

Kan Bankacılığında İyi Laboratuvar Uygulamalarına Temel Oluşturmak Üzere Kan Bağışçılarında Hepatit B Tarama Testleri İçin Kalite Kontrol Serumlarının Geliştirilmesi

Development of Quality Control Sera for Hepatitis B Screening in Blood Donors for the Establishment of Good Laboratory Practices

Fahri Yüce Ayhan^{*✉}, Memnune Selda Erensoy^{**✉}, Rüçhan Sertöz^{**✉}

* Sağlık Bilimleri Üniversitesi Dr. Behçet Uz Çocuk Hastalıkları ve Cerrahisi Eğitim ve Araştırma Hastanesi, İzmir, Türkiye

** Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye

Atf/Cite as: Ayhan FY, Erensoy MS, Sertöz R. Kan bankacılığında iyi laboratuvar uygulamalarına temel oluşturmak üzere kan bağışçılarında hepatit B tarama testleri için kalite kontrol serumlarının geliştirilmesi. Turk Mikrobiyol Cemiy Derg. 2022;52(1):63-72.

Öz

Amaç: Kan bağışçılarının transfüzyonla bulaşan enfeksiyonların mikrobiyolojik taraması güvenli kan temini açısından önemli ve gereklidir. Bu çalışmada, zorunlu tarama testlerinde HbsAg reaktivitesi gösteren bağışçı kanlarından internal kalite kontrol (İKK) serumlarının hazırlanması amaçlandı.

Yöntem: Bu amaçla Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Kan Merkezi'ne kan bağışında bulunmuş ve zorunlu tarama testlerinde saptanan HbsAg reaktivitesi nedeniyle karantinaya alınmış kanlardan plazmaları ayrıldı ve -70°C'de saklandı. HbsAg S/CO değeri yüksek (>1000) ve saptanabilir (>50 IU/ml) HBV DNA kantitasyonu bulunan plazmalar internal kalite kontrol örneği hazırlamak üzere havuzlanarak birleştirildi. Kalsiyum klorür ve trombin ile koagulasyonu sağlanan plazmadan elde edilen serum, dekstran sülfat ile muamele edildi ve bir dizi santrifügasyon işlemi uygulanarak lipid presipitasyonu sağlandı. Serum havuzundan alınan örnekler farklı sulandırım oranlarında fosfat tamponlu serum fizyolojik ile sulandırıldı. Farklı sulandırım oranları HbsAg reaktivitesi yönünden test edilerek S/CO oranlarına göre düşük reaktif, orta reaktif ve yüksek reaktif olarak üç farklı seri internal kontrol serumu kriyotüplere dağıtıldı ve donduruldu. Dondurulan İKK serumlarından farklı günlerde her seriden birer kriyotüp çözülürerek HbsAg yönünden test edildi. Bulunan S/CO değerleri Levey-Jennings grafiğine işlendi ve Westgard kurallarına göre değerlendirildi.

Bulgular: Yüksek, orta ve düşük reaktif İKK serumlarının S/CO değerlerinin istatistik analizinde ortalama sırasıyla 3323.75, 1725.57 ve 219.57 bulunurken, ortanca sırasıyla 3401.76, 1753.48 ve 217.34; standart sapma ise sırasıyla 14.93, 210.62 ve 271.19 olarak belirlendi. Değişim katsayıları ise yüksek reaktif İKK serumlarında %8.1, orta reaktif İKK serumlarında %12.2 ve düşük reaktif İKK serumlarında %7.6 olarak belirlendi.

Sonuç: ISO15189 kapsamında laboratuvarların bağımsız İKK örnekleri ile çalışması teşvik edilmektedir. Kan bağışçılarında toplanan kanlardan İKK örneklerinin hazırlanması uygun bir çözüm olarak gözükmektedir.

Anahtar kelimeler: HbsAg, kan bağışçısı, internal kalite kontrol

ABSTRACT

Objective: Microbiological screening of blood donors for agents of transfusion transmitted infections is important and necessary for ensuring the transfusion safety. The aim of this study was to prepare internal quality control (IQC) sera for HbsAg screening of blood donors by using the human plasma collected from blood donors with detectable HbsAg levels.

Methods: Quarantined fresh plasmas separated from the whole blood samples of donors with repeatedly reactive screening tests for HbsAg with high S/CO ratio (>1000) and detectable (>50IU/ml) HBV DNA were used for the preparation of IQC sera. In vitro coagulation of pooled plasma was performed by using calcium chloride and bovine thrombin. Following the removal of coagulum, dextrane sulphate was added and precipitation of lipids was carried out in a series of centrifugation processes. Samples from the sera pool were diluted with PBS and diluted samples were tested for HbsAg reactivity. Recorded S/CO ratio of IQC samples from each category was applied to Levey-Jennings control charts and evaluated according to Westgard rules.

Results: In descriptive analysis of high, medium and low reactive IQC samples the mean was found to be 3323.75, 1725.57 and 219.57; the median was determined as 3401.76, 1753.48 and 217.34; the standard deviation was calculated as 271.19, 210.62 and 14.93, respectively. Coefficients of variation for high, medium and low reactive IQC samples were determined as %8.1, %12.2 and %7.6, respectively.

Conclusion: In concordance with ISO15189 standards that suggest the use of independent run controls for immunoassays, it would be beneficial to prepare IQC samples from collected blood in blood banks.

Keywords: HbsAg, Blood Donor, Internal Quality Control

Alındığı tarih / Received:
18.11.2021 / 18.November.2021

Kabul tarihi / Accepted:
06.01.2022 / 06.January.2022

Erken çevrimiçi / First Published:
31.03.2022 / 31.March.2022

ORCID Kayıtları

F. Y. Ayhan 0000-0003-2982-0240
M. S. Erensoy 0000-0002-7052-8359
R. Sertöz 0000-0002-5321-4710

✉ yayhan@yahoo.com

GİRİŞ

Kan bağışçılarının transfüzyonla bulaşan enfeksiyonlar yönünden mikrobiyolojik taraması güvenli kan temini açısından önemli ve gereklidir. Ülkemizde zorunlu tarama testlerinin kapsamı hepatit B, hepatit C, AIDS ve sifiliz enfeksiyonlarına ilişkin göstergelerin araştırılması olarak belirlenmiştir. Genel anlamda, tarama testlerinin en önemli performans ölçütü geniş bir topluluk içerisindeki gerçek hastaları saptayabilmesi olarak kabul edilmektedir. Bu da testin duyarlılığının yüksek olması beklentisini yaratmaktadır. Çoğunlukla tarama testlerinde %95'den yüksek bir duyarlılık olması istenmektedir⁽¹⁾. Ancak, kan bağışçılarının serolojik taramasında kullanılan testlerde yalnızca analitik duyarlılığın yüksek olması transfüzyon güvenliği açısından yeterli değildir. Bu testlerin uygulanması sırasındaki süreçlerde kalite güvencesinin sağlanması ve sürdürülebilirliği önemli ve gereklidir.

Analitik sürecin düzgün biçimde tamamlandığını güvence altına almada önemli araçlardan birisi de kalite kontrol numuneleridir. Bunlar hasta örneklerine benzer ve belirli bir konsantrasyonda analitik madde içeren örneklerdir. Test kiti üreticileri, tedarik ettikleri test kiti ile birlikte kontrol örneklerini de sağlamaktadırlar. Ancak, tıbbi laboratuvarlar için geçerli standartları tanımlayan ISO 15189 kapsamında tıbbi laboratuvarların iç kalite kontrol (İKK) örneklerini kit tedarikçisinden bağımsız olarak sağlamaları önerilmektedir. Bu şekilde laboratuvardaki analitik sürecin daha nesnel ve gerçekçi bir biçimde değerlendirilmesi olasıdır. Bağımsız İKK örnekleri kit üreticilerinden farklı ticari kaynaklardan sağlanabilmekle birlikte, bu maliyet arttırıcı bir unsurdur. Bu açıdan laboratuvarların kendi bağımsız İKK örneklerini hazırlaması uygun bir çözüm olarak gözükmektedir^(2,3).

Kan bağışığı kabul eden kan hizmet birimlerinde tarama testlerinde reaktivite nedeniyle kullanılmayıp imha edilen bağışığı kanlarından bu testler için İKK örnekleri hazırlanması olasıdır. Bu girişim kan hizmet biriminde kalite yönetimi çerçevesinde transfüzyon güvenliğini arttırmaya yönelik bir edim olması yanında maliyet

etkinliği arttıracak bir kaynak yaratma eylemi olarak da yararlı olacaktır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma, Ege Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından (17.04.2018 tarih ve 18-4.1/47 No.lu karar) onaylanmıştır.

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Kan Merkezi'ne, kan bağışığında bulunmak amacıyla başvuran ve değerlendirme sonunda uygun bulunan kişilerden kan bağışığı kabul edilerek kan bileşenleri hazırlandı. Kan bağışığı sırasında ayrılmış numunelerde zorunlu mikrobiyolojik tarama testleri kemilüminesans mikropartikül immünoassay (CMIA) yöntemiyle (Architect i2000, Abbott Laboratories, ABD) araştırıldı. Zorunlu mikrobiyolojik tarama testlerinde reaktivite saptanması nedeniyle transfüze edilemeyeceğine karar verilen ve imha edilmek üzere ayrılan kan bileşenlerinden hepatit B virüs yüzey antijeni (HBsAg) reaktivitesi saptanmış olan plazmalar çalışma amacıyla ayrıldı. HBsAg reaktivitesi yanında taranan diğer enfeksiyon etkenlerine (HIV, HCV, *Treponema pallidum*) yönelik testlerinde de reaktive saptanmış bağışığı plazmaları çalışma dışında bırakıldı.

Ayrılan plazmalar HBsAg sinyal/eşik (S/CO) ölçüm değerleri açısından kategorize edildi ve HBsAg S/CO değeri 1000 üzerinde bulunan 14 plazmadan serum havuzu hazırlanmasında kullanılmak üzere ikiye adet steril, vidalı kapaklı 50 ml hacimli polipropilen (PP) tüplere ve testlerde kullanılmak üzere beşer adet 2 ml hacimli PP kriyotüplere dağıtılarak torba üzerindeki sayısal kod ile işaretlenerek -40°C'de saklandı. Saklanan plazma numunelerinden bir dizisinde HBV DNA kantitasyonunu belirlemek üzere gerçek zamanlı (*real time*) PCR yöntemiyle kantitatif HBV DNA analizi (Bosphore HBV Quantification Kit, Anatolia Geneworks, Türkiye) yapıldı.

Derin dondurucuda saklanmakta olan ve HBsAg reaktif bağışığı plazmalarını içeren 50 ml'lik PP tüplerden birer adet alınarak 14 kan bağışığına ait

plazmanın eşzamanlı olarak çözünmesi sağlandı. Çözünen plazmalar eşit miktarlarda karıştırılarak havuzlandı. Havuzlanmış plazmaların önce kalsiyum klorür (CaCl_2) solüsyonu ile koagülasyonu, sonra dekstran sülfat ile presipitasyonu planlandı. Bu amaçla Proksch ve ark.⁽⁴⁾ tarafından uygulanmış yöntem esas alınarak bazı modifikasyonlarla işlemler gerçekleştirildi.

Plazmanın *in vitro* koagülasyonu: Steril bir behere 1.1 gr CaCl_2 (Sigma Aldrich, Japonya) eklendi. Üzerine 200 ml havuzlanmış plazma konarak karıştırıldı, 37°C 'de 1 saat süreyle inkube edildi. Liyofilize haldeki siğir trombini (Q.F.A.Thrombine, HemosIL, Instrumentation Laboratory, ABD) steril su ile sulandırılarak çözelti haline getirildi. Sulandırılmış hâlde 100 NIH/ml siğir trombini içeriğine sahip 2 ml'lik çözelti oda ısısında CaCl_2 ile inkube edilmiş plazmaya eklenerek karıştırıldı.

Koagülasyonun makroskobik olarak görünür hale gelmesi için oda ısısında 20 dk. daha bekletilen karışım steril bir aplikatör ile koagulum hacmi küçültülerek konik tabanlı PP tüplere 50 ml olarak dağıtıldı. Yirmi dakika süreyle 4500 g'de ve 10°C 'de santrifügasyon uygulandı. Santrifügasyon sonrası üst sıvı steril bir şişede toplanarak serum havuzu oluşturuldu.

Homojenize edilmiş serum havuzundan konik tabanlı 50 ml'lik PP tüplere 45 ml eşit miktarlarda plazma dağıtılarak 3 adet tüpten oluşan bir seri hazırlandı.

Lipidlerin presipitasyonu: Serum havuzundan lipidlerin uzaklaştırılması için 3 g toz dekstran sülfat (OmniPur® Dextrane Sulfate, Calbiochem, Japonya) 100 ml steril distile su içerisinde çözündürülerek %10'luk dekstran sülfat solüsyonu hazırlandı. Elli ml'lik PP tüplere dağıtılmış 45 ml havuzlanmış seruma 5 ml %10'luk dekstran sülfat solüsyonu konarak litrede 300 mg dekstran sülfat içerecek serum tüpleri hazırlandı. Tüpler oda ısısında 30 dk. süreyle bekletilerek havuzlanmış serum içeriğinde bulunan lipidlerin presipitasyonu hedeflendi. Bekleme süresinin sonunda tüpler 20 dk. süreyle 10°C 'lik ısıda ve 4.500 g kuvvetinde santrifüj edildi. Santrifügasyon sonrası

dipte oluşan çökeltinin karışmasına izin vermeden ve çökelti üzerinde yaklaşık 2 ml berrak serum tabakası bırakılacak şekilde üst sıvı pipet ile çekilerek steril bir şişede toplandı. Toplanan serum konik tabanlı 15 ml'lik PP tüplere 10 ml eşit miktarlarda dağıtıldı. Tüplerde makroskobik bulanıklık varlığı nedeniyle 40 dk. süreyle 10°C 'lik ısıda ve 4500 g kuvvetinde ikinci kez santrifüj edildi. Santrifügasyon sonrası dipte oluşan çökeltinin karışmasına izin vermeden üst sıvı pipet ile çekilerek konik tabanlı 15 ml'lik PP tüplere aktarıldı. Bir gece 4°C 'lik soğutucuda beklemeye bırakıldı. Bekleme süresi sonunda tüpler 40 dk. süreyle 10°C 'lik ısıda ve 4500 g kuvvetinde santrifüj edildi. Santrifügasyon sonrasında dipte yoğun bir çökeltinin biriktiği ve makroskobik olarak berrak bir görünüm oluştuğu gözlemlendi. Tüplerdeki berrak üst sıvı steril bir şişede toplanarak İKK örneklerinin hazırlanacağı serum havuzu oluşturuldu (Resim 1).



Resim 1. Lipid presipitasyonu

İKK örneklerinin hazırlanması: Elde edilen serum havuzundan steril 15 ml'lik PP tüplere aktarım yapılarak fosfat tamponlu serum fizyolojik (PBS) (RTA

Laboratuvarları, Türkiye) ile 1/5, 1/10, 1/50, 1/100 ve 1/1000 sulandırılmaları hazırlandı. Her sulandırmadan birer örnek alınarak hasta ve kan bağışçılarının HBsAg taramasında kullanılan CMIA esaslı bir immünoassay cihazında (Architect i2000, Abbot laboratories, ABD) HBsAg yönünden analiz edildi. Elde edilen HBsAg S/CO değerleri çerçevesinde İKK örnekleri için uygun bir konsantrasyon sağlayabileceği öngörülen 1/100 ve 1/1000 sulandırılmış serumlar 2 ml'lik kriyotüplere dağıtılarak -40°C'de donduruldu. Orijinal serumun 1/100 ve 1/1000 oranında sulandırılmasıyla hazırlanan bu serilerdeki kriyotüpler sırasıyla "İK100" kodu verilerek "orta reaktif İKK" olarak ve "İK1000" kodu verilerek "düşük reaktif İKK" olarak etiketlendi. Sulandırım yapılmamış havuzlanmış serum ise "yüksek reaktif İKK" olarak kullanılmak üzere "İK1" koduyla etiketlenerek 2 ml'lik kriyotüplere dağıtıldı ve -40°C'de donduruldu.

Plazmaların işlenmesi ve serum örneklerinin hazırlanmasına yönelik tüm süreç Biyogüvenlik Düzey-2 (BSL-2) laboratuvar koşullarında ve bu koşullara uygun kişisel koruyucu ekipman kullanılarak yapıldı.

Kan bağışçılarının HBsAg S/CO değerleri ile HBV DNA konsantrasyonları arasında korelasyon varlığı Pearson korelasyon analizi ile araştırıldı.

İKK örneklerinin performans analizi: İKK örneklerinin günler arası değişkenlik derecesinin saptanması amacıyla farklı günlerde dondurucudan çıkarılarak çözülen internal kontrol serumları hasta ve kan bağışçısı örneklerinin rutin HBsAg analizleri sırasında kontrol örneği olarak eşzamanlı test edildi. Her çalışmada, her seriden (İK1, İK100 ve İK1000) birer tüp kullanılmak üzere 21 farklı çalışmada analiz gerçekleştirildi. İKK serumları CMIA esaslı immünoassay cihazında (Architect i2000, Abbott Laboratories, ABD) kontrol numunesi olarak analize alındı.

İKK örneklerinin günler arası değişkenlik derecesinin saptanması amacıyla farklı günlerde rutin HBsAg analizi sırasında İK1, İK100 ve İK1000 kodlu örneklerden birer tüp derin dondurucudan çıkarıldı

ve oda ısısında çözülmesi beklendi. Çözülmüş örnekler bağışçı ve hastaların rutin HBsAg incelemesinde İKK örneği olarak analiz edildi. Analiz sonrasında S/CO değerleri İKK örnek performans çizelgesine kaydedildi. Hazırlanan İKK örneklerinin 21 farklı analiz sonucunda elde edilen S/CO değerleri ile Levey-Jennings grafikleri oluşturuldu.

Tanımlayıcı ve analitik istatistikler için PASW (versiyon 18.0) yazılımı (SPSS Inc. Hong Kong) kullanıldı. İKK örneklerinin S/CO ortalamaları, standart sapmaları ve değişim katsayıları belirlendi. Ölçüm değerlerinin normallik sınaması Kolmogrov-Smirnov testi ile yapıldı. Levey-Jennings grafikleri Westgard 3 sigma kurallarına göre sistematik hata ve rastgele hata yönünden incelendi.

BULGULAR

HBsAg reaktivitesi S/CO 1000 ve üzerinde saptanan ve HBsAg reaktivitesi nedeniyle bağışladıkları kan, transfüzyon için uygun bulunmayan kan bağışçılarında (n=14) toplanan plazmalarda HBV

Tablo 1. İKK örneği için seçilen bağışçı plazmalarının HBsAg ve HBV DNA içeriği

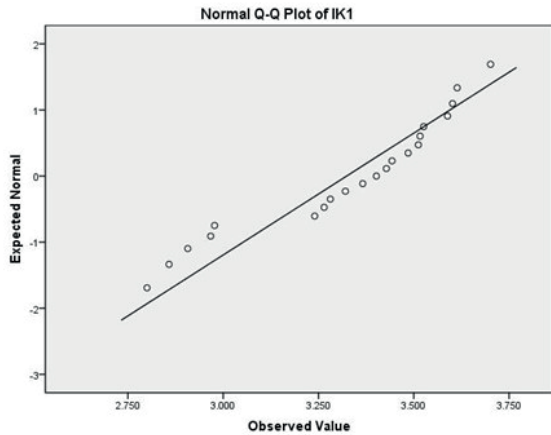
Kan Bağışçısı	HBsAg (S/CO)	HBV DNA (IU/ml)
1	4111	449
2	3950	503.7
3	3907	65.6
4	3984	12390
5	4043	3226
6	5500	396.7
7	3146	36360
8	1524	5212
9	1178	12360
10	1661	5749
11	4199	234.9
12	4212	617.1
13	3008	135300
14	5554	332.5

HBsAg: Hepatit B yüzey antijeni; HBV DNA: Hepatit B Virüs DNAsı; S/CO: Örnek Sinyali/Eşik Değeri, IU/ml; Enternasyonal Ünite/mililitre.

DNA konsantrasyonu 65.6 ile 135300 IU/ml arasında bulundu (Tablo 1). Kan bağışçılarının HBsAg S/CO değerleri ile HBV DNA konsantrasyonları arasında anlamlı bir korelasyon bulunmadı. ($R=-0.2129$, $p=0.46$).

Hazırlanan her üç seriden İKK serumlarının rutin HBsAg analizi sırasında elde edilen S/CO değerleri kaydedilerek veriler tanımlayıcı ve analitik istatistiklerde kullanıldı.

Yüksek reaktif İKK (İK1) serumları ile elde edilen S/CO değerleri için ortalama 3323.75 bulunurken ortanca 3401.76 olarak, standart sapma 271.19 olarak, değişim katsayısı %8.1 olarak belirlendi. Kolmogrov-Smirnov testi ile ölçüm değerlerinin %95 güven aralığında normal dağılım gösterdiği görüldü ($p=0.2$, Şekil 1).

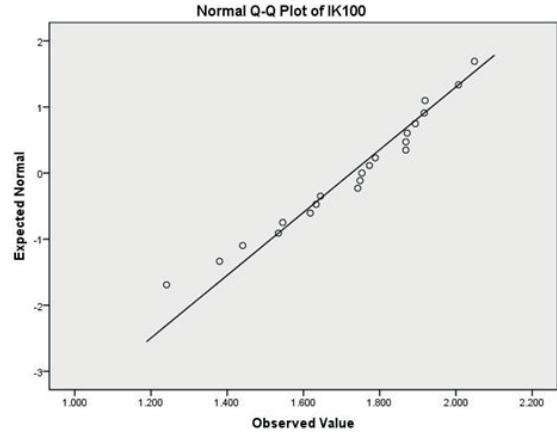


Şekil 1. Yüksek reaktif İKK ölçümlerinin dağılım (Q-Q) grafiği

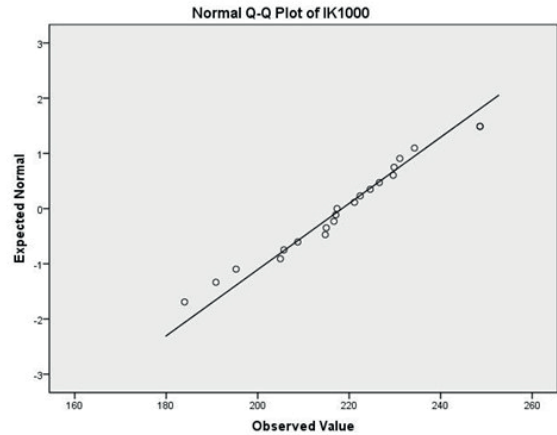
Orta Reaktif İKK (İK100) serumları için ortalama 1725.57 olarak bulunurken ortanca 1753.48 olarak, standart sapma 210.62 olarak, değişim katsayısı %12.2 olarak belirlendi. Kolmogrov-Smirnov testi ile ölçüm değerlerinin %95 güven aralığında normal dağılım gösterdiği görüldü ($p=0.2$, Şekil 2).

Düşük Reaktif İKK (İK1000) serumları için ortalama 219.57 olarak bulunurken ortanca 217.34 olarak, standart sapma 14.93 olarak, değişim katsayısı %7.6

olarak belirlendi. Kolmogrov-Smirnov testi ile ölçüm değerlerinin %95 güven aralığında normal dağılım gösterdiği görüldü ($p=0.2$, Şekil 3).



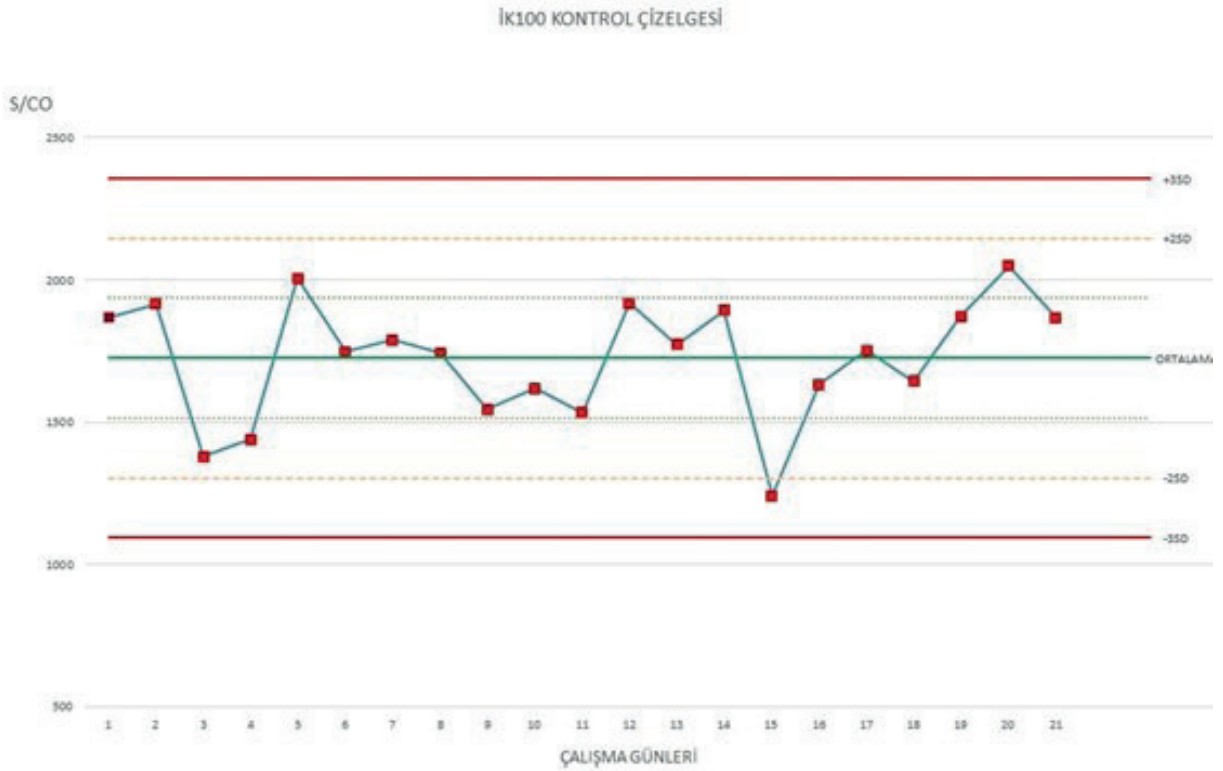
Şekil 2. Orta reaktif İKK ölçümlerinin dağılım (Q-Q) grafiği



Şekil 3. Düşük reaktif İKK ölçümlerinin dağılım (Q-Q) grafiği

S/CO değerlerinin aktarıldığı Levey-Jennings grafiklerinin incelenmesinde yüksek reaktif İKK örneklerinin tümünde ölçüm değerlerinin $\pm 2SD$ içerisinde yer aldığı görüldü.

En yüksek S/CO değeri 2048.65 olarak ölçülen orta reaktif İKK örneklerinde en düşük S/CO değeri olan 1240.71 ölçümünün $-2SD$ dışına çıktığı görüldü. Ancak, diğer tüm değerlerin $\pm 2SD$ içerisinde yer aldığı gözlemlendi (Şekil 4).



Şekil 4. Orta reaktif İKK serumlarının HBsAg test performansı

En düşük S/CO değeri 190.86, en yüksek S/CO değeri 248.60 olarak ölçülen düşük reaktif İKK örneklerinde tüm değerlerin $\pm 2SD$ içerisinde yer aldığı gözlemlendi.

Orta reaktif İKK örneklerinde $-2SD$ dışına çıkan değer nedeniyle Westgard'ın 1_{2s} kuralının ihlal edildiği saptandı. Uyarıcı özellikteki bu kural ihlali dışında rastgele hata veya sistematik hataya işaret eden bir kural ihlali saptanmadı.

TARTIŞMA

HBsAg'nin 1970'lerde ABD'inde kan bağışçılarında zorunlu tarama testi olarak kabulünün ardından transfüze edilecek kan ve kan bileşenlerinde enfeksiyon göstergelerinin araştırılması yaygın bir uygulama hâlini almıştır. Ülkemizde ise 1983 yılında kabul edilen 2587 sayılı kanunun ardından yürürlüğe giren Kan ve Kan Ürünleri Yönetmeliği ile tarama testleri zorunlu kılınmıştır. Avrupa Parlamentosu ve Konseyi'nin 2002 98/EC direktifi ile kan bağışçılarında serolojik tarama testlerine ilişkin gerekliliklerin

tanımlanmasının ardından transfüzyon öncesi serolojik tarama testlerinde AB ülkeleri açısından bir ortak standart oluşturulmuştur^(5,6).

Ülkemiz mevzuatında da karşılığını bulan bu gereklilik nedeniyle kan bağışçılarında HBV, HCV, HIV ve sifilize yönelik enfeksiyon göstergelerinin taranması zorunludur⁽⁷⁾.

Zaman içerisinde nükleik asit test yöntemlerinin ve kan bileşenlerinde patojen azaltmaya yönelik teknolojilerin geliştirilmesi, serolojik tarama testlerinin geleceğini tartışmaya açsa da daha epeyce bir süre serolojik tarama testlerinden vaz geçilmesi olası gözükmemektedir. Yaygınlaşan hepatit B aşılması ve geliştirilen antiviral tedavilere karşın hepatit B enfeksiyonu yeryüzünde ciddi bir halk sağlığı sorunu olarak önemini sürdürmektedir. Kan bağışçısı kazanım programları sayesinde gönüllü ve sürekli kan bağışçılarının sayısının artması, kan bağışçılarının transfüzyon ile bulaşan enfeksiyonlara yönelik riskli davranışlar konusunda bilinçlendirilmesi

de dahil tüm gelişmelere karşı transfüzyon ile HBV bulaşma riski bulunmaktadır. HBsAg saptanmasında pek çok kısıtlayıcı durum bulunmaktadır. Bunlardan en önemlisi HBV enfeksiyonunun başlangıcından viral antijenin tespit edilebilir seviyeye ulaşmasına dek geçen pencere dönemidir^(8,9).

HBsAg testleri enfekte karaciğer hücrelerinden salınan viral partiküller belirli bir seviyeye ulaşmaya dek HBsAg testinde antijen saptanmamaktadır. HBsAg saptanmasında fonksiyonel viral partiküllerden daha çok sHBS moleküllerinin spontan agregasyonun bir sonucu olan sferik partiküllerin ya da tubuler partiküllerin etkili olduğu ileri sürülmüştür⁽⁸⁾.

HBsAg S/CO değerleri ile HBV DNA düzeylerini karşılaştıran lineer regresyon modellemelerinde bu iki ölçüm değeri arasında anlamlı pozitif bir korelasyon saptanmış olsa da HBV DNA ve HBsAg'nin hızla arttığı akut enfeksiyonun erken döneminde bu durum beklenen bir sonuçtur. Çalışmamızda, HBsAg S/CO değerleri ile HBV DNA konsantrasyonları arasında anlamlı bir korelasyon bulunmaması ise öncelikle homojenize bir plazma havuzu elde etmek amacıyla seçilen kan bağışçılarının sayısının kısıtlanmasıyla ilişkilendirilebilir. Öte yandan HBsAg reaktivitesi gösteren plazmaların aktif enfeksiyonu bulunmayan taşıyıcı özelliğindeki kan bağışçılarından sağlanması da bu sonuca yol açabilir. Kan bağışçılarında HBsAg ile HBV DNA arasında korelasyon eksikliğine dikkat çeken başka çalışmalar bulunmaktadır. Kuhns ve ark.⁽¹⁰⁾ HBsAg reaktif kan bağışçılarında aşırı düşük HBV DNA düzeylerine dikkat çekmişlerdir. HBsAg reaktif kan bağışçılarının HBV DNA konsantrasyonlarını irdeledikleri çalışmalarında bağışçıların %36'sında HBV DNA konsantrasyonunu 400 kopya/ml altında bulmuşlardır. Kan bağışçılarında yapılan başka çalışmalarda da benzer sonuçlar alındığını vurgulayan aynı araştırmacılar HBsAg reaktif bağışçıların %6'sında ise HBV NAT *minipool* analizlerinde HBV DNA saptanamadığı bildirmişlerdir.

HBsAg varlığını saptamaya yönelik kalitatif test kitlerinde 0.5-100 IU/ml aralığında değişen analitik duyarlılıklar bildirilmiştir. İlk yıllarda düşük olan duyarlılıklar test tekniğindeki gelişmelere bağlı olarak artmıştır. Bu konuda, başlangıçta katı

fazda mikroplaklardan veya plastik boncuklardan yararlanılırken günümüzde kaplama yüzeyi olarak mikropartiküllerin kullanılması ve optik absorbans ölçümüne dayalı testlerden kemilüminesans temelli testlere geçilmesiyle önemli gelişme sağlanmıştır. HBsAg testlerinde önemli bir sorun ise HBV varyantlarıdır. Güvenilir bir sonuç için farklı varyantların varlığında bile test duyarlılığının etkilenmemesi gerekir^(8,11,12).

Biyolojik maddeleri için standartlar oluşturmayı yönelik çalışmalar yürüten DSÖ Biyolojik Standardizasyon Uzman Komitesi (ECBS) klinik laboratuvarlar ile kan hizmet birimlerinde ve kan ürünü veya *in vitro* diagnostik üreticileri tarafından kullanılacak HBsAg testlerinin validasyonu için de bir uluslararası standart (3rd WHO IS) hazırlamıştır. Bu standardın hazırlanma sürecindeki aşamalar ve paylaşılan deneyim çalışmamız için de yol gösterici olmuştur. HBsAg özelinde bir standart oluşturulmasında birçok etmene dikkat çekilmektedir. Özellikle kullanılan örnek matriksinin türü, standardın hazırlanma yöntemi ve antijenik varyantların önemine vurgu yapılmaktadır. DSÖ tarafından hazırlanan uluslararası standardın farklı laboratuvarlar ve farklı sistemlerle analizinde elde edilen veriler incelendiğinde örneğin niteliğinin önemi dikkat çekmektedir. HBsAg reaktif plazma kullanılması ile pürifiye ve inaktive plazma kullanılması arasında varyasyonlar yönünden önemli fark olduğu bildirilmiş, hatta bu farkın HBV genotip ya da subtip farklılıklarından daha etkili olduğu ileri sürülmüştür. Ancak, potens değerlendirmelerinde kantitatif ve kalitatif yöntemler arasında anlamlı fark bulunmamıştır⁽¹³⁾. Çalışmamızda, genotiplendirme yapılmamış olması bir eksiklik olmakla birlikte, örnek sayısının azlığı nedeniyle ortaya çıkan bu durumun geniş ölçekli bir üretim sürecinde giderilmesi düşünülmelidir.

Çalışmamızda, HBsAg reaktif kan bağışçılarının plazmalarından hazırladığımız İKK serumları bağımsız kontroller olarak işlev görmek üzere üretilmiştir. Hammadde olarak serum kullanılmasının stabilite sorunlarını azaltacağı öngörülmekle birlikte, çalışmamız kan bağışçılarından (antikoagulan içeren torbalara) toplanmış kanların değerlendirilmesi düşüncesine dayandığı için İKK örneklerinin hazırlanmasında zorunlu olarak plazma kullanılmıştır.

Bu amaçla, kan bankalarında toplanmış sitratlı bağışçı kanlarının İKK numuneleri için iyi bir matris olduğu ve havuzlanmış serum kadar uygun bir hammadde olduğu görüşünü belirten Proksch ve ark.nın⁽⁴⁾ yöntemi esas alınmıştır.

HBsAg analizlerinde bağımsız kontroller olarak kullanılan İKK örneklerimize ilişkin ölçüm değerleri kontrol çizelgelerine işlenmiş ve performansları da $\pm 3SD$ içerisindeki değişim oranlarını gösteren değişim katsayısı hesaplanarak Westgard "3 Sigma" kuralı temelinde yapılmıştır. Bu değerlendirmelerde İK1, İK100 ve İK1000 serisi için tüm ölçümlerin üst (+3SD) ve alt (-3SD) kontrol sınırları içerisinde bulunduğu görülmüştür. İK100 için bir örneğin 2SD dışında bulunması nedeniyle sadece bir kez 1_{2s} kuralının ihlal edildiği görülmüştür. Westgard kurallarında uyarıcı nitelikteki bu durum diğer kontrol değerlerinin uygun olması durumunda esasen test tekrarını gerektirmeyen bir kontrol noktası olarak kabul edilmektedir. Bu uyarıcı kural dışında sistematik bir hata gözlenmemesi çalışmamız sonucunda hazırlanan İKK örnekleri ile elde edilen sonuçların tüm serilerde (İK1, İK100, İK1000) tutarlı ve uygun olduğuna işaret etmektedir.

Wilkinson ve ark.⁽¹³⁾ nativ HBsAg içeren plazmanın sulandırılmasıyla hazırlanan bir standart ile yapılan kalibrasyonda yüksek varyasyon bildirmiştir. Bu standart için saptanan değişim katsayısı oldukça yüksek olup %29 olarak belirlenmiştir. Çalışmamızda, nativ HBsAg içeren plazmadan elde edilen serumun sulandırılmış ve sulandırılmamış formlarıyla hazırlanan kontrol örneklerinde değişim katsayıları İK1 için %8.1, İK100 için %12.2 ve İK 1000 için %7.6 olarak belirlenmiştir.

HBsAg analizinde kullandığımız immünoassay platformunda (Architecth i2000) kullanılan ticari kantitatif HBsAg kitiyle Liu ve ark.nın⁽¹⁴⁾ yaptığı bir çalışmada, düşük, orta ve yüksek HBsAg kantasyonu gösteren örneklerde elde edilen değişim katsayıları %0.44 ile %9.5 arasında bulunmuştur. Wang ve ark.⁽¹⁵⁾ da aynı platformu kullanarak, ardışık 5 günde aynı örnekleri her gün üçer kez çalışarak HBsAg, anti-HBs, HBeAg, anti-HBe, anti-HBc, anti-HCV, anti-TP, and HIV-Ag/Ab test kitleriyle yaptıkları çalışmada düşük

konsantrasyondaki numuneler için %1.9 ile %7.49 aralığında, orta konsantrasyondaki örnekler için %1.29 ile %5.09 arasında, yüksek konsantrasyondaki numuneler için %1.06 ile %12.74 arasında değişen varyasyon katsayıları bildirmişlerdir.

Her üç seride de elde edilen p değerleri İKK örneklerinin ölçüm değerlerinin normal dağılımına işaret etmektedir. Hazırladığımız İKK serumları bir referans değer ile karşılaştırılmadığı için bias hesaplaması yapılmamış ve bu nedenle toplam analitik hata belirlenmesi söz konusu olmamıştır. Buna karşılık, Westgard kuralları kapsamında incelendiğinde sistematik hata saptanmamış olmasından hareketle hazırlanan İKK serumlarının rutin uygulamada kullanılabilmesi düşünülmüştür. Ancak, geniş ölçekli bir üretim sürecinde toplam analitik hatanın da belirlenebileceği referans serumlarının kullanılması daha uygun olacaktır.

Kan bankacılığında yeni tarama stratejileri konusunda Hepatit B aşılması ve antiviral tedavi olanaklarının gelişmesine karşın HBV küresel bir sorun olmayı sürdürmektedir. Ülkelerin gelişmişlik ve gelir durumlarına bağlı olarak aşıya ve tedaviye erişim olanakları değişmektedir⁽¹⁶⁾. Laboratuvar süreçleri açısından ise nükleik asit temelli testlerin yaygınlaşmasıyla kan bağışçılarında transfüzyon ile bulaşan enfeksiyon etkenlerinin araştırılmasında yeni bir kapı açılmıştır. Enfeksiyon taşıyıcılarında pencere dönemini azaltması nedeniyle büyük yarar sağlayan nükleik asit testlerinin serolojik testlerin yerini alıp almayacağı, transfüzyon öncesi tarama stratejilerinde bir değişiklik olup olmayacağı tartışılmaya başlanmıştır⁽¹⁷⁾.

Butartışma, çalışmamızın konusu olan İKK örneklerinin teminine yönelik planlamaları da belirleyeceği için önemlidir. Ülkelerin nasıl bir tarama strateji oluşturacaklarına karar vermelerinde test maliyeti önemli bir sorun olarak öne çıkmaktadır. Ancak testlerin maliyet etkinliğini belirlemede transfüzyon sonrası enfeksiyonların önlenmesine yönelik bütüncül bir yaklaşım gerekmektedir. Bu noktada HBV rezidüel bulaş riskinin bilinmesi önem taşır. Posttransfüzyonel hepatit B enfeksiyonu gelişmesi için gereken minimum enfeksiyöz doz (ID50) HBsAg

için 20-200 IU aralığında hesaplanmıştır. Bu aralığın 100-1000 viriyona denk düştüğü öngörülmektedir. Ancak, rezidüel risk yalnızca enfeksiyöz doz ile ilişkili olmayıp, HBV epidemiyolojisi, tercih edilen testlerin analitik duyarlılıkları ve uygulanan test algoritmaları ile de yakından ilgilidir. HBsAg ve nükleik asit testlerinin birlikte kullanımı rezidüel riski düşürmektedir⁽¹⁸⁾.

Pek çok ülkede yaygın olarak kullanılan patojen azaltma teknolojileri ümit verici görülmektedir. Ancak, bu yöntemlerin de tarama testlerine bir alternatif olarak değerlendirilmemesi gerekir. Özellikle viral yükü yüksek olan bağışçılardan sağlanan kanların %100 güvenli olmadığı, HBV enfeksiyon riskini önemli ölçüde azaltsa da tümüyle ortadan kaldıramadığı anlaşılmaktadır. Ayrıca patojen azaltma teknolojilerinin poliovirüs ile hepatit A ve E virüsleri gibi zarfsız virüslere ve *Bacillus cereus* sporlarına etkisiz bulunduğu dair bildirimler bu yöntemin tarama testlerinin yerine geçebilme olasılığını zayıflatmaktadır^(9,19).

HBV enfeksiyon riskini azaltması öngörülen bir diğer durum hepatit B bağışıklaması olmakla birlikte, aşılanan bireylerin %5-10'unda yeterli bir antikor yanıtı gelişmediği, HBsAg ve HBeAg pozitifliği olan annelerden doğan yenidoğanların %10-30 kadarında hepatit B aşılması ile etkili bir korunma sağlanamadığı bildirilmiştir. Üstelik koruyucu düzeyde anti-HBs titresi bulunan bazı kişilerde okült HBV enfeksiyonu görülmüştür. Ayrıca Çin'de universal hepatit B aşısının uygulamaya sokulmasından sonraki dönemde doğan ve bu program çerçevesinde HBV aşılması uygun şekilde yapılmış genç kan bağışçılarında HBsAg prevalansının aşı programından önce doğmuş daha ileri yaştaki kan bağışçılara göre daha yüksek bulunması oldukça şaşırtıcıdır. Yanısıra hepatit B aşısı olmasına karşın anti-HBs geliştirmeyen ya da düşük antikor düzeylerine sahip bağışçılarda okült HBV enfeksiyonu gelişebildiği dikkate alınacak olursa aşılanmanın da kan bağışçılara yönelik tarama testlerinden vazgeçmemizi sağlayacak bir etkisi beklenmemelidir^(9,18,20,21).

Testlerde analitik duyarlılıkların artması, nükleik asit testlerinin yaygınlaşması, kan bileşenlerinde patojen

azaltma teknolojilerinin gelişmesi olumlu gelişmeler olmakla birlikte, yakın gelecekte immünoassay temelli tarama testlerinden vaz geçilmesini sağlayacak bir durum yaratmayacaktır. Bu durumda bu testlerin kalite güvencesini sağlamaya yönelik girişimlerimizin de devam etmesi gerektiği açıktır. Kan hizmet birimlerinde kan toplama-kan bileşeni hazırlama döngüsünde işlenen önemli miktarda hücre ve plazmanın bir kısmının bağımsız kalite kontrol materyallerinin hazırlanmasında kullanılması hem kaynakların doğru kullanımı açısından hem de transfüzyon güvenliği açısından yararlı olacaktır.

Etik Kurul Onayı: Bu çalışma, Ege Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından (17.04.2018 tarih ve 18-4.1/47 No.lu karar) onaylanmıştır.

Çıkar Çatışması: Yazarlar tarafından herhangi bir çıkar çatışması bildirilmemiştir.

Ethics Committee Approval: This study was conducted with the approval of Ege University, Clinical Research Ethics Committee (04.17.2018; 18-4.1/47).

Conflict of Interest: No conflict of interest was declared by the authors.

KAYNAKLAR

1. Clark RB, Lewinski MA, Loeffelholz MJ, Tibbetts RJ. Cumitech 31A. Verification and validation of procedures in the clinical microbiology laboratory. ASM Press, Washington, DC. 2009.
2. Public Health England. Quality assurance in the diagnostic virology and serology laboratory. Standards Unit Microbiology Services. 2015.
3. Sepulveda JL. Variation, errors, and quality in the clinical laboratory. In: Dasgupta A, Sepulveda JL (Eds.) Accurate Results in the Clinical Laboratory. (2nd Ed). Elsevier 2019:3-9.
4. Proksch GJ, Bonderman DP. Preparation of optically clear lyophilized human serum for use in preparing control material. Clin Chem. 1976;22(4):456-60.
5. Fiedler SA, Oberle D, Chudy M, et al. Effectiveness of blood donor screening by HIV, HCV, HBV-NAT assays, as well as HBsAg and anti-HBc immunoassays in Germany (2008–2015). Vox Sang. 2019;114(5):443-50.
<https://doi.org/10.1111/vox.12770>

6. Dodd RY, Nguyen ML, Krysztof DE, Notari EP, Stramer SL. Blood donor testing for hepatitis B virus in the United States: is there a case for continuation of hepatitis B surface antigen detection? *Transfusion*. 2018;58(9):2166-70.
<https://doi.org/10.1111/trf.14784>
7. Örüç NE, Yenicesu İ. Ulusal Kan ve Kan Bileşenleri Hazırlama, Kullanım ve Kalite Güvencesi Rehberi. 2016. Avrupa Birliği'nin IPA-I finansal desteği ile Kan Tedarik Sisteminin Güçlendirilmesi Teknik Destek Projesi. <https://sbu.saglik.gov.tr/Ekutuphane/Yayin/523> (Erişim: Aralık 2020).
8. Allain JP, Cox L. Challenges in hepatitis B detection among blood donors. *Curr Opin Hematol*. 2011;18(6):461-6.
<https://doi.org/10.1097/MOH.0b013e32834bac10>
9. Candotti D, Laperche S. Hepatitis B virus blood screening: Need for reappraisal of blood safety measures?. *Front Med*. 2018;5:29.
<https://doi.org/10.3389/fmed.2018.00029>
10. Kuhns MC, Kleinman SH, McNamara AL, et al. Lack of correlation between HBsAg and HBV DNA levels in blood donors who test positive for HBsAg and anti-HBc: implications for future HBV screening policy. *Transfusion*. 2004;44(9):1332-9.
<https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2004.04055.x>
11. Pronier C, Candotti D, Boizeau L, Bomo J, Laperche S, Thibault V. The contribution of more sensitive hepatitis B surface antigen assays to detecting and monitoring hepatitis B infection. *J Clin Virol*. 2020;129:104507.
<https://doi.org/10.1016/j.jcv.2020.104507>
12. Amini A, Varsaneux O, Kelly H, et al. Diagnostic accuracy of tests to detect hepatitis B surface antigen: a systematic review of the literature and meta-analysis. *BMC Infect Dis*. 2017;17(Suppl 1):698.
<https://doi.org/10.1186/s12879-017-2772-3>
13. Wilkinson DE, Seiz PL, Schüttler CG, et al. International collaborative study on the 3rd WHO International Standard for hepatitis B surface antigen. *J Clin Virol*. 2016;82:173-80.
<https://doi.org/10.1016/j.jcv.2016.06.003>
14. Liu TW, Yeh ML, Huang CF, et al. Clinical performance of a new hepatitis B surface antigen quantitative assay with automatic dilution. *Kaohsiung J Med Sci*. 2015;31(1):26-33.
<https://doi.org/10.1016/j.kjms.2014.10.007>
15. Wang L, Chen W, Yu Y. The performance of the Abbott i2000 for measuring serum markers of infectious diseases. *J Clin Lab Anal*. 2017;31(1):e22015.
<https://doi.org/10.1002/jcla.22015>
16. Kupek E. Residual risk of hepatitis-B-infected blood donations: estimation methods and perspectives. *Int Sch Res Notices*. 2013;2013:839896.
<https://doi.org/10.5402/2013/839896>
17. Busch MP. Should HBV DNA NAT replace HBsAg and/or anti-HBc screening of blood donors?. *Transfus Clin Biol*. 2004;11(1):26-32.
<https://doi.org/10.1016/j.tracli.2003.12.003>
18. Gerlich WH, Glebe D, Schüttler CG. Hepatitis B viral safety of blood donations: new gaps identified. *Ann Blood*. 2018;3:38.
<https://doi.org/10.21037/aob.2018.09.03>
19. Godbey EA, Thibodeaux SR. Ensuring safety of the blood supply in the United States: Donor screening, testing, emerging pathogens, and pathogen inactivation. *Semin Hematol*. 2019;56(4):229-35.
<https://doi.org/10.1053/j.seminhematol.2019.11.004>
20. Wang Z, Zeng J, Li T, et al. Prevalence of hepatitis B surface antigen (HBsAg) in a blood donor population born prior to and after implementation of universal HBV vaccination in Shenzhen, China. *BMC Infect Dis*. 2016;16:498.
<https://doi.org/10.1186/s12879-016-1834-2>
21. Candotti D, Assennato SM, Laperche S, Allain JP, Levicnik-Stezinar S. Multiple HBV transfusion transmissions from undetected occult infections: revising the minimal infectious dose. *Gut*. 2019;68(2):313-21.
<https://doi.org/10.1136/gutjnl-2018-316490>