

## Hepatit B Virus (HBV) Serolojik ve Moleküler Tanısı

Hepatit B virus (HBV), Hepadnaviridae ailesinden bir DNA virusudur. Ait oldukları Hepadnaviridae ailesinin diğer üyeleri gibi konakları sınırlıdır ve yerleştikleri konakta akut infeksiyon, persistan infeksiyon, fulminant hepatit, siroz ve hepatosellüler karsinom gibi ölümcül hastalıklara neden olurlar (1) .

Dünya nüfusunun yaklaşık yarısı (2 milyar) HBV ile infekte ve yaklaşık 400-500 milyon kişi (%5-15) HBV taşıyıcısıdır. Türkiyede ise HBs Ag seroprevalansı, bölgeden bölgeye göre farklı olmakla birlikte, bu oran % 3.9-12.5 arasında değişmektedir (2) . Her yıl dünyada 50 milyon, A.B.D.'de 1.5 milyon yeni olgu saptanmaktadır. HBV, sigaradan sonra en önemli ikinci kanserojen etkidir. HBV'ye bağlı nedenlerle yıllık ölüm, yaklaşık 1-2 milyon kişidir. HBV, HIV'den 100 kat daha infeksiyözdür. Bulaştırıcı en düşük kan miktarı HIV için 0.1 ml, HBV için 0.00004 ml'dir (3).

### HBV'nin Bulaşma Yolları:

- Parenteral  
Kan ve kan ürünleriyle temas ve transfüzyon  
Kontamine iğne, enjektör, bistüri, sonda, endoskop vb.  
Hemodiyaliz  
Damardan uyuşturucu kullanımı  
Oral cerrahi  
Akupunktur, döğme, kulak delme, traş vb.
- Perinatal ( Doğum sırasında bulaş, cilt sıyrıkları, mukoza penetrasyonu, vaginal kanaldan geçiş, sezaryan sırasında anne kaniyle temas, plasenta hasarı sonucu fetal ve maternal dolaşımın karışması)
- Horizontal ( Özellikle Ortadoğu, Afrika ve Hindistan gibi endemisitesi yüksek olan bölgelerde aynı evde yaşayanlar arasında geçiş )
- Cinsel temas

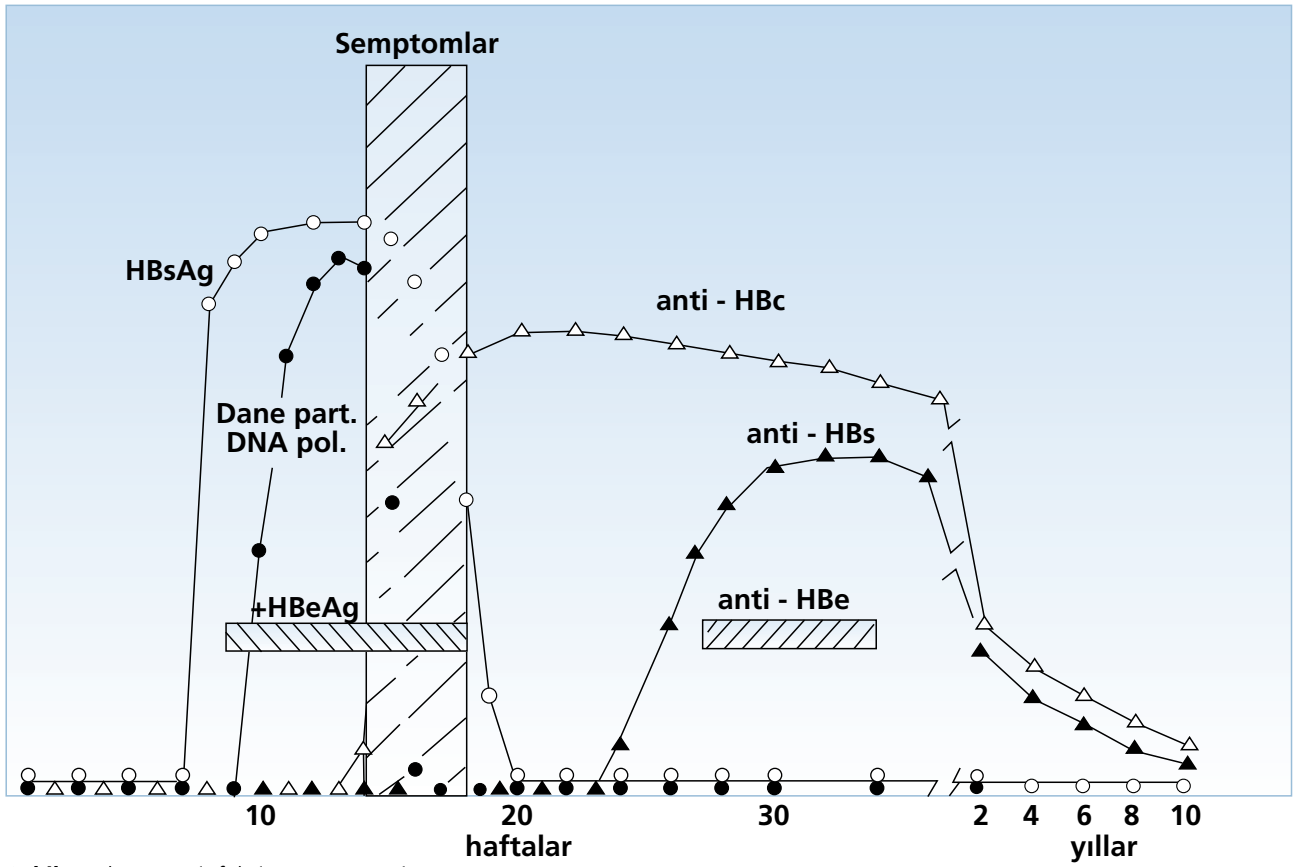
## HBV Enfeksiyonlarının Serolojik Tanısı

• **HBsAg/ Anti-HBs:** HBs Ag'nin varlığı, virion replikasyonu ile eş anlamlı değildir. HBs Ag, klinik belirtiler ortaya çıkmadan önce serumda saptanır. Serumda saptandıktan 4 hafta sonra klinik hepatit tablosu ortaya çıkar. Belirtilerle birlikte HBe Ag, DNA polimeraz ve HBV-DNA saptanabilir. HBs Ag , akut viral hepatit B olgularında 2-6 ay içinde kaybolur ve antikor saptanmaya kadar pencere dönemi oluşur. Bu pencere döneminden sonra anti-HBs antikorları pozitif olarak saptanmaya başlar. Akut infeksiyon geçiren kişide, altı aydan daha fazla HBs Ag varlığı devam ediyorsa, hastalığın kronikleşmesi söz konusudur.

• **HBcAg/ Anti-HBc:** HBcAg'nin serumda saptanması oldukça güçtür; bu nedenle kor bölgesi ile ilgili pratik önemi olan tek göstergesi Anti-HBc antikorlarıdır. Özellikle iyileşme ile sonlanan akut olgularda, pencere döneminde infeksiyonun tek göstergesi bu antikorlardır. Uzun süre kalıcı olan bu

antikorlardan, akut dönemde Anti-HBcIgM tipi antikorlarının saptanması önem kazanır. Ancak akut infeksiyondan 2 yıl sonra bile, % 20 oranında Anti-HBcIgM pozitifliği saptanabilir (1).

• **HBeAg/ Anti-HBe:** Akut infeksiyonlarda HBeAg, HBsAg ile hemen hemen aynı zamanda pozitifleşir ve HBsAg'den daha önce kaybolur. Eğer antijenin varlığı söz konusu ise HBV DNA'nın serumda bulunduğunu gösterir. Bu da aktif replikasyonun işaretidir. Anti-HBe antikorlarının oluşması iyileşmeye doğru gidişin kanıtı olarak kabul edilir. Ancak son yıllarda hibridizasyon ve özellikle PCR çalışmalarının yaygınlaşması ile Anti- HBeAg (+) % 80 olguda HBV DNA'nın gösterilmesi veya HBeAg (+) olgularda HBV DNA'nın (-) bulunması; bazı klasik bilgilerin zaman içinde değişebildiğini göstermektedir (3).



Şekil 1: Akut HBV infeksiyonunun seyri

## HBV infeksiyonlarının Serolojik Tanısında Karşılaşılan Olağan Dışı Profiller

- **Tek başına HBsAg pozitifliği**
  - HBV varyantının varlığı
  - Anti-HBc antikorlarının oluşmamasına neden olan immun defektin varlığı
- **Tek başına Anti-HBc pozitifliği**
  - Yalancı pozitiflik
  - Pencere dönemi
  - Hümorale yanıtta bozukluk
  - Anti-HBc antikorlarının anneden bebeğe pasif olarak aktarılması
- **Tek başına anti-HBs pozitifliği**
  - Aşılama
  - Hiperimmunglobulin
  - Kan ve kan ürünlerinin tranfüzyonu
- **HBsAg ve anti-HBs birlikte pozitifliği**
  - Kronik aktif hepatitlerde
  - Hemodiyaliz hastalarında
  - Asemptomatik damar içi uyuşturucu kullananlarda
- **Anti-HBs pozitifliğinin yerini HBsAg pozitifliğine bırakması**
  - HBV-DNA'nın hücrelerde saklı kalması ve uygun ortam bulduğunda tekrar ortaya çıkması (3).

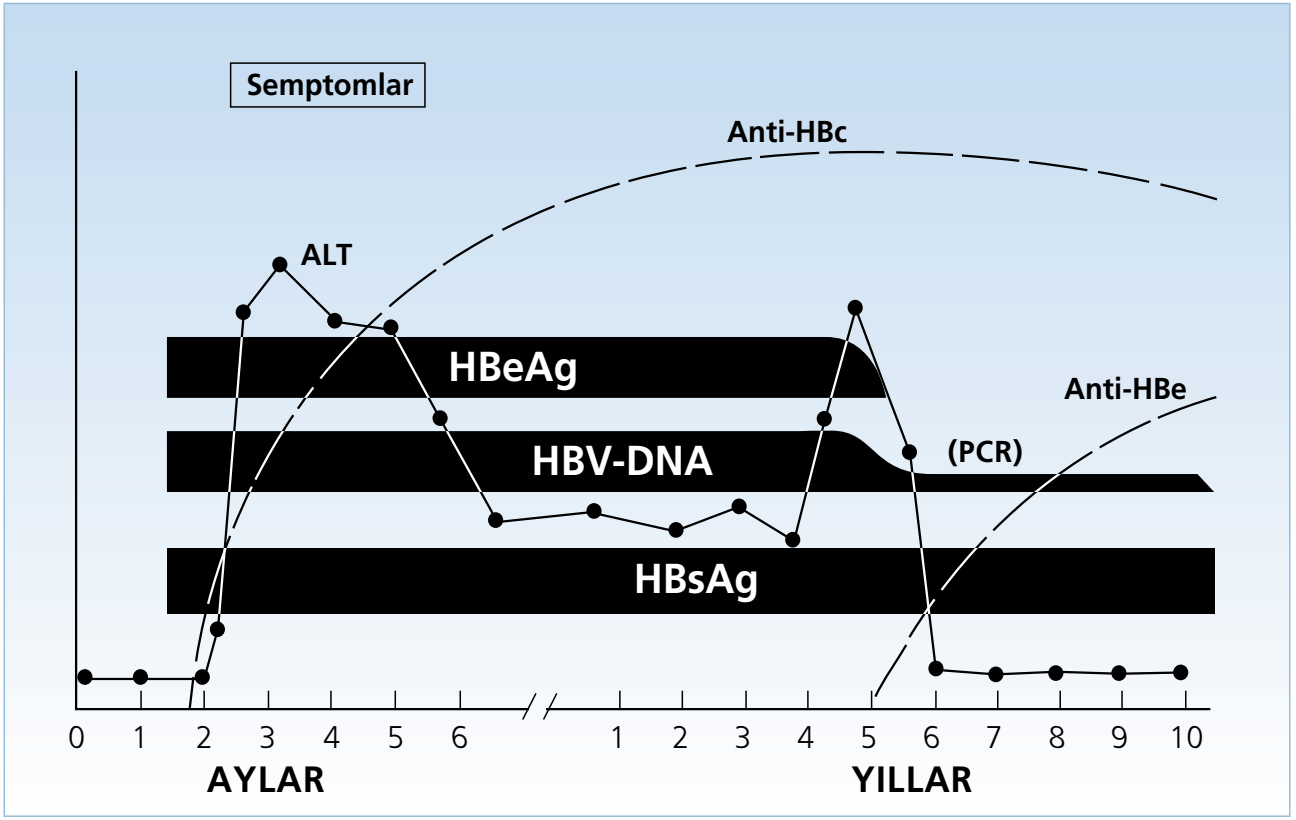
### HBV Persistansında Rol Oynayan Faktörler

#### 1 - VİRÜSE AİT FAKTÖRLER

- HBsAg'nin sentezi: HBsAg'nin sentezinin olmadığı kronik olgularda KC harabiyeti daha fazla olduğu görülmüştür.
- HBsAg'nin sentezi: HBsAg'nin aşırı sentezi bağışıklığı olumsuz şekilde etkilediği bilinmektedir.
- HBV'nin integrasyonu: Kronik olgularda HBV DNA'nın hepatosit genomuna integrasyonunda T lenfositlerin sentezlenmediği ve etkinliğinin azaldığı sanılmaktadır.
- HBV mutantları

#### 2 - KONAĞA AİT FAKTÖRLER

- İnterferon sentezinde aksama
- İnterferona yanıtta aksama
- Anti-HBc/Anti-HBe antikorları
- Lenfosit fonksiyonunda aksama
- Serum faktörleri
- Anti-idiyopatik yanıt
- Cinsiyet ve hormonal faktörler: Kronik infeksiyona erkeklerde daha sık raslanmaktadır.



Şekil 2: Kronik HBV infeksiyonunun seyri

## HBV İnfeksiyonlarının Moleküler Tanısı

HBV infeksiyonunda, replikasyonun göstergesi olan HBV DNA'nın gösterilmesi son yıllarda gittikçe önem kazanmıştır.

Bu amaçla kullanılan yöntemler, hibridizasyon ve nükleik asit amplifikasyon yöntemleri olarak iki başlık altında toplanabilir.

### A. Hibridizasyon Yöntemleri

Hibridizasyon, birbirine uyumlu şifreye sahip iki molekülün özgül olarak birleşmesi anlamına gelir. Hibridizasyon yöntemlerinde, DNA veya RNA'dan oluşturulmuş, çeşitli enzimler, antijenler, kemiluminesan bileşikler ya da radyoizotoplarla işaretlenmiş ve aranan hedef nükleik aside özgüllükle bağlanan dizilere sahip proplar kullanılır.

HBV DNA'nın serumda gösterilmesi için kullanılan slot hibridizasyon yönteminde duyarlılık sınırı 10-500 pg/ml, (1 pg/ml yaklaşık  $10^5$  kopya/mL'ye eşdeğerdir) likit faz hibridizasyon yönteminde ise yaklaşık 1.6-5 pg/ml'dir (4).

### B. Nükleik Asit Amplifikasyon Yöntemleri (PCR)

PCR (Polymerase Chain Reaction = Polimeraz zincir reaksiyonu) bilinen en eski amplifikasyon yöntemlerinden birisidir. Bu yöntem in vitro olarak DNA'nın hedef bölgesinin çoğaltılması ve çoğaltılan bölgenin jel elektroforezinde yürütülerek saptanmasıdır. "Home made PCR" tabir edilen ve her laboratuvarın kendi ürettiği "primer"lerle yapılan analizlerde ortaya çıkan yüksek interassay varyasyonlar, sertifikaya olmuş otomatize sistemlerle minimize edilmiştir. Bu nedenle son yıllarda özellikle rutin laboratuvarlarda mikrobiyolojik tanı amacıyla otomatize sistemler kullanılmaya başlamıştır.

HBV DNA'nın belirlenmesinde en özgül ve en duyarlı yöntem PCR yöntemidir. Bu yöntemle çok düşük miktarlarda HBV DNA 10-50 kopya/mL tespit edilebilmektedir (4). Diğer taraftan hibridizasyon tekniğinde tespit edilebilen 1 pg/mL, yaklaşık  $10^5$  kopya/mL'ye tekabül eder. Hibridizasyon tekniği duyarlılığının fazla olmaması nedeniyle, tanı koyma ve tedavi takibinde kullanımı sınırlıdır. (3)

## HBV DNA Testinin Klinik Önemi

### 1. Akut HBV enfeksiyonunun prognozunu belirlemek:

HBV DNA'nın sekiz haftadan uzun süreli saptanması, enfeksiyonun büyük olasılıkla kronikleşeceğini gösterir. Semptomların başlangıcından itibaren 2 hafta içinde HBV DNA'nın kaybolması ise iyileşmenin göstergesi olacaktır.

### 2. Persistan enfeksiyonda hastalığın aktivitesini değerlendirmek:

Yüksek HBV DNA düzeyi, HBV replikasyonun olduğunu gösterir ve tedavi protokolü açısından önemlidir.

### 3. Antiviral tedavi alan hastalarda, hastalığın seyrini izlemek:

Hızlı ve devamlı HBV DNA düşüşü, tedavinin başarısını ve prognozunu iyi olduğunu gösterir.

### 4. İmmunolojik olarak negatif olan atipik HBV enfeksiyonlarını tanımlamak ve izlemek:

Değişime uğramış olan HBV varyantları, immun sistemden etkilenmeksizin yaşamlarını sürdürebilmektedir. Ayrıca HBV genomundaki fenotipik varyasyonların, atipik serolojik tablolardan sorumlu oldukları görülmüştür. HBV varyantının varlığını, ancak bu yöntemle saptamak olanaklıdır.

### 5. Kanların enfeksiyözitesini ve sterilizasyon araçlarının HBV açısından değerlendirilmesini yapmak.

## HBV Genotiplendirmesi

HBV ile ilgili genotip çalışmaları dünyada olduğu gibi ülkemizde de son yıllarda artmıştır. Özellikle farklı genotiplerin, oluşacak hastalık tablosunu farklı biçimlerde etkileyip etkilemediğini; tedaviye yanıtta, genotipler arasında fark olup olmadığı; yada kronikleşme eğiliminin, bazı genotipler için daha büyük olasılıkla söz konusu olup olmadığını araştırılmaktadır. Precore ve core promotör bölgesindeki mutasyonların, genotiplerin anti-HBe Ag serokonversiyon oranını ve hastalığın ciddiyetini etkilediği gösterilmiştir (5). Ayrıca bazı genotiplerde (genotip D) belli bölgedeki mutasyonların (precor gibi) daha sık görüldüğü bildirilmektedir. Genotiplerle ilgili yapılan yoğun çalışmalar sonucunda, genotiplemenin gerekli olup olmadığı ortaya konacaktır (5).

Hepatit B virusu; DNA dizi analizi, restriction fragment length polymorphism (RFLP), line prop assay, genotip spesifik primerler ve ELISA ile A'dan H'ye kadar 8 genotipe ayrılabilir (5). Bu genotipler dünyada farklı bölgelerde farklı dağılım göstermektedir. Ülkemizde HBV genotipleri ile ilgili yapılan çalışmalarda %79-100 arasında genotip D olarak tespit edilmiştir (6-7)

Miks (ko-enfeksiyon) genotiplerin aynı hastada bulunabildiği, özellikle son yıllarda yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Miks genotiplerin ayrılması için Core RFLP ve genotype specific probe assay (GSPA) metodları geliştirilmiştir. Bu metodlar kullanılarak yapılan çalışmalarda HBe Ag pozitif grupta miks enfeksiyon %67 bulunurken, taşıyıcı grupta % 10.9 olarak saptanmıştır (8).

## Referans Kaynaklar

1. Hepatitis B Virus. In Mandell GL, Bennet JE, Dolin R, ed. Mandell Douglas and Bennet's Principles and Practice of Infectious Diseases. 5.th ed. New York, Churchill Livingstone; 135, 2000.
2. Yenen ŞO: Viral Hepatitler. In Willke TA, Söyletir G, Doğanay M, ed. Enfeksiyon Hastalıkları. 1 th ed.İstanbul, Nobel Tıp , 641,1996.
3. Badur S: Hepatit B virusu (HBV) Moleküler viroloji ve serolojik tanı. In Kaya Kılıçturgay ed. Viral Hepatit'94, İstanbul, Viral Hepatitle Savaşım Derneği, 65,1994.
4. Aspinall S, Steele AD, Peenze I. Detection and quantitation of hepatitis B virus DNA: Comparison of two commercial hybridization assays with polymerase chain reaction. J.Viral Hepatitis , 2:107, 1995.
5. Chu, C.J., Lok, A.S. Clinical significance of hepatitis B virus genotypes. Hepatology, 35,1274-1276, 2002.
6. H. Leblebicioğlu, C.Eroğlu, Hepatitis Study Group. Acute hepatitis B virus infection in Turkey: epidemiology and genotype distribution. Clin.Microb.Infect.vol:10, in pres.
7. Sunbal M, . H. Leblebicioğlu, Hepatitis Study Group. Distribution of Hepatitis B virus genotypes in patients with chronic hepatitis B infection in Turkey. 38 th European Association for study of the liver conference.p175, Ceneva, Switzerland, 2003.
8. Hannoun C, Krogsgaard K, Horal P, Lindh M, The interpred trial group. Genotype mixtures of hepatitis B virus in patients treated with interferon. J.Infect. Dis. 186, 752-759, 2002.

