

23947

T.C.  
GAZİ ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
ENFEKSİYON HASTALIKLARI  
VE KLİNİK MİKROBİYOLOJİ  
ANABİLİM DALI

**HBsAg TARAMASINDA KULLANILAN ELİSA VE  
RPHA'NUN DUYARLILIKLARININ KIYASLANMASI VE  
RPHA TESTİNİN DUYARLILIĞINI ARTIRMA DENEMELERİ**

**T. C.  
Yükseköğretim Kurulu  
Dokümantasyon Merkezi**

**(UZMANLIK TEZİ)**

ENFEKSİYON HASTALIKLARI VE KLİNİK  
MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI  
ARAŞTIRMA GÖREVLİSİ  
**Dr. Esin ŞENOL**

**T. C.  
Yükseköğretim Kurulu  
Dokümantasyon Merkezi**

ANKARA-1992

## **ÖNSÖZ**

Bu araştırmanın yürütülmesinde ve eğitimim süresince yardımlarını esirgemeyen ve bana destek olan değerli hocam Prof. Dr. Kâzım Kurtar'a, hocalarım Doç. Dr. Fatma Ulutan ve Doç. Dr. Firdevs Aktaş'a, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Doç. Dr. Nedim Sultan'a, tezimin istatistikleri konusunda değerli katkı ve destekleri için Prof. Dr. Mehmet Ali Bumin'e teşekkürü borç bilirim.

**Dr. Esin ŞENOL**

## İÇİNDEKİLER

I. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
II. GENEL BİLGİLER .....	4
AKUT VİRAL HEPATİTLER.....	4
HEPATİT B VİRUSU.....	5
TARİHİ GELİŞİM.....	6
HEPATİT B VİRUS MORFOLOJİSİ.....	7
EPİDEMİYOLOJİ.....	10
HEPATİT B VİRUS ENFEKSİYONU.....	13
HEPATİT B'DE SEROLOJİK MARKERLAR VE ANLAMLARI.....	20
HBsAg TARAMADA KULLANILAN YÖNTEMLER.....	27
III. GEREÇ VE YÖNTEM.....	37
IV. BULGULAR.....	43
V. TARTIŞMA.....	52
VI. SONUÇ.....	63
VII. ÖZET	
A) TÜRKÇE ÖZET.....	65
B) İNGİLİZCE ÖZET.....	66
VIII. KAYNAKLAR.....	67

## GİRİŞ VE AMAÇ

1965 yılında Blumberg'in Avusturalya (Au) antijenini ve bu antijenin serum hepatiti ile olan ilişkisini ilk kez tanımlamasından sonra hepatit B virusu (HBV) ve antijenleri üzerindeki çalışmalar yoğunlaşmıştır. Hepatit B yüzey antijeni (HBsAg), Hepatit B "e" antijeni (HBeAg), Hepatit B çekirdek antijeni (HBcAg) ve antikoları tanımlanmıştır. İmmunolojik göstergeler bu denli fazla sayıda olmasına karşın, günlük uygulamada sıklıkla serumda yalnızca HBsAg aranarak tanıya gidilmektedir (1). HBsAg'nin rutin taranması, hepatit olgularının etyolojisini göstermek, kan vericilerini, renal diyaliz üniteleri gibi riskli bölgelerdeki hasta ve personeli, gebeleri taramak için uygulanmaktadır (2). Ayrıca portörlerin izlenmesi, prenatal bulaşı engelleme, aşı ve immunglobülin uygulamalarına karar verme ve epidemiyolojik çalışmalar için de HBsAg aranmaktadır.

Avusturalya antijeninin bulunuşundan bu yana, antijeni saptamada daha duyarlı yöntemlerin geliştirilmesine çalışılmıştır. Bu yöntemler duyarlılık ve özgüllük açısından birbirlerinden farklıdır (3). HBsAg aranmasında kullanılan yöntemler, duyarlılıklarına göre az, orta ve çok duyarlı olmak üzere üç grupta toplanmış ve birinci, ikinci ve üçüncü kuşak yöntemler olarak sınıflandırılmıştır (1,4,5,6). Birinci ve ikinci kuşak yöntemler duyarlılıkları az, yalancı pozitif ve negatif sonuçları fazla olan yöntemler olduklarından, günümüzde duyarlılıkları

fazla, yalancı negatif-pozitif sonuçları aza indirgenmiş üçüncü kuşak yöntemler kullanılmaktadır (5).

Üçüncü kuşak yöntemler; Enzime-linked immunosorbent assay (ELİSA), radyoimmunoassay (RIA) ve reverse pasif hemaglütinasyon (RPHA) testleridir. Bunlar arasında da duyarlılık ve özgüllük açısından farklılıklar vardır (7). Bu testler içinde en duyarlı kabul edilen RIA'dır (1,4,8,9,10). Ancak pahalı gereçlere gereksinim göstermektedir; tekniği güçtür ve sonuç vermek için uzun zaman gerekmektedir. Duyarlılık yönünden RIA'nın hemen arkasından ELİSA gelmekte, bunu da RPHA izlemektedir (1). ELİSA'nın RIA kadar duyarlı olması, stabil ayıraçlarının hazırlanması, radyoizotop riskini ortadan kaldırması RIA'ya üstünlükleridir. Ancak ELİSA'nın ticari kitleri pahalı olup, komplike, iyi teknik bilgi ve uzun zaman gerektiren bir yöntemdir.

RPHA, uygulama kolaylığı, ayıraçlarının ekonomik olması, pahalı gerece gereksinim göstermemesi, hızlı sonuç vermesi, ek olarak yurdumuzda uzun zamandır uygulanan bir yöntem olduğundan, özellikle kan bankası teknisyenlerince iyi bilinmesi gibi nedenlerden, bu testlere üstünlük sağlamaktadır; ancak RIA ve ELİSA'dan daha az duyarlıdır. Bu duyarlılık farkı, orta ve güçlü reaksiyonu olan serumlar için söz konusu olmamakla birlikte, zayıf reaksiyonlu serumlarda rölatif olarak duyarlılığı az kabul edilmektedir (7, 11).

Bu çalışmada, RPHA'nun özellikle yurdumuz koşulları için çok daha önemli olan avantajları düşünülerek, düşük miktarda antijeni yakalamada ELİSA'ya göre dezavantajını giderebilmek ve duyarlılığını ELİSA'ya yaklaştırabilmek amacıyla RPHA'nun klasik prensip ve yöntemi bozulmadan,

yalnızca kullanılan test serum örneği bir misli artırılmak suretiyle antijen konsantrasyonunun yükseltilmesi hedeflenmiş olup, yeni bir tarama yöntemi geliştirilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla ELİSA ile pozitif bulunan serumlar, önce RPHA ile taranıp, negatif bulunan serumlar, sözü edilen değişiklik uygulanarak bir kez daha test edilmiş ve yeni geliştirilen bu yöntemin RPHA'ya üstünlüğü olup olmadığı, ayrıca ELİSA ile duyarlılık farkı bulunup bulunmadığı kontrol edilmiştir.

Bu çalışmadaki temel amaç, ELİSA'nın kullanılmadığı merkezlerde, küçük laboratuvarlarda, hızlı sonuç verilmesi gereken kan bankalarında ve yurdumuz gerçekleri doğrultusunda, denenen bu yöntemle RPHA'nun rölatif duyarlılık eksikliğini ortadan kaldırarak, hızlı, kolay, ucuz ve duyarlılığı daha yüksek bir yöntemle ulaşılmasını sağlamaktır.

## GENEL BİLGİLER

### AKUT VİRAL HEPATİTLER

Akut viral hepatit, hepatotrop virusların (A,B,C,D,E hepatit virusları) primer olarak karaciğerde yaptıkları inflamasyon sonucu oluşan hepatosellüler harabiyete bağlı başlıca sarılık, halsizlik, bulantı, kusma gibi belirtilerle seyreden akut, sistemik bir enfeksiyondur.

**Tablo I.** Bilinen Hepatit Viruslarının Karakteristikleri (12).

Ajan	Virus Tipi	Perkütan Geçiş	Enterik Geçiş	İnkubasyon	Markerlar
A	Picornavirus	±	+++	10-50 gün	anti HAVIgM, Ig6
B	Hepadnavirus	+++	±	40-180 gün	HBsAg, anti HBs anti HBcIgM,Ig6 HBeAg, anti HBe
C	?Togavirus ? Flavivirus	+++	?	20-180 gün	anti-HCV
D	Viroid (HBV'ye gereksinim vardır)	+++	-	40-180 gün	HDAg, anti-HD
E	Calcivirus	?	+++	15-60 gün	anti-HEV.

Hepatotrop viruslar dışında, Epstein-Barr virusu, Cytomegalo virus (CMV), Herpes simplex, Coxsackie B, Echo, sarı humma, kızamık, kızamıkçık, kabakulak virusları da hepatite neden olabilir.

## HEPATİT B VİRUSU

Hepatit B virusu (HBV) küçük bir DNA virusudur. On yıl öncesine kadar herhangi bir virus ailesine girmediği ve tek bir virus olduğu düşünülmekte idi. Son zamanlarda Amerika'nın doğusundaki dağ sıçanlarında, California'da yer sincaplarında, Çin ve Amerika'daki Pekin ördeklerinde benzer viruslar bulunmuştur (13, 14, 15, 16). Bu viruslar Hepadnaviridae denilen yeni bir virus ailesini oluşturmaktadır. Ortak olan özellikleri DNA yapıları (çok küçük, sirküler, kısmen tek sarmal olan, çift sarmal DNA), replikasyon mekanizmaları, virionlarda reverse transkriptaz özelliği bulunan bir enzimin varlığıdır. Önemli biyolojik özellikleri hepatositlere olan güçlü tropizmaları ve kanda aylarca hatta yıllarca devamlılığını sürdürebilen komplet ve inkomplet viral formlardan oluşan yüksek antijen konsantrasyonları ile persistan (sürengen) enfeksiyona yol açabilmeleridir (14).

Önceleri, HBV'nun enfekte ettiği tek hücre tipi hepatositler olarak bilinmekte idi. Ancak bazı hastaların pankreatik salgısında da HBsAg bulunmuştur (14, 17, 18). Ayrıca ışık mikroskopu ile insan pankreasında HBV antijenleri gösterilmiştir (19). Bunun dışında dolaşımdaki bazı lökositlerde HBV DNA'sı bulunmuştur (14, 17). Pankreatik hücreler ve lökositler, HBV ile enfekte olabilmekte ve sınırlı derecede HBV replikasyonu görülebilmektedir; ancak HBV'nun en sık tuttuğu organ karaciğerdir ve replikasyonu için en elverişli hücreler hepatositlerdir.



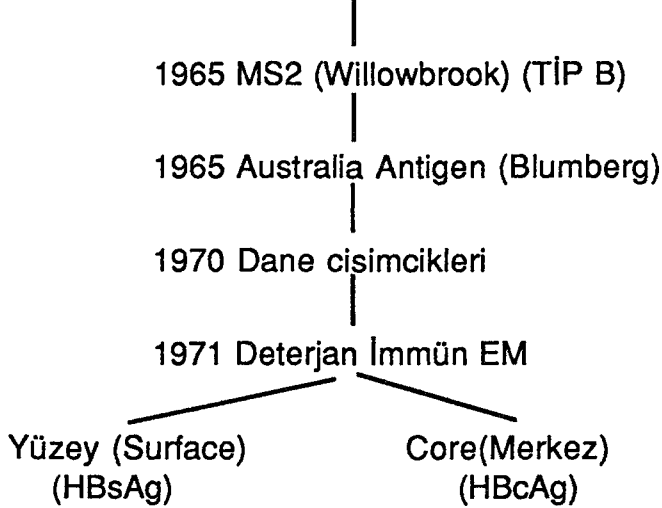
## TARİHİ GELİŞİM

Serum hepatiti ile ilgili ilk salgın 1833 yılında çiçek aşısı uygulanan bir gemi çalışanlarında görülmüştür. En büyük salgın ise 1942 yılında sarı humma için aşılanan genç Amerikalı askerler arasında görülmüştür (20, 21, 22, 23). Serum hepatitini, enfeksiyöz hepatitten ayıran antijenik ve biyolojik farklılıklar 1940 ve 1950'lere kadar tam olarak bilinmiyordu. Hepatit hakkındaki en büyük gelişme 1965'te genetikçi Baruch S. Blumberg'in Avusturalya (Au) antijenini bulması ile olmuştur. Böylece transfüzyon sonrası ortaya çıkan hepatit, Hepatit B olarak adlandırılmıştır. Avusturalya antijeni bulunan serumda Dane ve arkadaşları, elektronmikroskopla büyük yuvarlak partikülü gördüler (1970), bu da muhtemelen virusun kendisi idi (21).

Bundan sonra en büyük gelişme 1971'de olmuştur. June Almedia ve ark.ları, Dane partiküllerine deterjan ekleyerek, immunelektron mikroskopunda yüzeyde bir madde ve birde merkezde yuvarlak kısım ayırdılar.

Yüzey partiküllerinin (HBsAg) Avusturalya antijeninin kendisi olduğu ve tek başına enfeksiyöz olmadığı anlaşılmıştır.

**Tablo II-** Hepatit B de önemli evreler (24)



Hepatit B virusu ile ilgili, viral hepatit komitesi ve dünya sağlık örgütünün önerdiği kısaltmalar Tablo III'de görölmektedir.

**Tablo III-** Hepatit B Virusunu, Komponent ve Antikorlarına Ait Standart Kısaltmalar (25)

---

HBV: Hepatit B Virusu

HBsAg: Hepatit B yüzey antijeni

"s" kısaltması, surface-yüzey kelimesinden gelmektedir.

HBcAg: Hepatit B çekirdek antijeni.

"c" kısaltması, core-çekirdek, iç bölüm kelimesinden gelmektedir.

HBeAg: Hepatit B virusuna ait "e" antijeni

Anti-HBs: HBsAg'ye karşı oluşmuş antikor.

Anti-HBc: HBc Ag'ye karşı oluşmuş antikor

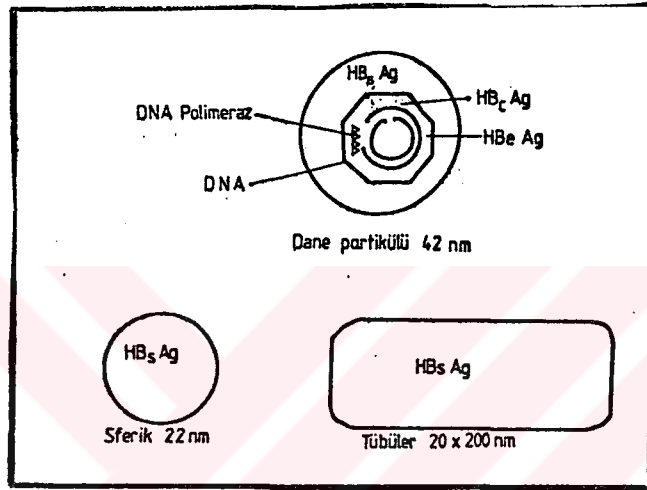
Anti-HBe: HBe Ag'ye karşı oluşmuş antikor.

---

### HEPATİT B VİRUS MORFOLOJİSİ

HBsAg. içeren serumlar elektron mikroskopunda incelendiklerinde üç değişik yapı görölmüştür. Bunlardan çoğunlukta olanı 22 nm çapındaki küçük sferik, pleomorfik partiküllerdir, bir de aynı çapta fakat uzunlukları 200 nm. ve daha fazla olabilen tübüler ve filamantöz oluşumlar vardır. Her ikisinden daha seyrek olarak karşımıza çıkan üçüncü tip oluşumlar ise 42 nm. çapındaki sferik partiküller olup, bu sonuncular genellikle "Dane" partikülü adı ile anılmaktadırlar (25, 26, 27, 28).

Dane partikülü, DNA içeren 27 nm. çapında bir iç çekirdek (core) ve bunu çevreleyen 15-25 nm. kalınlığında bir zarftan oluşmaktadır. Dane partikülünün iç bölümünün DNA polimeraz ve endojen DNA kalıbı ile yakından ilişkisi vardır. Tüm bu bulgular Dane partikülünün, hepatit B virusu olduğunu göstermektedir.



Şekil: 1 Şematize edilmiş HBV'u ve antijenleri

Hepatit B Yüzey Antijeni (HBsAg): HBsAg, lipoprotein yapısında kompleks bir antijendir. İmmüdifüzyon ve İmmünelektroforez yöntemleri ile antijenin homojen bir yapıda olmadığı ve çeşitli alt gruplarının invarlığı tanımlanmıştır. Çapraz bağışıklığı sağlayan ortak bir "a" determinantı ve d/y ve w/r alt determinantlarından oluşan 10 serolojik alt tipi bulunur (ayw, ayr, adw...) Bundan başka sadece epidemiyolojik önemi olan q, x f, t, n ve g yüzey antijenleri tanımlanmıştır (13, 17, 28).

HBsAg'yi kodlayan S geni; S, preS<sub>1</sub> ve preS<sub>2</sub> olmak üzere üç bölümden oluşur (14, 28, 29, 30). S bölümü tarafından, majör protein

komponentleri, preS<sub>2</sub> bölümünce orta büyüklükte polipeptidler ve preS<sub>1</sub> bölümünce büyük olan polipeptidler kodlanmaktadır (14, 29).

**Viral Çekirdek:** Virionun çekirdeği, HBc Ag. taşır, ancak serumda serbest HBcAg. bulunmaz. HBcAg. yaklaşık 19.000 Dalton ağırlığında tek bir polipeptidden oluşur ve Viral "C" geni tarafından kodlanır (14).

Bu antijen, hepatositlerin nükleusunda ve HBV partiküllerinin çekirdeğinde, immunelektronmikroskobu ve indirek immun flöresan yöntemi ile saptanabilir (13).

**Hepatit B e Antijeni (HBeAg):** HBV'nun çekirdek bölümünde gizlenmiş antijenik bir yapıdır. HBeAg. yaklaşık 17.500 Dalton ağırlığında bir polipeptid olup, yapımını sağlayan genetik bilgi HBV genomunun "C" bölümündedir. Serumda genellikle immunglobülinle kompleks olarak bulunan eriyebilir bir antijendir (14, 25).

**Viral DNA:** HBV'nun çembersel yapılı DNA'sı tek bir molekülden oluşur. Bu molekülün bir iplikçiği sabit büyüklüktedir ve 3200 nükleotid içerir. Diğer iplikçik değişken büyüklüktedir ve 1700-2800 nükleoitidden oluşur. Buna göre molekül % 15-45 arası tek iplikçikli, geri kalan kısmı çift iplikçikli DNA'dır (14, 31).

HBV, fiziksel etkenlere ve kimyasal dezenfektanlara oldukça dayanıklı bir virustur. HBsAg'nin dayanıklılığı ile enfeksiyon etkeninin dayanıklılığı her zaman aynı olmayabilir. Hem enfeksiyöz virus, hem HBsAg - 20°C'de, 20 yıldan fazla dayanıklıdır. Bu dayanıklılık dondurma ve çözme işlemleri ile plazma fraksinasyonu sırasında da geçerlidir.

HBV Dezenfeksiyon ve sterilizasyonu için önerilen yöntemler (32).

**I- Isı ile sterilizasyon**

- a. 100°C'de kaynatma, 10 dakika.
- b. Otoklavda 121°C, 15 basınç, 15 dakika.
- c. Kuru ısı 160°C'de, 2 saat.

**II- Kimyasal Dezenfektanlar**

- a. Sodium hypochloride %0.5-1, 30 dakika
- b. Sulu formalin % 16, 12 saat
- c. Formalin % 20+%70 Alkol, 12 saat.
- d. Gluteraldehide % 2, alkalize, 10 saat
- e. Gaz sterilizasyonu, ethylen oxide.

## **EPİDEMİYOLOJİ**

HBV antijen ve antikorları ile ilgili serolojik testlerin gelişmesi sonucu, HBV'nun tüm dünyada yaygın olduğu, ancak Asya, Afrika ve Okyanusya gibi bazı bölgelerde, enfeksiyon oranının çok yüksek olduğu anlaşılmıştır (14).

Perkutan ilaç kullananlar, kan ve kan ürünleri alan hastalar, hemodiyaliz hastaları, insan kan ve serumları ile çalışan laboratuvar personeli, homoseksüeller, sık ve değişik seksüel temasları olan kişiler, kanla sık teması olan hekim ve dişçiler en büyük risk gruplarıdır (14, 33, 34).

Kan ürünlerinin, HBsAg. bakımından duyarlı testlerle taranması, transfüzyon sonrası hepatit riskini tamamen ortadan kaldırmamakla birlikte, büyük ölçüde azaltmıştır. Transfüzyon sonrası hepatitlerle ilgili son çalışmalar halen olguların % 5-10'unun hepatit B olduğunu göstermektedir (14, 17).

Kalan % 90-95'lik oran ise non-A, non-B (NANB) hepatit etkenlerinden, parenteral geçen ve hepatit C virusu (HCV) olarak tanımlanan etkene bağılı kabul edilmektedir (12, 35).

Sosyo-ekonomik koşullar enfeksiyon için risk kabul edilmektedir (14, 30). Batı ve Kuzey Avrupa'da HBV prevalansı % 5'ten az saptanırken, Asya ve Afrika toplumlarında bu oranının % 40-60 olduğu bildirilmektedir (32). Yüksek prevalanslı coğrafik bölgelerde, primer HBV enfeksiyonu daha sık ve erken yaşlarda görülmektedir. Senegal, Tayland, Taywan gibi ülkelerde enfeksiyon oranı infantlarda çok yüksektir; erken çocukluk dönemi süresince de yüksek kalmaktadır (14). Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) Bülteninde yer alan bir değerlendirmeye göre, ülkemiz hipoendemik batı ile hiperendemik Güney Doğu Asya ülkeleri arasındaki kuşakta yer almakta, yüksek prevalanslı (% 8-10) ülkeler arasında sayılmaktadır (13, 36).

**HBV'nun Geçiş Yolları:** Virusun en önemli rezervuarı insandır. Enfeksiyöz HBV'nun kanda ve çeşitli vücut sıvılarında ömür boyu bulunabildiği persistan enfeksiyonlar virus için bilinen en iyi insan kaynağıdır.

Hepatit B'nin geçişinde üç önemli yol vardır (30, 37, 38).

**1. Parenteral yol:** Enfekte kanın çeşitli yollarla direk inokulasyonu sonucu olmaktadır. Kan, plazma, kan ürünlerinin transfüzyonu, kontamine ve steril olmayan iğne, enjektör, jilet kullanma, akapunktur, tatuaj, kulak delme ve aşılamalarla geçiş olabilmektedir.

**2. İnsandan insana geçiş:** Horizontal yol da denmektedir, seksüel geçişi de kapsamaktadır.

**3. Anneden infanta geçiş (perinatal dönemde):** Vertikal yol da denmektedir.

Kan ve kan ürünleri, geçiş için en iyi bilinen kaynaklardır. Ancak HBsAg, feçes, idrar, safra, ter, gözyaşı, salya, semen, anne sütü, vajinal sekresyon, serebrospinal sıvı, synovial sıvı ve kordon kanında da saptanmıştır. Bunlardan yalnızca serum, salya ve semen enfeksiyöz HBV taşımaktadır (14,30).

Bulaşı kolaylaştıran nedenlerden biri de yakın temas olarak bilinmektedir. Ailedeki enfekte bireylerin, cinsel temasta buldukları kişiye enfeksiyonu geçirme olasılıkları, diğerk bireylere geçirme olasılığından daha yüksektir. Bugün için cinsel temas, HBV enfeksiyonunun geçişinde en önemli yollardan biri olarak kabul edilmektedir (14, 32). Cinsel yolla geçişte risk, taşıyıcının enfektivitesine ve muhtemelen cinsel ilişkinin tipine ve uzunluğuna bağıdır. Ancak enfektiviteyi gösteren HBeAg'leri negatif olan taşıyıcılardan da, bu yolla geçiş belirtilmiştir. Bir çalışmada partnerlerine enfeksiyonu geçiren taşıyıcıların % 63' HBeAg. negatif ve anti-HBe pozitif olarak bulunmuştur (37). Ayrıca genelev kadınları ve homoseksüeller gibi çok sayıda partnerle ilişkiye girenlerde yapılan çalışmalarda, bulaşlar % 42 gibi yüksek oranlarda bildirilmiştir (14, 32).

Fekal-oral bulaşın bir geçiş yolu olduğunu gösteren hiçbir bulguya rastlanılmamıştır. Gastrointestinal bir kanama olmadıkça HBV'nun feese geçmediği bildirilmiştir (14).

Kan emen sinekler ve artropodların bulaşmada rolü olabileceği düşünülmüş; ancak HBV sinekleri enfekte etmediğinden, pasif transferin söz konusu olabileceği bildirilmiştir (14, 33, 38).

HBV'nun anneden infanta perinatal dönemde geçişi çok önemlidir (14, 32, 37). Genellikle asemptomatik HBV taşıyıcısı annelerden, daha seyrek olarak da akut hepatit B enfeksiyonu geçiren anneden bebeğe geçmektedir (37) HBeAg'i de pozitif olan annelerin % 90'ı, hepatit B'yi bebeklerine geçirmektedirler (28).

Anneden, bebeğe B tipi virusun nasıl geçtiği kesin olarak açıklanamamıştır. Genellikle, doğumda bebeğin vajinal kanaldan geçişi sırasında veya doğumdan sonra anne ile bebeğin yakın teması sonucunda geçiş olduğu düşünölmektedir (28, 33).

Doğumdan sonra, anneden bebeğe HBV'nun geçişinde, anne sütünün önemli bir yol olduğu gösterilememiştir. Emzirme sırasındaki geçişin meme ucundaki çatlaklardan olabileceği düşünölmektedir (14, 33).

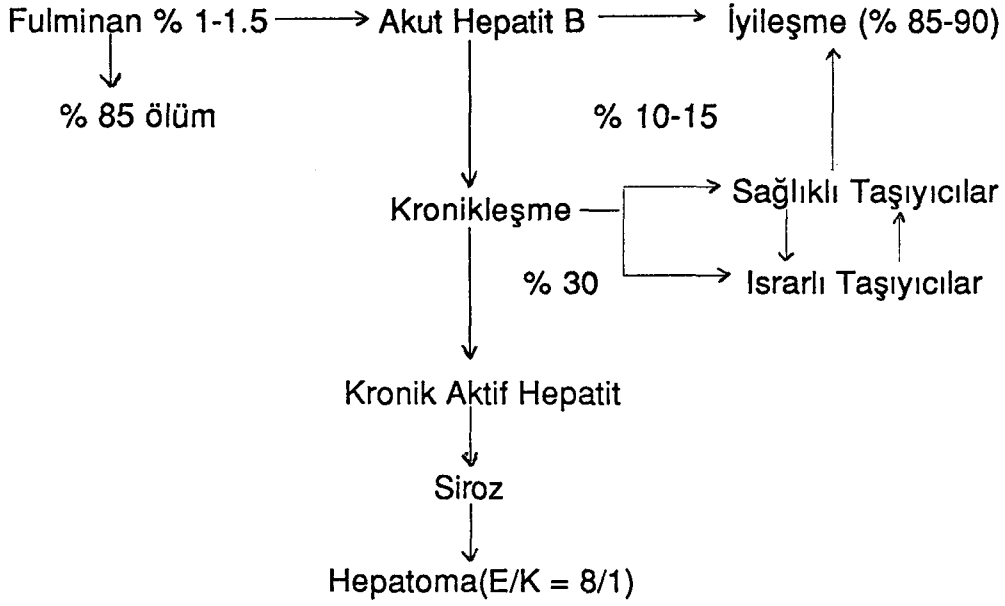
In utero geçiş yüksek riskteki infantlarda, % 5'den az oranlarda bildirilmiştir (28, 37). Perinatal olarak enfekte olan infantlar, genellikle kronik HBV taşıyıcısı olmaktadır. Bunun için % 90 gibi yüksek oranlar bildirilmiştir (14, 28, 37).

## **HEPATİT B VİRUS ENFEKSİYONU**

Yurdumuzda, hatta tüm dünyada karşılaşılan enfeksiyon hastalıkları arasında, viral hepatitler ilk sıralarda yer almaktadır (39). Akut viral hepatitlerin en sık karşılaşılan sebebi ise HBV enfeksiyonudur (14). Ayrıca viral hepatit etkenleri içinde, tüm dünyada morbidite ve mortalitesi en yüksek olan hepatit B virusudur. Bunun nedeni geçiş kolaylığı, kronik taşıyıcılığın sıklığı, siroz ve hepatosellöler karsinoma komplikasyonlarına yol açmasıdır (40).



HBV'ye maruz kalma değişik şekillerde sonlanabilir (13).



Şekil: 2 Hepatit B Enfeksiyonunun Seyri (13).

Hepatit B Enfeksiyonu, asemptomatik, semptomatik (ikterik veya anikterik) veya fulminan seyir gösterebilir. HBV enfeksiyonları erişkinlerin % 30-40'ında semptomatik, % 60-70'inde asemptomatik seyir göstermektedir. Ortalama inkübasyon süresi 40-180 gündür (12, 40). Akut ikterik hepatit B geçiren hastaların % 10-20'sinde, hastalık ortaya çıkmadan birkaç gün veya birkaç hafta önce, eritematöz makülopapüler raş, ürtiker, artralji, bazen de artrit ile seyreden serum hastalığı benzeri bir tablo gelişmektedir (14, 27). Semptomatik akut olgularda klinik seyir, ortadan-şiddetliye kadar değişmekte, bazen uzamış sarılık şeklinde seyretmekte, bazen de fatal olabilmektedir.

Olguların % 1-3'ünde fulminan hepatit gelişmektedir. Akut enfeksiyonunun şiddetini etkileyen iki önemli faktör bilinmektedir. Bu faktörlerden biri yaştır. Genelde klinik seyir infant ve genç erişkinlerde, yaşlılardan daha hafif olmaktadır. Faktörlerden ikincisi ise enfekte eden

virusun dozudur. Enfekte eden virus dozu yüksek olduğunda, inkübasyon süresi kısalmakta ve ikterik hepatit gelişme olasılığı yükselmektedir (14).

HBV'nun direk sitopatik etkisi yoktur. HBV'nun oluşturduğu karaciğer harabiyeti, vücudun virusa karşı geliştirdiği immun yanıt sonucu olmaktadır (17).

Enfekte hepatositte, HBsAg'nin hücre sitoplazmasında, HBcAg'nin ise hücre nükleusunda yerleşim gösterdikleri saptanmıştır (25).

Enfeksiyon olguların yaklaşık % 10'unda kronikleşmektedir. Kanda HBsAg'nin 6 ay, HBeAg'nin 10 haftadan fazla kalması kronikleşmeyi gösterir. Kronikleşme olasılığı, anikterik olgularda ikterik olgulardan daha yüksektir. Kronik formlar, klinik olarak kronik aktif hepatit (KAH) veya kronik persistan hepatit (KPH) şeklinde seyretmektedir. Olguların 1/3'ünde KAH, 2/3'ünde ise KPH gelişmektedir (22). Kronik persistan hepatit selim seyirlidir, hastalar yıllarca HBsAg pozitif kalabilmekte; ancak hastalık ilerlememektedir. Kronik aktif hepatit ise ciddi, tahrip edici karaciğer hastalığına, siroza yol açabilmektedir (26).

HBV, primer hepatosellüler karsinom (PHC) ile de ilişkili kabul edilmektedir (14, 22, 26, 30). PHC, insanlarda en sık rastlanılan tümörlerdendir ve HBV markerları ile önemli ölçüde paralellik gösterdiği saptanmıştır (41). HBsAg taşıyıcılık oranının yüksek olduğu ülkelerde, örneğin Taywan'da PHC sıklığı rekor düzeyde olup, ABD'lerindeki orandan 200 kat fazladır. Bu ülkede kanserden ölümlerin % 20-30'undan PHC sorumludur ve ortalama yaş 38 civarında iken, ABD'lerinde kanserden ölümlerin ancak % 2'sinden PHC sorumludur ve ortalama yaş 58 olarak bildirilmektedir (22).

HBV, ekstra hepatik yerleşimli hastalıklardan da sorumlu tutulmaktadır (14, 24). Bu hastalıkların bazılarının patogeneğinde, HBsAg-antiHBs komplekslerinin rol oynadığı düşünülmektedir. Hepatit B geçiren hastaların % 10-20'sinde görülen serum hastalığı benzeri tabloda, serumda, synovial sıvı ve tutulan eklemlerdeki synovial membranda HBsAg-antiHBs kompleksleri ve düşük düzeyde kompleman komponentleri saptanmıştır (14).

Poliarteritis nodoza olduğu saptanan hastaların 1/3 ila 1/2'sinde persistan HBV enfeksiyonu olduğu saptanmıştır. Ayrıca serum kompleman düzeylerinde düşüklük olduğu ve dolaşımda HBsAg-antiHBs kompleksleri bulunduğu bildirilmiştir (14, 24).

Önemli sayıda membranöz glomerülonefrit olgusunda, kronik aktif hepatit ve persistan HBV enfeksiyonu ile ilişki saptanmıştır. Elektron mikroskopi ile glomerüler bazal membranın subepitelyal yüzü boyunca immunkompleks depozitleri ve immun flöresan boyama ile glomerüllerde nodüler HBsAg immunglobülin ve C<sub>3</sub> depozitleri olduğu gözlemlenmiştir (14).

İnfantil papülerakrodermatit olguları ile persistan HBV enfeksiyonunun sıklıkla birlikte görüldüğü saptanmıştır (14, 24). Ayrıca esansiyel miks kryoglobülinemili 19 olgudan, 6'sında kryopresipitatların HBsAg., 11'inde anti-HBs içerdiği gözlemlenmiştir (14). Bu çalışma bazı kryoglobülinemi olgularının, HBV enfeksiyonu ile ilişkisi olduğunu düşündürmektedir.

Akut viral hepatit olgularından sonra önemli sayıda aplastik anemi bildirilmektedir. Ancak HBV enfeksiyonu ile aplastik anemi arasındaki ilişki kesin olarak saptanamamıştır (14, 24, 30).

HBV, kronik hepatit, siroz ve hepatomaya yol açabilen, tüm dünyada

endemik görülen, ciddi bir enfeksiyona neden olmaktadır. Virusun en büyük rezervuarını taşıyıcılar oluşturmaktadır. Bugün dünyada yaklaşık 300 milyon taşıyıcı olduğu sanılmaktadır (16, 29,37). Taşıyıcılıkta belirgin bir coğrafi farklılık görülmektedir. Dünyadaki taşıyıcıların % 95'i üçüncü dünya ülkelerinde, özellikle Asya ve Afrika'da bulunmaktadır. Ülkemizde çeşitli araştırmalarda farklı metodlarla alınan sonuçlara göre, taşıyıcılık oranı % 7-10 olarak saptanmıştır (28).

Ülkemizde akut viral hepatit olgularında, sağlıklı görünen kişilerde, kan donörlerinde, hastane personeline yapılan HBsAg tarama sonuçları şöyledir; Doğanay ve ark.ları, indirek hemaglütinasyon yöntemi ile çalışarak, akut viral hepatit tanısı almış 44 olgunun 16'sında (% 36.3), karaciğer hastalıkları tanısı almış 39 olgunun 4'ünde (% 10.21), kırsal kesimde oturanların % 8.2'sinde, donörlerin % 14.6'sında ve hemodiyaliz ünitesinde olguların % 57.1'inde HBsAg.'i pozitif olarak saptamışlardır (42).

Özlüarda ve ark.larının, RPHA yöntemi ile yaptıkları çalışmada, kan donörlerinin % 7.34'ünde, sağlıklı kişilerin % 2.88'inde, akut viral hepatitli olguların % 46.89'unda HBsAg. pozitif olarak saptanmıştır (43).

Fındık ve ark.larının, RPHA yöntemi ile kan donörlerinde yaptıkları çalışmada, HBsAg. % 21 oranında pozitif saptanmıştır (41). Menteşoğlu ve ark.ları RIA ile HBsAg.yi % 6.7, Gözdaşoğlu ve ark.ları gene RIA ile % 11, Palabıyıköğlu ve ark.ları ise ELİSA ile :% 14.7 oranında pozitif olarak saptamışlardır (44).

Çolak ve ark.larının değişik toplum gruplarında, ELİSA ile yaptıkları tarama sonucunda HBsAg, yemekhane personeline % 7.77, masabaşı memurlarında % 7.14, yardımcı sağlık personeline % 11.54, hemşire ve

doktorlarda % 3.92, genelev kadınlarında % 14.88 oranında pozitif olarak saptanmıştır (4).

Özbal ve ark.larının, RPHA ile yaptıkları tarama sonucunda, HBsAg sağlıklı kişilerde % 5.1, hepatitlerde % 24.9, hastane personeline % 19.7 oranında pozitif olarak saptanmıştır (45).

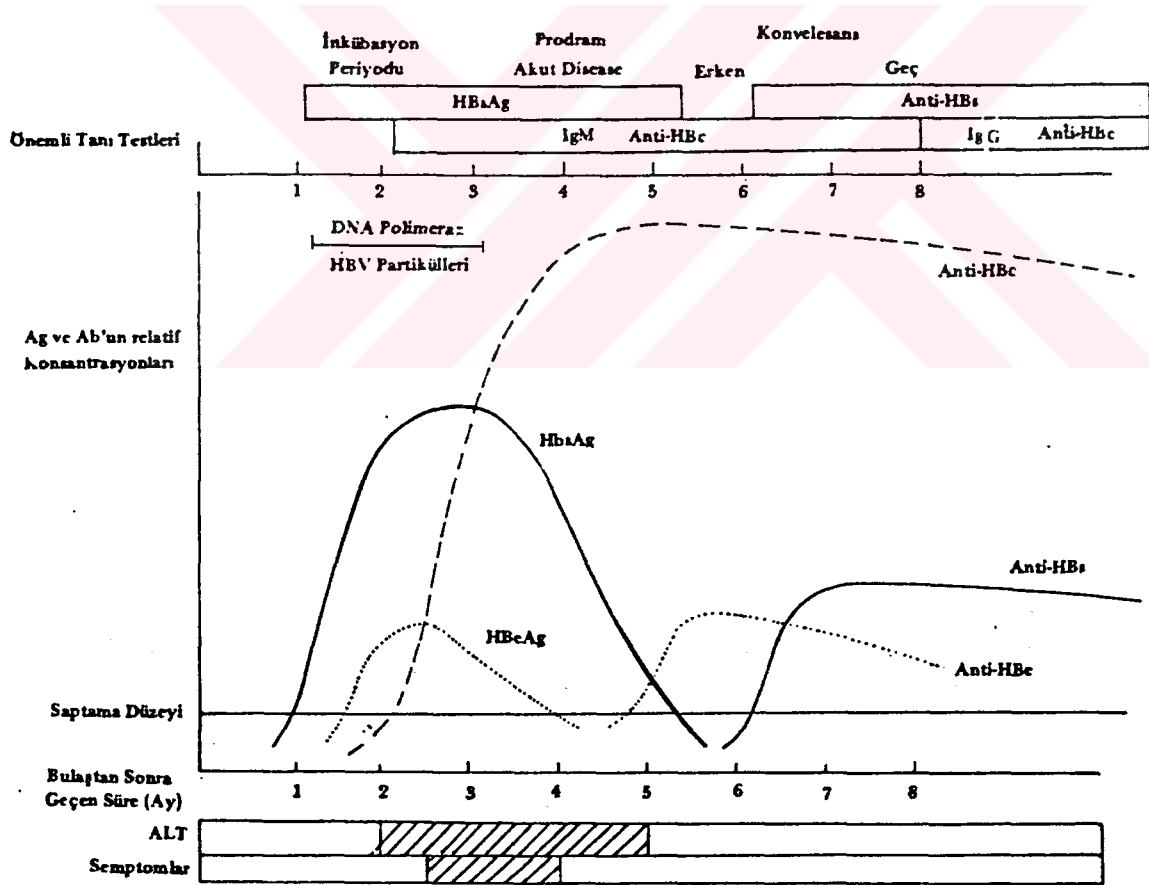
Gözdaşoğlu ve ark.larının yaptıkları bir çalışmada, gruplar RIA ile hem HBsAg, hem de anti-HBs için taranmış, kontrol grubunda antijen % 11, antikor % 47 oranında pozitif olarak saptanırken, hastane personeline antijen % 13.7, antikor % 52 oranında pozitif olarak saptanmıştır (46). İlk kez bu çalışmada yapılan antikor tayinleri, toplumumuzun en azından şehirde yaşayan kesiminin yarısının hepatit B virusu ile karşılaştığını, bunların da % 10 kadarının taşıyıcı olduğunu göstermektedir.

Bazı otörlere göre, HBsAg taşıyıcılığı, bozuk hücre sel bağışıklıktan ileri gelmektedir. Gerçekten de lenfoma, lösemi, lepramatöz lepra, Down sendromu gibi hastalıklarla, immunosuppresif tedavi uygulanan ve transplantasyon yapılmış kişiler arasında taşıyıcı sıklığı yüksektir (33).

İmmunolojik durum dışında, enfeksiyonun kronikleşmesinde yaş ve seks önemli faktörler olarak bilinmektedir. Taşıyıcılık kadınlarda % 1-3 oranında görülürken, erkeklerin % 5-10'unda görülmektedir. Erişkinlerde kronikleşme % 5-10 oranında görülürken, infantlarda bu oran % 90'a kadar yükselmektedir (29). Bunlar dışında enfekte eden virus dozu da önemli bir faktör olarak kabul edilmektedir. Düşük doz virus ile enfekte olanlarda, inkübasyon süresi daha uzun, hastalık seyri daha hafif olurken, genellikle enfeksiyonun kronikleştiği izlenmektedir (14).

HBsAg taşıyıcılarında, bazı araştırıcılara göre yılda % 2-17(29), bazı araştırıcılara göre de % 1-2 oranında spontan antijen kaybı görülebilmektedir (14).

HBV enfeksiyonu, komplikasyonlarının fazlalığı, kronikleşmenin yaygınlığı nedeniyle ciddi bir enfeksiyondur. Bu yüzden, ülkemiz gibi yüksek prevalanslı ülkelerin yanısıra, düşük prevalanslı ülkeler için de halen önemli bir halk sağlığı problemidir (22, 28). Hasta ve taşıyıcıların kesin tanısının yapılması gerekmektedir. HBV, klinik bulgularla diğer nedenlerle olan akut viral hepatitlerden ayrılamaz. Kesin tanı, virusa özgü serolojik markerların tayini ile olur.



Şekil: 3 Tipik (Klāsik) Akut Hepatit B'nin Klinik, Biyokimyasal ve Serolojik Seyri (28).

## HEPATİT B'DE SEROLOJİK MARKERLAR VE ANLAMLARI

Hepatit B yüzey antijeni (HBsAg): HBsAg, akut hepatitin kanda ilk beliren işaretidir. Genellikle ilk kez enfeksiyondan, 2-6 hafta sonra saptanır, kuluçka süresi içinde titresi maksimum düzeye yükselir ve semptomlar çıktığı zaman düşmeye başlar (47). Ortalama 3 ay içinde kaybolur, 20 haftaya kadar kalabilir, 6 aydan uzun süre kalması, taşıyıcılık durumunu gösterir (24).

Kanda HBsAg'nin varlığı aktif enfeksiyonla eş anlamlı kabul edilmektedir (14,30). Akut hepatit geçiren bir hastada HBsAg pozitif bulunduğunda, hepatit B düşünülmelidir. Ancak taşıyıcı bir kişide başka bir etkenle meydana gelen hepatitin eklenmesi veya kronik aktif hepatitin alevlenmesi de aynı bulguları verebilir.

Akut HBV enfeksiyonlu hastaların bir bölümünde HBsAg hiç bir zaman bulunmamaktadır. Hoofnagle ve ark.ları, antiHBc titresi yüksek, HBsAg titresi RIA ile saptanabilecek düzeyin altında ve üstünde dalgalanmalar gösteren bir hasta tanımlamışlardır (14). Bu hastada bazı zamanlarda en duyarlı testlerle bile HBsAg'nin negatif bulunduğu bildirilmiştir.

Transfüzyon sonrası hepatit B'ye yol açan vericilerin, HBsAg titreleri saptanabilecek düzeye ulaşmadan önceki inkübasyon döneminde olma olasılıkları vardır. Ayrıca HBsAg titresinde yukarda sözü edilen dalgalanmalar nedeniyle de HBsAg saptanamıyor olabilir (14,117, 21). Bazı olgularda ise

HBsAg, klinik tablo sona ermeden, hatta hastalık başlamadan kaybolabilmekte, böylece HBsAg saptanamamaktadır.

Hepatit B "e" Antijeni (HBe Ag): Kanda HBsAg ile aynı zamanda veya birkaç gün sonra saptanabilir. HBe Ag, on haftadan fazla pozitif kalanlarda, enfeksiyonun kronikleşme olasılığı yüksektir (14,17,24).HBe Ag viral replikasyonun varlığını göstermektedir. Akut veya kronik enfeksiyon sırasında, HBe Ag varsa, bulaşıcılık olasılığı yüksektir.

HBsAg taşıyıcılarında, HBe Ag varlığı kötü bir prognostik bulgudur. Daha ciddi bir seyir ve kronik karaciğer hastalığı gelişme olasılığı yüksektir (48).

HBV DNA ve DNA polimeraz: HBe Ag'den daha duyarlı viral replikasyon markerlarıdır. Anti HBe pozitif olan olgularda bile, HBV DNA pozitif bulunabilmektedir. Ancak rutin serolojik araştırmalarda kullanılmamaktadır (28).

Anti-HBc: HBc Ag, hastalığın akut döneminde karaciğerde, buna karşı oluşan anti-HBc ise HBV ile enfekte her hastanın kanında bulunmaktadır. HBsAg'den yaklaşık üç-beş hafta sonra kanda saptanabilmektedir.

İlk antiHBc tepkisi, IgM sınıfı antikorlar ile oluşmaktadır. Akut hepatit B'li tüm hastalarda antiHBc IgM bulunmakta, tipik olgularda en geç yedi-sekiz ay içinde kaybolmaktadır. Total antiHBc titreleri, iyileşmeden sonra düşmekte, buna karşın kronik olgularda, antiHBc titreleri yüksek olarak saptanmaktadır (14,28).



HBsAg saptanamayan, ancak yüksek titrede antiHBc saptanan olgulardan alınan kanların, HBV enfeksiyonunu bulaştırabileceği saptanmıştır. Yalnızca yüksek titrede anti HBc bulunan kanların potansiyel olarak enfeksiyöz kabul edilmesi gerektiği bildirilmiştir (14).

Anti-HBe: HBe Ag'ye karşı oluşan antikordur. Genellikle klinik bulguların en yüksek olduğu dönemde, HBe Ag'nin kaybolmasından birkaç hafta sonra oluşmakta ve kanda uzun bir süre devam etmektedir (14,24,28). Serumda antiHBe'nin bulunuşu, prognozun iyi olduğunu gösterir.

Anti-HBs: AntiHBs antikorları, HBsAg'ye karşı oluşur. Genellikle klinik belirtilerin ve HBsAg'nin kaybolmasından bir süre sonra ortaya çıkmaktadır. Hastaların yarısında, HBsAg'inin kaybolması ile antiHBs antikorlarının ortaya çıkışı arasında, iki-üç hafta ile bir yıl arasında değişkenlik gösteren bir zaman aralığı bulunur. Bu döneme pencere dönemi "window period" denir.

AntiHBs, geçici antijenemili hastaların %10'unda hiç bulunmayabilir. Bazı hastalarda ise HBsAg ve anti HBs'nin aynı zamanda pozitif bulunduğu gösterilmiştir (14,28).

AntiHBs antikorları, koruyucu ve bağışıklığı sağlayan antikordur, varlığı kesin iyileşmeyi göstermektedir.

**Tablo IV: HBV Enfeksiyonunun Farklı Dönemlerinde Görülen Serolojik Markerlar (14,28).**

Enfeksiyonun Durumu	Anti-HBC					
	HBsAg	Anti-HBs	IgG	IgM	HBe Ag	Anti-HBe
Geç inkubasyon dönemi	+	-	-	-	- veya +	-
Akut Hepatit B	+	-	+	+	+	-
HBsAg negatif akut Hepatit B	-	-	+	+	-	-
Sağlıklı HBsAg taşıyıcısı	+	-	+++	+veya-	-	+
Kronik Hepatit B	+	-	+++	+veya-	+	-
Yeni geçirilmiş HBV enfeksiyonu	-	++	++	+veya-	-	+
Çok eskiden geçirilmiş HBV enf.	-	+veya-	+veya-	-	-	-
Yakın geçmişte yapılmış HBV aşısı	-	++	-	-	-	-

HBV ile ilgili serolojik markerlar başlıca şu amaçlarla kullanılmaktadır; akut ve kronik hepatit etyolojisinin saptanmasında, hepatit B yönünden risk altında bulunan kişilerin immun durumlarının saptanmasında, HBsAg taşıyıcısı gebe kadınların saptanmasında anneleri HBsAg taşıyıcısı olan çocuklarda asemptomatik kronik karaciğer hastalığının saptanmasında (49); ayrıca hepatitin seyri, iyileşmesi, kronikleşmesi ve bulaşıcılık durumu hakkında fikir edinme, portörleri izleme, kan vericilerini tarama ve epidemiyolojik çalışmalar için de serolojik markerler kullanılmaktadır.

Çok sayıda serolojik marker olmasına karşın, uygulamada öncelikle aranan HBsAg'dir. HBsAg'nin varlığı hem akut, hem de kronik enfeksiyon hakkında fikir verir. Ayrıca serolojik işaretlerin tümünün ilk aşamada istenmesi ekonomik açıdan ve pratik olarak uygun değildir (26).

## **HBsAg'nin Rutin olarak Taranması Gereken Durumlar:**

1. Kan Donörlerinin Taranması: HBV enfeksiyonunun bulaşmasında bilinen en önemli yol paranteral yoldur (2,30,32,33).

Kan transfüzyonlarının geç ve en ciddi yan etkilerinden olan, transfüzyon sonrası hepatitlerde, HBV'nun önemi anlaşıldığından beri, tüm dünyada ve yurdumuzda, kan vericilerinde yaygın olarak HBsAg taramaları yapılmaktadır (32,43). Kan merkezleri ve kan bankalarında rutin olarak HBsAg taranmasına başlandıktan sonra, transfüzyon sonrası hepatit olgularında önemli bir azalma kaydedilmiştir (50). Günümüzde, transfüzyon sonrası hepatitler, non-A, non-B hepatit ile eş anlamlı kabul edilmektedir.

Transfüzyon sonrası hepatitlerin %90-95'i NANBH etkenlerinden HCV'ye bağlıdır (12,35). Kalan %5-10'luk oranın HBV'a bağlı olduğu bildirilmekte, bu da en duyarlı yöntemlerle bile HBsAg negatif bulunan kanların transfüzyonu ile açıklanmaktadır.

HCV için, spesifik serolojik gösterge olan, anti-HCV taranabilmektedir. Ancak serokonversiyon altı aya kadar uzayabildiğinden, anti-HCV taranarak olguların yalnızca %40'ı yakalanabilmektedir (40).

2. Gebelerin Taranması: Anneden infanta perinatal dönemde geçiş, genellikle HBV taşıyıcısı annelerden, daha seyrek olarakta akut hepatit B geçiren annelerden olmaktadır. Bu bebekler hepatit B enfeksiyonuna, daha yüksek oranda da enfeksiyonun kronik şekillerine yakalanma tehlikesi altındadırlar (28).

Hepatit B olan annenin çocuğu 1. HBsAg taşıyıcısı olarak asemptomatik kalabilir, taşıyıcılık kronik karaciğer hastalığı ile sonuçlanabilir. 2. HBsAg pozitif olup asemptomatiktir, ancak daha sonra antijenemi kaybolabilir. 3. HBsAg pozitifliği, ağır fulminan hepatit ile sonuçlanabilir veya 4. Çocuk tamamen normal olabilir (33).

Bugün dünyada taşıyıcılıktan büyük oranda perinatal geçiş sorumlu tutulmaktadır. Bu nedenle, gebelerde HBsAg taramalarının rutin olarak yapılması ve bebeklere gerekli profilaksinin uygulanması, toplumun sağlığını önemli ölçüde tehdit eden taşıyıcıların azaltılmasında çok önemlidir.

3. Akut Viral Hepatit Etyolojisini Saptamada: Akut viral hepatitlerin etyolojisini belirlemede, kanda ilk aranması gereken HBsAg olmalıdır. Çünkü HBV enfeksiyonlarında en kolay ve en çabuk tanımlanabilen markerdir (4).

HBV enfeksiyonlarının büyük çoğunluğu, kanda HBsAg varlığı ile birlikte görülmektedir. Ancak taşıyıcı bir kişide başka bir etkene bağlı hepatit gelişmiş olabileceği de düşünölmelidir (14). Ayrıca bazen, aktif HBV enfeksiyonuna rağmen kanda HBsAg bulunamıyabilir. Bu durumda akut enfeksiyonunun saptanması için, anti HBc IgM aranmalıdır.

4. Medikal Personelin ve Yüksek Riskli Bölgelerdeki Hasta ve Personelin Taranmasında: Hepatit B'nin hastane personeli için mesleki bir tehlike olduğu iyi tanımlanmış bir olgudur (36,48). Ülkemizde, HBsAg prevalansı yüksek olduğundan, bazı araştırcıların çalışma sonuçları, sağlık personelinin bu bakımdan ayrıca bir risk altında bulunmadığını düşöndürmektedir.

Gözdaşoğlu ve ark.larının RIA ile yaptıkları çalışmada HBsAg kontrol grubunda %11.0, hastane personelinde %13.7 oranında pozitif saptanmış, aradaki fark anlamlı bulunmamıştır (16).

Oral ve ark.larının ELİSA yöntemi ile yaptıkları çalışmada, HBsAg prevalansı hastane alışanlarında %6.34 oranında bulunmuş, bu çalışmada riskin genel populasyonndan yüksek olmadığı saptanmıştır (36).

Dienstag ve ark.larının RIA ile yaptıkları çalışmada, HBV serolojik markerları gönüllü kan donörlerinde %5 oranında bulunurken, hastane alışanlarında %16 oranında bulunmuştur. Bu oran, gönüllü kan donörlerindeki orandan çok daha yüksektir. Bu çalışmada, markerların sıklığının meslekte geçen yıllarla ve yaşla arttığı saptanmıştır. Ayrıca HBV markerları kan bankası ve laboratuvar çalışanları gibi kanla sık ve yoğun temasta bulunanlarda, kanla seyrek teması olanlardan anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Kanla sık ve yoğun teması olanlarda enfeksiyon riski yüksek saptanırken, düşük doz virusla devamlı karşılaşanlarda enfeksiyondan çok immunité geliştiği bildirilmiştir (52).

Medikal personelin HBsAg açısından taranması, hepatitle karşılaşma riskinin belirlenmesi ve riskin nasıl azaltılacağı konusunda korunma önlemlerine yönelinmesi açısından önemlidir.

Hastanelerde HBV enfeksiyonu açısından yüksek riskli bölgeler hemodiyaliz, onkoloji üniteleri, laboratuvarlar, kan bankaları ve cerrahi yoğun bakım üniteleridir. Bu bölgelerde hem hastalar, hem personel HBsAg açısından rutin olarak taranmalıdır. HBsAg pozitif bulunan personel bu

ünitelerdeki duyarlı hastalarla temas ettirilmemelidir. Benzer şekilde HBsAg pozitif hastalar, HBsAg negatif hastalardan ayrılmalıdır. Kan bankalarında tüm personel taranarak, HBsAg pozitif personelin, kan ürünlerini kontamine etme riski azaltılabilir (48).

## **HBsAg TARAMADA KULLANILAN YÖNTEMLER**

HBsAg taramada kullanılan yöntemler az, orta ve çok duyarlı olmak üzere üç grupta toplanmıştır. Birinci grupta az duyarlı deneyler yer almakta ve birinci kuşak testler olarak adlandırılmaktadır. Bunlar agar-jel diffüzyon deneyinin değişik şekilleridir. Az duyarlı olduklarından günümüzde yaygın olarak kullanılmamaktadırlar (1).

Teknoloji geliştikçe duyarlılıkları birinci kuşak testlere göre 5-20 misli fazla olan ikinci kuşak testler bulunmuştur (48). Bu grupta yer alan testler, immuno elektro osmoforez (IEOP) testinin değişik şekilleridir. Bu grupta en çok kullanılan testler, counterimmuno elektroforez (CIEP) ve kompleman fiksasyon (CF) testleridir. Bu testler, basit ve ekonomik olmalarının yanı sıra, deney süresinin 60-90 dakika gibi kısa süreli olması nedeniyle yaygın olarak kullanılmışlardır. Ancak, bu grup testlerde duyarlılık yeterli düzeyde değildir. Bu grup testlerle potansiyel olarak enfeksiyöz birimlerin ancak %25'inden azı saptanabilmektedir (48,50).

Üçüncü kuşak testlerde ise duyarlılık, agar-jel diffüzyondan 2-10.000 kat fazladır (48). Bu grupta yer alan testler, radyoimmunoassay (RIA), enzime-linked immunosorbent assay (ELISA) ve reverse passif hemaglütinasyon (RPHA) dur. Üçüncü kuşak yöntemler arasında da duyarlılık ve özgüllük açısından belirgin farklar bulunmaktadır (7).

HBsAg taramada kullanılan testler ve duyarlılık farkları Tablo V'de gösterilmektedir (26).

**Tablo V: HBsAg Taramada Kullanılan Yöntemler (26)**

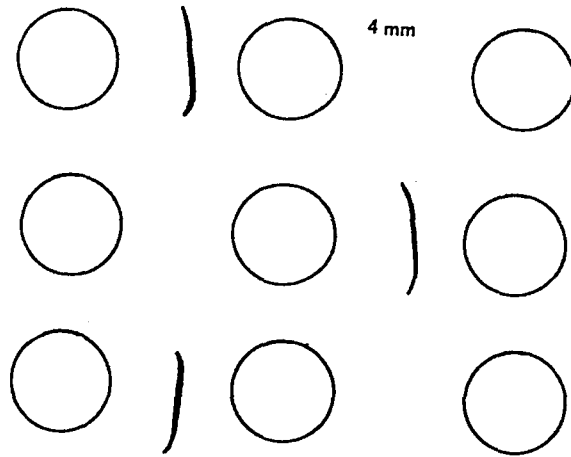
Test	Duyarlılık	Zaman	Yorum
<b>BİRİNCİ KUŞAK</b>			
Agar jel diffuzyon (AGD)	Az	24-72 sa.	Basit bir test Özel bir araca gereksinim yok
<b>İKİNCİ KUŞAK</b>			
Counterimmun elektroforez (CIEP)	5-10 x > AGD	1-2 sa.	
Kompleman fiksasyon (CF)	5-10 x AGD	24 sa.	
Reversepasiflatex aglütinasyon		1 sa.	Basit ve ucuzdur. Yalancı pozitif reaksiyon sık Pozitifler başka bir testle konfirme edilmeli.
<b>ÜÇÜNCÜ KUŞAK</b>			
Reverse pasif hemaglütinasyon (RPHA)	10-100x>İkinci kuşak testler		Basit ve hızlıdır. Yalancı pozitif reaksiyonlar vardır.
Radyoimmunoassay (RIA)	100-1000xİkinci kuşak testler	4-24 sa.	Radyoaktivite ve pahalı araca gereksinim var,yarı ömrü kısa. Konfirmasyon testi olarak kullanılabilir.
Enzim linked immunosorbent assay (ELİSA)	50-100 x > ikinci kuşak testler		Radyoaktivite gerekmez. Yarı ömrü uzun.

## 1. Agar-Jel Diffüzyon Testi (AGD) (Ouchterlony Yöntemi: Agar İçinde Çift Yönlü Yayılma ile Presipitasyon) Yöntemi

Agar plağın içine, karşılıklı çukurlar açılarak, hem antijen aranacak serum, hem de antikorlu antiserumlar konulur. Test serumunda antijen varsa, antijen ve antikor buldukları çukurdan agar içinde birbirlerine doğru yayılarak, optimal miktarlarda karşılaştıkları noktada presipitasyon çizgileri oluşur. 24-72 saatlik bir zamana gereksinim vardır. Diğer yöntemlerden daha az duyarlıdır (9).

## 2. Counter Immunelektroforez (CIEP) (Karşıt gidişli immunelektroforez-Double elektroimmunodiffüzyon) Yöntemi

Agar-jel diffüzyon testinden 5-10 misli daha duyarlıdır (9). Elektroforezli jel içinde iki yönlü yayılma presipitasyon temeline dayanır. 8.2 pH'da jel ortamda, bilinen bir antijen veya antikor aracılığı ile karşıtı elektroendozmotik fenomenden yararlanılarak saptanır, aranan varsa 30-60 dakika içinde iki kuyucuk arasında presipitasyon bandı oluşur.



Şekil 4: CIEP'de pozitif sonuçlar (39).



### **3. Radyoimmuno Assay (RIA) (Radyoaktifli İmmun Deney) Yöntemi**

RIA, viral antijen ve antikorları picogram konsantrasyonlarda ölçülebilen çok duyarlı bir testtir (54). HBsAg taramasında kullanılan en duyarlı testlerdendir.

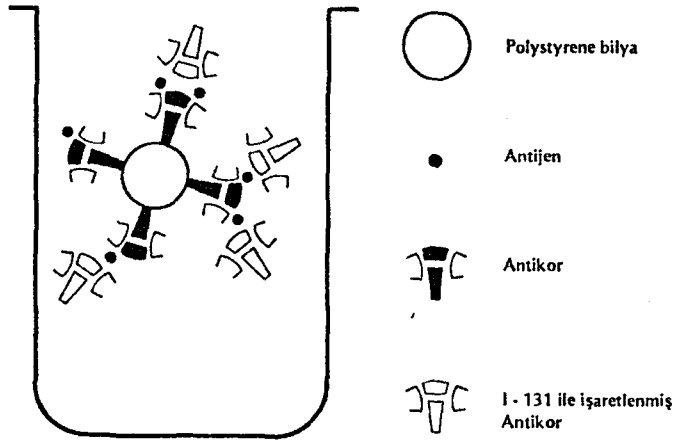
Yöntemin temeli spesifik bir antikor için işaretli (bilinen) ve işaretli olmayan (bilinmeyen) materyalin kompetisyonudur. Antijen ve antikor arasında oluşan bileşikler sonradan ayrılarak radyoaktivite miktarı saptanır.

Yaygın olarak kullanılan 2 RIA yöntemi vardır.

**a) Solid Faz RIA;** Test örnekleri, anti-HBs antikorları ile kaplanmış boncuk veya plastik tüplere eklenir. İnkübasyon aşamasından sonra, tüp veya boncuklar gama sayacı ile sayılır. Özgül olmayan yalancı pozitif sonuçlar görülebileceğinden, pozitif sonuçların confirmasyonu gerekmektedir.

**b) Çift Antikor veya Radyoimmunopresipitasyon (RIP):** Bu yöntemde, bilinen miktarda anti-HBs antikoru ile  $^{125}\text{I}$  ile işaretli HBsAg, test örnekleri ile inkübe edilir. Daha sonra gama globüline karşı eklenen ikinci antikorla reaksiyona girerek, antijen antikor kompleksleri olarak çöker. Test örneğinde HBsAg varsa, anti HBs ile radyoaktif işaretli HBsAg arasındaki reaksiyonu önler, böylece serbest kalan radyoaktif işaretli HBsAg'nin, bağlı ve presipite  $^{125}\text{I}$ -ile işaretli HBsAg'ye oranı büyür.

RIA testleri, hemaglutinasyon testlerinden 10 kat, CIEP'den 1000 kat daha duyarlıdır (9).



Şekil 5: Radyoimmuno Assay (39).

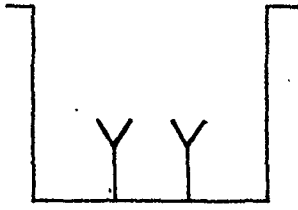
#### 4. Enzim Linked İmmunosorbent Assay (ELİSA) (Enzimli İmmun Deney) Yöntemi

ELİSA yöntemi antijen-antikor ilişkisinin, antikorlara bağlanmış bir enzimin aktivitesini izlemekle araştırılması temeline dayanır.

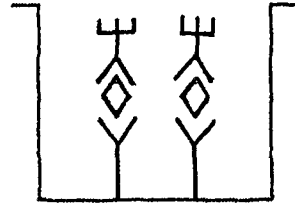
ELİSA yöntemi ile hem antijen, hem de antikor araştırılabilir. Bu yöntem ile antikor araştırmak için, önceden üzerine bilinen antijen tespit edilmiş olan özel mikroplyetler kullanılır ve test serum dilüsyonları ile inkübe edilip yıkanır. Daha sonra enzimle işaretlenmiş antiimmunglobülin eklenir ve tekrar inkübe edilir. Sistemde oluşan enzim aktivitesi spesifik bir substrat eklenerek ölçülür ve renk değişikliği kolorimetrik olarak okunur.

ELİSA yöntemi ile antijen araştırılmak istendiğinde, bilinen antikor katı bir yüzeye tespit edilir. Daha sonra antijen aranacak test serumu eklenir ve yıkanır. Sistem üzerine enzimle işaretli ikinci antikor eklenir, inkübe edilir ve yıkandıktan sonra substrat eklenip enzim aktivitesi kolorimetrik olarak ölçülür.

Kullanılan başlıca enzim ve substratlar peroksidaz, alkalen fosfataz, bela galaktosidaz enzimleri ve bunların substratlarıdır.

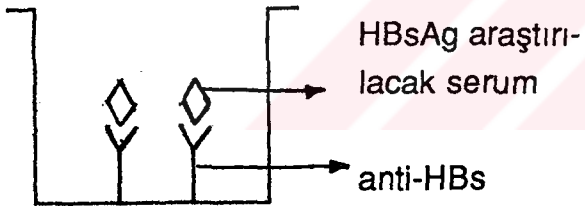


1. Anti-HBs tesbit edilmiş mikropleyt

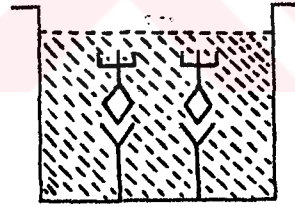


Enzimle işaretli anti-HBs bileşiği

3. Enzim İşaretli ikinci antikor ilave edilir.



2. Anti-HBs tesbit edilmiş mikropleyt üzerinde HBsAg arayacağımız serum ilave edilir. HBsAg varsa anti-HBs'ye bağlanır. Yıkanır.



4. İnkübasyon yıkama sonra enzim aktivitesi kolorimetrik olarak okunur. Antijen yoğunluğu saptanır.

Şekil 6: ELISA yöntemi ile HBsAg araştırılma prensibi (55).

ELİSA duyarlı bir yöntem olup, RIA'deki gibi özel bir sistem gerektirmediğinden, günümüzde çok kullanılan popüler bir yöntemdir (9,54, 55,56).

#### **5. Reverse Pasif Hemaglütinasyon (RPHA) (Dolaylı=Pasif=İndirek Hemaglütinasyon=Ters Pasif Hemaglütinasyon) Yöntemi**

RPHA, aglütinasyon yönteminin bir modifikasyonudur. Aglütinasyon, antikorları ile birleşen mikroorganizmalar, alyuvarlar, spermatozoitler gibi şekilli cisimlerin birbirine yapışması ve kümelenmesine denir (15).

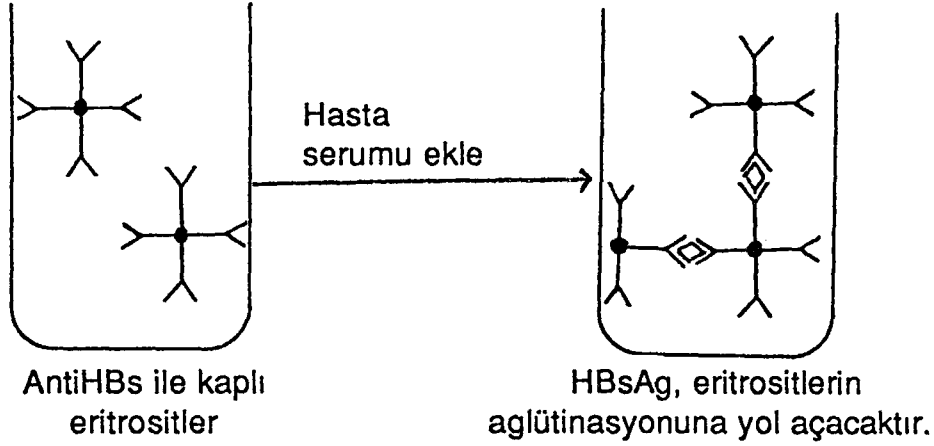
Aglütinasyon direk ve indirek (pasif=dolaylı) olarak sınıflandırılabilir.

Direk aglütinasyonda, hücre veya çözünmeyen partikül halindeki antijen direk olarak antikor ile aglütine olur. Örnek: A grubu eritrositlerin, anti-A serumu ile aglütinasyonu.

İndirek aglütinasyonda, erimiş haldeki antijenler, alyuvarlara veya latex, bentonit, inert partiküllerde adsorbe ettirilir. Ortama antijene özgül antikor eklendiğinde, hücre veya partiküllerin birbirine yapışması sonucu aglütinasyon olur. Örnek; Romatoid faktör için latex aglütinasyon deneyi.

Partiküller veya eritrositlerin antikorlarla kaplanarak, bilinmeyen antijenin aranmasına ise, reverse pasif hemaglütinasyon (ters pasif hemaglütinasyon, ters dolaylı hemaglütinasyon) denir (15,56).

RPHA, HBsAg aramalarında kullanılan bir yöntemdir. Yöntemin temeli, antiHBs antikorları ile kaplanmış eritrositlerin, HBsAg varlığında hemaglütinasyonudur.



**Şekil 7:** RPHA yöntemi ile HBsAg araştırılma prensibi (48)

Aglütinasyon olması ve olmaması için geçerli nedenler, bu yöntemin modifikasyonu olan RPHA yöntemi için de söz konusudur.

Aglütinasyon olabilmesi için antijeni taşıyan hücre veya diğer parçacıkların elektrolitli ortamda suspansiyon halinde olmaları gereklidir. Böyle bir ortamda, çok küçük parçacıklar, negatif elektrik yüklü olduklarından birbirlerini iterek asıntı durumunda bulunurlar (elektrostatik itme gücü).

Antijenle, antikorun birleşme isteği itme gücünden fazla ise, antikorlar bu parçacıklardaki antijenlere yapışırlar. Aralarında köprüler kurarak elektrikli özelliklerini kaldırır, gözle görülen büyük parçacıklar oluşarak dibe çöker. Bazı durumlarda bu mekanizmanın çalışması aksayabilir. Ortamda elektrolitler, parçacıklara bağlı antijenler ve uygun antikorlar bulunduğu halde aglütinasyon olmaz. Bunun çeşitli sebeplerinden biri de prozon olayıdır (55).

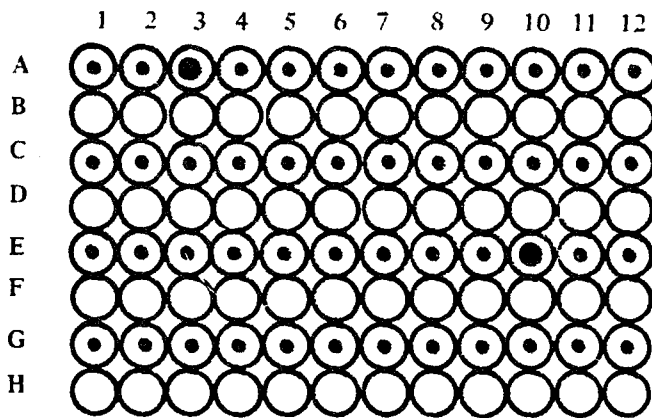
**Prozon olayı:** Gözle görülür aglütinasyon oluşması için antijen ve antikorun eşit miktarda bulunmaları gereklidir. Ortamda antikor fazlalığı varsa, antijenli parçacıkların her birleşme yanı sıra antikor ile birleşecek ve tüm antijenler bloke olacaktır. Antikorların serbest kalan yanları ise birleşecek ve köprü

oluşturacak serbest antijen parçacığı bulamayacak ve aglütinasyon olmayacaktır.

RPHA yönteminde, prozon fenomenine bağlı yalancı negatif sonuçlar olabileceği bilinmektedir (48).

RPHA testi yapılırken, U-tabanlı bir defada kullanılıp atılan plaklar kullanılmaktadır. U-taban hücrelerin daha hızlı çökmesini sağlar. Her çukura saflaştırılmış anti-HBs ile kaplı eritrosit suspansiyonundan birer damla konularak, HBsAg aranacak serumlar eklenir ve 30 dakikadan 2 saate kadar değişen süre sonunda sonuçlar gözle okunur. Hemaglütinasyon varsa hücreler çukur tabanındaki yüzeye yayılır, hemaglütinasyon yoksa hücreler çukur tabanında bir halka veya düğme şeklinde çöker (57).

RPHA uygulama kolaylığı, ayıraçlarının ekonomik olması ve pahalı gerece gereksinim göstermemesi gibi özellikleri nedeniyle yaygın olarak kullanılabilen bir yöntemdir, ancak RIA ve ELİSA yöntemlerinden daha az duyarlıdır. RPHA yönteminde özgül olmayan antikorların varlığına bağlı yalancı pozitif sonuçlar ve prozon fenomenine bağlı yalancı negatif sonuçlar olabileceği de bildirilmiştir (1,23,48).



**Şekil 8:** Reverse Pasif Hemaglütinasyon yöntemi ile elde edilen HBsAg'nin pozitif ve negatif görünüşleri (39).

Üçüncü kuşak yöntemlerden RIA, HBsAg taramalarında en duyarlı yöntemlerden kabul edilmektedir (1,8). Halen diğer deneylerin duyarlılık ve özgüllüğünü saptamada referans deney olarak kullanılmaktadır. Ancak pahalı gereç, kısa yarılanma ömürlü ayıraçlara gereksinim göstermesi ve radyo izotoplarla çalışma riski gibi dezavantajları vardır.

ELİSA duyarlılık bakımından RIA'ya yakındır, ayrıca radyoizotop riskinin ortadan kalkması, ayıraçların tüketim süresinin uzunluğu gibi avantajları da vardır (1,57). Ancak, günümüzde ticari kitleri oldukça pahalı olan bir yöntemdir.

RPHA duyarlılık bakımından, RIA ve ELİSA yöntemlerinden sonra gelmektedir. RPHA hızlı, ucuz ve basit bir test olarak ELİSA'nın kullanılmadığı merkezlerde, rutin taramalarda kullanılacak bir testtir (10). RPHA'nın avantajlarından biri de kan bankalarında çalışan teknisyenler için çok bilinen ve kolay bir test olmasıdır. Tekniğe dikkat etmek ve stabil eritrosit ayıraçlarının hazırlanması koşulunda duyarlılığının RIA'ya yakın olduğunu bildiren çalışmalar vardır (48,57).

## GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmada önceden ELİSA ile taranmış ve HBsAg pozitif bulunmuş serumlar RPHA yöntemi ile tarandı. RPHA yöntemi ile HBsAg negatif olarak değerlendirilen serumların, muhtemelen içerdiği antijenlerin test eritrositlerine adsorbe olduğu, ancak antijenin gözle görülür aglütinasyon oluşturacak miktarda olmadığı düşünülerek aynı yöntemle; yöntemin esası değiştirilmeksizin, ilk test çukurundan belirli miktar serum (üst sıvı) geri alınıp, üstüne yeniden aynı miktarlarda test serumu eklenerek, test tekrar edildi.

**Serumlar:** Bu çalışmada 131'i değişik zamanlarda G.Ü.T.F. Mikrobiyoloji Laboratuvarında, 50'si Yüksek İhtisas Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarında, 26'sı H.Ü.T.F. Mikrobiyoloji Laboratuvarında ELİSA testi ile taranarak, HBsAg pozitif bulunmuş toplam 207 serum ile G.Ü.T.F. Mikrobiyoloji laboratuvarında ELİSA ile taranarak HBsAg negatif bulunan 25 serum kullanıldı. Serumlar, çalışma zamanına kadar -20°C'lik derin dondurucuda saklandı.

**Testin Çalışma Prensibi:** Tannik asitle duyarlandırılmış hindi eritrositleri yüzeyine antikor globülinler bağlanmıştır. Antikor, HBsAg'ye karşı elde edilmiş at antiserumunun ileri derecede saflaştırılmasıyla hazırlanılarak,



tannik asitle işlenmiş hindi eritrositlerine bağlanmıştır. Elde edilen bu duyarlı hücre suspansiyonu, HBsAg varlığında aglütine olacaktır.

Çok düşük oranda normal insan serumu, at serum proteinleri veya hindi eritrositleri ile reaksiyon vererek, duyarlı hücrelerin özgül olmayan aglütinasyonuna yol açabilir. Normal at immunglobülini ile kaplanmış kontrol hücreleri ile bu özgül olmayan reaksiyonlar kontrol edilebilir.

#### Araştırmada Kullanılan Cihaz ve Ayırmaçlar:

1. 2 Ml.lik otomatik pipet (Oxford)
2. 25 Ml.lik otomatik pipet (Oxford)
3. RPHA kiti (Hepatest-3, Wellcome Hemaglütinasyon Kiti, VK07).
4. RPHA testi 200 testlik olup, yeterince U tabanlı mikrotitrasyon plakları içermektedir.

#### Testte Kullanılan Ayırmaçların Bileşimi ve Hazırlanması

**1. Test Hücreleri:** Her test hücre şişesinde, aldehid ve tannik asitle işlendikten sonra, saflaştırılmış at HBs antikorları ile kaplanmış liyofilize hindi eritrositleri bulunur.

**2. Kontrol Hücreleri:** Her şişede, aldehid ve tannik asitle işlenmiş, normal at globülini ile kaplanmış liyofilize hindi eritrositleri bulunur.

**3. Sulandırıcı Tampon:** Her şişede 20 ml. veya 100 ml. normal hindi serumu, normal at serumu, normal insan serumu ve sodyum azid içeren, pH 7.2 olan fosfat tamponlu tuzlu su bulunmaktadır.

Tampon herhangi bir sulandırımına gerek olmadan, kullanıma hazırdır.

**4. Pozitif Kontrol:** Her şişede, 60°C de en az 10 saat ısıtılarak inaktive edilmiş, HBsAg içeren 0.5 ml dilue insan serumu bulunur.

Tarama esnasında pozitif kontrol, test hücreleri ile tam bir aglütinasyon vermeli, kontrol hücrelerinde ise aglütinasyon görülmemelidir.

**5. Negatif Kontrol:** Her şişede 0.5 ml. normal insan serumu bulunur.

Negatif kontrol, test hücreleri ve kontrol hücreleri ile aglütinasyon vermemelidir.

### **Deneyin Yapılışı:**

1. Toplanmış olan serumlar, deneyden önce derin dondurucudan çıkarılarak çözülmeleri beklendi. Tüm serumlar eritrositler ve gözle görülebilen partiküller açısından değerlendirildi.

2. Tüm ayraçlar deneyden önce oda ısısına alınarak, test ve kontrol hücreleri, testten 15 dakika önce 1'er ml. sulandırıcı tamponla sulandırıldı. Test ve kontrol hücreleri sulandırıldıktan sonra artanlar -20°C'de 1 ay saklanabilmektedir.

3. U tabanlı mikroyetler kontrol ve deney serumları için işaretlendi.

4. 25 µl'lik otomatik pipet kullanılarak, birer damla sulandırıcı tampon, plâktaki işaretli çukurlara konuldu. Her serum örneği, pozitif ve negatif kontrol için birer çukur ayrıldı.

5. 2 µ'l'lik mikropipet ve bir defada kullanılıp atılan uçlar kullanılarak, uygun çukurlara birer damla serum örneği ve kontroller eklendi. Her örnek için ayrı uç kullanıldı.

6. 25 µ'l'lik mikropipetle test çukurlarına birer damla test hücre suspansiyonu damlatıldı.

7. Plâk düz zemin üzerinde hafifçe çalkalanarak hücreler karıştırıldı.

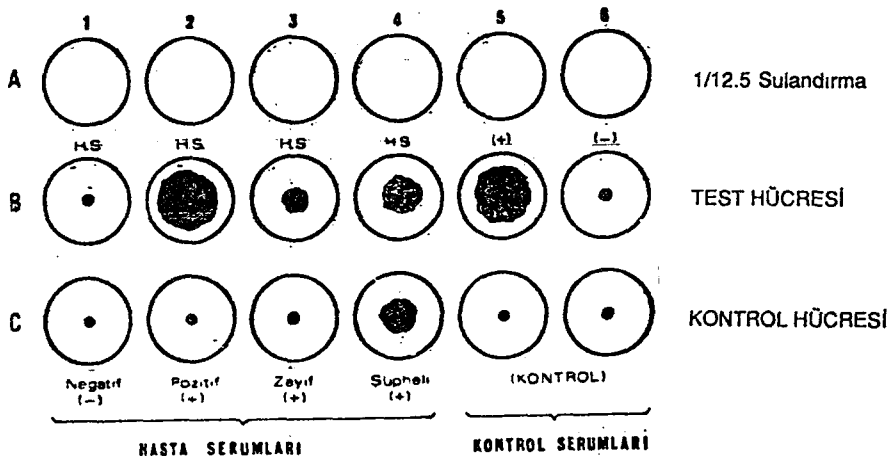
8. Plâk üzerine plâstik bir kapak örtüldü. Gün ışığı ve titreşimden uzakta, oda ısısında bırakıldı.

9. 1/2 ve 2 saat sonra sonuçlar okundu ve kaydedildi.

#### Sonuçların Okunması:

Pozitif reaksiyonda; hücreler kısmen veya tamamen kümelenerek çukurun tabanına yayılırlar.

Negatif reaksiyonda, hücreler çukurun tabanında düğme veya halka görüntüsü oluştururlar.



Şekil 9: RPHA yöntemi ile HBsAg aranması ve değerlendirilmesi (50).

Sonuçlar bu bilgilere göre değerlendirildikten sonra pozitif bulunan örneklerle konfirmasyon testi uygulandı. Bunun için pozitif bulunan serum örnekleri aynı anda test ve kontrol hücreleri ile karşılaştırıldı. Konfirmasyon testinde, testte anlatılan yöntem aynen uygulandı.

### **Konfirmasyon Testinin Yorumlanması:**

Sonuçlar okunurken, pozitif bulunan örnekler için test çukurunda aglütinasyon görülmelidir. Kontrol çukurunda ise aglütinasyon olmamalıdır. Bu test sonuçlarındaki pozitifliğin, yalancı pozitiflik olmadığını gösterir.

Konfirmasyon testi sonuçları bu esasa göre okundu ve kaydedildi.

Yalancı pozitif reaksiyonlara rastlanıldığında, konfirmasyon testinin ikinci aşaması uygulanır. Bu aşamada üç hacimli hemaglütinasyon inhibisyon testi uygulanır. Test için üç çukur ayrılır. Önce her üç çukura da uygun dilüsyondaki absorbe test serumundan birer damla damlatılır. daha sonra ilk çukura HBsAg'ne karşı at anti serumu, ikinci ve üçüncü çukura birer damla normal at serumu damlatılır. Birinci ve ikinci çukura test hücreleri, üçüncü çukura kontrol hücreleri eklenir. Sonuçlar okunurken, birinci ve üçüncü çukurda negatif reaksiyon, ikinci çukurda ise pozitif reaksiyon görülmesi, gerçek pozitif reaksiyonu gösterir.

RPHA ile taranan serumlardan, negatif bulunanlara, ikinci bir aşama uygulandı. İkinci aşamada ELİSA ile pozitif bulunmuş olmalarına karşın, RPHA ile negatif değerlendirilen serumlardaki antijen miktarının RPHA ile ölçülemeyecek miktarda olup olmadığını gösterebilmek amacıyla, ilk test çukurları üzerinde sırasıyla şu işlemler uygulandı.

1. Test ukurundaki st sıvıdan, otomatik pipetle 25  $\mu$ l dikkatle aspire edildi.

2. Çukurda kalan eritrosit kümesi üzerine aynı hastanın 1/12.5'luk serumundan 25  $\mu$ l eklendi. Aynı pipetle, eritrositlerin bu yeni sıvıda dağılması pipetlenerek sağlandı.

3. Mikropleyt oda ısısında, ışık ve titreşimden uzak 2 saat bırakıldı. Süre sonunda tekrar değerlendirildi.

Bu aşamadan sonra HBsAg negatif bulunan, ancak ELİSA yöntemi ile pozitif bulunmuş olan serumlara, yukarda tanımlanan konsantrasyon işlemi, ikinci kez uygulandı. Sonuçlar okundu ve kaydedildi.

Yukardaki işlemler, ELİSA ile taranarak, HBsAg negatif bulunan 25 seruma da uygulandı. Sonuçlar okundu, kaydedildi.

## BULGULAR

ELİSA ile taranarak HBsAg pozitif bulunmuş toplam 207 serum 4 grup halinde, önce RPHA testi ile tarandı.

**Tablo-VI: ELİSA ve RPHA testleri ile HBsAg pozitif Serum Sayısı**

	ELİSA ile HBsAg(+) Sayı	RPHA ile HBsAg(+) Sayı	RPHA ile HbsAg(-) Sayı
1. grup	106	74	32
2. grup	26	20	6
3. grup	50	47	3
4. grup	25	20	5
Toplam	207	161	46

RPHA'nun ELİSA'ya göre pozitif serumları bulmadaki duyarlılığı, 1. grup serumlar için %69.8, 2. grup serumlar için %76.9, 3 .grup serumlar için %94.0, 4. grup serumlar için %80.0, toplam serumlar için %77.7 olarak bulunmuştur.

Sonuçlar, bağımlı örnekler için Khi kare testi uygulanarak önemlilik açısından değerlendirilmiştir.

RPHA'nun ELİSA'ya göre duyarlılık farkı 1.grup için %30.2, 2. grup için %23.1, 3.grup için %6.0, 4. grup için %20.0, serumların toplamı söz konusu olduğunda, %22.3 olarak bulunmuştur.

**Tablo-VII:** RPHA'nun ELİSA'ya Göre Duyarlılığı ve ELİSA'dan Duyarlılık Farkı

	RPHA'nun ELİSA'ya Göre Duyarlılığı (%)	RPHA'nun ELİSA'dan Duyarlılık Farkı (%)	Önemlilik Derecesi p; 0.05
1. grup	69.8	30.2	p<0.05
2. grup	76.9	23.1	p<0.05
3. grup	94.0	6.0	p>0.05
4. grup	80.0	20.0	p<0.05
Toplam	77.7	22.3	p<0.05

- Tabloya ilişkin açıklama

- Bağımlı örneklerde Khi kare testi ile p<0.05 önemli, p>0.05 önemsiz.

İstatistiksel olarak, RPHA'nun ELİSA'ya göre duyarlılık farkı birinci, ikinci ve dördüncü grup için önemli, üçüncü grup içinse önemsiz bulunmuştur.

RPHA ile pozitif bulunan serumlara konfirmasyon testi uygulandığında yalancı pozitiflik olmadığı görülmüş ve konfirmasyon testinin ikinci aşaması uygulanmamıştır. Çalışmada kullanılan RPHA testinde yalancı pozitiflik (non spesifik aglütinasyon) olmadığı kabul edilmiştir.

ELİSA ile HBsAg pozitif bulunduğu halde, RPHA testi ile negatif bulunan serumlarda, aynı yöntem ile, aynı dilüsyondaki hasta serumu bir misli artırılarak, test tekrarlandı. Amaç, antijen miktarını konsantre etmek

olduğundan bu aşamaya 1. konsantrasyon aşaması denildi ve sonuçlar şöyle bulundu;

RPHA ile 1. gruptaki 106 serumdan 74'ü HBsAg pozitif bulunmuşken, 1. konsantrasyon aşamasından sonra HBsAg pozitif serum sayısı 88 olarak bulundu. 2.gruptaki 26 serumdan 20'si RPHA ile HBsAg pozitif bulunmuşken, 1. konsantrasyon aşamasından sonra bu sayı 26'ya yükseldi, 3. grup serumlar için 47'den 50'ye, 4. grup serumlar içinse HBsAg pozitif sayısı 20'den, 23'e yükseldi. Toplam 207 serumdan RPHA ile 161'i HBsAg pozitif bulunurken, 1. konsantrasyon aşamasından sonra, HBsAg pozitif serum sayısı 187 olarak bulundu.

**Tablo-VIII:** ELİSA, RPHA ve 1. konsantrasyondan sonra RPHA ile HBsAg pozitif Serum Sayısı.

	ELİSA ile HBsAg (+) Sayı	RPHA ile HBsAg (+) Sayı	1. konsantrasyondan sonra RPHA ile HBsAg(+) Sayı
1. grup	106	74	88
2. grup	26	20	26
3. grup	50	47	50
4. grup	25	20	23
Toplam	207	161	187

1. konsantrasyon aşaması uygulandıktan sonra RPHA testinin, ELİSA'ya göre duyarlılığı, 1. grup için %88.0, 2. grup için %100, 3. grup için %100, 4.grup için %92 ve toplam serumlar için %90.3 olarak bulunmuştur. İstatistiksel olarak, 2. ve 3. grup serumlar için RPHA ile ELİSA arasında



anlamli bir duyarlilik farki kalmadiğı, 1. ve 4. gruplar için ise halen anlamli bir duyarlilik farki olduğu bulunmuştur.

**Tablo-IX:** 1. Konsantrasyon Aşamasından Sonra RPHA'nun ELİSA'ya Göre Duyarlılığı ve ELİSA'ya Göre Duyarlılık Farkı

	1. konsantrasyon aşamasının ELİSA'ya göre duyarlılığı (%)	1. konsantrasyon ile ELİSA'nın duyarlılık farkı (%)	Önemlilik Derecesi p: 0.05
1. grup	88.0	12	p<0.05
2. grup	100	0	p>0.05
3. grup	100	0	p>0.05
4. grup	92.0	8.0	p<0.05
Toplam	90.3	9.7	p<0.05

Klasik yöntemle uygulanan RPHA'nun, 1. konsantrasyon aşaması uygulandıktan sonraki RPHA'ya göre duyarlılığı 1. grup için %82.9, 2. grup için % 73.0, 3. grup için % 92.0, 4. grup için % 82.0 toplam serumlar için %85.5 olarak bulunmuştur.

**Tablo-X:** RPHA'nun, 1. Konsantrasyon Aşamasına Göre Duyarlılığı ve Duyarlılık Farkı.

	RPHA'nun, 1. Konsantrasyona Göre Duyarlılığı (%)	RPHA'nun 1.Konsantrasyondan Duyarlılık Farkı (%)	Önemlilik p:0.05
1. grup	82.9	17.1	p<0.05
2. grup	73.0	27.0	p<0.05
3. grup	92.0	8.0	p>0.05
4. grup	82.0	18.0	p<0.05
Toplam	85.5	14.5	p<0.05

İstatistiksel olarak, 1., 2. ve 4. grup serumlar için, 1. konsantrasyon aşamasının RPHA'nun duyarlılığını önemli derecede artırdığı bulunmuştur. 3. grup serumlar için, istatistiksel olarak iki yöntem arasında önemli bir fark bulunamamıştır.

**Tablo-XI:** RPHA ve 1. Konsantrasyon Aşamasının ELİSA'ya Göre Duyarlılıkları

	RPHA-duyarlılık (%)	1. Konsantrasyon duyarlılık (%)
1. Grup	69.8	88.00
2. grup	76.9	100.0
3. grup	94.0	100.0
4. grup	80.0	92.0
Toplam	77.7	90.3

1. konsantrasyon aşamasından sonra HBsAg negatif bulunan serumlar, aynı dilusyonda bir misli daha artırılarak, yani ikinci kez konsantre edilerek tekrar test edildi. Bu aşamaya 2. konsantrasyon aşaması denildi. 1. konsantrasyon aşamasından sonra 2. ve 3. grup serumlarda HBsAg negatif serum bulunmadığı için bu gruplarda 2. konsantrasyon aşaması uygulanmadı.

**Tablo-XII:** ELİSA, RPHA, 1. Konsantrasyon ve 2. Konsantrasyon Aşamalarında Bulunan HBsAg(+) Serum Sayısı.

	ELİSA ile HBsAg(+) Sayı	RPHA ile HBSAg(+) Sayı	1. Konsantrasyonda HBSAg(+) Sayı	2. Konsantrasyonda HBSAg(+) Sayı
1. grup	106	74	88	97
2. grup	26	20	26	-
3. grup	50	47	50	-
4. grup	25	20	23	24

1. konsantrasyon yönteminin, 2. konsantrasyon yöntemine göre duyarlılığı 1. grup için % 90.7, duyarlılık farkı % 9.3, 4. grup için duyarlılığı % 95.8, duyarlılık farkı % 4.2 olarak bulunmuştur.

**Tablo-XIII:** 1. Konsantrasyon Aşamasının, 2. Konsantrasyon Aşamasına Göre Duyarlılığı ve Duyarlılık Farkı

	1. Konsantrasyonun 2. Konsantrasyona göre duyarlılığı (%)	1. Konsantrasyonun 2. Konsantrasyondan duyarlılık farkı (%)	Önemlilik (p: 0.05)
1. Grup	90.7	9.3	p<0.05
4. grup	95.8	4.2	p>0.05

İstatistiksel olarak 1. grup için, 2. konsantrasyon aşamasının, 1. konsantrasyon aşamasına göre duyarlılığı önemli derecede artırdığı, 4. grup için iki yöntem arasında önemli bir duyarlılık farkı olmadığı bulunmuştur.

Klasik RPHA testinin, 2. konsantrasyon aşamasına göre duyarlılığı 1. grup için % 75, duyarlılık farkı % 25 4. grup için duyarlılığı % 83.3, duyarlılık farkı % 16.7 olarak bulunmuştur.

**Tablo-XIV:** Klasik RPHA'nun, 2. Konsantrasyon Aşamasına Göre Duyarlılığı ve Duyarlılık Farkı

	RPHA'nun 2. Konsantrasyona göre duyarlılığı (%)	RPHA'nun 2. Konsantrasyondan duyarlılık farkı (%)	Önemlilik (p:0.05)
1. grup	75.0	25.0	p<0.05
4. grup	83.3	16.7	p<0.05

İstatistiksel olarak, 2. konsantrasyon aşamasının uygulanmasının, klasik RPHA testinin HBsAg pozitifleri bulmadaki duyarlılığını önemli derecede artırdığı bulunmuştur.

2. konsantrasyon aşamasının, ELİSA'ya göre duyarlılığı 1. grup için % 91.5, duyarlılık farkı % 8.5, 4. grup için duyarlılığı % 96.0, duyarlılık farkı % 4.0 olarak bulunmuştur.

**Tablo-XV:** 2. Konsantrasyon Aşamasının ELİSA'ya Göre Duyarlılığı ve Duyarlılık Farkı

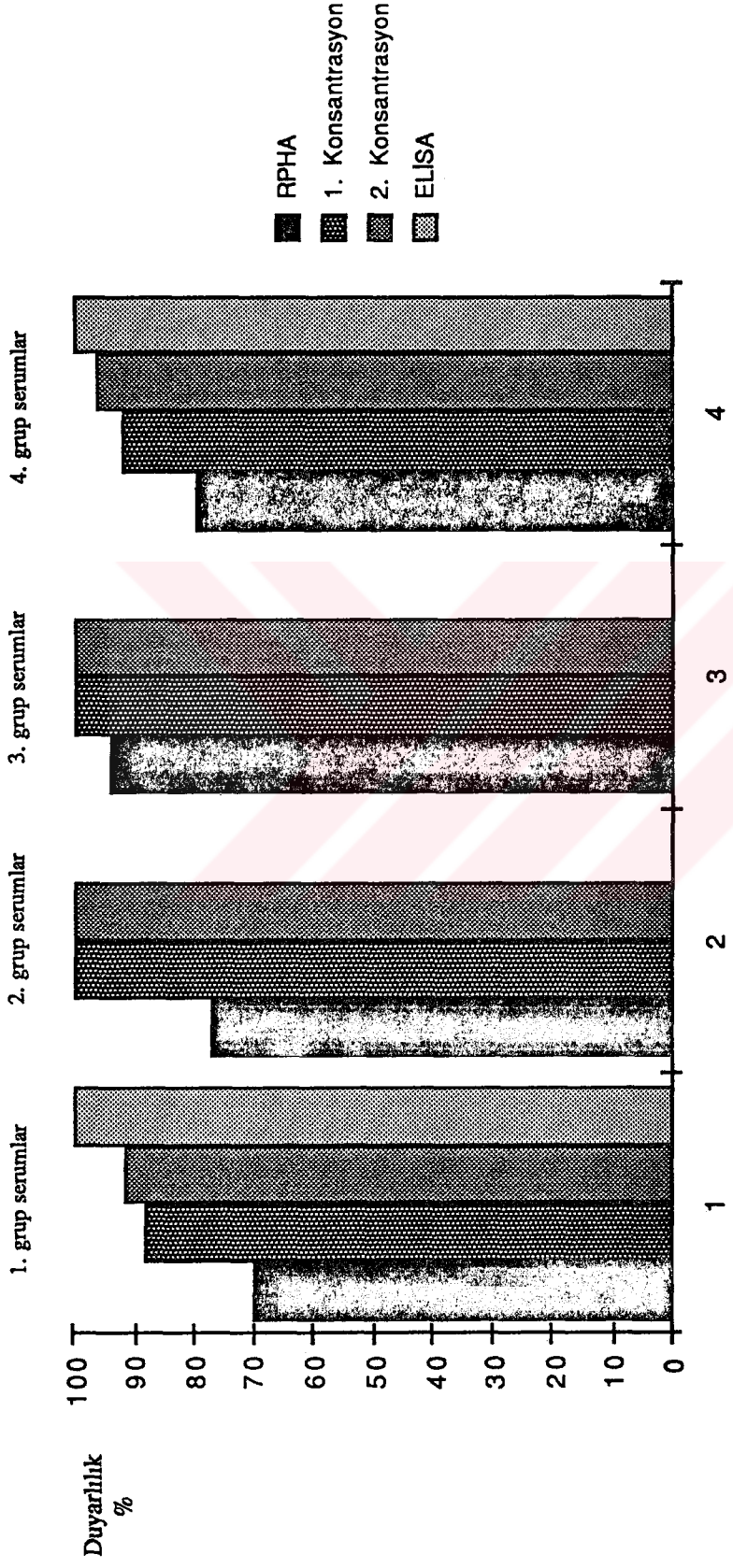
	2. Konsantrasyonun ELİSA'ya göre duyarlılığı (%)	2. Konsantrasyonun ELİSA'dan duyarlılık farkı (%)	Önemlilik (p:0.05)
1. grup	91.5	8.5	p<0.05
4. grup	96.0	4.0	p>0.05

İstatistiksel olarak, 1. grup için 2. konsantrasyon aşaması ile ELİSA testleri arasında halen önemli bir duyarlılık farkı olduğu, 4. grup için ise arada önemli bir duyarlılık farkı kalmadığı bulunmuştur.

**Tablo-XVI:** ELİSA, RPHA, 1. Konsantrasyon ve 2. Konsantrasyon Yöntemlerinde HBsAg(+) Bulunan Serum Sayısı ve ELİSA'ya Göre Duyarlılık Karşılaştırması.

	ELİSA HBsAg(+) Sayı	RPHA HBSAg(+) % olarak duyarlılık	1. Konsantrasyonda HBSAg(+) Sayı % olarak duyarlılık	2. Konsantrasyonda HBSAg(+) Sayı % olarak duyarlılık
1. grup	106	74(%69.8)	88(%88.0)	97(%91.5)
2. grup	26	20(%76.9)	26(%100 )	-
3. grup	50	47(%94.0)	50(% 100)	-
4. grup	25	20(%80.0)	23(%92.0)	24(%96.0)
Toplam	207	161(%77.7)	187(%90.3)	-

ELİSA ile HBsAg negatif bulunan 25 serum, önce klâsik RPHA testi ile tarandı ve tümü HBsAg negatif bulundu. 1. ve 2. konsantrasyon aşamalarının reaksiyonu değiştirip değiştirmediğini görmek için, 25 seruma, her iki aşamada uygulandı. Sonuçların değişmediği, bu aşamalar sonrasında da, 25 serumun HBsAg negatif olduğu bulundu.



**Şekil 10:** ELISA, RPHA, 1. Konstrasyon ve 2. Konstrasyon Yöntemlerinin Duyarlılıklarının Karşılaştırılması

## TARTIŞMA

Buradaki çalışmada önce, en duyarlı yöntemlerden kabul edilen ELİSA ile HBsAg taranarak pozitif bulunmuş olan serumlar, RPHA ile tekrar tarandı. RPHA'nun pozitifleri bulmada ELİSA'ya göre duyarlılığı, 1. grup için % 69.8, 2. grup için % 76.9, 3. grup için % 94.0, 4. grup için % 80.0, toplam serumlar için ortalama % 77.0 olarak bulunmuştur. Aradaki duyarlılık farkı birinci, ikinci ve dördüncü grup serumlar için anlamlı bulunmuştur.

HBsAg'nin tespit edilebilmesi amacıyla bugüne kadar değişik serolojik yöntemler geliştirilmiştir (9,11). Bunlardan birinci ve ikinci kuşak yöntemler duyarlılıkları az olduğundan terkedilmiş, çok daha duyarlı olan üçüncü kuşak yöntemler kullanılmaya başlanmıştır.

HBsAg taranmasında kullanılacak yöntemin duyarlı, özgül ve güvenilir olması gereklidir. Ancak tüm özelliklerin bir testte sağlanması da kolay değildir. Her yeni geliştirilen yöntem bir öncekinden üstün olmakla birlikte, rutin taramalarda çabuk sonuç veren ve uygulanması kolay olanlar geçerli olmaktadır (50).

1970'li yıllarda yaygın olarak kullanılan CIEP, tarihi bir test olan Ouchterlony'nin agar-jel difüzyonundan 10-30 kez daha duyarlıdır.

Uygulanması kolay olan ve kısa sürede sonuç veren bu yöntem, az duyarlı oluşu nedeniyle terkedilmiştir. Türet ve ark.larının RPHA ve CIEP'le kıyaslamalı olarak yaptıkları çalışmada, CIEP'in pozitifleri yakalamada, RPHA'dan % 25 daha az duyarlı olduğu bulunmuştur (50).

Wallace ve ark.larının RIA, RPHA ve CIEP'le kıyaslamalı olarak yaptıkları başka bir çalışmada, CIEP'in RPHA ve RIA'dan çok daha az duyarlı olduğu bildirilmiştir (58). Bilgehan ve ark.ları, RPHA'nun CIEP'den 4.5-6 kez daha duyarlı olduğunu bulmuşlardır (6). Withers ve ark.larının yaptıkları başka bir çalışmada, RPHA, CIEP'den % 35 daha duyarlı bulunmuştur (2).

İkinci kuşak yöntemlerden olan CIEP yeterince duyarlı olmadığından terkedilmiş, bunun yerini üçüncü kuşak testler almıştır. RPHA, ELİSA ve RIA üçüncü kuşak testlerdir. Ancak bu yöntemler arasında da duyarlılık ve özgüllük açısından önemli farklar bulunmuştur.

Üçüncü kuşak testlerden ELİSA ve RIA en duyarlı yöntemler olarak bilinmektedir (4). Literatürde, bu yöntemler arasındaki duyarlılık farkını belirten çalışmalarla, bizim çalışmamızda ELİSA ve RPHA arasında bulunan duyarlılık farkı ve yöntemlerin birbirlerine göre avantajları ve dezavantajları karşılaştırılmıştır.

Wallace ve ark.larının, kan vericilerinde hangi yöntemle HBsAg taranması gerektiği konusunda, büyük gruplarda CIEP, RPHA ve RIA ile kıyaslamalı olarak yaptıkları çalışma sonuçları şöyledir; 165.811 kişide yapılan bu çalışmada CIEP ile HBsAg negatif bulunan 9 kişi, sonradan RIA ve RPHA ile çalışıldığında pozitif bulunmuştur. Aynı araştırmacıların başka bir grup



üzerinde üç yöntem ile kıyaslamalı olarak yaptıkları çalışmada CIEP ile 27 serum HBsAg pozitif bulunurken, RPHA ile 39, RIA ile 41 serumda HBsAg pozitifliği bulunmuştur. Bu çalışma sonuçlarına göre, CIEP'in yeterince duyarlı olmadığı, RIA'nın ise RPHA'dan çok az daha duyarlı olduğu bulunmuş ve daha ucuz ve hızlı bir yöntem olan RPHA'nun, bir kan merkezinde rutinde kolay ve uygun bir yöntem olarak kullanılabileceği, ancak RIA'nın zahmetli bir yöntem olmasına karşın, konfirmasyon testi olarak düşünülebileceği bildirilmiştir (58).

Dünya Sağlık Örgütüncce HBsAg taramalarında en duyarlı yöntemin RIA olduğu, bunun kullanılmadığı merkezlerde RPHA yönteminin kullanılabileceği bildirilmektedir (1, 8, 10, 32).

Robert Wei ve ark.larının çalışmasında, ELİSA ve RIA eşit duyarlılıkta bulunmuştur (11). Yurdumuzda Bilgiç ve ark.larının yaptıkları bir çalışmada da ELİSA ve RIA'nın eşit duyarlılıkta olduğu bulunmuştur ve ELİSA ile RIA duyarlılıkları birbirine yakın yöntemler olarak bildirilmiştir (8, 39).

Cayzer ve ark.larının RIA ile HBsAg pozitif bulunan serumlarda, hemaglutinasyon yöntemi ile yaptıkları çalışmada, hemaglutinasyon yöntemi ile RIA arasında çok az duyarlılık farkı bulunduğu, HBsAg taramalarında RPHA'nun hız, basitlik ve fiyat açısından RIA'dan çok daha uygun olduğu bildirilmiştir (57).

Kumdalı ve ark.larının ELİSA, RIA ve RPHA yöntemleri ile kıyaslamalı olarak yaptıkları çalışmada, ELİSA'nın RPHA'dan duyarlılık farkı % 19.56, RIA'nın RPHA'dan duyarlılık farkı % 17.49, ELİSA'nın RIA'dan duyarlılık farkı %

2.07 olarak bulunmuştur. Bu çalışma sonuçları Waters 6. ve ark.larının, ELİSA'nın RIA'den % 2 daha duyarlı olduğunu belirleyen çalışmaları ile Kagoki J.'nin ELİSA'nın RIA'den % 2.2 daha duyarlı olduğunu belirleyen çalışmaları ile uyumlu bulunmuş ve bu çalışmalarda ELİSA en duyarlı yöntem olarak belirlenmiştir (11).

Çalışmamızda, ELİSA ile RPHA'nun duyarlılık farkı, birinci, ikinci ve dördüncü grup serumlar için yukarda belirtilen çalışma sonuçları ile uyumlu bulunmuştur. Üçüncü grup serumlar için duyarlılık farkı % 6 olarak bulunmuş ve bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlenmiştir. RPHA'nun ELİSA'ya göre duyarlılık azlığı, zayıf reaksiyonlu serumlar için söz konusu olduğundan, bu grupta zayıf reaksiyonlu serumların az sayıda olması ihtimali düşünülebilir.

Birinci grup için duyarlılık farkı, % 30.2 gibi yüksek oranda bulunmuştur. Bu oran, Hidenari ve ark.larının ELİSA ve RIA'nın, RPHA'dan % 30 daha duyarlı olduğunu belirleyen çalışmaları ile uyumludur (11). Literatürde, ELİSA'nın çalışılması sırasında, teknik elemanların deneyimleri ile ilgili olarak yalancı pozitif reaksiyonlar bulunabileceği bildirilmiştir (7,8). Çalışmamızda kullandığımız, birinci grup olarak belirlediğimiz 106 serum, G.Ü.T.F. Mikrobiyoloji Laboratuvarında, ELİSA'nın henüz rutin olarak kullanılmadığı 1989-90 yıllarında bir tez çalışması için ilk kez ELİSA ile yapılmış HBsAg taramaları sonucunda elde edilmişti. Birinci grup için ELİSA ile RPHA arasındaki yüksek duyarlılık farkının, ELİSA'daki yalancı pozitiflik oranının yüksek olması ihtimali ile ilişkili olabileceği de düşünülebilir.

ELİSA en az RIA kadar, hatta bazı çalışmalara göre RIA'dan daha duyarlı olmasının yanısıra, stabil ayıraçlarının hazırlanabilmesi, RIA'daki kadar pahalı gereçlere gereksinim göstermemesi, radyoizotoplarla çalışma riskini ortadan kaldırması gibi üstünlükleri de olan bir yöntemdir (1,8). Ancak ELİSA da ticari kitleri pahalı, ayrıntıları dikkat edilmesi gereken, uzun, komplike ve teknik deneyim isteyen bir yöntemdir (7,8,26). 1978-79 yılları arasında çeşitli laboratuvarlarda HBsAg taramalarında kullanılan yöntemleri karşılaştıran bir çalışmada, en çok yalancı pozitifliğin ELİSA ve Latex testlerini kullanan laboratuvarlardan geldiği bulunmuştur ve bu sonucun, kitin yeni çıktığı dönemde deneyimsiz teknisyenlerle çalışılmasına bağlı olduğu düşünülmüştür (7).

ELİSA testi yapılırken kontrol edilmesi gereken pek çok değişken söz konusudur. Örneğin, yıkama işlemi sırasında, mikropleytlerin yıkanması tam olmalı, ancak fazla da olmamalıdır. Aşırı kurutulması, peroksidaz enziminin inaktivasyonuna yol atığından, sonuçtaki absorbans değerleri düşecektir (8,26). Ayrıca taze serumlarda yalancı pozitifliğin daha çok olduğu düşünüldüğünden, serumların 4<sup>o</sup>C'de 1-2 gün saklanması önerilmektedir (8).

Enzim substrat solusyonu (0-phenilenediamine) stabil olmadığından, hazırlandığında en geç 1 saat içinde tkutilmelidir. Enzim reaksiyonu sonucu oluşan renk de stabil olmadığından, test 2 saat içinde okunmalıdır. Okuma geciktiğinde, testin tekrarlanması gerekmektedir (8).

Ayrıca, katı yüzey için kullanılan plastiklerdeki değişkenlik, serum bulunan tüplerin temiz olmaması, testin uygulanması sırasındaki pipetleme hataları da test sonuçlarının güvenilirliğini etkilemektedir. Bunlar dışında, her

testte pozitif ve negatif kontrol, substrat kontrolü ve konjugat kontrollerinin yapılması gerekmektedir (26).

ELİSA testinin yapılması sırasında, inkübasyon işlemleri için etüv, yıkama işlemleri için otomatik yıkama cihazı, okuma işlemleri için spektrofotometre gibi pahalı cihazlar gerekmektedir. Testin yapılma süresi, en az 3 kez uygulanan 30'ar dakikalık inkübasyon işlemleri ile birlikte toplam 3-4 saatlik bir zaman gerektirmektedir. Bunun dışında, ELİSA'nın günümüzdeki ticari kitleri bir seferde 96 serum çalışılmak için hazırlanmıştır. Bu nedenle, az sayıda serumun HBsAg için taranması gerektiğinde, test başına birim fiyatı çok yükselmiş olacağından, genellikle ELİSA ile çalışan merkezlerde, bu sayının tamamlanması beklenmektedir. Sonuçta acil olarak HBsAg çalışılması gerektiğinde, ELİSA yerine hızlı, kolay ve basit bir test uygulanması gerekmektedir.

ELİSA, RIA'ya üstünlükleri ve yüksek duyarlılığı nedeniyle çok popüler ve tüm modern laboratuvarlarda kullanılması gereken bir yöntemdir. Ancak küçük merkezlerde, kan bankalarında, ELİSA'nın bulunmadığı merkezlerde, hızlı sonuç verilmesi gereken durumlarda ve ülkemiz gerçekleri doğrultusunda, basit, ucuz ve hızlı bir yöntem olarak RPHA düşünülmelidir.

Literatürlerde, RPHA'nun duyarlılığı ile ilgili çalışma sonuçları, birbirlerinden oldukça farklıdır. Wallace ve ark.larının, RPHA ve RIA ile kıyaslamalı olarak yaptıkları çalışmada, RPHA, RIA'den çok az daha duyarlı bulunmuştur (58). Ülkemizde Kumdalı ve ark.larının yaptıkları çalışmada, RPHA, ELİSA'dan % 19.56, RIA'dan % 17.49 gibi yüksek oranlarda farklı bulunmuştur (11).

Cayzer ve ark.larının çalışmalarında RPHA'nun duyarlılık bakımından, ikinci kuşak testlerle, RIA arasında bulunduğu bildirilmiş ve RPHA'nun hızlı, basit ve büyük miktarlarda serum taranmasında en az gerece gereksinim gösteren, kısa sürede sonuç veren bir yöntem olarak rutin taramalarda kullanılması önerilmiştir (56).

DSÖ, ivedi laboratuvar tanısında, ivedi sonuç veren yöntem olarak RPHA'ı önermekte, gerektiğinde referans deney olarak RIA ve ELİSA'dan yararlanılabileceğini bildirmektedir (1).

RPHA, tüm bu avantajlarına karşın, duyarlılığı az bir yöntem olarak bilinmektedir. ELİSA'nın duyarlılığı 1 ng/ml antijen olarak (8), RPHA'nun duyarlılığı ise 5 ng/ml antijen olarak kabul edilmektedir (11).

Kumdalı ve ark.larının 3 yöntem için kıyaslamalı olarak yaptıkları çalışmada, RPHA'nun, RIA ve ELİSA'dan önemli derecede daha az duyarlı bulunması, serumdaki HBsAg miktarları ile ilişkili olarak düşünülmüş ve serumdaki HBsAg miktarları azaldıkça, RPHA'nun duyarlılığının azaldığı bildirilmiştir (11). Zayıf reaksiyonlu serumlarda, RPHA'nun duyarlılığının az olduğu bilinmektedir (7).

RPHA'nun duyarlılığında, kullanılan eritrositlerin kalite kontrolü de önemli kabul edilmektedir. Buradaki çalışmada, ELİSA ile karşılaştırma amacıyla kullandığımız kitteki eritrositlerin hindi eritrositleri olması ve eritrositleri kaplamak amacıyla kullanılan antikorların ileri derecede saflaştırılmış olması avantaj olarak bildirilmektedir (56). İleri derecede saflaştırılmış antikor kullanıldığında, eritrositler optimum miktarda kaplandığından, total globülin miktarı minimuma indirilmiş olmaktadır ve

böylece özgül olmayan reaksiyonlar önlenmektedir. Ayrıca, hindi eritrositleri çekirdekli olduğundan, memeli eritrositlerinden hızlı çökmekte, test sonuçları kısa süre içinde okunabilmektedir. Hindi eritrositleri kullanmanın ek avantajı, toplumda hindi eritrositlerine karşı antikorların çok düşük düzeyde olmasıdır.

RPHA'u, özgüllüğü az ve yalancı pozitif sonuçları fazla bir yöntem olarak bildiren çalışmalar da vardır (48,57). Wallace ve ark.larının çalışmalarında, RPHA için yalancı pozitiflik % 0.66 olarak bildirilmiştir (8).

Enfeksiyöz Mononükleozis gibi bazı enfeksiyonların da, RPHA testinde yalancı pozitif sonuçlara yol açabileceği düşünülmüştür. Türet ve ark.larının yaptıkları çalışmada, heterofil antikorların, RPHA testine hiçbir etkisi olmadığı bildirilmiştir (57).

Çalışmamızda, RPHA yönteminde yalancı pozitifliğe rastlanmamıştır. RPHA'da yalancı pozitifliğe yol açan özgül olmayan antikorlar da, kontrol hücreleri ile adsorpsiyon sonucu uzaklaştırılabilmektedir (56).

RPHA ile ELİSA'yı duyarlılık bakımından karşılaştıran ve RPHA'nun, ELİSA'dan daha duyarlı olduğunu gösteren çalışmamızın ilk bölümünden sonraki aşamada RPHA'nun duyarlılığının artırılmasına yönelik bir çalışma yapılmıştır.

RPHA yöntemindeki yalancı negatiflikten prozon fenomeni sorumlu tutulmaktadır (48, 56). Ortamda antijen olduğu halde, antijen miktarı az olduğundan, antikorla kaplı hücrelere adsorbe olduğu halde, gözle görülebilir hemaglutinasyon oluşmamaktadır. Hasta serumunda, RPHA'nun yakalayamayacağı kadar düşük miktardaki antijen konsantre edilebilirse bu

yalancı negatifliğin ortadan kaldırılabileceğini ve duyarlılığın artırılabilceğini düşünerek, klasik RPHA yönteminin esasını bozmadan, negatif bulunan serumları, miktarlarını artırarak tekrar test ettik. Birinci konsantrasyon aşaması dediğimiz bu değışikliğin uygulanması sonucu, RPHA'nun duyarlılığı önemli ölçüde artırılmış ve ELİSA'nın duyarlılığına yaklaştırılmıştır.

Birinci gruptaki serumlar için RPHA'nun duyarlılığı % 69.8'den, % 88'e, ikinci ve üçüncü gruptaki serumlar için sırasıyla % 76.9 ve % 94'den, % 100'e, dördüncü gruptaki serumlar için % 80'den, % 92'ye çıkmış ve aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı derecede artmış bulunmuştur.

Çalışmamızda yalnız antijen analizi yapılan serumların miktarları artırıldığı ve ilk aşamada çalışılan test çukurları üzerinde çalışıldığından, kitin maliyetinde artış söz konusu olmamaktadır. Bu aşama için, test plâğı okunmak üzere tekrar bekletildiğinden, testin süresi uzamaktadır. Klâsik RPHA yönteminde, kullandığımız kit için testin okunması 2 saat sonunda olmakta, başka RPHA kitlerinde 30 dakika gibi daha kısa bir süre sonunda da sonuçlar değerlendirilebilmektedir. Sonuçların değerlendirilmesindeki gecikme, deneylerimiz için, yalnız zayıf reaksiyonlu serumlarda söz konusu olacaktır ki, bunların da oranı düşüktür.

RPHA'nun duyarlılığı, test serumlarına uygulanan birinci konsantrasyon aşamasından sonra artmış bulunduğundan, bu işlem sonucunda da negatif bulunan serumlara aynı işlem tekrar uygulandı ve bu aşama ikinci konsantrasyon aşaması olarak adlandırıldı. Yalnızca birinci ve dördüncü gruplarda negatif serumlar bulunduğundan, testin ikinci aşaması bu gruplara uygulanmıştır.

Birinci konsantrasyon aşamasından sonra, birinci grup için % 88'e ulaşmış olan duyarlılık, ikinci konsantrasyon aşamasından sonra % 91.5'a, dördüncü grup içinse % 92'den, % 96.0'ya ulaşmıştır. Bu sonuçlar, istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. İkinci konsantrasyon, duyarlılığı RPHA ve birinci konsantrasyon aşamasına göre anlamlı derecede artırmaktadır.

Konsantrasyon aşamalarından sonra, RPHA'nun duyarlılığının anlamlı olarak artması, rutin uygulanan RPHA'nun düşük antijenli serumlar için, duyarlılığının az olduğu konusundaki bilgileri doğrulamaktadır (7,11,58).

HBV bulaşının en yoğun olduğu yer kan bankalarıdır. Son yıllarda, az duyarlı yöntemlerle bile olsa yapılan rutin taramalar sonucunda, transfüzyona bağlı bulaş oranında önemli derecede azalma görülmüştür. Daha olumlu sonuçlar alınabilmesi için, daha duyarlı testlerin kullanılması gereklidir. Ülkemiz gibi HBsAg taşıyıcılık oranının yüksek olduğu ülkelerde bu durum daha da önem kazanmaktadır. Çeşitli araştırmacıların, farklı yöntemlerle çalışarak bildirdikleri sonuçlara göre, ülkemizde taşıyıcılık oranı % 7-10 civarındadır (21, 22, 28). Yaklaşık her 10 kişiden birinin taşıyıcı olduğu ülkemizde kan vericilerinin taranması ve duyarlı bir yöntem kullanılması, transfüzyonla geçişin önlenmesi bakımından çok önemlidir. Ancak kullanılacak yöntemin duyarlılığının yanısıra hızlı, basit, kolay ve ülkemiz gerçekleri doğrultusunda ucuz olması da gerekmektedir.

Ayrıca, bazen en duyarlı yöntemle çalışıldığında bile HBsAg negatif bulunan donör kanlarıyla de Hepatit B bulaştığı gösterilmiştir (14,17). Bazı olgularda HBsAg ölçülemeyecek kadar düşük titrelerde olabileceği gibi, bazı olgularda da, antijenin ölçülebilecek düzeyin altında ve üstünde



dalgalanmalar göstermesi nedeniyle, bazen HBsAg pozitif olmasına karşın en duyarlı yöntemle bile saptanılmamaktadır (14,17,21).

En duyarlı kabul edilen yöntemlerde bile  $10^9$  partikül/ml HBsAg yakalanabilirken, şempanzelerde enfeksiyona yol açmak için  $10^6$  partikül/ml HBsAg'nin yeterli olduğu gösterilmiştir (30).

ELİSA halen en duyarlı yöntem olarak, deneyimli teknisyenlerin bulunduğu büyük merkezlerde, modern laboratuvarlarda rutin taramalarda ve gerektiğinde referans deney olarak kullanılmaktadır. Ancak küçük merkezlerde, özel laboratuvarlarda, kan bankalarında uygulanması teknik ve mali bakımdan külfetlidir.

RPHA basit, kolay, hızlı ve ucuz bir yöntem olarak, çok yüksek duyarlılık göstermemesine karşın DSÖ ve bazı araştırmacılar tarafından duyarlı yöntemler arasında kabul edilmektedir (45).

Çalışmamızda uyguladığımız, antijenin konsantrasyonuna yönelik değişiklik, RPHA'nun duyarlılığını anlamlı derecede artırmış, dezavantajının bir ölçüde giderilmesi sağlanmıştır.

ELİSA'nın uygulanamadığı merkezlerde, rutin taramalar RPHA ile yapılmalıdır. RPHA'nun duyarlılığındaki eksiklik, uyguladığımız yöntemle büyük ölçüde giderilebildiğinden, RPHA ile yapılan taramalar sonucu negatif bulunan serumlar, kullandığımız yöntemle tekrar test edilirse, güvenilir, ucuz ve kolay bir yöntemle, HBsAg taramalarının ELİSA'ya yakın duyarlılıkta yapılması mümkün olacaktır.

## SONUÇ

Çalışmamızda elde edilen sonuçlar şu şekildedir.

1. HBsAg taramalarında en duyarlı yöntemlerden kabul edilen ELİSA ile pozitif bulunmuş olan serumlar, RPHA ile tekrar test edilerek, RPHA'nun pozitifleri bulmadaki duyarlılığı ELİSA ile karşılaştırılmış ve sonuçlar şöyle bulunmuştur.

4 ayrı grup halinde çalışılan serumlarda, RPHA'nun ELİSA'ya göre duyarlılığı, birinci grup serumlar için % 69.8, ikinci grup için % 76.9, üçüncü grup için % 94.0, dördüncü grup için % 80.0 olarak bulunmuştur. Aradaki duyarlılık farkı birinci, ikinci ve dördüncü gruplar için anlamlı, üçüncü grup için anlamsız bulunmuştur.

Bulgularımız, HBsAg taramada, ELİSA'nın en duyarlı yöntemlerden olduğu, RPHA'nun da ELİSA'dan daha az duyarlı olduğunu gösteren çalışmalarla uyumludur.

RPHA, ELİSA'ya göre hız, kolaylık, maliyet açısından avantajlı, ancak duyarlılık açısından dezavantajlıdır.

2. RPHA ile HBsAg negatif bulunan serumlar, antijenin konsantre edilebilmesi amacıyla, test serumları bir misli artırılarak, tekrar test edilmiş ve sonuçlar şöyle bulunmuştur.

Birinci grup serumlar için HBsAg pozitif serum sayısı artmış ve duyarlılık % 88'e, ikinci ve üçüncü grup serumların duyarlılıkları % 100'e, dördüncü grup için de duyarlılık % 90.3'e yükselmiştir.

Birinci ve dördüncü grup serumlar için RPHA'nun, ELİSA ile duyarlılık bakımından farkı azalmış olmakla birlikte, halen anlamlı bir fark varken, ikinci ve üçüncü grup serumlar için RPHA'nun duyarlılığı ELİSA ile aynı bulunmuştur.

RPHA'nun rölatif duyarlılık eksikliği, antijen miktarının artırılmasına yönelik küçük bir değişiklikle, tamamen giderilememişse de anlamlı derecede azaltılmıştır.

3. Birinci konsantrasyon aşamasından sonra, birinci ve dördüncü gruplarda, halen HBsAg negatif olan serumlarda, test serum miktarları bir misli daha artırılarak, test tekrarlanmış ve sonuçlar şöyle bulunmuştur. Birinci grup serumlar için duyarlılık % 91.5'a, dördüncü grup içinse duyarlılık % 96'ya yükselmiştir. İkinci konsantrasyon aşaması, duyarlılığı anlamlı derecede artırmakta ve ELİSA'ya yaklaştırmaktadır.

RPHA'nun duyarlılık eksikliği, bu şekilde azaltılmak suretiyle ELİSA'dan daha kolay, daha hızlı ve ucuz bir test olarak ELİSA yerine kullanılmasında bir sakıncanın söz konusu olmayacağı görüşüne varılmıştır.

## ÖZET

Bu çalışma, HBsAg taramalarında, RPHA ile ELİSA'nın duyarlılıklarını karşılaştırmak ve RPHA'nun duyarlılığını artırmak amacı ile planlandı. Bu amaçla, ELİSA ile taranarak HBsAg pozitif bulunan toplam 207 serum, 4 grup halinde, RPHA ile test edildi. RPHA ile negatif bulunan serumlar, test serum miktarları, uygun oranda, bir misli artırılarak tekrar tarandı ve bu aşamaya 1. konsantrasyon aşaması denildi. Bu aşamadan sonra da negatif bulunan serumlarda aynı değişiklik uygulanarak test tekrarlandı ve bu aşamaya 2. konsantrasyon aşaması denildi.

4 grup halinde çalışılan serumlarda, RPHA'nun ELİSA'ya göre duyarlılığı 1. grup için % 69.8, 2. grup için % 76.9, 3. grup için % 94.0, 4. grup için % 80.0 olarak bulundu. 1. konsantrasyon aşamasından sonra duyarlılık 1. grup için % 88.0, 2. ve 3. gruplar için % 100, dördüncü grup için % 92.0 olarak bulundu. 2. konsantrasyon aşamasından sonra ise, 1. grup için duyarlılık % 91.5, 4. grup için % 96.0 olarak bulundu.

Bu çalışma RPHA yönteminde antijeni konsantre edebilmek için uygulanan bu değişikliğin, RPHA'nun duyarlılığını anlamlı derecede artırdığını gösterdi. Sonuç olarak hızlı, basit ve ucuz bir yöntem olan RPHA'nun bu değişiklik uygulandığında, duyarlılık bakımından da ELİSA'ya yakın bir yöntem olarak, küçük merkezlerde, hızlı sonuç verilmesi gereken kan bankalarında, ELİSA yerine güvenle kullanılabileceği belirlendi.

## **SUMMARY**

This study was planned to compare the sensitivities of RPHA and ELISA methods and to increase the sensitivity of RPHA method for the HBsAg detections. A total of 207 sera, that were already found to be positive by ELISA, were tested in four groups by RPHA with this aim. The sera that were found to be negative by RPHA, were detected once again, increasing the sera quantities by one in the appropriate ratio and this step was named the first concentration step. The sera that were found to be negative after this step were retested after the same variations and this was named the second concentration step.

The sensitivity of RPHA compared with ELISA was % 69.8 for the first, % 76.9 for the second, % 94.0 for the third and % 80.0 for the fourth groups. The sensitivity was % 88 for the first, % 100 for the second and third, % 92 for the fourth group after the first concentration step. The sensitivity was % 91.5 for the first, % 96.0 for the fourth group, after the second concentration step.

This study shows that the variety applied to concentrate the antigen in the RPHA method increases the sensitivity of the method significantly.

As a result, it was decided that RPHA can reliably be used after this variation as a rapid, easy and inexpensive method, in small centers, blood banks where speed is important as a method similar to ELISA.

## KAYNAKLAR

1. Bilgiç A, *Viral Hepatit Tip B'de Serolojik Tanı Yöntemleri*, Türk Mikrobiyoloji Derneği Yayını 4: s: 15-22, 1982.
2. Withers M.J, Mc Cahill G.V, Griffiths P.D, Heath R.B, Pattison J.R and Dane D.S, *A comparative study of passive haemagglutination methods for the detection of hepatitis B surface antigen in routine hospital practice*, J. Clin. Path, 29 p: 732-735, 1976.
3. *Virus Disease Unit, Who, Geneva, WHO Collaborative Study on Hepatitis B, Progress Report, Geneva, 11-16 October 1976.*
4. Çolak H, Akgün Y, *Değişik Meslek Gruplarında, Hepatitis B Virusu (HBV) Markerlerinin Enzyme Immuno Assay (EIA) Yöntemiyle Aranması*, Anadolu Tıp Dergisi, 9:81-82, 1987.
5. Bilgiç A, Uçan E.S, Bilgiç İ, *Bronş Kanserlilerde Hepatit B Yüzey Antijeni*, Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi 16:1, s: 33-38, 1986.
6. Bilgehan H, Bilgiç A, *İki Ayrı Serolojik Yöntem ile Hepatit B Yüzey Antijeni Araştırması*, Mikrobiyoloji Bülteni, 11:3, s: 365-370, 1977.
7. Polesky F.H, Hanson R.M, *Comparision of Viral Hepatitis Marker Test Methods Based on AABB-CAP Survey Data*, A.J.C.P: 76:4 (Supplement), p:521-524, 1981.

8. Nath N, Dodd R.Y, Fang C.T, *Enzyme-Linked Immunoassay for Hepatitis B Surface Antigen*, *Transfusion*: 23:1, 45-48, 1983.
9. Barker L.F, Purcell R.H, *Hepatitis B Virus*, *Manual of Clinical Immunology* p: 481-488, 2nd Printing, 1976.
10. Türet S., Alaeddinoğlu İ, *Viral Hepatit Laboratuvarının 1977-78 Yılı Çalışmaları*, *Türk Hijyen ve Tecrübi Biyoloji Dergisi*, XXXVIII, 1977-78.
11. Mutlu G, Kumdalı A, *Viral Hepatit Ön Tanılı Hastalarda HBsAg'nin ELİSA, RIA ve PHA Yöntemleri ile Mukayeseli Araştırması*, *Mikrobiyoloji Bülteni* 18:190-198, 1984.
12. Weinstein L, *NON-A, NON-B Hepatitis: The Role of Hepatitis C Virus and Hepatitis E Virus*, *Infectious Disease Practice*, 13-3, p: 1-8, 1989.
13. Çetin E.T, *Akut Viral Hepatitin Virolojisi*, *KLİMİK Dergisi*, 1:1, s: 6-10, 1988.
14. Mandell, Douglas, Bennet, *Hepatitis B Virus and Hepatitis Delta Virus, Principles and Practice of Infectious Diseases, Third Edition*, p: 1204-1231, 1990.
15. Unat, E.K, *Antijen-Antikor Birleşmesi Reaksiyonları*, *Temel Mikrobiyoloji*, p: 271-197, 1985.
16. Bukhari S.S, Tsiquaye K.N, *Hepadna Viruses, Their Infections and Hepatocellüler Carcinoma*, *JPMA*, 40(12), p: 300-6, 1990.
17. Balık İ, Tekeli E, *Akut Viral Hepatitler*, *A.Ü.T.F. Mecmuası* 42:3, s:289-304, 1984.

18. Hoefs C.J, Benner G.I, Ashcavai M, Pedeker G.A, Hepatitis B Surface Antigen in Pancreatic and Billiary Secretions, *Gastroenterology*, 79: 191-194, 1980.
19. Shimoka T, Shikata T, Karasawa, T, Tsukagoshi S, Yoshimura M, Sakurai I, Light Microscopik Localization of Hepatitis B Virus Antigens in the Human Pancreas, *Gastroenterology* 81:998. 1005, 1981.
20. Krugman S, Loard R, *Viral Hepatitis, Infectious Diseases of Children and Adults, Fifth Edition*, p: 76-96, 1973.
21. Memik F, *Viral Hepatit, VI. Türk Gastroenteroloji Kongresi, 22-25 Ekim 1985*, s. 7-21.
22. DüNDAR İ.H, *Proplaktik ve Terapötik Amaçlarla HBIG ve HB Aşısı Uygulaması*, *GATA Bülteni*, 27: 233-266, 1985.
23. Kurtar K.M, DüNDAR İ.H, Birol K, Baydar İ, *Serum Hepatit Sorunu*, *GATA Bülteni*, 17: 327-371, 1975.
24. Sherlock S, *Virus Hepatitis, Diseases of the Liver and Billiary System, Eighth Edition*, p: 331-338, 1989.
25. Serter F, Serter D, *Hepatitis Virüsleri ve Viral Hepatitler, Klinik Viroloji, 2. Baskı*, s: 225-246, 1986.
26. Howard B. J, Klaas J, Rubin J.S, Weissfeld S.A, Tilton C.R, *Hepatitis Viruses, Clinical and Pathogenic Microbiology*, p:817-829, 1987.
27. Çetin E.T, Gökoğlu, M, Gemicioğlu, N, *Hepatit Virusları, Tıp Fak. Mecm. 44: 214-223 (1981)*.



28. Balık İ, *Viral Hepatitlerde Serolojik Markerlar ve Anlamları, Türkiye Klinikleri* 7:4, s: 306-312, 1987.
29. Nordenfelt E, *Persistence of Hepatitis B Virus and Establishment of Delta Virus Infection, Scand. J. Infect. Dis. Suppl*, 69: 121-124, 1990.
30. Hoeprich D.P, Jordan C.M, *Hepatitis B and Hepatitis D, Infectious Diseases Fourth Edition* p: 766-788, 1989.
31. Usta Çelebi Ş, *Hepatit B Virusunun Tanımı, XX. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, İzmir 5-7 Ekim 1982, Türk Mikrobiyoloji Derneği Yayını 4; s: 1-6, 1982.*
32. Gemicioğlu N, *Viral Hepatit Tip B'de Korunma ve Kontrol, Türk Mikrobiyoloji Derneği Yayını 4: 23-27, 1982.*
33. Yalçın I, *Viral Hepatit Epidemiyolojisi, Portörlük, Vertikal Yayılım, Tıp Fak. Mecm.* 47: 181-187 (1984).
34. Payzın S, *Hepatit B Virus Epidemiyolojisi, Türk Mikrobiyoloji Derneği Yayını 4: s: 7-14, 1982.*
35. Nordenfelt E, *Epidemiology of Hepatitis Delta Virus and Non-A Non-B Hepatitis, Scand J. Infect. Dis. Suppl.* 69: 49-53, 1990.
36. Oral B, Diri C, Türkyılmaz R, Erbaş O, S.B, *Ankara Hastanesi Çalışanlarında Mevcut ve Geçirilmiş Hepatit B Enfeksiyonu İmmunolojik İşaret Prevalansları, Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi* 42:2, 159-166, 1989.

37. Norkrans G, *Epidermiology of Hepatitis B Virus (HBV) Infections with Particular Regard to Current Routes of Transmission and Development of Cirrhosis and Malignancy*, *Scand. J. Infect. Dis.* 69: 43-47, 1990.
38. Bali M, *Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastaneleri Sağlık Personelinde HBsAg Sıklığı*, G.Ü.T.F. İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi, 1989.
39. Aritürk S, DüNDAR İ.H, Baydar İ, *Viral Hepatitler*, Gülhane Askeri Tıp Akademisi Basımevi, 1985.
40. Brown J.L, Carman W.F, Thomas H.C, *The Hepatitis B Virus*, *Baillieres Clin. Gastroenterology*, (4/3), p: 721-47, 1990.
41. Fındak D, Tuncer İ, Günaydın M, *Sağlıklı Kan Donörlerinde Hepatit B Yüzey Antijeni Araştırması*, *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*, 19:1, s: 47-51, 1989.
42. Doğanay M, Gökoğlu M, Işık S, *Karaciğer Hastalıklarından ve Değişik Gruplardan Toplanan Serum Örneklerinde HBsAg (Hepatit B Yüzey Antijeni) Araştırılması*, *C.Ü. Tıp Fak. Dergi*, 7: 3-4, s: 51-54, 1984.
43. Özlüarda E, Türet S, Alaeddinoğlu İ.T.T, *Türk Toplumunda HBsAg Prevalansı*, *Türk Hij. Der. Biyol. Dergi* 37: 1-1977.
44. Çolakoğlu S, Aksu H.Z, Ergün Y, Başlamışlı F, Akkız H, Burgut R, *Çukurova Yöresinde Yüksek Risk Gruplarında Hepatit Serolojisinin Araştırılması*, *Tıp ve Sağlık Bilimleri Dergisi*, 2:249-259, 1988.
45. Özbal Y, Demirçelik A, *Hastane görevlilerinde Hepatit B Virusunun Görülme Sıklığı*, *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi* 14:3-4, 45-48, 1984.

46. Gözdaşoğlu R, Dağal K, Kutluay T, Hastane Personelinde Hepatit B Yüzey Antijen ve Antikor Oranı, *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Araştırma Dergisi* 1:69-74, 1983.
47. Kurtar K, Dünder İ, Baydar İ, Viral Hepatitler, *GATA Bülteni* 18: 165-172, 1976.
48. Sonnenwirth A.O, Jarett L, *Gradwohl's Clinical Laboratory Methods and Diagnosis*, p: 1519, 1980.
49. Bilgiç A, *Viral Hepatitte Serolojik Göstergelerin Yorum*, 1. Ulusal İnfeksiyon Hastalıkları Kongre Kitabı, s: 98-109, 20-23 Nisan 1987.
50. Türet S, Alaeddinoğlu, İ, Kaya F, HBsA, Taramalarında Reversed Passive Hemagglutination (RPHA) ve Counter Immuno Electrophoresis (CIEP) Yöntemlerinin Kıyaslanması, *Türk Hijyen ve Tecrübi Biyoloji Dergisi*, XXXVII, 1977.
51. Dienstag L. J, Diane M.L, *Occupational Exposure to Hepatitis B Virus in Hospital Personnel, Infection or Immunization, American Journal of Epidemiology* 115:1, p: 26-39, 1982.
52. Jawetz E, Melnick J.L, Adelberg E.A, *Review of Medical Microbiology, Serological Diagnosis and Immunological Detection of Virus Infections, Seventeenth Edition*, p: 408-417, 1987.
53. Bilgehan H, *Antijen-Antikor ilişkileri Temel Mikrobiyoloji ve Bağışıklık Bilimi*, s: 361-440, 1987.
54. Stites, Stobo, Wells, *Clinical Laboratory Methods for Detection of Antigens and Antibodies, Basic and Clinical Immunology, Sixth Edition* p: 241-304, 1987.

55. Cayzer F, Dane D.S, Cameron C.H, mDenning J.V, A rapid Hemagglutination Test For Hepatitis-B Antigen, Lancet, May, 18, p: 947-949, 1974.
56. Wallace J, Barr A, Milne G.R, Which Techniques Should be Used to Screen Blood Donations for Hepatitis B Surface Antigen, British Medical Journal, 2: 412-414, 1975.
57. Alaeddinoğlu İ, Türet S, Kaya F, Heterofil Antikorların RPHA Test Sonuçlarına Etkisinin Araştırılması, Türk Hijyen ve Tecrübi Biyoloji Dergisi, XXXVII: 2, 1977.

**V. G.**  
**Yükseköğretim Kurulu**  
**Dokümantasyon Merkezi**