

TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ANTİ-HCV TARAMASI YAPILMIŞ OLAN KAN  
VERİCİLERİNDE RT-PZR İLE HCV RNA TARAMA  
ÇALIŞMASI**

**Burcu ÇUHADAR**

**DİSİPLİNLERARASI HEPATOLOJİ ANA BİLİM DALI  
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN  
Prof. Dr. A. Mithat BOZDAYI**

**2006-ANKARA**



## İÇİNDEKİLER

<b>Kabul ve Onay</b>	<b>ii</b>
<b>İçindekiler</b>	<b>iii</b>
<b>Önsöz</b>	<b>iv</b>
<b>Simgeler ve Kısaltmalar</b>	<b>v</b>
<b>Şekiller</b>	<b>vii</b>
<b>Çizelgeler</b>	<b>viii</b>
<b>Resimler</b>	<b>ix</b>
<b>1. GİRİŞ</b>	<b>1</b>
1.1. Nükleik Asit Amplifikasyon Testi ve Bulaş	1
1.1.1. Rezidüel Risk ve Kan transfüzyonunda Güvenlik	1
1.1.2. Pencere Dönemi ve NAT	3
1.1.3. NAT Uygulamasının Ortaya Çıkışı	6
1.1.4. NAT Teknolojisinde Kullanılan Sistemler	7
1.2. HCV	8
1.2.1.HCV Genomu	10
1.2.2. HCV' nin Epidemiyolojisi	11
1.2.3. HCV Genotiplerinin Dağılımı	12
1.3. Çalışmanın Amacı	13
<b>2. GEREÇ VE YÖNTEM</b>	<b>14</b>
2.1. Serumların Havuzlanması	14
2.2. Havuzlanan Serumlardan HCV RNA İzolasyonu	16
2.3. Realtime PZR	16
<b>3. BULGULAR</b>	<b>18</b>
<b>4.TARTIŞMA</b>	<b>20</b>
<b>5. SONUÇ VE ÖNERİLER</b>	<b>22</b>
<b>ÖZET</b>	<b>23</b>
<b>SUMMARY</b>	<b>24</b>
<b>KAYNAKLAR</b>	<b>25</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ</b>	<b>28</b>

*Aileme,*

## SİMGELER ve KISALTMALAR

ALT	Alanin Amino Transferaz
anti-HBc	Hepatit B kor antikoru
anti-HCV	Hepatit C antikoru
bDNA	branched DNA
C	Kapsid proteini
cDNA	Komplementer DNA
dk	Dakika
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	Deoksinükleotidtrifosfat
E1, E2	HCV zarf glikoproteinleri
ER	Endoplazmik Retikulum
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç İdaresi (Food and Drug Administration)
HBsAg	Hepatit B yüzey antijeni
HBV	Hepatit B virüsü
HCV	Hepatit C virüsü
HIV	İnsan Bağışıklık Yetmezliği Virüsü (Human Immunodeficiency Virus)
HVR	Çok değişkenli bölge (Hypervariable Region)
H <sub>2</sub> O	Su
IRES	İç Ribozom Giriş Bölgesi (Internal Ribosome Entry Site)
ml	Mililitre
NAT	Nükleik asit Amplifikasyon Testi
NS	Yapısal olmayan
ORF	Açık okuma çerçevesi (Open Reading Frame)
pmol	Pikomol
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
p24 Ag	HIV enfeksiyonu varlığında serumda ilk olarak saptanan antijen
RNA	Ribonükleik asit
rpm	Dakikada döngü sayısı (Revolutions Per Minute)
RT-PZR	Ters transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu
s	Saniye

TMA	Transkripsiyon aracılı amplifikasyon
UTR	Translasyonu yapılmayan bölge (Untranslated Region)
Zn	Çinko
WHO	Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization)
$\mu$ l	Mikrolitre
$^{\circ}$ C	Derece santigrad

## ŞEKİLLER

**Şekil 1.1.** Transfüzyon sonrası komplikasyon risk hesapları.

**Şekil 1.2.** HIV pencere dönemi

**Şekil 1.3.** HBV pencere dönemi

**Şekil 1.4.** HCV pencere dönemi

**Şekil 1.5.** HCV RNA Genomu ve kodlanan proteinlerin şeması

**Şekil 1.6.** Serumların havuzlanması.

**Şekil 1.7.** Realtime-PZR'de kontrol serumlarının sonuçları.

## ÇİZELGELER

**Çizelge 1.1.** NAT çalışan ülkelerdeki rezidüel risk oranları

**Çizelge 1.2.** NAT'ın sağlayacağı beklenen teorik verim.

**Çizelge 1.3.** Dünyadaki HCV enfeksiyonu prevalansı. (Weekly Epidemiological Record No. 49 / Dec, 1999 / WHO )

## RESİMLER

**Resim 1.1.** Cobas Ampliscreen cihazı.

**Resim 1.2.** Chiron Procleix hedef yakalama sistemi.

**Resim 1.3.** İnsan HCV modeli

**Resim 1.4.** HCV genotipleri ve dünya genelinde dağılımı.

# 1. GİRİŞ

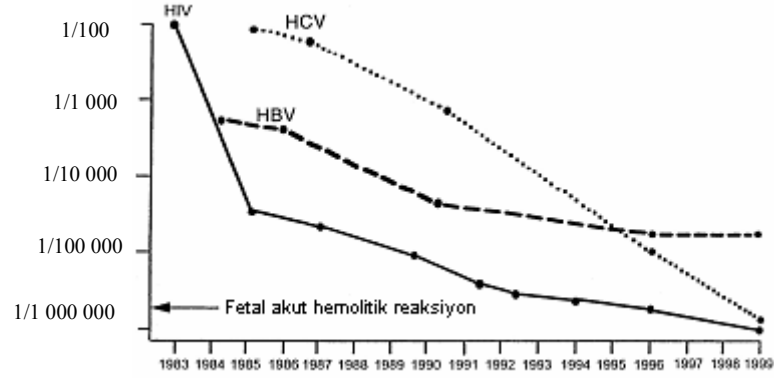
## 1.1.Nükleik Asit Amplifikasyon Testi ve Bulaş

Nükleik Asit Amplifikasyon Testi (NAT) viral nükleik asidin izolasyonu, çoğaltılması ve saptanması aşamalarından oluşan; çok sayıda farklı teknolojiyi içine alan genel bir test yöntemidir. Gelişen teknolojiyle birlikte kan bankacılığında ileri tetkiklerin de kullanılmaya başlanmasıyla birlikte, NAT teknolojisi de bu alanda giderek yaygınlaşan bir tetkik haline gelmiştir. Bu teknoloji, serolojik yöntemlere göre çok daha güvenilir ve hassas olsa da; test maliyetinin serolojik yöntemlerden yüksek olmasından dolayı, genel olarak örneklerin belli hacimlerde bir araya getirilmesiyle oluşturulan küçük havuzların başlangıçta test edilmesi ve pozitiflik saptanması halinde o havuzdan geriye dönülerek kademe kademe test edilmesi yöntemi ile, havuzun pozitif çıkmasına sebep olan örnek ya da örneklerin tek tek çalışılıp virüsü taşıyan hastanın bulunması yoluna gidilmektedir. Böylelikle zaman, iş gücü ve para kaybı da minimuma indirgenmektedir. NAT'ın kullanım amaçlarının en başında serokonversiyon öncesi pencere döneminde yapılan donasyonları ortaya çıkarmak ve bu donasyonlara ait kan ve kan ürünlerinin hastaya ulaşmasının önüne geçmek gelmektedir. Böylelikle, olabilecek en az riske sahip, en güvenilir kan transfüzyonunun gerçekleşmesi sağlanabilmektedir.

### 1.1.1 Rezidüel Risk ve Kan Transfüzyonunda Viral Güvenlik

Bir kan ve kan ürününün güvenliği söz konusu olduğunda halkın beklentisi, kan transfüzyonunda viral ajanın bulaşma riskinin olmaması yönündedir. Ancak virüse maruz kalma ve virüsün NAT ve serolojik tetkiklerle saptanabilmesi arasında geçen eklips fazından dolayı bu riskin sıfırlanması mümkün olmamaktadır. Son 20 yıl içinde, kan merkezlerinde bağışlanan kanlara yapılan laboratuvar testlerinin geliştirilmesiyle, kan nakli yoluyla virüs bulaşma riskinde çarpıcı bir düşüş gözlenmektedir (Şekil 1.1). Şu anda dünyadaki risk aralığı majör viral ajanlar için 50 000 üniteye 1 ila 700 000 üniteye 1 arasında değişmektedir. Geriye kalan bu riskin 4

kaynağı vardır; önserokonversiyon (pencere dönemi) donasyonları, viral varyantlar, atipik serokonversiyon ve laboratuvar test hataları. (Busch ve ark.,2000)



Şekil 1.1. Transfüzyon sonrası komplikasyon risk hesapları. (Transfusion 2000; 40:143-159)

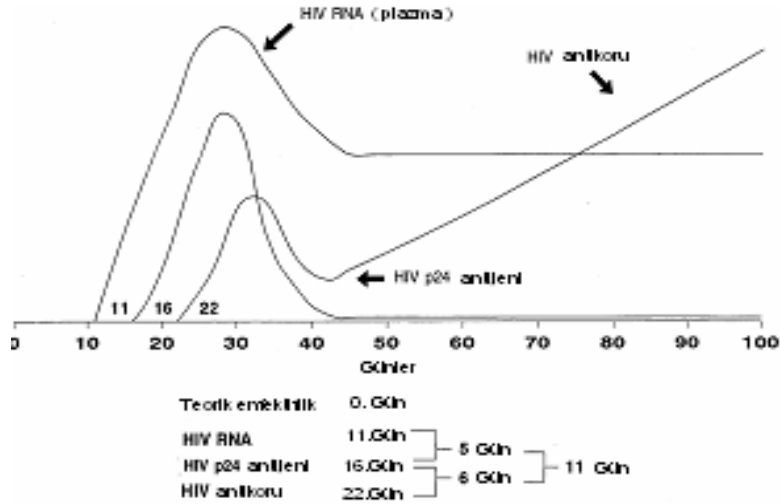
Çizelge 1.1. NAT çalışan ülkelerdeki rezidüel risk oranları

	ABD	INGiltere	ITALYA	AVUSTRALYA	HONG KONK
HIV	1:493 000	<1:2 000 000	1:408 000	1:1 200 000	1:877 147
HCV	1:103 000	<1:200 000	1:230 000	1:250 000	1:86 137
HBV	1:63 000	1:50 000-170 000	1:63 400	1:160 000	1:3357

### 1.1.2. Pencere Dönemi ve NAT

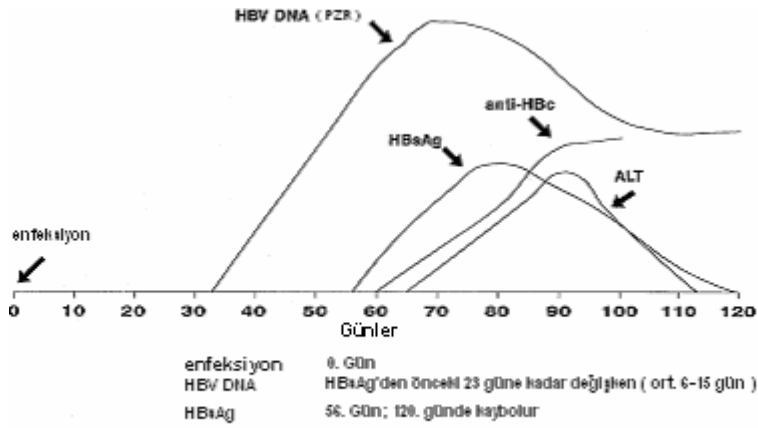
Pencere dönemi, viral ajana maruz kalınmasından itibaren vücutta antikorların oluşmasına kadar olan süreçtir. Pencere döneminin eklips fazı virüse maruz kaldıktan hemen sonra, viral replikasyonun doku bölgelerine sınırlandırıldığı ve saptanabilir vireminin olmadığı en erken safhadır. Pencere döneminin enfeksiyöz safhası, eklips fazından sonra ve serokonversiyondan önceki dönemdir. Hepatit C virüsü (HCV), hepatit B virüsü (HBV) ve human immunodeficiency virus (HIV) özellikle serokonversiyonun erken safhalarında ve çoğunlukla da hastalık süresince hasta bireyin vücudunda belirti göstermeden enfeksiyon oluşturan virüslerdir. Belirtiler (hepatit, grip benzeri) virüs replikasyonundan ya da viremiden daha çok doku hasarı sonucu oluşan, virüse karşı immün yanıtı yansıtan şekildedir. Bu yüzden, birincil enfeksiyonun antikor öncesi döneminde pek fazla bilgi vermezler. NAT ne kadar hassas olursa olsun, viremik olmayan eklips faz yüzünden hiçbir zaman ‘virüsle karşılaşma-serokonversiyon’ pencere dönemini tamamen kapatmak mümkün olamayacaktır. Bununla birlikte; NAT , birincil enfeksiyonun viremik fazı sırasında yapılan hemen hemen tüm donasyonları saptayabilir.

HIV enfeksiyonunda HIV antikor 22. günde saptanabilmektedir. P24 antijenini saptayabilen testlerde virüsün varlığı 16. günde tespit edilmektedir. HIV RNA ise serumda 11. günde saptanabilmekte ve bu durum hastalığı 11 gün daha erken ortaya çıkarmaktadır (Şekil 1.2.).

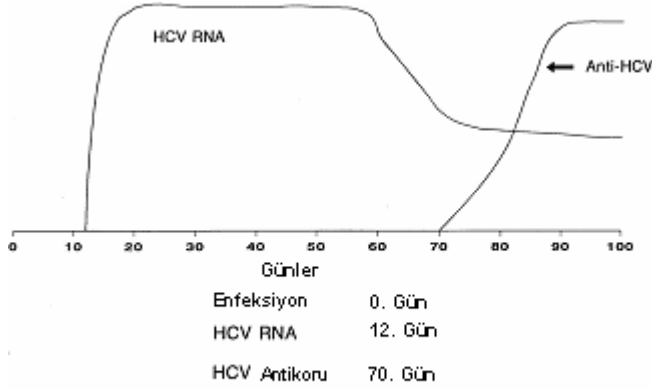


Şekil 1.2. HIV pencere dönemi

HBV enfeksiyonu varlığında HbsAg 56. gün ile 120. gün arasında tespit edilebilir. 120 günün sonunda HbsAg seviyesi düşmesiyle ALT düşüş, anti-HBs yükseliş göstermektedir. HBV DNA ise 33. günden itibaren serumda tespit edilmeye başlar (Şekil1.3.).



Şekil 1.3. HBV pencere dönemi



**Şekil 1.4.** HCV pencere dönem

HCV'nin pencere dönemini anlamada 3 veri kaynağı kullanılmıştır.

- 1) Bir plazma vericisi serokonversiyon olduğunda, bundan önceki seri donasyonları test edilerek, sürecin ve karaciğer enzim artışı ile antijen oluşumu olmadan önceki HCV RNA seviyelerinin anlaşılması sağlanır. HIV'in aksine, RNA pozitif antikor negatif durumunun belirgin olduğu HCV ile, ALT ve antikor serokonversiyonundan önce, uzayan bir yüksek titre viremik faz vardır. Ek olarak, negatif RNA NAT sonucundan pozitifliğe geçiş, HCV'de aşırı hızlıdır. ~ 0,1 gün olarak hesaplanan, virüsün olağandışı bir hızda kendini sayısal olarak ikiye katladığı zaman, bu geçişin olduğu andır. Bir çalışmada, serokonversiyondan önce HCV RNA pozitifliğinin süresi ortalama 41 gündür (Busch ve ark., 2003). Bu dönem sırasında RNA kopyalarının sayısı ml'de 100 000'in üzerine çıkmıştır. Havuzların genişliği 100-500 donasyon bile olsa, bu yüksek titre viremi fazıyla HCV, havuzlanan örneklerden çalışılan NAT ile tespit edilmeye oldukça uyumludur.
- 2) HCV pencere döneminin 2. veri kaynağı 70'lerin sonlarında kan nakli sonrası ortaya çıkan hepatit vakalarıdır. Bu vakaların analizlerinden elde edilen bulgular serokonversiyon geçiren plazma vericilerinin verilerine benzerlik gösterir. Virüsle karşılaşma tarihi (ör. kan nakli) bilindiğinden, birçok alıcının enfeksiyondan itibaren 10 gün içinde yüksek seviyede viremi geliştirdiği gösterilebilir. ALT yükselmesi ve ~10 gün sonra antikor

serokonversiyonundan önce ortalama 40 günlük yüksek seviyede viremi dönemi izler. (Şekil 1.4.).

- 3) Şempanze enfektifliği çalışmaları insanlardaki gözlemlerle uyumaktadır. RNA NAT ile, inokulasyondan ortalama 9 gün sonra saptanmış ve antikor ise inokulasyondan 73 gün sonra saptanmıştır. (Busch ve ark., 2005)

Diğer virüslerle karşılaştırıldığında HCV'deki yaklaşık 41 günlük kazanç NAT çalışmalarında dikkatin bu virüse çekilmesini sağlamaktadır (Çizelge 1.2.) (Keller ve ark., 2005).

**Çizelge 1.2.** NAT'ın sağlayacağı beklenen teorik verim

Virüs	Marker	Pencere Dönemi (gün)	Beklenen Kazanç (gün)	Hesaplanan Etkinlik/10 <sup>6</sup> donasyon	Klinik Veriler
HBV	DNA	56	6-25	9,1	
HCV	RNA	80	41-59	2,7	
HIV	RNA	22	6-11	2	
	p24Ag		6	1	1/12x10 <sup>6</sup>

### 1.1.3. NAT Uygulamasının Ortaya Çıkışı

1999 haziran ayında Avrupa Komitesi, fraksinasyon yapılan bütün plazma ürünlerinin NAT ile HCV RNA negatif olduğunun gösterilmesi kararı aldı. Bu tarihten itibaren Almanya'da bulunan Paul Erlich Enstitüsü bunu uygulama kararı aldı. Amerika Birleşik Devletleri kan merkezleri bu tarihten itibaren bu kararı HIV ve HCV için uygulamaya başladı ve sadece Gen Probe ve Roche sistemlerini kullandı. Kanada kan servisleri 1999 Ekim'den itibaren NAT uygulamaya başladı. Avustralya 2000 Haziran ayında HIV ve HCV için kan donörlerinde NAT uygulamaya geçti. Japon Kızılhaç'ı 1999 hazirandan beri NAT'ı HCV, HIV ve HBV için uygulamaktadır. HCV RNA NAT uygulayan ülkeler sırasıyla Avustralya, Yeni

Zelanda, Japonya, A.B.D., Kanada, Almanya, Fransa, Avusturya, İtalya, Hollanda, İngiltere, Finlandiya, Norveç, İspanya (kısmen) ve Hong Kong'tur.

#### 1.1.4. NAT Teknolojisinde Kullanılan Sistemler

HCV, HIV ve bazı vakalarda HBV NAT için ticari kitler halen çalışma altında olup şunları içine almaktadır: PZR tabanlı yöntemler (Roche Laboratories, Indianapolis, IN; Abbott Laboratories, Abbott Park, IL), bir transkripsiyon aracılı çoğaltma yöntemi (GenProbe, San Diego, CA), bir bDNA sinyal çoğaltma yöntemi (Chiron Corp., Emeryville, CA), ve nükleik asit tabanlı sinyal çoğaltma yöntemi (NucliSens, Organon Teknika, Durham, NC). Roche ve Abbott'un kitleri RT-PZR tabanlı kitler olup, sonradan kolorimetrik olarak saptanan çok sayıda çoğaltılmış viral DNA kopyaları üretir. GenProbe, viral RNA'yı DNA'ya çeviren enzimleri kullanır, bu daha sonra milyarlarca adet kolay saptanabilen RNA ampliconlarını oluşturur. bDNA sinyal çoğaltma yöntemi ise, viral nükleik aside bir kere bağlanan sinyalin çoğaltılmasına dayanır. Bu yöntemler sadece farklı teknolojilere dayalı değildir aynı zamanda farklı standartlar, kontroller ve farklı saptama yöntemleri kullanmaktadır:

- I. PZR tabanlı tetkikler (Roche Cobas Ampliscreen) (Resim 1.1.)
- II. Transkripsiyon aracılı amplifikasyon (TMA) (GenProbe)
- III. Diğerleri, in-house PZR preparasyonlarını içerir

#### **COBAS Ampliscreen**



**Resim 1.1.** Cobas Ampliscreen cihazı.

### Gen Probe

FDA tarafından yakın zamanda (Şubat 2002) geliştirildi. (Resim 1.2.)Üç ana basamağı vardır:

1) Örnek hazırlanması ve hedef yakalama

RNA hedefe özgül oligonükleotidlere hibridize olur ve manyetik alanda plazmadan ayrılan manyetik mikropartiküller tarafından yakalanır.

2) Transkripsiyon Aracılı Amplifikasyon (TMA)tek basamaklı izotermal amplifikasyon

- hedef RNA'dan ilk cDNA sentezi ve sonrasında cDNA'nın çok sayıda RNA amplikonuna in-vitro transkripsiyonu

3) Amplikona hibridize olan bir kemilüminesan prob ile saptama



**Resim 1.2.** Chiron Procleix hedef yakalama sistemi.

### 1.2. HCV

Hepatit C virüsü (HCV), *Flaviviridae* familyasına ait *hepacivirus* cinsinin tek üyesidir. HCV, eskiden non-A,non-B Hepatiti diye bilinen 1989 yılında tanımlanmış, tek zincirli bir RNA virusudur. HCV, parenteral yolla bulaşan bir virüstür ve özellikle, intravenöz ilaç kullananlarda çok yaygındır. Bu virus, eritrosit, platelet, plazma ve kryopresipitatla bulaşabilmektedir. Viral inaktivasyon tekniklerinin kullanımından önce, faktör konsantreleri ve immünglobulin preparatlarıyla da bulaşabiliyordu. HCV, genellikle (%80) akut fazda asemptomatiktir ama, vakaların %85'ine kadar varabilecek kısmında kronik enfeksiyon meydana gelebilir. Hastaların küçük bir kısmında 20-30 yıllık süreç içerisinde , kronik aktif hepatit, siroz ve

hepatosellüler karsinoma gibi sekeller oluşabilmektedir. Düşük HCV prevalansına sahip ülkelerde HCV ile enfekte kan donörlerinin %40-50'sine bulaşın kan transfüzyonu ile olduğu bilinmektedir (Forns ve Bukh, 1999).

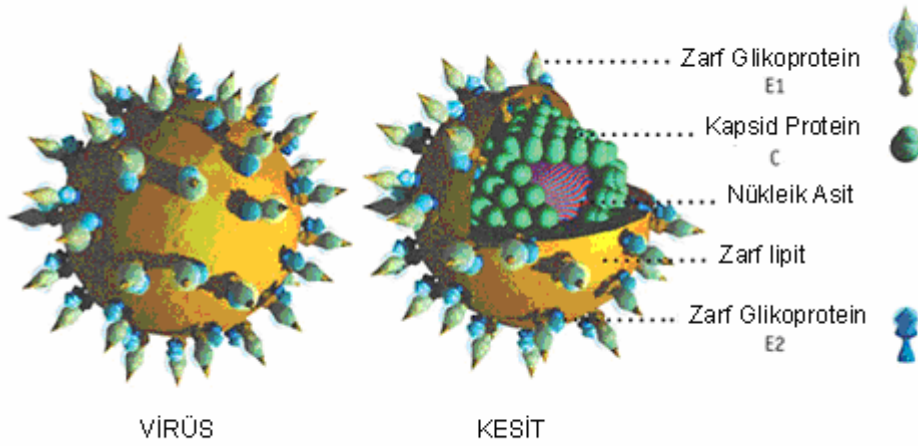
1990'dan beri, bağışlanan kanlarda HCV antikor taraması rutin olarak yapılmaktadır. HCV antikor , enfeksiyondan yaklaşık 70 gün ( 10-20 hafta) kadar sonra gelişmekte ve yaşam boyunca aynı düzeyde seyretmektedir . Dolayısıyla HCV'nin transfüzyonla bulaşı da hastalığın alınması ile, antikorların kanda tespit edilebildiği 70 günlük süre içerisinde bağışlanmış olan kanlarla meydana gelmektedir. Amerika Birleşik Devletleri'ndeki kan donörlerine ait verilere göre pencere döneminde yapılan kan bağışlarının neden olduğu bulaşma riskinin 1/103.000 olduğu tahmin edilmektedir. 1990'larda HCV antikor tarama testinin geliştirilmesiyle bu oran 1/120.000'e düşmüştür. HCV nükleik asit testi, pencere sürecini 42 ile 56 güne kadar düşürmekle transfüzyonla bulaşma riskini de 1/250.000 – 1/500.000 civarına indirmiştir. . 1989 yılında Anti-HCV taramasının başlatılmasıyla, özellikle de son zamanlarda üçüncü kuşak testlerin kullanımı HCV'ye bağlı transfüzyon sonrası hepatitlerinde %90'lara varan bir azalma sağlamıştır.

HCV, Dünya üzerinde 6 genotip, birçok alttip ve nükleotid farklılığına dayanan izolatlara sahiptir. Birey içinde ise "quasispecies" ismiyle adlandırılan çeşitliliğe sahiptir. Genotipler, hastalığın ilerleyişine etki etmez ancak antiviral tedaviye yanıt etkiler. Örneğin; genotip 2 ve 3, alfa-interferon tedavisine, genotip 1'den daha fazla yanıt verir. Bunun sebebi henüz bilinmemektedir. (Moradpour ve ark.,2004).

RNA polimerazın proofreading aktivitesinin olmaması ve HCV replikasyon oranının yüksek olması, enfekte bir birey içinde yüksek genetik çeşitliliğe sebep olur. Bu viral genetik varyantlar "quasispecies" olarak adlandırılır. Bu varyantlar HCV için ilaç geliştirilmesini olanaksız kılmakta ve tedaviyi güçleştirmektedir.

Virion, E1 ve E2 glikoproteinlerinin yaptığı heterodimerler ile bir ikozahedral lipid membrandan oluşur. Viral membran içinde bir ikozahedral nükleokapsid olduğu düşünülmektedir. (Resim 1.3.)

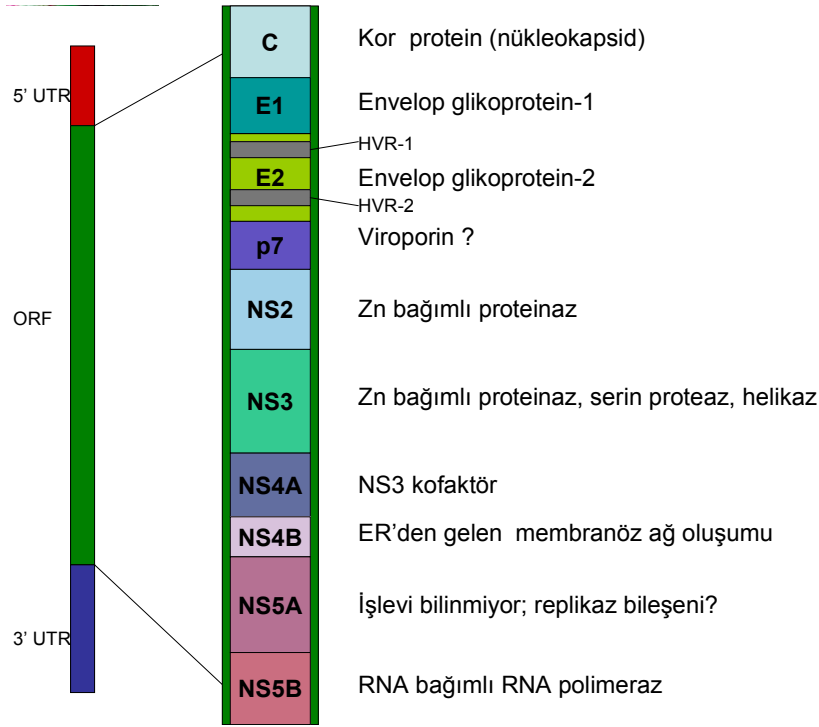
Lipid zarf, heterodimer oluşturan E1 ve E2 glikoproteinlerini içerir. Zarf içinde HCV genomunun olduğu viral kapsid vardır.



**Resim 1.3.** İnsan HCV modeli

### 1.2.1. HCV Genomu

5' ucunda bulunan IRES (iç ribozom giriş bölgesi) viral RNA'nın cap-bağımsız translasyonu için şarttır. 3000 aminoasitlik poliprotein kodlandığı bir açık okuma bölgesi (ORF) vardır. Bu poliprotein önce tek bir peptit olarak translasyona uğrar. Daha sonra viral ve hücrel proteazlarla işlenir. (Şekil 1.5.).



**Şekil 1.5.** HCV RNA Genomu ve kodlanan proteinlerin şeması

E2'de 2 çok çeşitlilik gösteren bölge bulunur (HVRs) ve HCV genomunun genetik olarak en çeşitli bölgesidir. Bu, virüsün konak immün yanıtından kaçışını sağlar. p7'nin viroporin ailesine ait olduğu ve virüsün olgunlaşması ve salınımında rol oynadığı düşünülmektedir. NS4B'nin ekspresyonu, konak hücrenin endoplazmik retikulumundan elde edilen bir membranöz ağın oluşumuna yol açar. Bunun; viral replikasyon sırasında viral RNA ve proteinleri birleştirebilen bir çatı gibi davrandığı düşünülmektedir.

Tüm bu proteinler muhtemel ilaç hedefleri olsa da, zarf glikoproteinleri çok çeşitlilik gösterdiğinden dolayı hedef olarak daha az etkilidirler. NS5B, RNA polimeraz, gelişimde polimeraz inhibitörlerinin hedefidir ve NS3 ise bir proteaz inhibitörünün hedefidir.

### 1.2.2. HCV'nin Epidemiyolojisi

HCV, dünya nüfusunun % 3' ünü yani yaklaşık 170 milyon insanı enfekte etmektedir. Bu, HIV-1 ile enfekte olan insan sayısının 5 katı demektir. HCV, kronik

hepatit, karaciğer sirozu ve hepatoselüler karsinoma neden olur ve karaciğer nakillerinin sebeplerinden biridir.

Virüs, kan ve kan ürünleri, damar içi ilaç kullanımı gibi nedenler yoluyla bulaşır ve çevresel yüzeylerde 16 saatten fazla ve muhtemelen 4 güne kadar yaşayabildiği saptanmıştır (CDC FAQ).

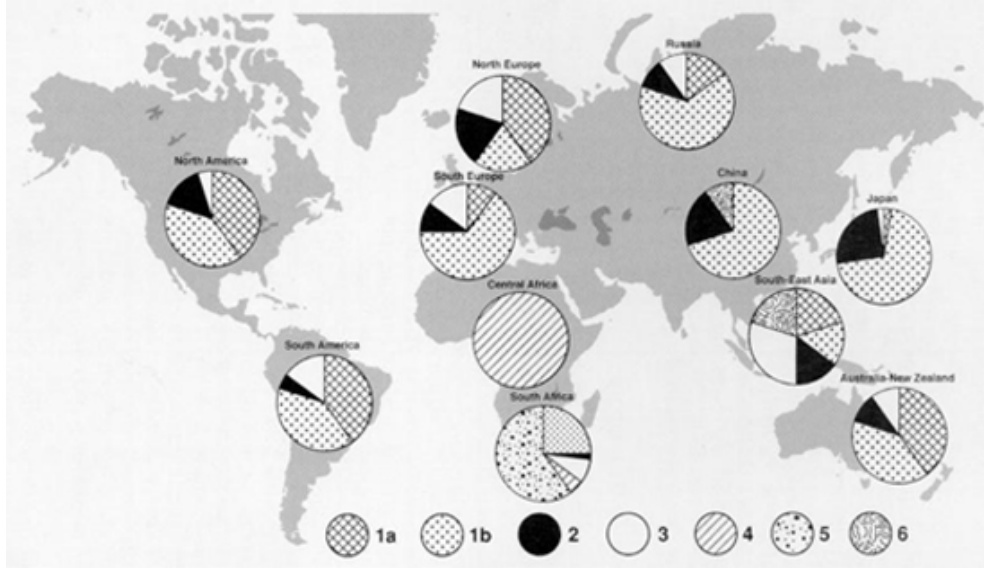
Dünya sağlık örgütünün verilerine göre Afrika HCV enfeksiyonunda en yüksek prevalansa sahiptir. Ardından doğu Akdeniz ve batı Pasifik bölgeleri gelmektedir. (Çizelge1.3.)

**Çizelge 1.3.** Dünyadaki HCV enfeksiyonu prevalansı. (Weekly Epidemiological Record No. 49 / Dec, 1999 / WHO )

WHO Bölgesi	Toplam Populasyon (Milyon)	Hepatit C Prevalansı (Oran %)	Enfekte Populasyon (Milyon)	Veri Toplanamayan Ülke Sayısı (WHO Bölgelerinden)
Afrika	602	5.3	31.9	12
Amerika	785	1.7	13.1	7
Doğu Akdeniz	466	4.6	21.3	7
Avrupa	858	1.03	8.9	19
Güney-Doğu Asya	1500	2.15	32.3	3
Batı Pasifik	1600	3.9	62.2	11
Toplam	5811	3.1	169.7	59

### 1.2.3. HCV Genotiplerinin Dağılımı:

Batı dünyasındaki HCV hastalarının çoğunluğu genotip 1'i oluştururken ardından genotip 2 ve 3 gelir. Genotip 4 ve 5 Afrika'da, genotip 6 ise Asya'da ortaya çıkar. Türkiye'nin genotipi 1b olarak tespit edilmiştir.



**Resim 1.4.** HCV genotipleri ve dünya genelinde dağılımı.

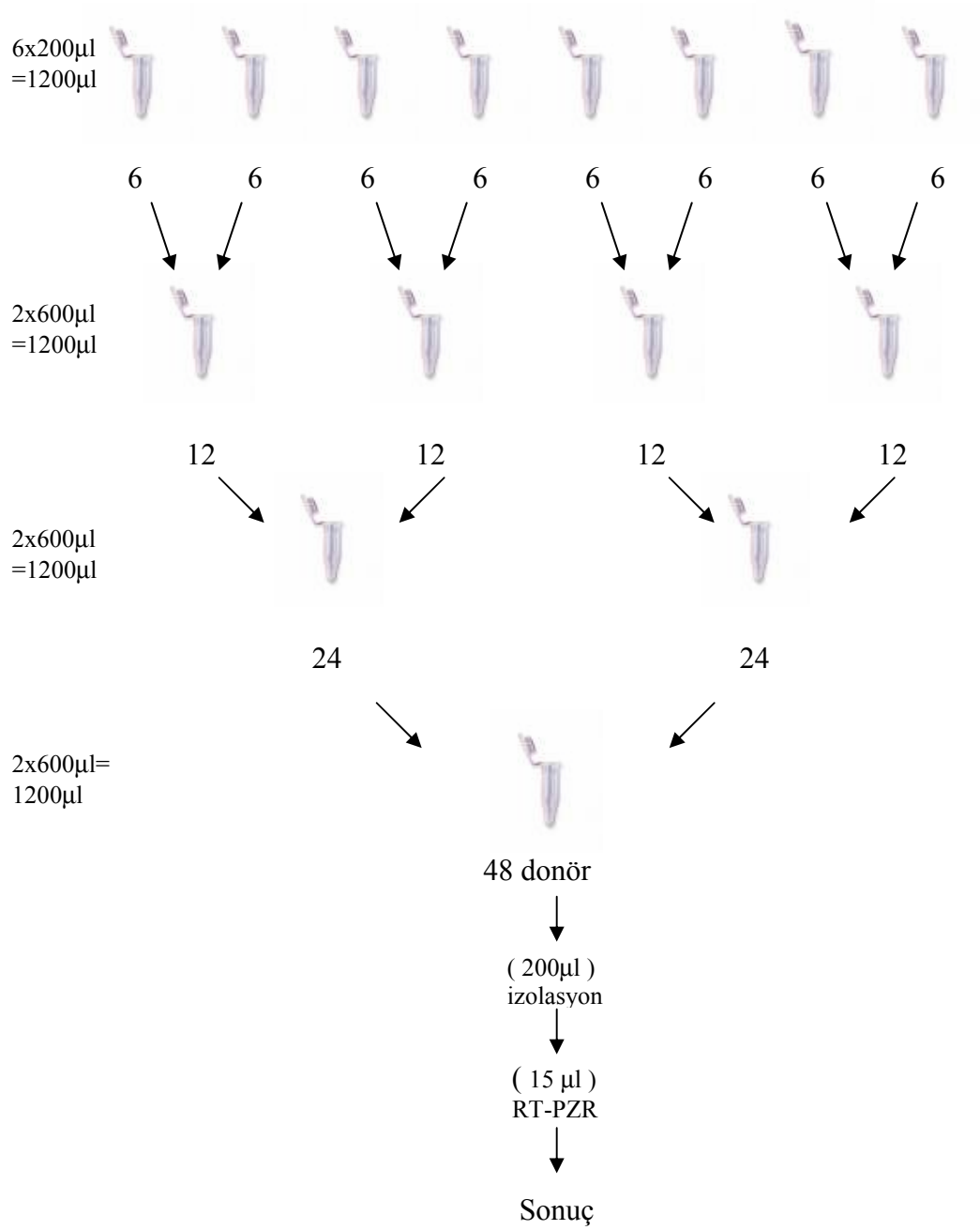
### 1.3. Çalışmanın Amacı

Bu çalışmada; kan merkezlerinde yapılan serolojik testlerin HCV'nin bulaş riskini ne kadar ortadan kaldırdığını görebilmek için geniş bir aralıktaki donör grubunda Realtime-PCR uygulayarak, transfüzyon için fizik muayenede uygun bulunan donörler içinde olası HCV RNA varlığının araştırılması, yani başka bir deyişle pencere döneminin incelenmesi hedeflenmiştir.

## 2. GEREÇ VE YÖNTEM

### 2.1. Serumların Havuzlanması

Bu işlem için A.Ü. İbn-i Sina Hastanesi Kan Merkezi'nde fizik muayeneden geçen ve "kan verebilir" onayı alan tam kan ve trombosit vericilerinden elde edilen serumlar, rutin serolojik testlerin çalışılmasından hemen sonra vidalı kapaklı kuru tüplerde -80 °C'de saklanmıştır. Tüm serolojik testler (anti-HCV, anti-HIV, HBsAg, sifiliz) bakımından negatif olduğu belirlenen 6000 adet serum çalışmaya alınmıştır. Bu örnekler oda sıcaklığında çözülerek 48'erli havuzlar halinde ayrılmış olup her bir 48'lik havuzu oluşturmak için 8 adet 6 ayrı donasyonu içeren serum bir araya getirilmiştir. Bu 6'lı havuzlardan ikişer tanesi bir araya getirilip 12'li 4 havuz, bunlar da bir araya getirilip 24'lü 2 havuz elde edildikten sonra bu havuz finalde çalışmaya alınacak olan 48'li havuzu oluşturmak üzere bir araya getirilmiş ve sonuçta 125 adet 48'lik serum havuzları elde edilmiştir (Şekil 1.6.). Her bir serum ve yapılan her bir havuz çok iyi vorteksenerek RNA elde etme işlemi öncesinde -20 °C'de saklanmıştır. Havuzlama işlemi temiz bir kabin içinde steril malzemeler kullanılarak yapılmıştır.



Şekil 1.6. Serumların havuzlanması.

## 2.2. Havuzlanan Serumdan HCV RNA İzolasyonu

Serumdan HCV RNA izolasyonu yapmak için Roche High Pure Viral RNA Kit kullanıldı.

- 1) Her 24 adet havuz için 10 ml bağlanma tamponu içine 100 µl poly A eklenip karıştırıldı. Her bir ependorf tüpüne 400 µl karışımdan konuldu.
- 2) Çok iyi vortekslenen serumlardan 200 µl bu karışıma eklendi.
- 3) 10 dk oda ısısında bekletilen serumlar quick spin yapılarak kit içinden çıkan filtreli tüplere aktarıldı.
- 4) Soğutmalı santrifüjde 105 rpm'de 1 dk santrifügasyondan sonra altta kalan sıvı uzaklaştırıldı.
- 5) 500 µl inhibitör uzaklaştırma tamponu eklenerek santrifügasyon basamağı uygulandı.
- 6) 450 µl yıkama tamponu eklenerek santrifügasyon basamağı uygulandı. Bu işlem 2 kere tekrar edildi.
- 7) Kalan alkolün uzaklaştırılması amacıyla 150 rpm'de 10 s boş santrifügasyon yapıldı.
- 8) Temiz ependorf tüplerine bu filtreli tüpler yerleştirilerek 50 µl elüsyon tamponu eklenerek santrifügasyon basamağı uygulandı.
- 9) Elüsyon tamponu içinde olası viral RNA'ların izolasyonu gerçekleşmiş oldu.

## 2.3. Real – time PZR

Real – time PZR için Roche Light cycler cihazı ile “Light Cycler RNA Master Hybridization Probes” kullanıldı.

Light Cycler RNA Master Hybridization Probes içeriği: (3 x 250 µl) Tth DNA polimeraz, reaksiyon tamponu ve dNTP karışımıdır.

H <sub>2</sub> O.....	2,2 µl
Mangan .....	1,3 µl.....25mM
HCV primer 1 (forward)....	1,0 µl.....10 pmol/µl
HCV primer 2 (reverse)....	1,0 µl.....10 pmol/µl
Prob 1.....	1,0 µl.....5 pmol/µl

Prob 2.....1,0 µl.....5 pmol/µl

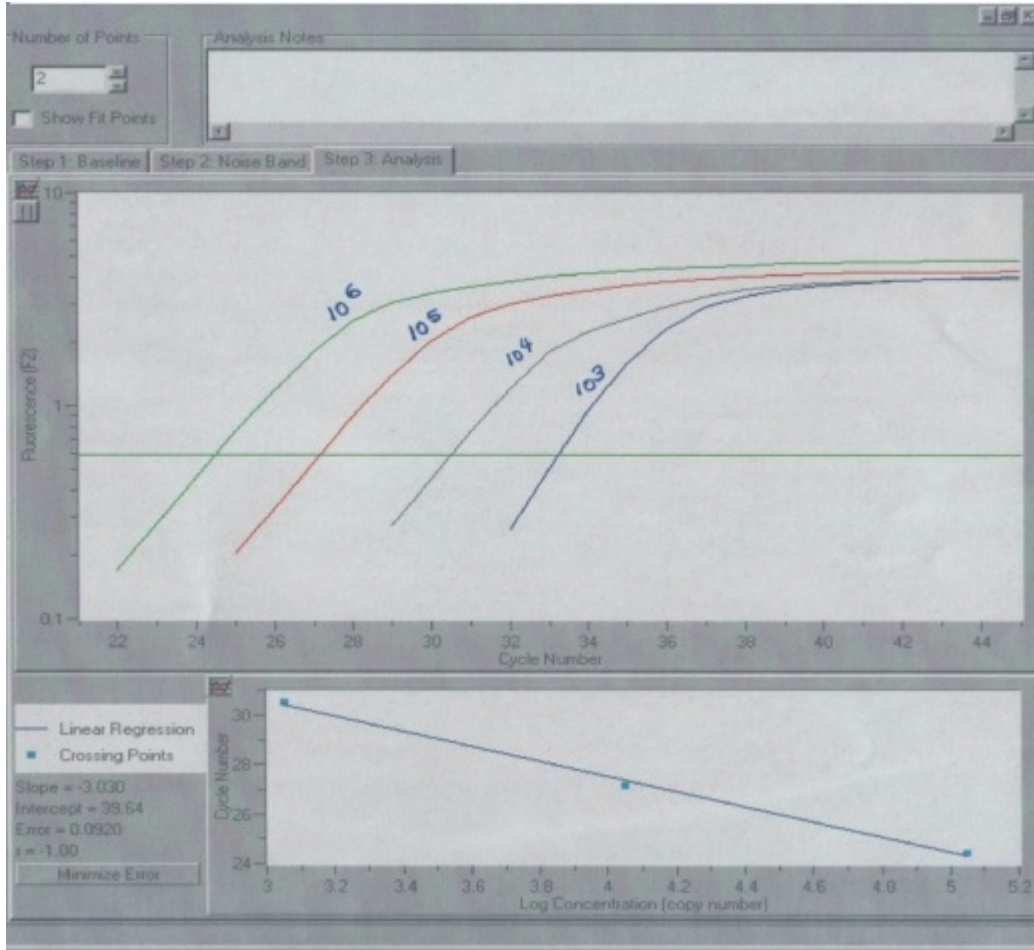
Master mix.....7,5 µl

Bu karışımdan her tüpe 15'er µl pipetlendikten sonra izolasyonu yapılmış olan RNA'lardan 5'er µl eklenerek her tüpte 20 µl olacak şekilde karışım hazırlandı. Light cycler cihazına yerleştirilmek üzere kılcal tüplere aktarıldı ve quick spin yapıldı. PZR işlemi için döngü ve süreler şu şekilde uygulandı:

61 °C	20 dk	ters transkripsiyon	
95 °C	2 dk	denatürasyon	
95 °C	0 dk		} amplifikasyon 40 döngü
55 °C'den 50 °C'ye	touch down	PZR	
72°C	13 s		
40°C	30 s	soğutma	

### 3.BULGULAR

6000 adet kan vericisinden toplanmış olan serumlar 125 havuzda toplanarak RT-PZR çalışıldı. Kontrol serumları olarak  $10^6$ ,  $10^5$ ,  $10^4$  ve  $10^3$  kopya / ml HCV RNA pozitif serumlar kullanılmıştır. Kontrol serumları beklenen döngülerde amplifikasyonlarını gerçekleştirmiştir (Şekil1.7.). Yapılan çalışma  $10^3$  kopya / ml hassasiyette olup, bu koşullar altında çalışılan 125 adet havuzun hiç birinde HCV RNA pozitifliğine rastlanmamıştır.



Şekil 1.7. Realtime-PZR’de kontrol serumlarının sonuçları.

Havuzlarda pozitiflik saptanması halinde pozitif olan havuzun ilk 24’lük havuzu çalışılır ve bunda da pozitiflik bulunduğunda o havuzu oluşturan ilk 12’lik havuz çalışılır. Pozitif çıkarsa onu oluşturan 6’lık havuz çalışılıp eğer pozitifse o havuzun

tüm 8 donörü birden PZR çalışır ve pozitif olan donör saptanır. Negatif çıkan havuzlar elenerek, bir sonraki basamaktan dallara ayrılarak pozitif olan donör bulunana kadar takip edilir. Böylece son 8'li havuza ulaşıldığında o havuz içindeki 8 donör tek tek test edilip pozitif donör bulunur. Doğrulama yapılması ve kişinin doğru yönlendirilmesi açısından HCV RNA pozitif bulunan donör merkeze çağırılarak kendisinden alınan örnekten serolojik testler ( anti-HCV, HBsAg, anti- HIV ve sifiliz) ve HCV RNA çalışılır. Eğer pozitifliği doğrulanırsa genotip tayini de yapıp hastanın tedavisine başlanması için ilgili bölüme yönlendirilmesi yapılır.

#### 4. TARTIŞMA

Kan/kan ürünü transfüzyonu ile birçok hastanın hayatı kurtarılırken bir yandan da bu hastalara bazı virüslerin bulaştırılması söz konusu olmaktadır. Bunu engellemek amacıyla dünyadaki ve ülkemizdeki kan merkezlerinde, taranması yasalarca zorunlu olan üç tip virüs (HCV, HBV ve HIV) ve bir bakteri (*treponema pallidum*), alınan tüm kanlarda test edilmekte ve kanların bulaş açısından güvenli bir şekilde hastaya ulaştırılması sağlanmaktadır.

Bununla birlikte, sadece serolojik test yapmak bulaş riskini ortadan kaldırmamaktadır. Bu oran virüsün tipine göre değişiklik gösterse de, serolojik testi negatif olan bir donörde virüsün enfektif maddesi olan nükleik asidi (RNA ya da DNA) pozitif olabilmekte ve bu da kan ve/veya kan ürünüden bulaş olmasına sebebiyet verebilmektedir. Hastaya güvenli, en az risk taşıyan ürünün kullanılması açısından bu durumun da göz önünde bulundurulması oldukça önemlidir.

Kuzey Amerika'da 16-24 donörlük havuzlar kullanılmakta ve GenProbe ve Ampliscreen ile çalışılmaktadır. 1999 yılından itibaren toplam 29 milyon donasyonda 113 HCV RNA pozitif, anti-HCV negatif (1:259 000) donasyon bildirilmiştir.

Almanya'da (Transfüzyon Tıbbı ve İmmünehematoloji Enstitüsü, Frankfurt) 96 donörlük havuzlar kullanılmış ve HCV için Roche Amplicor ile çalışılarak 1997-2000 yılları içinde 1 087 000 donasyon test edilmiştir. Bunların içinden 2 donörün HCV RNA pozitif, anti-HCV negatif (1:543 500) olduğu bildirilmiştir.

Japon Kızılhaç NAT Tarama Araştırma Grubu, Şubat 2000-Nisan 2001 döneminde 50 donörlük havuzlardan Multiplex HCV/HBV/HIV reaktifleri ile çalışmış ve çalışmasında tüm serolojik pozitif vakaları çalışma dışı tuttuğunu belirtmiştir. 6 805 010 donasyon içinde 25 donörün (1:272 200) HCV RNA pozitif, anti-HCV negatif olduğu bildirilmiştir.

İspanya'da Temmuz 1999-Haziran 2001 arasında COBAS Ampliscreen HCV v2.0 ile yapılan çalışmada 22-48'lik havuzlar kullanılmış, 1 015 482 donasyon içinden 3 HCV RNA pozitif, anti-HCV negatif donasyon tespit edilmiştir (1:338 494).

Bu ülkeler gibi birçok ülke NAT çalışmalarını hızla sürdürmekte ve güvenli kan ve kan ürünleri kullanımı için gerekli önlemleri almaktadır. Öyle ki; gelecekteki beklentiler, havuz yerine tek donasyon-NAT yönünde ilerlemektedir. Ülkemizde bu

konuda ulaşılabilecek güvenilir veriler bulunmadığı gibi konu hakkında yapılmış yayınlara ulaşmak da mümkün olmamıştır.

Bu alışmada Ağustos 2004-şubat 2005 dönemine ait 6 aylık süreçte, uygun koşullarda saklanan 6000 adet tam kan ve trombosit donasyonuna ait örneklerden 48'lik havuzlar oluşturularak RT-PZR yöntemi ile HCV RNA pozitif, anti-HCV negatif donasyon olasılığı araştırılmış ve bütün havuzlarda negatif sonuç elde edilmiştir. Diğer ülkelerle karşılaştırıldığında; çalışmada kullanılan örnek sayısı oldukça az olup elde edilen sonuç beklenti dahilinde görülmektedir. Ne var ki; ülkemizde bu konu kapsamında bildirilmiş yeterli çalışma bulunmadığından bu çalışmanın geliştirilmesi ve HCV'ye ek olarak diğer virüslerin de çalışma kapsamına dahil edilmesi, gelişmiş dünya ülkelerinde olduğu gibi bizim de hastalarımıza güvenli kan ve kan ürünlerinin kullanımını sağlayabilmemiz açısından oldukça önemlidir. Bu çalışmada kullanılan yöntem, araştırma ve veri sağlama amaçlı olup rutin uygulama kapsamı dışındadır. Rutinde uygulanmak üzere seçilecek olan yöntem FDA ve WHO'nun belirlediği standardizasyonlara uygun olacak şekilde belirlenmeli ve tabii ki maliyet analizi doğru yapılmalıdır.

## 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Kan merkezi rutin taramalarında anti-HCV, anti-HIV, HBsAg ve sifiliz testleri negatif bulunan 6000 tam kan ve trombosit vericisinin serumları 48'lik havuzlar haline getirilip, oluşturulan bu 125 adet havuza RT-PZR yöntemi uygulanmıştır.

Realtime PZR ile  $10^3$  kopya/ml hassasiyetinde çalışılmış olup HCV RNA pozitif vericiye rastlanmamıştır. Başka bir deyişle, bu 6000 vericiden hiç biri Hepatit C Virüsünü temel olarak pencere döneminde bulaştırma riski taşımamaktadır.

Ülkemizde yapılan çalışmalarda, bu ölçüde yapılmış başka bir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmanın hem HCV hem de diğer virüsler (HIV, HBV) açısından daha çok sayıda tam kan ve trombosit vericisiyle geliştirilmesi, güvenli kan transfüzyonunun yapılabilmesi adına önemlidir.

## ÖZET

### ANTI-HCV TARAMASI YAPILMIŞ OLAN KAN VERİCİLERİNDE RT-PZR İLE HCV RNA TARAMA ÇALIŞMASI

Bu çalışmada amaç, geniş bir aralıktaki donör grubunda RT-PZR uygulayarak olası HCV RNA pozitif anti-HCV negatif donasyon varlığını tespit etmektir.

Kan ve kan ürünü transfüzyonu ile birçok hastanın hayatı kurtarılırken bir yandan da bu hastalara bazı virüslerin bulaştırılması söz konusudur. Gelişen teknolojiyle birlikte kan bankacılığında ileri tetkiklerinin kullanılmaya başlanması, nükleik asit amplifikasyon testi (NAT) teknolojisini bu alanda dünya üzerinde giderek yaygınlaşan bir tetkik haline gelmiştir. Hepatit C Virüsü (HCV) , tedavisi en zor olan hastalıklardan C tipi sarılığa neden olmakta ve bu hastalığa yakalananlarda karaciğer hasarı, karaciğer sirozu ve sonunda kanser ve ölüme kadar gidebilen bir seyir görülmektedir. NAT hepatit C virüsünün (HCV) pencere dönemini yaklaşık 41 gün kısalttığından dolayı kan vericilerinde bu yöntem uygulanarak daha güvenli kan transfüzyonun yapılması sağlanabilir.

Tüm serolojik testler bakımından negatif olduğu belirlenen 6000 adet serumdan 48'erli 125 adet havuz oluşturulup HCV RNA izolasyonu ve RT-PCR yöntemi uyguladı.

Kontrol serumları olarak  $10^6$ ,  $10^5$ ,  $10^4$  ve  $10^3$  kopya / ml HCV RNA pozitif serumlar kullanıldı. Kontrol serumları beklenen döngülerde amplifikasyonlarını gerçekleştirdi. Yapılan çalışma  $10^3$  kopya / ml hassasiyette olup, bu koşullar altında çalışılan 125 adet havuzun hiç birinde HCV RNA pozitifliğine rastlanmadı.

Havuzlanarak çalışılan 6000 vericiden hiç birinin hepatit C virüsünü pencere döneminde bulaştırma riski taşımadığı gösterilmiştir. Ülkemizde yapılan çalışmalarda, bu ölçüde yapılmış başka bir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmanın hem HCV hem de diğer virüsler (HIV, HBV) açısından daha çok sayıda tam kan ve trombosit vericisiyle geliştirilmesi, güvenli kan transfüzyonun yapılabilmesi adına önemlidir.

**Anahtar Sözcükler:** Nükleik asit amplifikasyon testi, hepatit c virüsü, kan vericileri, HCV RNA, RT-PZR

## SUMMARY

### **STUDY OF HCV RNA SCREENING BY RT-PCR IN ANTI-HCV SCREENED BLOOD DONORS OF BLOOD BANK.**

Our purpose in this study is to detect HCV RNA positive, anti-HCV negative donations that may exist in a number of donors by RT-PCR.

Many patients survive by transfusion of blood and blood products but the fact remains that these patients can be infected by some viruses during transfusions. As the technology develops, the use of nucleic acid amplification test (NAT) technology is increasing over the world by applying these assays.

Hepatitis C Virus (HCV) is a leading cause of liver failure, liver cirrhosis, hepatocellular carcinoma and perhaps death. Because NAT shortens the window period of HCV approximately for 41 days, applying this assay to blood donors should provide the safety of transfusions.

6000 blood donors whose serological tests were known as negative, were collected in 48-donor pools and totally 125 pool were applied HCV RNA isolation and RT-PCR. As control sera  $10^6$ ,  $10^5$ ,  $10^4$  and  $10^3$  copy/ml of HCV RNA positive sera were used. Control sera generated amplification cycles as anticipated. The sensitivity of the assay was  $10^3$  copy/ml and none of the 125 pools met the HCV RNA positive criteria. It was shown that none of the 6000 donors that were pooled have a risk of HCV in the window period.

In our country, no previous study has been made in this size. It's important to develop this study with both HCV, and other viruses (HIV, HBV) and with a large number of whole blood and platelet donors for safety of blood transfusion.

**Key words:** Nucleic acid amplification test, hepatitis c virus, blood donors, HCV RNA, RT-PCR.

## KAYNAKLAR

ALLAIN, J.-P. (2000). Genomic screening for blood-borne viruses in transfusion settings. *Clin. Lab. Haem.* 22, 1–10

ALTER, M.J., DODD, R.Y., ORTON, S.L., STRAMER, S.L. (2001). Risk factors for HCV infection among blood donors confirmed to be positive for the presence of HCV RNA and not reactive for the presence of anti-HCV. *Transfusion*, 44:275-281.

AUBUCHON, J.P., BIRKMEYER, J.D., BUSCH, M.P. (1997) Safety of the blood supply in the United States: opportunitites and controversies. *Ann Int Med*, 127:904-909.

BLAJCHMAN MA. IN HILLYER C ED. (1999). The Safety of the Blood Supply. *Baxter Healthcare Corp.* Deerfield IL

BOVENHORST, M., JONGERIUS, J.M., KROES, A.C.M., SCHUURMAN, R., VAN DER DOES, J.A., VAN HILTEN, J.A., VAN LEEUWEN, E.F., VAN DER POEL, C.L. (2000). Evaluation of automated nucleic acid extraction devices for application in HCV NAT. *Transfusion*, 40:871-874.

BUSCH, M.P., CAGLIOTI, S., GLYNN, S.A., KLEINMAN, S.H., PAPPALARDO, B., STRAMER, S.L., STRONG, D.M., WRIGHT, D.J. (2005). A new strategy for stimating risks of transfusion-transmitted viral infections based on rates of detection of recently infected donors. *Transfusion*, 45:254-264.

BUSCH, M.P., FANG, C.T., HAESCHE, C.H., LEPARC, G., PHELPS, B., TOBLER, L.H. (2003). Fluctuation of HCV viral load before seroconversion in a healthy volunteer blood donor. *Transfusion*, 43:541-544.

BUSCH, M.P., KLEINMAN, S.H. (2000). Nucleic acid amplification testing of blood donors for transfusion-transmitted infectious diseases. Report of the Interorganizational Task Force on Nucleic Acid Amplification Testing of Blood Donors. *Transfusion*. 40:143-159.

BUSCH, M.P., STRAMER, S.L., KLEINMAN, S.H. (1997). Evolving applications of nucleic acid amplification assays for prevention of virus transmission by blood components and derivatives. In: Garratty G, ed. Application of molecular biology to blood transfusion medicine. *Bethesda: American Association of Blood Banks*, 123-76.

CARDOSO, M.S., KOERNER, K., KUBANEK, B. (1998). Mini-pool screening by nucleic acid testing for hepatitis B virus, hepatitis C virus, and HIV: preliminary results. *Transfusion*, 38:905-907.

CDC FAQ: <http://www.cdc.gov/ncidod/diseases/hepatitis/c/faq.htm>

CHAMBERLAND, M., ( 2001). Emerging infectious disease issues in blood safety. *Emerg Infect Dis*, 7:552-3.

EIRAS, A., FRANCO, E., HERNANDEZ, J.M., IBARRA, A., MONTORO, J.A., PLANELLES, D., SAULEDA, S., SEDENO, M., VESGA, M.A., VILLAESCUSA, R.G. (2003). HCV screening in blood donations using RT-PCR in mini-pool: the experiance in Spain after routine use for 2 years. *Transfusion*, 43:713-720.

FORNS, X., BUKH, J. (1999). The Molecular Biology of Hepatitis C Virus: Genotypes and Quasispecies. *Clinics in Liver Disease*, 3.

GESSONI, G., BARIN, P., VALVERDE, S., GIACOMINI, A., Di NATALE, C., ORLANDINI, E., ARREGHINI, N., De FUSCO, G., FRIGATO, A., FEZZI, M., ANTICO, F., MARCHIORI, G. (2004) Biological qualification of blood units Considerations about the effects of sample's handling and storage on stability of nucleic acids.. *Transfusion and Apheresis Science*, 30:197–203.

GLYNN, S. A., WRIGHT, D.J., KLEINMAN, S.H., HIRSCHKORN, D., TU, Y., HELDEBRANT, C., SMITH, R., GIACHETTI, C., GALLARDA, J., BUSCH, M.P., (2005). Dynamics of viremia in early hepatitis C virus infection. *Transfusion*, 45:994-1002.

HARTWIG, D., HENNIG, H., KIRCHNER, H., KLUTER, H., LUHM, J. (2001). A novel RT-PCR for reliable and rapid HCV RNA screening of blood donations. *Transfusion*, 41:1100-1106.

HEWLETT, I.K., EPSTEIN, J.S. (1997). Food and Drug Administration conference on the feasibility of genetic technology to close the HIV window in donor screening. *Transfusion*, 37:346-51.

HITZLER, W.E., RUNKEL, S. (2001). Routine HCV PCR screening of blood donations to identify early HCV infection in blood donors lacking antibodies to HCV. *Transfusion*, 41:333-337.

KELLER, A.J., KIELY, P., SEED, C.R. (2005). Residual risk of transfusion transmitted human immunodeficiency virus, hepatitis B virus, hepatitis C virus and human T lymphotropic virus. *Internal Medicine Journal*, 35: 592–598.

LEFRERE, J.J., COSTE, J., DEFER, C. (1998). Screening blood donations for viral genomes: multicenter study of real-time simulation using pooled samples on the model of hepatitis C virus RNA detection. *Transfusion*, 38:915-923.

LIVER FOUNDATION. <http://www.liverfoundation.org/db/articles/1028>

MARSHALL, D. A., KLEINMAN, S. H., WONG, J. B., AUBUCHON, J. P., GRIMA, D. T., KULIN, N. A., WEINSTEIN, M. C. (2004). Cost-effectiveness of nucleic acid test screening of volunteer blood donations for hepatitis B, hepatitis C and human immunodeficiency virus in the United States. *Vox Sanguinis*, 86, 28–40.

MCCULLOUGH, J., BIANCO C., BUSCH, M.P. (1998). Interagency Genome Amplification Testing Task Force: preliminary report. *Transfusion*, 38:903-904.

MORADPOUR, D., BLUM, H.E. (2004). A primer on the molecular virology of hepatitis C. *Liver International* 24: 519-525.

MORADPOUR, D., CERNY, A., HEIM, M.H., BLUM, H.E. (2001). Hepatitis C: an update. *Swiss Medical Weekly* 131: 231-298.

RAY, P.S., DAS, S. (2004). Inhibition of hepatitis C virus IRES-mediated translation by small RNAs analogous to stem-loop structures of the 5'-untranslated region. *Nucleic Acids Research*, 32: 1678-1687.

REGAN, F.A.M., HEWITT, P., BARABARA, J.A.J. (2000). Contreras M.on behalf of the current TTI Study Group Prospective investigation of transfusion in transmitted infection in recipients of over 20000 units of blood, *Br Med J*, **320**:403-406.

ROTH, W.K., SEIFRIED, E. (2001). Yield and future issues of nucleic acid testing. *Transfus Clin Biol*, **8** : 282-4

ROTH, W.K., SEIFRIED, E. (June 2001). (letter )Reducing the residual risk of transfusiontransmitted viruses: mini-pool or singledonation NAT?. *Transfusion*, **41**: 845-846.

SALDANHA, J. (2001). Validation and standardisation of nucleic acid amplification technology (NAT) assays for the detection of viral contamination of blood and blood products. *Journal of Clinical Virology*, **20**:7–13.

SEED, C. R., KIELY, P., KELLER, A. J.(2005). Residual risk of transfusion transmitted human immunodeficiency virus, hepatitis B virus, hepatitis C virus and human T lymphotropic virus. *Internal Medicine Journal*, **35**: 592–598.

STRAMER, S.L., (2000). NAT of the United States and Canadian blood supply. *Transfusion*, **40**:1165-8.

ORTON, S.L., STRAMER, S.L., DODD, R.Y., ALTER, M.J. (2004). Risk factors for HCV infection among blood donors confirmed to be positive for the presence of HCV RNA and not reactive for the presence of anti-HCV. *Transfusion*; **44**:275-281.

PENIN, F., DUBUISSON, J., REY, F.A., MORADPOUR, D., PAWLOTSKY, J. (2004). Structural Biology of Hepatitis C Virus. *Hepatology* **39**: 5-19.

THOMSON, B. J., FINCH, R..G.(2005) Hepatitis C virus infection. *Clin Microbiol Infect* , **11**: 86–94.

TOSTI, M.E. (2002). An estimate of the current risk of transmitting blood-borne infections through blood transfusion in Italy. *Br J Haemat*, **117**:215-219.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) (1999). Weekly Epidemiological Record No. 49, December.

YERLY, S., PEDROCCHI, M., PERRIN, L. (1998). The use of polymerase chain reaction in plasma pools for the concomitant detection of hepatitis C virus and HIV type 1 RNA. *Transfusion*, **38**:908-914.

## ÖZGEÇMİŞ

### I- Bireysel Bilgiler:

Adı Burcu  
Soyadı Çuhadar  
Doğum Yeri ve Tarihi Ankara-12.02.1979  
Uyruğu Türkiye Cumhuriyeti  
Medeni Durumu Bekar  
İletişim Adresi ve Telefonu Başkent Bulvarı Oleyis-1 A/4 NO:8 06370  
Batıkent/ANKARA- 05357018823

### II- Eğitim:

Yüksek lisans: A.Ü. Tıp Fakültesi, Hepatoloji A.B.D, ANKARA. 2006  
Lisans: Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü, ANKARA. 1997  
Yabancı Dil: İngilizce

### III- Mesleki Deneyim:

A.Ü. İbn-i Sina Hastanesi Kan Merkezi Eliza Laboratuvarı 2002-2006  
Mikroeliza cihazı ile kan donörleri serolojik testleri  
Kan ürünleri kalite kontrol stok giriş  
A.Ü. İbn-i Sina Hastanesi Merkez Laboratuvarı 2006  
Makroeliza cihazıyla kan donörleri serolojik testleri  
HCV RIBA anti-HCV doğrulama testi  
HCV RNA izolasyon ve RT-PCR çalışmaları

### IV- Katıldığı Kurs ve Sertifika:

Sağlık Bakanlığı Kan Bankacılığı Uygulamaları Eğitim Sertifikası

### V- Seminerler:

Primer Tasarımı  
Hepatit C Virüsünün Moleküler Biyolojisi