

KISA BİLDİRİ:
KAN DONÖRLERİNDE HBsAg, ANTI-HCV VE ANTI-HIV
ARAŞTIRILMASINDA İKİ FARKLI YÖNTEMİN KARŞILAŞTIRILMASI

SHORT COMMUNICATION:
COMPARISON OF TWO DIFFERENT ASSAYS FOR THE INVESTIGATION OF
HBsAg, ANTI-HCV AND ANTI-HIV IN BLOOD DONORS

Esra ÇAVDAR**, *Semra KUŞTİMUR, *Funda DOĞRUMAN AL*****

ÖZET: Kan transfüzyonu ile enfeksiyon etkenlerinin alıcılara bulaşması önemli bir komplikasyondur. Özellikle serokonversiyonun gerçekleşmediği pencere döneminden önce, donörlerdeki enfeksiyonun saptanmasının güçlüğü nedeniyle tarama testlerinin seçimi ve uygulanması büyük önem taşımaktadır. Bu çalışmada 150 gönüllü donörün kan örneğinde anti-HIV 1/2, anti-HCV ve HBsAg araştırılmasında iki farklı yöntemin karşılaştırılması amaçlanmıştır. HBsAg, anti-HCV ve anti-HIV 1/2 kemilüminesans yöntemle çalışılmış, anti HIV ve anti-HCV sırasıyla Western Blot ve Inno-Lia HCV Ab III testleri ile doğrulanmıştır. Ayrıca tüm örneklerde HBsAg ile anti-HCV ve anti-HIV 1/2 antikorları Simul-Tec™ immunassay ile çalışılmış ve sonuçlar kemilüminesans yöntemi ve doğrulama testleriyle karşılaştırılmıştır. Donörlerin %4.7'sinde HBsAg pozitifliği saptanmış, doğrulama testleri sonucunda anti-HCV %2.7, anti-HIV 1/2 %0.7 oranında pozitif olarak tespit edilmiştir. Sonuç olarak Simul-Tec™ immunassay yöntemi kullanılan tarama testleriyle karşılaştırıldığında; HBsAg için her iki yöntem arasındaki sonuçlar uyumlu bulunmasına rağmen anti-HCV ve anti-HIV 1/2 için sonuçlar arasında uyumsuzluk tespit edilmiş olması, bu testin henüz ihtiyaca cevap verecek düzeyde olmadığını göstermiştir.

Anahtar sözcükler: *Kan donörleri, HBsAg, anti-HCV, anti-HIV, tarama testleri.*

ABSTRACT: Acquisition of infectious agents during blood transfusions is an important complication. The choice of screening tests is of crucial importance since it is difficult to detect the markers of the infection in blood donors, especially before the window period when seroconversion has not taken place. In this study the blood samples of 150 volunteer donors were screened for anti-HIV 1/2, anti-HCV, and HBsAg by chemiluminescence method. Samples found to be positive for anti-HIV 1/2 and anti-HCV were confirmed by Western Blot and Inno-Lia HCV Ab III tests, respectively. HBsAg, anti-HCV and anti-HIV 1/2 antibodies were also investigated by the Simul-Tec™ immunoassay in all of the samples, and the results were compared. As a result, 4.7% of the donors were positive for HBsAg and confirmatory tests showed that the positivity rate was 2.7% for anti-HCV, 0.7% for

* Kızılay Derneği Ankara Kan Merkezi, Ankara.

** Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

anti-HIV 1/ 2. Although the results obtained with the Simul-Tec™ immunoassay were similar to the screening test results obtained for HBsAg, discrepant results were obtained for anti-HCV and anti-HIV 1/ 2. The results of this study indicated that Simul-Tec™ immunassay method is not yet ready to meet the demands in terms of anti-HCV and anti-HIV detection.

Key words: Blood donors, HBsAg, anti-HCV, anti-HIV, screening tests.

GİRİŞ

Transfüzyon yolu ile bulaş riski olduğu düşünülen viral etkenlerin taranmasına yönelik serolojik testlerin büyük çoğunluğu, antijen aramak yerine antikor tespitine dayanmaktadır. Donör tarama testlerindeki duyarlılığı artırmak için, pencere dönemini mümkün olan en kısa süreye indirmek ve antikor negatif süreçten antikor pozitif sürece geçişi gösteren serokonversiyonu mümkün olan en kısa sürede tesbit etmek amacıyla araştırmalar yapılmaktadır¹. Düzenli kan bağışında bulunan gönüllü kan vericileri enfeksiyon geçişi açısından düşük risk grubundadır. Dünya Sağlık Örgütü'nün güvenli kan sağlanması konusundaki önerilerinin başında düzenli olarak kan bağışında bulunan gönüllü olan vericilerin desteklenmesi gelmektedir². Bu çalışmada, kan vericilerinde HBsAg, anti-HCV ve anti-HIV 1/2 belirlenmesinde yeni bir test sisteminin (Simul-Tec™ Immunassay) mevcut yöntemler ile karşılaştırılması ve sonuçların değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmaya, Türkiye Kızılay Derneği Ankara Kan Merkezine bağışlanan kanlardan rastgele 150 kişiye ait kan örneği alındı. Test çalışmaları için serumlar -20°C'de saklandı. Serum örneklerinde HBsAg, anti-HIV 1/2 (Access, Sanofi-Pasteur), anti-HCV (AxSYM, Abbott) kemilüminesans ve Simul-Tec™ immunassay yöntemiyle çalışıldı. Anti-HIV 1/2 ve anti-HCV pozitif serumlarda sırasıyla Western blot (WB) (New Lav Blot I ve Blot II, Sanofi Pasteur) ve 3.kuşak ELISA testi (Inno-Lia HCV Ab III, Line immunoassay) kullanılarak doğrulama yapıldı.

WB yönteminde üretici firmanın önerisine göre; en az 2 "env" bandı varsa (gag ve pol bandı ile birlikte veya değil) pozitif, bant yok veya yalnız p17 bandı varsa negatif, diğer tüm bantlar belirsiz ise şüpheli olarak değerlendirildi. HCV doğrulama yönteminde ise, kullanılan tüm antijenlere karşı (kor, E2, NS3, NS4A, NS5A) örnekte antikor yokluğunda bantların saptanmaması negatif, bir antijen bandında 2+ veya daha fazla yoğunluk ya da en az iki antijen bandında minimum 1+ veya daha fazla yoğunluk olması pozitif olarak yorumlandı.

BULGULAR

Kemilüminesans yöntemi ile 150 kan örneğinin 7'si (%4.7) HBsAg pozitif olarak saptanmış, Simul-Tec™ immunassay yönteminde de aynı oranda pozitif sonuç alınmıştır. İstatistiksel analizde bu iki yöntem arasındaki uyumun tam olduğu belirlenmiştir (kappa değeri: 1).

Kemilüminesans yöntemi ile 22 (%14.7) donörde anti-HCV pozitifliği saptanmış, bunların 4'ü (%2.7) Inno-Lia HCV Ab III doğrulama testi ile pozitif, 9'u (%6) şüpheli ve 9'u (%6) da negatif olarak tespit edilmiştir. Bu durumda gerçek HCV pozitifliğinin

%2.7, yalancı pozitiflik oranının ise %12 olduğu düşünülmüştür. Aynı örneklerde Simul-Tec™ immunassay ile HCV'nun NS3, NS4 ve kor bölgelerine karşı antikorlar taranmış ve bir örnekte NS4, 2 örnekte de kor antikorları saptanmıştır. Ancak bu örnekler kemilüminesans yöntemiyle negatif olarak tespit edilmiştir. Kemilüminesans yöntemi doğrulama testi (Inno-Lia HCV Ab III) ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak tutarlılığın zayıf olduğu belirlenmiştir. Simul-Tec immunassay yönteminin anti-HCV antikorunu saptama açısından kemilüminesans (kappa değeri: - 0.036) ve Inno-Lia HCV Ab III (kappa değeri: - 0.023) yöntemleriyle uyumsuz olduğu görülmüştür.

Kemilüminesans yöntemi ile 150 kan örneğinin 19'unda (%12.7) anti-HIV 1/2 antikorları pozitif olarak saptanmıştır. Bu örneklerden birisi (%0.7) WB doğrulama testinde de pozitif sonuç vermiş, 8'inden (%5.3) şüpheli, 10'undan ise (%6.7) negatif sonuç alınmıştır. Şüpheli sonuç alınan donörler üçer ay aralıklarla altı ay boyunca takibe alınmış ve yeni alınan kan örnekleri çalışıldığında negatif bulunmuştur. Tarama testi ile WB doğrulama testi karşılaştırıldığında iki test arasında uyumsuzluk olduğu belirlenmiştir (kapa değeri: 0.084). Simul-Tec immunassay testi ile örneklerde HIV p24, HIV I gp41 ve HIV II gp36 bantlarına karşı antikorlar araştırıldığında, WB yöntemiyle pozitif bulunan bir kan örneği negatif olarak saptanmıştır. Buna karşın kemilüminesans yöntemiyle negatif olan dört örnek HIV-1 gp41 pozitif bulunurken, yine kemilüminesans yönteminde negatif sonuç veren bir örnek bu yöntemle HIV p24, HIV-1 gp41 ve HIV-2 gp36 pozitif sonuç vermiştir. Simul-Tec immunassay testi ile WB (kappa değeri: -0.011) ve kemilüminesans yöntemleri (kappa değeri: -0.056) arasında istatistiksel olarak uyumsuzluk saptanmıştır.

TARTIŞMA

Ülkemizde yasal olarak kan donörlerinde HBsAg ile anti-HCV ve anti-HIV antikorlarını taramaya yönelik testlerinin yapılması zorunludur³. Günümüzde bu taramalar, üçüncü kuşak testler olarak adlandırılan ELISA, rekombinant immunoblot testleri (RIBA), radioimmunoassay (RIA) ve ters pasif hemagglütinasyon (RPHA) testleriyle yapılmaktadır. Bu testlerde 10 pg/ml (ya da 10⁶ partikül) yoğunluklardaki HBsAg gösterilebilmektedir. Düşük düzeydeki HBsAg yoğunluklarının saptanmaması kan bankacılığı açısından bir sorun oluşturmaktadır⁴. HBsAg testlerinde yalancı pozitifliklere %0.2-0.3 oranında rastlanılmaktadır⁵. Çalışmamızda toplanan 150 kan örneğinde HBsAg pozitifliği %4.7 olarak saptanmıştır. Kan Merkezleri Transfüzyon Derneği (KMTD)'nin 29 merkezde yaptığı 5 yıllık (1995-1999) araştırmaya göre, HBsAg pozitifliği %4.3 olarak tespit edilmiştir⁶. Bizim sonuçlarımızın bu çalışma ile uyumlu olduğu saptanmıştır. 1986-2000 yılları arasında ülkemizdeki farklı kan merkezlerinde yapılan çalışmalarda ise HBsAg oranı %5.2 olarak bildirilmiştir. Kızılay Kan Merkezleri'nin 1985-1998 yılları arasındaki donör tarama verilerine göre ise bu oran %5.1 olarak belirtilmektedir⁷.

Kan bankalarında anti-HCV taramaları 2. ve 3. kuşak ELISA ve RIBA testleri ile yapılmaktadır. İkinci kuşak testler, birinci kuşak testlerde bulunan ve genomun yapısal olmayan bir bölgesinden (NS4) türetilmiş rekombinant proteinlere ek olarak, kor (core) bölgesinden türetilmiş bir rekombinant antijen (c22) ile NS3 bölgesinden türetilmiş antijen (c33c veya c200) içermektedir. Üçüncü kuşak testlerde ise NS5 bölgesinden türetilen bir rekombinant antijen teste eklenmiştir⁸. Üçüncü kuşak anti-

HCV testlerinin, ikinci kuşak testlere göre özgüllük ve duyarlılığının daha yüksek olduğu, HCV enfeksiyonunu ortalama 10 gün kadar önce belirlediği ve taramalarda ek pozitiflikleri saptayabildiği gösterilmiştir⁹. Ülkemizde donör kanlarında hepatit C seroprevalansı %0.3-1.9 arasında değişmektedir. Bu verilere göre anti-HCV pozitifliği 1996-1998 yılları arasında artmış, 1998-1999 yılları arasında azalmıştır^{6,7}. Çalışmamızda anti-HCV pozitifliği %2.7 olarak belirlenmiştir. Sonuçlarımız diğer çalışmaların verilerine göre daha yüksek saptanmış ve kan donörlerinde anti-HCV saptanmasında, Simul-Tec immunassay ile kemilüminesans yöntem arasında uyumluluk tespit edilmemiştir.

Günümüzde kullanılan üçüncü kuşak ELISA testlerinde HIV-1 ve -2 birlikte taranmaktadır. Çift antijen sandviç yöntemine dayalı bu testlerle, sadece IgG sınıfından antikorları saptayan ikinci kuşak testlerin aksine hem IgM hem de IgG sınıfından antikorlar belirlenmektedir. Taramalara p24 antijeninin saptanmasını sağlayan testlerin de katılmasının güvenliği artıracağına yönelik çalışmalar üzerine, HIV antijen ve antikorunun birlikte gösterilmelerini sağlayan dördüncü kuşak tarama testleri geliştirilmiştir¹⁰. Sentetik peptid antijenleri içeren immunoblot testleri yeni doğrulama yöntemleri olarak geliştirilmektedir¹¹. Havuzlama yöntemi uygulanan Avrupa ülkelerinde, HIV-RNA taraması ile antijen testlerinden altı, antikor testlerinden ise 10-12 gün önce enfektivitenin saptanması mümkün olabilmektedir. HIV'e karşı oluşan antikorlar ortalama 6-8 haftada gösterilebilirler. Pencere dönemi denilen bu dönem daha kısa ya da haftalarca uzun olabilir. Ülkemizde Kızılay Kan Merkezleri ile KMTD'nin yaptığı çalışmalarda, donörlerde anti-HIV 1/2 pozitifliği sırasıyla ortalama %0.25 ve %0.2 olarak belirlenmiştir⁶. HIV enfeksiyonu sırasında p24 antijeni, antikordan daha önce kanda saptanabildiğinden bazı ülkelerde banka kanlarının güvenliğinin artırılmasında bu antijenin taranmasına başlanmıştır¹². Bizim çalışmamızda HIV antikor pozitifliği %0.7 olarak belirlenmiş olup, bu oran ülkemizde yapılan çalışmalarda elde edilen pozitiflikten (%0.2) daha yüksektir⁶.

Ülkemizde 2000 yılından sonra kan bağıışı sırasında yapılan testlerden elde edilen verilere yönelik çalışmalar incelendiğinde, HBsAg %0.9-2.5, anti-HCV %0.2-0.5 ve anti-HIV %0.0-0.02 oranında pozitiflik olduğu izlenmektedir¹³⁻¹⁷.

Sonuç olarak, Simul-Tec immunassay yönteminin rutin uygulamada kullanılan tarama testleriyle karşılaştırıldığı çalışmamızda, HBsAg için her iki yöntemin tam uyum gösterdiği, ancak anti-HCV ve anti-HIV 1/2 testleri için sonuçlar arasında uyumsuzluk olduğu tespit edilmiş, bu testin henüz uygulamada kullanılacak düzeyde olmadığı düşünülmüş ve kemilüminesans yöntemleriyle yapılan anti-HCV ve anti-HIV tarama testlerinin sonuçlarının doğrulama yapıldıktan sonra bildirilmesi gerektiği kanısına varılmıştır.

KAYNAKLAR

1. Busch MP, Kleinman SH, Jackson B, Stramer SL, Hewlett I, Preston S. Committee Report. Nucleic acid amplification testing of blood donors for transfusion-transmitted infectious diseases: Report of the Interorganizational Task Force on Nucleic Acid Amplification Testing of Blood Donors. Transfusion 2000; 40: 143-59.
2. World Health Organization (WHO). Proposal for Establishment of World Blood Donor Day. Fifty-eighth World Health Assembly, 2005. Document no: A58/38.

3. Heper Y. Kullanılan donör tarama testleri standartlar. 1.Ulusal Kan Merkezleri ve Transfüzyon Tıbbi Kongresi. Kapadokya, 2000. Kongre Kitabı, s:137-9.
4. Gandhi MJ, Yang GG, McMahon BJ, Vyas GN. Hepatitis B virions isolated with antibodies to the pre-S1 domain reveal occult viremia by PCR in Alaska native HBV carriers who have seroconverted. *Transfusion* 2000; 40: 910-6.
5. Ratnam S, Stead F, Head CB. False positive results with third generation monoclonal hepatitis B surface antigen enzyme immunoassay. *J Clin Microbiol* 1989; 27: 2102-4.
6. Altunay H, KMTD Çalışma Grubu. Türkiye'de Kan Merkezlerinde 1995-1999 yılları arasında HBsAg, anti-HCV, anti-HIV ve VDRL seroprevalansı. 1. Ulusal Kan Merkezleri ve Transfüzyon Tıbbi Kongresi. Kapadokya, 2000. Kongre Kitabı, s: 276, Poster no: 8.
7. Mistik R, İ Balık. Türkiye'de viral hepatitlerin epidemiyolojik analizi, s: 10-55. Kılıçturgay K, Badur S (ed), *Viral Hepatit* 2001, 1.baskı. Viral Hepatitle Savaşım Derneği, İstanbul.
8. Dow BC. Microbiology confirmatory tests for blood donors. *Blood Rev* 1999; 13: 91-104.
9. Kiely P, Kay D, Parker S, Piscitelli L. The significance of third generation HCV RIBA-indeterminate, RNA-negative results in voluntary blood donors screened with sequential third-generation immunoassays. *Transfusion* 2004; 44: 349-58.
10. Weber B, Fall EH, Berger A, Doerr HW. Reduction of diagnostic window by new fourth-generation human immunodeficiency virus screening assays. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 2235-9.
11. Zaaijer HL, van Rixel GA, Kromosoeto JN, Balgobind-Ramdas DR, Cuypers HT, Lelie PN. Validation of a new immunoblot assay (Lia Tek HIV III) for confirmation of human immunodeficiency virus infection. *Transfusion* 1998; 38: 776-81.
12. Sarkodie F, Adarkwa, Adu-Sarkodie Y, Candotti D, Acheampong JW, Allain JP. Screening for viral markers in volunteer and replacement blood donors in West Africa. *Vox Sang* 2001; 80: 142-7.
13. Ocak S, Duran N, Savaş L, Önlen Y, Dibek MA. Hatay bölgesindeki kan donörlerinde HBV, HCV, HIV ve VDRL seropozitifliği. *Viral Hepatit Dergisi* 2005; 10: 49-53.
14. Turunç T, Sezgin N, Uncu H, Demiroğlu YZ, Arslan H. Kan donörlerinde hepatit B ve hepatit C seroprevalansı. *Viral Hepatit Dergisi* 2003; 8: 171-3.
15. Mutlu B, Meriç M, Willke A. Kan donörlerinde hepatit B ve C virusu, insan immün yetmezlik virusu ve sifiliz seroprevalansı. *Mikrobiyol Bül* 2004; 38: 445-8.
16. Yazan Sertöz R, Pullukçu H, Altuğlu İ, Karadoğan A, Aydınok Y. Sık kan bağışlayan kan vericilerinde infeksiyon göstergeleri. *İnfeks Derg* 2003; 17: 77-9.
17. Oldacay M, Oldacay S, Erdem G. Çanakkale Devlet Hastanesi kan vericilerinde hepatit B virusu, hepatit C virusu, insan immün yetmezlik virusu ve sifiliz seropozitifliğinin değerlendirilmesi. *İnfeks Derg* 2004; 18: 11-15.