

KAN BANKACILIĞINDA HAVUZ YÖNTEMİYLE HCV RNA PCR TARAMA TESTİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

R. Yazan Sertöz, S. Erensoy, S. Göksel, N. Özkalay, A. Bilgiç

ÖZET

Çalışmada kan bankalarında güvenli kan ve kan ürünleri üretimi ve nükleik asit testlerinin uygunluğu ve güvenliği araştırılmıştır. Birinci grupta 192 plazma örneğinden 24'lü gruplar halinde sekiz primer havuz hazırlandı. Havuzlardan ikisine birer, birine iki kopya sayısı bilinen hepatit C virus (HCV) RNA olumlu plazma örneği eklendi. İkinci grupta kan donörü sorgulanmasından geçmiş 384 kişinin plazma örneğinden havuzlar hazırlandı. Cobas Ampliscreen HCV Test v 2.0 (Amplicor, Roche Diagnostics, Branchburg NJ, ABD) ile HCV RNA araştırıldı. Birinci grupta üç havuzda pozitiflik saptandı. HCV RNA antikor tarama testi negatif olan ikinci grupta ise pozitif saptanmadı. Bu grupta anti-HCV pozitif örnek de bulunmadı. HCV RNA tarama testi ile havuz yöntemi arasında %100 uyum bulundu. Antijen antikor düzeyi saptanabilir düzeyin altında olan donörlerin yakalanabilmesi için önerilen havuz yöntemiyle nükleik asit testlerinin (NAT) uygulanabilir olduğu ancak özel ekip ve alt yapıya gereksinim olduğu sonucuna varıldı.

Anahtar Kelime: Kan bankacılığı, HCV RNA, NAT

SUMMARY

In this study. It is investigated whether using NAT is safe for routine use in blood banks. In the first group eight primer pools have been prepared with 192 plasma specimens. Two HCV RNA positive plasma specimens (known copy number) have been added to two different pools and two positive plasma specimens have been added to one pool. 384 blood donors which filled out the questionnaire were included in the second group. HCV RNA was detected with Cobas Ampliscreen HCV Test v2.0 (Amplicor, Roch Diagnostics, Branchburg NJ, USA). Pooling results were consistent consistent with HCV RNA tests. NAT can be applied to blood banks but special equipment is needed.

Giriş

Kan bankalarının başlıca görevi güvenli kan ürünü sağlamaktır. Kan yoluyla bulaşan infeksiyon etkenleri arasında hepatit virüsleri başta gelir.

HCV'nin 1989 yılında klonlanarak tanımlanmasından sonra posttransfüzyon non-A, non-B (NANB) hepatitlerin %90'ından sorumlu olduğu ortaya çıkmıştır. Kan Merkezlerine HCV infeksiyonu 1990 yılından itibaren anti-HCV tarama testleri ile araştırılmaya başlamıştır. Türkiye'de ise anti-HCV taraması 1996'da zorunlu kılınmıştır. Transfüzyona bağlı hepatit C Virüs (HCV) riski azalmasına rağmen halen önemli bir problemdir. Tüm taramalara rağmen Schreiber ve arkadaşları transfüzyona bağlı HCV geçişinin 103.000 ünite kanda bir olduğunu bildirmişlerdir (1). Bunun başlıca nedenleri; serokonversiyon öncesi dönem (pencere dönemi), viral mutandlar, atipik profil ve laboratuvar hatalarıdır. Tüm bu nedenler arasında serokonversiyon öncesi dönem en önemli risk faktörünü oluşturmaktadır (2). Virüs vücuda girdikten sonra antikor oluşturana kadar geçen süreye serokonversiyon öncesi dönem denir. HCV, uzun ve sessiz bir viremik dönem geçirir. Bu dönemde antikor yokluğunun yanısıra serum alanın aminotransferaz (ALT) düzeyi de normal olabilir. Virüs sayısının hızla ikiye katlanması nedeniyle RNA nükleik asit testi (NAT) hızla pozitifleşir (3). Antijen ve antikor konsantrasyonu saptanabilir düzeyin altına olan, serum ALT değeri normal asemptomatik infekte donörlerin tanımlanabilmesi için vi-

ral genomu çoğalttıktan sonra saptayabilen nükleik asit testlerinin kan bankacılığında kullanımı gündeme gelmiştir (4).

Maliyet ve iş gücünü azaltmak için havuzlanmış serum örneklerinde testleri uygulayan sistemler geliştirilmiştir. Duyarlılık ve özgüllüğü optimize etmek amacıyla standart yöntem araştırılmaktadır; bu amaçla ticari kitler de geliştirilmiştir.

Bu çalışmada da havuz yöntemiyle HCV RNA tarama testinin kan bankacılığında kullanım uygunluğu ve güvenilirliği araştırılmıştır.

Gereç ve Yöntem

Çalışma kapsamında iki grup hedeflendi.

Birinci grupta HCV RNA testi (Amplicor, Roche Diagnostics, Branchburg NJ, ABD) çalışılmış 192 plazma örneğinden 24'lü gruplar halinde sekiz primer havuz hazırlandı. Havuzlardan ikisine birer, birine iki HCV RNA olumlu, kopya sayısı bilinen plazma örneği eklendi. Pozitif örneklerin mililitrede HCV RNA kopya sayısı sırasıyla; 80.000, 17.000, 161.000 ve birinde 500.000'inin üzerinde idi.

Havuzları hazırlayan kişiye örnekler kör olarak verildi.

İkinci grupta kan donörü sorgulamasından geçmiş 384 kişinin

plazma örneğinden aynı şekilde havuzlar hazırlandı. Cobas Ampliscreen HCV Test, version 2.0 (Amplacor, Roche Diagnostics, Branchburg NJ, ABD) ile HCV RNA araştırıldı. Olumlu bulunan havuzlar önce altılı gruplar, ardından birer birer olmak üzere çalışıldı.

Havuzların Hazırlanması

Primer Havuzun Hazırlanması

Toplanan plazma örnekleri 12 sıralı sekiz sütunlu olacak şekilde bir spora yerleştirildi. Spor, ikişer sütunlu olmak üzere dörde bölündü. Her bir çeyrekteki iki örnek, 175'er µl olmak üzere ara sporda bir tüpte birleştirildi. A-B sütunundaki örnekler ara spordaki A sütununda toplanmış oldu. Aynı işlem diğer üç çeyreğe de uygulandı. Böylece dört sütunlu 12 sıralı ikişer plazma içeren 48 tane kuyucuk oluşturuldu (intermediate: ara spor).

Ara spordaki A sütununda bulunan 12 kuyucuktan 83.5'şer µl alınarak 1.5 ml'lik üç ayrı mikrosantrifüj tüpüne kondu. Ara spordaki B, C, D sütunları için de aynı işlem uygulandı. Böylece 96 donörden oluşan ikişer yedekli dört primer havuz oluşturuldu (Tablo.1).

Sekonder Havuzun Hazırlanması

Ana spordaki altı ardışık plazma örneğinden 167'şer µl alınarak başka bir sporda bir tüpte birleştirildi.

Böylece herbirinde altışar plazma örneği bulunan 16 sekonder havuz hazırlandı. Her tüpten birer de yedek bulunduruldu. (Tablo.2)

Internal kontrol

Inhibitör varlığını araştırmak için kit içinde sağlanan internal kontrol her havuza nükleik asit ekstraksiyonu öncesinde eklendi.

Örnek Hazırlama

Havuzlar hazırlandıktan sonra üretici firmanın önerdiği şekilde viral nükleik asit izolasyonu yapıldı. Bunun için kaotropik ajan içeren parçalanma solüsyonu kullanıldı, nükleik asitler alkol ile presipite edildi ve ardından süspansiyon hazırlandı.

Revers Transkripsiyon, amplifikasyon, hidridizasyon ve saptama işlemleri Cobas Ampliscreen HCV Test, v2.0 sisteminde otomatik olarak gerçekleştirildi.

Testin prensibi

Cobas Ampliscreen HCV Test, v2.0 testinde 5' kodlanmayan bölgeye (5'NCR) özgü KY80 ve biotinle işaretli KY78 primerleri kullanılarak komplementer DNA çoğaltılmaktadır.

PCR amplifikasyonun ardından HCV'ye özgü oligonükleotid prob (KY150) ile kaplı manyetik partiküller üzerinde hibridizasyon gerçekleşmektedir. Hibridizasyonun ardından 'avidin horse radish' peroksidaz konjugat ve ardından TMB substratın eklenmesiyle oluşan reaksiyon sonucu renk oluşum absorbans 660nm'de değerlendirilmektedir.

Tablo 1. Primer havuz oluşumu

Ana spor		Ara spor				Primer havuz		
	A	B	C	D	E	F	G	H
12	◆	◆						
11	σ	σ						
10	●	●						
9	●	■						
8								
7								
6								
5								
6								
4								
3								
2								
1								

Tablo 2. Sekonder havuz oluşumu

Ana spor		Sekonder havuz						
	A	B	C	D	E	F	G	H
12	◆							
11	◆							
10	◆							
9	◆							
8	◆							
7	◆							
6								
5								
6								
4								
3								
2								
1								

Sonuç

Birinci grupta üç havuzda pozitiflik bulundu. Bunların açılımı ile iki havuzda birer, bir havuzda iki plazma örneğinde pozitiflik saptandı. Böylece pozitif olarak eklenen tüm kontrollerin saptandığı görüldü. Anti-HCV tarama testi negatif olan ikinci grup örneklerin hiçbirinde pozitiflik saptanmadı.

İnternal kontrollerin çalışılması sonucunda hiçbir örnekte PCR inhibitörü bulunmadı. Bu sonuçlara göre HCV RNA tarama testi ile havuz yöntemi arasında %100 uyum bulundu.

Tartışma

Serolojik yöntemlerin HCV enfeksiyonunu saptamada farklılıklar göstermesi ve problemlerin yaşanması nedeniyle kan donörlerinde HCV RNA taramasının gerçekleştirilmesi pencere dönemini daraltarak HCV bulaşma riskini azaltmaktadır. Alta aya kadar uzayabilen serokonversiyon dönemi, günümüzde kan bankalarında kullanılmakta olan 2. jenerasyon testlerle 82 güne, 3. jenerasyon testlerle 70 güne kadar kısalmıştır. HCV-NAT'ın uygulanmasıyla pencere dönemi, 3-jenerasyon kitlelere göre 59 gün kısaltarak 11 güne kadar inmektedir(5)

Avrupa'da idari ve denetleyici kuruluşlar (EMA-European Agency for the Evaluation of Medicinal Products) 1 Ocak 1999 tarihinden itibaren plazmadan elde edilen ürünlere HCV-NAT testinin negatif olma koşulunu getirmiştir. Plazma üreticileri enfeksiyon yönünden yaptıkları takip sonuçlarına göre HCV bulaşma riskini, bu testlerin kullanımı ile sifıra yaklaştırdıklarını öne sürmektedirler (6,7). Son yıllarda kan bankacılığı için birçok ülkede çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Cardosa ve ark. 3.311.783 donörde yaptıkları çalışmada büyük kan merkezlerinde NAT'ın rutin kullanıma uygun olduğu sonucuna varmışlardır (8). Lefrere ve ark. da kullanıma girmeden önce laboratuvar teknik personelinin iyi bir eğitiminden geçmesinin önemli bir basamak olduğunu vurgulamışlardır. Alman Kızılhaç 1 Nisan 1999 tarihinden itibaren HCV için NAT uygulamaktadır.

Araştırılan virüsün titresi ve dilüsyon katsayısı güvenilirliği belirlirler. HCV gibi yüksek titreye sahip virüsler için havuz yöntemi uygulanabilir bir yöntem olarak belirtilmektedir. Dünya Sağlık Örgütü'nün HCV standardı 100 IU/ml'dir.

Günümüzde kullanılan teknolojilerin etkinliği, havuzdaki ör-

nek sayısı, viral yük, testin duyarlılığı gibi birçok faktörden etkilenmektedir (10). Kullanılan yöntemle göre bir havuzdaki örnek sayısı değişmektedir.

Plazma havuzlarında HCV RNA tarama testi güvenilir bir testtir. Ancak özel bir altyapı ve deneyimli personel gerektirir. Havuzların hazırlanma basamağı kritiktir; rutin kullanım için bu basamakta da otomasyon şarttır.

KAYNAKLAR

1. Schreiber GB, Bush MP, Kleinman SH, Kleinman SH, Korelitz JJ. The risk of transfusion-transmitted viral infections. The Retrovirus Epidemiology Donor Study. *N Engl J Med.* 1996 Jun 27; 334(26): 1685-90.
2. Busch MP, Kleinman SH: Nucleic acid amplification testing and disease transmission in Nucleic acid amplification testing of blood donors for transfusion-transmitted infectious diseases. *Transfusion*, 2000; 40: 2; 143-168.
3. Stramer SI, Porter RA, Brodsky JD, et al. Sensitivity of HIV and HCV RNA detection by pooled genome amplification testing (GAT) abstract. *Transfusion* 1998; 38 (Suppl.): 70s.
4. Roth WK, Buhr S, Drosten C, Seifried E. NAT and viral safety in blood transfusion. *Vox Sang* 2000; 78: 2: 257-259.
5. Otağ F: Destekleyici Testler ve Moleküler Tanı Yöntemleri. I. Ulusal Kan Merkezleri Ve Transfüzyon Tıbbı Kongresi, Kongre Kitabı (24-29 Eylül 2000, Kapadokya); 131-135.
6. Seitz R, Burger R, Science, lawyers, and "the Europeans' testing requirements in transfusion medicine. *Transfusion* 1998; 38: 506.
7. Burnouf T, Radosevich M. Reducing the risk of infection from plasma products: specific preventative strategies. *Blood Rev* 2000; 14 (2): 94-110.
8. Cardosa MS, Koerner K, Kubanek B: Mini-pool screening by nucleic acid for hepatitis B virus, hepatitis C virus, and HIV: preliminary results. *Transfusion* 1998; 38; 905-907.
9. Lefrere LJ, Coste J, Defer C, et al. Screening blood donations for viral genomes: multicenter study of real time simulation using pooled samples on the model of hepatitis C virus RNA detection: *Transfusion* 1998; 38; 915-923.
10. Roth WK, Weber M, Seifried E. Feasibility and efficacy of routine PCR screening of blood donations for hepatitis C virus, hepatitis B virus, and HIV-1 in blood-bank setting. *Lancet* 1999; 353: 359-363.