pozitiflik olduğunu gördük. NAT kullanımında karşılaşılan bu yüksek orandaki yanlış pozitifliklerden sorumlu olan en önemli etmen çevresel kontaminasyondur. Çalışma sırasında pozitif örneklerden kapağının açılması sırasında komşu tüplere mikrosprey yoluyla, ayrıca pipetaj sırasında kontaminasyon ortaya çıkabilmektedir (90,91). Kalifiye elamanlarla çalışma, cihazların sık aralarla temizliği ve bir gece UV irradiasyona tabi tutulmasıyla kontaminasyon sorunu aşılmaya çalışılmaktadır.

Bir başka problem de NAT pozitif havuzlar için nasıl bir yaklaşım sergileneceğidir. NAT pozitif havuzlardan hazırlanmış tüm örnekler atılmalı mı yoksa yalancı pozitif olarak değerlendirildiğinde kabul mü edilmelidir? Havuzlanmış örneklerde pozitive neden olan örnek saptanıncaya kadar havuzdaki tüm örnekler tek tek çalışılmalıdır (42).

Çalışmamızda 2592 adet donör serumu havuzlanarak 108 havuz elde edilmiş ilk aşamada 108 adet PCR kiti kullanılmıştır. Bu çalışmanın maliyeti her kitin 72.9 YTL fiyata alındığı hesaplanırsa 7.873 YTL olmuştur. Pozitif havuzdan kaynaklanan ek çalışma fazladan 25 adet kit (pozitif havuzun tekrar çalışılması ve sonrasında tüm havuzu oluşturan 24 serum örneğinin ayrıca çalışılması ile) kullanmamıza ve sonuçta 1.822 YTL'lik ek maliyete neden olmuştur. Ayrıca önemli bir zaman kaybını da beraberinde getirmiştir. Bu da diğer benzer çalışmalarda da belirtildiği gibi NAT'ın kullanımında en önemli kısıtlamanın maliyeti ve zaman kaybı olduğu fikrini desteklemektedir.

Yalancı pozitifliklerde kan bankalarını zor durumda bırakan bir diğer nokta ise donörlerin red edilmesi ve bu konuda donörlerin bilgilendirilme gereğidir. Bu da aylarca süren ciddi psikolojik baskı, önemli maddi ve zaman kayıplarına neden olmaktadır. NAT reaktif bir sonuçla karşılaşıldığında donöre ulaştırılması gereken mesaj şu şekilde olmalıdır: "Bir araştırma yöntemiyle yapmış olduğumuz testiniz HCV'ne karşı reaktif sonuç vermiştir. Zorunlu olan serolojik tarama testi sonucunuz negatiftir. Bu sonuçların öneminin belirlenebilmesi için iki test sonucunuzun netleştirilmesi gerekmektedir. Tam bir sonuç alınca kadar başka kişilere hastalık bulaştırmamanız için kan bağışınız kabul edilmeyecektir." Donör 6-12 aylık bir periyotta izlenir. Eğer NAT reaktivitesi devam etmez yada seropozitiflik gelişmezse donör olarak kabul edilir. Daha sonraki çalışmalarda testler enfeksiyonu doğrularsa kişi medikal takibe alınıp kalıcı olarak donörlüğü reddedilir. Bu durumda söz konusu olan sadece donör kaybı değil, aynı zamanda ürün kaybıdır.

NAT teknolojisi ile transfüzyonla HCV bulaş riski sığırına yaklaşabilir, ancak yalancı pozitiflikler, zaman kaybı ve ekonomik yönü uygulanabilirliğini zorlaştırmaktadır. NAT'ın kan bankacılığında uygulanması oldukça pahalı ve zordur (87).

Tablo 3. MP-NAT/SD-NAT maliyet analizi(92).

ABD maliyet analizi	MPNAT	SDNAT
Her donasyon için	15\$(12-18\$)	30\$(27-33\$)
Toplam maliyet	4.3 milyon dolar	X2

NAT maliyetleri değişkenlik göstermektedir ve kesin olarak önceden tahmin etmek zordur (92).

En büyük maliyet, test maliyetidir. Test maliyetinin içeriği; örneklerin toplanması, transportu, testin uygulanması, ünitenin karantinası, doğrulama testi ve donöre bildirimidir. Ayrıca yanlış pozitif sonuçlar nedeniyle geçici olarak red edilen donörlerden ve bunlardan elde edilen komponentlerin imhasından kaynaklanan kayıp da unutulmamalıdır (92).

ABD MP-NAT testinin her bir eritrosit ünitesinde 6-10 USD ek bir maliyete yol açtığı belirtilmektedir (65).

Fransa'da serolojik testlerle saptananlara ek olarak sadece 11 HCV, 4 HBV, 2 HIV pozitif vericinin NAT ile saptanması on milyonlarca Frank harcanmasına neden olmuştur (93).

Tıbbın diğer alanlarındaki maliyet-etkinlik oranlarına ulaşabilmesi için NAT maliyetinin verilen her ünite için 1 doların altına inmesi gerektiği belirtilmektedir. Bu da gerçekçi gibi gözükmemektedir (92).

Ayrıca transfüzyon ile HCV geçişinin maliyet analizi yapılırken, yılda kaç kişinin bu şekilde HCV enfeksiyonu ile karşılaştığı ve bu kişilerin tedavi giderlerinin ekonomiye getireceği yükün, HCV geçişini engellemek için yapılan harcamalarla kıyaslanması gerekmektedir. Bu kıyaslama için öncelikle ülkemizde transfüzyon ile HCV bulaş riskinin ne olduğunun ve NAT ile anti-HCV negatif ne kadar bulaştırıcı donör saptanabileceğinin ortaya

konması gerekmektedir. Gerçek bir pozitiflik elde edilmediyse de, çalışmamız ülkemizde bu amaçla yapılmış ilk çalışmadır.

Enfeksiyon gelişen kişilerin tedavi maliyetlerinin ve enfeksiyon geliştiğinin belirlenmesi için yapılan harcamaların, bulaşı engellemek için yapılan harcamalarla kıyasının iyi yapılmasının, kan bankalarında HCV'ye yönelik rutin olarak uygulanan anti-HCV testine ek test gerekip gerekmediği kararının verilmesinde önemi büyüktür.

Mesleki ve ahlaki değerlerimiz bu maliyetin karşılanması gerektiğini düşündürse de, işletmelerin varlıklarını sürdürebilmeleri ve topluma uzun süreli ve kaliteli hizmet verebilmesi için de ekonomik dengeler ve maliyet önem kazanmaktadır. Bu nedenle HCV-NAT'ın kan bankacılığında rutin kullanım gerekliliği tartışılırken maliyet-etkinlik değerlendirilmesinin öncelikli olarak yapılması gerekmektedir. Yılda ortalama 17.250 eritrosit süspansiyonu, 14.000 taze donmuş plazma, 4.500 trombosit süspansiyonu ,750 tam kanı kullanıma veren kan merkezimiz örnek alındığında yılda 36.500 transfüzyonun gerçekleştiği görülmektedir. Yılda ortalama 25.000 donör kabul ettiğimiz merkezimizde tüm donör örneklerinde MP-NAT (24 serum örneği içeren) çalışmak kan merkezimiz için yıllık yaklaşık 75.937 YTL'lik ek test maliyetine neden olacaktır. Bunun yanında yalancı pozitiflikler de maliyeti yükseltmektedir. Bizim çalışmamızda yaklaşık olarak %0.9 oranında yanlış pozitiflik saptanmıştır. 25.000 donörün çalışıldığı bir çalışmada ortalama 10 adet yanlış pozitiflikle karşılaşılacak bu da ek 250 çalışma ve 18.225 YTL'lik maliyete neden olacaktır. Bu hesaplara kan merkezimiz için NAT teknolojisi ortalama yıllık 94.162 YTL'lik maliyete neden olacaktır.

Sonuç olarak kan donörlerinde HCV-RNA'nın taranması kan desteğinin emniyetini arttırabilir. Fakat bu göreceli olarak yüksek bir maliyetle gelmektedir (94).

NAT teknolojisi; maliyet, zaman ve kalifiye personel yetersizliği gibi sıkıntılarını nedeniyle ÷lkemiz açısından Şimdilik pek uygulanabilir g÷r÷nmemektedir. Ancak, aynı anda birden çok vir÷se ait taramanın yapılabildiği otomatik ve daha ucuz NAT sistemleri hem maliyet, hem de uygulanma s÷resi açısından umut vaat edebilir (95,96).

Ancak, en azından bug÷n için ÷lkemizde, yeterli veriler elde edilene kadar kan bankacılığında rutin NAT çalışılması yerine özenli bir don÷r seçimi ve y÷ksek duyarlılıkta serolojik testlerin standartlara uygun Şekilde t÷m kan bankalarında kalite kontrolleri de yapılarak çalıŐılmasının sağlanması çok daha gerçekçi ve verimli olacaktır. D÷zenli ve g÷n÷ll÷ kan bađıŐıları ile enfeksiyonların geçiŐ riskinin ilk kez kan bađıŐlayan veya para karŐılıđı kan verenlere g÷re çok daha d÷Ő÷k olduğunun pek çok çalışma ile g÷sterilmiŐ olması, g÷n÷ll÷ kan bađıŐını topluma yaymaya y÷nelik organizasyonların önemini net bir Şekilde ortaya koymaktadır. ÷lkemizde bu konuda da ciddi organizasyonlara gerek vardır. NAT'ın bu sorunları aŐmiŐ olan gelişmiş ÷lkelerde rutin kullanıma girmiş olması ŐaŐırtıcı değildir. Ancak ÷lkemiz için maliyet yararlılık hesaplaması yapılması için çok sayıda ek çalışmalara ihtiyaç vardır.

Bizim çalışmamız ÷lkemizde bu konuda elde edilen ilk veriler olması nedeniyle önemlidir. Ancak daha fazla merkezde ve çok daha fazla sayıda don÷rde çalışmalar yapılması gerekmektedir.

KAYNAKLAR

1. Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 1989; 244: 359-62
2. Lauer GM , Walker BD, Hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 2001; 345: 41-52
3. Hoofnagle JH, Course and outcome of hepatitis C. *Hepatology* 2002; 36: 21-28
4. Major ME, Feinstone SM, The molecular virology of hepatitis C. *Hepatology* 1997; 25: 1527-38
5. Di Bisceglie A M, Hepatitis C. *Lanset* 1998; 351: 351-55
6. Berenguer M, Wright TL, *Viral Hepatitis*. 7. Saunders; 2002: 1278-1335
7. Zein NN, Clinical significance of hepatitis C virus genotypes. *Clin Microbiol Rev.* 2000; 13: 223-35
8. Thiers V, Jaffredo F, Tuveri R, Development of a simple restriction fragment length polymorphism(RFLP) based assay for HCV genotyping and corparative analysis with genotyping and serotyping tests. *J Virol Methods* 1997; 65: 9-17
9. Flamm SL, Chronic hepatitis C virus infection. *JAMA* 2003; 289: 2413-17
10. Abacıoğlu H, Hepatit C virusunun moleküler evrimi. *V. Ulusal Viral Hepatit Simpozyum Kitabı* 2000; 81-89
11. Yenen Ő. Hepatit C virusu. In: Wilke A, Söyletir G, Doğanay M. *İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi, 2002: 1377-1400
12. Yıldız E, Oztan A, Sar F, Pınarbaşı E, Atalay RC, Akız H. Molecular characterization of full genoma Turkish hepatitis C virus 1b isolate(HCV-TR1): predominant viral form Turkey. *Virus Genes* 2002; 25:169-170
13. Qian Kp, Natov SN, Percira BJB, Lau JYN, Hepatitis C virus mixed genotype infection in patient haemodialysis. *Journal of Viral Hepatitis* 2000; 7: 153-60
14. Quer J, Esteban J. *Epidemiology*. In: Thomas HC, Lemon S, Zuckerman AJ(eds). *Viral hepatitis*. Third Edition. Massachusetts, USA: Blackwell Publishing, 2005: 407-25
15. World Health Organization, Geneva. *Weekly Epidemiological Record*. 1997; 72: 341-348
16. Booth JCL, O'Grady J, Neuberger J, Clinical guidelines on the management of hepatitis C. *Gut* 2001;49 (suppl 1):1- 21
17. Ökten A. Hepatit C Virusu İnfeksiyonu: Genel Bakış. İn: Kılıçturgay K, Badur S. *Viral Hepatit* 2001. Deniz Ofset . 2001; 180-81

18. Kölgeliler S, Ertek M, Erol S, Taşyaran M, Erzurum çevresinde Hepatiti C seroprevalansı. *Viral Hepatit dergisi* 2003; 8(3): 166-170
19. Aslan G, Ulukanlıgil M, Seyrek A, Şanlıurfa ilinde HBsAg, Anti-HCV seroprevalansı. *Viral Hepatit Dergisi* 2001; 7(3): 408-10
20. Şencan İ, Şahin İ, Kaya D, Bahtiyar Z, Yeni kurulan bir Tıp Fakültesi hastanesinde sağlık çalışanlarının Hepatit B ve Hepatit C seroprevalansı. *Viral Hepatit Dergisi*, 2003;8(1):47-50
21. Özsoy MF, Emekdaş G, Pahsa A ve ark, Sağlık çalışanlarında Hepatit B ve Hepatit C seroprevalansı. *Viral Hepatit Dergisi* 2000; 6(2): 71-74
22. Kadanalı A, Piroğlu S, Özden K, Hemodiyaliz hastalarında HBsAg, anti-HBs, anti-HBc total, anti-HBc IgM, anti-HCV ve anti-HAV IgG sıklığı. *Viral Hepatit Dergisi* 2004; 9(1): 41-45
23. Şencan İ, Şahin İ, Çatakoğlu N, Üsküdar O, Bahtiyar Z, Yıldırım M, Kronik hemodiyaliz hastalarında hepatit B ve C belirleyicilerinin değerlendirilmesi. *Viral Hepatit Dergisi* 2002; 8 (1-2): 463-66
24. Seyyal R., Bedia D., Ayşegül Y, Gülendam B., Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Rutin Labaratuvarı'nda Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Hepatit C Virus RNA Pozitifliğinin Araştırılması. *Turkish Journal of Infection* 2004; 18(1): 7-10
25. Kökoğlu ÖF, Geyik MF, Uçmak H, Aslan S, Ayaz C, Hoşoğlu S, Diyarbakır ilinde kan donörlerinde HBsAg ve anti-HCV prevelansı. *Viral Hepatit Dergisi* 2003; 8(1): 56-59
26. Bayat N, Dinç E, Akdik İ ve ark., Kan donörlerinde anti-HCV pozitifliği. *Viral Hepatit Dergisi* 1999; 5(1): 54-55
27. Sümer Z, Sümer H, Bakıcı MZ, Koç Z, Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi kan merkezi donör kanlarının HBsAg, anti-HCV, anti-HIV ve sifiliz seropozitifliği yönünden değerlendirilmesi. *Viral Hepatit Dergisi* 2000; 7(2): 330-332
28. Heper Y, Yılmaz E, Akalın H, Töre O, Prevalance of transfusion transmissible infection (TTI) markers in donors over a 6-year period. *Vox Sanguinis* 87(S3): 100, 2004
29. Gülcan EM, Sağlık N, Şiraneci R, Öztürk H, Yalçınar A, Ulucaklı Ö, Hastaneye başvuran ve risk faktörü olmayan asemptomatik adölesanlarda anti-HCV pozitifliği ve erişkin kan donörleri ile karşılaştırılması. *Viral Hepatit Dergisi* 2003 : 8(1): 51-55
30. Trepo C, Des hepatitis non-A, non-B au virus de hepatit C. *Gastroenterol Clin Biol* 1990; 14:51
31. Koff RS, Seeff LB, Distag JL. Transfusion transmitted hepatitis A, B and D. Principles of Transfusion Medicine. Second edition, Baltimore-Philadelphia-London: 1996; 675-86

32. Nishioka K, Epidemiological studies on hepatitis C virus infection: Detection, revalence, exposure and prevention. *Intervirology* 1994; 37, 58-67
33. Ustaçelebi Ş, Hepatit C viusu. *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji* 1999; 880-88
34. Mehta S, Cox A, Hoover D, Protection against persistence of hepatitis C. *Lanset* 2002; 359:1478-83
35. Jigo X, Wang RY-H, Feng Z, Modulation of hepatitis C virus nonstructural protein 3 by catioonic liposome encapsulated RNA immunization. *Hepatology* 2003; 37: 452-461
36. Richter SS, Laboratory assays for diagnosis and management of hepatitis C virus infection. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 4407-4412
37. Kurtz J.B, Boxal E, Qusir N, Shirley J, Coleman D, Chandler C, The diagnostic significance of an assay for 'total' hepatitis C core antigen. *J Virol Meth* 2001; 96: 127-132
38. Icardi G, Ansaldi F, Bruzzone B M, Durando P, Lee S, De Luigi C, Crovari P, Novel Approach To Reduce the Hepatitis C Virus(HCV) Window Period: Clinical Evaluation of a New Enzyme-Linked İmmunosorbent Assay For HCV Core Antigen. *J Clin Microbiol* 2001;(39): 3110-114
39. Peterson J, Green G, Iida K, Caldwell B, Kerrison P, Bernich S, Aoyagi K, Lee SR, Detection of hepatitis C core antigen in the antibody negative "window" phase of hepatitis C infection. *Vox Sanguinis* 2000; 78: 80–85
40. Thomas DL, Lemon SM: Hepatitis C. In : Principles and Practise of Infectious Diseases. Mandell GL, Douglas RG, and Bennett JE. London. Churchill Livingstone: 2000:1736-760
41. Fried MW, Diagnostic testing for hepatitis C: Practical conciderations. *Am J Med* 1999; 107(6B): 31S-35S
42. Lee HH, Allain JP, Genomic screening for blood-borne viruses in transfusion setting. *Vox Sang.* 1998; 74 (suppl 2): 119-123
43. Thio CL, Nolt KR, Astemborski J, Vlahov D, Nelson KE, Thomas DL, Screening for hepatitis C Virus in human immunodeficiency virus- infected individuals. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 575-77
44. Poynard T, Yen MF, Ratziu V, Lai CL, Viral Hepatitis C. *Lanset* 2003; 362: 2095-100
45. Nolte FS, Thurmond C, Fried MW, Preclinical evaluation of Amplicor HCV test for detection of HCV RNA. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 1775-778
46. Centers for Disease Control and Prevention: Guidelines for laboratory testing and result reporting of antibody to hepatitis C virus. *MMWR* 2003; 52(RR-3): 1-16
47. Türkoğlu S, HCV enfeksiyonu(viroloji,seroloji). Kılıçtırgay K, Badur S, ed *Viral Hepatit 2001'de. İstanbul: Deniz ofset, 2000:10-55*

48. Pawlotsky JM, Use and interpretation of virological test for hepatitis C. *Hepatology* 2002; 36: 65-72
49. Pawlotsky JM. Molecular diagnosis of viral hepatitis. *Gastroenterology* 2002; 122: 1554-1568
50. Clemens JM, Tascas S, Chau K, et al, IgM antibody response in acute hepatitis C viral infection. *Blood* 1992; 79: 169-72
51. Simmonds P, Alberty A, Boninho F, A proposed system for nomenclature of genotypes for hepatitis C virus. *Hepatology* 1994; 19: 1321-4
52. Van Der Poel, Noel L, Barbara J, Dodd R, ISBT Working party on transmissible diseases: Report on workshop ' Infectious-disease testing and quality control. *Vox Sang* 1996; 70: 53-60
53. Dodd RY, Notari EP, Stramer SL. Current prevalence and incidence of infectious disease markers and estimated window period risk in the American Red Cross blood donor population. *Transfusion* 2002; 42: 975-9
54. Aberle-Grasse JM, Dodd RY, Stramer SL, Recent trends in seroprevalence and incidence of HIV1/2, HCV and HBV in U.S. allogeneic blood donors. American Association of Blood Banks 53rd Annual Meeting, 2000 Nov 4-8, Washington, DC *Transfusion* 2000; 40 Suppl:3S
55. Van der Poel CL, Cuyper HT, Reesink HW, Hepatitis C virus six years on. *Lancet* 1994; 344: 1475-479
56. Busch MP, Kleinman SH, Jackson B et al, Nucleic acid amplification testing of blood donors for transfusion-transmitted infectious diseases. *Transfusion* 2000; 40: 143-159
57. Rogers PM, Saldanha J, Allain JP, Report of EPHA/NIBSC Workshop 'Nucleic Acid Amplification Test (NAT) for the Detection of Blood-Born Viruses' Held on 31 October 1996 in Amsterdam, The Netherlands. *Vox Sang* 1997; 72: 199-206
58. CL Van der Poel, *Transfus Clin Biol* 2001; 8: 240-241
59. Lefrere JJ, Coste J, Defer C, Screening blood donation for viral genomes: multicenter study of real time simulation using pooled samples model of hepatitis C virus RNA detection. *Transfusion* 1998;38:915-922
60. Mortimer J, Intersecting pools and their potential application in testing donated blood for viral genomes. *Vox Sang* 1997;73:93-97
61. Busch MP, Kleinman SH, Nemo GJ, Current and emerging infectious risks of blood transfusions. *JAMA* 2003; 289: 959-62
62. Park P, Blood Borne Pathogens. 1st Seminar on Infection control practices in East Europe and Middle East. May 25th-June 3rd, 1997;14-17
63. Quer J, Esteban J, *Epidemiology*. In: Thomas HC, Lemon S, Zuckerman AJ(eds). *Viral Hepatitis*. Massachusetts, USA. Third Edition. Blackwell Publishing: 2005: 407-425
64. Di Bisceglie AM, Hepatitis C. *Lancet* 1998; 351: 351-55

65. Dodd RY, Current viral risk of blood and blood product. *Ann Med* 2000; 32: 469-74
66. Regam FAM, Prospective investigation of transfusion transmitted infections in recipient of over 20000 units of blood. *Br Med J* 2000; 320: 403-6
67. Gerlich WH, Caspari G, Hepatitis viruses and safety of blood donations. *S Viral Hep* 1999; (suppl): 6-15
68. Scriber GB, Bush MP, Kleinman SH, et al, The risk of transfusion-transmitted viral infections. The retrovirus epidemiology donor study. *Nengl J Med* 1996; 334: 1685-90
69. Chan K, Blood Supply: FDA oversight and remaining issues of safety. In: U.S. General Accounting Office, 1997
70. Coste J, Reesink HW, Engelfriet CP, Laperche S, Implementation of donor screening for infectious agents transmitted by blood by nucleic acid tecnology: update to 2003. *Vox Sang* 2005; 88: 289-303
71. Garfein RS, Vlahov D, Galai N, Doherty MC, Nelson KE, Viral infections in short-term injection drug users: the prevalence of hepatitis C, hepatitis B, human immunodeficiency, and human T-lymphotropic viruses. *Am J Public Health* 1996; 86(5): 655-661
72. Stramer SL, Viral diagnostics in the arena of blood donor screening. *Vox Sang* 2004 87: S180-S183
73. Bush MP, Young MJ, Samson SM, et al, Risk of human immunodeficiency virus (HIV) transmission before the implementation of HIV-1 antibody screening. The Transfusion Safety Study Group. *Tranfusion* 1991; 31: 4-11
74. NAT? Questions and Answers About Screening the Volunteer Donor Blood Supply with a New Research Test. America's Blood Centers Memoranda
75. Schuttler CG, Caspari G, Jursch CA, Willems WR, Gerlich WH, Schaefer S, Hepatitis C virus transmission by a blood donation negative in nucleic acid amplification tests for viral RNA. *Lancet* 2000; 355: 41-42
76. Stramer SL, Glynn SA, Kleinman SH, Strong DM, Cagliot S, Wright DJ, Dodd RY, Busch MP, Detection of HIV-1 and HCV infections among antibody-negative V5 blood donors by nucleic acid amplification testing. *N Engl J Med* 2004; 351(8): 760-8.
77. Roth WK, Buhr S, Drosten C, et al, NAT and viral safety in blood transfusion. *Vox Sang* 2000; 78: 257-9
78. Cardoso MS, Koerner K, Kubanek B, Mini-pool screening by nucleic acid testing for hepatitis B virus, hepatitis C virus, and HIV: preliminary result. *Tranfusion* 1998; 38: 905-907

79. Schottstedt V, Tuma W, Bunger G, et al, PCR for HBV, HCV and HIV-1 experiences and first results from a routine screening programme in a large blood transfusion service. *Biologicals* 1998; 26: 101-104
80. Koerner K, Cardoso M, Deryler T, et al, Estimated risk of transmission of hepatitis C virus by blood transfusion. *Vox Sang* 1998; 74: 213-6
81. Busch MP, Watanabe KK, Smith JVU, et al, False negative testing errors in routine viral marker screening of blood donors. For the Retrovirus epidemiology donor study. *Transfusion* 2000; 40: 585-9
82. Le Pont F, Costagliola D, Rouzioux C, Valleron AJ, How much would the safety of blood transfusion be improved including p24 antigen in the battery of tests? *Transfusion* 1995; 35: 542-47
83. Pillonel, S Laperche et l'Etablissement Français du sang. Trends in risk transfusion-transmitted viral infections (HIV,HCV,HBV)in France between 1992 and 2003 and impact of nucleic acid testing (NAT). *Eurosurveillance* 2005; 10:1-6
84. Yugi H, Hino S, Satake M, Tadodoro K, Implementation of donor screening for infectious agents transmitted by blood by nucleic acid technology in Japan. *Vox Sang* 2005: 89: 265
85. Japanese Red Cross NAT Screening Research Group, The First Large-Scale Nucleic Acid Amplification Testing(NAT) of Donated Blood Using Multiplex Reagent for Simultaneous Detection of HBV,HCV and HIV-1 and Significance of NAT for HBV. *Microbiol.Immunol* 2001;45(9):667-672
86. Heyns ADP, Swanevelder JP, Leile PN, Crookes RL, Busch MP, The impact of individual donation NAT screening on blood safety-the South African experience. *ISBT Science Series* 2006;1: 203-208
87. McCullough J, Bianco C, Busch MP, et al, Genoma amplification Task force. Preliminary report. *Transfusion* 1998; 38: 903-4
88. Yenen OŞ. Hepatit C virusu. In: Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M(ed), *İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyoloji*. 2. baskı. Nobel Tıp Kitabevleri, Ankara: 2002: 820-835
89. Natov SN, Pereira BJJ, Transmission of viral hepatitis by kidney transplantation: donor evaluation and transplant policies (Part 2: hepatitis C virus). *Transpl Infect Dis* 2002; 4: 124-131
90. Aslanzadeh J, Padilla B B, Shanley J D. Evaluation of PCR and nested PCR for laboratory diagnosis of hepatitis C virus infection. *Mol Cell Probes*. 1996;10:173-178
91. Damen M, Cuypers HT, Zaijer HL, Resink HW, Schaasberg WP, Gerlich WH, Niesters HG, Lelie PN, International collaborative study on the second Eurohep HCV-RNA reference panel. *J Virol Methods* 1996; 58: 175-185
92. Jackson BR, Busch MP, Stramer SL, and AuBuchon JP, The cost-effectiveness of NAT for HIV, HCV and HBV in whole-blood donations. *Transfusion* 2003; 43: 721-29

93. Rouzioux C, Barin F, Cazenave JP, et al, Contribution of Nucleic acid amplification techniques to safety of blood components in France. *Transfusion* 1998; 38: 989-90
94. Van der Poel CL, Nucleic acid testing: the international status of NAT. *Transfus Clin Biol* 2001; 8: 240-41
95. Allain JP, Genomic screening for blood-borne viruses in transfusion settings. *Clinical and Laboratory Haematology* 2000; 22; 1-10
96. Allain JP, Occult hepatitis B infection: implication in transfusion. *Vox Sanguinis* 2002; 86: 83-91

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim sırasında bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım hocalarım sayın Prof Dr Kaya Kılıçturgay'a, Prof Dr Feridun Gökırmak'a, Anabilim Dalı Başkanımız sayın, Prof Dr Safiye Helvacı'ya, her konuda ilgisini ve desteğini gördüğüm, deneyimlerinden yararlandığım, tezimin oluşumu ve yürütülmesinde büyük emeği olan tez danışmanlarım sayın Prof Dr Okan Töre ve sayın Yrd Doç Dr Yasemin Heper'e, tez çalışmam sırasında değerli fikirlerini paylaşan ve yardımlarını esirgemeyen sayın Prof Dr Reşit Mıstık'a, yetişmemde emekleri olan hocalarım sayın Prof Dr Suna Gedikoğlu'na, Prof Dr Güher Göral'a, Prof Dr Beyza Ener'e, Prof Dr Halis Akalın'a, Doç Dr Barbaros Oral'a, Doç Dr Cüneyt Özakın'a, Yrd Doç Dr Emel Yılmaz'a, Yrd Doç Dr Melda Sınırtaş'a, Uzm Dr Oktay Alver'e, Uzm Dr Sevim Akçağlar'a, Uzm Dr Canan Evcı'ye, tez çalışmamın her aşamasında yakın ilgi ve desteğini gördüğüm sayın Binnaz Güngör'e, çalışmamın gerçekleşmesinde malzeme desteği yaparak önemli destekte bulunan Abbott firmasına, birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum asistan arkadaşlarıma ve tüm Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyoloji çalışanlarına teşekkür ederim.

Ayrıca, buraya kadar gelmemde büyük emeği olan aileme, okul yıllarımdan bu yana her zaman sevgisini ve desteğini yanıbaşımnda hissettiğim eşim K.Şükrü Kabaş'a ve varlığıyla hayatımıza renk ve neşe katan biricik oğlum Cem'e teşekkür ederim.

ÖZGEÇMİŞ

08.08.1977 yılında Bandırma'da doğdum. İlkokul öğrenimimi Yenisarıbey Köyü İlkokulu'nda, ortaokul öğrenimimi Ortasarıbey Köyü Ortaokulu'nda, lise öğrenimimi Karacabey Lise'sinde tamamladım. 1994 yılında Ondokuzmayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi'ni kazandım. 2000 yılında Ondokuzmayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi'nden mezun oldum. 02.01.2002 tarihinde Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Anabilimdalı'nda uzmanlık eğitimime başladım. Halen aynı bölümde Araştırma Görevlisi olarak çalışmaktayım. Evliyim ve bir çocuk annesiyim.