



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



**HEPATİT B, C VE D VİRÜSLERİ İÇİN BİRİNCİL
REFERANS MATERYALLERDEN KALİBRE EDİLMİŞ
İKİNCİL REFERANS MATERYALLERİN HAZIRLANMASI**

Mehtap KIZILPINAR

**DİSİPLİNLERARASI HEPATOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

DANIŞMAN

Prof. Dr. A. Mithat BOZDAYI

ANKARA

2017

Mehtap KIZILPINAR

**DİSİPLİNLERARASI TEMEL HEPATOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

2017

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**HEPATİT B, C VE D VİRÜSLERİ İÇİN BİRİNCİL REFERANS
MATERYALLERDEN KALİBRE EDİLMİŞ İKİNCİL
REFERANS MATERYALLERİN HAZIRLANMASI**

Mehtap KIZILPINAR

**DİSİPLİNLERARASI HEPATOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

DANIŞMAN

Prof. Dr. A. Mithat BOZDAYI

**Bu araştırma Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu'nun 213S130
no'lu projesi ile desteklenmiştir.**

ANKARA

2017

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Yüksek Lisans tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Hepatit B, C ve D Virüsleri İçin Birincil Referans Materyallerden Kalibre Edilmiş İkincil Referans Materyallerin Hazırlanması ” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir. Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin

Adı Soyadı: Mehtap KIZILPINAR

Tarih: 13.09.17

İmza:

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Disiplinlerarası Temel Hepatoloji Anabilim Dalında Mehtap KIZILPINAR tarafından hazırlanan “Hepatit B, C ve D Virüsleri İçin Birincil Referans Materyallerden Kalibre Edilmiş İkincil Referans Materyallerin Hazırlanması” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak OY BİRLİĞİ ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 13/09/2017

Prof. Dr. A. Mithat BOZDAYI
Ankara Üniversitesi
Jüri Başkanı

Prof. Dr.
Kayhan ÇAĞLAR
Gazi Üniversitesi
Jüri Üyesi

Yard. Doç. Dr.
Senem Ceren ÖZEN KARATAYLI
Ankara Üniversitesi
Jüri Üyesi

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
İçindekiler	iv
Önsöz	vii
Simgeler ve Kısaltmalar	viii
Şekiller	xi
Çizelgeler	xii
1. GİRİŞ	1
1.1. Hepatit B, C ve D Virüslerinin Epidemiyolojisi	2
1.2. Hepatit Virüslerinin Moleküler Tespiti	3
1.2.1. Protein Temelli Metotlar	4
1.2.2. Nükleik asit Temelli Metotlar	6
1.3. Standardizasyon ve Harmonizasyon	7
1.3.1. Uluslararası Standardizasyon Kuruluşu (International Organization for Standardization - ISO)	8
1.3.2. Laboratuvar Tıbbında İzlenebilirlik Uzman Komitesi (The Joint Committee for Traceability in Laboratory Medicine - JCTLM)	9
1.3.3. Dünya Sağlık Örgütü Biyolojik Standardizasyon Uzman Komitesi (WHO Expert Committee on Biological Standardization)	10
1.3.3.1. DSÖ Uluslararası Biyolojik Referans Preparatları	10
1.3.3.2. DSÖ Referans Materyallerinin Kurulması	11
1.4. Terimler Sözlüğü	11
1.5. Biyolojik Materyallerin Kalibrasyon Hiyerarşisi	14
1.5.1. Birincil Standartlar (Uluslararası DSÖ Standartları)	15
1.5.2. İkincil Standartlar	15
1.5.3. Üçüncül Standartlar	16
1.5.4. Diğer Kontrol Materyalleri	16
1.6. HBV, HCV ve HDV NAT Birincil Referanslarının Tarihçesi	17
1.6.1. HBV DNA NAT Birincil Referans Materyalleri	17
1.6.2. HCV RNA NAT Birincil Referans Materyalleri	19
1.6.3. HDV RNA NAT Birincil Referans Materyalleri	20
1.7. Biyolojik Referans Materyallerde Önemli Özellikler	21
1.7.1. İzlenebilirlik (Traceability)	21
1.7.2. Değiştirilebilirlik (Communtability)	24
1.7.3. Doğruluk-1, Doğruluk-2, Kesinlik (Accuracy, Trueness, Precision)	25
1.7.4. Belirsizlik (Uncertainty)	26
1.7.5. Kararlılık (Stability)	27
1.7.5.1. Eş Zamanlı Stabilite Çalışmaları	28
1.7.5.2. Hızlandırılmış Termal Degredasyon Çalışmaları	29
1.7.6. Fiziksel Görünüm	29
1.7.7. İmmunolojik ve Genetik Çeşitlilik	30
1.7.8. Bulaşıcılık	30
1.7.9. Matriks, Konsantrasyon ve Hacim	30
1.8. Liyofilizasyon	31

1.8.1. Liyofilizasyonun Tarihi	31
1.8.2. Liyofilizasyonun Prensibi	33
1.8.3. Liyofilizasyonun İşleyişi	34
1.8.3.1. Dondurma (Freezing)	35
1.8.3.2. Birincil Kurutma (Primary Drying)	35
1.8.3.3. İkincil Kurutma (Secondary Drying)	36
1.8.4. Liyofilize Materyallerin Formülasyonunda Yardımcı Maddeler	36
1.8.4.1. Tampon Maddeler	37
1.8.4.2. Hacim Arttırıcı Ajanlar (Bulking Reagents)	37
1.8.4.3. Dengeleyiciler (Stabilizers)	38
2. GEREÇ VE YÖNTEM	40
1.9. Gereçler	40
1.9.1. Hasta Serumları	40
1.9.2. PZR Primerleri ve Problemleri	40
1.9.3. DNA Dizi Analizi Primerleri	43
1.9.4. Kimyasallar	43
1.9.5. Tampon ve Çözeltiler	44
1.9.6. Kullanılan Cihazlar	44
1.9.7. Kullanılan Kitler	45
1.10. Yöntemler	46
1.10.1. HBV, HCV ve HDV Viral Yük Kantitasyonu	46
1.10.1.1. Viral DNA Ekstraksiyonu	46
1.10.1.2. Viral RNA Ekstraksiyonu	47
1.10.1.3. cDNA (Komplementer DNA) Eldesi	48
1.10.1.4. RT-PZR Kurulumu	49
1.10.1.4.1. HBV DNA ve HCV RNA için RT-PZR Kurulumu	49
1.10.1.4.2. HDV RNA için RT-PZR Kurulumu	49
1.10.2. HBV, HCV ve HDV Örneklerinin Dizi Analizleri	50
1.10.2.1. Viral RNA ve DNA Ekstraksiyonu	50
1.10.2.2. PZR Kurulumu	51
1.10.2.3. PZR Ürünlerinin Agaroz Jelde Görüntülenmesi	54
1.10.2.4. PZR Ürünlerinin Silika ile Temizlenmesi	55
1.10.2.5. DNA / cDNA Miktarının NanoDropla Ölçülmesi	55
1.10.2.6. DNA Dizi Analizi PZR Kurulumu	55
1.10.2.7. DNA Dizi Analizi PZR'ın Temizlenmesi	56
1.10.3. Liyofilizasyon Aşaması	57
1.10.3.1. HBV Liyofilizasyonu	57
1.10.3.2. HCV Liyofilizasyonu	59
1.10.3.3. HDV Liyofilizasyonu	60
3. BULGULAR	62
1.11. Dizi Analizleri	62
1.11.1. HDV cDNA Dizi Analizi	62
1.11.2. HBV DNA Dizi Analizi	63
1.11.3. HCV Genom 5' UTR, NS3, NS5A ve NS5B Bölgeleri cDNA Dizi Analizi	64
1.12. Liyofilize Materyallerin Üretim Sonrası Test Edilmesi	65
1.13. Liyofilize Materyallerin Çeşitli Laboratuvarlar Tarafından Test Edilmesi	67

1.14. Liyofilize Materyallerin Stabilizasyon Çalışması Sonrası Test Edilmesi	71
2. TARTIŞMA	75
3. SONUÇ ve ÖNERİLER	79
ÖZET	80
SUMMARY	81
KAYNAKLAR	82
ÖZGEÇMİŞ	92



ÖNSÖZ

Bu çalışma, ülkemiz laboratuvarlarında; çalışma ayırıcı, yürütme kontrolü veya kalibratör olarak kullanılmak üzere ülkemiz genotip dağılımına özgü HBV (Hepatit B), HCV (Hepatit C) ve HDV (Hepatit Delta) ikincil referans materyallerin üretilmesi amacıyla gerçekleştirilmiştir. Çalışmada kullanılan HBV, HCV ve HDV pozitif serum örnekleri Kızılay Orta Anadolu Kan Merkezi ile yapılan bir anlaşma ile temin edilmiştir. Yine çalışmada HBV, HCV ve HDV pozitif örneklerden dilüsyon hazırlama aşamasında kullanılan plazmaferez örnekleri ise Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi İbn-i Sina Hastanesi'nden temin edilmiştir. HBV, HCV ve HDV pozitif serum örnekleri RT- PZR (Gerçek Zamanlı-Polimeraz Zincir Reaksiyonu) ile kantitatif olarak ölçülmüştür. Dilüsyonu gerçekleştirilen örnekler liyofilize edildikten sonra örnekler tekrar kantitatif olarak ölçülmüş ve DSÖ (Dünya Sağlık Örgütü) Birincil Referans Materyalleri'ne karşı kalibre edilmişlerdir. HBV ve HCV liyofilize materyalleri daha sonra çeşitli test teknolojileri kullanan laboratuvarlara gönderilmiştir. Liyofilize HBV, HCV ve HDV örnekler, +4, -20 ve -80°C'lerde muhafaza edilerek 2 ay sonra ölçümleri yapılmıştır. Elde edilen veriler ışığında HBV, HCV ve HDV liyofilize örnekleri ikincil referans materyal olarak kullanılmaya uygun bulunmuştur. Ayrıca çalışmada kullanılan örneklerin çeşitli çalışmalarda kullanılmak üzere dizisi analizleri gerçekleştirilerek FASTA formatında gösterilmiştir.

Bu tez çalışması Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu'nun 213S130 no'lu projesi ile desteklenmiştir. Proje yürütücüsü ve aynı zamanda tez danışmanım olan sayın Prof. Dr. A. Mithat BOZDAYI'ya desteklerinden dolayı sonsuz teşekkürlerimi bir borç bilirim. Enstitüde yüksek lisansa başladığım günden beri desteklerini bir gün bile esirgemeyen, hocalık görevlerinin yanı sıra bana birer abla ve abi olmuş saygıdeğer hocalarım Yard. Doç. Dr. Senem Ceren ÖZEN KARATAYLI ve Doç Dr. Ersin KARATAYLI'ya sonsuz sevgilerimi iletirim. Ankara Üniversitesi Hepatoloji Enstitüsü'ne başladığım ilk günden beri, başımın sıkıştığı her anda bana destek olan Esra YURTÇU'ya, geri kalan enstitü

personellerine çok teŖekkür ederim. Bu süreçte bana manevi desteklerini esirgemeyen dost ve arkadaşlarıma ne kadar teŖekkür etsem azdır. En önemlisi de bana her zaman inanan ve her koşulda destek olan, her ne kadar uzakta olsalar da maddi ve manevi desteklerini hiç esirgemeyen canım aileme ne kadar teŖekkür etsem azdır. Onlara sonsuz minnettarım.



SİMGELER VE KISALTMALAR

A	Adenin nükleotidi (Adenin)
bDNA	Dallanmış (“branched”) DNA
BS	İngiliz Standartları “British Standards”
C	Sitozin nükleotidi (Sitozin)
cDNA	Komplementer Deoksiribonükleik Asit
CMIA	Karbonil Metal İmmün Test
CMV	Sitomegalovirüs (“Cytomegalovirus”)
CLIA	Kemilüminesans İmmün Testi
Ct	Eşik değeri
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	Deoksi nükleotit
dH ₂ O	Distile su
ddH ₂ O	Çift distile su
dk	Dakika
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
IS	Uluslararası Standart
ECBS	Biyolojik Standartlar Uzman Komitesi
ECLIA	Elektro-kemilüminesans İmmün Testi
EDTA	Etilen Diamin Tetra-Asetik asit
EIA	Enzim İmmün Test

ELISA	Enzim Bağımlı İmmünosorbent Testi
G	Guanin nükleotidi (Guanin)
GAPDH	Gliseraldehit 3 fosfat dehidrogenaz
HIV	İnsan İmmün yetmezlik Virüsü (“Human Immunodeficiency Virus”)
HBV	Hepatit B Virüsü
HCV	Hepatit C Virüsü
HDV	Hepatit Delta Virüsü
ISO/EC	Uluslararası Standardizasyon Komisyonu / Avrupa Komisyonu
IVD	<i>In vitro</i> Tanı
JCTLM	Labratuar için İzlenilebilirlik Ortak Komitesi (The Joint Committee for Traceability in Laboratory Medicine”)
MEIA	Mikroparçacıklı Enzim İmmün Testi
MgCl ₂	Magnezyum Klorür
NaOAc	Sodyum asetat
NAT	Nükleik asit Amplifikasyon Teknolojileri
NIH	Ulusal Sağlık Enstitüleri (“National Institutes of Health”)
POCTs	Hasta Başı Testleri (“Point-Of-Care Diagnostic Tests”)
PT/EQA	(“Proficiency Testing/External Quality Assurance”)
RNA	Ribonükleik asit
RIA	Radyo İmmün Test
RT-PZR	Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
sa	Saat

SI	Uluslararası Birim
sn	Saniye
T	Timin nükleotidi (Timin)
Tris-HCl	Tris-Hidroklorür
UTR	Translasyona Uğramayan Bölge (“Untranslated Region”)
VIM	Metrolojinin Temellerinin ve Genel İçeriğinin Uluslararası Sözlüğü ve İlgili Terimler (“International Vocabulary of Metrology Basic and General Concepts and Associated Terms”)



ŞEKİLLER

Şekil 1.1. Dünyada HBV, HCV ve HDV genotiplerinin coğrafik dağılımı.	3
Şekil 1.2. Protein tespitinde yararlanılan indirekt ELISA yöntemi.	5
Şekil 1.3. RT-PZR kimyasalları ve işleyiş prosedürleri.	7
Şekil 1.4. Kalibrasyon hiyerarşisi ve DSÖ'nün uluslar arası standartlarına kadar metrolojik takip.	14
Şekil 1.5. Sağlık laboratuvarında izlenebilirlik.	23
Şekil 1.6. Hata tipi, kalitatif performans özellikleri ve kantitatif ifadeleri arasındaki ilişkiler.	26
Şekil 1.7. Maddelerin faz diyagramı.	33
Şekil 1.8. Liyofilizasyon aşamaları.	34
Şekil 1.9. Liyofilizasyon cihazının temel gösterimi.	34
Şekil 2.1. HDV-A1/A2 ve HDV-B1/B2 primer bağlanma bölgelerinin şematik gösterimi.	50
Şekil 3.1. HDV cDNA dizi analizi fasta formatı.	62
Şekil 3.2. HBV DNA dizi analizi fasta formatı.	63
Şekil 3.3. HCV genom 5' UTR, NS3, NS5A ve NS5B parçalı cDNA dizi analizi fasta formatı.	64
Şekil 3.4. HDV genomunun 1. nükleotitten 377. nükleotide kadar Finch TV Programı ile görüntülenmesi.	65
Şekil 3.5. Liyofilizasyon sonrasında rastgele seçilen HBV, HCV ve HDV liyofilize örneklerinin viral yük dağılımları.	67
Şekil 3.6. Katılımcı laboratuvarların HBV kantitatif ölçüm sonuçlarının histogram grafiği ile ifade edilmesi.	70
Şekil 3.7. Katılımcı laboratuvarların HCV kantitatif ölçüm sonuçlarının histogram grafiği ile ifade edilmesi.	71
Şekil 3.8. Farklı sıcaklıklarda 2 ay muhafaza edilen HBV, HCV ve HDV aday liyofilize ikincil referans materyallerin ortalama viral yüklerinin sütun grafiğinde gösterilmesi.	73
Şekil 3.9. Farklı sıcaklıklarda 2 ay muhafaza edilen ve rastgele seçilerek çalışılan HDV aday liyofilize ikincil referans materyallerin viral yüklerinin RT-PZR ölçüm sonuçları.	73

ÇİZELGELER

Çizelge 1.1. Dünyadaki HBV, HCV ve HDV enfeksiyonu verileri.	3
Çizelge 1.2. İzlenebilirlik ve analit sınıflandırılması.	22
Çizelge 2.1. HDV RNA RT-PZR ve prob dizileri.	41
Çizelge 2.2. HDV tüm genom PZR’de kullanılan primer dizileri.	41
Çizelge 2.3. HBV tüm genom PZR’de kullanılan primer dizileri.	41
Çizelge 2.4. HCV parçalı genom PZR’de kullanılan primer dizileri.	42
Çizelge 2.5. HBV DNA dizi analizinde kullanılan primerler.	43
Çizelge 2.6. Çalışmada kullanılan tampon ve çözeltiler.	44
Çizelge 2.7. HDV RT-PZR kurulumu.	50
Çizelge 2.8. HDV tüm genom PZR içerikleri.	51
Çizelge 2.9. HDV tüm genom PZR koşulları.	52
Çizelge 2.10. HBV tüm genom PZR içeriği.	52
Çizelge 2.11. HBV tüm genom PZR koşulları.	53
Çizelge 2.12. HCV genom PZR içeriği.	53
Çizelge 2.13. HCV genom PZR kurulumu.	54
Çizelge 2.14. DNA Dizi analizi PZR termal döngüleyici döngü sıcaklıkları ve süreleri.	56
Çizelge 2.15. Liyofilizasyon cihazının birincil kurutma başlangıç aşamasındaki basınç ve sıcaklık değerleri.	59
Çizelge 3.1: Liyofilizasyon sonrası 1. ölçüm sonuçları.	66
Çizelge 3.2: Liyofilizasyon sonrası 2. ölçüm sonuçları.	66
Çizelge 3.3: Liyofilizasyon sonrası 3. ölçüm sonuçları.	66
Çizelge 3.4: Katılımcı laboratuvarların kantitatif ölçüm sonuçları.	68

Çizelge 3.5: Stabilite çalışması kapsamında -80°C kantitatif ölçüm sonuçları.	72
Çizelge 3.6: Stabilite çalışması kapsamında -20°C kantitatif ölçüm sonuçları.	72
Çizelge 3.7: Stabilite çalışması kapsamında +4°C kantitatif ölçüm sonuçları.	72



1. GİRİŞ

Laboratuvarlarda dış ve iç kalite kontrol programları, kalibrasyon ve yeterlilik testlerinin uygulanmasında referans materyallerinden yararlanılır. Referans materyali, yeterli homojenliğe ve belirli özellikler açısından stabiliteye sahip materyaldir ve istenilen kullanıma ya da nominal özelliklerin incelenmesine uygun olacak şekilde yapılmış olmalıdır (ISO/EC Guide 99, EP30-A, 1999).

İlk yüksek seviyeli referans ayırıcı olan Uluslararası standart, Biyolojik Standardizasyon Uzman Komitesi (ECBS)'nin Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) Uzman Komitesi girişimi ile oluşturulmuştur. 1990'lı yıllarda DSÖ'nün yaptığı çalışmalarla, İnsan İmmünyetmezlik Virüsü (HIV), Hepatit C Virüsü (HCV) ve Hepatit B Virüsü (HBV) için kanda bulunan virüs belirteçleri kullanılarak uluslararası standartlar geliştirilmiştir. Üretilen preparatlar ile kan güvenliğini, klinik tanı alanlarında kullanılan *in vitro* tahlillerde regülasyonu, harmonizasyonu mümkün hale getirmek amaçlanmıştır (DSÖ, Geneva, 2010).

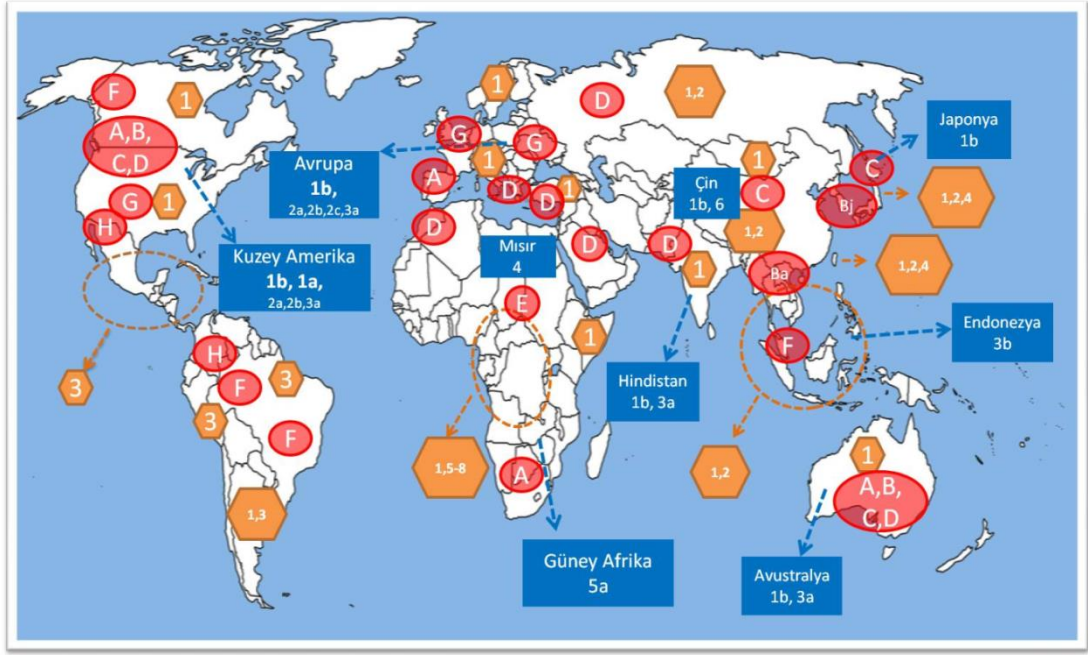
Uluslararası standartların düzenli aralıklarla değiştirilmesine olan ihtiyacı en aza indirmek amacıyla, biyolojik materyalin en yüksek seviyeli standardı olarak DSÖ'nün uluslararası standardının kullanımı ikincil biyolojik referans materyalleriyle sınırlandırılmalıdır.

Ülkemizde bulunan klinik laboratuvarlarda, HBV, HCV ve Hepatit Delta Virüsü (HDV) kaynaklı hastalıkların tanısı ve tedavi sürecinin izlenilmesi amacı ile yapılan test ve deneylerde iç kontrol ve çalışma ayırıcı olarak kullanılmak amaçlı geliştirilmiş ulusal bir referans materyali mevcut değildir. Bu çalışmada ile 2015 yılında Ankara Üniversitesi Hepatoloji Enstitüsü'nde başlatılmış olan ve Tübitak 1003 Projesi kapsamında desteklenen 213S130 no'lu proje ile ulusal referans materyallerin üretilmesi amaçlanmıştır. Bu doğrultuda DSÖ'den temin edilen primer referans materyallere karşı liyofilize edilmiş ikincil referans materyaller hazırlanması

hedeflenmektedir. Hazırlayacağımız ikincil referans materyallerin ileri aşamada test iç (internal) kontrollerde, DNA dizi analizi çalışmalarında ve deney optimizasyonlarında kullanılabilmesi söz konusu olacaktır.

1.1. Hepatit B, C ve D Virüslerinin Epidemiyolojisi

Hepatit virüsleri, karaciğer hepatositlerini infekte eden viral RNA/DNA ajanlarıdır. Hepatit virüsleri, günümüzde hem gelişmiş hem de gelişmekte olan ülkelerde hala ciddi oranda enfeksiyon sebebidir. İleri aşamalarda ise kronik karaciğer hastalıkları, siroz ve hepatoselüler karsinomaya kadar bir hastalık seyri gözlemlenebilir. Kronik enfeksiyonlara sebep olan virüsler ise hepatit B, C ve Delta virüsleridir. Dünyada yaklaşık 2 milyar insanın HBV ile enfekte olduğu ve bu insanlardan yine 240 milyonunun ise kronik HBV enfeksiyonuna sahip olduğu tahmin edilmektedir. Her yıl HBV kaynaklı siroz ve hepatoselüler karsinoma nedeni ile yaklaşık 686 bin kişi hayatını kaybetmektedir (WHO, 2017a). Bunun yanı sıra dünya üzerinde yaklaşık 130 – 150 bin kronik HCV hastası olduğu bilinmekte ve yılda 700 bin kişi HCV kökenli hastalıklardan hayatını kaybetmektedir (WHO, 2017b). HDV ise, replikasyonunun gerçekleşmesi için HBV'ye ihtiyaç duyan bir virüstür ve dünyada yaklaşık 15 milyon insan HBV ile koenfekte şekilde kronik HDV hastasıdır (WHO, 2017c).



Şekil 1.1. Dünyada HBV, HCV ve HDV genotiplerinin coğrafik dağılımı. HBV genotipleri kırmızı oval şekillerle, HCV genotipleri mavi dikdörtgenlerle ve HDV genotipleri ise turuncu beşgenlerle gösterilmiştir. Şekillerin içindeki rakamlar ve harfler ilgili virüsün genotipini göstermektedir (Karataylı, 2014, s.:21).

Çizelge 1.1. Dünyadaki HBV, HCV ve HDV Enfeksiyonu Verileri.

DSÖ Verileri	HBV	HCV	HDV
Toplam Enfeksiyon (2016)	2 milyar	240 milyon	HbsAg (+) hastaların %5'i
Kronik Enfeksiyon (2017)	257 milyon	71 milyon	15 milyon
Ölüm/Yıl	887 bin	399 bin	1,5-2,5 milyon

1.2. Hepatit Virüslerinin Moleküler Tespiti

HBV, HCV ve HDV virüslerinin serolojik ve moleküler olarak tespiti, kronik hepatit enfeksiyonlarına sahip hastaların tedavi seyirlerinin izlenebilmesi ve yönetilebilmesi için oldukça önemlidir.

Her bir tip hepatit virüsünün kendine özgü patojenik seyri mevcuttur. Viral yükün tespitine dayalı yöntemler ise çeşitlidir. Laboratuvarlarda tanıda, saptamada ve bulaşıcı hastalıkların kontrolünde *in vitro* ölçümler yapılmaktadır. Kullanılan *in vitro* tanı testleri (IVD), nükleik asit amplifikasyon tekniği temelli olarak, bulaşıcı elemanların DNA veya RNA'sını saptayan yöntemleri ve bulaşıcı elemanların antijenlerinin ya da antikorlarının saptanmasında kullanılan immunolojik testleri içine almaktadır (WHO/BS/2016.2284). Uygulanan testler ile hasta serumundan elde edilecek HBV DNA ya da HCV/HDV RNA viral yükü ya da antikor miktarları, tedavi yönteminin belirlenmesini sağlar.

HBV, HCV ve HDV enfeksiyonlarının ilk aşamadaki tanısı, bu virüslere karşı antijen ve antikor tespiti için uygulanan serolojik testler ile yapılır. Daha sonraki aşamalarda ise viral yük miktarını ve virüs genotipini tespit etmek amacıyla bir takım kalitatif ve kantitatif testler uygulanır.

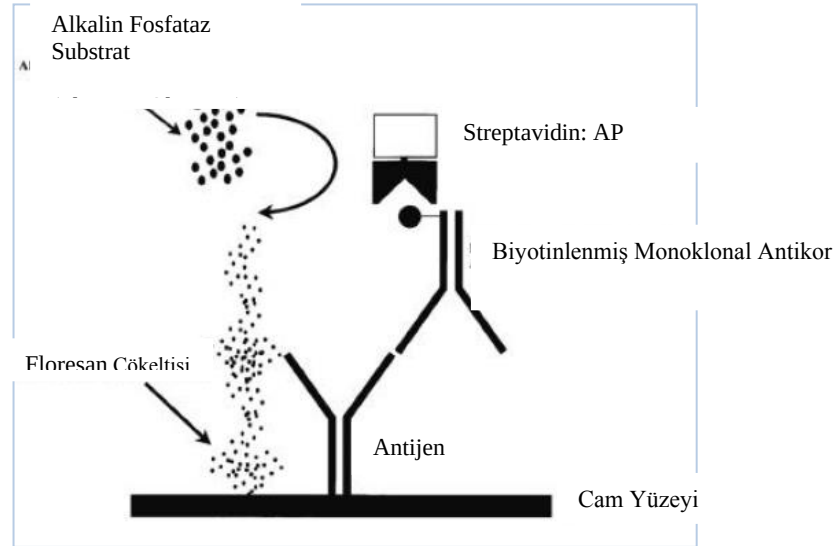
1.2.1. Protein Temelli Metotlar

1965 yılında HBsAg'nin keşfini takiben 1970 yılında “Dane Partikülü” tam olarak tanımlanmıştır (Takahashi ve ark., 1976). Böylece antijen ve antikor temelli çalışmalar ile hastalık etkeninin doğasının çözümlenmesi ve anti-viral bir tedavi seyrinin izlenebilmesinin önü açılmıştır.

Reaktantlardan birinin radyoizotoplara konjuge olduğu Radyo İmmün Test (RIA), HBV tanısı için kullanılan ilk tekniklerdendir (Annesley, 1960). Fakat bu teknik hem maliyetli hem de uygulayan açısından yüksek bir risk taşımaktadır. 1971 yılında ise bu tekniğin yerini, uygun substratın eklenmesiyle birlikte renk değişiminin gözlemlendiği bir teknik olan Enzim İmmün Test (EIA) almıştır (Engvall ve Perlmann, 1971). EIA'nın RIA'ya göre avantajları ise; uygulayan açısından kolaylık sağlaması, daha az maliyetli ve hassas olmasıdır.

EIA'nın bir türevi de Enzim Bağımlı İmmünosorbent Testi (ELISA)'dır. ELISA genellikle belirli bir örneği tespit etmek ya da örneğin miktarını belirlemek amaçlı kullanılan bir metottur (Shah ve Maghsoudlou, 2016). Anti HCV/HBV antikor immünolojik testleri geçmişte de günümüzde de virüse olan maruziyeti belirlemek açısından sık kullanılan bir yöntemdir. Anti-HCV antikorlarının belirlenmesinin, serumda tespit edilen düşük viremi miktarından dolayı HCV RNA'nın negatif olarak belirlendiği durumlarda oldukça faydalı olabileceğini gösteren bazı çalışmalar mevcuttur (Radkowski ve ark., 2005; Carreño ve ark., 2006). Kimi durumlarda ELISA tekniğinin NAT tahlillerine oranla daha objektif, nispeten daha ucuz ve yüksek verimli bir kapasiteye sahip olduğu düşünülmektedir.

RIA ve EIA teknikleri dışında hepatit virüslerinin serolojik tespitinin yapıldığı diğer teknikler ise; Mikroparçacıklı Enzim İmmün Testi (MEIA) (Khuroo ve ark., 2014), Elektro-kemilüminesans İmmün Testi Kemilüminesans İmmün Testi (ECLIA) (Victor ve ark., 2016), Kemilüminesans İmmün Testi (CLIA) (Weber ve ark., 2016), Karbonil Metal İmmün Test (CMIA) (Kim ve ark., 2007) ve Hasta Başı Testleri (Point-Of-Care Diagnostic Tests /POCTs) (Shiykumar ve ark., 2012)'dir.



Şekil 1.2. Protein tespitinde yararlanılan indirekt ELISA yöntemi (Mendoza ve ark., 1999).

1.2.2.Nükleik asit Temelli Metotlar

Viral hepatit DNA, RNA tespitinde kullanılan kalitatif ve kantitatif metodlar, kronik enfeksiyonlarda HBV, HCV ve HDV replikasyonunun nicel ölçümünde, hastalık prognozunun değerlendirilmesinde ve antiviral tedavi sürecinin izlenmesinde oldukça önemlidir (Gupta ve ark, 2014; Behzadi ve ark., 2015).

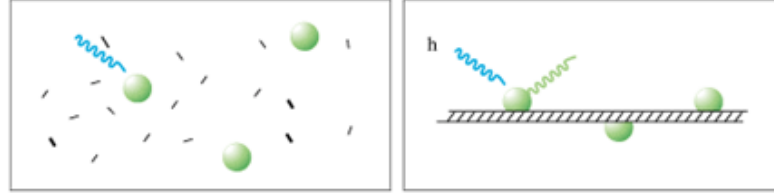
Viral hastalıkların tespitinde geleneksel serolojik tespit yöntemleri ve moleküler olmayan tekniklerin kullanımı zaman zaman yanlış pozitif ve yanlış negatif sonuçların elde edilmesine neden olabilmektedir (Heinrichs ve ark., 2016). Bu durumda serolojik testlere nazaran Nükleik asit Amplifikasyon Teknolojileri (NATs), viral genomik dizilerin spesifik bölgelerinin çoğaltılması tekniğine dayanır ve hassas, hızlı, güvenilirlerdir.

PZR'nin 1981 yılındaki keşfinden bu yana moleküler amplifikasyon teknikleri, klinik tanı için giderek artan bir öneme sahip olmaktadır (Hayden ve ark., 2008). Kullanılan her bir teknik hassaslık, özgüllük ve sahip olduğu dinamik aralık açısından farklılıklar gösterir (Gerlich ve ark., 1995).

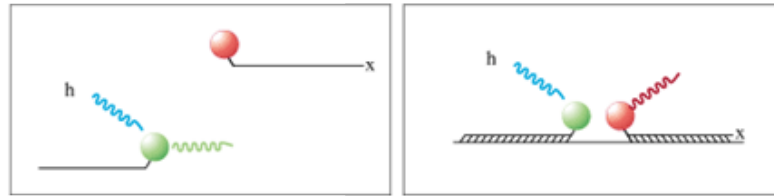
1980'li yıllarda moleküler tespit ve kantitasyon tekniklerindeki çeşitlilik, radyoaktif ya da radyoaktif olmayan DNA prob lar içeren dot ve slot blot hibridizasyonunu (Scotto ve ark, 1983; Valentine-Thon ve ark, 1990; Valentine-Thon ve ark., 1991), HBV DNA-RNA hibritinin kemilüminesans tespitini (Niesters ve ark., 2000) ve mikrokuyucuklu bir plakaya ya da manyetik boncuklara (Marin ve ark., 2001) prob hibridizasyonunu takip etmiştir. Bunların yanı sıra; HBV DNA'nın PZR amplifikasyonunu (Kessler ve ark, 1998; Mantero ve ark, 1991; Valentine-Thon, 1995), HBV DNA-DNA hibritinin dallanmış ("branched") DNA (bDNA) sinyal amplifikasyonu (Hendricks ve ark., 1995), transkripsiyon- aracılı amplifikasyon (Kamisango ve ark., 1999) ve amplifiye edilmiş HBV DNA'nın floresanlı real-time tespiti (Abe ve ark., 1999) gibi çalışmalar izlemiştir. Başlarda kalitatif olan testler zaman içerisinde geliştirilerek kantitatif testler de kullanılmaya

başlanmış ve bu testler sayısız uygulamaya uygun olarak tasarlanmışlardır (Stevens ve ark, 2002).

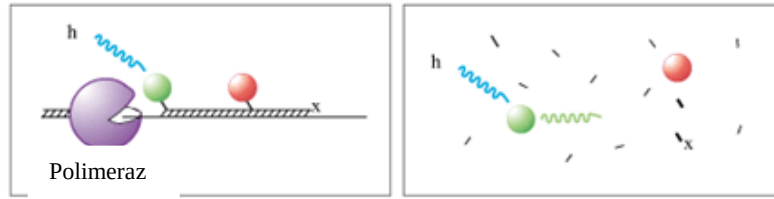
1.SYBR Green



2. Hibridizasyon Problemi



3. TaqMan Problemi



Şekil 1.3. RT-PZR kimyasalları ve işleyiş prosedürleri (Smith ve Osborn, 2009).

1.3. Standardizasyon ve Harmonizasyon

Klinik laboratuvar testleri, hastalığın tanı, tedavi ve seyrinin izlenmesinde önemli rol oynayan araçlardır. Aynı analit örneği için farklı laboratuvarlarda, çeşitli testlerin kullanılarak ölçüm yapılması ile elde edilen sonuçlar arasındaki uyumluluğun sağlanması gerekmektedir. Standardizasyon ve harmonizasyon çalışmaları bu amaç doğrultusunda başlatılmıştır ve günümüzde de hala sürdürülmektedir (Armbruster ve Miller, 2007).

Standardizasyon ve harmonizasyon birbiri ile bağlantılı terimlerdir. Harmonizasyon farklı laboratuvarlarda, farklı zamanlarda ve farklı tekniklerle elde edilen test sonuçlarının uyumlu olmasının sağlanmasını ifade eder (Aslan ve ark,

2011). Standardizasyonun asıl hedefi hasta test sonuçlarının harmonizasyonudur. Harmonizasyon çalışmaları, ulusal ve uluslararası çapta gerçekleştirilmekte olan Dış Kalite Kontrol (DKK) Programları ile birlikte sürdürülmektedir. DKK programları gerçekleştiren kuruluşlara birkaç örnek vermek gerekirse;

1. INSTAND (“Gesellschaft zur Förderung der Qualitätssicherung in medizinischen Laboratorien”) – EQA tests - Almanya
2. RIQAS (“Randox International Quality Assessment Scheme”) - İngiltere
3. QCMD (“Quality Control for Molecular Diagnostics”) – Avrupa Birliği
4. UK - NEQAS (“United Kingdom - International Quality Expertise”) İngiltere
5. ECAT
6. DEQAS (“Danish External Quality Assessment Scheme”)
7. CDC – LQASP (“Centers for Disease Control and Prevention – Laboratory Quality Assurance and Standardization Programs”)
8. NIST (“National Institute of Standards and Technology”) - ABD
9. API (“American Proficiency Institute”)
10. NOKLUS (“Norsk kvalitetsforbedring av laboratorievirksomhet utenfor sykehus”) – Norveç

Ülkemizde tıbbi laboratuvarların iç kalite kontrol (İKK) ve DKK çalışmalarının sonuçlarını toplayıp değerlendiren ulusal bir sistem mevcut değildir (Aytekin ve ark, 2009).

1.3.1. Uluslararası Standardizasyon Kuruluşu (“International Organization for Standardization” – ISO

ISO, dünya üzerindeki ülkelerin çoğu olmak üzere, 163 ulusal standart kurumunun üyeliğini bünyesinde barındıran bağımsız, hükümet-dışı bir uluslararası organizasyondur.

ISO, 1946 yılında 25 ülkeden delegelerin katılımı ile Londra’da gerçekleşen “Institute of Civil Engineers” toplantısında alınan kuruluş kararı ile birlikte faaliyetlerine başlamıştır. Bu çalışmalarla uluslararası koordinasyonu sağlamak ve endüstriyel standartları birleştirmek amaçlanmıştır (ISO, 2017a).

İlk ISO standardı, “ISO/R 1:1951 *“Standard reference temperature for industrial length measurement”* 1951 yılında yayımlanmıştır. İlk standart yayımlanma zamanından itibaren defalarca güncellenmiştir ve günümüzde; “ISO 1:2002 *“Geometrical product specification” (GPS) – “Standard reference temperature for geometrical product specification”* şeklindedir (ISO, 2017a).

1960 yılında ise, birimler ve miktarlar üzerine olan ISO 31 standardı yayımlanmıştır (ISO 80 000 ile yer değiştirmiştir). ISO 31, SI (“Système international d’unités”)’e dayanmaktadır. SI, her kantite (miktar) için bir birim sergiler (Örn; aralık için metre, zaman için saniye kullanımı vb). SI sisteminin amacı, ölçüm birimlerinde dünya çapında bir kabul görüş sağlamaktır. ISO 80 000, bu birimler ve birimlerin nasıl kullanılacakları üzerinedir (ISO, 2017b).

1.3.2. Laboratuvar Tıbbında İzlenebilirlik Uzman Komitesi (“The Joint Committee for Traceability in Laboratory Medicine” - JCTLM)

Klinik laboratuvarlar, test sonuçları arasındaki eşdeğerliği, karşılaştırılabilirliği ve güvenilirliği sağlamak amacıyla uluslararası standardizasyona yönelmelidirler. Standardizasyonu sağlamada ilk adım ise kullanıma özgü referans materyallerini ve metotlarını belirlemektir. Bu nedenle, bu alandaki eksikliklerin giderilebilmesi amacıyla 2002 yılında, JCTLM, uluslar arası yeni bir konsorsiyum kurulmuştur. Bu birlik; klinik laboratuvarlardan, devlet kurumlarından ve üreticilerden uzman temsilcilerin bir araya gelmesiyle oluşturulmuştur. JCTLM’nin çalışmaları, ISO Standartları çerçevesinde uygun yüksek seviye referans materyallerin ve metodların kullanılmasıyla test sonuçlarının kesinliğinin sağlanmasını hedeflemektedir (Armbruster ve Miller, 2007).

1.3.3. DSÖ Biyolojik Standardizasyon Uzman Komitesi (“WHO Expert Committee on Biological Standardization- WHO ECBS”)

DSÖ Biyolojik Standardizasyon Uzman Komitesi (ECBS), DSÖ tarafından kan ürünleri, hücre düzenleyicileri, aşılar ve ilgili *in vitro* tanı testlerinin üretimi, ruhsatlandırılması ve kontrolü için detaylı tavsiyeler ve kılavuzlar oluşturmak üzere görevlendirilmiştir. Uzman komite üyeleri ulusal denetim kuruluşlarından, araştırma enstitülerinden, halk sağlığı kurumlarından ve ilaç endüstrisinden ilgili organizasyonların temsilcilerinden bireysel uzmanlar olarak hareket eden bilim insanlarından oluşmaktadır. Komite kararları ve tavsiyeleri, kamu sağlığına ilişkin bilimsel ilkelere ve düşüncelere dayanmaktadır (WHO, 2017d).

1947 yılından bu yana Biyolojik Standardizasyon Uzman Komitesi, yıllık olarak toplanmaktadır. DSÖ Uluslararası Biyolojik Referans Hazırlıkları (“*WHO International Biological Reference Preparations*”)’nın planlanmasından ve DSÖ Tavsiyeler ve Kılavuzlar (“*WHO Recommendations and Guidelines*”)’ın kabulünden sorumludur (WHO, 2017d).

1.3.3.1. DSÖ Uluslararası Biyolojik Referans Preparatları

DSÖ’nün biyolojik materyaller üzerindeki temel rollerinden biri de biyolojik ölçümlerin dünya çapında karşılaştırılmasına olanak veren uluslararası çapta kabul görmüş bir birim tanımlamaktır (WHO, 2017e).

DSÖ, uluslararası kabul görmüş birimde ifade edilen tanımlanmış biyolojik etkinliğin referans kaynağı olarak kullanılan “Biyolojik Referans Materyalleri”nin oluşturulmasını sağlar. Bu preparatlar; hekim ve bilim insanlarının profilaktik veya tedavide kullanıldığı biyolojik preparatlar ile *in vitro* hastalık ve tedavi izlemede kullanıldığı biyolojik tanı yöntemlerinin etkinliğini veya potansiyelini belirlemek için ortak bir dille iletişim kurmalarına yardımcı olan ve güvenilirliklerini temin eden tek tip raporlama sisteminin temelini oluşturmaktadır (WHO, 2017e).

İyi tanımlanmış kullanıma hazır ürünleri, biyolojik ürün gruplarına karşı referans olarak değerlendiren Biyolojik Referans Materyal kavramı, biyolojik ürünlerin kalitesinin yanı sıra üretim tutarlılığının sağlanması için temel önemini korumaktadır. Bu preparatlar özellikle ikincil referans preparatların (bölgesel, ulusal veya laboratuvarın kendi iç çalışma standartları) etkinliğinin karakterize edilmesinde kullanılmak üzere tasarlanmışlardır. Bu ürünler yalnızca laboratuvar deneylerinde kullanılmak üzere üretilmiş olup insanlar üzerinde kullanılmamalıdır (WHO, 2017e).

1.3.3.2. DSÖ Referans Materyallerin Kurulması

DSÖ Biyolojik Referans Materyalleri, Uluslar arası ve Diğer Biyolojik Referans Standartlarının Hazırlanması, Karakterizasyonu ve Kurulması için Prosedürler (*“Procedures for the Preparation, Characterization and Establishment of International and Other Biological Reference Standards”*) adlı kılavuzda belirtilen temsilci malzemelerin (çoğunlukla adaylardan DSÖ’ye bağışlanmış), kendi yöntemlerini kullanan katılımcı laboratuvarlar tarafından test edildiği standart bir prosedür ile oluşturulur. Bu çalışmalar, sorumlu bir DSÖ İşbirliği Merkezi tarafından yapılır ve koordine edilir. Referans preparatın Biyolojik Standardizasyon Uzman Komitesi (BSUK) tarafından oluşturulması üzerine materyal genellikle Uluslararası Birim (*“International Units-IU”*) olarak atanır. Kullanılan karşılaştırma yer ve yöntemleri ne olursa olsun, laboratuvarlardan alınan sonuçların standartlaştırılmaları ve karşılaştırılmaları için aracı olarak görev yaparlar (WHO, 2017e).

1.4. Terimler Sözlüğü

Referans Materyali (“Reference Material”): Yeterli homojenliğe ve belirli özellikler açısından stabiliteye sahip materyaldir. Referans materyali, istenilen kullanıma ya da nominal özelliklerin incelenmesine uygun olacak şekilde yapılmış olmalıdır (ISO/IEC Guide 99, EP30-A, 1999).

Kontrol Materyali (“Control Material”): *In-vitro* tanıda kullanılan cihazlar gibi tıbbi cihazların performanslarını doğrulamak için kullanılan materyaldir (ISO 15198).

İkincil (Referans) Standart (“Secondary (Reference) Standard”): Bölgesel ya da ulusal otoriteler veya diğer laboratuvarlar tarafından kurulmuş, DSÖ referans materyallerine karşı kalibre edilmiş ve izlenilebilir referans standartlarıdır (WHO Kılavuzu, 2016).

Kalibrasyon (“Calibration”): Belirlenmiş koşullar altında ölçüm aletinden ya da sisteminden elde edilmiş kantite değerleri ya da materyal ölçüleri veya referans materyali tarafından gösterilen değerler ile standartlar tarafından anlaşılmış karşılık gelen değerler arasındaki ilişkiyi kuran işlem setleridir (VIM93).

Kalibrasyon Hiyerarşisi (“Calibration Hierarchy”): Her bir kalibrasyon çıktısının bir önceki kalibrasyon çıktısına bağlı olduğu kalibrasyonlar dizisidir (WHO Kılavuzu, 2016).

Uluslararası Ölçüm Standardı (“International Measurement Standard”): Bir uluslararası anlaşmanın tarafları tarafından tanınan ve dünya çapında hizmeti amaçlayan ölçüm standardıdır (WHO IS).

Uluslararası Konvansiyonel Kalibratör (“International Conventional Calibrator”): Miktar değerleri SI birimine göre metrolojik olarak izlenemeyen fakat uluslararası anlaşmalar ile atanan kalibratördür (WHO Kılavuzu, 2016).

Çalışma Standardı (“Working Standard”): Ölçüm aletlerini ya da ölçüm sistemlerini doğrulamada veya kalibre etmede rutin olarak kullanılan ölçüm standardıdır (WHO Kılavuzu, 2016).

Uluslararası Birim-IU (“International Unit”): DSÖ’nün uluslararası biyolojik standartları için DSÖ’nün Biyolojik Standardizasyon Uzman Komitesi tarafından belirlenmiş kısaltma birimleridir (WHO Kılavuzu, 2016).

Doğruluk-1 (“Accuracy”): Test sonucu ile kabul edilen referans değeri arasındaki yakınlıktır (ISO 5725-1).

Değiştirilebilirlik (“Commutability”): Referans materyalinin bir özelliği olarak, referans materyali ve ölçülmesi düşünülen tipin temsilci örnekleri için kullanılan farklı ölçüm prosedürlerinin sonuçları arasındaki matematiksel ilişkilerin eşdeğerlik göstermesidir (WHO Kılavuzu, 2016).

Kesinlik (“Precision”): Bir ölçüm sisteminin kesinliği çoğaltılabilirliği ve tekrar edilebilirliği ile ilgilidir. Kesinlik, değişmeyen koşullar altında tekrarlanan ölçümlerden aynı sonucu alma oranıdır (JCGM 200, 2008).

İzlenebilirlik (“Traceability”): Ölçüm sonucunun bir özelliğidir. Sonuç, dokümantasyonu yapılmış kalibrasyon zinciri ile ilgili olan referans ile ilişkili olabilir. Ölçüm belirsizliğine olan her bir katkı olarak belirtilir (JCGM 200, 2008).

Belirsizlik (“Uncertainty”): Test sonucuna bağlı olan tahmini değerdir. Doğru değer in yanlış olma ihtimalinin olduğu aralığı nitelendirir (WHO/IVB/11.03, 2011).

Spesifiklik (“Specificity”): Bir tahlilin, etkileşime girebilecek maddelerin de olduğu durumda, karışım da bulunan ilgili analite değ er biç me kabiliyetidir (WHO Kılavuzu, 2016).

Lineerlik (“Linearity”): Ölçüm sisteminin, ölçülen örneğin değ eri ile doğrudan orantılı olan kantite değ erini veren yetidir (ISO 18113-1).

Biyolojik Matriks (“Biological Matrix”): Analitin içinde test edildiği materyaldır (WHO Kılavuzu, 2016).

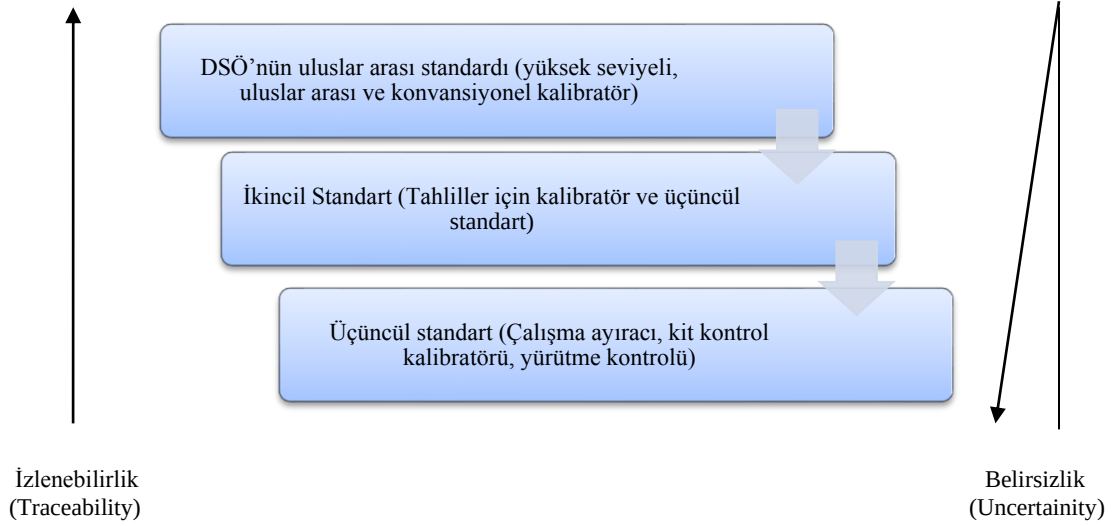
Örnek Cut-off Değeri (Cutt-off Ratio”): ≤ 1.0 sinyal eşik oranı, test edilen örneğin optik yoğunluk değerinin, enzim immünoassay testinin eşik değerinin optik yoğunluk değerine oranı ile elde edilir. Eğer çalışılan test örneği tarafından üretilen sinyal, hesaplanmış eşik değerine eşit ya da bu değerden fazla ise örneğin testte reaktif olduğu düşünülür. Kompetatif immunoassaylerinde renk yoğunluğu ile test örneği miktarı arasında tam tersi bir ilişki vardır (WHO Kılavuzu, 2016).

Siklus-Ct (“Cycle”): Siklus eşik değeri, arka plandaki florasan seviyesinin eşliğini geçebilmek için gerekli olan florasan sinyali (probdan veya florasan içerikli boyadan gelen) için gerekli olan PZR döngüsü sayısıdır (WHO Kılavuzu, 2016).

Bitiş Noktası Dilüsyonu (“End point Titer”): Eşik değerinin üzerindeki okumayı veren analit dilüsyonunun karşılığı olarak tanımlanır (WHO Kılavuzu, 2016).

1.5. Biyolojik Materyallerin Kalibrasyon Hiyerarşisi

Referans materyaller, amaca uygunluğu, materyallere değerler atanması ya da ölçüm metodunun değerlendirilmesi gibi istenilen kullanımdaki ölçüm süreçlerine göre yapılandırılmaktadırlar (AMRM Glossary, NIH, USA, 2009), (ISO 15194:2009, Geneva, Switzerland).



Şekil 1.4. Kalibrasyon hiyerarşisi ve DSÖ'nün uluslar arası standartlarına kadar metrolojik takip (DSÖ İkincil Referans Materyallerin Kurulumu Klavuzu, 2016'dan uyarlanmıştır).

1.5.1. Birincil Standartlar (Uluslararası DSÖ Standartları)

Uluslararası Konvansiyonel Kalibratörler ve yüksek seviyeli biyolojik referans standartları gibi, Uluslararası DSÖ Standartları da ISO17511 tarafından tanımlanmış ve DSÖ ECBS'yi takip eden klavuzlar tarafından oluşturulmuşlardır. DSÖ Uluslar arası standardı (DSÖ IS) IVD üreticileri, laboratuvarlar gibi farklı materyal kullanıcılarını ve mümkün olan en yüksek miktarda farklı güncel tahlil tiplerini içeren ortak çalışmalarla oluşturulmuştur (WHO/BS/2016.2284). Yapılan ortak çalışmalar sonucuna bağlı olarak uluslararası birim (IU) atanmıştır. Atanan IU değerinin her bir standardı, kalibrasyonla ilgili herhangi bir belirsizlik taşımamaktadır. Belirsizlik yalnızca doldurma aşamasında belirlenmiş viyal ağırlığının değişkenliği olarak ifade edilmektedir (WHA63/2010/REC/1, WHO, Geneva,2010), (AMRM Glossary, NIH, USA, 2009).

1.5.2. İkincil Standartlar

İkincil standartlar, doğrudan uluslararası standartlara karşı kalibre edilmiş materyallerdir. Bu preparatlar çoğunlukla bölgesel ya da ulusal referans

preparatlarını içine alırlar. İkincil standartların titreleri, kompozisyonları ve hazırlanış şekilleri farklılık gösterebilir. Fakat materyal, dilüe edildiğinde kesin kalibrasyon sonucuna ulaşılabilmesi için kaliteli ölçümlerin alınabileceği uygunlukta olmalıdır (WHO/BS/2016.2284). Üretim metodundan bağımsız olarak her bir kalibrasyon belirli bir belirsizliğe sahip olmaktadır.

İkincil standartların oluşturulması; uluslar arası standartları sağlamak için çalışmalarla paralel olarak, DSÖ'nün iş birlikçi çalışmasına benzer bölgesel ve ulusal iş birlikçi çalışmayla fakat daha az katılımcı ve bölgesel laboratuvarlarla, tek ya da az sayıdaki laboratuvarlarla tek ya da sınırlı sayıdaki tahlillerle yapılan küçük çaplı çalışmalarla sağlanabilir (WHO/BS/2016.2284).

İkincil standartlar, doğrudan üçüncül standartların üretilmesinde kullanılmakla birlikte çalışma ayıracı, yürütme kontrolü ve kalibratör olarak da kullanılmaktadırlar.

1.5.3. Üçüncül Standartlar

Üçüncül standartlar aynı kalibrasyon prosedürleri uygulanarak doğrudan ikincil standartlara karşı kalibre edilirler. Bu standartlar genellikle belirli bir laboratuvar ya da başka enstitülerin kullandığı spesifik bir tahlil için kurulan standartlardır. Çalışma ayıracı, yürütme kontrolü ya da kalibratör olarak kullanılabilirler (WHO/BS/2016.2284).

Üçüncül standartların oluşturulması tahlil spesifik çalışma ile normalde bir spesifik test/platform için tek laboratuvar ya da sınırlı sayıdaki laboratuvar ile tek ya da sınırlı sayıdaki farklı tahliller ve platformları içeren küçük çalışmalarla gerçekleşir.

Birincil ve ikincil standartlarda olduğu gibi üçüncül standartlar da ölçümü yapılacak analite mümkün olduğunca benzemelidir. Değiştirilebilirliği gösterilen bu

maddeler, biyolojik materyaller ya da biyolojik olmayan materyallerden, zırlı RNA ya da rekombinant proteinlerden yapılmış olabilirler (WHO/BS/2016.2284).

1.5.4. Diğer Kontrol Materyalleri

Yüksek seviye referans materyaline (IS) geri dönen izlenebilirlik yolunu takip etmeyen kontrol materyalleri, ticari ya da analit için yüksek bir standardın bulunmadığı dahili laboratuvarlarda üretilebilir.

Bu materyaller, yürütme kontrolü olarak, ölçüm birimleri (Örn; OD/CO, Ct. kopya/ml) vasıtasıyla laboratuvar içi görüntülemeye kullanılabilir. Bu materyaller de üçüncül standartlara benzer olarak değerli ve eğilim belirleyici veriler sağlayabilirler. Fakat farklı test sonuçlarının karşılaştırılması için dizayn edilmemişlerdir (WHO/BS/2016.2284).

1.6. HBV, HCV ve HDV NAT Birincil Referanslarının Tarihçesi

1.6.1. HBV DNA NAT Primer Referans Materyalleri

Serum ya da plazmadaki HBV DNA'nın kantitatif tespiti, hastalara uygulanan antiviral tedavi esnasında, öncesinde ve sonrasında hastaların kanındaki viral yük miktarının ölçülmesi için bir araçtır (Nowak ve ark., 1996). Bu sebeple yüksek hassaslık sergileyen bir HBV DNA ölçüm aleti, enfekte olmuş hastaların kan örneklerinden viral nükleik asitlerin erken tespitinde önemlidir.

HBV DNA'nın kantitasyonu için çeşitli nükleik asit amplifikasyon tekniklerinin uygulanması, ticari olarak satılan test kitleri ile mümkündür. Fakat çeşitli faktörlerden dolayı test kitlerinin çalışılması ile farklı sonuçlar elde edilebilir (Zaaijer ve ark., 1994).

HBV DNA'nın tespitinde kullanılan PZR testlerinin iç ve dış kalite kontrolleri ile standardizasyonunu sağlamak amaçlı ilk yeterlilik testlerinin tasarlanmaya başlanması 1995 yılına dayanmaktadır (Quint ve ark., 1995). Bu kalite güvence programı, “*European Group for Rapid Viral Diagnosis*” ve “*European Group on Viral Hepatitis*” tarafından düzenlenmiştir. 39 laboratuvarın katılımı ile gerçekleştirilen çalışma sonucu 43 veri seti elde edilmiştir. Programa katılan laboratuvarların biri hariç tümü HBV-DNA tespitinde PZR tekniğinden yararlanmışlardır. Laboratuvarlara çalışılması için 7 adet dilüe edilmemiş pozitif serum örneği ve 5 adet negatif serum örneği içeren HBV test panelleri gönderilmiştir. Panellere, bir tanesi pozitif bir hastadan diğeri bütünüyle (“full-length”) rekombinant DNA'dan olmak üzere 2 dilüsyon serisi daha eklenmiştir. Her iki dilüsyon serisinin 26 veri seti (%60.5) hatasız sonuçlara sahipken, dilüe edilmemiş serum örneklerinin 12 veri setinin (%27.9) tanındığı ve 19 veri setinin (%44.2) yanlış pozitif ya da/ve yanlış negatif sonuçlara sahip olduğu gözlemlenmiştir. 10 veri seti (%23.3) ise tüm örnek panelleri ile iyi performans göstermiştir. Bu sonuçlara göre, geniş laboratuvar gruplarında PZR vasıtasıyla HBV viral yük tespitinde, spesifiklik ve duyarlılık problemleri gözlemlenebilmektedir (Quint ve ark., 1995).

2000'li yıllara gelindiğinde ise, HBV DNA nükleik asit amplifikasyon teknikleri (NAT) için uluslararası bir standart oluşturmak amaçlı DSÖ önderliğinde uluslararası bir işbirlikçi çalışma düzenlenmiştir (Saldanha ve ark., 2001). Çalışmaya 9 ülkeden 22 laboratuvar katılmıştır. Çeşitli NAT testleri kullanılarak AA, BB (her ikisi de liyofilize halde) ve CC (likit halde) olmak üzere 3 örnek test edilmiştir. Çalışma sonuçlarına göre, katılımcılar tarafından kullanılan test çeşitlerinin geniş aralığına rağmen bir laboratuvar dışında (Laboratuvar 4) farklı testler ile elde edilen tüm ortalama eşdeğerlikler arasında iyi bir anlaşmanın olduğu tespit edilmiştir. Laboratuvar 4'ün değerlendirilmediği durumda ise 3 örnek için $\log_{10}$ eşdeğer (“equivalents”)/ml’ nin hesaplanmasındaki varyasyon 1.75-1.25 bulunmuştur. Tüm laboratuvarlar için ortalama $\log_{10}$ eşdeğer (“equivalents”)/ml ise; örnek AA için 6.42, örnek BB için 6.30 ve örnek CC için 5.03 bulunmuştur. İki liyofilize örnek (AA ve BB) arasındaki titre farkı istatistiksel açıdan anlamlı bulunmazken donmuş örneğin (CC) titresi ise önemli ölçüde düşük bulunmuştur.

Materyal AA (kod no:97/746), HBV DNA NAT testleri için ilk DSÖ uluslar arası standart olarak kabul edilmiş ve 10^6 uluslar arası birim/ml (IU/ml) olarak atanmıştır (Saldanha ve ark., 2001)

Günümüzde, uluslararası referans materyallerin kurulması amaçlı DSÖ uluslararası işbirlikçi çalışmaların 4.'sünün tamamlandığı, 2016 yılında yayımlanan bir doküman ile bildirilmiştir. Bu çalışma sonucunda ise aday örnek 2 (NIBSC kodu: 10/266) yaklaşık $5,98 \log_{10}$ IU/ml olarak hesaplanmış ve referans materyal olarak atanmıştır (Fryer ve ark, 2016).

1.6.2. HCV RNA NAT Primer Referans Materyalleri

HCV RNA NAT testleri için bir DSÖ uluslar arası standardı kurmak ve aday standardın HCV RNA içeriğini belirlemek amacıyla ilk kez 1997 yılında DSÖ önderliğinde bir işbirlikçi çalışma düzenlenmiştir (Saldanha ve ark., 1999). Çalışmaya 22 laboratuvar katılmış olup ikisi liyofilize halde (AA ve BB), biri (CC) likit halde olmak üzere üç aday standart değerlendirmeye alınmıştır. Liyofilize örnekler aynı şartlar altında fakat farklı gruplar halinde işleme tabi tutularak elde edilmişlerdir. Tüm örnekler HCV Genotip 1 ihtiva etmekle birlikte yaklaşık olarak 10^5 genom eşdeğer (“equivalents”)/ml’dir.

Elde edilen paneller farklı laboratuvarlarda çeşitli test metotlarıyla çalışılmıştır. Önemli miktarda düşük ölçümler veren, tek (“single”) primerlerin kullanıldığı in-laboratuvar tasarımı testlerin bazılarının dışında testlerden elde edilmiş tüm ortalama NAT saptanabilir units/ml değerleri arasında uygun bir anlaşma gözlemlenmiştir. Bu titreler örnek AA ve BB için $5.0 \log_{10}$, CC örneği için $4.6 \log_{10}$ olarak bulunmuştur. Sonuç olarak örnek AA (kod: 96/790) aday standart olarak kabul edilmiş ve 10^5 IU/ml olarak atanmıştır (Saldanha ve ark., 1999).

İlk HCV birincil referans materyali AA(96/790)’ın birkaç yıl sonra tükenmesi ile yeni bir HCV RNA referansına gereksinim duyulmuştur. Bu eksikliği gidermek

amaçlı AA ile aynı kaynak havuzdan üretilen ve istatistiksel açıdan aralarında ciddi bir farklılık gözlemlenmeyen BB (96/798) örneğinin alternatif bir referans materyal olabileceği düşünülmüştür. Az sayıda laboratuvarın katılımı ile gerçekleştirilen küçük bir çalışma ile 5 yıl boyunca çeşitli koşullarda (+4°C ve -20°C) muhafaza edilen BB örneği test edilmiştir. Sonuç olarak -20°C’de muhafaza edilen örnekler arasında kayda değer bir farklılık gözlemlenmemiş ve böylece 2003 yılında BB örneği 2. uluslar arası HCV RNA NAT referans materyali olarak atanmıştır (Saldanha ve ark., 2004).

NIBSC kodu 14/150 olan HCV için hazırlanmış 5. DSÖ uluslararası standardı, HCV ikincil referans materyallerinin kalibrasyonlarında kullanılmak amaçlı üretilmiştir. Hazırlanan bu uluslararası referans, 2. Uluslararası referans materyaline karşı kalibre edilmiş olup yaklaşık 5.00 *log*10 IU/ml olan bir değer atanmıştır (NIBSC Report, 2016).

1.6.3. HDV RNA NAT Primer Referans Materyalleri

HBV DNA ve HCV RNA’nın NAT temelli testler ile tespit edilmesi sürecinin standardizasyon ve harmonizasyonu için referans örnekler hazırlama çalışmaları HDV RNA için de bir referans materyal üretme çalışmalarından çok önce başlamıştır. HDV RNA NAT temelli testlerde standardizasyonun bulunmaması ve HDV RNA kantitasyonunun güvenilir olmaması, test sonuçlarının birbiri ile karşılaştırılamaması ve HDV RNA miktarı göz önünde bulundurularak bir tedavi süreci çizilememesine neden olmuştur (Wedemeyer ve ark., 2010).

DSÖ ve katılımcı laboratuvarların 2013 yılında gerçekleştirdikleri işbirlikçi bir çalışma ile birlikte NAT-temelli testlerde kullanılacak ilk DSÖ uluslar arası HDV RNA Birincil Referans Materyalleri üretilmiştir. Çalışmaya 9 ülkeden 15 laboratuvar katılmıştır. Aday materyaller, HDV Genotip 1 ihtiva eden klinik plazma örneğinin negatif insan plazmasında dilüe edilmesiyle elde edilmiştir. Çalışmaya katılan aday standartlardan 2 tanesi (Örnek 1, Örnek 2) liyofilize formda iken, havuz materyal

(örnek 3) sıvı- donmuş formda seçilmiştir. Bunun yanı sıra saf (“neat”) HDV RNA pozitif plasma örneği (Örnek 4) çalışmaya katılmıştır. Sonuçlar Örnek 1 ve 2’nin referans materyal olarak kullanılmaya uygun olduğunu göstermiştir. Böylece 7657/12 kodlu örnek NAT temelli testler için 1. uluslararası DSÖ HDV RNA Standardı olarak atanmıştır. Referans standart $5,75 \times 10^5$ IU/ml olarak atanmıştır (Chudy ve ark., 2013).

1.7. Biyolojik Referans Materyallerde Önemli Özellikler

Klinik laboratuvarların ana amacı, sağlık hizmetleri çalışanlarına laboratuvar çalışma sonuçlarının uygun ve güvenilir bir şekilde ulaşmasını sağlamaktır. Güvenilirlik, hem üretimin hem de iletimin son kullanıcıya kadar sağlanması ile ilişkilidir (Dybkaer R, 1995). Üretim safhası; talepler, bireysel tedarik, örneğin üretimi ve iletimi, örneğin çalışmaya hazırlanması, örnek sonuçlarının belirsizlik göz önünde bulundurularak incelenmesi ve sonuçlarının yorumlanmasından oluşur (Dybkaer, 2001). Referans materyaller ve kalibratörler, işlevini tam olarak ve doğru bir şekilde yerine getirebilmeleri için izlenebilirlik, değiştirilebilirlik ve belirsizlik gibi bazı özelliklere sahip olmalıdırlar.

1.7.1. İzlenebilirlik (“Traceability”)

İzlenebilirlik, ölçüm sonucunun bir özelliğidir ve ölçüm belirsizliğine yapılmış olan her bir katkıdır. Sonuç, dökümantasyonu yapılmış kalibrasyon zinciri ile ilgili olan referans ile ilişkili olabilir [International vocabulary of metrology – Basic and general concepts and associated terms (VIM), JCGM 200,2008].

Klinik laboratuvar sonuçlarının izlenebilir olmasının bazı avantajları;

- 1) Aynı analit örneği için farklı test sonuçlarının karşılaştırılabilmesi,

2) Metot-spesifik aralıklar yerine standart referans aralıkların sağlanabilmesi,

3) "Geleneksel aletler" yerine uluslararası kabul görmüş referans ölçüm prosedürlerinde metot karşılaştırılması yapılabilmesi,

4) Laboratuvar analitik hatalarının azalması ve hasta güvenliğinin artırılması

5) Yeterlilik Testi/Dış Kalite Değerlendirmesi (YT/DKD) ("Proficiency Testing/External Quality Assurance-PT/EQA") vasıtası ile aynı grupların göreceli performanslarına karşı objektif test karşılaştırmalarının sağlanabilmesi gibidir.

Çizelge 1.2. İzlenebilirlik ve analit sınıflandırılması (Panteghini M, 2007).

A Tipi Analitler
İyi tanımlanmış bileşiklerdir. Konsantrasyonlar SI birimleriyle ifade edilmiştir. Sonuçlar yöntem bağımlı değildir. Yaklaşık 65 analit mevcuttur (metabolitler, elektrolitler, steroid hormonları...).Tam izlenebilirlik zincirleri.
B Tipi Analit
İyi tanımlanmamış, çoğunlukla heterojen karışımlardır. Analitler bağlı ya da serbest haldedir. SI birimleriyle değil uluslararası birimlerle ifade edilirler (DSÖ Uluslararası birimleri). İmmüno kimyasal prosedürler doğal değişkenliği göstermektedir (farklı epitoplar). 400-600 analit mevcuttur (tümör işaretleyicileri, viral antijenler, pıhtılaşma faktörleri...).Tam izlenebilirlik zincirleri genellikle mevcut değildir (yaygın olarak kullanılan yöntemlerde kalibrasyon).

ISO 17511 (*In vitro* tanı aletleri - biyolojik örneklerde miktar ölçümü - kalibratörlere ve kontrol materyallerine atanan değerlerin metrolojik izlenebilirliği), kalibratör izlenebilirlik zincirinin unsurlarını tanımlar. ISO 17511'de bahsedilen metrolojik düzenlemelerde, ölçülen büyüklük için uygun referans materyaller ve referans ölçüm prosedürlerinin mevcut olduğu kabul edilir. Farklı durumlara bakacak olursak;

1) Referans materyal ve referans ölçüm prosedürünün her ikisinin de mevcut ve SI birimlerine göre izlenebilir olduğu durumlar (örn; glikoz, kreatinin),

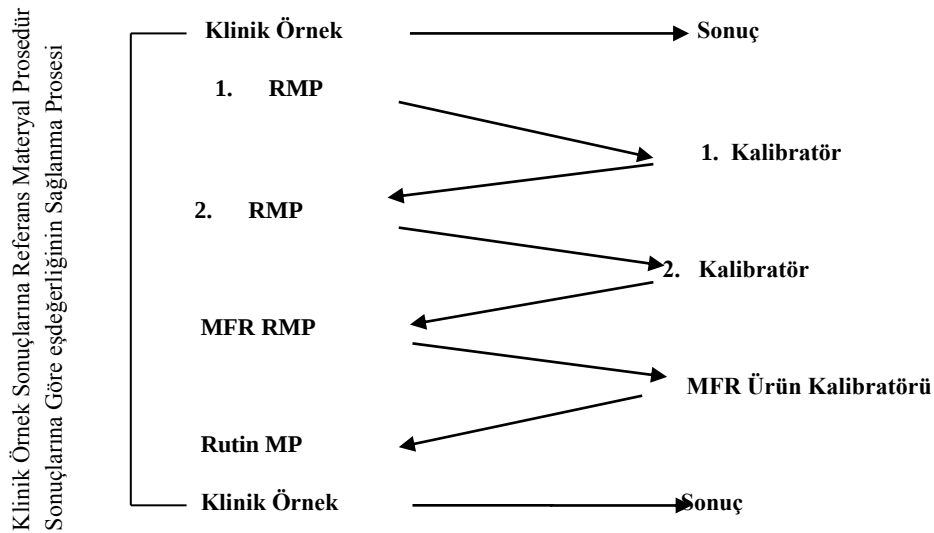
2) Referans materyal ve referans ölçüm prosedürünün her ikisinin de mevcut olduğu fakat SI birimlerine göre izlenebilir olmadığı durumlar,

3) Referans materyalin mevcut olmadığı fakat referans ölçüm prosedürlerinin bulunduğu durumlar (örn; koagülasyon faktörü),

4) Referans materyalin mevcut olduğu fakat bir referans ölçüm prosedürünün mevcut olmadığı durumlar (örn; spesifik plazma proteinleri: immunoglobulinler...),

5) Ne referans materyalinin ne de referans ölçüm prosedürünün mevcut olmadığı durumlar (bazı tümör belirteçleri) mevcuttur.

Bir üst seviye referans materyali ya da referans ölçüm prosedüründe kalibrasyon izlenebilirliğinin amacı, aynı ölçüm büyüklüğünü belirten farklı rutin klinik laboratuvar ölçüm prosedürlerinin kullanılarak ölçüldüğü hasta örnek sonuçlarında eşdeğerliğinin sağlanmasıdır.



Şekil 1.5. Tıbbi laboratuvarlarda izlenebilirlik. (MP: Materyal Prosedürü, RMP: Referans Materyal Prosedürü (Gary, 2017)).

Atanmış değerin yetkisi, onun metrolojik olarak izlenebilirliğine bağlıdır. Avrupa Yönergesi: “Kalibratörlere ve kontrol materyallerine atanmış değerlerin izlenebilirliği, uygun referans ölçüm prosedürleri ve/ya da uygun yüksek seviye

referans materyalleri vasıtası ile garanti altına alınmalıdır.” maddesi ile *in vitro* tanı medikal cihazları üzerindeki temel gereklilikleri öne çıkartarak metrolojik izlenebilirliğin öneminin üzerinde durmuştur [European Parliament, Council of European Union, Official Journal of European Communities 1998;(7.12.98):L331/1-L331/37].

Metrolojik izlenebilirliğin yerine getirilebilmesi için ise bazı gereklilikler sağlanmalıdır;

1. İlk olarak, tüm ölçüm prosedürleri aynı tip ölçüm büyüklüklerini ölçmelidir.
2. İkinci olarak, tüm ölçüm prosedürleri aynı analitik özgüllüğe sahip olmalıdır.
3. Üçüncüsü ise her bir kalibratör değiştirilebilir olmalıdır (Dybkaer, 2001).

1.7.2. Değişebilirlik (“Commutability”)

Değiştirilebilirlik referans materyalin bir özelliğidir ve aynı ölçüm büyüklüğü için iki ya da daha fazla ölçüm prosedürünün uygulandığı referans materyaller ve klinik örnekler arasındaki ilişkinin aynı olması durumudur (Miller ve ark., 2006; Miller ve ark., 2011). Değiştirilebilirlik özelliği, referans materyalin klinik laboratuvar ölçüm prosedürlerinde yaygın bir kalibratör olarak ya da hasta örnek sonuçlarının ölçüm prosedürleri arasındaki anlaşmanın değerlendirildiği dış kalite kontrol değerlendirilme programında kullanılacak olması durumlarında zorunludur (Miller ve ark., 2011).

Laboratuvar sağlığı uzmanları, bir izlenebilirlik zincirinde referans materyallerin bir kalibratör olarak kullanımına yönelik olarak, referans materyalin değiştirilebilirliğinin önemini vurgulamaktadırlar (Miller ve ark., 2006; Miller ve ark., 2011). ISO standardı 17511:2003, kalibratörlere ve kontrol materyallerine atanmış değerlerin metrolojik olarak izlenebilir olmasını ve izlenebilirlik zincirinin her bir basamağında kalibratörlerin değiştirilebilirliğini belirtir (ISO 17511:2003).

Diğer yandan değiştirilebilirlik referans materyallerinin genel bir özelliği değildir. İki tahlil metodu için değiştirilebilirliği göstermek diğer metodlarda da değiştirilebilirliğin gösterilebileceğini konusunda garanti etmez. Aynı şekilde bir örnek setinin kendi içinde belirli test yöntemleri için değiştirilebilirlik özelliğini gösteriyor olması, bu yöntemlerin diğer örneklerle de uygulandığı zaman aynı sonucun elde edileceğini garanti etmez (Miller ve Myers, 2013; WHO, 2013).

Yaygın bir kalibratör olarak ya da yeterlilik test programlarında kullanıldığında referans materyallerinin temsilci hasta örnekleri ile değiştirilebilirliğinin sağlandığı garanti edilmelidir. Diğer yandan ise, kullanılan her bir ölçüm prosedürü için değiştirilebilirlik değerlendirmesi yapmak mümkün değildir. Bu nedenle daha olasılıklı bir yaklaşım olarak, verilmiş ölçülen büyüklükte yaygın olarak kullanılan prosedürler ve teknolojiler için değiştirilebilirlik değerlendirmesi yapmak daha uygun olur (WHO/BS/2016.2284).

1.7.3. Doğruluk-1 “Accuracy”, Doğruluk-2 “Trueness”, Kesinlik “Precision” Kavramları

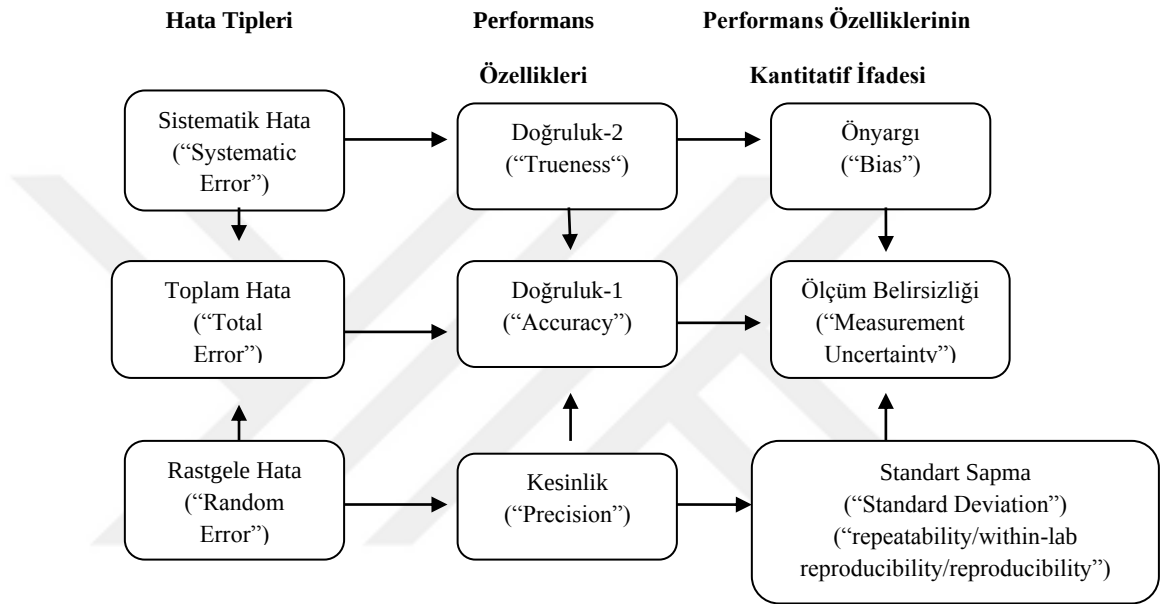
“Accuracy”, “trueness” ve “precision” kavramları, ölçüm nitelendirilmesinde kullanılan ve birbirleri ile zaman zaman karıştırılabilen kavramlardır. Farklı dillerde birbirlerinin yerine kullanılma durumları görülebilmektedir. Bu terimlere bakacak olursak;

Hata “Error”: İdealize edilmiş bir kavramdır ve hiçbir zaman tam olarak bilinemezler (GUM, ISO, Geneva, 1995).

Doğruluk-1 “Accuracy”: Ölçülen büyüklüğün gerçek değeri ve ölçüm vasıtasıyla elde edilen bir miktar değeri arasındaki uzlaşma yakınlığı (VIM, ISO, Geneva, 1993).

Kesinlik “Precision”: Öngörülen şartlar altında elde edilen, birbirinden bağımsız test sonuçları arasındaki uzlaşma yakınlığı (ISO 5725-1, 1998).

Doğruluk-2 “Trueness”: Kabul edilmiş bir referans değer ve test sonuçlarının geniş bir serisinden elde edilmiş ortalama değer arasındaki uzlaşma yakınlığı (ISO 5725-1, 1998).



Şekil 1.6. Hata tipi, kalitatif performans özellikleri ve kantitatif ifadeleri arasındaki ilişkiler (Menditto ve ark., 2007).

Şekil 1.6’da bir analitik ölçümü, performans özelliğini ve onun kantitatif ifadesini etkileyen hatalar tipleri arasındaki ilişki anlatılmıştır.

1.7.4. Ölçüm Belirsizliği (“Uncertainty”)

Ölçüm belirsizliği, test sonucuna bağlı olan tahmini değerdir. Bu değer, doğru değerın yanlış olma ihtimalinin olduğu aralığı nitelendirir (WHO/IVB/11.03, WHO 2011). Belirsizlik, ölçümün kantite değerinin dağılımını nitelendiren negatif olmayan parametredir ve ölçülmüş olan örneğe atfedilmiştir (JCGM 200:2012).

Verilen bir miktar için, bir SI birimi, birincil ölçüm prosedürü ve bir birincil kalibratör mevcut olmayabilir. Bu durumda referans materyale ya da referans ölçüm prosedürüne sıklıkla isteğe göre SI olmayan birimlerde değerler verilir (WHO uluslararası birimler gibi). Bu durumda yine izlenebilirliğin, spesifitenin, değiştirilebilirliğin ve belirsizliğin gereklilikleri uygulanır (Dybkaer R, 1996). Bu gereklilikleri karşılamak için ise hem “International Bureau of Weights and Measures (BIMP)” (Uluslararası Ağırlıklar ve Ölçüler Bürosu) işbirliğindeki ulusal metroloji enstitülerinde hem de referans ölçüm laboratuvarlarında, endüstri laboratuvarlarında ve klinik laboratuvarlarda uzman metrolojik bilgiye ihtiyaç duyulur (Dybkaer R, 2001).

Ölçüm Belirsizliğinin İfadesi Klavuzu (“Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement-GUM”)’na göre kalibrasyon hiyerarşisinin her bir seviyesindeki standart belirsizlik, bir belirsizlik bütçesinin temelinde hesaplanmalıdır (ISO-IEC, 1993).

Birçok ülkede laboratuvar yeterliliğini değerlendirmek için ISO Standartlarını kullanan yetkili kuruluşlar, deney test sonuçlarının ölçüm belirsizliğinin (“Measurement Uncertainty”) tahminine ihtiyaç duyar. Bu tahmin varyasyon kaynaklarının tümünün belirlenmesi, varyasyon büyüklüğünün ölçümü ve belirsizliğin kombini için kurulmuş metotların kullanılması vasıtası ile yapılabilir. Alternatif olarak, laboratuvar personeli, yeterlilik testlerinin ya da dış kontrol testlerinin değerlendirilmesinden elde edilmiş geniş veri setlerini ölçüm belirsizliğinin belirlenmesinde kullanabilir (Dimech ve ark., 2005).

1.7.5. Kararlılık (“Stability”)

Stabilite test programı, materyalin miktar ve potansiyelinin zaman içerisindeki değişimini gözlemlemek amaçlı uygulanır ve çoğunlukla eş zamanlı veri görüntülenmesi üzerine kuruludur. İvmelendirilmiş termal degradasyon çalışmalarından elde edilen veriler ise liyofilize referans materyallerin

dayanıklılığının ve ekstrem teslimat koşullarına uygunluğunun belirlenmesinde önemlidir (WHO/BS/2016.2284).

Materyal stabilitesini, son saklama sıcaklığı ve fiziksel durumu etkiler (Örn; belli sıcaklıklarda mantar ve bakteri üremesi gerçekleşmez). Bu durumda eklenen maddenin ya da yapılan değişikliklerin performans ve değişebilirlik üzerine olan etkisi değerlendirilmelidir. Ayrıca liyofilize materyallerde nem ve oksijen oranları materyal bütünlüğü üzerine etki edebilir. Bu nedenle bu materyalleri, liyofilizasyonu takiben ve saklama esnasında oksijen ve nem oranları açısından takip etmekte fayda vardır (WHO/BS/2016.2284).

Ürün stabilitesi için gerekli degradasyon prensiplerinin anlaşılması, ürün kalitesinin sürdürülmesi için önemlidir. Ürünün yarılanma ömrü, gerekli minimum potansiyel salınımının belirlenmesi ile gözetilebilir. “*Arrhenius Davranımı*” gibi kinetik yasaları, uygulayıcılara etkili ivmelendirilmiş stabilite programları tasarımıyla yardımcı olur. Stabilite çalışmalarının tasarlanması, stabilite parametrelerinin değişkenliğinin minimuma indirgenmesi göz önünde bulundurularak gerçekleştirilmelidir. Test başlangıcından sonuna kadar düzenli aralıklarla degradasyon oranının ölçülmesi, tahminin kesinliğini güçlendirir (Egan ve Schofield, 2009).

1.7.5.1. Eş Zamanlı Stabilite Çalışmaları

Materyaller, seçilen rutin laboratuvar testinde çalışılmak üzere periyodik olarak belirli saklama sıcaklıklarından alınıp çözülmelidir. Bu çözülme sıklığı, materyalin fiziksel durumuna ve saklama sıcaklığına bağlı olarak değişkenlik gösterir. Likit materyaller genel olarak liyofilize materyallere oranla daha çok sıklıkla test edilmelidir. Eş zamanlı görüntüleme işlemi test sayısında geçen zamanla birlikte azalma görülür. İlk yıl üç ayda bir ölçüm yapılması uygun görülürken, elde edilen veriler stabil ise bu ölçüm altı ayda bir düşürülebilir. Aynı şekilde liyofilize

preparatlarda ölçüm ayda bir yapılırken daha sonraları bu durum yılda bire düşürülür (WHO/BS/2016.2284).

Liyofilize materyallerde standartlar sulandırılıp tüplere ayırarak dondurulmalıdır ($-80^{\circ}\text{C}/-20^{\circ}\text{C}$). Her bir zaman aralığında, örnekler üç tekrar testinde en az ikişer defa test edilmelidir (WHO/BS/2016.2284).

1.7.5.2. Hızlandırılmış Termal Degredasyon Çalışmaları

Eş zamanlı stabilite çalışmaları test periyodunu takiben materyal titresinde yaşanan kaybı yansıtamayabilir. Hızlandırılmış termal degradasyon çalışmaları ile ürünün yükseltilmiş sıcaklıklardaki davranışlarına bakılarak, ileri aşamadaki stabilitesini tahmin etmek mümkün olabilir.

Örnekler öncelikle; -20 , $+20$ ve $+37^{\circ}\text{C}$ 'lik sıcaklıklarda kontrollü ortamlarda saklanarak viyaller periyodik olarak üç tekrarda en az iki kere test edilmelidir (WHO/BS/2016.2284).

1.7.6. Fiziksel Görünüm

Bir standardın fiziksel olarak nasıl görüldüğünü etkileyen birçok faktör vardır. Liyofilize materyaller, likit materyallere oranla daha uzun raf ömrüne ve stabilite özelliklerine sahiptirler. Ayrıca liyofilize materyallerin transferi çevresel sıcaklıklarda kararlılığı bozulmadan gerçekleştirilebilir. Yapılan çalışmalar liyofilizasyon süreçlerinin materyalin hedef analit bütünlüğü üzerinde olumsuz bir etkiye sahip olmadığını göstermiştir. Fakat liyofilizasyon işlemi maliyetlidir ve bazı patojenler ürün stabilitesi üzerinde olumsuz etki yapabilmektedir. Bu sebeple likit preparat kullanımı daha avantajlı olabilir. Ayrıca liyofilizasyon işlemi, tahlil performansını ve klinik örneklerin standartlarının değişebilirliği üzerindeki etkisinin ölçülmesini içeren bazı ek çalışmalar da gerektirebilir (WHO/BS/2016.2284).

Liyofilize preparasyonlar, likit prearasyolarına karşı farklı tahlillerde değerlendirilmelidir (WHO/BS/2016.2284).

1.7.7. İmmunolojik ve Genetik Çeşitlilik

Belirlenmiş bir test metodunun kullanılarak bir analitin saptanması, test edilen organizmanın immünolojik ve genetik çeşitliliğine (serotipler, suşlar, genotipler, alttürler..vb.) de bağlıdır. Bu sebeple ikincil standart, uluslararası standart hazırlanmasında kullanılan materyalle, dolayısıyla test edilen örnek ile aynı immunolojik ve/veya genetik özellikleri göstermelidir. Nükleik asit saptanması için hazırlanan bir standartta DNA dizi analizinin yapıldığı yerlerine göre, amaca uygun olarak nitelendirilmiş bir suş kullanılmalıdır (WHO/BS/2016.2284).

1.7.8. Bulaşıcılık

Bulaşıcılık, standardın işlenmesi, kullanılması ve taşınması üzerinde önemli etkilere sahiptir. Örneklerin bulaşıcı materyallerden hazırlandığı durumlarda, son kullanıcıya materyal içeriği açısından açık ve net olarak bilgi verilmelidir. Ayrıca üretilen materyalin patojenitesinin orijinine göre, ihracat kuralları ülkeden ülkeye değişkenlik gösterebilmektedir (Örn; plazma taşıma koşulları ve doku kültürü taşıma koşulları).

Standartların inaktive edilmiş materyallerden hazırlanması durumunda inaktivasyon prosedürünün başarısının final standardın üzerine olan etkisi oldukça önemlidir. Bu nedenle halihazırda kullanılan ve etkili olan yöntemler tercih edilmelidir (WHO/BS/2016.2284).

1.7.9. Matriks, Konsantrasyon ve Hacim

Materyalin amaca uygunluğu açısından standardın formüle edildiği matriks oldukça önemlidir. Serum, üre ve plazma gibi klinik örnekleri test etmek amaçlı

kullanılan ekstraksiyon metotları ile matriks uyumlu olmalıdır. Değiştirilebilirlik açısından ise biyolojik materyal kullanımı sentetik olanlara oranla daha çok tercih edilir (WHO/BS/2016.2284).

İkincil standartlarda konsantrasyon, farklı kantitatif testler arasında seyrelti hazırlamaya uygun olacak seviyede yüksek olmalıdır. Her seyreltilme süreci ise, belirsizliğe katkıda bulunur. Sinyaldeki değişimlerin analit konsantrasyonundaki doğrusal değişimlere karşılık geldiği dinamik aralıktaki testler ile kullanılan referans materyalleri, norm olarak değerlendirilir (WHO/BS/2016.2284).

Alikot hacmi deneyde kullanılan analite, başlangıç hacmine ve son saklanma sıcaklığına bağlı olarak değişkenlikler gösterir. Deneyde kullanılacak materyalin tek kullanımlık olarak ayarlandığı durumlarda teste bağlı olarak hacim yeterli miktarda olmalıdır. Eğer materyal bir seferden fazla olarak kullanılacaksa hacim yine test miktarına ve son saklama derecesine bağlıdır. Stabilite testleri duruma göre ayarlanmalıdır (WHO/BS/2016.2284).

1.8. Liyofilizasyon

Liyofilizasyon, biyolojik materyalin dondurulması ile birlikte içerdiği buz kristallerinin süblimleştirilmesi prensibine dayanır. Liyofilizasyon süreci; dondurma, birincil kurutma ve ikincil kurutma şeklindedir. Liyofilize edilmiş materyal, sadece daha iyi stabilite sağlamakla kalmaz aynı zamanda nakliye ve depolama işlemlerinde oldukça kolaylık sağlar.

1.8.1. Liyofilizasyonun Tarihi

Liyofilizasyon, kışın kuru soğuk hava nedeniyle yola düşen kar tanelerinin erimeden kaybolması örneğindeki gibi doğada sıkça görülebilen bir durumdur. 12. yy.da Antik İnkalar, etlerini düşük basınç altında dondurarak kurutarak ilk liyofilize örnekleri gıda koruması amacıyla elde etmişlerdir. Araştırmacılar, Sibirya'da yaklaşık

15.000 yıl öncesinden bir süreç izleyerek günümüze ulaşan dondurularak kurutulmuş mamut vücutlarına rastlamışlardır (Rey L, 2004).

Biyolojik materyallerin dondurularak kurutulması ve böylece dış etkenlerden korunması ve muhafazası fikri ilk defa 1906 yılında Fransız Bilimler Akademisi'nden d'Arsonval ve Bordas'ın bir yayını ile dile getirilmiştir (Bordas ve d'Arsonval, 1906). Bilim adamlarının öne sürdüğü bu teknik, hassas örneklerin belirli bir vakum altında kurutulmasını mümkün kılmaktadır. Araştırmacıların notlarında, materyalin uzun süre oda sıcaklığında da stabilitesini koruduğu belirtilmektedir. Bu sebeple serum ve aşı koruma çalışmalarında oldukça faydalı olacağı dile getirilmektedir.

“Liyofilizasyon” terimi ilk olarak 1935'te tanımlanmış olup Yunanca kökenli bir terim olan “lyophile” den gelmektedir ve “solvent benzeri” anlamını taşımaktadır (Flosdorf ve Mudd, 1935). Günümüzde ise bu terim “cryodesiccation” terimi ile birlikte anılmaktadır.

2. Dünya Savaşı'nın başlaması, insan plazmasına olan ihtiyaçta artışa neden olmuştur. Bu ihtiyacı karşılamak amaçlı İngiltere'den Greaves, Fransa'dan François Henaff ve Birleşik Devletler'den Earl Flosdorf adlı bilim adamları, kan örneklerini dondurup kurutularak korumuşlardır (Louis ve Joan, 2004). Cambridge, UK' den Ronald Greaves ve arkadaşları ise çalışmalarını proteinlerin liyofilizasyonu üzerine sürdürmüşlerdir (Greaves ve Adair, 1939).

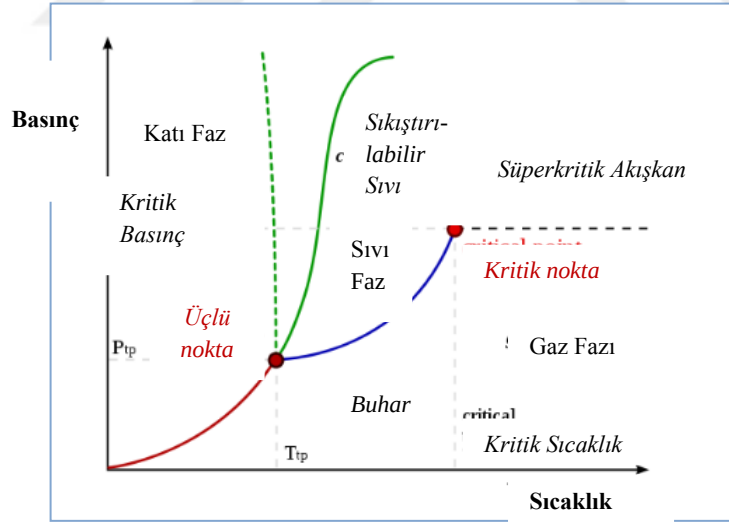
Sanayileşme ile birlikte, Loire, Stokes, Edwards ve diğerleri tarafından ilk dondurup-kurutma ekipmanı inşa edilmiştir. Penisilin üzerine yaptığı çalışmalarla Nobel Ödülü'ne layık görülmüş biyokimyacı Sir Ernst Boris Chain, antibiyotiklerin ve duyarlı biyokimyasalların hazırlanması için dondurma-kurutma yöntemini kullanmanın önemini vurgulamıştır. Daha sonraki yıllarda ise Isidore Gersh (Gersh, 1956), Tokio Nei (Nei, 1970) ve Fritjof Sjostrand (Sjostrand ve Baker, 1958) elektron mikroskopunda görüntülemek amaçlı biyolojik örnekleri dondurup kurutma

işlemine tabi tutmuşlar ve bu örneklerin önemli fotoğraflarını elde etmişlerdir. Liyofilizasyonun tarihine dair daha detaylı kaynaklar mevcuttur (Hauduroy P, 1960).

1.8.2. Liyofilizasyonun Prensibi

Liyofilizasyonun temel prensibi, maddenin katı formdan doğrudan gaz formuna geçmesi olarak adlandırılan süblimleşme olayıdır. Buharlaşma olayında olduğu gibi madde, moleküllerinin serbest hale geçebilmesi için enerjiye gereksinim duyar. Fakat sadece enerji kazanımı tek başına yeterli değildir. Maddenin istenilen fazda elde edilebilmesi için sıcaklık ve atmosfer basıncı gibi gerekli koşullar da mevcut olmalıdır. Aksi halde faz değişimi gözlemlenememektedir.

Maddenin hangi sıcaklık ve atmosfer basıncı değerlerinde hangi fazda olacağını faz diyagramları ifade eder. Faz diyagramı maddeye özgüdür ve maddeler arası değişkenlik gösterir.

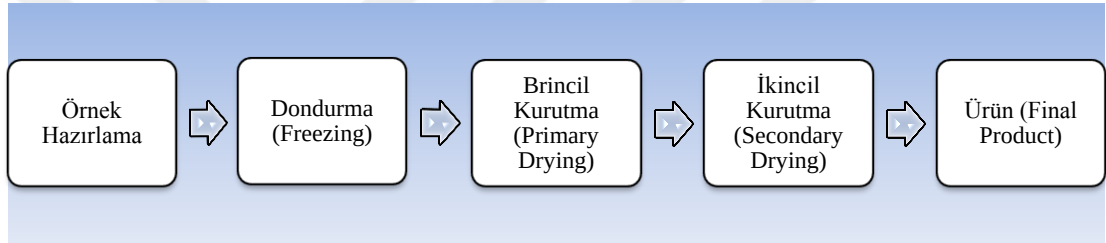


Şekil 1.7. Maddelerin faz diyagramı.

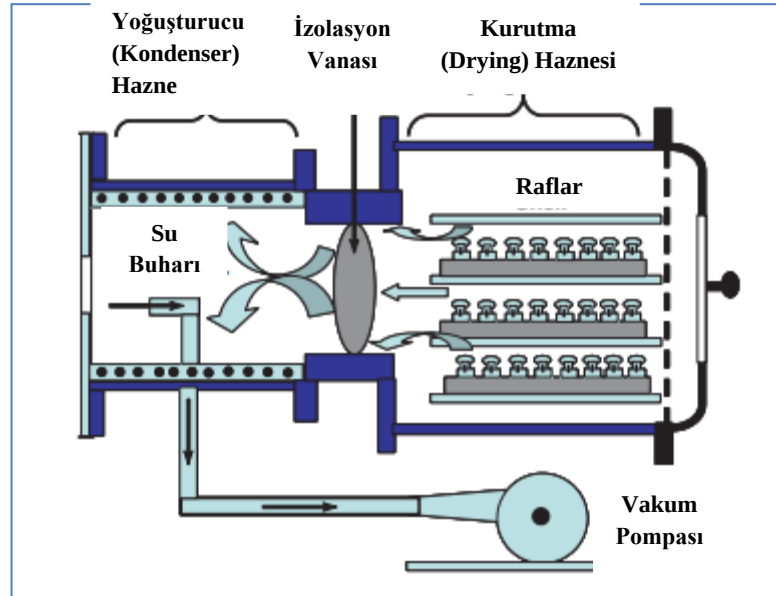
1.8.3. Liyofilizasyonun İşleyişi

Liyofilizasyon, buzun süblimleşmesinin mümkün olması için düşük basınç ve sıcaklıkta, faz diyagramında görülen üçlü noktanın altında gerçekleşir. Tüm işlem bu şartlar altında devam eder.

Dondurup-kurutma işlemi, çoklu basamakları içeren bir prosedür ile gerçekleştirilir. Liyofilizasyon, örnek hazırlamanın ardından istenilen nem oranına sahip ürün elde edilinceye kadar; dondurma, birincil kurutma ve ikincil kurutma basamaklarını takip eder (Kamboj ve ark., 2017).



Şekil 1.8. Liyofilizasyon aşamaları.



Şekil 1.9. Liyofilizasyon cihazının temel gösterimi (Remmele ve ark., 2012).

1.8.3.1. Dondurma (“Freezing”)

Bu adımda materyalin dondurma işlemi gerçekleştirilir. Bu aşama mekanik bir dondurucuda, kuru buz, metanol ya da sıvı nitrojen ile gerçekleştirilebilir. Bu aşamada önemli olan, materyalin ötektik noktasından düşük derece soğutulmasıdır. Ötektik noktası, materyalin hem sıvı hem de katı halinin bir arada bulunabildiği en düşük sıcaklık noktasıdır (Shukla, 2011).

Genellikle dondurma sıcaklıkları -50°C ila -80°C arasındadır. Materyalin bozulma ihtimali olduğu için dondurma aşaması tüm liyofilizasyon sürecinin en önemli aşamasıdır (Shukla, 2011).

Dondurma aşamasında ürünün hassasiyetine bağlı olarak analitte (proteinler, lipozomlar, virüsler...) hasarlar meydana gelebilir. Ani soğuma sonucu buz kristallerinde daha hızlı çekirdeklenme ve büyüme oranıyla küçük buz kristalleri sayısında artış ile geniş bir buz-su arayüzünün oluşumu görülür. Bu buz-su arayüzü ise biyolojik materyallerde denatürasyona sebebiyet verebilir (Chang ve ark., 1996). Küçük buz kristalleri düşük hacim-yüzey alanı ile porlar üretir ve böylece bu durum daha düşük difüzyon akışı ve daha yavaş süblimleşme ile sonuçlanır (Searles ve ark., 2001).

1.8.3.2. Birincil Kurutma (“Primary Drying”)

Birincil kurutma aşamasında, basınç milibar aralıklarına kadar azaltılırken sıcaklık, materyal içindeki su kristallerinin süblimleşebilmesini sağlayacak kadar düşürülür. Bu durumda materyal içindeki su kristallerinin yaklaşık %95'i süblimleşir. Materyale kısa periyotta fazla ısı verildiğinde materyalin yapısı değişeceğinden bu aşama mümkün olduğunca uzun tutulur. Basınç kontrolü, kısmi vakum uygulanmasıyla sağlanır. Vakum uygulanması süblimleştirmeyi hızlandırır. Soğuk bir yoğuşturucu (kondenser) hazne ise buharlaşan suyun tekrar katılarak toplanmasını sağlar. Böylece vakum pompasının performansının etkilenmesi

önlenmiş olur. Kondenser sıcaklığı ise genel olarak -50°C 'ın altındadır (Shukla, 2011).

1.8.3.3. İkincil Kurutma (“Secondary Drying”)

İkincil kurutma aşamasının amacı birincil kurutma aşaması ile materyalin içerdiği tüm buzun giderilmesinden sonra kalan donmamış su moleküllerinin ortamdan uzaklaştırılmasının sağlanmasıdır. Dondurma-kurutma işleminin bu aşaması materyalin adsorpsiyon izotermi tarafından yönetilir. İkincil kurutma fazındaki sıcaklık birincil kurutma fazındaki sıcaklığa oranla daha yüksektir, hatta 0°C 'nin üzerine çıkabilir. Bunun amacı; donmuş materyal ile su molekülleri arasında oluşabilecek herhangi bir fiziko-kimyasal etkileşimi kırmaktır. Genel olarak desorpsiyonu desteklemek amacıyla bu fazda uygulanan basınç (mikrobar seviyeleri) azaltılır (Shukla S, 2011).

Dondurma-kurutma işleminin tamamlanması ile birlikte materyal kapakları kapatılmadan önce vakum genellikle inert bir gaz (nitrojen gibi atıl bir gaz) ile kesilir. Liyofilizasyon işleminin sona ermesi ile birlikte materyalin artık su içeriğinin %1 - %4 arasında olması beklenildiği belirtilmektedir (Shukla, 2011). Son ürünün aşırı derecede düşük su içermesi ise destabilizasyona sebebiyet verebileceğinden, optimal su içeriği iyi belirlenmelidir (Shalaev ve Zografi, 1996).

1.8.4. Liyofilize Materyallerin Formülasyonunda Yardımcı Maddeler

Liyofilizasyon, pek çok farmasötik ürünlerin, viral aşılarda (Gheorghiu ve ark., 1996), proteinlerin (Colaço ve ark., 1992), lipozomların (Zingel ve ark., 1996) ve referans materyallerin (Sandanha, 2005) stabil olarak uzun süre muhafazasında kullanılan yaygın bir yöntemdir.

Liyofilizasyon süreci kapsamında biyolojik materyaller dondurma ve sonrasında kurutma aşamalarında aktivite kaybına sebep olabilecek bazı faktörlere maruz kalır.

Dondurma aşamasında bu faktörler; buz-su ara yüzeylerine maruz kalma (Chang ve ark., 1996) ve artan buz kristallerine bağlı mekanik hasarlar (Zhai ve ark., 2004) olabilirken kurutma aşamasında; stabilize edici hidrasyon kabuklarının (“stabilizing hydration shells”) uzaklaştırılması (Prestrelski ve ark., 1993) vb. olabilir. Ayrıca üretilen pek çok farmasötik ürün kullanıma hazır bir şekilde saklandığında fiziksel ve kimyasal degradasyona açık olabilir. Bu nedenle araştırmacıların amacı; doğru formülasyon şartlarını ve doğru yardımcı maddeleri optimal miktarda olacak şekilde belirlemek ve böylece ürün için maksimum stabiliteyi sağlamaktır (Bedu-Addo, 2004).

1.8.4.1. Tampon Maddeler

Tampon çözelti, stabil bir pH değerinin elde edilebilmesi için önemlidir. Liyofilize edilecek materyallerin formülasyonlarının geliştirilmesinde tampon çözelti seçimi kritik bir önem taşır. Fosfat tampon çözeltiler dondurma aşamasında ani pH değişimlerine sebep olabilir (Pikal-Cleland ve ark., 2000). İzlenebilecek en iyi yaklaşımlardan biri ise bir tampon çözeltinin düşük konsantrasyondaki halini kullanarak dondurma aşamasındaki pH değişikliklerinin düşük miktarda kalmasını sağlamaktır. Tris, sitrat ve histidin tamponları bu amaçla kullanılan kimyasallardandır (Carpenter ve ark., 1997).

1.8.4.2. Hacim Arttırıcı Ajanlar (“Bulking Reagents”)

Bu ajanların amacı, liyofilize edilen materyallerin hacimlerinin artışı sağlamaktır. Aktif maddenin az miktarda konsantrasyonlarda kullanıldığı durumlarda önemli kimyasallardır. Kristalin ajanlar liyofilize ürün için iyi mekanik özellik ve fiziksel yapı sağlar. Fakat bu ajanlar bazen proteinler ve lipozomlar gibi materyallerin stabilitelerinin sağlanmasında etkisiz de olabilmektedirler (Izutsu ve ark., 1993).

1.8.4.3. Dengeleyiciler (“Stabilizers”)

Hacim arttırıcı ajan olmalarına ek olarak, lipozom ve protein gibi ürünlerin liyofilizasyon esnasındaki stabilitelerinin sağlanmalarında en etkili ajanlar olarak kabul edilirler (Colaco ve ark., 1992). Sükroz ve trehaloz inert (atıl) şekerlerdir ve proteinlerin, lipozomların ve virüs formlarının stabilizasyonlarında kullanılmaktadır (Flood ve ark., 2016). Glukoz, maltoz ve laktoz indirgeyici şekerlerdir ve Maillard Reaksiyonu vasıtasıyla protein miktarında düşmeye neden olabilirler (Li ve ark., 1996).



Bu çalışmanın amacı, ülkemiz laboratuvarlarında kullanılmak üzere, ülkemizin epidemiyolojik dağılımına özgü olacak şekilde ikincil referans materyalleri üretmektir. Yapılan seroprevalans çalışmalarına göre ülkemizde en yaygın görülen genotipler; HCV için Genotip 1b (Kabakçı ve ark., 2014), HBV için Genotip D (Özdemir ve ark., 2005), HDV için ise Genotip 1 (Bozdayı ve ark., 2004) olarak bulunmuştur. Yaptığımız çalışmanın ülkemizin ihtiyaçları doğrultusunda olması amacıyla materyallerin hazırlandığı pozitif serum örnekleri en yaygın genotiplere sahip olanlardan seçilmiştir.



2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Gereçler

2.1.1. Hasta Serumları

Bu çalışmada kullanılan hepatit viral pozitif hasta serumları, Kızılay Orta Anadolu Bölge Kan Merkezi ile Ankara Üniversitesi Hepatoloji Enstitüsü arasında yapılan bir anlaşma kapsamında temin edilmiştir. Yine çalışmada negatif serum olarak kullanılan plazmaferez örnekleri Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi İbn-i Sina Hastanesi'nden temin edilmiştir.

Kızılay Orta Anadolu Bölge Kan Merkezi'nden alınan ve serolojik olarak pozitifliği saptanmış serum örnekleri viral yükleri tayin edilmek üzere Real Time-PZR yöntemi kullanılarak test edilmiştir.

2.1.2. PZR Primerleri ve Probları

HBV ve HCV RT-PZR için COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HBV Test, v2.0 ve COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HCV Quantitative Test, 2.0 Kitleri kullanılmıştır. Kullanılan kitlerin klavuzlarının içeriğinde primer dizileri belirtilmemiştir. HDV RNA RT- PZR için kullanılan primer ve prob dizileri ise çizelge 2.1.'de verilmiştir.

Çizelge 2.1. HDV RNA RT-PZR ve prob dizileri.

Primer / Prob	Nükleotit dizileri	Kaynak
HDV-F1	5'-TCG GGT CGG CAT GGC ATC T-3'	Kendi Tasarımımız
HDV-R1	5'-CWC TCC CTT AGC CAT CCG AG-3'	Kendi Tasarımımız
*TaqMan-1	fam-TCC TCC TWC GGA TGC CCA GGT CGG A-tamra	Kendi Tasarımımız

*TaqMan prob (5' label= Fam, 3' quencher= Tamra ve W=T ya da A

HDV tüm genom PZR için ise daha önce laboratuvarımız yaptığı çalışmalar ile tasarlanmış olan primer dizileri kullanılmıştır (Çelik, 2011). HDV PZR'de kullanılan primer dizileri Çizelge 2.2'de verilmiştir.

Çizelge 2.2. HDV tüm genom PZR'de kullanılan primer dizileri.

Primer	Nükleotit dizileri	Kaynak
HDV-A1 (sense; 1160F)	5'-GCG GGC CGG CTA CTC TTC TTT C-3'	Kendi tasarımıımız
HDV-A2 (anti- sense; 430R)	5'-CTA GCC CCG TTG CTT TCT TTG CTT T-3'	Kendi tasarımıımız
HDV-B1 (sense; 300F)	5'-ACC TCC AGA GGA CCC CTT CAG CGA A-3'	Kendi tasarımıımız
HDV-B2 (anti- sense; 1400R)	5'-GAG GGA GCT CCC CCG GCG AAG AG-3'	Kendi tasarımıımız

Çizelge 2.3. HBV tüm genom PZR'de kullanılan primer dizileri.

Primer	Nükleotit dizileri	Kaynak
HBVP1	5'-CCG GAA AGC TTG AGC TCT TCT TTT TCA CCT CTG CCT AAT CA-3'	Günther ve ark., 1995
HBVP2	5'-CCG GAA AGC TTG AGC TCT TCA AAA AGT TGC ATG GTG CTG-3'	Günther ve ark., 1995

HBV tüm genom ve HCV parçalı genom PZR'de kullanılan primer dizileri sırasıyla Çizelge 2.3 ve Çizelge 2.4'te belirtilmiştir.

Çizelge 2.4. HCV parçalı genom PZR’de kullanılan primer dizileri.

Primer	Nükleotit dizileri	Kaynak
NS3ALLF ₂ (1. tur PZR) (2. tur PZR)	5'-TGT AAA ACG ACG GCC AGT ATG GAR AYY AAG VTY ATY ACX TGG G-3' X= Inosin	Besse ve ark., 2012
NS3ALLR ₁ (1. tur PZR)	5'-CAG GAA ACA GCT ATG ACC CTY TTX CCR CTX CCX GTX GGX GCR TG-3'	Besse ve ark., 2012
2nd NS3ALLF ₃ (2. tur PZR)	5'-TGT AAA ACG ACG GCC AGT ATC TTX CTX GGX CCX GCY GA-3'	Besse ve ark., 2012
2nd NS3ALLR ₂ (2. tur PZR)	5'-CAG GAA ACA GCT ATG ACC GCX ACY TGR TAX GTX TGX GG-3'	Besse ve ark., 2012
EF1B (NS5A için) (1.tur PZR)	5'-TGG ATG ACC CGG CTG ATA G-3'	Almuedo, 2013
ER1B (NS5A için) (1.tur PZR)	5'-CCA CAR GAG GTT GGC CTC-3'	Almuedo, 2013
IF1B (NS5A için) (2.tur PZR)	5'-TCC CCC ACG CAC TAC GTG-3'	Almuedo, 2013
IR1B (NS5A için) (2.tur PZR)	5'-CTA GCY GAR GAG CTG GCC-3'	Almuedo, 2013
NS5B 1FWD (1.tur PZR)	5'-CTA CCA TCA TGG CTA ARA AYG AGG T-3'	Danielsson ve ark., 2014
NS5B 1REV (1.tur PZR)	5'-ATG ATG TTA TGA GCT CCA RGT CRT A-3'	Danielsson ve ark., 2014
NS5B 2FWD (2.tur PZR)	5'-TAT GAY ACC CGC TGY TTT GAC-3'	Danielsson ve ark., 2014
NS5B 2REV (2.tur PZR)	5'-CCT GGT CAT AGC CTC CGT GAA-3	Danielsson ve ark., 2014
HCV 11 (5'UTR için) (1.tur PZR)	5'-ATA CTC GAG GTC CAC GGT CTA CGA GAC CT-3'	Garson ve ark., 1990
HCV 13 (5'UTR için) (1.tur PZR)	5'-CTG TGA GGA ACT ACT GTC TT-3'	Okamoto ve ark., 1990
HCV 14 (5'UTR için) (2.tur PZR)	5'-TTC ACG CAG AAA GCG TCT AG-3'	Okamoto ve ark., 1990
HCV 12 (5'UTR için) (2.tur PZR)	5'-CAC TCT CGA GCA CCC TAT CAG GCA GT-3'	Garson ve ark., 1990

2.1.3. DNA Dizi Analizi Primerleri

HDV ve HCV cDNA dizi analizi PZR'si aşamasında kullanılan primerlerden yararlanılırken, HBV DNA dizi analizinde tüm genomun farklı bölgelerini hedef alan farklı primerler kullanılmıştır. HBV DNA dizi analizinde kullanılan primerler Çizelge 2.5'te belirtilmiştir.

Çizelge 2.5. HBV DNA dizi analizinde kullanılan primerler.

Primer	Nükleotit dizileri	Kaynak
HBVCP11	5'-GAC CTT GAG GCA TAT TTC AAA GAC-3'	Karataylı ve ark., 2012
HBVCP12	5'-GAA TTT GGA GCT ACT GTG GAG TTA C-3'	Kendi tasarımı
HBV1	5'-CAT GCG TGG AAC CTT TCT GG-3'	Kendi tasarımı
HBV2	5'-GCT ATG CCT CAT CTT CTT GTT GGT-3'	Kendi tasarımı
HBV (2357-2380)	5'-GGC AGG TCC CCT AGA AGA AGA ACT-3'	Günther ve ark., 1995

2.1.4. Kimyasallar

Agaroz	Sigma, Almanya
Etidyum Bromid	Sigma, Almanya
Formamid	
Mutlak Etanol	Kimetsan, Türkiye
Silika	Sigma, Almanya
Sodyum Asetat (NaOAc)	

Trehaloz

Sigma, Almanya

Tris-HCl

Sigma, Almanya

Tween-20

AppliChem, Almanya

2.1.5. Tampon ve Çözeltiler

Çalışmada kullanılan çözeltiler ve içerikleri çizelge 2.6.'da belirtilmiştir.

Çizelge 2.6. Çalışmada kullanılan tampon ve çözeltiler.

ÇÖZELTİ / TAMPON	İÇERİK
Tris-HCl (1 M / pH: 8)	7,88 gr. Tris-HCl 50 ml. dH ₂ O ile çözülür.
10X TAE	48,4 gr. Trisbase, 20 ml. EDTA (0,5 M, pH: 8) ve 11,42 ml. Glacial Acetic Acid dH ₂ O ile 1000 ml.'ye tamamlanır.
Silika	Az miktarda dH ₂ O'da 35,4 g. GSCN çözülür. Çözelti içine 0,12 g. Tris, 0,5 g. silika ve 50 µl. HCl eklenir. Son karışım dH ₂ O 100 ml.'ye tamamlanır.
Sodyum Asetat (NaOAc) Tamponu (pH:4.6)	3M'lık sodyum asetattan (pH: 4,6) 3,0 µl, % 95'lik etanolden 62,5 µl ve 14,5 µl ddH ₂ O alınır ve temiz bir tüpte karışım hazırlanır.

2.1.6. Kullanılan Cihazlar

ABI PRISM 310 Genetic Analyzer

ACTGene ASP-2680 NanoDrop

Christ Alpha 1-2 LD plus Freeze-dryer Liyofilizatör

Hassas Terazı

Jel Elektroforezi Ekipmanı

New Brunswick Ultra-Low Temperature Soğutucu (“Freezer”)

pH Metre

Roche LightCycler 480 II RT-PZR Cihazı

Roche Cobas Taqman 48 RT-PZR Cihazı

Soğutmalı Santrifüj

Termal Döngü (“Thermal Cycler”) PZR Cihazı (Eppendorf, Almanya)

Topo İnkübatör-Çalkalayıcı

2.1.7. Kullanılan Kitler

High Pure Viral RNA Kit (Roche Diagnostics, Almanya)

High Pure Viral Nucleic Acid Kit (Roche Diagnostics, Almanya)

BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, ABD)

Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche Diagnostics, Almanya)

COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HBV Test, v2.0 (Roche Diagnostics, Almanya)

COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HCV Quantitative Test, 2.0 (Roche Diagnostics, Almanya)

LightCycler 480 Probes Master (Roche Diagnostics, Almanya)

2.2. Yöntemler

2.2.1. HBV, HCV ve HDV Viral Yük Kantitasyonu

2.2.1.1. Viral DNA Ekstraksiyonu

HBV DNA ekstraksiyonları High Pure Viral Nucleic Acid Kit (Roche Diagnostics, Almanya) kullanılarak yapılmıştır. İşlemlerde soğutmalı santrifüj kullanılmıştır. Santrifüj işlemleri +4°C’de gerçekleştirilmiştir.

1. 200 µl’ lik HBV pozitif hasta serumu örnekleri temiz ependorf tüplere aktarılır.
2. Üzerlerine her tüp için 200 µl Bağlanma Tamponu + Poly (A) karışımı ile 50’şer µl Proteinaz K eklenir.
3. Karışım iyice vortekslenir ve 72°C’de 10 dk inkübasyona bırakılır.
4. Inkübasyon sonrasında örneklerle 100’er µl Bağlanma Tampou eklenir.
5. Karışım iyice vortekslenerek filtreli tüplere aktarılır.
6. Tüpler 8.000×g’ de 1 dk santrifüj edilir ve süpernatant atılır.
7. Tüplere 500 µl “Inhibitor Removal” Tamponu eklenir.
8. 8.000×g’ de 1 dk santrifüj edilir ve süpernatant atılır.
9. Tüplere 450 µl Yıkama Tamponu eklenir.
10. 8.000×g’ de 1 dk santrifüj edilir ve süpernatant atılır.
11. Tüplere 450 µl Yıkama Tamponu eklenir.
12. 8.000×g’ de 1 dk santrifüj edilir ve süpernatant atılır.
13. 15.000×g (Max. Hız)’de 10 sn santrifüj edilir ve süpernatant atılır.
14. Tüplere 50 µl Elüsyon Tamponu eklenir.

15. 8.000×g' de 1 dk santrifüj edilir.
16. Elde edilen DNA -20°C'ye kaldırılır.

2.2.1.2. Viral RNA Ekstraksiyonu

HDV ve HCV RNA ekstraksiyonları High Pure Viral RNA Kit (Roche Diagnostics, Almanya) kullanılarak yapılmıştır. İşlemlerde soğutmalı santrifüj kullanılmıştır. Santrifüj işlemleri +4°C'de gerçekleştirilmiştir.

1. 200 µl' lik HDV/HCV pozitif hasta serumu örnekleri temiz ependorf tüplere aktarılır.
2. Üzerlerine her tüp için 400 µl Bağlanma Tamponu + Poly (A) karışımı eklenir.
3. Karışım iyice vortekslenerek filtreli tüplere aktarılır.
4. Tüpler 8.000×g' de 15 sn santrifüj edilir ve süpernatant atılır.
5. Tüplere 500 µl "Inhibitor Removal" Tamponu eklenir.
6. 8.000×g' de 1 dk santrifüj edilir ve süpernatant atılır.
7. Tüplere 450 µl Yıkama Tamponu eklenir.
8. 8.000×g' de 1 dk santrifüj edilir ve süpernatant atılır.
9. Tüplere 450 µl Yıkama Tamponu eklenir.
10. 8.000×g' de 1 dk santrifüj edilir ve süpernatant atılır.
11. 15.000×g (Max. Hız)'de 10 sn santrifüj edilir ve süpernatant atılır.
12. Tüplere 50 µl Elüsyon Tamponu eklenir.
13. 8.000×g' de 1 dk santrifüj edilir.
14. Elde edilen RNA -20°C'ye kaldırılır.

2.2.1.3. cDNA (Komplementer DNA) Eldesi

HDV RNA'dan cDNA eldesinde "Transcriptor First Strand cDNA Synthesis" Kit (Roche Diagnostics, Almanya) kullanılmıştır. Kitin protokolüne uyularak her bir tüp örnek için aşağıdaki basamaklar izlenilmiştir:

1. Aşama

"RandomHekzamer" Solüsyonu.....(600mM) 2µl
H₂O.....1µl
RNA.....(10 pmol) 10 µl

Yukarıda miktarları verilmiş olup buz üzerinde hazırlanan tüpler yavaşça al-ver yapılır ve 65°C'de 10 dk inkübasyona bırakılır.

2. Aşama

"Transkriptor Ters ("Revers") Transkriptaz" Tamponu...(5 X) 4 µl
"Protector" RNAz İnhibitor.....(40 U/ml) 0,5 µl
dNTP Karışımı.....(10 mM) 2 µl
Transkriptor Ters ("Revers") Transkriptaz.....(20 U/ml) 0,5 µl

Yukarıda miktarları verilmiş olan karışım örnek sayısı baz alınarak hazırlanır ve 7'şer µl olacak şekilde 1. aşamada inkübasyona bırakılan tüplerin üzerine eklenir. Pipetle nazıkçe al-ver yapılan tüpler kısaca döndürülerek aşağıda verilen protokole göre Thermal Döngü PZR Cihazı (Eppendorf, Almanya)'na konulur.

25°C'de.....10 dk
55°C'de.....30 dk
85°C'de.....5 dk
4°C'de.....∞

2.2.1.4. RT-PZR Kurulumu

2.2.1.4.1. HBV DNA ve HCV RNA için RT-PZR Kurulumu

HBV ve HCV RT-PZR aşaması, Cobas Taqman 48 RT-PZR Cihazı (Roche Diagnostics, Almanya) kullanılarak COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HBV Test, v2.0 (Roche Diagnostic, Almanya) Kiti'nin talimatlarına göre; HCV RT-PZR aşaması COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HCV Quantitative Test, 2.0 Kiti'nin talimatlarına uyularak yapılmıştır.

2.2.1.4.2. HDV RNA için RT-PZR Kurulumu

HDV RT-PZR aşaması LightCycler 480 II RT-PZR Cihazı (Roche Diagnostic, Almanya) ile yapılmıştır. Çalışmada, daha önce laboratuvarımız tarafından sentezlenen primerler kullanılmıştır (Çelik ve ark., 2011). Her bir örnek için aşağıdaki basamaklar izlenmiş olup işlemler buz üzerinde gerçekleştirilmiştir.

1. Aşama

HDV İleri Primer (10 pmol).....	0,6 µl
HDV Geri Primer (10 pmol).....	0,6 µl
HDV Prob (5 pmol).....	0,6 µl
GAPDH İleri Primer (10 pmol).....	0,6 µl
GAPDH Geri Primer (10 pmol).....	0,6 µl
GAPDH Prob (5 pmol).....	0,6 µl
LightCycler 480 Prob Master.....	10 µl
H ₂ O.....	1,4 µl

Karışımdan her bir örnek için 15 µl olacak biçimde plak kuyucuklarına pipetlenmiştir. Kuyucukların üzerlerine HDV cDNA örneklerinden 5 µl'şer yükleme yapılmıştır. Çalışmada önceden hazırlanan ve viral yükleri bilinen standart örnekler

kullanılmıştır. Her çalışmada bir kuyucuğa pozitif örnek yerine su yüklemesi yapılmış ve bu kuyucuk negatif kontrol olarak değerlendirilmiştir.

HDV RNA ve standartların tespiti için FAM filtresi (465-510) ve internal kontrolün tespiti için Vic/Hex/Yellow555 (533-580) filtresi kullanılmıştır. Uygulanan PZR protokolü Çizelge 2.7.'de belirtilmiştir.

Çizelge 2.7. HDV RT-PZR kurulumu.

	Denatürasyon	Amplifikasyon		Soğutma
Devir (Cycle)	1	40		1
Hedef Sıcaklık (C)	95	94	60	40
Süre (sa:dk:sn)	00:05:00	00:00:20	00:01:00	00:00:30

2.2.2. HBV, HCV ve HDV Örneklerinin Dizi Analizleri

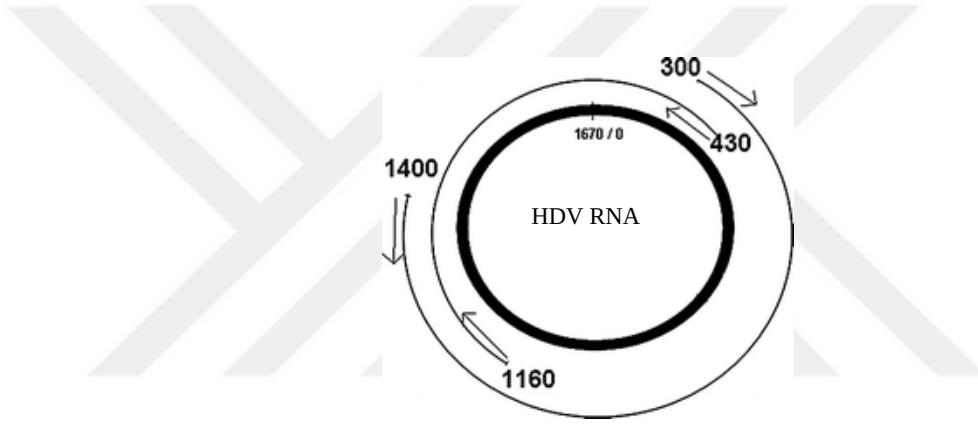
Çalışmaya dahil edilip liyofilizasyonda kullanılması kararlaştırılmış olan HBV, HCV ve HDV örneklerinin her üçünün de DNA dizi analizleri gerçekleştirilmiştir.

2.2.2.1. Viral RNA ve DNA Ekstraksiyonu

Kantitasyonu yapılan ve liyofilizasyon için uygun olarak bulunan HBV, HCV ve HDV pozitif serum örnekleri cDNA dizi analizi aşamasında kullanılmak üzere ekstrakte edilmiştir. Ekstraksiyon aşamaları; High Pure Viral RNA Kit (Roche Diagnostic, Almanya) ve High Pure Viral Nucleic Acid Kit'lerinde (Roche Diagnostic, Almanya) belirtilen protokollere uygun olarak gerçekleştirilmiştir.

2.2.2.2. PZR Kurulumu

HCV ve HDV RNA örneklerinin ekstraksiyonu sonrası “Transcriptor First Strand cDNA Synthesis” Kit (Roche Diagnostics, Almanya) ile cDNA elde edilmiştir. Daha önceki bölümde de açıklandığı gibi kit protokolünün adımları izlenerek işlem gerçekleştirilmiştir. Elde edilen cDNA örnekleri ile PZR yapılmıştır. HDV tüm genom PZR için 2 ayrı bölge seçilmiştir ve 2 primer seti (HDV-A ve HDV-B) kullanılmıştır. Primer bağlanma bölgeleri Şekil 2.1’de gösterildiği gibidir. Kullanılan PZR içerikleri ve koşulları sırasıyla çizelge 2.8 ve çizelge 2.9’da belirtilmiştir.



Şekil 2.1. HDV-A1/A2 ve HDV-B1/B2 primer bağlanma bölgelerinin şematik gösterimi: 300F (nt 300-320), 1600R (nt 1580-1600), 1160F (nt 1160-1180), 430R (nt 410-430) (Çelik ve ark., 2011).

Çizelge 2.8. HDV tüm genom PZR içerikleri.

Kullanılan Kimyasal	Kullanılan Miktar
HDV cDNA	5 µl
*HDV-A1 İleri Primer (1160F) (10 pmol) / HDV-A2 Geri Primer (430R) (10 pmol)	2,5 µl / 2,5 µl
*HDV-B1 İleri Primer (300F) (10 pmol) / HDV-B2 Geri Primer (1400R) (10 pmol)	2,5 µl / 2,5 µl
Tampon (10X)	5 µl
MgCl ₂ (25 mM)	2 µl
dNTP karışımı (2 mM)	5 µl
Taq DNA Polimeraz (Roche Diagnostic, Almanya)	0,5 µl
ddH ₂ O	27,5 µl
Toplam Hacim	50 µl

* İki ayrı hedef bölge için seçilen primerler.

Çizelge 2.9. HDV tüm genom PZR koşulları.

Hedef Bölge	Primerler	Reaksiyon Koşulları	Döngü Sayısı
HDV nt; 1160-1180 HDV nt; 410-430	HDV-A1 (İleri Primer) HDV-A2 (Geri Primer)	94°C'de 5 dk 94°C'de 30 sn 65°C'de 1 dk 72°C'de 2 dk 72°C'de 7 dk	35
HDV nt; 300-320 HDV nt; 1580-1600	HDV-B1 (İleri Primer) HDV-B2 (Geri Primer)	94°C'de 5 dk 94°C'de 40 sn 65°C'de 1,5 dk 68° C'de 3 dk 72°C'de 7 dk	35

HBV DNA PZR'ı için örneklerin ekstraksiyonu sonrası çizelge 2.10'da belirtilen miktarlara göre HBV PZR kurulmuştur.

Çizelge 2.10. HBV tüm genom PZR içeriği.

Kullanılan Kimyasal	Kullanılan Miktar
HBV DNA	5 µl
HBVP1 (10 pmol)	1,5 µl
HBVP2 (10 pmol)	1,5 µl
Tampon (10X)	5 µl
MgCl ₂ (25 Mm)	2 µl
dNTPmix (2 mM)	5 µl
Taq DNA Polimeraz (Roche Diagnostic, Almanya)	1 µl
ddH ₂ O	29 µl
Toplam Hacim	50 µl

HBV DNA tüm genom PZR koşulları ise çizelge 2.11'de verilen şartlara göre gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 2.11. HBV tüm genom PZR koşulları.

Primerler	Reaksiyon Koşulları	Döngü Sayısı
HBVP1 HBVP2	94°C'de 2 dk	1
	94°C'de 40 sn 60°C'de 1,5 dk 68°C'de 3 dk*	40
	72°C'de 20 dk	1
	4°C	∞

*Her siklusta 2 dk uzatılarak 9 dk'ya kadar çıkarılır.

HCV Genom PZR'ı, 4 bölge hedeflenerek kurulmuştur. Bu bölgeler; NS3, NS5A, NS5B ve 5'UTR bölgeleridir. Her bölge için farklı primerlerin kullanıldığı 2 tur PZR yapılmıştır. PZR 'lerin içeriği çizelge 2.12, kurulumu izelge 2.13' te belirtildiği gibidir.

Çizelge 2.12. HCV genom PZR içeriği.

Kullanılan Kimyasal	Kullanılan Miktar
HBV DNA	5 µl
*Primer (İleri) (10 pmol)	2 µl
*Primer (Geri) (10 pmol)	2 µl
Tampon (10X)	5 µl
MgCl ₂ (25 mM)	3 µl
dNTPmix (2 mM)	5 µl
Taq DNA Polimeraz (Roche Diagnostic, Almanya)	0,5 µl
ddH ₂ O	27,5 µl
Toplam Hacim	50 µl

* Kullanılan primerler Çizelge 2.3'te belirtildiği gibidir.

Çizelge 2.13. HCV genom PZR kurulumu.

Bölge	1. Tur PZR	2. Tur PZR
NS3	94°C'de 3 dk 94°C'de 15 sn 53°C'de 1 dk 72°C'de 1 dk } 45 döngü	94°C'de 5 dk 94°C'de 30 sn 53°C'de 1 dk 72°C'de 1 dk } 5 döngü 94°C'de 15 sn 67°C'de 30 sn 72°C'de 30 sn } 35 döngü
NS5A	94° C'de 3 dk 94° C'de 35 sn 54° C'de 35 sn 72° C'de 1,30 sn 72° C'de 10 dk } 45 döngü	94° C'de 3 dk 94° C'de 35 sn 54° C'de 35 sn 72° C'de 1,30 sn 72° C'de 10 dk } 45 döngü
NS5B	95° C'de 5 dk 95° C'de 30 sn 50° C'de 30 sn 72° C'de 2 dk 72° C'de 7 dk } 40 döngü	95° C'de 5 dk 95° C'de 30 sn 55° C'de 30 sn 72° C'de 1,30 sn 72° C'de 7 dk } 40 döngü
5'UTR	95° C'de 5 dk 95° C'de 1 dk 55° C'de 1 dk 72° C'de 1 dk 72° C'de 7 dk } 30 döngü	95° C'de 5 dk 95° C'de 1 dk 55° C'de 1 dk 72° C'de 1 dk 72° C'de 7 dk } 30 döngü

2.2.2.3. PZR Ürünlerinin Agaroz Jelde Görüntülenmesi

HBV, HCV ve HDV PZR örneklerinin DNA/cDNA dizi analizi için yeterli olup olmadığını belirlemek amaçlı agaroz jel elektroforezi görüntülenmesi gerçekleştirilmiştir.

Öncelikle 10X TAE çözeltisi dH₂O ile 1X'e indirgenmiştir. 0,5 g. agaroz tartılıp temiz bir cam behere aktarılmıştır. Üzerine 50 ml. 1X TAE solüsyonundan eklenerek %1'lik agaroz jel karışımı hazırlanmıştır. Hazırlanan karışım mikrodalga fırında eritilip 1 µl.etidyum bromür eklendikten sonra jel tankına dökülerek donmaya bırakılmıştır. Jel donduktan sonra taraklar çıkarılarak kuyucuklara PZR örnekleri yükleme tamponu ile karıştırılarak yüklenmiştir. Jeldeki bantların görüntülenmesi için "UVP jel dökümantasyon sistemleri" kullanılmıştır.

2.2.2.4. PZR Ürünlerinin Silika ile Temizlenmesi

1. HBV, HCV ve HDV pozitif PZR örneklerine 50'şer µl silika eklenir.
2. Örnek içeren silikalı tüpler 4600 rpm'de 1 dk santrifüj edilir.
3. Üst kısım alttaki silikalı peletin bozulmamasına dikkat edilerek pipetle alınır.
4. Altta kalan peletin üzerine %70'lik 50 µl etil alkol eklenir.
5. 4600 rpm'de 1 dk santrifüj edilir.
6. Üst kısım alttaki silikalı peletin bozulmamasına dikkat edilerek pipetle alınır.
7. Peletin üzerine 50 µl su eklenir ve tüpler vorteks yapılır.
8. Tüpler kapakları açık olacak şekilde 72°C'de 15 dk bekletilir.
9. 4600 rpm'de 1 dk santrifüj yapılır.

2.2.2.5. DNA /cDNA Miktarının NanoDropla Ölçülmesi

Silika ile temizlenen ürünlerin DNA dizi analizi PZR'lerinin yapılabilmesi için elimizde en az 10 ng ürün bulunmalıdır. Bu nedenle nanodrop ile miktar tayini yapılmıştır.

Cihaza ilk önce 2 µl su konulup cihaz sıfırlandı. Daha sonra 2-2,5 µl DNA örneği konulup ölçüm yapıldı. Ölçüm sonucunda 10 ng/µl bulunan örnekler ile bir sonraki aşamaya geçildi.

2.2.2.6. DNA Dizi Analizi PZR Kurulumu

HBV, HCV ve HDV DNA/cDNA dizi analizi PZR'lerin "BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing" Kit (Applied Biosystems, ABD) kullanılarak kit içerisinden çıkan kullanım kılavuzunun talimatları doğrultusunda yapılmıştır.

ddH₂O.....5,25 / 5,75 µl

DNA Dizi Analizi Tamponu.....1,75 µl

Primer*.....1 µl (3,2 pmol)

Big dye.....0,5 µl

DNA Örneği^.....1 / 1,5 µl (10 ng.)

Total Hacim.....10 µl

^ HBV DNA dizi analizi PZR için 1,5 µl DNA örneği kullanılırken; HCV ve HDV cDNA dizi analizi PZR için 1 µl cDNA örneği kullanılmıştır.

*HBV DNA dizi analizlerinde Çizelge 2.5’de belirtilen HBVCP11, HBVCP12, HBV1, HBV2 ve HBV(2357-2380) primerleri; HDV dizi analizlerinde Çizelge 2.2’deki HDV-A1, HDV-A2, HDV-B1 ve HDV-B2 primerleri ve HCV dizi analizlerinde Çizelge 2.4’teki HCV PZR primerlerinin tümü kullanılmıştır.

Çizelge 2.14. DNA Dizi analizi PZR termal cycler döngü sıcaklıkları ve süreleri.

Sıcaklık Derecesi	Döngü Süresi	Döngü Sayısı
94°C	1 dk	1
94°C	10 sn	25
50°C	5 sn	
60°C	4 dk	
4°C	∞	

2.2.2.7. DNA Dizi Analizi PZR’nin Temizlenmesi

1. Formamid, -20°C’den erimesi için dışarı çıkarılır.
2. Örnek tüpü başına NaOAc çözeltisinden 1 µl ve %99’luk etanolden 25 µl alınır ve hazırlanan karışımdan her bir tüpe 26’şar µl dağıtılır.
3. Tüp kapakları kapatılıp el ile çalkalama yapılır.
4. Tüpler 10 dk oda sıcaklığında bekletilir.
5. 4500 rpm’de 10 dk santrifüj yapılır.
6. Süpernatant pipetle atılır.
7. Peletin üzerlerine 35 µl %70’lik etanol eklenir.

8. 4500 rpm’de 5 dk santrifüj yapılır.
9. Süpernatant pipetle atılır.
10. Her bir tüpe 20 µl formamid eklenir ve vorteks yapılır.
11. Tüpler kısa bir santrifüj yapıp cihaza yüklenir.

Temizleme sonrası elde edilen PZR ürünleri, “ABI Prism™ 310 Genetic Analyzer, PE Applied Biosystems, Foster City, CA” DNA dizi analizi cihazına yüklendi.

2.2.3. Liyofilizasyon Aşaması

Viral yük ölçümü yapılan ve daha sonra -80°C’de muhafaza edilen serum örnekleri arasından birer örnek HBV, HCV ve HDV yüksek pozitif numune seçildi. HBV ve HCV pozitif örneklerinin Cobas Ampliprep TaqMan 48 (Roche Diagnostic, Almanya) ile tekrar kantitatif ölçümleri yapıldı. HDV pozitif örneğinin kantitatif ölçümü ise Light Cycler 480 (Roche Diagnostic, Almanya) cihazı ile gerçekleştirildi. Elde edilen sonuçlara göre liyofilizasyon cihazına yükleme öncesi aşağıdaki çalışma basamakları uygulandı.

2.2.3.1. HBV Liyofilizasyonu

Ankara Üniversitesi Merkez Laboratuvarına gönderilen örnek için kantitatif RT-PZR testi uygulandı. Test sonucuna göre örnek; 1,58E+6 IU/ml olarak tespit edildi. Aşağıdaki deney basamakları izlendi;

Plazmaferez Hazırlama: Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi İbn-i Sina Hastanesi’nden tedarik edilen plazmaferezler 50 ml’lik falkonlara aktarıldı. +4°C’de 7.000 rpm’de 20 dk 2 kez santrifüj edildi. Yağ tabakaları ve eritrosit artıkları dibe çöktürüldü. Santrifüj işlemi tamamlanan plazmaferez örnekleri 1 litrelik şişelere

aktarıp -80°C'ye kaldırıldı. Liyofilizasyon işleminden bir gün önce ise +4°C'ye kaldırılıp yavaşça çözünmesi sağlandı.

Dilüsyon Matriksi Hazırlama: Çizelge 2.6'da belirtildiği miktarlarda hazırlanmış olan 1 Molar Tris-HCl çözeltisinden 200 µl pipetle alınıp 500 ml'lik temiz cam bir behere aktarıldı. Hassas terazide 10 gr. Trehaloz tartıldı ve behere eklendi. Son olarak Tween-20'den 20 µl pipetle çekilip aynı behere eklendi. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi İbn-i Sina Hastanesi'nden almış olduğumuz plazmaferez 200 ml miktarda ölçülerek kimyasalların eklendiği behere aktarıldı. Hazırlanan karışımli beher, manyetik balık yardımıyla homojenize edilmek üzere manyetik karıştırıcıya konuldu. Dilüsyon matriksi oda sıcaklığında yarım saat kadar karıştırıldı.

Havuz Hazırlama: TaqMan'da RT-PZR ile kantitatif ölçümü yapılan yüksek pozitif HBV örneğinden 20 ml alınarak temiz bir behere aktarıldı. Ardından 40 ml negatif serum (plazmaferez) eklenerek 1/3 dilüsyon yapıldı. Manyetik balık yardımıyla +4°C'de 1 saat manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Süre sonunda elde edilen 60 ml örnekten 20 ml alındı ve temiz bir behere aktarıldı. Artan örnek -80°C dolaba kaldırıldı. 20 ml örneğin üzerine hazırlamış olduğumuz dilüsyon matriksinden 180 ml aktararak 1/10 dilüsyon yapıldı. Karışım balık yardımıyla +4°C'de 1 saat manyetik karıştırıcıda karıştırıldı.

Şişeleme: 200 adet steril cam viyal ve plastik tıplar doldurulmak üzere hazırlandı. Manyetik karıştırıcıda yeterince homojenizasyon işlemi gerçekleştirilen örnek otomatik pipet yardımıyla 1000'er µl olacak şekilde viyalere hızlıca dağıtıldı. Viyaller ağızları yarım kapalı olacak şekilde tıplarla kapatıldı. Hazırlanan örnek içerikli cam viyaller liyafilizatörün raf bölümüne yerleştirildi. Raflar -80°C'ye kaldırıldı. Donma (freezing) aşaması için viyaller 1 saat kadar dolapta muhafaza edildi.

Cihaza Yükleme: Cihaz kullanım klavuzundaki komutlar izlenerek soğutma için 30 dk'ya ayarlandı. 30 dk sonunda cihazın uyarısı ile birlikte cam fanus

(chamber) açıldı. -80°C'ye kaldırılmış olan cam viyallerin dizildiği raf dolaptan hızlı bir şekilde çıkarıldı. Bu aşamada örneklerin çözülmeden donmuş halde cihaza aktarılmasına çok önem verildi. Örnekler yüklendikten sonra cam fanus kapatılarak rafların konumu ayarlandı. Birincil kurutma işlemi başlatılmış oldu. Bu aşama 24 saat sürmüştür. Ekranda görülen basınç ve sıcaklık ayarları tablo 2.10'da gösterildiği gibidir.

Saklama: Liyofilizasyon işlemi tamamlandıktan sonra cam fanus açılmadan önce döner kol yardımıyla raflar birbiri üzerine sıkıştırılıp kapatıldı. Böylece yarı açık tıpların cam şişelerin ağzını tamamen kapatması sağlandı. Daha sonra cihaz içindeki vakum dikkatlice elimine edilerek liyofilize olmuş materyaller içeren plastik tıpalı cam viyaller metal kapaklar ile sıkıştırıldı. Böylece viyalere hava geçişi engellenmiş oldu. Örnekler -80°C'a kaldırıldı. Stabilitate çalışması için ayrılan örnekler ise -20°C ve +4°C'a kaldırıldı.

Çizelge 2.15. Liyofilizasyon cihazının birincil kurutma başlangıç aşamasındaki basınç ve sıcaklık değerleri.

Örnek	Kondenser Sıcaklığı (°C)	Vakum mbar (°C)	Vakum (mbar)	İşlem Süresi
HBV	-58.1°C	-47.6°C	0,052 mbar	*Soğutma: 30 dk Birincil Kurutma: 24 sa
HCV	-52.5°C	-44.8°C	0,072 mbar	*Soğutma: 30 dk Birincil Kurutma: 24 sa
HDV	-56.9°C	-46.4°C	0,058 mbar	*Soğutma: 30 dk Birincil Kurutma: 24 sa

*Cihaza yükleme yapılmadan önce yarım saatlik bir vakum pompası soğutma işlemi gerçekleştirilmiştir.

2.2.3.2. HCV Liyofilizasyonu

Ankara Üniversitesi Hepatoloji Laboratuvarında çalışılan örnek için kantitatif RT-PZR testi uygulandı. Test sonucuna göre örnek; 4,20E+5 IU/ml olarak tespit edildi. Aşağıdaki deney basamakları izlendi;

Plazmaferez Hazırlama: Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi İbn-i Sina Hastanesi'nden tedarik edilen plazmaferezler 50 ml'lik falkonlara aktarıldı. +4°C'de 7.000 rpm'de 20 dk 2 kez santrifüj edildi. Yağ tabakaları ve eritrosit artıkları dibe çökertildi. Santrifüj işlemi tamamlanan plazmaferez örnekleri 1 litrelik şişelere aktarılıp -80°C'ye kaldırıldı. Liyofilizasyon işleminden bir gün önce ise +4°C'ye kaldırılıp yavaşça çözünmesi sağlandı.

Dilüsyon Matriksi Hazırlama: Çizelge 2.6'da belirtildiği üzere hazırlanmış olan 1 Molar Tris-HCl çözeltisinden 180 µl pipetle alınıp 500 ml'lik temiz cam bir behere aktarıldı. Hassas terazide 9 gr trehaloz tartıldı ve behere eklendi. Son olarak Tween-20'den 18 µl pipetle çekilip aynı behere eklendi. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi İbn-i Sina Hastanesi'nden almış olduğumuz plazmaferez 180 ml miktarda ölçülerek kimyasalların eklendiği behere aktarıldı. Hazırlanan karışımli beher, manyetik balık yardımıyla homojenize edilmek üzere manyetik karıştırıcıya konuldu. Dilüsyon matriksi oda sıcaklığında yarım saat kadar karıştırıldı.

Havuz Hazırlama: TaqMan'da RT-PZR ile kantitatif ölçümü yapılan yüksek pozitif HCVörneğinden 25 ml alınarak temiz bir behere aktarıldı. Ardından örneğin üzerine hazırlanmış olduğumuz dilüsyon matriksinden 175 ml aktararak 1/8 dilüsyon yapıldı. Karışım manyetik balık yardımıyla +4°C'de 1 saat manyetik karıştırıcıda karıştırıldı.

Şişeleme, cihaza yükleme ve saklama aşamaları, HBV liyofilizasyonunda anlatılan prosedüre uyularak gerçekleştirilmiştir.

2.2.3.3. HDV Liyofilizasyonu

Hepatit Delta kantitasyonu Hepatoloji Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi. Ölçüm için Roche LightCycler 480 cihazı kullanıldı. RT-PZR yöntemi çalışıldı. Sonuç olarak liyofilize edilecek örneğin viral yükü 5E+5 IU/ml olarak tespit edildi. Aşağıdaki deney basamakları izlendi;

Plazmaferez Hazırlama: Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi İbn-i Sina Hastanesi'nden tedarik edilen plazmaferezler 50 ml'lik falkonlara aktarıldı. +4°C'de 7.000 rpm'de 20 dk 2 kez santrifüj edildi. Yağ tabakaları ve eritrosit artıkları dibe çökertildi. Santrifüj işlemi tamamlanan plazmaferez örnekleri 1 litrelik şişelere aktarılıp -80°C'ye kaldırıldı. Liyofilizasyon işleminden bir gün önce ise +4°C'ye kaldırılıp yavaşça çözünmesi sağlandı.

Dilüsyon Matriksi Hazırlama: Çizelge 2.6'da belirtildiği üzere hazırlanmış olan 1 Molar Tris-HCl çözeltisinden 200 µl pipetle alınıp 500 ml'lik temiz cam bir behere aktarıldı. Hassas terazide 10 gr. Trehaloz tartıldı ve behere eklendi. Son olarak Tween-20'den 20 µl pipetle çekilip aynı behere eklendi. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi İbn-i Sina'dan almış olduğumuz plazmaferez 200 ml miktarda ölçülerek kimyasalların eklendiği behere aktarıldı. Hazırlanan karışımli beher, manyetik balık yardımıyla homojenize edilmek üzere manyetik karıştırıcıya konuldu. Dilüsyon matriksi oda sıcaklığında yarım saat kadar karıştırıldı.

Havuz Hazırlama: RT-PZR ile kantitatif ölçümü yapılan yüksek pozitif HDV örneğinden 20 ml alınarak temiz bir behere aktarıldı. Ardından örneğin üzerine hazırlanmış olduğumuz dilüsyon matriksinden 180 ml aktararak 1/10 dilüsyon yapıldı. Karışım balık yardımıyla +4°C'de 1 saat manyetik karıştırıcıda karıştırıldı.

Şişeleme, cihaza yükleme ve saklama aşamaları, HBV liyofilizasyonunda anlatılan prosedüre uyularak gerçekleştirilmiştir. HBV, HCV ve HDV liyofilizasyonu sürecinde ikincil kurutma aşaması gerçekleştirilmemiştir.

3. BULGULAR

3.1. DNA Dizi Analizi

3.1.1. HDV cDNA Dizi Analizi

< HDV cDNA Tüm Genom Dizisi

```
ATGGGGCCACGCACCGAACGAAGGGAACGCGAGGGGCAGATCAGCGCCCCGAGAG
GGGATAAATGGCAAAGAGCATTGGAACGCCGAGGGGAATACTCCCAAGAAGGA
AAAGAGGTGATCGGGAAACGGACGCTTTCCCAGAGACGCTGGAGACATCTGGAA
GGGGAAAGAGGATAGGTGGAAAAAGAGGAGGCGGGCCCCCGATCCGAGGGGC
CCGGCGCCCAAGTTTGGAGAGCACTCCGGGCGGAAGGGTTGAGTAGCACCAGA
GGGAGGAATCCACACGGAGATGAGCAGACAAATCACCTCCAGAGGACCCCTTCA
GCGAACAGAAAGGGCACTAGCAGCGATAGGAGTAAGATCATAGCGATAGGAAGG
GATGCTAGGAGTTAGAGGAGACCGAAGCGAGGAGGAAAGCAAAGAAAGCAACG
GGGCTAGTCGGCGGGAGTTCCGCCTCCCAGAGGTCCCGAGTGAGGCTTATCCCG
GGGAACTCGACTTATCGTCCCCACATAGCGGATTCCCGGCGCCCCCTTCAAAAGCG
ACTGGGGGGGGAGCTAGGAACATGGGGGTCCGCAGTGAGCCATGGGATGCCCT
TCCCGATTCCGTCCAAACCCCTCCCAGGGAGTCGCCAGCGAATGGCGGGACCC
CACTTCAGCAGGGTCCGCGTTCCATCCTTTCTTACCTGATGGCCGGCATGGTCCCA
GCCTCCTCGCTGGCGCCGGCTGGGCAACATTCCGAGGGGACCGCCTCCTCGGTAA
TGGCGAATGGGACCCAGAACTCTCTCTAGATTCCGATAGAGAATCGAGAGAAAA
CTGGCTCTCCCTTAGCCATCCGAGTGACGTTGTCCTCCTTCGGATGCCAGGTGCG
GACCGCGAGGAGGTGGAGATGCCATGCCGACCCGAAGAGGAAAGAAGGACGCG
GACGCGAACCTGTGAGTGGAACCCGCTTTATTCACTGGGGTCGACAGCTCTGAG
GAGAAAGGGAGGATCGGATGGGAAGAGTATATCCTATGGGAATCCCTGCGTTCC
CTCACGTCCAGCCCCTCCCAGTCCGACGAAGGGGACTCCGGATACCTGCATGCTG
GGGACGAAGCCGCCCCCGGGCGCTCCCCTCGGTGGTCCTTCGAGGGGGTTCACTC
CCCCAGTCGACGGGCCGGCTACTTCTTTCCCTTCTCTCGTCTTCTCGGTCAAC
CTCTTGAGTTCTCTTCCTCTTCCTTGCTGAGACTCTTCCCTCCCGCGCTCAGTTGC
CTCTTCTGTTCTCGAGGGCCTTCTTCGTGCGGTGATCCTGCCTCTCCTTGTGCGGTG
AATCCTCCCCTGAGAGGCCCTTCTCCTAGGTCCGGAGTCTACCTCCATCTGGTCCGT
CCGGGCCCTCTTCGCCGGGGGAGCCCCCTCTCCATCCTTATCCTTCTTTCCGAGAA
TTCCTTTGATGTTTCCCAGCCAGGGATTGTCGTCTCAAGTTTCTTGATCTTCTTCT
TCACCTTCCGGAGGTCCCTCTCGAGTTCCTCTAACTTCTTTCTTCCATTACCCACT
GCTCGAGAACCTCTTCTCGCCCTCCGCGACTCTTCTTCGATTCCGACCGGCTCATC
TCGACAAGAGGCGACGGTCCTCAGTACTCTTATTCTTTTCTGATAAAGAGGAGA
CTGCTGGAAGTCGACGCCCAAGTTCGAG
```

Şekil 3.1. HDV cDNA dizi analizi fasta formatı.

3.1.2. HBV DNA Dizi Analizi

<HBV Tüm Genom Dizisi

```
AACTCCACAACCTTCCACCAAACCTCTGCAAGATCCCAGAGTGAGAGGCCTGTATTTCCC
TGCTGGTGGCTCCAGTTCAGGAACAGTAAACCCTGTTCCGACTACTGTCTCTCCCATAT
CGTCAATCTTCTCGAGGATTGGGGACCCTGCGCTGAACATGGAGAACATCACATCAGG
ATTCTAGGACCCCTGCTCGTGTTACAGGCGGGGTTTTCTTGTTGACAAGAATCCTCA
CAATACCGCAGAGTCTAGACTCGTGGTGGACTTCTCTCAATTTCTAGGGGGAACCTACC
GTGTGTCTTGGCCAAAATTGCGAGTCCCCAACCTCCAATCACTCACCAACCTCCTGTCC
TCCAACCTTGCTCGTTATCGCTGGATGTGTCTGCGGCGTTTTATCATCTTCCTCTTCAT
CCTGCTGCTATGCCTCATCTTCTTGTTGGTTCTTCTGGACTATCAAGGTATGTTGCCCGT
TTGTCTCTAATTCCAGGATCTTCAACTACCAGCACGGGACCATGCAGAACCTGCACGA
CTCCTGCTCAAGGAACCTCTATGTATCCCTCCTGTTGCTGTACCAAACCTTCGGACGGA
AATTGCACCTGTATTCCCATCCCATCATCCTGGGCTTTCGGAAAATTCCTATGGGAGTG
GGCCTCAGCCCGTTTCTCCTGGCTCAGTTTACTAGTGCCATTTGTTCAAGTGGTTCGTAGG
GCTTCCCCCACTGTTTGGCTTTCAGTTATATGGATGATGTGGTATTGGGGGCCAAGTC
TGTACAGCATCTTGAGTCCCTTTTTACCGCTGTTACCAATTTTCTTCTGTCTTTGGGTAT
ACATTTAAACCCTAACAAAAACAAAAGATGGGGTTACTCTTTACATTTTCATGGGCTATG
TCATTGGATGTTATGGGTCAATTGCCACAAGATCACATCATACAGAAAAATCAAAGAATG
CTTTAGAAAACCTTCTGTTAACAGGCCTATTGATTGGAAAAGTCTGTCAACGTATTGTGG
GTCTTTTGGGTTTTGCTGCCCCTTTTACACAATGTGGTTATCCTGCTTTAATGCCTTTGT
ATGCATGTATTCAAGTCGAAGCAGGCTTTTACTTTCTCGCCAACCTACAAGGCCTTTCTG
TGTAACAATACTGAACCTTTACCCCGTTGCCCGGCAACGGCCAGGTCTGTGCCAAGT
GTTTGCTGACGCAACCCCACTGGCTGGGGCTTGGTCATGGGCCATCAGCGCATGCGT
GGAACCTTTCTGGCTCGTCTGCCGATCCATACTGCGGAACCTCTAGCCGCTTGTTTTGC
TCGCACGAGTCTGGAGCAAAACATTCTCGGGACGGATAAATCTGTTGTTCTCTCCCGCA
AATATACATCGTATCCATGGCTGCTAGGCTGTGCTGCCAAGTGGATCCTGCGCGGGAC
GTCTTTTGTTCAGTCCCGTCGGCGCTGAATCCCGCGGACGACCTTCTCGGGGTCGCT
TGGGACTCTCTCGTCCCCTTCTCCGTCTGCCGTTTCGACCGACCACGGGGCGCACCTCT
CTTACGCGGACTCCCCGTCTGTGCCTTCTCATCTGCCGGACCGTGTGCACTTCGCTTCA
CCTCTGCACGTCGCATGGAGACCACCGTGAAAGCCCAACCATTTCTTGCCCAAGGTCTTA
CATAAGAGGACTCTTGGACTCTCTGTAATGTCAACGACCGACCTTGAGGCATACCTCAA
AGACTGTTTGTGTTAAAGACTGGGAGGAGTTGGGGGAGGAGATTAGATTAAAGGCTTTT
GTATTAGGAGGCTGTAGGCATAAATTGGTCTGCGCACCAAGCACCATGCAACTTTTTTAC
CTCTGCCTAATCATCTCTTGTTCATGTCCTACTGTTCAAGCCTCCAAGCTGTGCCTTGGG
TGGCTTTGGGGCATGGACATTGATCCTTATAAAGAATTGGAGCTACTGTGGAGTTACT
CTCGTTTTTGCTTCTGACTTCTTTCCTTCAGTACGAGATCTTCTAGATAACGCCCTCAGC
TCTGTATCGGGAAGCCTTAGAGTCTCCTGAGCATTGTTACCTCACCATACTGCACTCA
GGCAAGCAATACTGTGCTGGGGGGAACATAATGACTCTAGCTACCTGGGTGGGTGGTAA
TTTGGAAAGATCCAATATCCAGGGACCTAGTAGTCAGTTATGTCAACACTAATATGGGC
CTAAAATTACAGGCAACTATTGTGGTTTTACATTTCTTGTCTCACTTTTGAAGAGAAAC
AGTTATAGAGTATTGGTGTCTTTTGGAGTGTGGATTGCACTCCTCCAGCTTATAGAC
CACCAAATGCCCTATCTTATCAACACTTCCGGAGACTACTGTTGTTAGACGACGAGGC
AGGTCCCCTAGAAGAAGAACTCCCTCGCCTCGCAGACGAAGGTCTCAATCGCCGCGTC
GCAGAAGATCTCAATCTCGGGAATCTCAATGTTAGTATTCCCTTGACTCATAAGGTGGG
AACTTTACGGGGCTTTATTCTTCTACTGTACCTGTCTTTAACCCCTCATTGGAAAACACC
CTCTTTTCCTAATATACATTTACACCAAGACATTATCAAAAAATGTGAACAATTTGTAG
GCCCCTCACAGTCAATGAGAAAAGAAGACTGCAATTGATTATGCCAGCTAGGTTTTA
TCCAAATGTTACCAAATATTTGCCATTGGATAAGGGTATTAAACCTTATTATCCAGAAT
ATTTAGTTAATCATTACTTCCAAACTAGACATTATTTACACACTCTATGGAAGGCGGGT
ATATTATACAAGAGAGAACTACACATAGCGCCTCATTTTGTGGGTACCATATTCTTG
GGAACAAGAGCTACAGCATGGGGCAGAATCTTTCCACCAGCAATCCTCTGGGATTCTT
TCCCGACCACAGTTGGATCCAGCCTTCAGAGCAAACACCGCAAATCCAGATTGGGAC
TTCAATCCCAACAAGGACACCTGGCCAGACGCCAACAAGGTAGGAGCTGGAGCATTG
GGCTGGGATTACCCCAACACACGAGGCCCTTTTGGGGTGGAGCCCTCAGGCTCAGGG
CATACTAGAAACGTTGCCAGCAAATCCGCCTCCTGCCTCTACCAATCGCCAGTCAGGA
AGGCAGCCTACCCGCTGTCTCCACCTTTGAGAAACACTCATCCTCAGGCCATGCAGTG
G
```

Şekil 3.2. HBV DNA dizi analizi fasta formatı.

3.1.3 . HCV cDNA Genom 5' UTR, NS3, NS5A ve NS5B Bölgeleri cDNA

Dizi Analizi

< HCV 5'UTR Dizisi

```
.....
TTCAATCTCGAGCCACTTATCAGGCAGTACCACAAGGCCTTTCGCGACCCAACACTA
TTCGGCTAGCAGTCTCGCGGGGGCACGCCCAAATCTCCAGGCATGAGCGGGTTAAT
CCAAGAAAGGACCCGGTCTCTGGCAATTCCGGTGTACTACCCGGTTCCGCAGACC
ACTAGGCTCTCCCGGAGGGGGTCTGGAAGCTGCACGACACTCATACTAACGCC
ATGGCTAGACCTTTT.....
```

< HCV NS3 Dizisi

```
.....
GGCACGGGTGGCGGCTCCTTGCGCCTATTACGGCCTACTCCCAGCAGACGCGAG
GCCTACTTGGCTGTATTGTCAGCTACAGGCCGGGACAAGAACCAGGTCTG
AGGGGGAGGTTCAAATGGTCTCCACCGCAACACAATCTTTCCTAGCGACCTGCA
TCAACGGCGTATGCTGGAGTGTTCCTATGGCGCGGCTCAAAGACCCTAGCCG
GGCCAAAGGGGCAATCACCACAAATGTACACCAATGTAGACCAGGACCTCGTCG
GCTGGCAGGCGCCCCCGGGGCGCGTTCCTGACACCGTGCACCTGCGGCAGCT
CGGACCTTTACTTGGTCACGAGACATGCTGATGTCATTCCGGTGCGCCGGCGGG
GCGACACCAGGGGGAGTCTCCTCTCCCCAGGCCGTCTCCTATCTGAAGGGCTC
TTCGGGTGGCCCACTGCTTTGCCCTCGGGGCACGCTGTGGGCATCTTCCGGGCC
GCTGTGTGCACCCGGGGGGTGGCAAGGCGGTGGACTTCGTACCCGTCGAGTCC
ATGGAACCACTATGCGGTCCCCGGTCTTACGGACAACCTCGTCCCCCGGGCC
GTACCCACACC.....
```

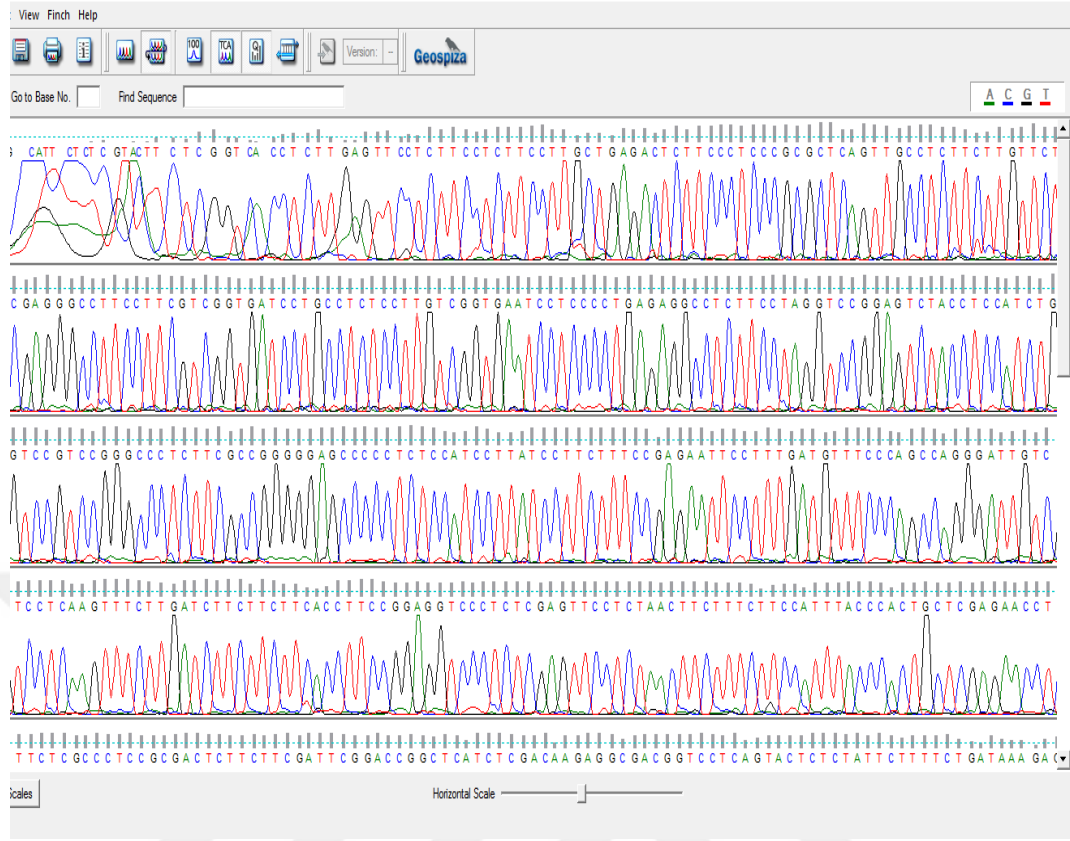
< HCV NS5A Dizisi

```
.....
ATCCTCTCCAGCCTTACCATCACTCAGCTGTAAAGAGGCTTCATCAGTGGATCA
ATGAGGACTGCTCCACGCCATGCTCCGGCTCGTGGCTAAAGGATATTTGGGACT
GGATATGTACAGTGTGAGTGACTTCAAGACCTGGCTCCAGTCCAAGCTTCTGCC
CGGCTACCGGGGGTCCCTTCTTCTCATGCCAACGTGGGTACAAGGGGGTCTG
GCGAGGAGATGGCATCATGCACACCACCTGTCCATGTGGGGCACAGATCACCGG
ACATGTCAAGAACGGTTCCATGAGGATCGTTGGGCCTAACACCTGCAGCAACAC
GTGGCACGGAACATTTCCCATCAATGCGTACACCACGGGGCCCTGCACACCCTC
CCCGCGCCAACTACTCTAAGGCGCTGTGCGGGTGTGCTGCAGAAGAGTACGT
GGAGGTTACGCGGGTGGGGGATTTCCACTACGTGACGGGCATGACCACTGACAA
CGTGAAGTGCCCATGCCAAGTCCCGGCCCCGAATTCTTACAGAAGTGGATGG
GGTGGCGTGCATAGGTACGCTCCGGCGTGCAAGCCCTCCTAAGGGAGGAGGT
CACATTCAGGTTGGGCTCAACCAGTACCTGGTGGGTCACAGCTCCCGTGTGA
GCCCCAACCGGATGTAAAGTGCTCACCTCCATGCTCACTGACCCCTCCACATT
ACAGCTGAGACGGCTAAGCGTAGACTGGCTA.....
```

< HCV NS5B Dizisi

```
.....
CTTGGCCCCCGAAGCCGACAGGCCTAAGGTCGCTCCGAGCGGCTTTACGTGCGG
GGTCTCTGACCATTCAAGGGGCCAACTGCGGTTATCGCCGGTGCCGCGCAAGC
GGCGTGCTGACGACTAGCTGCGGTAATACCCTCACATGTTACTTGAAAGCCTCTG
CGGCTGTGAGCTGCAAAGCTCCAGGACTGCACGATGCTCGTGAACGGAGACG
ACCTTGTCGTTATCTGTGAAAGCGCGGAACCCAAGAGGACATGGCGAACCTAC
GAGTCTTCACGAGG.....
```

Şekil 3.3. HCV cDNA genom 5' UTR, NS3, NS5A ve NS5B parçalı cDNA dizi analizi fasta formatı.



Şekil 3.4. HDV genomunun 1. nükleotitten 377. nükleotide kadar Finch TV Programı ile Görüntülenmesi.

3.2. Liyofilize Materyallerin Üretim Sonrası Test Edilmesi

Liyofilizasyon aşamasının tamamlanmasını takiben elde edilen ürünler viral yük bakımından test edildi. HBV, HCV ve HDV liyofilize aday referans materyalleri belirli aralıklarla Ankara Üniversitesi Hepatoloji Laboratuvarı'nda test edildi. Örnekler her testte iki adet olmak üzere rastgele seçildi. Testlere paralel olarak DSÖ liyofilize primer referans standartları kullanıldı.

Çizelge 3.1: Liyofilizasyon sonrası 1. ölçüm sonuçları.

1.ÖLÇÜM	LİYOFİLİZE HBV	LİYOFİLİZE HCV	LİYOFİLİZE HDV
1.Örnek	4,69×10 ⁴ IU/ml	8,94×10 ⁴ IU/ml	4,7×10 ⁴ IU/ml
2.Örnek	4,62×10 ⁴ IU/ml	9,43×10 ⁴ IU/ml	5,5×10 ⁴ IU/ml
1.ve 2. Örneğin Ortalaması	4,65×10⁴ IU/ml	9,18×10⁴ IU/ml	5,1×10⁴ IU/ml
DSÖ Primer Referansı	3,08×10 ⁴ IU/ml	1,74×10 ⁴ IU/ml	3,6×10 ⁴ IU/ml
DSÖ Primer Referanslara Kalibre Edilmiş Sonuçlar	4,07×10⁴ IU/ml	1,42×10⁵ IU/ml	8,1×10⁴ IU/ml
Kullanılan Yöntem	Roche Cobas Taqman 48 RT-PZR	Roche Cobas Taqman 48 RT-PZR	Roche LightCycler 480 II RT-PZR
Sulandırıl-ma Miktarı	Örnek 1000 µl steril H ₂ O'da sulandırılmıştır	Örnek 1000 µl steril H ₂ O'da sulandırılmıştır	Örnek 1000 µl steril H ₂ O'da sulandırılmıştır

Çizelge 3.2: Liyofilizasyon sonrası 2. ölçüm sonuçları.

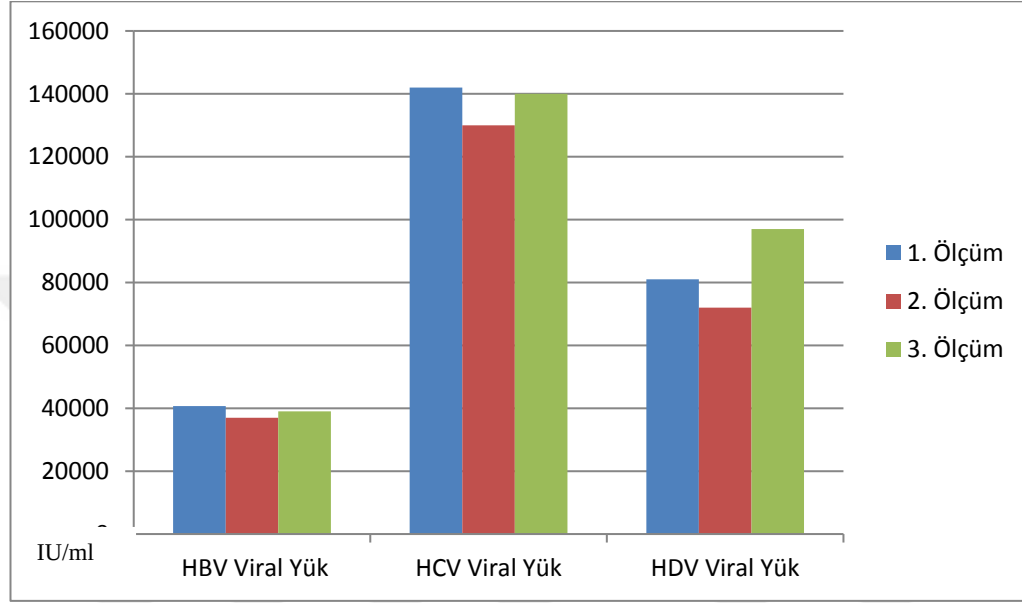
2.ÖLÇÜM	LİYOFİLİZE HBV	LİYOFİLİZE HCV	LİYOFİLİZE HDV
1.Örnek	4,96×10 ⁴ IU/ml	8,76×10 ⁴ IU/ml	3,94×10 ⁴ IU/ml
2.Örnek	6,78×10 ⁴ IU/ml	9,18×10 ⁴ IU/ml	2,61×10 ⁴ IU/ml
1.ve 2. Örneğin Ortalaması	5,87×10⁴ IU/ml	8,97×10⁴ IU/m	3,27×10⁴ IU/ml
DSÖ Primer Referansı	4,28×10 ⁴ IU/ml	1,85×10 ⁴ IU/ml	2,61×10 ⁴ IU/ml
DSÖ Primer Referanslara Kalibre Edilmiş Sonuçlar	3,70×10⁴ IU/ml	1,30×10⁵ IU/ml	7,2×10⁴ IU/ml
Kullanılan Yöntem	Roche Cobas Taqman 48 RT-PZR	Roche Cobas Taqman 48 RT-PZR	Roche LightCycler 480 II RT-PZR
Sulandırıl-ma Miktarı	Örnek 1000 µl steril H ₂ O'da sulandırılmıştır	Örnek 1000 µl steril H ₂ O'da sulandırılmıştır	Örnek 1000 µl steril H ₂ O'da sulandırılmıştır

Çizelge 3.3: Liyofilizasyon sonrası 3. ölçüm sonuçları.

3.ÖLÇÜM	LİYOFİLİZE HBV	LİYOFİLİZE HCV	LİYOFİLİZE HDV
1.Örnek	5,33×10 ⁴ IU/ml	8,31×10 ⁴ IU/ml	6,57×10 ⁴ IU/ml
2. Örnek	5,33×10 ⁴ IU/ml	1,04×10 ⁵ IU/ml	4,04×10 ⁴ IU/ml
1.ve 2. Örneğin Ortalaması	5,33×10⁴ IU/ml	9,35×10⁴ IU/ml	5,28×10⁴ IU/ml
DSÖ Primer Referansı	36800 IU/ml	18000 IU/ml	31000 IU/ml
DSÖ Primer Referanslara Kalibre Edilmiş Sonuçlar	3,9×10⁴ IU/ml	1,4×10⁵ IU/ml	9,7×10⁴ IU/ml

Çizelge 3.3. Devamı

Kullanılan Yöntem	Roche Cobas Taqman 48 RT-PZR	Roche Cobas Taqman 48 RT-PZR	Roche LightCycler 480 II RT-PZR
Sulandırıl-ma Miktarı	Örnek 1000 µl steril H ₂ O'da sulandırılmıştır	Örnek 1000 µl steril H ₂ O'da sulandırılmıştır	Örnek 1000 µl steril H ₂ O'da sulandırılmıştır



Şekil 3.5. Liyofilizasyon sonrasında rastgele seçilen HBV, HCV ve HDV liyofilize örneklerinin viral yük dağılımları.

3.3. Liyofilize Materyallerin Çeşitli Laboratuvarlar Tarafından Test Edilmesi

Örnekler kantitatif olarak test edildikten sonra farklı cihaz ve test yöntemleri kullanan çeşitli üniversite laboratuvarlarına ve ticari laboratuvarlara; toplamda 16 adet laboratuvara birer HBV ve HCV liyofilize aday referans materyal gönderilmiştir. Katılımcılardan, gönderilen materyalleri 1000 µl steril su ile sulandırmaları istenmiştir. 10 laboratuvar çağrıya geri dönüş yaparak sonuçlarını bildirmiştir. Çalışmaların sonuçları ise Çizelge 3.4'te belirtilmektedir.

Çizelge 3.4: Katılımcı laboratuvarların kantitatif ölçüm sonuçları.

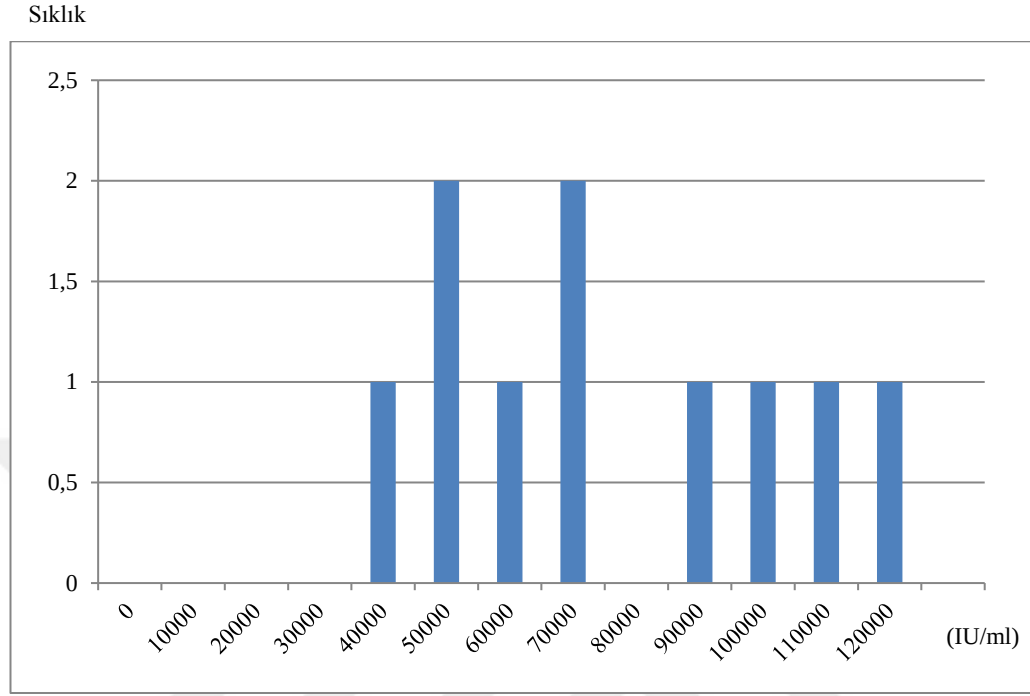
LABORATUVAR KODU	HBV ÖLÇÜM SONUCU	HCV ÖLÇÜM SONUCU	KULLANILAN TEST YÖNTEMİ/TEKNOLOJİ
Laboratuvar 1	$6,15 \times 10^4$ IU/ml	$1,63 \times 10^5$ IU/ml	Ekstraksiyon: Manuel/QIAcube (QIAGEN, Almanya) Amplifikasyon: Rotor-Gene Q 6plex HRM (QIAGEN, Almanya) (A Teknolojisi)
Laboratuvar 2	$9,52 \times 10^4$ IU/ml	$1,23 \times 10^5$ IU/ml	Ekstraksiyon: QIAsymphony SP System (QIAGEN, Almanya) Amplifikasyon: Rotor-Gene Q 5plex HRM (QIAGEN, Almanya) (A Teknolojisi)
Laboratuvar 3	$5,04 \times 10^4$ IU/ml	$1,92 \times 10^5$ IU/ml	Ekstraksiyon: El ile (Manuel) Amplifikasyon: Anatolia Geneworks (Türkiye) Kit: Bosphore HBV quantification Kit v2 (Anatolia Geneworks, Türkiye) Bosphore HCV quantification Kit v2 (Anatolia Geneworks, Türkiye) (D Teknolojisi)
Laboratuvar 4	$6,55 \times 10^4$ IU/ml	$1,08 \times 10^5$ IU/ml	Ekstraksiyon: QIAsymphony SP System (QIAGEN, Almanya) Amplifikasyon: QIAsymphony RGQ (QIAGEN, Almanya) (A Teknolojisi)
Laboratuvar 5	$4,88 \times 10^4$ IU/ml	$1,08 \times 10^5$ IU/ml	Ekstraksiyon: COBAS Ampliprep (Roche, Almanya) Amplifikasyon: Cobas TaqMan 96 Automated DNA Amplification and Detection Analyzer (Roche, Almanya) (B Teknolojisi)

Çizelge 3.4. Devam.

Laboratuvar 6	1,19×10 ⁵ IU/ml	1,64×10 ⁴ IU/ml	Ekstraksiyon: m2000 Real Time System (Abbott, ABD) Amplifikasyon: m2000 Real Time System (Abbott, ABD) (C Teknolojisi)
Laboratuvar 7	8,85×10 ⁴ IU/ml	1,82×10 ⁵ IU/ml	Ekstraksiyon: QIAAsymphony SP System (QIAGEN, Almanya) Amplifikasyon: Rotor-Gene Q 5plex HRM (QIAGEN, Almanya) (A Teknolojisi)
Laboratuvar 8	1,07×10 ⁵ IU/ml	7,36×10 ⁴ IU/ml	Ekstraksiyon: m2000sp Real Time System (Abbott, ABD) Amplifikasyon: m2000rt Real Time System (Abbott, ABD) (C Teknolojisi)
Laboratuvar 9	3,32×10 ⁴ IU/ml	7,22×10 ⁴ IU/ml	Ekstraksiyon: COBAS Ampliprep (Roche, Almanya) Amplifikasyon: Cobas TaqMan 96 Automated DNA Amplification and Detection Analyzer (Roche, Almanya) (B Teknolojisi)
Laboratuvar 10	4,25×10 ⁴ IU/ml	9,05×10 ⁴ IU/ml	Ekstraksiyon: COBAS TaqMan (Roche Diagnostics, Almanya) Amplifikasyon: COBAS TaqMan (Roche Diagnostics, Almanya) (B Teknolojisi)
Lab. Değerleri Ort.:	7,11×10⁴ IU/ml	1,12×10⁵ IU/ml	

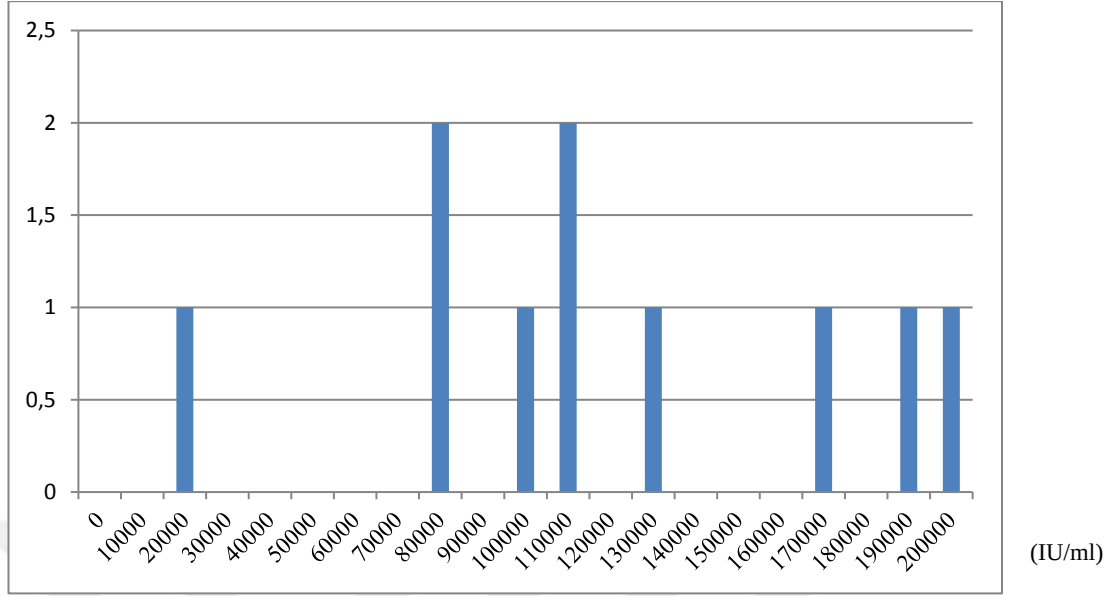
Katılımcı laboratuvarlar tarafından gönderilen sonuçların yığılma değerlerinin daha iyi anlaşılabilmesi için sonuçlar histogram grafiği şeklinde ifade edilmiştir. HBV için

oluřturulan grafik şekil 3.6’da ifade edilirken HCV için oluřturulan grafik şekil 3.7’de ifade edilmiştir.



şekil 3.6. Katılımcı laboratuvarların HBV kantitatif ölçüm sonuçlarının histogram grafiği ile ifade edilmesi.

Sıklık



Şekil 3.7. Katılımcı laboratuvarların HCV kantitatif ölçüm sonuçlarının histogram grafiği ile ifade edilmesi.

3.4. Liyofilize Materyallerin Stabilizasyon Çalışması Sonrası Test Edilmesi

Liyofilizasyon aşamasının tamamlanıp örneklerin farklı sıcaklıklarda (-80°C, -20°C ve +4°C) muhafaza edilmesinden 2 ay sonra örnekler için kantitatif ölçüm yapılmıştır. HBV, HCV ve HDV liyofilize materyallerden 2'ser örnek 1000 µl steril suda sulandırılmıştır. HBV ve HCV örneklerinden her biri tek yükleme yapılarak çalışılırken HDV örneklerinin her biri çift yükleme yapılarak çalışılmıştır.

HBV RT-PZR aşaması COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HBV Test, v2.0 Kiti kullanılarak; HCV RT-PZR aşaması COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HCV Quantitative Test, 2.0 Kiti kullanılarak Roche Cobas Taqman 48 RT-PZR Cihazı'nda yapılmıştır. Çalışma boyunca kit içeriğinden çıkan kullanım talimatları izlenmiştir.

HDV Kantitatif RT-PZR çalışmaları gereçler kısmında belirtilmiş olan primer ve prob dizileri ile Roche LightCycler 480 II RT-PZR Cihazı'nda gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar Çizelge 3.5; 3.6; 3.7'de belirtildiği gibidir.

Çizelge 3.5: Stabilite çalışması kapsamında -80°C kantitatif ölçüm sonuçları.

Saklama Derecesi	Örnek Numarası	HBV ÖLÇÜM SONUCU	HCV ÖLÇÜM SONUCU	HDV ÖLÇÜM SONUCU
-80°C	1.Örnek	$5,22 \times 10^4$ IU/ml	$9,68 \times 10^4$ IU/ml	* $1,08 \times 10^4$ IU/ml * $1,00 \times 10^4$ IU/ml
-80°C	2.Örnek	$5,50 \times 10^4$ IU/ml	$1,07 \times 10^5$ IU/ml	* $3,14 \times 10^4$ IU/ml * $1,03 \times 10^4$ IU/ml
-80°C	1.ve 2.Örnek Ort.	Ort.: $5,36 \times 10^4$ IU/ml	Ort.: $1,01 \times 10^5$ IU/ml	*Ort.: $1,54 \times 10^4$ IU/ml

*Örnekler çift çalışılmıştır.

Çizelge 3.6: Stabilite çalışması kapsamında -20°C kantitatif ölçüm sonuçları.

Saklama Derecesi	Örnek Numarası	HBV ÖLÇÜM SONUCU	HCV ÖLÇÜM SONUCU	HDV ÖLÇÜM SONUCU
-20°C	1.Örnek	$6,15 \times 10^4$ IU/ml	$1,11 \times 10^5$ IU/ml	* $1,64 \times 10^4$ IU/ml * $1,33 \times 10^4$ IU/ml
-20°C	2.Örnek	$4,89 \times 10^4$ IU/ml	$9,99 \times 10^4$ IU/ml	* $4,98 \times 10^3$ IU/ml * $8,71 \times 10^3$ IU/ml
-20° C	1. ve 2. Örnek Ort.	Ort.: $5,52 \times 10^4$ IU/ml	Ort.: $1,05 \times 10^5$ IU/ml	Ort.: $1,08 \times 10^4$ IU/ml

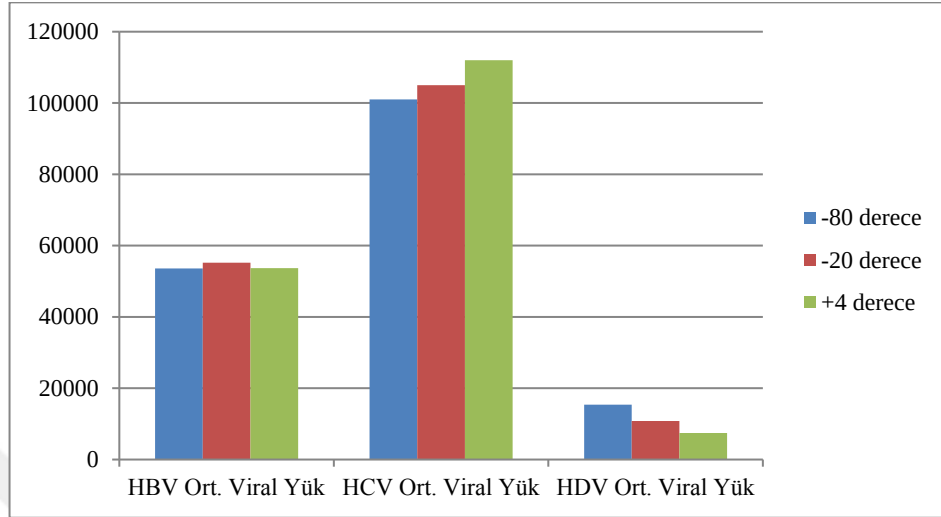
*Örnekler çift çalışılmıştır.

Çizelge 3.7: Stabilite çalışması kapsamında +4°C kantitatif ölçüm sonuçları.

Saklama Derecesi	Örnek Numarası	HBV ÖLÇÜM SONUCU	HCV ÖLÇÜM SONUCU	HDV ÖLÇÜM SONUCU
+4°C	1.Örnek	$4,65 \times 10^4$ IU/ml	$1,00 \times 10^5$ IU/ml	* $7,76 \times 10^3$ IU/ml * $1,07 \times 10^4$ IU/ml
+4°C	2.Örnek	$6,10 \times 10^4$ IU/ml	$1,24 \times 10^5$ IU/ml	* $4,26 \times 10^3$ IU/ml * $7,13 \times 10^3$ IU/ml
+4°C	1. ve 2. Örnek Ort.	Ort.: $5,37 \times 10^4$ IU/ml	Ort.: $1,12 \times 10^5$ IU/ml	Ort.: $7,46 \times 10^3$ IU/ml

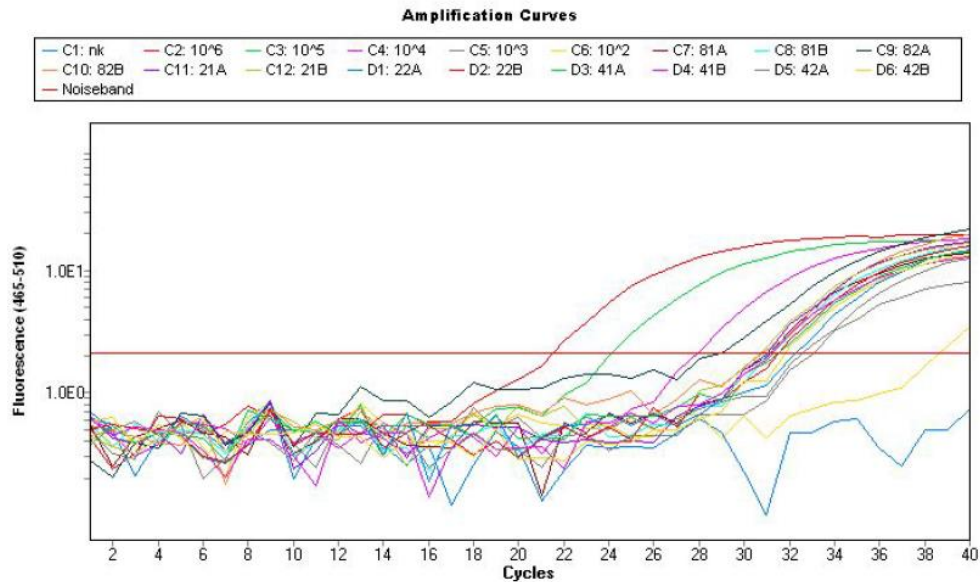
*Örnekler çift çalışılmıştır.

Stabilizasyon çalışması sonrasında yapılan kantitasyon testleri sonuçlarının ortalama değerleri ve sıcaklık değerlerine göre dağılımları şekil 3.8de belirtilmiştir.

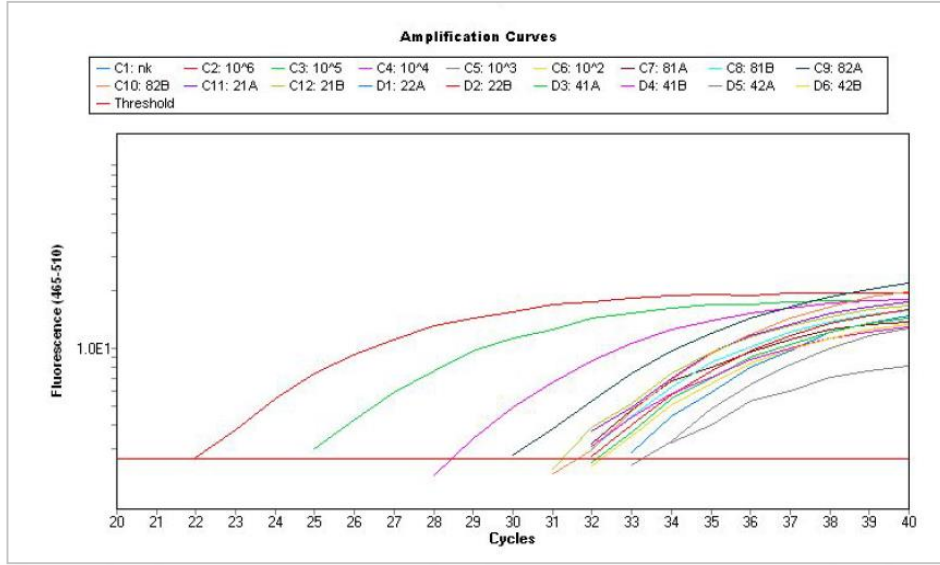


Şekil 3.8. Farklı Sıcaklıklarda 2 Ay Muhafaza Edilen HBV, HCV ve HDV Aday Liyofilize İkincil Referans Materyallerin Ortalama Viral Yüklerinin Sütun Grafiğinde Gösterilmesi.

HDV kantitasyonu sonrasında elde edilen RT-PZR sonuçları ise şekil 3.9’da belirtildiği gibidir.



Şekil 3.9. Farklı Sıcaklıklarda 2 Ay Muhafaza Edilen ve Rastgele Seçilerek Çalışılan HDV Aday Liyofilize İkincil Referans Materyallerin Viral Yüklerinin RT-PZR Ölçüm Sonuçları.



Şekil 3.9. Devam.

4. TARTIŞMA

Bu çalışmada, Nükleik asit Amplifikasyon Teknolojisi (NATs) analizlerinde kullanılmak üzere Dünya Sağlık Örgütü'nün Birincil Referans Materyallerine karşı kalibre edilmiş ikincil referans materyallerin üretilmesi gerçekleştirilmiştir. Ülkemizde yapılan HBV, HCV ve HDV nükleik asit tespit yöntemleri, kullanılan cihazlar ve test kitleri açısından çeşitlilik göstermektedir. Viral yükü bilinen ve uluslararası bir standarda göre kalibre edilmiş bir referans materyali kullanımı testler arasında standardizasyonun sağlanmasında oldukça faydalı olacaktır. Yaptığımız çalışma ile HBV, HCV ve HDV olmak üzere 3 ayrı viral patojenin liyofilize halde NAT ikincil referans materyalleri oluşturulmuş olup bu materyaller çalışma ayıracı, yürütme kontrolü ve kalibratör olarak kullanmak üzere hazır hale getirilmiştir.

Günümüzde Nükleik asit Amplifikasyon Teknolojisi (NAT)'ne dayanan testlerle kan taramaları, hastalığın tanısı ve izlenmesi için giderek daha fazla kullanılmaktadır. Kan tetkikleri ve hasta tedavisi için düzenleyici gereklilikler NAT analizlerinin standardizasyonu için mevcut olan standartlara ve referans materyallere dayanmaktadır. Fakat DSÖ uluslararası standartları yalnızca sınırlı sayıda mevcuttur ve temel olarak ikincil standartların kalibrasyonlarında kullanılmak üzere tasarlanmışlardır. DSÖ'nün uluslararası standartları gibi birincil referans materyallerine karşı kalibre edilmiş laboratuvar tasarımı standartların üretimi laboratuvarlar tarafından sıklıkla başvurulmuş bir yöntemdir (Baylis ve ark, 2015). Bu çalışma da ulusal çapta olacak şekilde laboratuvar tasarımı HBV, HCV ve HDV ikincil referans materyaller üretmek amacı ile gerçekleştirilmiştir. Liyofilizasyon işlemi sonrası viyallerin homojenliklerinin test edilmesi ve DSÖ'den temin edilen birincil referans materyallere karşı kalibre edilmesi amacıyla HBV, HCV ve HDV liyofilize materyallerden rastgele viyaller seçildi. Seçilen viyalere, primer standartlarla paralel olacak şekilde RT-PZR yöntemi kullanılarak kantitatif ölçüm yapıldı. Kantitatif ölçümler 3 ayrı günde olacak biçimde, her bir örnek için deneysel hataların en aza indirgenmesi için çift çalışarak gerçekleştirildi. Liyofilize edilmiş aday ikincil referans örnekler 1000 µl dH₂O'da sulandırıldı. Sonuç olarak HBV

liyofilize materyallerinin viral yükleri yaklaşık $4,0 \times 10^4$ IU/ml, HCV liyofilize materyallerinin viral yükleri yaklaşık $1,35 \times 10^5$ IU/ml, HDV liyofilize materyallerinin viral yükleri ise yaklaşık $8,0 \times 10^4$ IU/ml olarak tespit edildi. Sonuçlara göre HBV, HCV ve HDV liyofilize materyallerin viral yük bakımından birbirine yakın değerlerde olduğu görüldü. Bu durum örneklerin liyofilizasyon öncesi viyallere dağıtımlarının homojen bir şekilde olduğunu doğrulamaktadır.

Çalışmada materyallerin liyofilize hallerinin tercih edilmesinin sebebi ise liyofilize materyallerin likit hallerinden daha stabil, transferlerinin daha kolay yapılabilir ve uzun süre saklanabilir olmalarıdır. DSÖ tarafından gerçekleştirilen primer referans materyallerin üretimi amacıyla yapılan işbirlikçi çalışmalarda da hem likit hem de liyofilize aday materyaller değerlendirmeye alınmıştır (Saldanha ve ark., 1999 ve Saldanha ve ark., 2001). Çalışmalar sonucu yapılan ölçümlerde, aynı serum havuzundan hazırlanan likit ve liyofilize materyallerin viral yük açısından farklılıklar gösterdiği, likit olanın liyofiize olanlara oranla daha düşük viral yük içerdiği sonucuna varılmıştır. Yine 1999 yılında Saldanha ve ark. tarafından gerçekleştirilen işbirlikçi çalışma ile aynı kaynaktan üretilen DSÖ birincil referans materyallerden AA örneği primer referans olarak kullanılıp BB örneği -80°C 'de muhafaza edilmiştir. 1999 yılında üretilen AA referans materyalinin tükenmesi ile birlikte ölçümler sonucu hala stabil olarak değerlendirilen BB liyofilize materyali yeni birincil referans materyal olarak atanmıştır (Saldanha ve ark., 2005). Bu örnek çalışmalar referans materyallerinin liyofilize halde muhafaza edilmelerinin materyallerin stabil olarak kalmaları açısından daha güvenilir olduğunu desteklemektedir.

Çalışmanın ikinci basamağında ise HBV ve HCV liyofilize örnekleri, çeşitli NAT yöntemleri kullanan üniversite laboratuvarlarına gönderilmiştir. Gönderi yapılan laboratuvarlardan ise 10 tanesi sonuçlarını bildirmişlerdir. Katılımcı laboratuvarlardan biri hariç (manuel/el ile) laboratuvarların tümü örnek ekstraksiyonu aşamasını cihaz (otomatizasyon) ile gerçekleştirmişlerdir. Çalışmaya katılan laboratuvarların sonuçları kullandıkları teknoloji yöntemlerine göre değerlendirildiğinde ise; aynı teknolojik yöntemleri kullanan laboratuvarın test

sonuçları arasında bir yakınlık saptanırken farklı teknolojik yöntemleri kullanan laboratuvarların test sonuçları arasında ise değişkenlikler tespit edilmiştir. A, B ve D Teknolojileri kullanıcılarından farklı olarak C Teknolojisi kullanıcıları beklenilen aksine, HBV liyofilize materyallerinin viral yük miktarlarını HCV liyofilize materyallerin viral yük miktarlarına oranla daha yüksek bulmuşlardır. Bu durum kit veya cihaza yüklenen serum miktarı farkından kaynaklı olabileceği gibi viyallerin sulandırılma aşamasındaki pipetleme hatalarından da kaynaklı olabilir.

Çalışmanın üçüncü basamağında ise liyofilize edilen materyallerin viral yük miktarı değişimlerinin izlenilmesi amacıyla 2 ay boyunca stabilite çalışması gerçekleştirilmiştir. Stabilite çalışmasının sonunda yapılan ölçümler ile liyofilizasyon sonrasında yapılan ölçümler karşılaştırılmıştır. Buna göre HBV ve HCV liyofilize materyalleri için viral yük değişiminin göz ardı edilebilir derecede az olduğu ve bu materyallerin sıcaklık şartlarından çok etkilenmediği, ancak HDV liyofilize materyallerinin viral yük miktarında az da olsa bir düşüklük tespit edilmiştir. Fakat bu viral yük düşüklüğünün HDV kantitatif testlerin ekstraksiyon ve cDNA eldesi aşamalarının manuel olarak gerçekleştirilmiş olmasından kaynaklı olduğu düşünülmektedir. Liyofilizasyon sonrası yapılabilecek oksijen ve kalıntı nem miktarının ölçülmesi gibi validasyon çalışmaları bu farklılık nedeninin anlaşılabilmesi için yapılabilecek ek çalışmalardandır. Bunun yanı sıra HDV liyofilizasyon prosedürü, liyofilize edilecek materyale eklenen yardımcı kimyasalların miktarları açısından da tekrar gözden geçirilerek yeni deney düzenekleri oluşturulabilir.

Elde ettiğimiz HBV, HCV ve HDV liyofilize ikincil referans materyallerinin her birinin birden fazla testte kullanılabilmesi amacıyla her bir tip örneğin dilüsyon yapımını mümkün kılacak biçimde sulandırma miktarları belirlenmiştir. Buna göre HBV liyofilize materyallerin 50,000 IU/ml'ye eşitlenmesi için 800 µl dH₂O'da çözülmesi; HCV liyofilize materyallerin 90,000 IU/ml'ye eşitlenmesi için 1500 µl dH₂O'da çözülmesi; HDV liyofilize materyallerin 80,000 IU/ml'ye eşitlenmesi için ise 1000 µl dH₂O'da çözülmesi gerektiği sonucuna varılmıştır. Böylece sulandırılıp

alikitlanarak muhafaza edilen referans materyaller mümkün olduğunca verimli olarak kullanılabileceklerdir.



SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışma ile HBV DNA, HCV RNA ve HDV RNA pozitif hasta serumlarından, DSÖ Birincil Referans Materyalleri'ne karşı kalibre edilmiş liyofilize ikincil referans materyallerin hazırlanması gerçekleştirilmiştir.

Liyofilizasyon sonrası RT-PZR yöntemi ile kantitatif ölçümleri yapılan HBV aday ikincil referans materyallerde viral yük bakımından örnekler arasında tutarlılık gözlemlenmiş ve HBV liyofilize materyallerine her bir viyal için 50,000 IU/ml'lik bir değer atanmıştır. Bu değere her bir viyal 800 µl dH₂O'da sulandırıldığı takdirde ulaşılacaktır.

HCV aday ikincil referans materyallerinde de viral yük bakımından viyaller arasında tutarlılık gözlenmiş ve HCV liyofilize materyallerine her bir viyal için 90,000 IU/ml'lik bir değer atanmıştır. Bu değere her bir viyal 1500 µl dH₂O'da sulandırıldığı takdirde ulaşılacaktır.

Liyofilizasyon işlemi sonrasında HDV aday ikincil referans materyallerde viral yük bakımından viyaller arasındaki tutarlılığa bakılmak amaçlı yapılan testler sonucunda da viyaller arası tutarlılık gözlemlenmiştir. HDV liyofilize materyallerine her bir viyal için 80,000 IU/ml'lik bir değer atanmıştır ve bu değere her bir viyal 1000 µl dH₂O'da sulandırıldığı takdirde ulaşılacaktır.

Yapılan çalışmalar sonucunda üretilen liyofilize ikincil referans materyallerin, hem laboratuvarımızın hem de katılımcı laboratuvarların test sonuçlarına dayanılarak NAT testlerinde çalışma ayırıcı, yürütme kontrolü veya kalibratör amaçlı kullanılmaya elverişli olduğu kanıtlanmıştır. Yine de viral yüklerin olası değişimlerinin izlenilebilmesi için uzun vadede stabilizasyon çalışmalarının devam ettirilmesinde fayda vardır. Ayrıca üretilen materyallerin sekans dizileri de elde edilmiş ve isteyen laboratuvarların çalışmalarında kullanmaları için FASTA formatında tez içerisinde belirtilmiştir.

ÖZET

Hepatit B, C ve D Virüsleri İçin Birincil Referans Materyallerden Kalibre Edilmiş İkincil Referans Materyallerin Hazırlanması

Bu çalışma, ülkemizde Nükleik asit Amplifikasyon Teknolojileri (NAT) alanında ihtiyaç duyulan HBV, HCV ve HDV ikincil referans materyallerinin oluşturulması amacıyla gerçekleştirildi. Bu amaçla DSÖ Birincil Referans Materyaller kullanılarak ülkemize özgü HBV, HCV ve HDV genotipleri içeren liyofilize ikincil referans materyalleri üretildi.

Hazırlanan materyallere daha uzun süre stabil bir şekilde muhafaza edilebilmeleri için liyofilizasyon işlemi uygulandı. Liyofilize edilen örnekler RT-PZR yöntemi kullanılarak test edildi. Kantitatif olarak ölçülen materyaller arasında büyük oranda bir tutarlılık gözlemlendi. Bu materyallerden HBV ve HCV liyofilize olanlar daha sonra çeşitli NAT yöntemleri kullanan laboratuvarlara gönderildi. Katılımcı laboratuvarların ölçüm sonuçlarına göre aynı yöntemi kullanan laboratuvarlar arasında bir uyum belirlenirken farklı yöntem kullanan laboratuvarlar arasında sonuç farklılıkları gözlemlendi.

Yapılan stabilite çalışmaları sonrası yapılan ölçümler liyofilizasyon sonrası yapılan ölçüm sonuçları ile karşılaştırıldı. HBV ve HCV liyofilize materyallerinde herhangi bir viral yük farkı tespit edilmedi.

Elde edilen bu veriler ışığında HBV, HCV ve HDV aday liyofilize materyaller, NAT testlerinde iç kontrol ya da çalışma ayırıcı olarak kullanılmaya uygun görüldü.

Anahtar Sözcükler: HBV, HCV, HDV, İkincil Referans Materyal, Viral Yük

SUMMARY

Preparation of Secondary Reference Materials Calibrated from Primary Reference Materials for Hepatitis B, C and D Viruses

This study have been realized to establish secondary reference materials for HBV, HCV and HDV needed on the field of Nucleic Acid Amplification Technologies in our country. For that purpose lyophilized secondary reference materials that include HBV, HCV and HDV genotypes which are specific for our country have been produced WHO Primary Reference Materials.

The prepared materials were subjected to lyophilization so that they could be stored for a longer period of time in a stable manner. Lyophilized materials were tested by using RT-PCR method. A great consistency was observed among the materials measured quantitatively. Than these materials, except HDV lyophilized, were sent laboratories which use different kinds of NAT methods. According to the measurement results of the participating laboratories, there was a consistency between the laboratories using the same method, while different results were observed among laboratories using different methods.

Measurements made after the stability studies were compared with those obtained after lyophilization. No viral load difference was detected in HBV and HCV lyophilized materials.

HBV, HCV and HDV candidate lyophilized materials were found suitable for use as internal control or working reagent in NAT tests.

Key Words: HBV, HCV, HDV, Secondary Reference Material, Viral Load

KAYNAKLAR

- ABE A, INOUE K, TANAKA T, KATO J, KAJIYAMA N, KAWAGUCHIR, TANAKA S, YOSHIBA M, KOHARA M (1999). Quantitation of hepatitis B virus genomic DNA by real-time detection PCR. *J Clin Microbiol*, **37**: 2899-2903.
- ALMUEDO ZP (2013). Resistencia A Los Nuevos Antivirales Frente Al Virus De La Hepatitis C (Doktora Tezi). Universidad Complutense de Madrid Facultad de Medicina Departamento de Immunología.
- Analytical methods and reference materials program, AMRM Glossary, NIH, USA, 2009.
- ANNESLEY TM (2010). It's about the journey, Not the destination: The birth of radioimmunoassay. 1960. *Clin Chem*, **56**: 671-672.
- ARMBRUSTER D, MILLER RR (2007). The Joint Committee for Traceability in Laboratory Medicine (JCTLM): A global approach to promote the standardisation of clinical laboratory test results. *Clin Biochem Rev*, **28(3)**: 105-13.
- ASLAN D, YILMAZTÜRK GC, AKALIN N, BÜYÜKBEŞE MA, SERMEZ Y, FENKÇİ S (2011). Klinik laboratuvar test sonuçlarının uluslararası ve ulusal harmonizasyonu, standardizasyonu ve HbA1c örneği. *Türk Biyokimya Dergisi*, **36(4)**: 374-383.
- AYTEKİN M, ALACADAĞLI E, AKIN L, ÖZKAN AT, SECCOMBE DW (2009). Ulusal bir dış kalite programına olan ihtiyaç ve ülkemiz şartları. *Türk Hij Den Biyol Derg*. **66(3)**:123-131.
- BAYLIS SA, CHUDY M, NUBLING CM (2015). Standardization of NAT for Blood-Borne Pathogens. *Transfus Med Hemother*, **42**: 211-18.
- BEDU-ADDU FK (2004). Understanding Lyophilization Formulation Development. *Pharmaceutical Technology*, 10-18.
- BEHZADİ P, RANJBAR R, ALAVİAN SM (2015). Nucleic Acid-Based Approaches for Detection of Viral Hepatitis. *Jundishapur J Microbiol*, **8(1)**: e17449.
- BIMP, IEC, IFCC, ISO, IUPAC, IUPAP, OIML (1993). International vocabulary of basic and general terms in metrology (VIM). 2nd edition, ISO, Geneva.
- BIMP, IEC, IFCC, ISO, IUPAC, IUPAP, OIML (1995). Guide to the expression of uncertainty in measurement (GUM). ISO, Geneva.
- BORDAS F, D'ARSONVAL M (1906). *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences Paris* **142**: 1058-1079 ve 143:567.

- BOZDAYI AM, ASLAN N, BOZDAYI G, TURKYILMAZ AR, SENGEZER T, WEND U, ERKAN Ö, AYDEMİR F, ZAKİRHODJAEV S, ORUCOV Ş, BOZKAYA H, GERLICH W, KARAYALÇIN S, YURDAYDIN C, UZUNALİMOĞLU Ö (2004). Molecular epidemiology of hepatitis B, C and D viruses in Turkish patients. *Arch Virol*, **149**: 2115-2129.
- CARPENTER JF, PIKAL MJ, CHANG BS, RANDOLPH TW (1997). Rational design of stable lyophilized protein formulations: some practical advice. *Pharm Res*, **14**: 969-75.
- CHANG BS, KENDRICK BS, CARPENTER JF (1995). Surface-Induced Denaturation of Proteins during Freezing and its Inhibition by Surfactants. *J Pharm Sci*, **85**: 1325-30.
- COLACO CI, SEN S, THANGAVELU M, PINDER S, ROSER B (1992). Extraordinary stability of enzymes dried in trehalose: simplified molecular biology. *Biotechnology (NY)*, **10(9)**: 1007-11.
- ÇELİK İ, KARATAYLI E, ÇEVİK E, KABAKÇI SG, KARATAYLI SC, DİNÇ B, ÇINAR K, YALÇIN K, İDİLMAN R, YURDAYDIN C, BOZDAYI M (2011). Complete genome sequences and phylogenetic analysis of hepatitis delta viruses isolated from nine Turkish patients. *Arch Virol*, **156**: 2215-20.
- DANIELSSON A, PALANISAMY N, GOLBOB S, YIN H, BLOMBERG J, HEDLUND J, SYLVAN S, LENNERSTRAND J (2014). Transmission of hepatitis C virus among intravenous drug users in the Uppsala region of Sweden. *Infect Ecol Epidemiol*, **4**: 22251.
- DIMECH W, FRANCIS B, KOX J and ROBERTS G: Serology Uncertainty of Measurement Working Party (2006). Calculating Uncertainty of Measurement for Serology Assays by Use of Precision and Bias. *Clin Chem*, **52(3)**: 526-9.
- DYBKAER R (1995). Reference materials and reference measurement systems in laboratory medicine. Harmonization of nomenclature and definition in reference measurement systems. *Eur J Clin Chem Clin Biochem*, **33**: 995-8.
- DYBKAER R (1996). Quantities and units for biological reference materials used with *in vitro* diagnostic measuring systems for antibodies. *Scand J Clin Lab Invest*, **56**: 385-91.
- DYBKAER R (2001). Calibrators: Commutability, traceability and uncertainty. *In vitro veritas*, 2, art. 21. Erişim Adresi: [<http://www.accllc.cat>]. Erişim Tarihi: 16/5/2017.
- EGAN W and SCHOFIELD T (2009). Basic principles of stability. *Science Direct Biologicals* **37**: 379-386.
- ENGVALLE E, PERLMANN P (1971). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry*, **8**: 871-874.

- FLOSDORF EW, MUDD S (1935). Procedure and apparatus for preservation in “lyophile” form of serum and other biological substances. *J. Immunol.* **29**: 389. See also Flosdorf EW (1949). Freezing and Drying. *New York: Reinhold*, 1-280.
- FLOOD A, ESTRADA M, MCADAMS D, JI Y, CHEN D (2016). Development of a Freeze-Dried, Heat-Stable Influenza Subunit Vaccine Formulation. *PLoS One*, **11(11)**: e0164692.
- FRYER JF, MINHAS R, DOUGALL T, RIGSBY P, MORRIS CL and the Collaborative Study Group (2016). Collaborative study to evaluate the proposed WHO 4 th International Standard for Hepatitis B Virus (HBV) DNA for Nucleic Acid Amplification Technique (NAT) based assays. WHO/BS/2016.2291.
- GARSON JA, RING C, TUKE P, TEDDER RS (1990). Enhanced detection by PCR of hepatitis C virus RNA. *Lancet*, **336**: 878-9.
- GERSH I (1956). The Preparation of Frozen-Dried Tissue for Electron Microscopy. *J Byophys Biochem Cytol.* **2(4)**: 37-43.
- GERLICH, WH, HEERMANN KH, THOMSEN R, THE EUROHEP GROUP (1995).
- GHEORGHIU M, LAGRANDIERE M, BALAZUC AM (1996). Stabilisation of BCG vaccines. *Dev Biol Stand*, **87**: 251-61.
- GREAVES RI, Adair ME (1939). High-vacuum condensation drying of proteins from the frozen state. *The Journal of Hygiene (Lond.)* **39(4)**: 413-45.
- GUPTA E, BAJPAI M, CHOUDHARY A (2014). Hepatitis C virus: Screening, diagnosis, and interpretation of laboratory assays. *Asian J Transfus Sci*, **8(1)**: 19-25.
- HAUDUROY P (1960). Histoire de la technique de lyophilisation. In: *Traité de Lyophilisation. Paris: Hermann*. 3-16.
- HAYDEN RT, HOKANSON KM, POUNDS SB, BANKOWSKI MJ, BELZER SW, CARR J, DORIO D, FORMAN MS, JOSHI Y, HILLYARD D, HODINKA RL, NIKIFOROVA MN, ROMAIN CA, STEVENSON J, VALSAMAKIS A, BALFOUR JR HH, FOR THE US EBV WORKING GROUP (2008). Multicenter comparison of different real-time PCR assays for quantitative detection of Epstein-Barr virus. *J Clin Microbiol*, **46**: 157-163.
- HEINRICH A, ANTOINE M, STEENSELS D, MONTESINOS I, DELFORGE ML (2016). HCV false positive immunoassays in patients with LVAD: A potential trap! *J Clin Virol*, **78**: 44-6.
- HENDRICKS DA, STOWE BJ, HOO BS, KOLBERG J, IRVINE BD, NEUWALD PD, URDEA MS, PERRILLO RP (1995). Quantitation of HBV DNA in human serum using a branched DNA (bDNA) signal amplification assay. *Am J Clin Pathol*, **104**: 537-546.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, INTERNATIONAL ELECTROTECHNICAL COMMISSION, INTERNATIONAL ORGANIZATION OF LEGAL METROLOGY, INTERNATIONAL BUREAU OF WEIGHTS AND MEASURES (1993). Guide to the expression of uncertainty in measurement. Geneva: ISO.

INTERNATIONAL ORGANIZATION for STANDARDIZATION (2017a). All About ISO, The ISO Story. Erişim Adresi: [<https://www.iso.org/the-iso-story.html#2>]. Erişim Tarihi: 8/6/2017.

INTERNATIONAL ORGANIZATION for STANDARDIZATION (2017b). All About ISO, The ISO Story. Erişim Adresi: [<https://www.iso.org/the-iso-story.html#5>]. Erişim Tarihi: 8/6/2017.

ISO 5725-1: 1998. Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results – Part 1: General principles and definitions. ISO, Geneva.

ISO 17511:2003. *In vitro* diagnostic medical devices – measurement of quantities in biological samples – metrological traceability of values assigned to calibrators and control materials. 1st ed. Geneva: ISO.

ISO 15194:2009. *In vitro* diagnostic medical devices – Measurement of quantities in biological samples – Requirements for certified reference materials and the content of supporting documentation. ISO, Geneva, Switzerland.

IZUTSU K, YOSHIOKA S, TERAOKA T (1993). Decreased protein-stabilizing effects of cryoprotectants due to crystallization. *Pharm Res*, **10**: 1232-7.

JOINT COMMITTEE for GUIDES IN METROLOGY (2008). International vocabulary of metrology-Basic and general concepts and associated terms (VIM), JCGM 200:2008.

JOINT COMMITTEE for GUIDES IN METROLOGY (2008). International vocabulary of metrology-Basic and general concepts and associated terms (VIM), JCGM 200:2012.

KABAKÇI ALAGÖZ G, KARATAYLI SC, KARATAYLI E, ÇELİK E, KESKİN O, DİNÇ B, ÇINAR K, İDİLMAN R, YURDAYDIN C, BOZDAYI AM (2014). Hepatitis C virus genotype distribution in Turkey remains unchanged after a decade: performance of phylogenetic analysis of the NS5B, E1 and 5'UTR regions in genotyping efficiency. *Turk J Gastroenterol*, **25**: 405-10.

KAMBOJ N, MAURYA S, KAMBOJ S, SINGH GK. Lyophilization Process – An Overview. *Pharmatutor* [Electronic Journal]. Erişim Adresi: [<http://www.pharmatutor.org/articles/lyophilization-process-overview>]. Erişim Tarihi: 30/6/2017.

KAMISANGO K, KAMOGAWA C, SUMI M, GOTO S, HIRAO A, GONZALES F, YASUDA K, LINO S (1999). Quantitative detection of hepatitis B virus by

transcription-mediated amplication and hybridization protection assay. *J Clin Microbiol*, **37**: 310-314.

KARATAYLI E, KARATAYLI SC, ÇINAR K, GÖKAHMETOĞLU S, GÜVEN K, İDİLMAN R, YURDAYDIN C, BOZDAYI AM (2012). Molecular characterization of a novel entecavir mutation pattern isolated from a multi-drug refractory patient with chronic hepatitis B infection. *J Clin Virol*, **53**: 130-134.

KARATAYLI SC (2014). Hepatit B, Hepatit C ve Delta Virüslerinin Klinik Uygulama Bakımından Moleküler Biyolojisi. BOYACIOĞLU AS. *Kronik Hepatitler B, C ve Delta 2014 ve Sonrası*. Bölüm 3, s.: 19-41.

KESSLER HH, PIERER K, DRAGON E, LACKNER H, SANTNER B, STÜNZNER D, STELZL E, WÄTZL B, MARTH E (1998). Evaluation of a new assay for HBV DNA quantitation in patients with chronic hepatitis B. *Clin Diagn Virol*, **9**: 37-43.

KHURROO MS, KHURROO NS, KHURROO MS (2014). Accuracy of Rapid Point-of-Care Diagnostic Tests for Hepatitis B Surface Antigen-A Systematic Review and Meta-analysis. *J Clin Exp Hepatol*, **4(3)**: 226-40.

KIM H, OH EJ, KANG MS, KIM SH, PARK YJ (2007). COMPARISON of the Abbott Architect i2000 assay, the Roche Modular Analytics E170 assay, and an immunoradiometric assay for serum hepatitis B virus markers. *Ann Clin Lab Sci*, **37**: 256-259.

LIBRETEXTS, Chemistry (2016). Phase Diagrams. Erişim Adresi: [\[https://chem.libretexts.org/Core/Physical_and_Theoretical_Chemistry/Physical_Properties_of_Matter/States_of_Matter/Phase_Transitions/Phase_Diagrams\]](https://chem.libretexts.org/Core/Physical_and_Theoretical_Chemistry/Physical_Properties_of_Matter/States_of_Matter/Phase_Transitions/Phase_Diagrams). Erişim Tarihi: 26/6/2017.

LI S, PATAPOFF TW, OVERCASHIER D, HSU C, NGUYEN TH, BORCHARDT RT (1996). Effects of reducing sugars on the chemical stability of human relaxin in the lyophilized state. *J Pharm Sci*, **85**: 873-7.

LOUIS R, JOAN C (2004). Freeze-Drying/Lyophilization of Pharmaceutical and Biological Products, Second Edition. Drugs and Pharmaceutical Sciences/Volume 137. Chapter 1 and 2.

MANTERO G, ZONARO A, ALBERTİNİ A, BERTOLO P, PRİMİ D (1991). DNA enzyme immunoassay: general method for detecting products of polymerase chain reaction. *Clin Chem*, **37**: 422-429.

MARİN IJ, POLJAK M, SEME K, MEGLİC-VOLKAR J, MATIĆIĆ M, LESNİCAR G, BRİNOVEC V (2001). Comparative evaluation of semiautomated COBAS AMPLICOR hepatitis B virus (HBV) MONITOR Test and manual microwell plate-based AMPLICOR HBV MONITOR Test. *J Clin Microbiol*, **39**: 758-761.

- MEDICINES and HEALTHCARE PRODUCTS REGULATORS AGENCY (2016). WHO International Standard 5th WHO International Standard for HCV NAT, NIBSC code: 14/150. NIBSC Report Version 2.00. Erişim Adresi: [<http://www.nibsc.org/documents/ifu/14-150.pdf>]. Erişim Tarihi: 12/6/2017.
- MENDITTO A, PATRIARCA M, MAGNUSSON B (2007). Understanding the meaning of accuracy, trueness and precision. *Accred Qual Assur* **12**: 45-47.
- MENDOZA LG, MCQUARY P, MONGAN A, GANGADHARAN R, BRIGNAC S, EGGERS M (1999). High-Throughput Microarray-Based Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). *BioTechniques*, **27**: 778-788.
- MILLER WG, MYERS GL, REJ R (2006). Why commutability matters. *Clin Chem*, **52**: 553-4.
- MILLER WG, JONES GRD, HOROWITZ GL, WEYKAMP C (2011). Proficiency testing/external quality assessment: current challenges and future directions. *Clin Chem*, **57**: 1670-80.
- MILLER WG, MYERS GL, GANTZER ML, KAHN SE, SCHÖNBRUNNER ER, THIENPONT LM, BUNK DM, CHRISTENSON RH, ECKFELDT JH, LO SF, NUBLING CM, STURGEON CM (2011). Roadmap for harmonization of clinical laboratory measurement procedures. *Clin Chem*, **57**: 1108-17.
- MYERS GL. Traceability in Laboratory Medicine. Erişim Adresi: [ftp://ftp.cdc.gov/pub/cliac_meeting_presentations/pdf/addenda/cliac0903/I_Traceability.pdf]. Erişim Tarihi: 7/7/2017.
- NATIONAL INSTITUTES of HEALTH (2009). Analytical methods and reference materials program, AMRM Glossary, USA.
- NEI T (1970). Studies on the freezing and drying of biological specimens by electron microscopy. *J. Electron. Microsc. (Tokyo)*, **19(1)**: 6-11.
- NİESTERS HGM, KRAJDEN M, CORK L, DE MEDİNA M, HİLL M, FRIES E, OSTERHAUS ADME (2000). A multicenter study evaluation of the Digene Hybrid Capture II signal amplification technique for detection of hepatitis B virus DNA in serum samples and testing of EUROHEP standards. *J Clin Microbiol*, **38**: 2150-2155.
- NOWAK MA, BONHOEFFER S, HİLL AM, BOEHME R, THOMAS HC, and MCDADE H (1996). Viral dynamics in hepatitis B virus infection. *Proc Natl Acad Sci USA*, **93**: 4398-4402.

- OKAMOTO H, OKADA S, SUGIYAMA Y, TANAKA T, SUGAI Y, AKAHANE Y, MACHIDA A, MISHIRO S, YOSHIZAWA H, MIYAKAWA Y (1990). Detection of hepatitis C virus RNA by a two-stage polymerase chain reaction with two pairs of primers deduced from the 5'-noncoding region. *Jpn J Exp Med*, **60**: 215-22.
- ÖZDEMİR FT, DUMAN D, ERTEM D, AVŞAR E, EREN F, ÖZDOĞAN O, KALAYCI C, ASLAN N, BOZDAYI AM, TÖZÜN N (2005). Determination of hepatitis B genotypes in patient with chronic hepatitis B virus infection in Turkey. *Turk J Gastroenterol*, **16**: 183-7.
- PANTEGHINI M (2007). Traceability, Reference Systems and Result Comparability. *Clin Biochem Rev*, **28**: 97-104.
- PICAL-CLELAND KA, RODRIQUEZ-HOMEDO N, AMIDON GL, CARPENTER JF (2000). Protein denaturation during freezing and thawing in phosphate buffer systems: monomeric and tetrameric beta-galactosidase. *Arch Biochem Biophys*, **384**: 398-406.
- PRESTRELSKI S, TEDESCHI N, ARAKAWA T, CARPENTER JF (1993). Dehydration-induced conformational transitions in proteins and their inhibition by stabilizers. *Biophys J*, **65**: 661-71.
- REMMELE RL, KRISHNAN S, CALLAHAN WJ (2012). Development of stable lyophilized protein drug products. *Curr Pharm Biotechnol*. **13(3)**: 471-496.
- REY L (2004). The Saga of Freeze-Drying. *Pharmaceutical Technology* [Electronic Journal]. Erişim Adresi: [<http://www.pharmtech.com/>]. Erişim Tarihi: 24/6/2017.
- SALDANHA J, LELIE N, HEATH A and the WHO Collaborative Study Group (1999). Establishment of the First International Standard for Nucleic Acid Amplification Technology (NAT) Assays for HCV RNA. *Vox Sang*, **76**: 149-158.
- SALDANHA J, GERLICH W, LELIE N, DAWSON P, HEERMANN K, HEATH A and The WHO Collaborative Study Group. 2001. An international collaborative study to establish a World Health Organization international standard for hepatitis B virus DNA nucleic acid amplification techniques. *Vox Sanguinis*, **80**: 63-71.
- SALDANHA J, HEATH A, ABERHAM C, ALBRECHT J, GENTILI G, GESSNER M, PISANI G (2005). World Health Organization collaborative study to establish a replacement WHO international standard for hepatitis C virus RNA nucleic acid amplification technology assays. *Vox Sang*, **88(3)**: 202-4.
- SALK J (1987). Prospects for the control of AIDS by immunizing seropositive individuals. *Nature*, **327**: 473-6.
- SCOTTO J, HADCHOUËL M, HERY C, YVART J, TIOLLAÏS P, BRECHOT C (1983). Detection of hepatitis B virus DNA in serum by a single spot hybridization technique: Comparison with results for other viral markers. *Hepatology*, **3**: 279-282.

- SEARLES JA, CARPENTER JF, RANDOLPH TW (2001). The Ice Nucleation Temperature Determines the Primary Drying Rate of Lyophilization for Samples Frozen on a Temperature Controlled Shelf. *J Pharm Sci*, **90**: 860-71.
- SHAH K, MAGHSOUDLOU P (2016). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): the basics. *Br J Hosp Med (Lond)*, **77(7)**: 98-101.
- SHALAEV EY, ZOGRAFI G (1996). How Does Residual Water Content Affect the Solid-State Degradation of Drugs in the Amorphous State? *J Pharm Sci*, **85**: 1137-41.
- SHIYKUMAR S, PEELING R, JAFARI Y, JOSEPH L, PANT PAI N (2012). Accuracy of rapid and point-of-care screening tests for hepatitis C: a systematic review and meta-analysis. *Ann Intern Med*, **157(8)**: 558-66.
- SHUKLA S (2011). Freeze Drying Process: A Review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, **2(12)**: 3061-3068.
- SIQUEIRA JF, JR, RÔÇAS IN (2003). PCR methodology as a valuable tool for identification of endodontic pathogens. *Journal of Dentistry*, 333-339.
- SJOSTAND FS, BAKER RF (1958). Fixation by freezing-drying for electron microscopy of tissue cells. *J Ultrastruct Res*, **1(3)**: 239-46.
- SMITH CJ, OSBORN AM (2009). Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR)-based approaches in microbial ecology. *Fems Microbiol Ecol*, **67**: 6-20.
- STEVENS SJ, VERSCHUUREN EA, VERKUUJLEN SA, VAN DEN BRULE AJ, MEIJER CJ, MIDDELDORP JM (2002). Role of Epstein-Barr virus DNA load monitoring in prevention and early detection of post-transplant lymphoproliferative disease. *Leuk Lymphoma*, **43**: 831-840.
- TAKAHASHI T, NAKAGAWA S, HASHIMOTO T, TAKAHASHI K, IMAI M (1976). Large-scale isolation of Dane particles from plasma containing hepatitis B antigen and demonstration of circular double-stranded DNA molecule extruding directly from their cores. *J Immunol*, **117**: 1392-1397.
- VÍCTER TN, DOS SANTOS CS, BÂO SN, SAMPAIO TL (2016). Deceased tissue donor serology and molecular testing for HIV, hepatitis B and hepatitis C viruses: a lack of cadaveric validated tests. *Cell Tissue Bank*, **17(4)**: 543-553.
- WEBER NC, KLEPSE ME, AKERS JM, KLEPSE DG, ADAMS AJ (2016). Use of CLIA-waived point-of-care tests for infectious diseases in community pharmacies in the United States. *Expert Rev Mol Diagn*, **16(2)**: 253-64.
- VALENTINE-THON E, STEINMANN J, ARNOLD W (1990). Evaluation of the commercially available HepProbe kit for detection of hepatitis B virus DNA in serum. *J Clin Microbiol*, **28**: 39-42.

- VALENTINE-THON E, STEINMANN J, ARNOLD W (1991). Detection of hepatitis B virus DNA in serum with nucleic acid probes labelled with 32p, biotin, alkaline phosphatase or sulphone. *Mol Cell Probes*, **5**: 299-305.
- VALENTINE-THON E (1995). Evaluation of SHARP Signal System for enzymatic detection of amplified hepatitis B virus DNA. *J Clin Microbiol*, **33**: 477-480.
- ZAAIJER HL, BORG TER F, CUYPERS HT, HERMUS MC and LELIE PN (1994). Comparison of methods for detection of hepatitis B virus DNA. *J Clin Microbiol*, **32**: 2088-2091.
- ZINGEL C, SACHSE A, ROESSLING GL, MUELLER RH (1996). Lyophilization and rehydration of iopromide-carrying liposomes. *Int J Pharm*, **140**: 13-24.
- ZHAI S, HANSEN RK, TAYLOR R, SKEPPER JN, SANCHES R, SLATER NK (2004). Effect of freezing rates and excipients on the infectivity of a live viral vaccine during lyophilization. *Biotechnol Prog*, **20**: 1113-20.
- WEBER B (2005). Genetic variability of the S gene of hepatitis B virus: clinical and diagnostic impact. *J Clin Virol*, **32**: 102-112.
- WEDEMEYER H, MANNS MP (2010). Epidemiology, pathogenesis and management of hepatitis D: update and challenges ahead. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, **7**: 31-40.
- WILLIAM J, PINGOUD A (2003). Real-time polymerase chain reaction. *Chembiochem*, **4(11)**: 1120-8.
- WORLD HEALTH ASSEMBLY RESOLUTION 63.12. Availability, safety and quality of blood products. WHA63/2010/REC/1, WHO, Geneva, 2010.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (2011). WHO manual for the establishment of national and other secondary standards of vaccines. WHO/IVB/11.03, WHO 2011.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (2013). WHO Consultation on the commutability of WHO biological reference preparations for the *in vitro* detection of infectious markers. Geneva, 18-19 April, 2013.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (2017a). Hepatitis B. Erişim Adresi: [<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204/en/>]. Erişim Tarihi: 6/7/2017.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (2017b). Hepatitis C. Erişim Adresi: [<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs164/en/>]. Erişim Tarihi: 6/7/2017.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (2017c). Hepatitis Delta. Erişim Adresi: [<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/hepatitis-d/en/>]. Erişim Tarihi: 6/7/2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (2017d). WHO Expert Committee on Biological Standardization. Erişim Adresi: [\[http://www.who.int/biologicals/expert_committee/en\]](http://www.who.int/biologicals/expert_committee/en). Erişim Tarihi: 8/6/2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (2017e). WHO International Biological Reference Preparations. Erişim Adresi: [\[http://www.who.int/biologicals/reference_preparations/en\]](http://www.who.int/biologicals/reference_preparations/en). Erişim Tarihi: 8/6/2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (2016). Manual for the preparation of secondary reference materials for *in vitro* diagnostic assays designed for infectious disease nucleic acid or antigen detection: Calibration to WHO international standards, 2016.2284.

QUINT WG, HEIJTINK RA, SCHIRM J, GERLICH WH, and Niesters HG (1995). Reliability of methods for hepatitis B virus DNA detection. *J Clin Microbiol*, **33**: 225-228.

ÖZGEÇMİŞ

I- Bireysel Bilgiler

Adı Mehtap
Soyadı Kızılpınar
Doğum Yeri ve Tarihi Bodrum, 12.12.1991
Uyruğu Türkiye Cumhuriyeti
Medeni Durumu Bekar
İletişim Adresi ve Telefonu Ankara / 554 884 42 57

II- Eğitimi

2015-2017, Yüksek Lisans
Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Disipliner arası Temel Hepatoloji
Anabilimdalı, ANKARA.

09.2010-06.2014, Lisans

Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü, ANKARA.

09.2006-06.2010, Lise

Bodrum Anadolu Lisesi, MUĞLA

III-Bilimsel İlgi Alanları

Haziran 2016, Ankara

“Turkish Journal of Molecular Biology and Biotechnology”, Scientific Assistan.

Mayıs 2017, Ankara

Türkiye’de hev seroprevalansının yeniden değerlendirilmesi: Ticari olarak kullanılan iki hev total antikor ELISA kitinin karşılaştırılması (BAP Projesi)
Poster Bildirisi / 2017 Ulusal Hepatoloji Kongresi

IV-Bilimsel Etkinlikleri

Tübitak 1001 Projesi Bursiyerliği – 2016/7

Tübitak 1003 Projesi Bursiyerliği – 2016/7

VIII-Diğer Bilgiler

Katıldığı Kongreler ve Organizasyonlar

- 16-20 Kasım-2016, Antalya
XXXVII. Türk Mikrobiyoloji Kongresi
- 19-22 Kasım-2015, Antalya
3. Ulusal Klinik Mikrobiyoloji Kongresi

