



Kan Hizmetleri Genel Müdürlüğü

Sunum Tarihi: 10 Mart 2016



www.kanver.org
KAN HİZMETLERİ GENEL MÜDÜRLÜĞÜ
www.kizilay.org.tr



NAT TARAMA TESTİ UYGULAMALARI VE ÖNEMİ



Uzm. Dr. Kadri DEMİREL
Kuzey Marmara Bölge Kan Merkezi
Laboratuvar Birim Şefi

KAN TRANSFÜZYONU İLE BULAŞAN ENFEKSİYON ETKENLERİNDEN SAĞLIK BAKANLIĞININ ZORUNLU TUTTUĞU ENFEKSİYONLAR

- Hepatit B Virus enfeksiyonları
- Hepatit C Virus enfeksiyonları
- HIV enfeksiyonları
- ***T. pallidum*** enfeksiyonları

- Mikroorganizmaların üretilmesi
- Mikroorganizmaya ait antijenik yapıların gösterilmesi
- Mikroorganizmaya özgü genetik materyalin gösterilmesi
- Mikroorganizmaya karşı konağın oluşturduğu özgül immun yanıtın gösterilmesi

Neden NAT ?

- Serokonversiyon öncesi pencere dönemi,
- İmmun sessiz dönem,
- Prototip virüsler,
- Varyant suş varlığı
- Analitik hatalar

Nükleik Asit Test (NAT) Laboratuvarı

	HIV*	HCV	HBV
Temasdan antikor oluşumuna (gün)	22	70	56
NAT ile azalan süre (gün)	10-15	41-60	6-15
*HIV NAT, HIV p24 antijen testine göre pencere dönemini 3-8 gün kısaltır.			

- Transfüzyon ürünlerindeki bulaşıcı ajanlar için daha yüksek tarama standartlarına olan kamu talebi, Nükleik Asit Testi (NAT) teknolojisinin gelişimini hızlandırmıştır.
- Türk Kızılayı 2006 yılında NAT tarama testi,
- Sonuçların sunulması
- Süreç sonunda 6'lı havuz
- 30 Ekim 2014 de NAT testi

Nükleik Asit Test (NAT) Laboratuvarı

Roche Cobas s201 sistemi Türk Kızılayı 'nın Ankara, İzmir, Erzurum ve İstanbul Bölge Kan Merkezi laboratuvarlarında kuruldu.

- **NAT için kullanılan yöntem;** Real Time PCR (Multiplex, Multidye Teknolojisi- MP6)
- **NAT için kullanılan sistem;** Cobas s-201 platformu, Roche Diagnostics, İsviçre
- **NAT için kullanılan Kit;** MPX v2.0 kiti, Roche Diagnostics, İsviçre
- **NAT çalışılan test;** HBV DNA, HCV RNA, HIV-1 RNA / HIV-2 RNA

- NAT testleri 6'lı havuzlar şeklinde (Minipool-6;MP6)
- Nonreaktif havuzda yer alan her bir numune “nonreaktif”
- Reaktif havuzlara ise rezolüsyon
- Rezolüsyonda tüm numuneler tek tek (MP1) çalışılır
(Single NAT, Individual NAT; ID-NAT).
- Rezolüsyon sonucu, test sonucu olarak kabul edilir.
- Rezolüsyon numuneleri nonreaktif ise, başlangıçtaki MP-6 havuz sonucu “yalancı reaktif” olarak kabul edilir.

- MP-6 NAT da, 166 mikrolitre plazma
- Rezolüsyon da 1 mL'lik plazma
- Duyarlılık yaklaşık 6 kat artmakta
- Yöntem, “kalitatif” sonuç vermektedir
- HIV-1 RNA ve HIV-2 RNA taraması yapılabilmekte
- Ancak HIV-1 ve HIV-2 ayırımı yapılmamakta

Cobas s201 sistemi işlem adımları

- Havuzlama (pooling)
Hamilton Microlab STAR IVD Pipetleme Cihazı
- Numune hazırlama / Ekstraksiyon
Cobas AmpliPrep Ekstraksiyon Cihazı
- Amplifikasyon ve deteksiyon
Cobas TaqMan PCR Amplifikasyon Cihazı
- Sonuç gözden geçirme ve yönetme
AMPLILINK Yazılımı ve Bilgisayarı



Nükleik Asit Test (NAT) Laboratuvarı

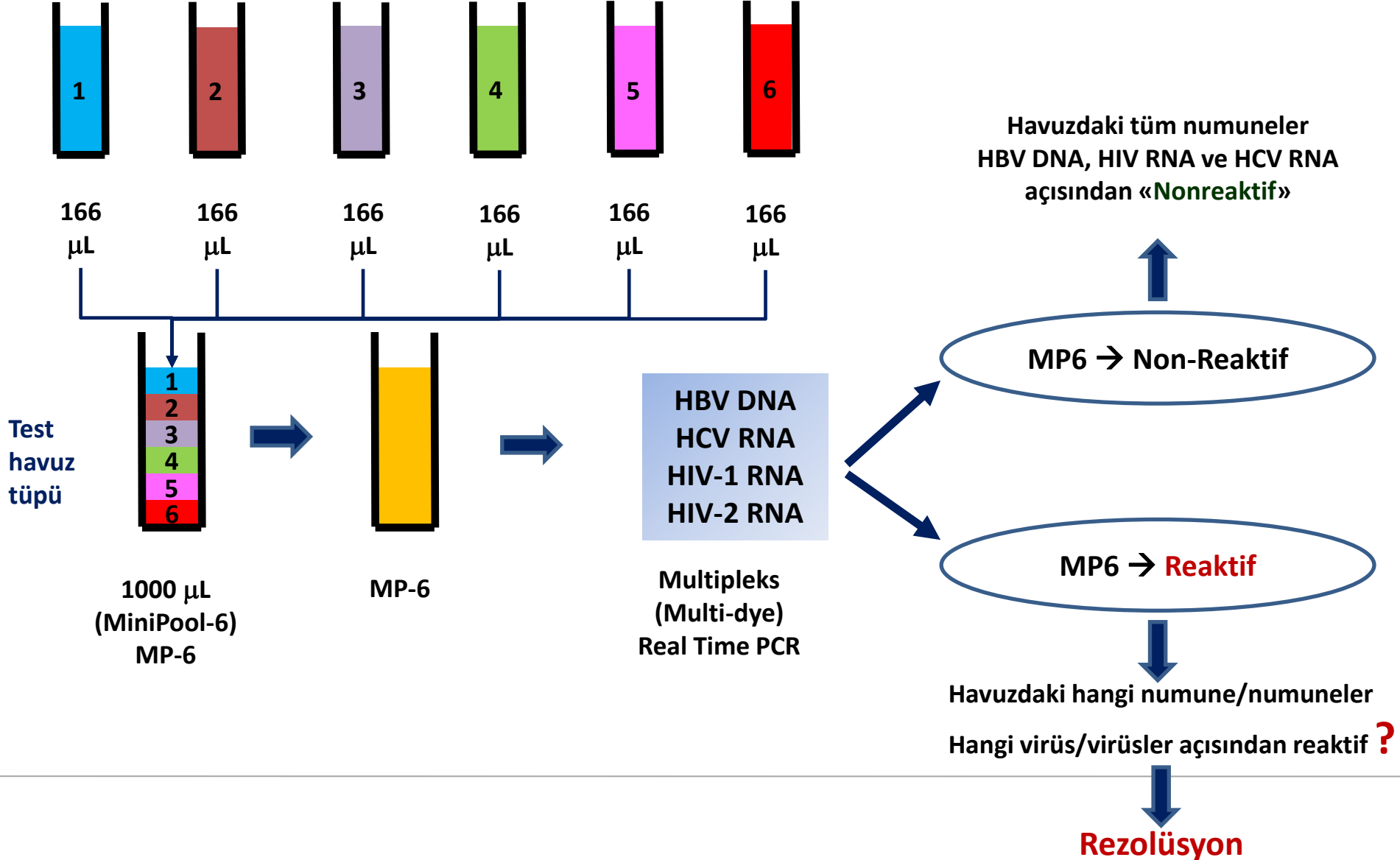


Standart Çalışma Prosedürü

- Numune türü (Plazma)
- Santrifigasyon
- Havuzlama (6'lı havuz)
- Ekstraksiyon, Amplifikasyon ve deteksiyon
- Reaktif numuneler için otomatik rezolüsyon
- Test sonuçlarının değerlendirilmesi, Şahit numune
- Test sonucuna göre doğrulama testi

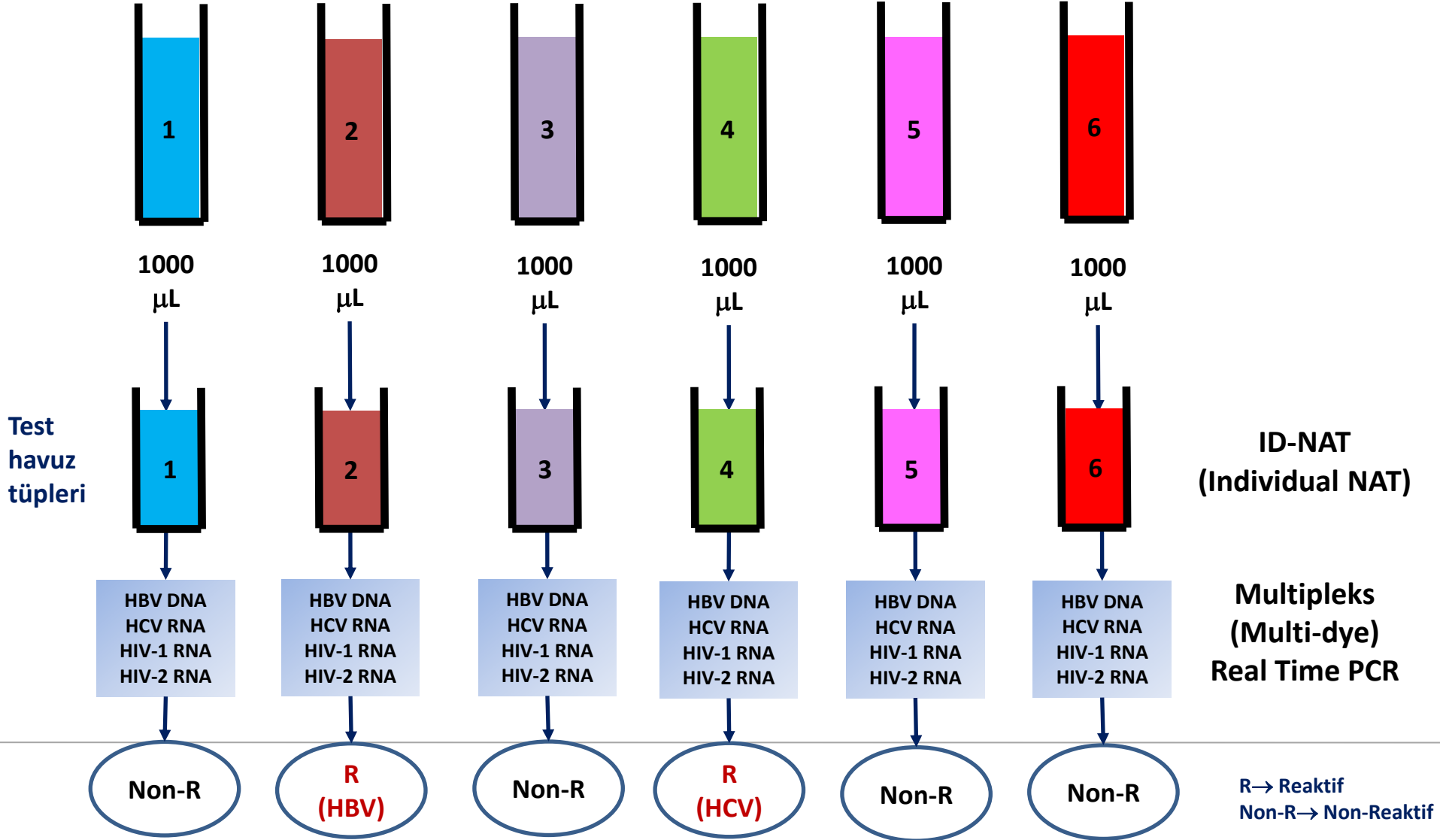
Rutin NAT testinde iş akışı

Primer tüpler

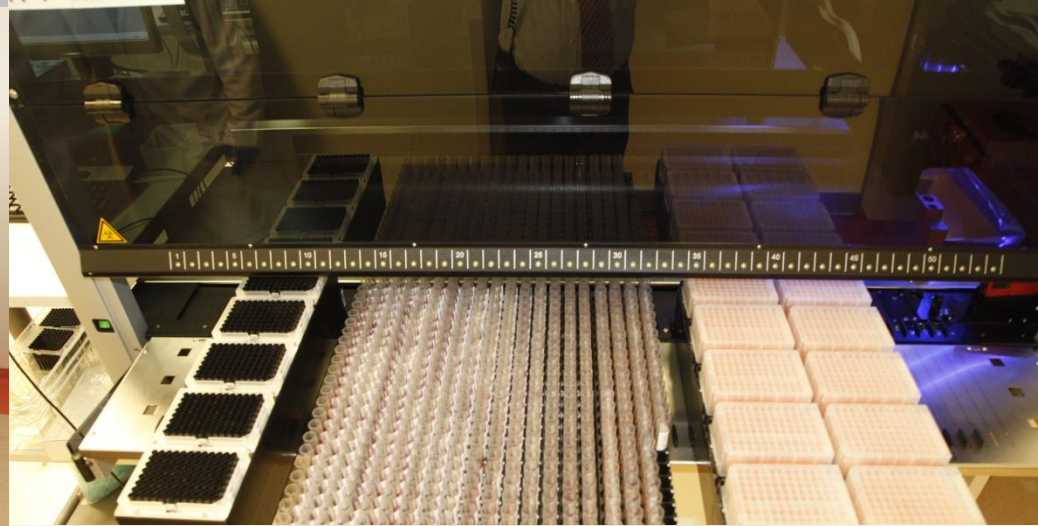


Reaktif havuzun çözömlenmesi→ Resolution

Primer tüpler



Nükleik Asit Test (NAT) Laboratuvarı



- 1 Kasım 2014- 1 Ağustos 2015 → ilk 9 aylık veriler → **1.436.555** bağış
 - Tam kan bağışçısı → 1.412.620 (%98.33)
 - Trombosit aferez bağışçısı → 23.935 (%1.67)
- Serolojik tarama ve NAT tarama testleri **EŞ ZAMANLI** çalışıldı.
- Serolojik tarama →
 - EIA (Siemens Enzygnost/ BioRad Monolisa /DiaSorin Murex)
 - CLIA (DiaSorin Liaison XL)
- NAT tarama →
 - Cobas s 201 Sistemi (Real Time PCR; Multiplex /Multidye teknolojisi)
 - TaqScreen MPX ver.2.0 kiti
 - MP6; MiniPool-6 (6 numuneden oluşan plazma havuzlarının taranması)

NAT TEST SONUÇLARININ DAĞILIMI

Etken	Tarama testleri		Birinci Dönem (ilk 3 ay) (n=474.248)		İkinci Dönem (sonraki 6 ay) (n=962.307)		Tümü (ilk 9 ay) (n=1.436.555)		
	Seroloji ^{(a),(b)}	NAT ^(c)	n	Oran	n	Oran	n	Oran	Oran (1/10 ⁶)
HBV	Nonreaktif	Nonreaktif	471.876	99,500%	957.611	99,512%	1.429.487	99,508%	995.080
	Reaktif	Reaktif	1.484	0,310%	3.042	0,316%	4.526	0,315%	3.151
	Reaktif	Nonreaktif	573	0,120%	1.129	0,117%	1.702	0,118%	1.185
	Nonreaktif	Reaktif	315	0,070%	525	0,055%	840	0,058%	585
HCV	Nonreaktif	Nonreaktif	473.715	99,890%	961.066	99,871%	1.434.781	99,877%	998.765
	Reaktif	Reaktif	57	0,010%	87	0,009%	144	0,010%	100
	Reaktif	Nonreaktif	476	0,100%	1.137	0,118%	1.613	0,112%	1.123
	Nonreaktif	Reaktif	0	0,000%	17	0,002%	17	0,001%	12
HIV	Nonreaktif	Nonreaktif	473.623	99,870%	960.659	99,829%	1.434.282	99,842%	998.418
	Reaktif	Reaktif	23	0,000%	69	0,007%	92	0,006%	64
	Reaktif	Nonreaktif	602	0,130%	1.563	0,162%	2.165	0,151%	1.507
	Nonreaktif	Reaktif	0	0,000%	16	0,002%	16	0,001%	11

Tablo-4: 01 Kasım 2014- 01 Ağustos 2015 zaman dilimindeki ilk 9 aylık dönemde 1.436.555 kan bağışçısı numunesinden elde edilen serolojik ve NAT test sonuçlarının dağılımı.

- (a) Kullanılan kitlere göre, EIA yöntemi ile çalışılan HBsAg testinde %10, Anti-HCV ve HIV 1-2 Ag+Ab testlerinde %10-20, gray-zone uygulanmıştır. CLIA yöntemi ile çalışılan tüm testlerde gray-zone oranı %10'dur. S/CO (sample/cut off) oranı gray-zone sınırları içinde olan sonuçlar "reaktif" olarak kabul edilmiştir.
- (b) Tabloda "Seroloji" sütununda yer alan "reaktif" sonuçlar tekrarlayan reaktifliktir (ilk çalışmada reaktif sonuç olunan numuneler aynı yöntemle iki kez daha test edilmiştir. Tekrar edilen testlerden en az birinde reaktif sonuç alınması durumu "tekrarlayan reaktif" olarak kabul edilmiştir).
- (c) Numuneler rutin olarak 6'lı havuzlar (MP6; minipool-6) şeklinde test edilmiştir. Reaktif sonuç alınan havuzdaki her bir numune rezolüsyon amacıyla tekli havuzlar (MP1) şeklinde tekrar edilmiştir (ID-NAT; Individual NAT, single NAT)

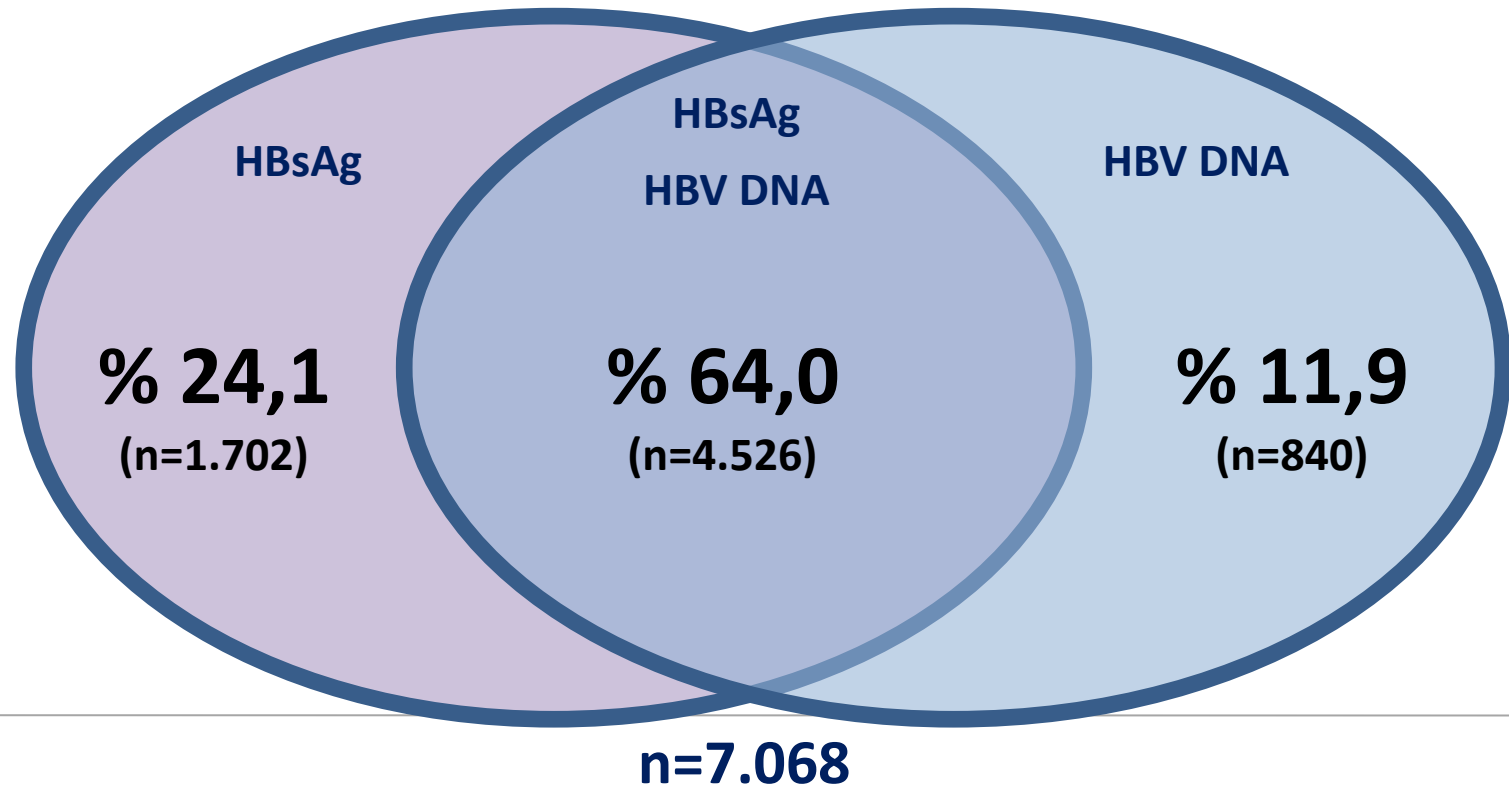
HBV Seroloji ve/veya NAT reaktifliği

7.068/1.436.555



%0,49

(492/100.000)



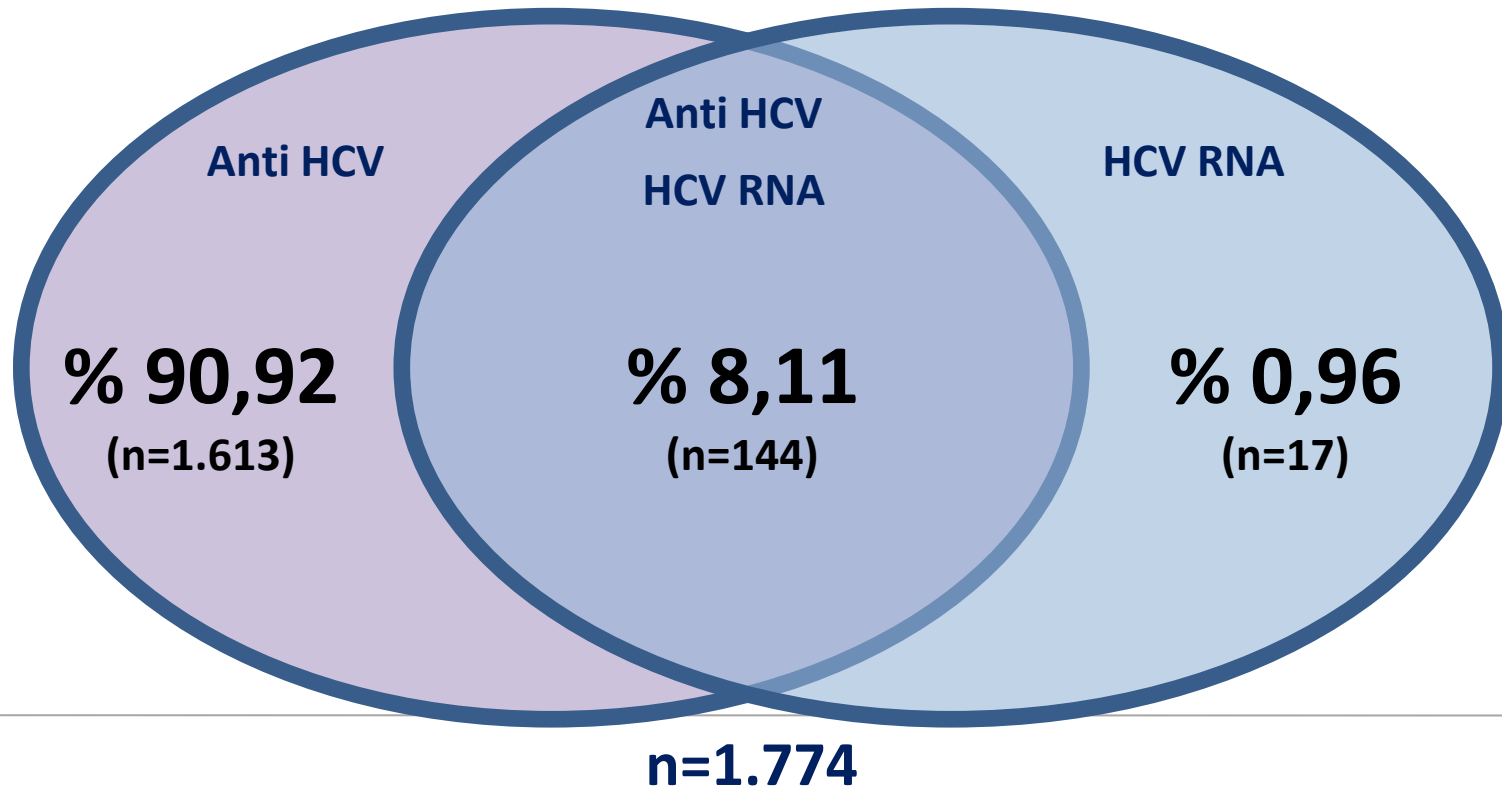
HCV Seroloji ve/veya NAT reaktifliği

1.774/1.436.555



%0,12

(123/100.000)



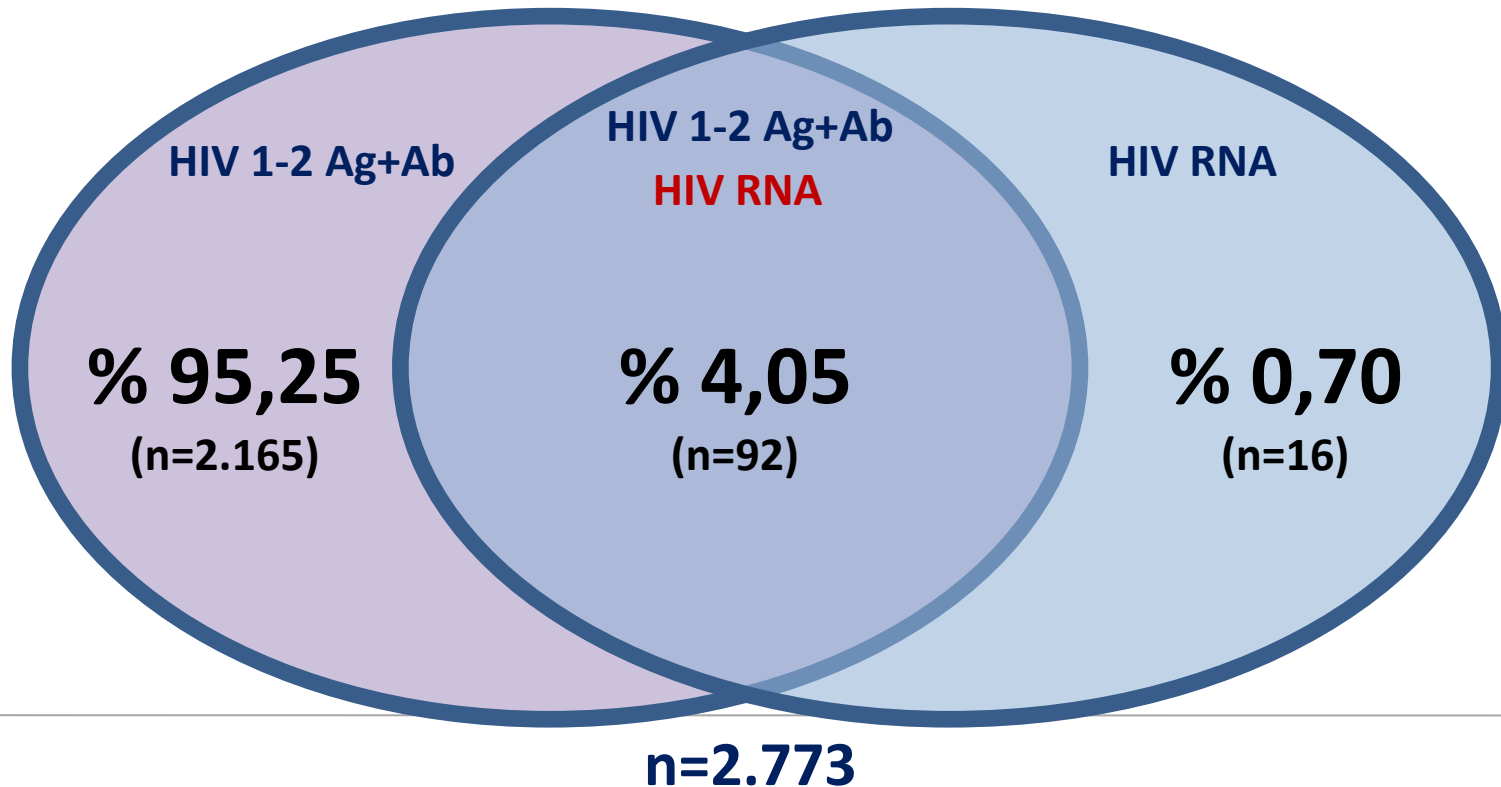
HIV Seroloji ve/veya NAT reaktivliği

2.273/1.436.555



%0,16

(158/100.000)



Seroloji nonreaktif / NAT reaktif

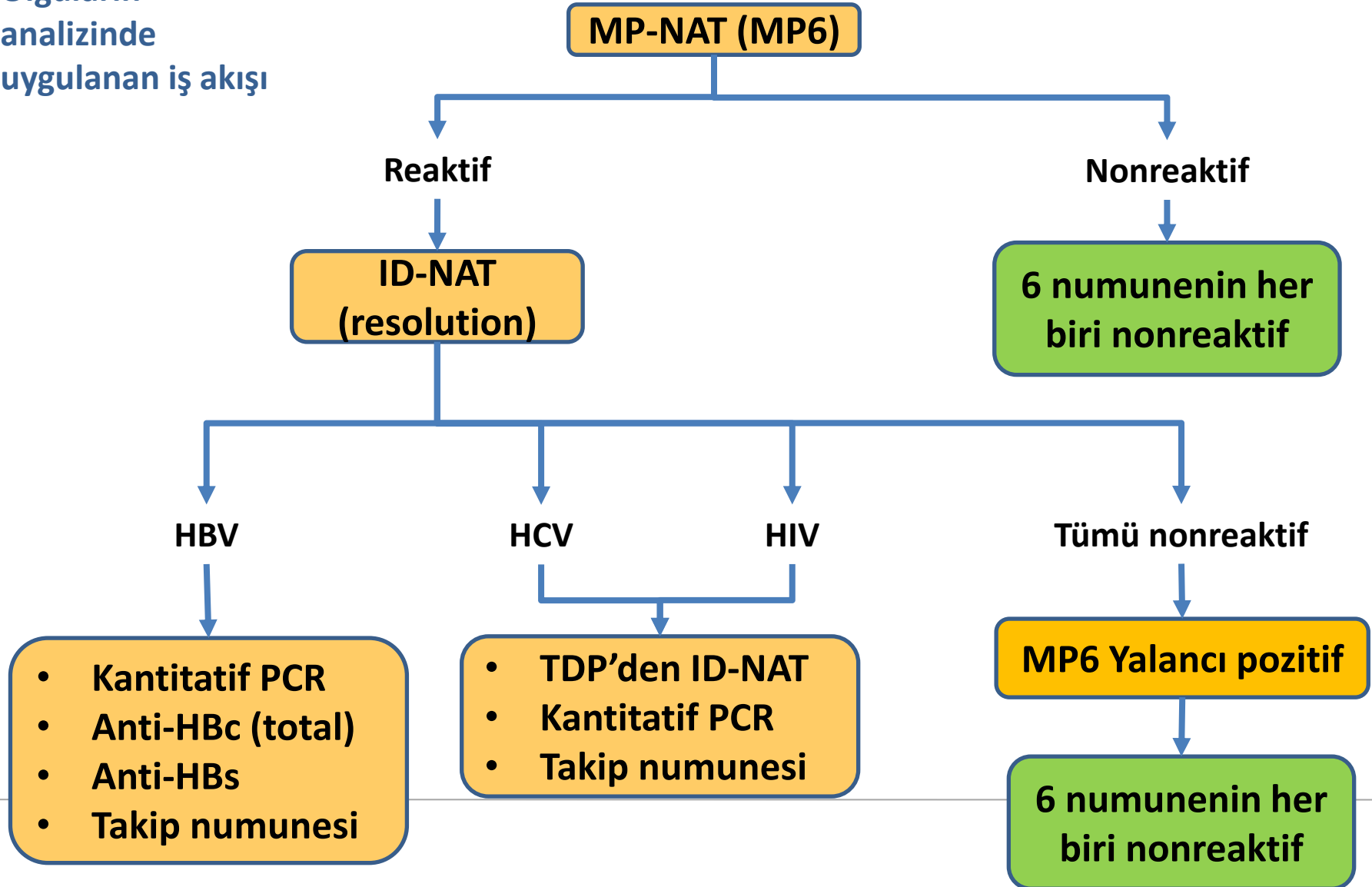
873/1.436.555

%0.061

60,77/100.000

Seroloji nonreaktif/ NAT reaktif

Olguların
analizinde
uygulanan iş akışı



Anti-HCV nonreaktif / NAT reaktif

17/1.436.555

%0.012

1,18/100.000

Anti-HCV nonreaktif / NAT reaktif

	Real Time PCR	Yöntem türü	Numune Hacmi	LOD (%95)	PROBIT Analizi (%95)*
Tarama	ROCHE Cobas s 201 TaqScreen MPX v2.0 (1 IU=2,7 kopya)	Kalitatif	1 mL (ID-NAT)		6,8 IU/mL (5,8-8,3) (MP6: 40,8 IU/mL)
Doğrulama	ABBOTT m2000 Real Time HCV	Kantitatif	0,5 mL	12 IU/mL	10,5 IU/mL (8,6-14,0)
			0,2 mL	30 IU/mL	23,8 IU/mL (17,4-59,7)

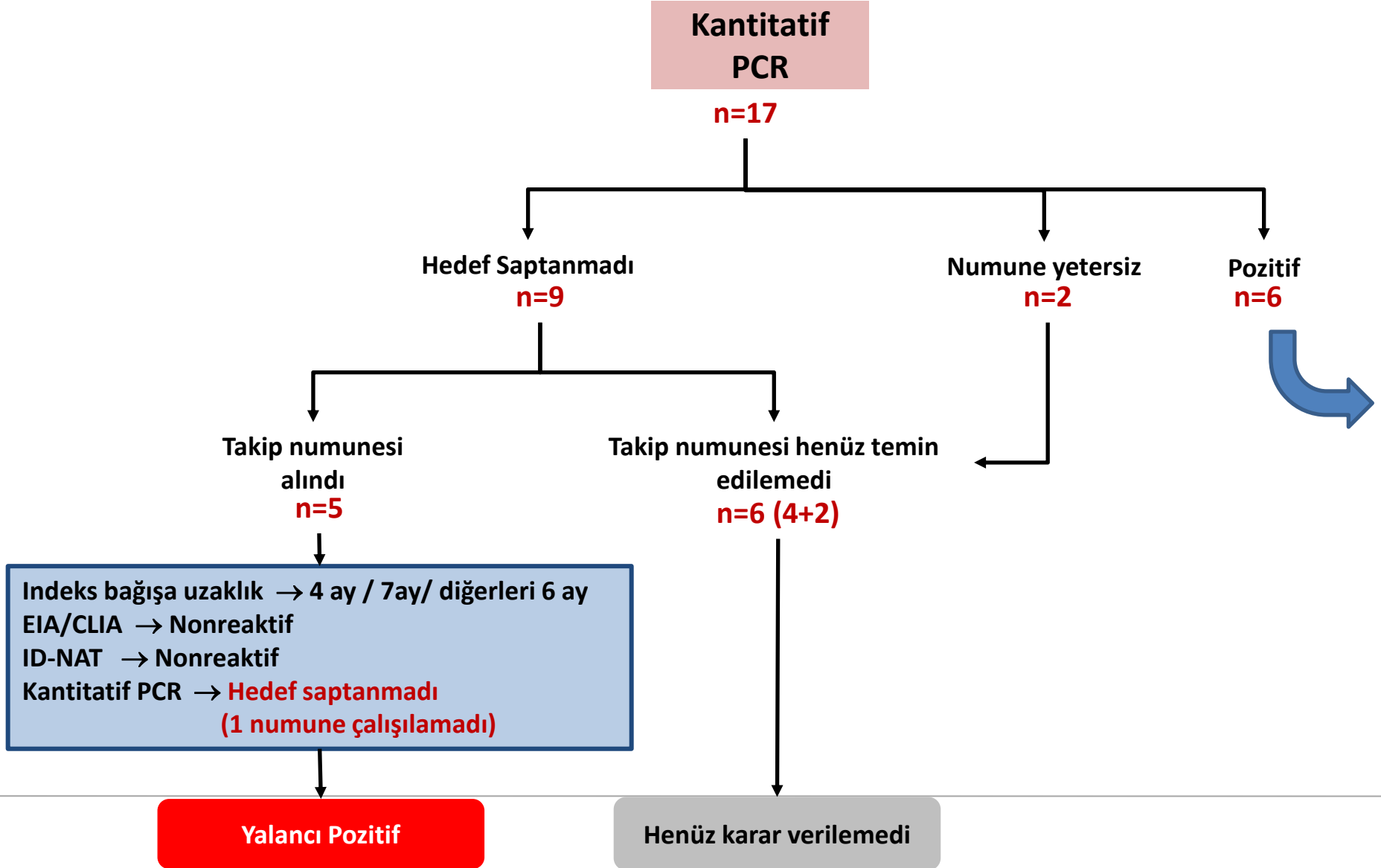
(*) WHO Second International Standard for Hepatitis C Virus RNA for Genomic Amplification Technology Assays (NIBSC code 96/798)



Gerçek pozitiflerde kantitatif PCR negatif bulunabilir → TDP ile desteklenmeli

TDP yok ya da NAT negatif ise kontaminasyon olasılığı dışlanmalı → Bağışçıdan alınacak yeni numune ile (takip numunesi) serokonversiyon ve/veya NAT pozitifliği izlenmeli

Anti-HCV nonreaktif / NAT reaktif



HIV 1-2 Ag+Ab nonreaktif / NAT reaktif

16/1.436.555

%0.011

1,11/100.000

HIV 1-2 Ag+Ab nonreaktif / NAT reaktif

	Real Time PCR	Yöntem türü	Numune Hacmi		LOD (%95)	PROBIT Analizi (%95)*
Tarama	ROCHE Cobas s 201 TaqScreen MPX v2.0 (HIV-1 Grup M 1 IU=0,6 kopya)	Kalitatif	1 mL (ID-NAT)	HIV-1 Grup-M		46,2 IU/mL (35.5-65.9) (MP6: 277,2 IU/mL)
				HIV-1 Grup-O		18,3 kopya/mL (13.1-30.9) (MP6: 109,8 kopya/mL)
				HIV-2		56,2 kopya/mL (48.7-66.6) (MP6: 337,2 kopya/mL)
Doğrulama	ABBOTT m2000 Real Time HIV-1 (1 IU=0,58 kopya) 1 kopya=1,74 IU)	Kantitatif	1 mL		69,6 IU/mL	43,5 IU/mL (34,8-57,4)**
			0,6 mL		69,6 IU/mL	67,86 IU/mL (57,42-85,26)**
			0,5 mL		130,5 IU/mL	113,1 IU/mL (88,74-153,12)**
			0,2 mL		261 IU/mL	207,06 IU/mL (177.48-261.00)**

(*) WHO Second International Standard for HIV-1 RNA, Second International Standard (NIBSC code 97/650)

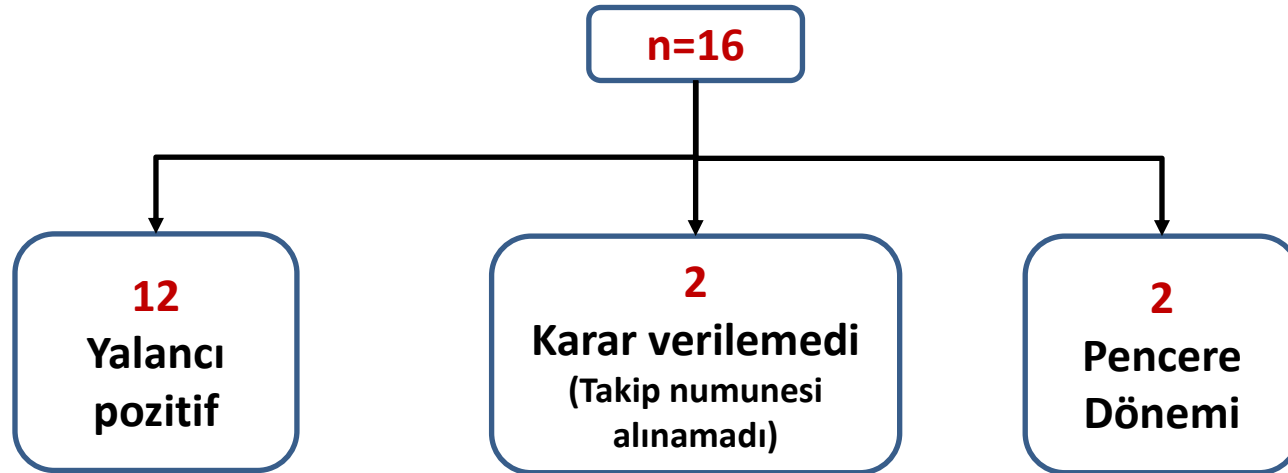
(**) WHO 1st International Standard for HIV-1 RNA (NIBSC code 97/656) / HIV-1 VQA RNA Quantification Standard from Virology Quality Assurance (VQA) Laboratory of the AIDS Clinical Trial Group



Gerçek pozitiflerde kantitatif PCR negatif bulunabilir (özellikle numune hacmi <1 mL ise) → TDP ile desteklenmeli

TDP yok ya da NAT negatif ise kontaminasyon olasılığı dışlanmalıdır → Bağışçıdan alınacak yeni numune ile (takip numunesi) serokonversiyon ve/veya NAT pozitifliği izlenmeli

HIV 1-2 Ag+Ab nonreaktif / NAT reaktif



HIV 1-2 Ag+Ab negatif/ NAT pozitif → 16/1.436.555
Analizi tamamlanan → 14/1.436.555

HIV NAT verimi → 2 /1.434.298 → 1 /717.149

HBsAg nonreaktif / NAT reaktif

840/1.436.555

%0.058

58,47/100.000

HBsAg nonreaktif / NAT reaktif

	Real Time PCR	Yöntem türü	Numune Hacmi	LOD (%95)	PROBIT Analizi (%95)*
Tarama	ROCHE Cobas s 201 TaqScreen MPX v2.0 (1 IU=5 kopya)	Kalitatif	1 mL (ID-NAT)		2,3 IU/mL (2.0-2.8) (MP6: 13,8 IU/mL)
Doğrulama	ROCHE Cobas Ampliprep/Cobas TaqMan HBV Test, version 2.0 (1 IU=5,82 kopya)	Kantitatif		20 IU/mL	9 IU/mL (6.8 -12.1) (EDTA'lı plazma)
	ABBOTT m2000 Real Time HBV (1 IU=3,41 kopya)	Kantitatif	0,5 mL	10 IU/mL	6.40 IU/mL (3.97-13.03)
			0,2 mL	15 IU/mL	10.66 IU/mL (7.11-19.38)

(*) WHO International Standard for Hepatitis B Virus DNA for NAT Assays (NIBSC code 97/746)



Gerçek pozitiflerde kantitatif PCR negatif bulunabilir → Bağışçıdan alınacak yeni numune ile desteklenmeli

İndeks numunede kantitatif PCR pozitif bulunmasına rağmen anti-HBc ve anti-HBs nonreaktif ise kontaminasyon olasılığı dışlanmalı → Bağışçıdan alınacak yeni numune ile desteklenmeli

HBsAg nonreaktif / NAT reaktif

840 numuneden 773 (%92)'sinin
testleri tamamlandı

		Anti-HBc Negatif				Anti-HBc Pozitif					
		Anti-HBs Negatif		Anti-HBs Pozitif		Anti-HBs Negatif		Anti-HBs Pozitif		Toplam	
HBV DNA (IU/mL)	Hedef Saptanmadı	23	2,98%	37	4,79%	129	16,69%	149	19,28%	338	43,73%
	<20	18	2,33%	13	1,68%	117	15,14%	123	15,91%	271	35,06%
	20-99	7	0,91%	6	0,78%	54	6,99%	61	7,89%	128	16,56%
	100-199			2	0,26%	12	1,55%	8	1,03%	22	2,85%
	200-399	1	0,13%			5	0,65%	3	0,39%	9	1,16%
	400-1000					2	0,26%			2	0,26%
	>1000	1	0,13%	1	0,13%	1	0,13%			3	0,39%
	Toplam	50	6,47%	59	7,63%	320	41,40%	344	44,50%	773	100,00%
Olası durum*		1.Pencere Dönemi - GHB (seronegatif) - Yalancı pozitif		- GHB (seronegatif) - Yalancı pozitif		2.Pencere Dönemi - Düşük ya da varyant HBsAg ile kronik infeksiyon - GHB (seropozitif) - Yalancı pozitif		- OBI (seropozitif) - Yalancı pozitif		- Pencere Dönemi - Düşük ya da varyant HBsAg ile kronik infeksiyon - GHB - Yalancı pozitif	

(*) GHB; Gizli hepatit B infeksiyonu

HBsAg nonreaktif / NAT reaktif

Kantitatif PCR'da pozitif sonuç alınan numunelerin dağılımı
n=435 (435/773→ %56)

		Anti-HBc Negatif				Anti-HBc Pozitif					
HBV DNA (IU/mL)		Anti-HBs Negatif		Anti-HBs Pozitif		Anti-HBs Negatif		Anti-HBs Pozitif		Toplam	
	<20	18	4,14%	13	2,99%	117	26,90%	123	28,28%	271	62,30%
	20-99	7	1,61%	6	1,38%	54	12,41%	61	14,02%	128	29,43%
	100-199			2	0,46%	12	2,76%	8	1,84%	22	5,06%
	200-399	1	0,23%			5	1,15%	3	0,69%	9	2,07%
	400-1000					2	0,46%			2	0,46%
	>1000	1	0,23%	1	0,23%	1	0,23%			3	0,69%
	Toplam	27	6,21%	22	5,06%	191	43,91%	195	44,83%	435	100,00%
Olası durum*		1. Pencere Dönemi - GHB (seronegatif) - Kontaminasyon		GHB (seronegatif)		2. Pencere Dönemi - Düşük ya da varyant HBsAg ile kronik infeksiyon - GHB (seropozitif)		GHB (seropozitif)		- Pencere Dönemi - Düşük ya da varyant HBsAg ile kronik infeksiyon - GHB	

%10

Pencere Dönemi
GHB (primer)

%10

GHB

%40

GHB

%40

GHB

Serolojik test sonuçlarına göre genellikle beklenen oranlar

HBsAg nonreaktif / NAT reaktif

(İndeks numunelerde kantitatif PCR sonucu negatif bulunan 338 bağışçının 69'undan alınan takip numunelerinde gerçekleştirilen testler)

			Takip numunesi						
Anti-HBc	Anti-HBs	n	n	HBV DNA (IU/mL)	HBsAg	Anti-HBc	Anti-HBs	Anti-HBs değişim	Olası Durum
Nonreaktif	Nonreaktif	8	1	25	-	+	-		Pencere Dönemi-1
			1	<10	-	+	+		Pencere Dönemi-1
			1	Hedef Saptanmadı	-	-	-		Yalancı pozitif
			4	Hedef Saptanmadı	-	+	-		GHB (Dalgalanan DNA)
			1	Hedef Saptanmadı	-	+	+	34	GHB (Dalgalanan DNA)
Nonreaktif	Reaktif	10	6	Hedef Saptanmadı	-	-	+	↑ (4) / ↓ (2)	Yalancı pozitif
			4	Hedef Saptanmadı	-	+	+	↓ (1)	? (Anti-HBc doğrulanmalı)
Reaktif	Nonreaktif	27	9	<10 (5) / 18-56(4)	-	+	-		GHB (Dalgalanan DNA)
			14	Hedef Saptanmadı	-	+	-		Yalancı pozitif
			4	Hedef Saptanmadı	-	+	+	10.1/14.8/ 29.1/43,3	Yeni numune ile anti-HBs düzeyi izlenmeli (PD-2 ?)
Reaktif	Reaktif	24	2	<10 94	S/CO; 6.2 S/CO; 7.2	+	+	61.1→56.9 20.5→22.5	OBI (Reaktivasyon?) (HBsAg re-seroconversion)
			1	15	-	+	-	15.1→8.3	Pencere Dönemi-2/ GHB
			8	<10 (4) / 10-36 (4)	-	+	+		Pencere Dönemi-2/ GHB
			1	Hedef Saptanmadı	+ (S/CO; 2.2)	+	+	38.2→39.4	HBsAg nötralizasyon çalışılmalı (Yalancı pozitif?)
			11	Hedef Saptanmadı	-	+	+		Yalancı pozitif
			1	Hedef Saptanmadı	-	+	-	18.6→7.0	Yalancı pozitif

HBsAg nonreaktif / NAT reaktif

(İndeks numunelerde kantitatif PCR sonucu negatif bulunan 338 bağışçının 69'undan alınan takip numunelerinde gerçekleştirilen testler)

Takip numunesi

Anti-HBc	Anti-HBs	n	n	HBV DNA (IU/mL)	HBsAg	Anti-HBc	Anti-HBs	Anti-HBs değişim	Olası Durum
Nonreaktif	Nonreaktif	8	1	25	-	+	-		Pencere Dönemi-1
			1	<10	-	+	+		Pencere Dönemi-1
			1	Hedef Saptanmadı	-	-	-		Yalancı pozitif
			4	Hedef Saptanmadı	-	+	-		GHB (Dalgalanan DNA)
			1	Hedef Saptanmadı	-	+	+	34	GHB (Dalgalanan DNA)
Nonreaktif	Reaktif	10	6	Hedef Saptanmadı	-	-	+	↑ (4) / ↓ (2)	Yalancı pozitif
			4	Hedef Saptanmadı	-	+	+	↓ (1)	? (Anti-HBc doğrulanmalı)
Reaktif	Nonreaktif	27	9	<10 (5) / 18-56(4)	-	+	-		GHB (Dalgalanan DNA)
			14	Hedef Saptanmadı	-	+	-		Yalancı pozitif
			4	Hedef Saptanmadı	-	+	+	10.1/14.8/ 29.1/43,3	Yeni numune ile anti-HBs düzeyi izlenmeli (PD-2 ?)
Reaktif	Reaktif	24	2	<10 94	S/CO; 6.2 S/CO; 7.2	+	+	61.1→56.9 20.5→22.5	OBI (Reaktivasyon?) (HBsAg re-seroconversion)
			1	15	-	+	-	15.1→8.3	Pencere Dönemi-2/ GHB
			8	<10 (4) / 10-36 (4)	-	+	+		Pencere Dönemi-2/ GHB
			1	Hedef Saptanmadı	+ (S/CO; 2.2)	+	+	38.2→39.4	HBsAg nötralizasyon çalışılmalı (Yalancı pozitif?)
			11	Hedef Saptanmadı	-	+	+		Yalancı pozitif
			1	Hedef Saptanmadı	-	+	-	18.6→7.0	Yalancı pozitif

HBsAg nonreaktif / NAT reaktif

n=840

Kantitatif PCR

Numune yetersiz
(şahit numuneden çalışmalar yapılacaktır)

n=67

n=773

Hedef Saptanmadı
n=338

Pozitif
n=435

Takip numunesi
alındı
n=69

Takip numunesi henüz
temin edilemedi
n=269

Anti-HBc ve Anti-HBs
negatif
n=27

Anti-HBc ve/veya Anti-HBs
pozitif
n=408

▪ Pencere Dönemi-1
▪ Pencere Dönemi-2
▪ GHB
▪ GHB (Dalgalanan
HBV DNA)

n=27

Yalancı
Pozitif

n=33

Henüz
karar
verilemedi
(Ek
çalışmalara
ihtiyaç var)

n=9

Henüz
karar
verilemedi
(Ek
çalışmalara
ihtiyaç var)

n=269

▪ 1. Pencere Dönemi
▪ GHB (seronegatif)
▪ Kontaminasyon

Henüz karar
verilemedi
(Kontaminasyon
olasılığını dışlamak
için takip numunesi
gerekli)

n=27

▪ Pencere Dönemi-2
▪ GHB (seropozitif)
▪ Düşük ya da
varyant HBsAg ile
kronik infeksiyon

n=408

HBsAg nonreaktif / NAT reaktif

- Pencere Dönemi-1
- Pencere Dönemi-2
- GHB
- GHB (Dalgalanan HBV DNA)

n=27

**Yalancı
Pozitif**

n=33

Henüz
karar
verilemedi
(Ek
çalışmalara
ihtiyaç var)

n=9

Henüz
karar
verilemedi
(Ek
çalışmalara
ihtiyaç var)

n=269

Henüz karar
verilemedi
(Kontaminasyon
olasılığını dışlamak
için takip numunesi
gerekli)

n=27

- Pencere Dönemi-2
- GHB (seropozitif)
- Düşük ya da varyant HBsAg ile kronik infeksiyon

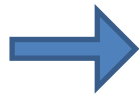
n=408

435

HBsAg negatif/ NAT pozitif → 840/1.436.555

HBV NAT verimi → 435/1.430.327 → 1/3288

2007-2008'deki
ilk NAT çalışmalarında



KMBKM (İstanbul, TMA yöntemi, ID-NAT, 18200 donasyon → 1/1626
OABKM (Ankara, RT-PCR yöntemi, MP-6, 17262 donasyon → 1/2466

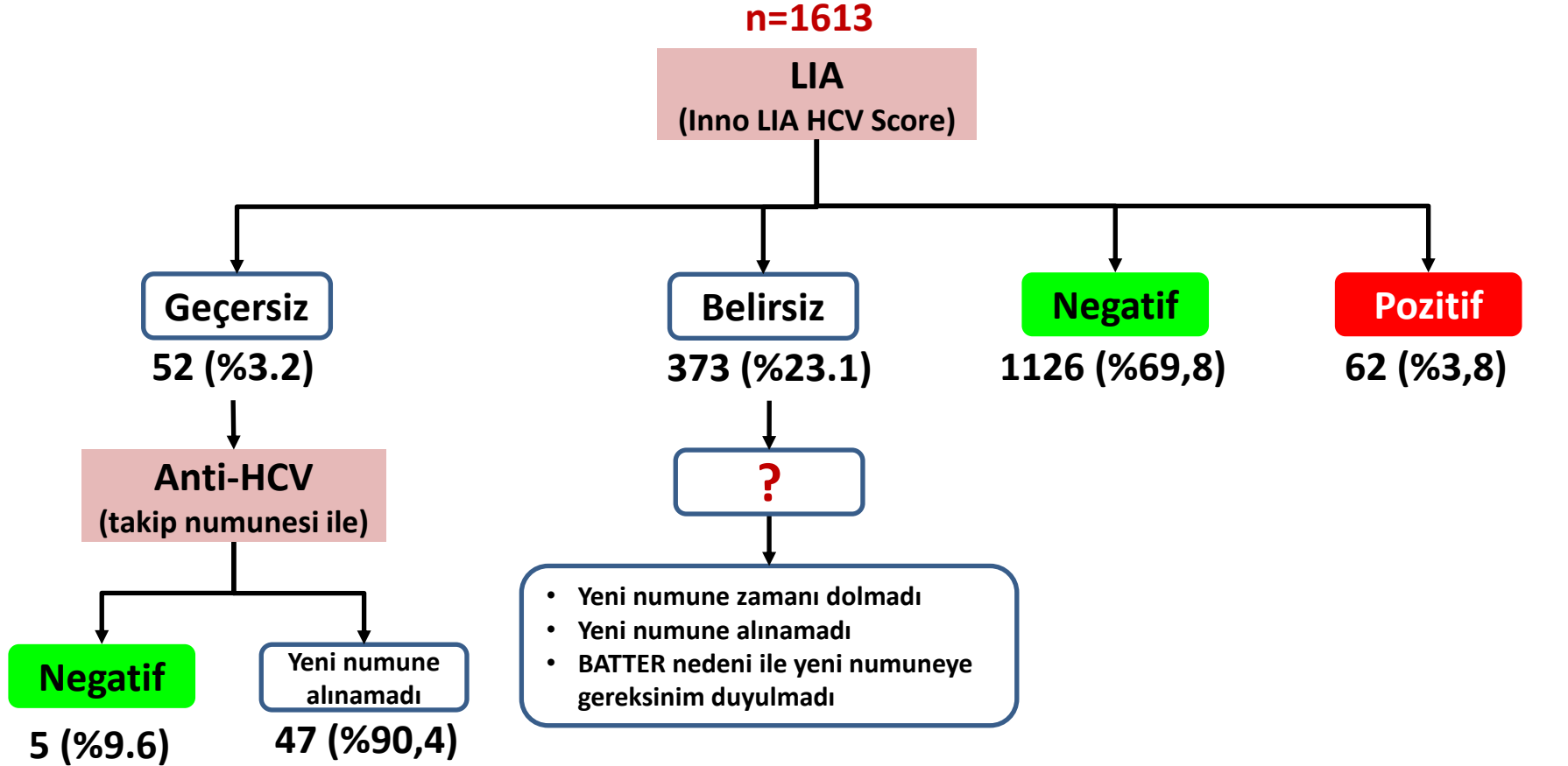
Seroloji reaktif / NAT nonreaktif

5.480/1.436.555

%0.38

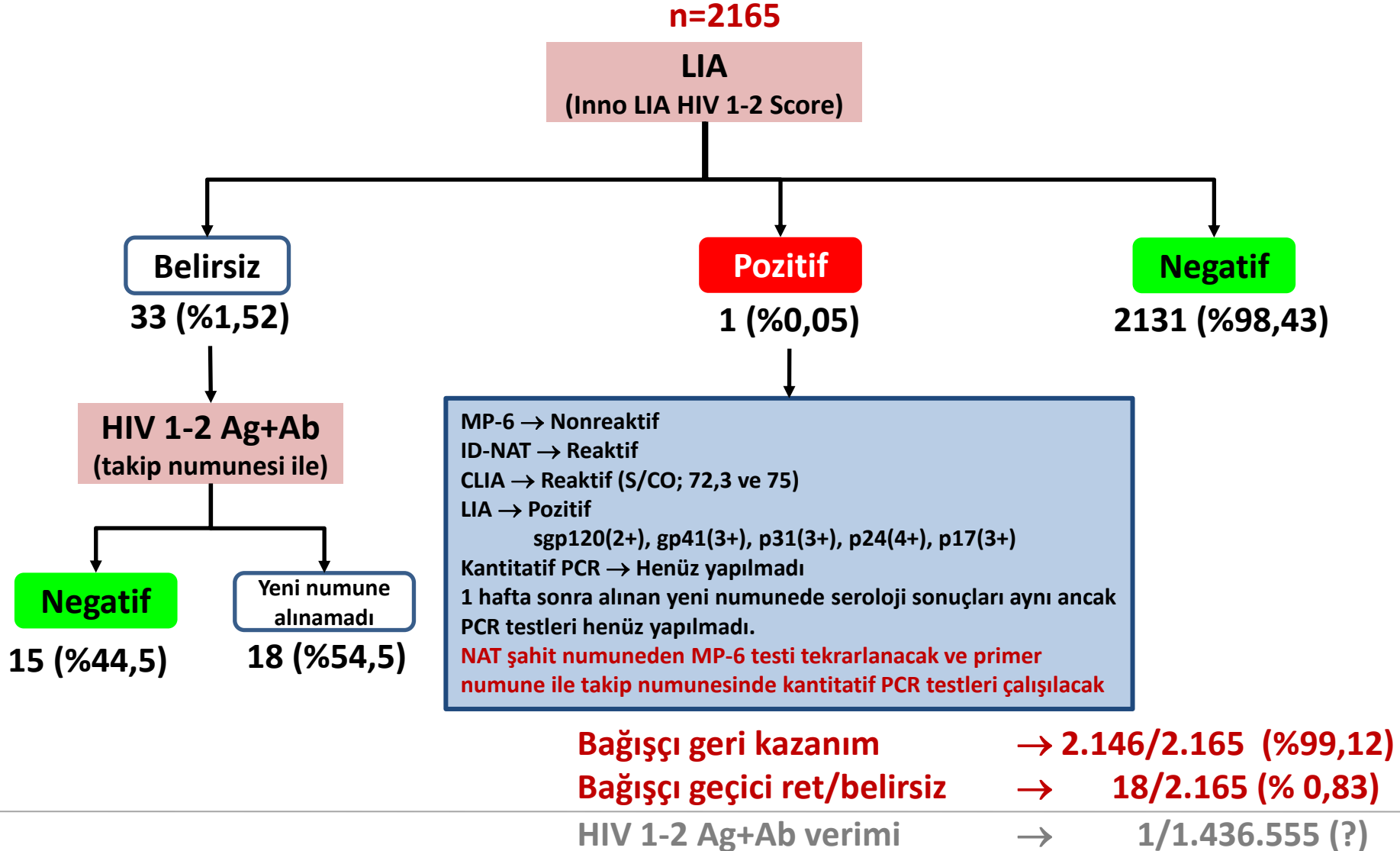
381/100.000

Anti-HCV reaktif / NAT nonreaktif (1.613/1.436.555)
(112/100.000)

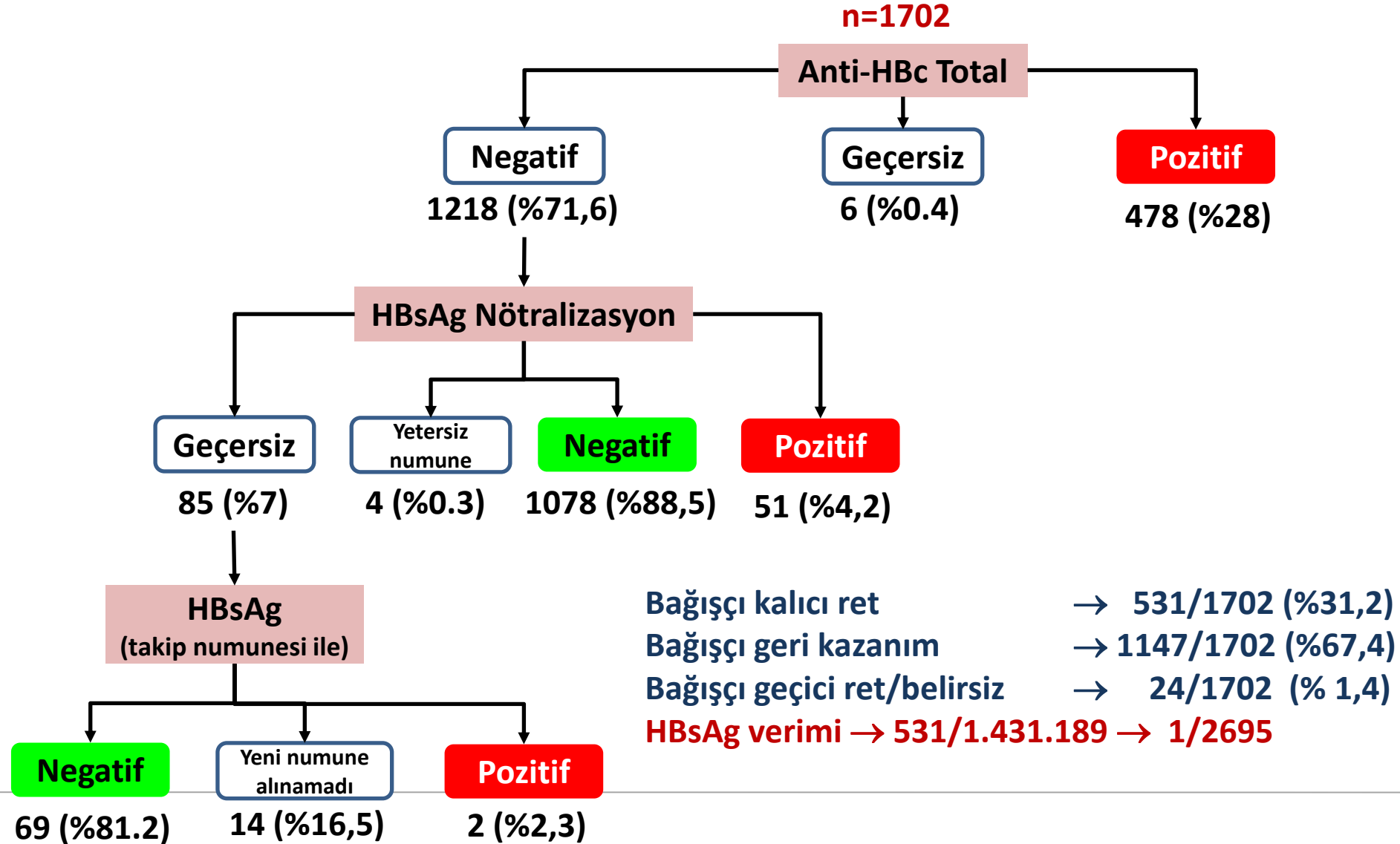


Bağışçı kalıcı ret (DOTER) → 62/1613 (%3,8)
Bağışçı geri kazanım → 1131/1613 (%70,1)
Bağışçı geçici ret/belirsiz → 420/1613 (%26,1)
Anti-HCV verimi → 62/1.436.394 → 1/23.168

HIV 1-2 Ag+Ab reaktif / NAT nonreaktif (2.165/1.436.555)
(151/100.000)



HBsAg reaktif / NAT nonreaktif (1.702/1.436.555)
(118/100.000)



Serolojik tarama ve NAT testlerinde verim

	Seroloji	NAT			
HBV	-	+	NAT verimi	1/3288	30,41/100.000
	+	-	HBsAg verimi	1/2695	37,10/100.000
HCV	-	+	NAT verimi	1/358.700	0,28/100.000
	+	-	Anti-HCV verimi	1/23.168	4,32/100.000
HIV	-	+	NAT verimi	1/717.149	0,14/100.000
	+	-	HIV 1-2 Ag+Ab verimi	?	?



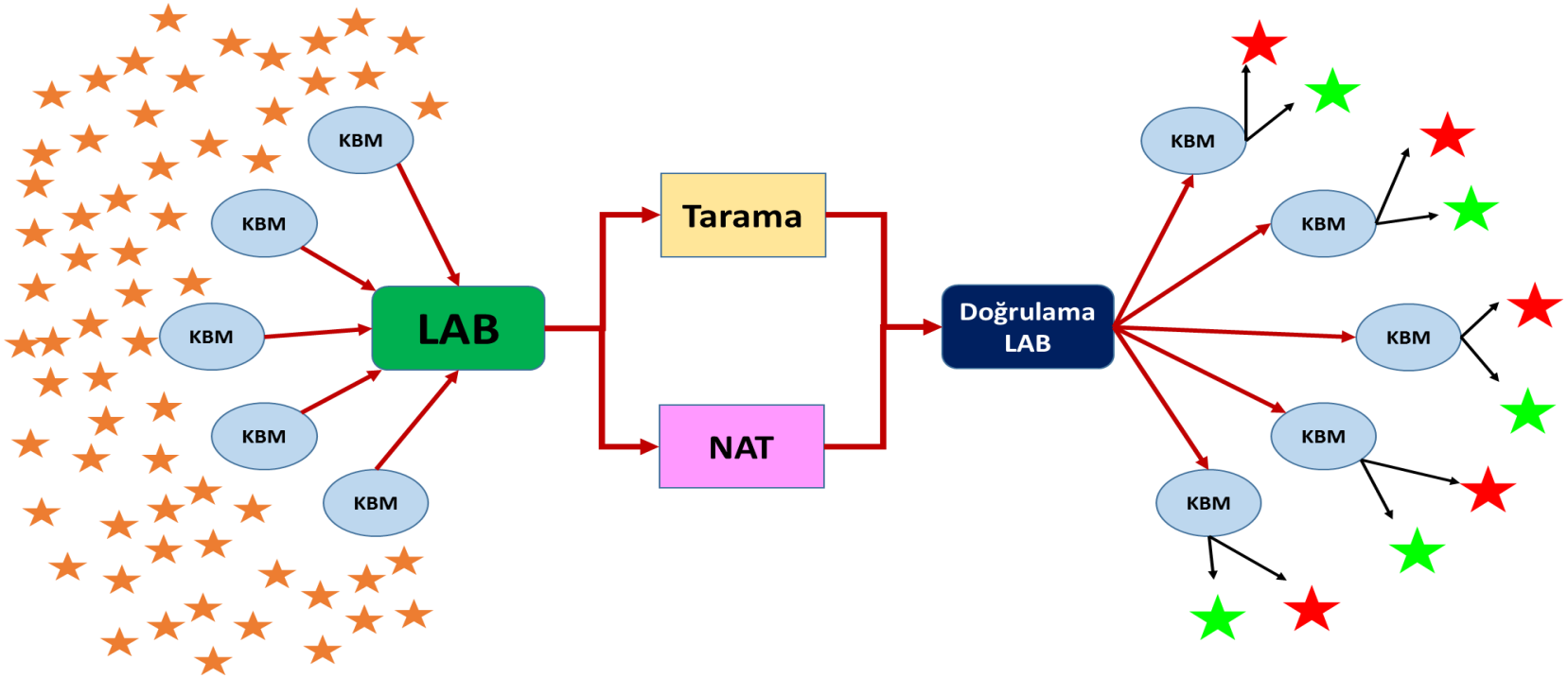
NAT, serolojik tarama ve doğrulama testlerinin önemini azaltmıyor, birbirlerinin yerine kullanılamazlar

Özellikle HBsAg testi (HBsAg nötralizasyonu ile doğrulama ve anti-HBc'nin destekleyesi test olarak kullanılması şartıyla) HBV NAT ile birbirine yakın önemdedir



***Literatür taramalarında çalışma verileri kıyaslanırken
çalışmada kullanılmış olan test türü ve yöntemleri ile
olguların analizinde ve HBV enfeksiyonu türünün
(özellikle Gizli Hepatit B) tanımlanmasında kullanılmış
olan ifadelerin dikkatli incelenmesi gereklidir
Aksi takdirde yanıltıcı/hatalı yorumlara varılabilir***

HER BAĞIŞÇI BİR YILDIZDIR



KMBKM Laboratuvarları





Teşekkürler

1) Primer numunedeki HBV DNA pozitifliğinin doğrulanması

- Özellikle yalancı pozitif ile gerçek pozitiflerin ayırımını sağlar

2) Moleküler ve serolojik belirteçlerin karşılaştırılması

- Bağışçıdaki HBV enfeksiyonunun doğrulanmasını sağlar (özellikle GHB ve kaçak mutantları)

3) Bağışçıdan alınacak yeni numunede (takip numunesi) ya da arşiv numunesinde (şahit numune) serolojik belirteçlerin irdelenmesi

- Pencere dönemi / GHB / kontaminasyon ayırımını sağlar

*Diagnostic algorithm for HBV safe transfusion
Allain JP, Candotti D; Blood Transfus 2009; 7: 174-82*

İyi planlanmış bir algoritma;

hem bağışçının doğru bilgilendirilmesini ve yönlendirilmesini

hem de look-back (bağışçıdan hastaya iz sürme) sürecinin etkin şekilde yürütülmesini sağlar

1) Primer numunedeki HBV DNA pozitifliğinin doğrulanması

e) Kantitatif PCR

- Tarama testine eşit veya daha yüksek duyarlılıkta ise ciddi avantajlar sağlar
 - Uygulanması kolaydır
 - Viral yük de (HBV DNA) belirlenebildiğinden infektivite derecesi ve sınıflandırma için dolaylı katkı sağlar;

olguların çoğunda

- | | |
|---------------------------|--------------|
| • Gizli hepatit B (GHB) → | < 100 IU/mL |
| • Pencere dönemi → | > 100 IU/mL |
| • Kaçak mutant → | > 1000 IU/mL |

2) Moleküler ve serolojik belirteçlerin karşılaştırılması

a) Anti-HBc

- Düşük HBV prevalansı → Tarama NAT pozitifliğini doğrular (yüksek özgüllükteki bir kit ile tekrarlanması durumunda standart doğrulama yöntemi olarak kullanılabilir)
- Yüksek HBV prevalansı → Tarama NAT yalancı pozitif/ Gerçek pozitif ayırımını sağlamaz

b) HBeAg/ anti-HBe

- Anti-HBc pozitifliğinin doğrulanması için kullanılabilir.

c) Anti-HBc IgM

- Kronik GHB ile HBV enfeksiyonu erken iyileşme dönemi arasında ayırım sağlar

2) Moleküler ve serolojik belirteçlerin karşılaştırılması

d) Anti-HBs

- Yüksek → infektivitenin olmadığını işaret eder
- Düşük → infektiviteyi dışlamaz
(özellikle immün sistemi baskılanmış hastalarda koruyucu değildir)

e) Alternatif HBsAg testi (tarama testine göre daha yüksek duyarlılıkta ise)

- Düşük düzeydeki HBsAg'yi saptar → akut/kronik infeksiyon ayırımını sağlar
- Mutantları tespit edebilir

3) Bağışçıdan alınacak yeni numunede (takip numunesi) ya da arşiv numunesinde (şahit numune) serolojik belirteçlerin irdelenmesi

a) Takip numunesi

- Tamamlayıcı moleküler ve serolojik testler
→ Pencere dönemi / GHB / kontaminasyon ayırımını sağlar
- İndeks donasyondan yaklaşık 6 ay sonra temin edilmesi gerekir ancak bağışçıların yaklaşımı farklılıklar gösterir, geri dönüş oranı düşüktür

b) Önceki bağışlara ait arşiv numuneleri

- GHB tanısını destekleyebilir ancak pencere dönemi ayırımını sağlamaz
(Ag ve Ab henüz nonreaktiftir)

HBsAg nonreaktif / NAT reaktif

Duyarlılığı
daha yüksek
(~ 0,1 IU/mL)
ya da daha
geniş varyant
saptama
yeteneği olan
kit ile

Indeks numune

Alternatif HBsAg	Anti-HBc IgM	Anti-HBc IgG	Anti-HBs	Yorum
+	+	-	-	Yeni geçirilen (post-acute)
+	-	+	-	Kronik infeksiyon /Varyant HBsAg
-	-	+	-	GHB (Çözülmüş ya da kronik)
-	-	+	+	GHB (Çözülmüş)
-	-	-	-	Primer GHB / Pencere Dönemi / Kontaminasyon

Takip numunesi

HBV DNA	HBsAg	Anti-HBc IgM	Anti-HBc IgG	Anti-HBs	Yorum
+	+	(+)	-	-	Pencere Dönemi
+	-	+	-	-	Pencere Dönemi-2 / Primer GHB
+	-	-	+	+	Pencere Dönemi-2 / Primer GHB
-	-	-	+	-	GHB (Dalgalanan DNA)
-	-	-	+	+	GHB (Dalgalanan DNA)
-	-	-	-	-	Yalancı pozitif

- **Avrupa Komisyonu Rehberi**

- HBsAg 0,130 IU/mL
- 100 IU/mL HBV DNA (ID-NAT)

Guide to the preparation, use and quality assurance of blood components Recommendation No. R (95) 15, 2015, 18th Edition

- **Akut enfeksiyonda HBV DNA 200-400 IU/mL olduğunda HBsAg saptanabilir hale geliyor (1000-2000 kopya /mL)**

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 Kuhns MC1, Kleinman SH; Transfusion. 2004 Sep;44(9):1332-9.

- **Piyasadaki en duyarlı kit; Prism HBsAg**

- Saptama limiti → **0,014-0,018 IU/mL**
0.08-0,1 ng/mL (1 IU= 5.6 Abbott ng)
- **HBsAg analitik duyarlılık 0,004 IU/mL olur ise 59 IU/mL HBV DNA'yı saptayabilir**
(0,02 ng/mL) (200 kopya/mL) (IU=3,41 kopya)

Correlation of improved hepatitis B surface antigen detection limits with hepatitis B virus DNA nucleic acid test yield in blood donations

Martin LA, Stramer SL Khuns MC; Transfusion. 2012 Oct;52(10):2201-8

HBsAg nonreaktif / NAT reaktif

		<u>PEI * standardı (ad)</u> <u>(IU/mL)</u>	<u>ICBS* kantitatif paneli</u> <u>(IU/mL)</u>	<u>2nd WHO standardı**</u> <u>(IU/mL)</u>
HBsAg	EIA	Murex	0,025	0,022-0,052
		Enzygost-5.0	0,021	0,016-0,045
		Enzygost-6.0	0,020	< 0,032
	CLIA	Liaison XL		0,050
		Prism HBsAg	0,021	0,013-0,020

Table S2: Analytical sensitivities of the 70 HBsAg test kits evaluated*

HBsAg test kit ¹⁾ and manufacturers	Catalogue No. ²⁾	Test format	PEI HBsAg ad Stand- ard	ICBS HBsAg Quantitative Panel (sample #, genotype/subtype, country of origin)							
				#220 A/adw2 Jordan	#546 B/ayw1 Vietnam	#570 B/adw2 Vietnam	#516 C/adr Vietnam	#93 D/ayw2 Tunisia	#318 D/ayw3 Brazil	#246 E/ayw4 Ivory Coast	#713 F/adw4 Brazil Manaus
				Detection limits (IU/mL ³⁾)							
Prism HBsAg; Abbott GmbH & Co. KG	3A47-48	ChLI A	0.021	0.017	0.013	0.013	0.014	0.013	0.016	0.013	0.020
Enzygnost HBsAg 5.0 ⁴⁾	OQPW	EIA	0.021	0.016	0.045	0.036	0.044	0.016	0.041	0.033	0.041
Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH ⁵⁾											
Advia Centaur HBsAg Siemens Healthcare Diagnostics Inc. ⁶⁾	03393362	ChLI A	0.023	0.031	0.032	0.024	0.034	0.034	0.040	0.016	0.028
Elecsys HBsAg II Roche Diagnostics GmbH	04687787	ECLI A	0.023	0.058	0.046	0.046	0.041	0.034	0.049	0.029	0.051
Murex HBsAg Version 3 Abbott Murex Biotech, Ltd.	GE34	EIA	0.025	0.033	0.032	0.037	0.031	0.029	0.035	0.022	0.052
DS-IFA-HBsAg ⁴⁾											
RPC Diagnostic Systems	B-1152	EIA	0.035	0.113	0.079	0.080	0.108	0.067	0.076	0.036	0.110
Architect HBsAg Abbott GmbH & Co. KG	6C36	CLMI A	0.038	0.031	0.031	0.031	0.031	0.025	0.044	0.026	0.031

(*) ICBS ;International Consortium for Blood Safety , PEI; Paul-Ehrlich-Institut

(**) 2nd WHO International HBsAg standardı (HBsAg alt tip adw2, genotip A; NIBSC kod numarası: 00/588) 'na göre

Performance evaluation of 70 hepatitis B virus surface antigen (HBsAg) assays from around the world by a geographically diverse panel with an array of HBV genotypes and HBsAg subtypes- Vox Sanguinis (2010) 98, 403–414

- **GHB** → < 200 IU/mL HBV DNA

Occult hepatitis B virus infection

Min-Sun Kwak, Yoon Jun Kim;

World J Hepatol 2014 December 27; 6(12): 860-869

- **GHB** → < 100 IU/mL HBV DNA
- **Pencere dönemi** → > 100 (100-2000) IU/mL HBV DNA
- **Kaçak Mutant** → > 1000 IU/mL HBV DNA
(varyant HBsAg)

Diagnostic algorithm for HBV safe transfusion

Allain JP, Candotti D; Blood Transfus 2009; 7: 174-82

- *Look-back (bağışçıdan hastaya iz sürme) çalışmalarına göre GHB ile bulaş oranı %3-28*
- *GHB olan bağışçılardan bulaş en fazla TDP (%85-100), en az ES (%24) bileşeni ile oluyor.*

Infectivity of blood components from donors with occult hepatitis B infection – results from an Australian lookback programme

C. R. Seed, R. Maloney, P. Kiely;; Vox Sanguinis (2015) 108, 113–122



**Çalışmalarda Gizli Hepatit B enfeksiyonu (GHB)
tanımında farklılıklar var !**

Occult Hepatitis B (OBI); Gizli Hepatit B infeksiyonu (GHB)

Karaciğer	Serum				Tanım
HBV DNA	HBsAg	HBV DNA	Anti-HBc	Anti-HBs	
+	-	-			GHB
+	-	+			
Test edilmesi zordur ve pratik değildir bu nedenle GHB daha çok serum HBV DNA pozitifliği ile tanımlanır	-	?	+	-	GHB (?)
	-	+	-	-	GHB-seronegatif (Primer GHB)
	-	+	+	-	GHB-seropozitif
	-	+	-	+	
	-	+	+	+	



- < 1000 IU/mL
- < 200 IU/mL
- < 100 IU/mL

Serum				Tanım
HBsAg	HBV DNA	Anti-HBc	Anti-HBs	
-	?	+	-	GHB (?)

HBV DNA testi yapılamadığında,
ya da intermitant HBV DNA olabileceği dikkate alınarak
izole anti-HBc pozitifliği GHB olarak tanımlanabilmektedir



Kullanılan kitin duyarlılık ve özgüllüğüne bağlı olarak; yalancı negatiflik / yalancı pozitiflik

- *Anti-HBc pozitif kişilerin tümünde HBV DNA pozitif değildir*
- *Anti-HBc negatifliği, seronegatif GHB'yi dışlamaz.*

HBsAg nonreaktif / NAT reaktif

Tüm GHB'lerin
%20'sinden
fazlası



Serum				Tanım
HBsAg	HBV DNA	Anti-HBc	Anti-HBs	
-	+	-	-	GHB (seronegatif)



- *Primer GHB*
- *Akut infeksiyon - Pencere Dönemi-1 (pre-HBsAg)*
- *Akut infeksiyon (iyileşme fazında)- Pencere Dönemi-2 (post-HBsAg)*
- *HBsAg varyant*
- *Kontaminasyon (yalancı HBV DNA pozitifliği)*

HBsAg nonreaktif / NAT reaktif

	Real Time PCR	Yöntem türü	Numune Hacmi	LOD (%95)	PROBIT Analizi (%95)*
Tarama	ROCHE Cobas s 201 TaqScreen MPX v2.0 (1 IU=5 kopya)	Kalitatif	1 mL (ID-NAT)		2,3 IU/mL (2.0-2.8) (MP6: 13,8 IU/mL) 12.0-16.8
Doğrulama	ROCHE Cobas Ampliprep/Cobas TaqMan HBV Test, version 2.0 (1 IU=5,82 kopya)	Kantitatif		< 20 20 IU/mL	9 IU/mL (6.8 -12.1) (EDTA'lı plazma)
	ABBOTT m2000 Real Time HBV (1 IU=3,41 kopya)	Kantitatif	0,5 mL	< 10 10 IU/mL	6.40 IU/mL (3.97-13.03)
			0,2 mL	15 IU/mL	10.66 IU/mL (7.11-19.38)

(*) WHO International Standard for Hepatitis B Virus DNA for NAT Assays (NIBSC code 97/746)



Gerçek pozitiflerde kantitatif PCR negatif bulunabilir → Bağışçıdan alınacak yeni numune ile desteklenmeli

İndeks numunede kantitatif PCR pozitif bulunmasına rağmen anti-HBc ve anti-HBs nonreaktif ise kontaminasyon olasılığı dışlanmalıdır → Bağışçıdan alınacak yeni numune ile desteklenmeli

- *Örnekleme etkisi ya da Poisson distribution*

- *Taqscreen MPX v.2.0*

- *LOD %50 ; ID-NAT → 0,46 IU/mL MP-6 → ~1,56 IU/mL*

- *LOD %70 ve %75; ID-NAT → 0,78 ve 0,90 IU/mL**

- *Kantitatif PCR sonucu <6 IU/mL olan bir numunede HBV DNA düzeyini 5 IU/mL varsayılır ise MP6'da ~0,83 IU/mL olur ki bu da tarama kitinin LOD %70-LOD %75 aralığına denk gelir*

- *Kitlerin saptama limitleri WHO HBV standardına (NIBSC code 97/746) göre belirlenir. Oysa kitlerin performansları bu standart (genotip A2) dışındaki genotip ve subtiplerde farklılık gösterebilir.*

