

**T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ**

**HBsAg POZİTİF HASTALARDA HBV DNA'NIN
ARAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ

**Dr. Nihal Seçil BATI
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Mehmet Sait TEKEREKOĞLU**

MALATYA - 2016

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince yetişmemde emeği geçen Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'ndaki tüm öğretim üyelerine, her daim bilgisi ve desteğiyle yanımda olan sadece tez değil her türlü sıkıntıda manevi desteğini esirgemeyen yüce gönüllü danışmanım Prof. Dr. Mehmet Sait TEKEREKOĞLU'na, birlikte çalıştığımız süre boyunca bilgilerini içtenlikle paylaşan önce kıdemli asistan abim sonrada hocam olan Yrd. Doç. Dr Yücel DUMAN'a, tezimin moleküler mikrobiyoloji ile ilgili bölümü için eğitim ve destek veren değerli hocam Prof. Dr. Barış OTLU'ya, oldukça uzun bir yolculuk olan uzmanlık eğitimim sırasında hiçbir gün desteğini benden esirgemeyen canım annem Güler ATACAN'a, eşim Uzman Dr. Fatih BATI'ya, babam Mustafa Fahri ATACAN'a, abim Ulaş ATACAN'a ve varlığıyla beni yaşama bağlayan canım kızım Gülsüm Aygen BATI'ya tüm içten dileklerle teşekkür ederim.

Dr. Nihal Seçil BATI

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	i
İÇİNDEKİLER.....	ii
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
TABLolar DİZİNİ.....	viii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Tarihçe	3
2.2. Sınıflandırma.....	4
2.3. Genel Özellikleri	5
2.3.1. Duyarlılık ve Dirençlilik.....	7
2.3.2. Genom Yapısı	7
2.3.3. Replikasyon	9
2.3.4. Genotip ve Subtip.....	9
2.3.5. Viral Proteinler	12
2.4. Hepatit B Virüs Mutasyonları.....	15
2.4.1. Yüzey (kılıf) mutasyonları	15
2.4.2. Prekor/kor mutasyonları	16
2.4.3. P geni mutasyonları	17
2.4.4. X geni mutasyonları.....	17
2.5. Epidemiyoloji.....	17
2.5.1. Dünyada HBV enfeksiyonu prevalansı	19
2.5.2. Türkiye’de HBV enfeksiyonu prevalansı	18
2.6. Klinik Belirti ve Bulgular.....	19
2.6.1. Akut İnfeksiyon.....	20
2.6.2. Kronik İnfeksiyon.....	20
2.6.3. Hepatosellüler Karsinom.....	21
2.7. Mikrobiyolojik Tanı	23

2.7.1. Serolojik tanı.....	23
2.7.2. Moleküler tanı.....	26
2.7.3. Hücre kültürü ve hayvan modelleri	29
2.7.4. Mutant virüs infeksiyonlarında tanı	29
2.8. Antiviral Direncin Saptanması.....	29
2.9. Olağan Dışı Serolojik Profiller	29
2.9.1. Gizli HBV infeksiyonu.....	29
2.9.2. İzole anti-HBc pozitifliği.....	31
2.9.3. HBsAg ve anti-HBs'nin birlikte pozitif bulunması	32
2.9.4. Tek başına HBsAg pozitifliği [HBsAg(+), anti-HBc total(-), anti-HBs(-)].....	32
2.9.5. Tek başına anti-HBs pozitifliği	32
2.10. Tedavi.....	33
2.11. Korunma.....	33
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	35
4. BULGULAR.....	44
5. TARTIŞMA	47
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	54
7. KAYNAKLAR.....	56

ÖZET

HBsAg Pozitif Hastalarda HBV DNA Araştırılması

Amaç: Hepatit B infeksiyonu kronik karaciğer hastalığı ve hepatosellüler karsinoma gelişme riski açısından önemli bir sağlık sorunu olmaya devam etmektedir. Hepatit B infeksiyonunda HBsAg (Hepatit B virüs yüzey antijen) aktif infeksiyonu göstermekte, akut ve kronik hastalıkta serumda saptanabilmektedir. HBV DNA ise günümüzde replikasyon göstergesi olarak ve HBV infeksiyonunun antiviral tedavi takibinde kullanılmaktadır. Bu çalışmada HBsAg pozitif saptanan olgularda, HBV DNA sonuçları retrospektif olarak incelenerek aralarındaki uyumun karşılaştırılması amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot: Bu çalışmada 2014-2015 yılları arasında İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda HBsAg pozitif saptanan 2437 hastanın HBV DNA değerleri retrospektif olarak incelendi. Hasta serumlarında HBsAg belirlenmesi için ELISA yöntemi, HBV DNA belirlenmesi için Real-time PCR metodu kullanıldı.

Bulgular: HBsAg'si pozitif olan 2437 örnekten 1037'sinde (%42.5) HBV DNA pozitif, 1400'ünde (%57.5) HBV DNA negatif bulundu. 1037 HBV DNA pozitif örneğin viral yük miktarının 435 kopya/ml-9 milyar 782 milyon kopya/ml arasında olduğu belirlendi.

Sonuç: Sonuç olarak hepatit B virüs infeksiyonunun tespitinde serolojik gösterge olarak HBsAg (Hepatit B virüs yüzey antijen), viral replikasyonun belirlenmesinde ve antiviral tedavinin takibinde ise HBV DNA moleküler test olarak önemini korumaktadır.

Anahtar kelimeler: HBV, HBsAg, HBV DNA, Real-time PCR.

ABSTRACT

Investigation of HBV DNA at HBsAg Positive Patients

Aim: Hepatitis B infection continues to be an important health problem in terms of chronic liver disease and hepatocellular carcinoma development. HBsAg (hepatitis B virus surface antigen) shows active infection in hepatitis B infection and can be detected in serum in acute and chronic hepatitis B disease. HBV DNA is currently used for the detection of viral replication and also assists in the follow-up antiviral treatment of HBV infection. In this study; we aimed to compare HBV DNA results retrospectively during HBsAg-positive cases.

Material and Method: In this study, HBV DNA values of 2437 patients who were positive for HBsAg in Inonu University Medical Faculty Microbiology Laboratory between 2014-2015 were examined retrospectively. In sera of the patients; HBV DNA were examined by Real Time PCR method and HBsAg were examined by ELISA method.

Results: Of the HBsAg positive 2437 samples, 1037 (42.5%) were HBV DNA positive, 1400 (57.5%) were HBV DNA negative. It was observed that 1037 HBV DNA positive patients viral load amount is 435 copies / ml to 9 billion 782 million copies / ml.

Conclusion: In conclusion; HBsAg (hepatitis B virus surface antigen) is a serologic indicator in the detection of hepatitis B virus infection and HBV DNA is a molecular test in determining viral replication and following antiviral treatment and these still maintains their importance.

Key words: HBV, HBsAg, HBV DNA, Real-time PCR.

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Anti-HBc	: Hepatit B Virüsü Kor Antijenine Karşı Gelişen Antikor
Anti-HCV	: Hepatit C Virüsüne Karşı Gelişen Antikor
cccDNA	: “Covalently Closed Circular DNA”; Kovalent Olarak Kapalı Sirküler DNA
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
DR	: “Direct Repeats”; Tekrarlayan Bölgeler
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
EIA	: Enzimimmunoassay
EN	: Enhancer
HBcAg	: Hepatit B Virüsü Kor Antijeni
HBeAg	: Hepatit B Virüsü Zarf Antijeni
HBiG	: Hepatit B İmmünglobulin
HBsAg	: Hepatit B Yüzey Antijeni
HBV	: Hepatit B Virüsü
HCC	: Hepatosellüler kanser
HCV	: Hepatit C Virüsü
HIV	: İnsan İmmün yetmezlik Virüsü
IC	: “Internal Control”; İnternal Kontrol
ID-NAT	: Tek Tek Örneklerde Uygulanan Nükleik Asit Testi
NAT	: Nükleik Asit Testi
ORF	: “Open Reading Frame”; Açık Okuma Çerçevesi
PCR	: “Polymerase Chain Reaction”; Polimeraz Zincir Reaksiyonu
pgRNA	: Pregenomik RNA
PKMH	: Periferik Kandaki Mononükleer Hücre
preC	: Prekor
QCMD	: “Quality Control for Molecular Diagnostics”
RNA	: Ribonükleik Asit
RPR	: “Rapid Plasma Reagen”
RT	: Revers Transkriptaz

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No

Sayfa No

Şekil 2.1. Hepatit B virüsü (Dane partikülü).....	66
Şekil 2.2. HBV genomik yapısı ve sentezlenen proteinler.....	8
Şekil 2.3. Hepatit B virüsünün yaşam ve replikasyon döngüsü.....	10
Şekil 2.4. Akut HBV infeksiyonunda serolojik göstergeler.....	25
Şekil 2.5. Kronik HBV infeksiyonunda serolojik göstergeler.....	25
Şekil 2.6. PCR reaksiyonundaki aşamalar.....	27
Şekil 3.1. Kemiluminesan Mikropartikül Immunoassay yöntemindeki aşamalar.....	37
Şekil 3.2. İnönü Üniversitesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda kullanılan ELISA cihazı.....	38
Şekil 3.3. İnönü Üniversitesi Moleküler Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda DNA izolasyonu için kullanılan cihazlar.....	40
Şekil 3.4. İnönü Üniversitesi Moleküler Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda sıvı dağıtım sistemi için kullanılan cihaz (QIAgility).....	41
Şekil 3.5. İnönü Üniversitesi Moleküler Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda kullanılan Real-time PCR cihazı.....	42
Şekil 4.1. HBsAg(+) hastalarda HBV DNA görülme oranı.....	44
Şekil 4.2. HBV DNA(+) veya (-) olan hastalarda erkek-kadın oranı.....	45
Şekil 4.3. HBV DNA(+) veya (-) olan hastalarda erişkin-çocuk yaş grubu oranı.....	46
Şekil 4.4. HBV DNA istemi yapan kliniklerin dağılımı.....	46

TABLolar DİZİNİ

Tablo No	Sayfa No
Tablo 2.1. Hepadnavirüslerin özellikleri.....	5
Tablo 2.2. HBV genotipleri ve subtiplerinin coğrafi dağılımı.....	12
Tablo 3.1. HBV DNA için amplifikasyon programı.....	18
Tablo 4.1. HBsAg'ye göre HBV DNA görülme oranları.....	40
Tablo 4.2. Cinsiyete göre HBV DNA görülme oranlarının karşılaştırılması.....	40
Tablo 4.3. Yaş grubuna göre HBV DNA görülme oranlarının karşılaştırılması.....	41
Tablo 5.1. HBV'ün olağan serolojik/moleküler tanı kalıplarının yorumu.....	46

1. GİRİŞ

Hepatit B infeksiyonu tüm dünyada önemli bir sağlık sorunu olmaya devam etmektedir. Tüm dünyada yaklaşık 400 milyon kişi HBV ile kronik infektidir. HBV infeksiyonu, kendini sınırlayan akut hastalık, inaktif taşıyıcılık, kronik hepatit, siroz ve hepatosellüler kansere kadar değişen geniş bir klinik spektruma sahiptir (1). Etkin ve güvenli bir aşısı olmasına karşın her yıl 50 milyon yeni olguya tanı konmaktadır. Ülkelerin sağlık politikası, alınan önlemler, eğitim, ekonomik koşullar gibi pek çok faktör HBsAg görülme sıklığında değişikliklere neden olmaktadır. HBV ile karşılaşma oranı Batı Afrika'da en yüksek, Batı Avrupa ve Kuzey Amerika'da en düşük seviyededir. Bu oranlar; Batı Afrika'da $> \%80$, Uzak Doğu'da $\%60$ ve İngiltere'de $< \%0,5$ civarındadır (2-7, 8). Türkiye'deki HBsAg prevalansı, bölgeden bölgeye değişmekle birlikte $\%2-21$ olarak saptanmıştır (9).

HBsAg tarama test duyarlılığı yıllar içinde artmakla birlikte HBV infeksiyonunu saptamakta her zaman yeterli olmamaktadır (10). Bunun için HBV kor antijenine karşı gelişen antikorun (anti-HBc) HBsAg ile birlikte bakılması önerilmektedir. Ancak Anti-HBc'nin orta ve yüksek endemik olduğu bölgelerde yalancı pozitiflik oranlarından dolayı HBV DNA testi daha önemli hale gelmektedir (11, 12).

Moleküler biyolojideki en önemli adımlardan biri nükleik asit dizisinin in vitro çoğaltılmasının başarılmasıdır. Bu bağlamda infeksiyon hastalık etkenlerinin tanısı, tiplendirilmesi, tedavilerinin takibi ve ilaç dirençleri saptanabilmiştir. Nükleik asit dizisinin in vitro çoğaltılması temeline dayanan yöntemler özellikle mikroskopi ile görülmesi zor olan, kültürde üretilmesi uzun zaman alan veya olanaksız olan mikroorganizmaların belirlenmesinde kullanılmaktadır (13). Hepatit B virüs DNA (HBV DNA)'sının belirlenmesinin önemi anlaşıldıkça bu alandaki yöntemlerin kullanımı artmış

ve yeni arayışlar başlamıştır. Real-time PCR; HBV DNA'nın kantitasyonuna olanak sağlayan hızlı ve basit bir testtir ve HBV DNA saptanmasında sıkça kullanılmaktadır.

Çalışmamızda ELISA ile HBsAg pozitifliği saptanan olguların Real-time PCR yöntemiyle HBV DNA sonuçlarının retrospektif olarak incelenerek, karşılaştırılması amaçlanmıştır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tarihçe

Hepatit B virüsü ile ilgili ilk kanıtlara M.Ö. 2000 yıllarında Uzak Doğu'da yapılan insan mumyalarında HBsAg tespit edilmesi ile rastlanmıştır. Hipokrat hepatit virüslerini ilk defa M.Ö. 3-4. yy'da tarif etmiş ve bulaşıcı olabileceğini düşünerek hastanın bulunduğu yerleşim yerine "Karantina uygulaması" önermiştir (14). HBV'ye bağlı bildirilen ilk salgın 1883 yılında Almanya Bremen'de çiçek virüsü aşısı yapılan gemi çalışanlarında görülmüştür. Yirminci yüzyılın başlarında hastalık etkeninin virüs olabileceği düşünülmüştür. 1947 yılında MacCallum ve Bauer, 1973 yılında Dünya Sağlık Örgütü infeksiyöz hepatit için hepatit A ve serum hepatiti için hepatit B teriminin kullanılmasını önermişlerdir (15, 16-19).

1965 yılında Blumberg ve Alter, çok sayıda kan transfüzyonu yapılmış bir hemofili hastasının serumunda jel difüzyon deneyi ile presipitin bandı saptamışlardır. (19). Hasta Avusturalya asıllı olduğu için Avusturalya antijeni (Au) adını vermişlerdir. Başlangıçta konağa ait bir antijen olarak düşünülen Au antijeninin yıllar sonra akut hepatitle ilişkisi saptanarak "Hepatitis associated antigen- HAA" olarak adlandırılmıştır. Daha sonraki çalışmalarda HBV ile ilişkisi ortaya koyulmuş ve "Hepatitis B surface antigen-Hepatit B yüzey antijeni-HBsAg" olarak bugünkü adını almıştır (19, 20).

1965 yılında Blumberg ve arkadaşları Avustralya antijeni'ni bir serum proteini olarak tanımlamışlardır. Avustralya antijeninin akut/kronik hepatit B infeksiyonu ile ilişkili HBsAg olduğu belirlenmiştir. 1970 yılında Dane ve arkadaşları tarafından tam virionun elektron mikroskopik görüntüleri elde edilip "Dane partikülü" olarak isimlendirilmiştir. 1971 yılında Krugman, ısı ile inaktive edilen HBsAg pozitif serumların immünojenik olduğunu ve aşı olarak kullanılabileceğini göstermiştir. 1972

yılında Magnius ve Espmark, HBeAg'yi tanımlamış, 1973 yılında Kaplan ve arkadaşları virüsün kor bölgesinde RNA'ya bağımlı DNA polimerazı göstermişlerdir. Aynı yıllarda virüsün çeşitli antijenlerinin hepatositlerdeki yerleşim özellikleri immun elektron mikroskobu ile belirlenmiş; HBsAg'nin hepatosit sitoplazmasında, HBV çekirdek antijeninin (HBcAg) ise nükleusta depolandığı tespit edilmiştir. 1979'da ise HBV DNA klonlanarak tam nükleotid dizisi çıkarılmıştır (15, 16-19).

2.2. Sınıflandırma

HBV zarflı, kısmen çift sarmallı DNA virüsüdür. *Hepadnaviridae* ailesinin prototip üyesidir. *Orthohepadnavirus* genusu içinde yer almaktadır (21). Hepatotropik bir virüsdür. İnsanlarda ve doğada bazı hayvanlarda (şempanze, orangutan vs) infeksiyon yaptığı saptanmıştır (22).

Hepadnaviridae ailesi; virion büyüklükleri ve ince yapıları birbirine benzeyen, genom replikasyonunda revers transkripsiyonuna gereksinim duyan, karaciğere tropizm gösteren, persistan infeksiyon oluşturabilen ve hepatosellüler kanserlerle ilişkili virüslerdir. Bu ortak özelliklerine karşın virüslerin birbirinden farklılık gösteren özellikleri de bulunmaktadır (24-26).

Tablo 2.1. Hepadnavirüslerin Özellikleri (19)

	Ortohepadnavirüs			Avihepadnavirüs
	HBV	WHV	GSHV	DBHV
Büyükklük	42 nm	40-42 nm	40-42 nm	46-48 nm
Genom	3.2 kb	3.3 kb	3.3 kb	3.0 kb
Viral DNA	Tamamlanmamış	Tamamlanmamış	Tamamlanmamış	Tam
Zarf proteinleri	L,M,S	L,M,S	L,M,S	L,S
Gen	S,C,P,X	S,C,P,X	S,C,P,X	S,C,P
Konak	İnsan Şempanze	Dağ sıçanı	Yer sincabı Dağ sincabı Amerika sincabı	Ördek Kaz Balıkçıl
Replikasyon	Karaciğer Böbrek, Pankreas Lenfosit	Karaciğer Böbrek, Pankreas Lenfosit ve diğer	Karaciğer	Karaciğer, Böbrek, Pankreas, Dalak ve diğer
Dağılım	Tüm dünya	Doğu ABD	Kaliforniya	Çin, ABD

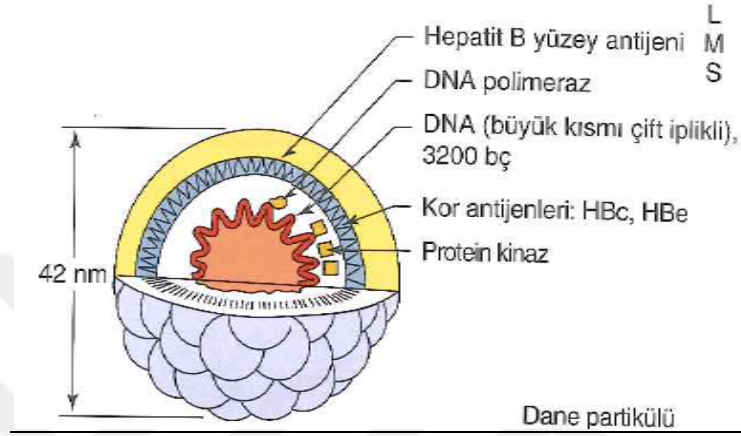
HBV: Hepatit B virüs, WHV: Woodchuck hepatitis virus, GSHV: Ground squirrel hepatitis virus
DHBV: Duck hepatitis B virus

Hepadnaviridae ailesi içinde memeli hepatit virüslerinden *orthohepadnavirüs* ve kanatlı hepatit virüslerinden *avihepadnavirüs* cinsleri yer almaktadır. *Orthohepadnavirüs* içinde HBV, dağ sıçanı (woodchuck) hepatit B virüsü (WHBV) ve yer sincabı (ground squirrel) hepatit B virüsü (GSHBV) yer almaktadır. Bu virüsler arasında nükleotit düzeyinde %70 homoloji bulunmaktadır. Dağ sıçanı (woodchuck) hepatit B virüsü enfeksiyonları kronik karaciğer hastalığı ve HCC için model olarak çalışılmaktadır. *Avihepadnavirüs* cinsinde yer alan ördek hepatit B virüsü (DHBV), özellikle replikasyonun incelenmesi amacıyla kullanılmaktadır (24-26).

2.3. Genel Özellikleri

Küçük, zarflı bir DNA virüsü olan hepatit B virüsünün viral genomu kısmen çift (~%70), kısmen tek iplikli (~%30) yaklaşık 3200 nükleotitten oluşan çembersel DNA'dan meydana gelir. Viral genom ve DNA polimeraz ikozahedral bir kapsid içerisinde yer alır. Kapsidin içinde ayrıca fonksiyonu henüz tanımlanmamış olan

protein kinaz bulunmaktadır. Üç farklı yüzey antijenini taşıyan lipid yapılı zarfı kapsidin dışında yer alır. HBV, DNA virüsü olmasına rağmen revers transkriptaz (RT) enzimi kodlar. Zarflı bir virüs olmasına rağmen; eter, düşük pH, ısı, donma ve çözülmeye karşı oldukça dirençlidir. Bu özellikler virüsün kişiden kişiye geçmesine katkıda bulunur ve dezenfektanlara karşı direnç sağlar (15, 22).



Şekil 2.1. Hepatit B virüsü (Dane partikülü) (22)

HBV içeren serumdan hazırlanan preparatlar elektron mikroskobu ile incelendiğinde; büyüklük, yapı ve miktar gibi özellikler açısından üç farklı tipte partikül saptanmıştır:

a) Dane partikülü: 42 nm çapında, tam virion yapısında, infeksiyöz ve bulan kişinin adıyla anılan partiküllerdir. Nükleokapsid 28 nm çapında olup; DNA, HBcAg, HBeAg ve DNA polimerazdan meydana gelmektedir. Nükleokapsidi çevreleyen yaklaşık 7 nm kalınlığında HBsAg ve lipitten oluşan zarf bulunmaktadır. Zarf büyük (L), orta (M) ve küçük (S) (LHBs, MHBs, SHBs) proteinlerden oluşmaktadır. L, M, S proteinleri sırasıyla 1:1:4 oranında zarfta bulunmaktadır.

b) Küresel partiküller: Yaklaşık 22 nm çapında, infeksiyöz olmayan, nükleik asit içermeyen partiküllerdir. Kanda en fazla bu partiküller bulunmakta olup, 1:2 oranında M ve S proteinleri ile eser miktarda L proteini içermektedir.

c) Tübüler partiküller: 22 nm çapında, infeksiyöz olmayan, nükleik asit içermeyen, 50-500 nm uzunluğunda eşit miktarda M ve L proteini içeren partiküllerdir. (17, 24).

Her üç partikül de immunojenik olduğu için anti-HBs antikoru ile reaksiyona girerler. İnfekte konak serumunda yüksek miktarda (200-500 µg/ml) saptanabilen

HBsAg antijenini içerirler. İnfeksiyon oluşturma özelliği olmayan formlar daha fazla miktarda üretilmektedir. Kanda dolaşan HBsAg'nin büyük bölümünü küresel partiküller oluşturur. Dane partiküllerinin sayısı 104-109/ml arasında iken, non-infektif küresel partiküllerin miktarı 10¹³ /ml veya daha fazladır (27-29).

2.3.1. Duyarlılık ve Dirençlilik

HBV eter, düşük pH, dondurma ve orta düzeyde ısıtmaya dirençlidir (22). Zarflı olmasına rağmen diğer zarflı virüsler gibi deterjanlarla inaktive olmamaktadır. HBV ile kontamine materyal %10'luk çamaşır suyu ile dezenfekte edilebilir. HBV'ü %1 gluteraldehit ile 5 dakikada, %80 etanol ile 2 dakikada, 98°C de ısıtılmakla 2 dakikada inaktive olmaktadır (30, 31).

2.3.2. Genom Yapısı

HBV kısmen çift sarmallı çembersel DNA'ya sahiptir. Guanin + Sitozin (G+C) oranı %49, molekül ağırlığı $2,3 \times 10^6$ daltondur (15, 30). Genotiplere bağlı olarak genom uzunluğu 3181-3221 baz arasında değişmektedir (32).

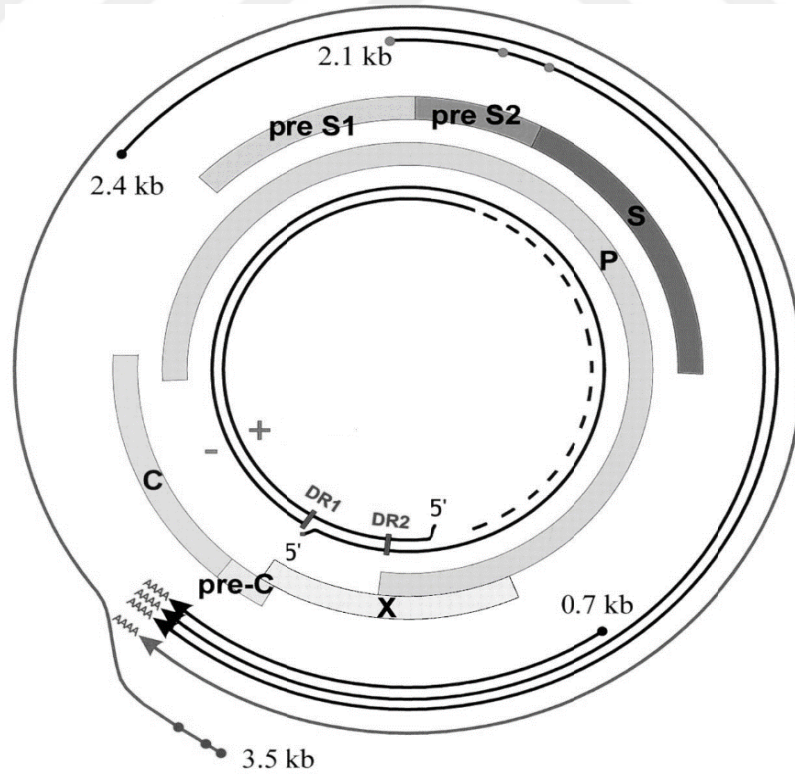
HBV; 1800-2700 nükleotitten oluşan uzun (L) ve 400-1000 nükleotitten oluşan kısa (S) zincirli iki sarmaldan meydana gelmiş, negatif polariteli DNA virüsüdür. Kısa zincirin boyu değişkendir ve kapsidin zarflanma zamanı ile ilişkilidir. Bu zincirler çembersel bir yapıda olmasına rağmen her birinin 3' ve 5' uçları birleşik olmadığı için lineer moleküler yapı gösterirler. Uzun zincirin 5' ucu 1826. kısa zincirin 5' ucu ise 1601. nükleotide bulunur. Her iki zincir üzerinde DR (direct repeats) denen iki adet (DR1 ve DR2) 11 nükleotitlik dizi vardır. Uzun zincirin 5' ucu DR1, kısa zincirin 5' ucu DR2 içinde yer alır. DR'lerdeki hidrojen bağları zincirleri bir arada tutar ve çembersel yapının korunmasına katkıda bulunurlar (17, 33). Uzun zincirin 5' ucunda viral DNA polimeraz kovalent olarak bağlı iken kısa zincirin 5' ucunda viral DNA sentezi için kalıp görevi gören kısa RNA oligomeri bulunur. Uzun zincirin 3'ucu sekiz-dokuz nükleotitlik artık uç ile sonlanırken kısa zincirin 3' ucundaki eksik bölge ise replikasyon sırasında viral DNA polimerazla sentezlenerek doldurulur (25).

HBV'de genetik bilgi negatif zincir üzerinde taşınır ve bu bölge, dört farklı protein kodlayan bölge [açık okuma çerçevesi: open reading frame (ORF)] içerir.

Bunlar P, C, S ve X genlerinden meydana gelmektedir. ORF'lerin transkripsiyonu promoter (başlatıcı) ve enhancer (güçlendirici) denilen düzenleyici dizinler tarafından kontrol edilmektedir. HBV genomunda dört promoter (preC/C prom, X prom, preS1 prom ve preS2/S prom) ve transkripsiyonu arttıran iki enhancer (EN1 ve EN2) bölgesi bulunmaktadır. Bu genler arka arkaya dizilmiş ve binişiklerdir (17, 33, 34).

Genomun en uzun geni olan P geni; X ve C genleri ile kısmen, S geni ile tamamen binişik halde bulunmaktadır. Bu nedenle uzun sarmal 1.5 kez okunmaktadır. Bu özellik sayesinde HBV; hayvan virüsleri içinde en küçük genomik yapıya sahip olmasına rağmen kendini kodlama kapasitesi en fazla olan virüstür (33).

Uzun sarmaldaki S geni yüzey proteinlerini (L, M, S), C geni kapsid proteinlerini (HBeAg, HBcAg), X geni X proteinini (HBxAg) ve P geni de DNA polimerazı kodlar. Ancak başlangıç kodonları farklı olduğundan S geni üzerinde pre-S1, pre-S2 ve S olmak üzere üç, C geni üzerinde ise pre-C ve C olmak üzere iki bölge bulunmaktadır ve dolayısıyla farklı başlangıç kodonlarından sentezlenen proteinler de farklı olmaktadır. Bundan dolayı HBV 4 adet ORF'si olmasına rağmen yedi değişik polipeptid üretmektedir (29).



Şekil 2.2. HBV genomik yapısı ve sentezlenen proteinler (15)

2.3.3. Replikasyon

HBV'ün en önemli özelliği karaciğere tropizm göstermesi ve replikasyonunun kendine özgü olmasıdır (22).

HBV hücreye girişte ilk olarak hücre tipine bağlı olmayan ve hepatositlerden başka diğer hücrelerde de bulunan heparan sülfat proteoglikanlarına geri dönüşümlü olarak tutunur daha sonra hepatositlerde bulunan henüz tanımlanmamış özgül reseptörlere geri dönüşümsüz olarak bağlanır. Yapılan araştırmalara göre pre-S1, pre-S2 bölgesinin reseptör bağlanmasını gerçekleştirmede gerekli olduğu düşünülmektedir. Tutunma sonrasında nükleokapsid hepatosite girer. Virüsün hücre içine girişinin endositoz veya füzyonla iki farklı şekilde olabildiği düşünülmektedir. Hücreye girdikten sonra, nükleokapsid çekirdek membranına taşınır ve polimeraz-viral genom kompleksi nükleoplazma içine girer (15, 22).

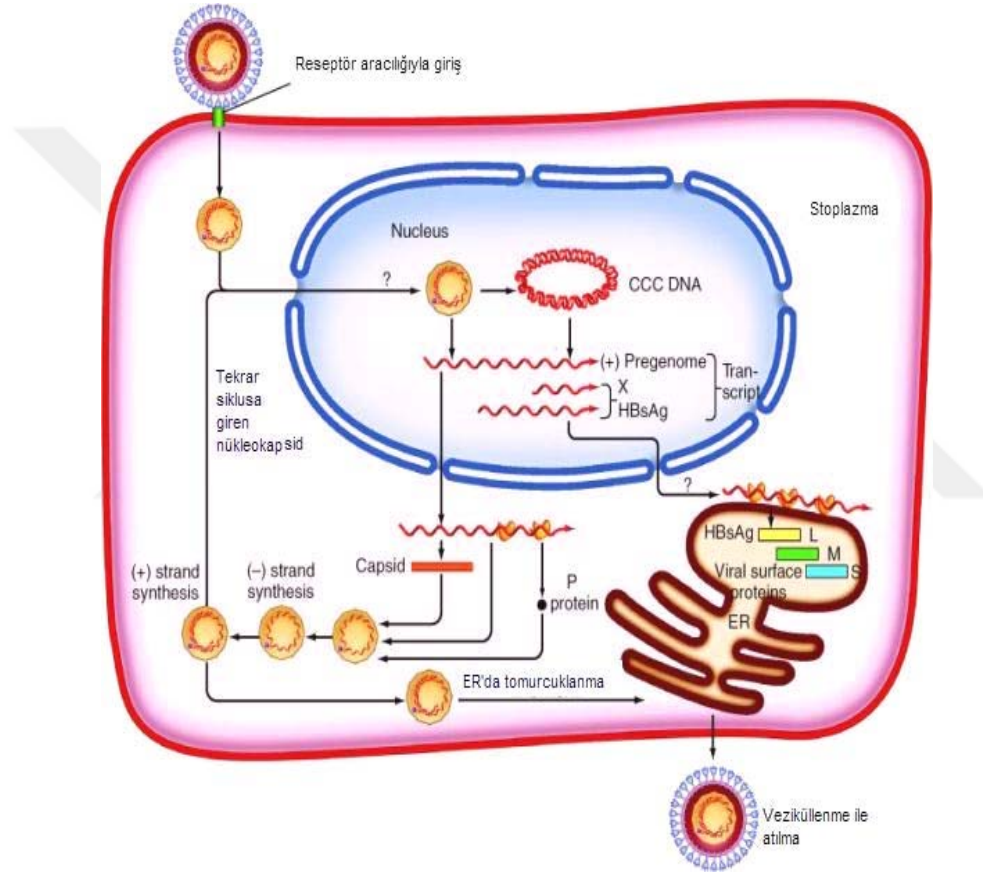
Çekirdekte genomun kısa DNA (pozitif polariteli) zinciri viral polimeraz ve hücresel enzimler aracılığı ile tamamlanır ve kovalent olarak kapalı sirküler DNA (covalently closed circular DNA; cccDNA)'ya dönüşür. Bu cccDNA formu; pregenomik RNA (pgRNA) ve mRNA için kalıp görevi yapar. cccDNA hepatosit içinde DNA giraz ve topoizomerazların etkisiyle süpersarmal oluşturur ve minikromozom halinde kalır. PgRNA nükleustaki cccDNA'dan transkripte edilir ve infekte hücrenin sitoplazmasına yerleşir. PgRNA sitoplazmada HBcAg, HBeAg ve revers transkriptaz enzimi (polimeraz) için kalıp görevi görür. Polimeraz daha sonra pgRNA'yi yeni sirküler DNA molekülü haline çevirir. İnfeksiyonun erken döneminde; yeni sentez edilen genomların bir kısmı cccDNA havuzunu oluşturmak üzere tekrar sitoplazmadan nükleusa geçerler.

HBV genomunun açık okuma bölgesindeki her bir nükleotit aynı zamanda bir kodlama bölgesinde yer almaktadır. HBV genomunun yarısından fazlası, birden fazla açık okuma bölgesini de içine alacak biçimde oluşur. HBV proteinlerinin sentezinde 4 viral mRNA transkripti rol almaktadır. Bu viral mRNA'lar cccDNA'nın negatif zincirinden hücresel RNA polimeraz II enzimi kullanılarak sentezlenir. Bunlar;

- 3.5 kb mRNA: Poli-A kuyruğu da taşıdığından dolayı viral genomdan daha büyüktür. Genom replikasyonunda kalıp görevi görür, HBc, HBe antijenlerini, polimerazı ve DNA replikasyonu için bir protein öncülünü (primer) kodlar.
- 2.4 kb mRNA : PreS1 , preS2 ve S proteinlerinin sentezinde rol oynar.
- 2.1 kb mRNA : PreS2 ve S proteinlerinin sentezini sağlar.

- 0.7 kb mRNA : X proteininin sentezini sağlar.

Olgun virionlar; RNA revers transkripsiyonu ile sirküler DNA molekülüne dönüşerek oluşmaktadır. PgRNA ve polimeraz proteini, olgun kor partiküllerinde paketlenir ve revers transkriptaz enzimi tarafından yeni viral DNA genomunu sentez edilir. Daha sonra bu partiküller endoplazmik retikulumda yüzey proteinlerinde paketlenir ve hücreden dışarıya salınırlar. HBsAg gibi yüzey proteinleri, HBV genomu ve kor proteini olmadan küresel ve tübüler partiküller olarak infekte hücreden salınırlar (17, 22).



Şekil 2.3. Hepatit B virüsünün yaşam ve replikasyon döngüsü (35)

HBV'ün replikasyonunun düzenlenmesinde; promoter (prekor/kor prom, X prom, preS1 prom ve preS2/S prom), enhancer (EN1 ve EN2), PreS2 başlama kodonunda bulunan CCAAT motifi, glukokortikoide duyarlı eleman ve negatif düzenleyici eleman rol alır. Ayrıca viral RNA üzerinde bulunan replikasyon kontrolü için poliadenilasyon sinyali, post-transkripsiyonel düzenleyici eleman, enkapsidasyon sinyali (ϵ) gereklidir (36).

2.3.4. Genotip ve Subtip

HBV genotipleri; tüm genom dizisinde %8'i, S geninde ise %4'ü aşan farklılık taşıyan varyantlar şeklinde tanımlanır. Buna göre HBV genomu A'dan H'ye kadar adlandırılan sekiz genotipten oluşmaktadır (15).

S proteinini oluşturan aminoasit dizilerinin belli bölgelerdeki farklılıklarına göre *ayw1*, *ayw2*, *ayw3*, *ayw4*, *ayr*, *adw2*, *adw4*, *adrq-* ve *adrq+* olarak dokuz ayrı subtipi bulunmaktadır (33, 37).

HBsAg subtiplerinin yeryüzünde farklı dağılımları vardır. *Ayw1* subtipi Vietnam'da, *ayw2* subtipi Akdeniz ülkelerinde, *ayw3* Avustralya'da, *ayw4* subtipi Batı Afrika'da görülmektedir. *Adw2* subtipi Kuzey Avrupa, Orta Avrupa ile Doğu Asya'da, *adw4* subtipi ise Amerika ve Arjantin'de baskındır. *Adrq-* türler sadece okyanus bölgesine ait olup *adrq+* türler ise Vietnam hariç Güneydoğu Asya'da görülür (15).

Bazı HBsAg alt tipleri birden fazla genotipte bulunmakla birlikte, alt tipler ve genotipler arasında bir ilişki varlığı söz konusudur. Genellikle *adw2* alt tipi genotip A, B ve G'de bulunmasına rağmen, genotip C ve D'de görülmektedir. *Adrq* ve *ayr* olan bütün kökenler genotip C'de yer alırken, *adw4q⁻* alt tipi ise sadece genotip F ve H'de yer almaktadır. *Ayw2* ve *ayw3* alt tipi genotip D ve C'de bulunurken, *ayw4* alt tipi ise genotip D, E, F ve H'de bulunmaktadır (38, 39).

Ülkemizde yapılan bir çalışmada 54 kronik hepatit B hastasının 51'inde genotip D1, 3'ünde genotip D2 saptanmıştır. HBsAg subtipleri değerlendirildiğinde ise; 50 hastada *ayw2*, 2 hastada *ayw3* ve 2 hastada *ayw* (alt tiplendirme yapılamamıştır) subtipleri görülmüştür (40).

HBV prevalansının düşük olduğu Kuzeybatı Avrupa ve Amerika Birleşik Devletleri'ndeki taşıyıcıların arasında baskın olarak genotip A vardır. Amazon bölgesi ve Peru gibi yüksek HBV prevalansına sahip ülkelerde ise genotip F sık olarak saptanmıştır. Doğu Asya ülkelerinde HBV bulaşında vertikal geçiş ilk sırada yer alır ve genotip B ve C prevalansı yüksektir. Bu durum kısmen vertikal geçişten sorumlu olan HBeAg pozitif (replikatif) dönemin daha uzun oluşu ile açıklanabilir. HBV'ün endemik olduğu bölgelerde, yüksek taşıyıcılık oranının devamında en önemli mekanizma vertikal geçiş olarak kabul edilmektedir. Bunun aksine genotip A ve D'nin dominant olduğu Akdeniz ve Sahra altı Afrika ülkelerinde horizontal geçiş daha ön plandadır (41).

Tablo 2.2. HBV genotipleri ve subtiplerinin coğrafi dağılımı (42).

Genotip	Subtip	En çok görüldüğü coğrafi bölge
A	adw 2	Kuzeybatı Avrupa
B	adw 2 adrq+	Doğu asya Japonya
C	adw 2 adrq+ adrq- ayr	Doğu asya Japonya, Kore, Çin Fransız Polinezyası
D	ayw2 ayw3	Akdeniz Bölgesi Hindistan, Pakistan, Yakın Doğu
E	ayw4	Batı ve Sahra altı Afrika
F	adw4q-	Orta Amerika, Şili, Arjantin, Peru, Amazon Bölgesi
G	adw2	Fransa, ABD, Almanya, Meksika
H	adw4q-	Orta ve Güney Amerika

2.3.5. Viral Proteinler

Yüzey (kılıf) proteinleri

Yüzey proteinleri; HBV genomunda PreS/S gen bölgesi ürünleridir. S geni üzerinde başlangıç kodonları farklı ancak ortak 3' ucuna sahip üç ayrı gen bölgesi tarafından üç değişik protein molekülü sentezlenmektedir. Okuma işlemi gen üzerindeki ilk kodondan başlarsa preS1+preS2+S gen bölgelerinin tümü okunacağından LHBs, ikinci kodondan başlarsa preS2+S bölgeleri okunacağından MHBs, üçüncü kodondan başlarsa sadece S bölgesi okunacağından SHBs sentezlenir. PreS1 gen bölgesi 2850-3174., preS2 gen bölgesi 3174-157. ve S gen bölgesi 157-833. nükleotitler arasında yer alır (15, 16).

LHBs; bu protein en fazla Dane partiküllerinde, daha az olarak tübüler partiküllerin yüzeyinde ve az miktarda küresel partiküllerde bulunur. LHBs'de yer alan preS1 bölgesinin 21-47. aminoasitleri arasındaki bölge hepatositlere tutunmayı sağlar ve bu bölgeye karşı oluşan antikorlar hepatosite bağlanmayı engeller (25, 33). Hepatosit içinde LHBsAg birikimi, endoplazmik retikulumda dilatasyona neden olur ve hücreler balonlaşarak buzlu cam görünümünü alırlar (33).

MHBs; tüm partiküllerde bulunmasına rağmen Dane partikülü ve tübüler partiküllerde LHBs ile eşit miktarda, 22 nm'lik küresel partiküllerde ise LHBs'den

daha fazla oranda bulunmaktadır. Replikasyon olmadığı zaman HBsAg'nin yapısında bulunmaz. Bu nedenle pre-S2 proteininin bulunması viral replikasyonun bir göstergesidir. Asemptomatik HBsAg taşıyıcılarında ise az miktarda yer alır. Pre-S2 glikan reseptörünün HBV'ün karaciğer hücrelerine tutunmasında rolü olduğu düşünülmektedir (25, 33).

SHBs; HBsAg'nin büyük kısmını oluşturur ve 226 aminoasitten meydana gelir. Zarfın major proteinidir. HBsAg S, L ve M yüzey proteinlerini değişik oranlarda içerir. HBV'ün partikül tipleri bu üç proteini içermektedir fakat oranları eşit değildir. Tüm partiküllerde baskın olarak bulunan S proteinidir (25, 33).

Tüm HBV genotip ve HBsAg alt tiplerinde ortak olarak bulunan özgül "a" determinanti, 124-147. aminoasitler arasındaki hidrofilik bir bölgede yer almaktadır. "a" determinanti HBV için özellikle bağışıklık açısından önemlidir. Çünkü "a" determinantına karşı oluşan antikolar HBV'ün hepatositlere bağlanmasını engelleyerek tüm alt tiplere karşı etkili bir bağışıklık sağlar. SHBs üzerindeki bu bölge, yapısında yer alan 7 adet sistein arasındaki disülfid köprülerince oluşturulan ve 124-147. aminoasitler arasında yer alan iki ilmik sayesinde oldukça iyi korunmuştur.

Virionun dış yüzünde bulunan "a" determinanti, aşı veya doğal infeksiyon sonrası oluşan anti-HBs antikolarının büyük kısmını bağlayabilmektedir. Nötralizan antikolar için major determinant 139-147. aminoasitler arasındaki ikinci ilmik üzerindedir. S proteinine karşı gelişen bağışık yanıtın HBV'den korunmada etkili olması ve tüm HBV genotipleri ile HBsAg subtiplerinde "a" determinantının bulunması, farklı veya benzer alt tiplerle oluşan reinfeksiyonlardan korunmada "a" determinantına karşı gelişen cevabın önemini göstermektedir (33).

Kor proteinleri

HBV genomunda C geninde bir ORF yer alır. Gen üzerinde okuma işleminin başladığı iki farklı kodon (1816. ve 1903. nükleotit) bulunur. C geni; prekor ve kor olmak üzere iki ayrı bölgeye ayrılır. Okuma işlemi C başlangıç kodonundan başlarsa HBcAg; preC başlangıç kodonundan başlarsa HBeAg proteini sentezlenir. Bu iki bölgenin stop kodonu (2452. nükleotit) ortak olduğundan aynı noktada sonlanırlar (33).

HBcAg; C bölgesinden genotipe bağlı olarak değişen uzunlukta bir polipeptid (p23c) olan HBcAg'nin öncülü sentezlenir (32). HBcAg 29 aminoasitlik ek dizisi olmadığı için endoplazmik retikuluma gidemeyip konak hücre

sitoplazmasında kalır ve karboksiterminal ucundaki 34 aminoasitlik peptit ile viral DNA'ya sıkıca bağlanır (26, 33). HBcAg dolaşımında serbest halde bulunmaz. Karaciğerde hepatositlerin nükleusunda yer alır, aktif infeksiyon sırasında ise sitoplazmada görülür. Akut ve kronik HBV infeksiyonu olan hastaların karaciğerinde saptanabilir (33, 34).

HBeAg; 25kDa molekül ağırlığında bir polipeptiddir (p25c). Okuma işleminde öncülü preC bölgesinden başlayarak sentezlenir. HBcAg'den farklı olarak ek aminoasit dizisi içerir. Sentez sırasında prekor polipeptidini (p25c) endoplazmik retikuluma yönlendirir, burada konak proteazları tarafından C terminal bölgesindeki 34 aminoasitlik bölüm kesilerek işlenmiş protein haline getirilir. Sonrasında nükleusa yönlendirilir veya Golgi cisimciği üzerinden HBeAg olarak salınır (19). HBeAg aktif HBV replikasyonunun iyi bir göstergesi olmasına rağmen in vitro araştırmalar HbeAg'nin viral replikasyon için gerekli olmadığını göstermiştir. HBeAg kan dolaşımına salınırken HBcAg sadece karaciğer dokusunda saptanabilir. HBeAg ayrıca plasentayı da geçerek fetal immün sistemi HBV antijenlerine karşı uyarır. HBeAg'ye karşı oluşan antikorlar anti-HBs'nin tersine koruyucu değildir (32).

P proteini

HBV genomundaki en uzun gen bölgesidir. 2309-1623. nükleotitler arasında yaklaşık 832 aminoasitten oluşmaktadır. P geni, viral DNA polimerazı kodlar ve 835-845. kodonlar arası bölgede HIV'e ait RT ile homoloji gösterir (34). P proteini RT, endonükleaz (RNase H) ve RNA'ya bağımlı DNA polimeraz aktivitesine sahiptir (33).

X proteini

HBV genomunda yer alan en küçük gen bölgesi X proteindir. 17 kDa molekül ağırlığında, 154 aminoasit uzunluğunda olup 1376-1838. nükleotitler arasında yer almaktadır. HBxAg'yi kodlar. HBxAg; HBV transkripsiyonunun transaktivasyonu, sinyal iletimi yoluyla endojen protein kinaz C aktivitesinin artışı ve ribo/deoksi ATPaz aktivitesinde rol alır. In vitro çalışmalara göre bu protein gen ekspresyonu veya HBV replikasyonu için mutlaka gerekli değildir (25, 26, 33).

X proteini ayrıca tümör supresör genin (p53) işlevini bozar. Bu durum HBV ile ilişkili hepatokarsinogenez sürecinin ilk aşamasında etkili olacağından HCC gelişiminde rol oynayabileceğini düşündürmektedir (29).

2.4. Hepatit B Virüs Mutasyonları

HBV replikasyonunda; pregenomik RNA'dan revers transkripsiyon ile viral DNA oluşur. Hepatit B virüsünün hızlı replikasyon yeteneği olması ve yapısında yer alan revers transkriptaz enziminden dolayı diğer DNA virüslerinden 10 kat fazla mutasyon oluşturmaktadır.

HBV mutasyonları;

- a) Virüs replikasyonunun artışına neden olur
- b) Virüsün antijenik yapısını değiştirerek bağışık yanıtı kaçırmayı sağlar
- c) Virüsün hücreye girişini ve integrasyonunu kolaylaştırır
- d) Antiviral ilaçlara karşı direnç gelişmesine yol açar

Genom üzerindeki herhangi bir yerde (S, preC/C, X, P, promoter ve enhancer) ortaya çıkan bu mutasyonlar;

- a) Tek bir taban bazınının değişmesi (nokta mutasyonu) ile
- b) Bir veya daha fazla nükleotitin silinmesi ile
- c) Aynı dizinin ters veya düz biçimde tekrar edilmesi ile
- d) Nükleotit dizilerinin yeniden düzenlenmesi gibi farklı genetik mekanizmalarla meydana gelebilir.

Aktif bağışık yanıtın sağlanmasına rağmen virüste meydana gelen genetik değişiklikler mutant suşun hayatının devamlılığını sağlar ve bu durum tanıda karışıklıklara, aşı çalışmalarında başarısızlıklara neden olur (14, 32).

2.4.1. Yüzey (kılıf) mutasyonları

HBV kılıf varyantları ile ilgili ilk önemli mutasyon; alellerdeki subtip determinant çiftlerinde (d/y veya w/r) bulunmuştur. Sentez sırasında 519. nükleotitteki değişime bağlı olarak HBsAg'nin 122. aminoasitinde bulunan lizin ile argininin yer değiştirmesi ile "d" determinantı "y" determinantına dönüşmektedir. 633. nükleotitin sorumlu olduğu 160. aminoasitteki lizinin yerine arginin konması ile "w" determinantı "r" ye dönüşmektedir (19).

HBsAg'nin tüm subtiplerinde "a" determinantı ortak bulunduğu ve bu bölgeye karşı oluşan antikorlar hepatositlere bağlanmayı engellediğinden, aşı veya doğal infeksiyonun geçirilmesi ile herhangi bir subtipe karşı gelişen humoral bağışıklık

tüm serotiplere karşı koruyuculuk sağlamaktadır. Ancak “a” determinantında değişiklik olursa klasik HBsAg subtiplerine karşı oluşan antikorlar koruyucu olmaz (29).

Yüzey mutasyonlarının klinik açıdan önemli sonuçları;

a) Aşılınmış kişilerde HBV enfeksiyonunun oluşabilmesi: İtalya’da 1988 yılında HBeAg pozitif anneden doğan bir bebeğe pasif ve aktif immunizasyon uygulanmıştır. Yeterli düzeyde anti-HBs’ye sahip olduğu halde bir süre sonra HBsAg ve HBeAg’nin pozitifleştiği ve kronik hepatit geliştiğinin saptanması aşı ile ilişkili ilk mutant vakasını ortaya koymuştur. Dizi analizi yapıldığında anneye ait “a” determinantının 145. pozisyonunda glisin bulunurken, çocuğunda arginin saptanmıştır. Buna bağlı olarak klasik HBsAg subtipleri ile hazırlanan aşılardan koruyuculuğunun yeterli olmadığı sonucuna kanaat getirilmiştir (29).

b) Hepatit B immunglobulini ile karaciğer transplant alıcılarında HBV enfeksiyonu reaktivasyonu: Korunma amacıyla “monoklonal anti-a” ya da “poliklonal anti- HBs” verilen karaciğer transplantlı hastalarda bir süre sonra HBV DNA pozitifleştiği görülmüştür. Bu olgularda S proteininin diğer pozisyonlarında mutasyonel değişiklikler olmuştur ve 145. aminoasitte glisin-arginin mutasyonu saptanmıştır (43, 44).

c) HBsAg tespitinde kullanılan EIA testlerinin saptayamayacağı antijenik yapıların varlığı ve olağan dışı serolojik profiller: S bölgesinde oluşan mutasyonlar tek başına HBV DNA pozitifliği, tek başına HBsAg pozitifliği, anti-HBs ve HBsAg’nin birlikte pozitif bulunması gibi alışılmadık dışında serolojik profillerin görülmesine neden olmaktadır (19).

2.4.2. Prekor/kor mutasyonları

Viral replikasyon kaybı olmadan anti-HBe serokonversiyonu gösteren bazı hastalardan izole edilen HBV DNA'lar incelendiğinde prekor/kor geni üzerinde mutasyonlar görülmüştür. Eğer prekor bölgesinin 1896. nükleotidindeki guaninin (G) yerine adenin (A) gelirse triptofan kodonu da denilen kodon 28 (TGG), stop kodon (TAG) haline gelir. Dolayısı ile HBeAg’nin prekürsör proteininin (p250) oluşması engellenir. Bu mutasyon kor bölgesinin başlama kodonundan önce olduğundan ve HBeAg ile HBcAg farklı mRNA moleküllerinden sentezlendiğinden HBcAg’nin sentezinde bir problem oluşmazken, HBeAg sentezlenemez (29).

2.4.3. P geni mutasyonları

P geni HBV'nin en büyük geni olup diğer üç genle çakışabilir ve gen üzerinde değişiklik olması halinde diğer genlerde de değişikliğe neden olabilir. Bugün için polimeraz geni mutasyonları denildiğinde akla nükleotid analoglarına karşı direnç sağlayan mutasyonlar gelmektedir. HBV replikasyonunu baskılamak için nükleozit/nükleotid analogları kullanılmaktadır. Bu ajanların uzun süre kullanımı replikasyonu baskımlarken ilaca dirençli kökenlerin de ortaya çıkmasına neden olmaktadır (34).

Polimeraz gen mutasyonları çoğunlukla tirozin-metionin-aspartat-aspartat (YMDD) motifinde oluşmaktadır. İlaça bağlı en iyi tanımlanan HBV mutantları lamivudine dirençli olanlardır ve lamivudin direncinden sorumlu olan mutasyonlar; rtM204V (YVDD), rtM204I (YIDD) ve rtM204S (YSDD) 'dir. Adefovir dipivoksil direncinden rtN236T ve rtA181T/V mutasyonları sorumludur. Entakavir direnci ise lamivudine dirençli olgularda rtT184G, rtS202I ve rtM250V bölgelerinde gözlenmiştir (29, 45).

2.4.4. X geni mutasyonları

X proteini virüsün replikasyonu ve ekspresyonunda rol alır ayrıca HBV genlerinin transaktivasyonunu da sağlar. X geninde meydana gelen mutasyonların önemi tam olarak bilinmemektedir. Bu varyantların replikasyon seviyeleri düşük, infektiviteleri düşüktür. Kronik HBV enfeksiyonlu, HCC'li, fulminan hepatitli ve sirozun son dönemindeki hastalarda X geni üzerinde nokta mutasyonları saptanmıştır. Bu gen üzerindeki bulunan delesyon DNA ekspresyon ve replikasyonunu baskılar ve sonuçta HBsAg'yi negatif hale getirir (29, 46).

2.5. Epidemiyoloji

Tüm dünyada yaygın olarak görülen hepatit B virüsünün birlikte neden olduğu akut hepatit vakalarının ortalama %5'i kronikleşirken bir kısmı da siroza dönüşmektedir. Sirozlu olgularda HCC gelişme olasılığı yüksektir. Tüm dünyada yaklaşık 400 milyon kişi HBV ile kronik enfektedir. Her yıl 500.000- 1.200.000 kişide

HBV nedenli hastalıklara bağlı ölüm görölmektedir (47, 48).

HBV'ün başlıca bulaşma yolları řu şekildedir:

- a. İnfekte kan ya da vücut salgıları ile parenteral temas (perkütan)
- b. Cinsel temas
- c. İnfekte anneden yeni doğana bulaş (perinatal, vertikal)
- d. İnfekte kişilerle cinsellik içermeyen yakın temasla bulaş (horizontal)

HBV serum dışında semen, yara eksudası, tükürük, idrar, dışkı, ter, gözyaşı, vajinal salgılar, sinovyal sıvılar, beyin omurilik sıvısı ve kordon kanında da saptanmıştır (28).

Ayrıca HBV'ün infekte kanın hasarlanmış oral mukozaya teması sonrasında bulaştığını bildiren yayınlar da mevcuttur. Bulaşma mevsim ve yaş faktörleri ile ilişkili değildir (28, 49).

Perkütan bulaşma, kan ve kan ürünleri verilenlerde, hemodiyaliz hastalarında, endoskopi, yapay solunum cihazı gibi tıbbi aletlerin kullanımında, akupunktur uygulaması, aynı enjektörün farklı bireylerde kullanımı ve dövme yaptıranlarda görölmektedir. Ayrıca infekte kan bulaşmış jilet, tıraş makinesi, diş fırçası, havlu gibi günlük eşyaların ortak kullanımı da perkütan bulaşmaya neden olabilmektedir (28).

Homoseksüel kişiler rektal mukoza travmalarına bağlı olarak infekte kan ya da infekte semen temasından dolayı cinsel temasla bulaşta en riskli gruptur. Genital sekresyonlar kandan daha az oranda virüs içerselerde bu sekresyonlar heteroseksüel temas sırasında bulaşmaya neden olabilmektedir. HBV taşıyıcılarının eşleri heteroseksüel yolla bulaşmada, tehlike altında olması yanında, çoklu heteroseksüel eşi ya da diğer cinsel yolla bulaşan hastalığı olanlarda risk daha fazladır (49).

Perinatal bulaşma, intrauterin dönemde plasenta hasarına bağlı olarak, doğum sırasında vaginal kanaldan geçişte, sezaryen sırasında anne kanıyla temas gibi durumlarda ve doğum sonrasında olmaktadır (50).

Horizontal (yatay) bulaşma ise insandan insana zedelenmiş deri veya mukoza aracılığıyla oluşan bulaşma şeklidir. Tükürük gibi vücut sıvılarının hasarlı deriyle teması da bulaşa neden olabilir. Horizontal yol özellikle ev içi bulaşta önemlidir. HBV toplu yaşamın olduğu zihinsel engelli çocuk bakımevleri, anaokulu, kreş, yatılı okul, kışla, yurt, hapishane gibi yerlerde de kolayca yayılabilmektedir. Kötü hijyen ve düşük sosyoekonomik düzey de HBV'ün bulaş oranını arttırmaktadır (28, 50).

2.5.1. Dünyada HBV infeksiyonu prevalansı

Dünyada HBV infeksiyonunun dağılımı coğrafi bölgelere göre farklılıklar göstermektedir. Bu bölgelerdeki HBsAg ve anti-HBs pozitifliği oranları, infeksiyonla karşılaşma yaşı ve virüsün en sık hangi yolla bulaştığı göz önüne alınarak düşük, orta ve yüksek endemite bölgeleri olarak sınıflandırılır. HBsAg pozitiflik oranı dünya genelinde %0,1–20 arasında yer alır (48).

Düşük endemik bölgelerde prevalans %2'nin altındadır. Kuzey Amerika, Kuzey ve Batı Avrupa, Avustralya, Yeni Zelanda gibi gelişmiş ülkelerde HBV düşük endemiteye sahiptir. Bu ülkelerde genel popülasyonda HBV insidansı düşük bulunurken eşcinseller, çok eşli heteroseksüeller, damar içi uyuşturucu bağımlıları gibi risk gruplarında ve eskimolar, Yeni Zelanda Maorileri, Avustralya yerlileri, ABD zencileri gibi bazı etnik gruplarda infeksiyon endemiktir. Cinsel temas en önemli bulaş yoludur. HBV ile karşılaşma çoğunlukla erişkin dönemde olur. Perinatal ya da erken çocukluk çağındaki bulaş daha çok HBV taşıyıcılığına neden olur (48, 51).

Orta endemik bölgelerdeki toplumda HBsAg pozitifliği %2–7 arasında yer alır ve erişkinlerin %20–60'ında anti-HBs pozitifliği vardır. Türkiye'nin de içinde yer aldığı Ortadoğu, Güney ve Doğu Avrupa, Güney ve Orta Amerika, Orta Asya orta endemik bölgelerdendir. İnfeksiyona çoğunlukla çocukluk, ergenlik veya genç erişkinlik dönemlerinde maruz kalınmaktadır. Başlıca bulaşma yolu perkütan veya horizontal yollardır (48, 51). Yüksek endemik bölgeler olan Afrika ve Asya ülkelerinde HBV infeksiyonunun epidemiyolojisi oldukça farklıdır. HBsAg pozitifliği %5–20 oranlarındadır. Erişkinlerin %70'den fazlası anti-HBs pozitifdir. Yüksek endemik bölgelerde ana bulaş yolu perinatal veya horizontal bulaştır. Asya'da perinatal bulaşma daha ön planda iken Afrika'da bulaşma bir yaşından büyük çocuklarda aile içi horizontal yolla olmaktadır (48, 51).

2.5.2. Türkiye'de HBV infeksiyonu prevalansı

Ülkemiz hepatit B açısından orta derecede endemik bölgeler arasında yer almaktadır ve yaklaşık 3 milyon kişinin HBV ile infekte olduğu tahmin edilmektedir (9). Endeminin derecesi ile HBV infeksiyonunun bulaş yolları arasında yakın ilişki bulunmaktadır. Orta doğu ve Akdeniz ülkelerinde horizontal geçiş en sık rastlanan geçiş yoludur. HBV infeksiyonu vertikal geçiş durumunda daha fazla kronikleşme

eğilimi göstermektedir. Ülkemizde de horizontal geçişin başlıca bulaş yolu olduğu, gebelerde HBsAg ve özellikle de HBeAg prevalansının düşük olması nedeniyle vertikal geçişin muhtemelen daha az görüldüğü düşünülmektedir. HBV bulaşı aile içinde başlıca çocukluk ve adolesan dönemde görülmektedir. Bundan dolayı yenidoğan ve çocukların aşılınması ve ailelerin bulaş yolları hakkında bilgilendirilmesi önem taşımaktadır (53).

Avrupa Hastalık Önleme ve Kontrol Merkezi'nin Eylül 2010'da hepatit B'ye ilişkin hazırladığı teknik raporda Türkiye'de genel popülasyonda hepatit B prevalansı bölgelere göre %2-8 olarak bildirilmiştir. Bu rapora göre Türkiye Avrupa ülkeleri ile kıyaslandığında genel popülasyonda hepatit B prevalansının en yüksek olduğu ülkelerden biridir (54). Ülkemizde yapılan çalışmalarda hepatit B prevalansı batıdan doğuya doğru artmaktadır. HBV'nin 8 genotipi içinde Türkiye'de en sık genotip D bulunduğu bildirilmektedir (55, 56).

2.6. Klinik Belirti ve Bulgular

HBV enfeksiyonunun seyri dört dönemde incelenebilir. Bunlar:

1. İmmuntolerans dönemi: Sağlıklı erişkinlerdeki inkübasyon dönemine karşılık gelir, yenidoğanlarda ise onlarca yıl sürebilir. Virüs replikasyonu yüksektir, aminotransferazlarda yükselme yoktur ve klinik belirti bulunmaz (29).

2. İmmunolojik yanıt dönemi: Bu dönemde inflamatuvar yanıt ve hücre harabiyeti mevcuttur. Erişkinlerde görülen akut hepatit tablosu bu döneme örnektir. İnfekte hücrelerin ölümüyle birlikte HBV DNA düzeyinde düşme saptanır. Klinik olarak sarılık tablosu görülür. Bu dönem kronik olgularda 10 yıl veya daha uzun bir süre devam edebilir (29).

3. Viral replikasyonun baskılandığı (non-replikatif) dönem: HBeAg kaybolurken anti-HBe'de pozitifleşme saptanır ve HBsAg pozitifdir. Aminotransferazlar normal düzeye iner. Bu dönemde HBV'nin hepatosit DNA'sına integresyonu gerçekleşir. Bu şekilde serolojik profilin görüldüğü hastalar "sağlıklı ya da asemptomatik taşıyıcı" olarak tanımlanır ve bu hastaların büyük kısmında HBsAg(+) bulunmakla birlikte HBV DNA negatif olarak saptanabilmektedir (29, 58, 59).

4. İmmun dönem: Bu dönemde HBsAg negatifleşir ve anti-HBs ortaya çıkar.

Bu dönemlerin gelişmesinde bazı etkilere bağlı olarak farklılıklar görülür. İnfeksiyonun seyrini genetik özellikler, diğer virüslerle infeksiyonlar, immunsupresyon, cinsiyet ve HBV mutantları gibi faktörler etkiler (29).

HBV infeksiyonunda farklı klinik tablolar görülür. Bu tablolar şunlardır:

2.6.1. Akut İnfeksiyon

İnkübasyon dönemi alınan virüs miktarı ve kişinin immunité durumuna bağılı olarak 45-120 gündür. Akut infeksiyon; asemptomatik infeksiyon, sarılıklı kolestatik hepatit nadiren de fulminan hepatit olarak farklı klinik şekillerde ortaya çıkabilir. Virüsün alınmasından 6 hafta sonra HBsAg ve diğér aktif viral replikasyon göstergeleri pozitifleşir; biyokimyasal testlerde bozulma olur ve klinik belirtiler ortaya çıkmaya başlar.

Semptomatik akut hepatit tablosunun gelişmesi kişinin yaşı ile ilişkilidir. Okul öncesi çocuklarda HBV infeksiyonu genellikle asemptomatik olarak geçirilirken, erişkinlerde %25 oranında yorgunluk, iştahsızlık, kas ağrıları, hafif ateş, kokulardan rahatsız olma, bulantı ve/veya sarılık ve hepatomegali gibi hepatik fonksiyon bozukluğu belirtileri görülür. Hastalarda hafif kilo kaybı, sağ üst kadrán ağrısı veya sağ üst kadranda dolgunluk mevcut olabilir. Sarılıkla seyreden olgularda, idrar renginde koyulaşma, skleralar ve ciltte sararma gibi hiperbillurubinemi bulguları görülür. İnfeksiyon nadiren fulminan seyredip; hepatik ensefalopati, hepatorenal sendrom ve kanama diyatezi ile akut karaciğér yetmezliğine ilerler. Bu vakalarda mortalite riski %75'in üzerindedir.

Akut HBV infeksiyonu geçirenlerin %10-20'sinde antijen-antikor kompleksine bağılı olarak ekstrahepatik belirtiler saptanır. Bunlar, serum hastalığı benzeri sendrom, poliarteritis nodoza (PAN), membranoproliferatif glomerulonefrit (MPGN) ve çocuklarda papüler akrodermatitistir.

Akut infeksiyonu geçiren birçok olguda immun yanıt ile virüs karaciğérdén temizlenir ve iyileşme görülür. Oluşan anti-HBs antikorları da kişiyi yeni infeksiyonlara karşı korur (29, 60).

2.6.2. Kronik İnfeksiyon

Akut infeksiyonu takiben, HBsAg pozitifliğinin 6 aydan uzun süre mevcut olması durumunda kronik HBV infeksiyonundan kuşkulandırılmalıdır. Bu olgularda anti-HBs saptanmaz.

HBV infeksiyonunun kronikleşmesi ile kişinin yaş ve immun sistemi arasında yakın bir ilişki vardır. Kronikleşme doğum sırasında infeksiyonu alan bebeklerde %80-90 oranında, 6 yaş altındakilerde %30, erişkinlerde ise %5-10 civarındadır. Kronik infeksiyon riski; hemodiyaliz hastaları, organ transplantasyon alıcıları ve kemoterapi hastalarında yüksektir.

Olguların çoğunda infeksiyon asemptomatik olarak görülür. Transaminazlar normaldir ve karaciğer biyopsisinde normal histolojik yapı ya da portal alanda minimal mononükleer hücre infiltrasyonu saptanabilir. Bu olgulara “kronik persistan hepatit” denir. Olguların %25’inde ise orta-belirgin derecede karaciğer enzimlerinde yükselme ve biyopside “piecemeal” nekrozu, lobuler inflamasyon ve “Councilman inklüzyon cisimcikleri” görülür. Bu olgular ise “kronik aktif hepatit” olarak adlandırılır.

Kronik aktif hepatitte karaciğer sirozuna ilerleme kliniğinin ağırlığına göre değişen sürelerde görülebilir. Siroz gelişiminden sonra 5 yıllık sağkalım %50 civarındadır. Prognoz karaciğer hasarının derecesine bağlıdır. Olguların %50’sinde aktif viral replikasyon mevcuttur ve serum aminotransferazları yüksektir.

Her yıl olguların %7-20’sinde HBeAg spontan olarak kaybolur ve bu durum karaciğer hastalığının alevlenmesi ile beraberdir. HBsAg yıllık %1-2 oranında spontan olarak kaybolur fakat bu hastalar ömür boyu infekte olarak kalırlar. Hastalar normal aminotransferaz seviyesi ve normal karaciğer histolojisine sahipse prognozları daha iyidir (29, 60).

2.6.3. Hepatosellüler Karsinom

HBV infeksiyonu hepatosellüler karsinom gelişmesinde en önemli risk faktörü olarak kabul edilirken, dünyada her yıl 500.000 kişi hepatosellüler karsinom nedeniyle ölmektedir. HBV ile infekte kişilerde hepatosellüler karsinom gelişme riski %10-25 olup, infeksiyonun başlamasından yaklaşık 30-50 yıl sonra gelişir. Hastada siroz gelişmişse hepatosellüler karsinom gelişme riski daha da artar (26).

2.7. Mikrobiyolojik Tanı

HBV tanısı için serolojik yöntemlere ilaveten son yıllarda moleküler tanı teknikleri geliştirilmiştir. 1980'lerden sonra daha duyarlı serolojik teknik ve testlerin gelişmesiyle akut enfeksiyonun erken tanısı, akut ve kronik enfeksiyonun birbirinden ayırt edilmesi ve vireminin kalıcılığının belirlenmesi sağlanmıştır. Serolojik yöntemlerin yetersiz kaldığı durumlarda, olağan dışı hepatit B serolojilerinde, antiviral tedavi takibinde, mutant suşların araştırılmasında ve HCC oluşum mekanizmalarının aydınlatılmasında moleküler yöntemlerden yararlanılmaktadır (16).

2.7.1. Serolojik tanı

HBV enfeksiyon tanısını koymak amacıyla hasta serumunda virüs antijenlerine karşı gelişen antikorların varlığı araştırılmaktadır (16, 24, 25).

HBsAg: Akut HBV enfeksiyonu sırasında HBsAg, virüse ait saptanan ilk antijendir. Akut enfeksiyonda semptomların başlamasından 2–8 hafta önce kanda saptanabilir. Hastalık iyileşme ile sonlanırsa akut dönemde pik yapar ve 2–6 ay içinde kaybolur. HBsAg'nin akut enfeksiyonu takiben serumda 6 aydan daha uzun süre pozitif olarak kalması kronikleşmenin göstergesidir (16, 29).

HBeAg: Akut enfeksiyonda genellikle HBsAg'nin ortaya çıkmasından kısa bir süre sonra ortaya çıkar ve HBsAg'den önce kaybolur. Serumda HBeAg'nin varlığı bulaşıcılık, infektivite ve aktif viral replikasyonunun göstergesidir. Ancak bazen hastada HBeAg sentezlenmesine rağmen, serumda aktif viral replikasyonun göstergesi olan HBV DNA saptanamayabilir. HBeAg'nin serumda 3–4 aydan uzun süre kalması kronik HBV enfeksiyonu geliştiğini gösterir. Kronik HBV enfeksiyonunda HBeAg'nin pozitifliğini sürdürmesi ağır karaciğer hastalığının gelişme riskini arttırmaktadır (16, 29, 71).

HBcAg: HBsAg saptandıktan kısa bir süre sonra ve anti-HBs ortaya çıkmadan önce anti-HBc saptanabilir. HBcAg erken dönemde hızla spesifik antikor ile birleştiğinden serumda saptanması zordur. Yapılan bir çalışmada HBcAg miktarı ile HBV DNA düzeyi incelenmiş ve uyumlu bulunmuştur. (16, 61).

Anti-HBc IgM: Akut HBV enfeksiyonunun göstergesi olan anti-HBc IgM; enfeksiyon başladıktan birkaç hafta sonra en yüksek düzeye ulaşır ve ortaya çıktıktan 4–8 ay (bazen 12 ay) sonra ortadan kaybolur (HBsAg'den daha uzun süre kanda

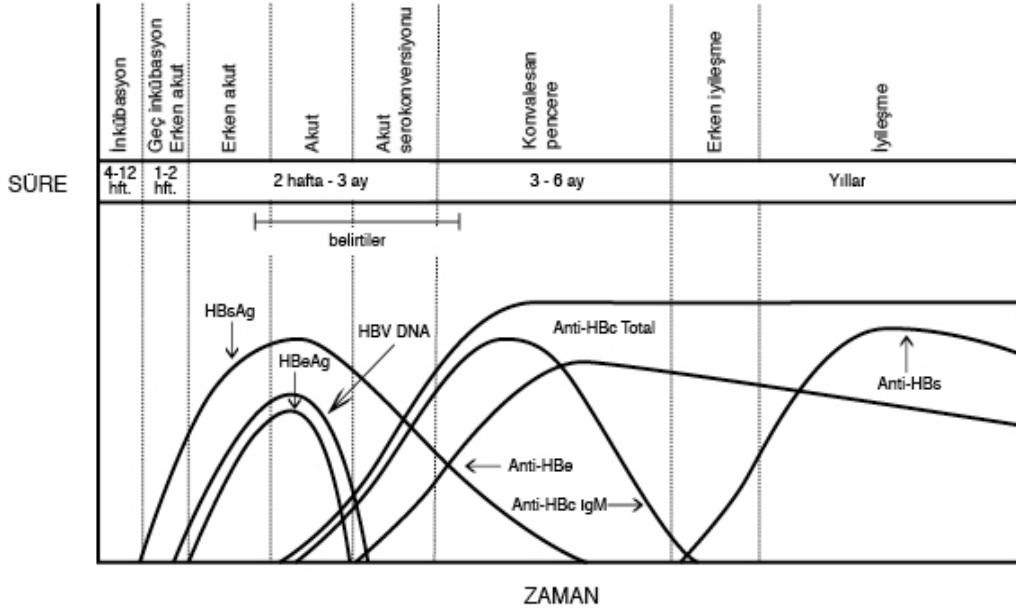
bulunmaktadır). Genellikle HBsAg pozitifliğinden 1–4 hafta sonra pozitifleşir. HBsAg ve HBeAg'nin kaybolduğu, antikorların henüz oluşmadığı döneme “pencere dönemi” adı verilir. Yaklaşık 2–8 hafta süren bu dönemde akut HBV infeksiyonunun tek göstergesi anti-HBc IgM olabilir. Pencere döneminin uzadığı olgularda anti-HBc IgM ortadan kaybolur ve sadece anti-HBc IgG pozitifliği saptanabilir. Anti-HBc IgM pozitifliği sadece akut dönemde değil kronik HBV infeksiyonunun akut alevlenmeleri sırasında da görülür. Ancak akut dönemde IgM titresi yüksek düzeyde bulunurken, kronik infeksiyon sırasında düşük seviyelere inmektedir (16, 29).

Anti-HBc IgG: Anti-HBc IgM antikorlarının görülmesinden bir süre sonra IgG sınıfı antikorlar ortaya çıkar ve genellikle hayat boyu saptanır. Anti-HBc IgG'nin pozitifliği kişinin HBV ile karşılaştığının göstergesidir, ancak akut, kronik ya da geçirilmiş infeksiyonu birbirinden ayırt ettiremez. Bütün serolojik göstergelerin negatif olmasına karşılık tek başına anti-HBc IgG'nin pozitifliği “izole anti-HBc pozitifliği” olarak adlandırılır (16, 29).

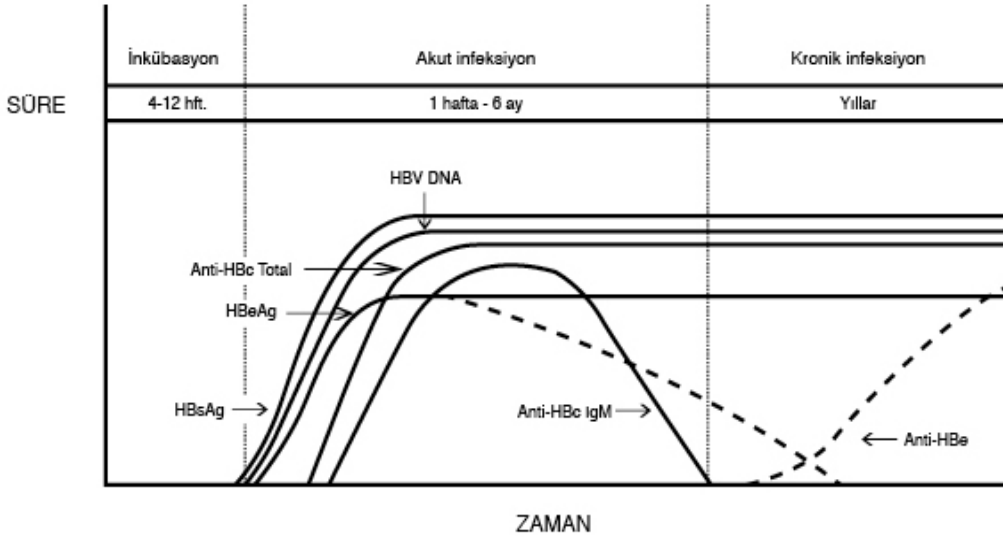
Anti-HBe: HBeAg'nin kaybolmasından (genellikle 12–14 haftada ortadan kaybolur) kısa bir süre sonra anti-HBe antikorları ortaya çıkar. Bazı olgularda HBeAg ve anti-HBe'nin serumda çok kısa bir süre birlikte pozitifliği bulunabilmektedir. Anti-HBe antikorlarının ortaya çıkması viral replikasyonun azaldığını ve hastalığın iyileşmeye doğru gittiğini gösterir. Ancak mutasyon olan suşlarla oluşan infeksiyon sırasında hastada anti-HBe pozitifliğine rağmen HBV DNA pozitifliği saptanabilir. Anti-HBe antikorları altı ay içinde hastaların üçte birinde saptanamayacak düzeye iner, geri kalanlarda ise 4–6 yıl kadar devam eder. Anti-HBc ve anti-HBs antikorlarıyla birlikte bulunması yakın zamanda geçirilmiş akut HBV infeksiyonunu göstermektedir. İnfeksiyon eskidikçe hastaların %50'sinde aktif viral replikasyon azalır, HBeAg kaybolur ve anti-HBe antikorları oluşur (16, 29).

Anti-HBs: İnfeksiyon iyileşme ile sonlanırsa, HBsAg ortadan kaybolduktan bir süre sonra serumda buna karşı koruyucu anti-HBs antikorları ortaya çıkmaktadır. Aslında akut dönemde anti-HBs antikorları daha erken oluşmaktadır. Ancak HBsAg fazlalığına bağlı oluşan immün komplekslerin bunu maskeleyiği düşünülmektedir. HBV infeksiyonu sonrası oluşan anti-HBs, anti-HBc antikorları ile birlikte genellikle hayat boyu saptanabilecek düzeyde kalır. Anti-HBs; hepatit B aşılması

ve HBV immunglobulin (HBIG) verilmesinden sonra da pozitifleşebilir ya da kan transfüzyonu yoluyla ve anneden bebeğe pasif olarak transfer edilebilir (pasif olarak alınan antikorlar birkaç ay içinde ortadan kaybolur). Anti-HBs seviyesinin serumda 10 IU/L'nin üzerinde olması koruyucu bağışıklığı göstermektedir (16, 29).



Şekil 2.4. Akut HBV infeksiyonunda serolojik göstergeler (15)



Şekil 2.5. Kronik HBV infeksiyonunda serolojik göstergeler (15)

Hepatit B infeksiyonu değişik dönemlerinde ve mutant virüs varlığına göre değişik serolojik tanımlar alır. HBV infeksiyonunun değişik dönemlerine ait olağan tanı göstergeleri ve bunların anlamı aşağıda verilmiştir (Tablo 5.1.) (48).

Tablo 5.1. HBV'ün olağan serolojik/moleküler tanı kalıplarının yorumu (48)

Etken	Kalıp	Yorum
Hepatit B	HBsAg+, Anti-HBs-, Anti-HBc IgM+ HBeAg+/- , Anti-HBe-, HBV DNA+	Akut infeksiyon
	HBsAg-, Anti-HBs+, Anti-HBc total+ HBeAg- , Anti-HBe+, HBV DNA-	İyileşmiş infeksiyon
	HBsAg+, Anti-HBs-, Anti-HBc total+ HBeAg- , Anti-HBe+, HBV DNA+*	Sağlıklı taşıyıcı
	HBsAg+, Anti-HBs-, Anti-HBc total+ HBeAg+, Anti-HBe-, HBV DNA+**	Kronik infeksiyon

* $<10^5$ kopya/ml ** $>10^5$ kopya/ml

2.7.2. Moleküler tanı

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Amerika Birleşik Devletleri'nde bulunan Cetus şirketi çalışanlarından Henry A. Erlich, Kary Mullis ve Randall K. Saiki tarafından 1985 yılında geliştirilen yöntem nükleik asitlerin uygun in vitro koşullar altında çoğaltılmasını sağlamaktadır. PCR yönteminin geliştirilmesindeki çalışmaları nedeniyle Kary Mullis, 1993 yılı Nobel Kimya Ödülü'nü almıştır (62). Polimeraz Zincir Reaksiyonu tıbbi araştırma alanlarının mikroorganizmaların direkt tanısına olanak sağlamaktadır (63, 64).

“Etkene özgü nükleik asitlerin (DNA/RNA) in vitro çoğaltılarak saptanması” esasına dayanan Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) yöntemi, HBV DNA'nın saptanması için en özgül ve en duyarlı yöntemdir (65, 66).

Prensibi

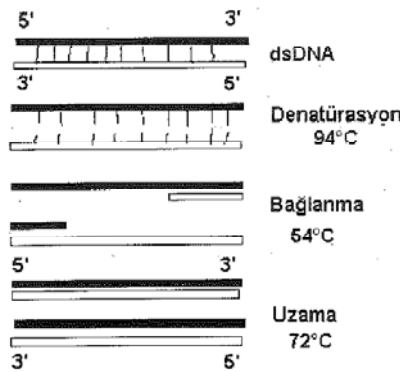
Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemi DNA zincirinin önceden belirlenen bir bölgesinin uygun koşullarda çoğaltılması esasına dayanır. PCR uygulamaları için ilgili gen bölgesine ait baz dizisinin bilinmesi gerekmektedir. Bu yöntemle RNA

çoğaltılmak istenirse; önce revers transkriptaz kullanılarak DNA kopyası çıkarılır ve PCR ile bu DNA molekülü çoğaltılır (67).

İn vivo şartlarda bölünen bir hücrede DNA replikasyonu çeşitli enzimler tarafından düzenlenir ve genomun kopyalanması ile sonuçlanır. PCR'da in vivo çoğalma örnek alınmıştır. Bir test tüpü içerisinde yalnızca DNA polimeraz enzimi yardımı ile genomun tamamı değil, spesifik bölgelerin kopyalanması gerçekleştirilir. (63, 67).

PCR temel olarak tekrarlayan üç aşamalı bir yöntemdir:

- 1- Denaturasyon:** Çift iplikli DNA'nın birkaç saniye 94-96° C ısı ile tek iplikli DNA'lara ayrılmasıdır.
- 2- Bağlanma (annealing):** Örnek 30-60° C'de birkaç dakika tutularak primerin (spesifik sentetik oligonükleotitler) tek sarmal DNA'daki hedef bölgelere hidrojen bağlarının yardımı ile hibridizasyonu sağlanır. Bağlanma ısı sadece DNA/DNA eşleşmesine imkan sağlayacak yükseklikte olmalıdır. Isı primerlerin yapısı ve erime ısı derecelerine göre hesaplanabilir. Yaklaşık olarak 20 baz çifti uzunluğuna sahip primerler kullanılırsa 54°C'de optimum sonuçlar elde edilir (64, 67).
- 3- Uzama (ekstansiyon):** Tek sarmal DNA kalıplarına bağlanan primerlerin polimeraz enzimi yardımı ile 5'→3'yönde uzatılmasıdır. DNA zinciri 65-72°C'de komplementerini sentezler. Taq DNA polimerazın optimal uzama ısı 72-78°C arasında olup 2000 nükleotit/dakika hızında çalışmaktadır. Enzimin performansı tüm siklularda aynı olmamakta ve siklus sonlarına doğru azalma göstermektedir. Bağlanma sikluslarını takiben, orijinal DNA segmenti yeni komplementer DNA'lar ve yeni kalıp DNA'lar oluşturmaya başlar. Bu şekilde her PCR siklusunda mevcut spesifik DNA miktarı iki katına çıkmaktadır. Bu işlemlerin 30 defa tekrarlanması ile milyardan fazla hedef DNA eldesi mümkün hale gelir (64, 67).



Şekil 2.6. PCR reaksiyonundaki aşamalar (67)

Çoğaltılan DNA parçaları birçok farklı yöntemle belirlenebilir. Bunlardan en yaygın olarak kullanılan agaroz jel elektroforezi yönteminde; PCR ile elde edilen ürünler agaroz jel kullanılarak elektroforezle ayrıştırılır ve DNA zincirleri etidyum bromür ile boyanarak ultraviyole ışık kaynağında floresans vererek görünür hale getirilir. Elektroforezde PCR ürünlerinin büyüklüğünü belirleyebilmek için daha önceden bilinen DNA molekülleri ile karşılaştırma yapılır (67,68).

PCR yöntemiyle serumda HBV DNA'nın amplifiye edilerek saptanması ve kantitasyonu sağlanmıştır. Serumdaki 10 kopya/ml HBV DNA'yı saptayabilen bu testler; çok düşük oranlardaki HBV DNA'nın saptanmasında yararlı olmaktadır. Serumda PCR yöntemi ile HBV DNA'nın saptanması HBsAg pozitifliğine benzer şekilde HBV enfeksiyonunun göstergesi olarak değerlendirilir. Bu yöntemin avantajı; HBeAg negatif ve hibridizasyonla HBV DNA negatif bulunan hastalarda antiviral tedaviye yanıtın izlenmesine ve antiviral direncin erken saptanmasına olanak sağlamasıdır (68).

Son yıllarda PCR reaksiyonlarında sıcaklık döngüleri sağlamak için kullanılan cihazların (thermocycler) hassas ölçüm aletleriyle birleştirilmesi ile real-time PCR olarak adlandırılan yeni bir yöntem geliştirilmiştir. Bu yöntemle DNA ve RNA örnekleri kalitatif ve kantitatif olarak kısa sürede analiz edilebilmekte ve son derece az kontaminasyon riskiyle çok sayıda örnek güvenle çalışılabilmektedir (69).

Real-time PCR (RT-PCR) tekniği HBV DNA'nın kantitasyonuna olanak sağlayan hızlı ve basit bir testtir. Bu metod, termocycle süresince oluşan PCR ürününün vermiş olduğu floresansın belirli zaman aralıklarında ölçülmesine dayanır. HBV yüzey geni için düzenlenmiş bir prob ve bilinen konsantrasyonları içeren referans standartlarla HBV DNA kantitasyonu ölçülür (64, 67).

Real-time PCR'da reaksiyon sırasında ürün analizi yapılmaktadır. Bu yüzden, agaroz jel elektroforezi, DNA bantlarının mor ötesi ışık altında görüntülenmesi gibi işlemlere gerek kalmamaktadır. Real time PCR ürünlerinin kalitatif ve kantitatif analizlerinde, diziyeye özgün olmayan floresans boyalar yada diziyeye özgün proplar kullanılmaktadır. Böylece sonuçlar kısa sürede alınmakta ve kontaminasyon riski azaltılarak tüm işlemler sıcaklık döngüleri başlayınca otomatik olarak devam etmektedir. Real-time PCR'da çoğaltılan ürün görünür hale getirilir. Görüntüleme için floresans işaretli proplar veya interkalatör boyalar kullanılır. Oluşan DNA (amplikon) miktarı ile doğru orantıda floresans meydana gelir. Real-time PCR on-line izlenebilen bir yöntemdir (69).

Akut, kronik HBV infeksiyonlarında serolojik testlerin yanında moleküler tanı testleri (MP-NAT veya ID-NAT) de kullanılmaktadır (65).

2.7.3. Hücre kültürü ve hayvan modelleri

Erişkin ve fetal hepatosit kültürlerinde HBV üretilmektedir. Şempanze ve diğer yüksek primatlar deneyler için kullanılabilir. Ancak rutin kullanım için uygun değildir (51).

2.7.4. Mutant virüs infeksiyonlarında tanı

HBV DNA'nın gen bölgelerinde sekans analizi ile ilgili mutasyonlar saptanabilmektedir. Ayrıca serolojik göstergeler de mutant virüs infeksiyonunu düşündürülebilir. Pre-kor mutantlarında HBeAg sentezlenemediği için bu virüsle infekte olanlarda HBeAg ve anti-HBe negatif olarak bulunur. Eski HBV infeksiyonlarından pre-kor mutantları bulunanlarda anti-HBe varlığına rağmen aktif viral replikasyon vardır ve serumda HBV DNA miktarı yüksek olarak bulunur. Yüzey proteini mutantları olanlarda ise aşılama ile gelişen anti-HBs varlığına rağmen aktif viral replikasyon varlığı görülür. Bu vakalarda HBsAg, "a" determinantındaki değişiklik nedeniyle ticari kitlerle saptanamayabilir (70). Serumda HBV DNA ise pozitif olarak bulunur.

2.8. Antiviral Direncin Saptanması

Tedavi sırasında HBV DNA konsantrasyonundaki artış antiviral ilaca dirençli varyantları akla getirir, bu nedenle tedaviyi izlemek açısından HBV DNA'nın kantitasyonu önemlidir (72).

Özellikle tedavi sırasında hızlı mutasyon gelişen pol genindeki 528, 552, 555. kodonları etkileyen mutasyonlar 'Line probe assay' yöntemi ile geliştirilen kitlerle hızlı olarak saptanabilmektedir (73).

2.9. Olağan Dışı Serolojik Profiller

2.9.1. Gizli HBV infeksiyonu

Hepatit B infeksiyonunun iyileşmesi, HBsAg'nin kaybolması ile birlikte HBV DNA'nın negatifleşmesi olarak tanımlanır. Bununla birlikte PCR teknikleri ile bazı

hastaların serum ve/veya karaciğerinde düşük düzeyde HBV DNA (genellikle <104 viral genom/mL) varlığı gösterilmiştir (74-76). HBsAg'nin saptanamadığı kronik HBV enfeksiyonunu tanımlayan bu durum "okült; gizli; sessiz ya da latent" HBV enfeksiyonu olarak adlandırılmaktadır. Gizli HBV enfeksiyonluların bir kısmında anti-HBc ve/veya anti-HBs pozitifliği görülür. Hastaların önemli bir kısmında ise her ikisi de negatif bulunmaktadır. Gizli HBV enfeksiyonu aşağıdaki hasta gruplarında daha sık görülmektedir (77) ;

- HCC'li kronik hepatit C virüs (HCV) enfeksiyonu bulunanlar
- Anti-HBc(+) vericilerden karaciğer nakli olanlar
- Anti-HBc(+) kronik hepatit C hastaları
- Kriptojenik siroz/fibrozis hastaları
- Hemodiyaliz hastaları
- İntravenöz uyuşturucu kullananlar

Gizli HBV enfeksiyonu oluşum mekanizması tartışmalıdır. Mekanizması için düşünülen olasılıklar;

1) S bölgesinde mutasyon

Pre-S/S bölgelerindeki herhangi bir mutasyon HBsAg antijenitesine ya da üretimine etki edebilir. Bazı gizli HBV enfeksiyonu olan hastalarda belli pre-S/S tanımlanmamasına rağmen, aynı bölgedeki mutasyon sıklığının artması en azından bazı hastalarda patogeneze sorumlu olabileceğini düşündürmektedir (74).

2) Genoma integrasyon

Gizli HBV enfeksiyonu olan hastalarda genoma integre ya da serbest epizomal HBV DNA molekülleri varlığı gösterilmiştir. HBV DNA integrasyonu virüste DNA zincirinin düzenlenmesini etkileyebilir. Buna bağlı olarak HBsAg ekspresyonu azalabilir ya da durabilir. HBV integrasyon sıklığı gizli HBV enfeksiyonu olan HCC'lilerde daha fazla görülmüştür (78).

3) Periferik kandaki mononükleer hücrelerde (PKMH) HBV enfeksiyonu

PKMH'de akut ve kronik HBV enfeksiyonu sırasında HBV DNA saptanabilir (74). HBV'ye bağlı karaciğer hastalığından dolayı karaciğer nakli olan hastalarda yüksek doz HBIG verilmesi serumda HBsAg'nin ve karaciğerde HBV DNA'nın negatif kalmasını sağlar; bu hastalarda da PKMH'de HBV DNA varlığı gösterilmiştir. Bu durum karaciğer nakli sonrasında nüks HBV enfeksiyonlarının nedeni olabilir (78).

4) HBV içeren immün kompleksler

Akut HBV enfeksiyonunun ardından anti-HBs oluşsa bile, HBV partiküllerinin varlığı kanda immünkompleks halinde devam edebilir (79).

5) Konak immün cevabı

Konak immün cevabı ile viral replikasyon oranının dengesi HBV enfeksiyonunun seyrini belirler. Virüs eliminasyonunda hem hücresel, hem de humoral faktörler rol alır. HBV proteinlerine karşı yetersiz T hücre cevabı gelişmesi virüsün kalıcı olmasına neden olur. Konak immün yanıtın azalması gizli HBV enfeksiyonu gelişimini kolaylaştırır. Karaciğer nakli sonrasında immünyüpresyondan dolayı HBV enfeksiyonunun nüks etmesi bundan dolayıdır (80, 81).

6) Ko-enfeksiyon

Ülkemizde kronik HCV ile enfekte hemodiyaliz hastalarında yüksek oranda (%36,4) gizli HBV enfeksiyonu bulunduğunu gösteren çalışmalar vardır (82).

Kronik HBV ve HCV ko-enfeksiyonunda HBV DNA düzeyi düşük olma eğilimindedir ve önemli oranda HBsAg klerensi gerçekleşir (83).

HBV DNA, Akdeniz bölgesinde HCV taşıyıcılarında HBsAg negatif olan hastaların üçte birinde saptanabilmektedir. Uzak Doğu Asya ülkelerinde bu prevalans daha yüksektir (77). HCV enfeksiyonuna bağlı HCC gelişim riski artmaktadır. HBV ve HCV koenfeksiyonu bu riski daha da artırır. Sadece HCV enfeksiyonlu hastalarla, HCV ile birlikte gizli HBV enfeksiyonu bulunanlar HCC gelişim süresi açısından kıyaslandığında; gizli HBV enfeksiyonu olanlarda daha erken sürede HCC geliştiği saptanmıştır (19).

2.9.2. İzole anti-HBc pozitifliği

En sık görülen atipik serolojik profil budur. Ülkemizde %2–12 oranında izole anti-HBc pozitifliği görülmektedir (84). İzole anti-HBc pozitifliğinin nedenleri arasında:

- 1) Anti-HBc'nin yalancı pozitif olması
- 2) İzole anti-HBc'li olguların %5–15'inde anti-HBs yanıtının gelişmemesi
- 3) Düşük düzeyde taşıyıcılık olması
- 4) Akut hepatit B pencere dönemi
- 5) HBcAg dışındaki antijenlere konak yanıtının olmaması
- 6) Pasif transferle antikör geçişi (anneden bebeğe ya da kan transfüzyonunu takiben) sayılabilir (29, 84, 85).

2.9.3. HBsAg ve anti-HBs'nin birlikte pozitif bulunması

Bu durum birçok farklı nedenlerden kaynaklanabilir;

- 1) Bu iki göstergenin bir arada saptanması deney koşullarında immün komplekslerin parçalanması ile açığa çıkan antijen ve antikorların ayrı ayrı saptanması durumunda
- 2) Akut hepatit B infeksiyonunun iyileşme döneminde
- 3) Farklı HBV subtipleri ile karşılaşan taşıyıcılarda
- 4) Bağışıklık yanıtı bozulan kişilerde (özellikle kronik aktif hepatitlilerde, damar içi uyuşturucu kullanan ve hemodiyaliz uygulananlarda)
- 5) Hepatit B aşısı olan, gerçekte kronik HBV infeksiyonu olanlarda
- 6) Doğal ve aşı ile oluşan anti-HBs'ye rağmen "a" determinatını kodlayan gen bölgesinde mutasyona uğrayan kökenlerle infeksiyon oluşması durumunda görülebilir (84, 86).

2.9.4. Tek başına HBsAg pozitifliği [HBsAg(+), anti-HBc total(-), anti-HBs(-)]

Tek başına HBsAg pozitifliği aşağıdaki durumlarda görülebilir;

- 1) Akut hepatit B infeksiyonu seyri sırasında
- 2) HBcAg'ye özgü immün yanıt defekti
- 3) Prekor/kor gen bölgesinde mutasyon oluşması
- 4) Yüksek doz HBV aşısı sonrasında kısa bir süre boyunca
- 5) Aşırı HBcAg sentezlenmesine bağlı olarak ortaya çıkan HBcAg/anti-HBc kompleksi nedeniyle anti-HBc'lerin saptanamayacak düzeye inmesi
- 6) Klinik örneğin kontamine olması (hemofili hastaları, heparinli kan örneği gibi) sonucunda görülür (84).

2.9.5. Tek başına anti-HBs pozitifliği

HBV aşılması veya HBIG uygulaması dışında bu durum:

- 1) Doğal infeksiyon sonrasında anti-HBc oluşmaması ya da kaybolması
- 2) Hasta kanlarıyla sürekli temas halinde olan laboratuvar personeline infeksiyöz olmayan virionla tekrarlayan karşılaşmalara bağlı olarak
- 3) Pasif transferle geçen antikorlara bağlı olarak (anneden bebeğe veya kan transfüzyonunu takiben)
- 4) Test hatalarına bağlı yanlış pozitiflik kaynaklı (en çok düşük titrede koruyucu özelliği olmayan, IgM sınıfı, bir süre sonra kaybolan antikorlar nedeniyle) görülebilir (84).

2.10. Tedavi

Akut hepatit B'nin tedavisi destekleyici tedavidir. Fulminan hepatit gelişmesi durumunda karaciğer transplantasyonu endikasyonu doğar (29).

Kronik hepatit B tedavisinde amaç geriye dönüşümsüz karaciğer hastalığı gelişmeden HBV'ün çoğalmasının baskılanmasıdır. Böylece karaciğer hastalığında düzelme başlar, virüsün temizlenmesi, hastalığın siroz ve karaciğer kanserine ilerlemesinin önlenmesi ve sağkalımın uzatılması sağlanır. Etkin tedavi ile kalıcı HBV DNA kaybı sağlanır (87-89, 131, 132).

Tedavide kullanılan ilaçlar;

1) İmmün modülatörler

- İnterferon α
- Peginterferon α -2a/b

2) Viral polimeraz inhibitörleri (Nükleozit ve nükleotit analogları)

- Lamivudin
- Adefovir dipivoksil
- Entekavir
- Telbivudin

3) Yeni Antiviraller

- Emtrisitabin
- Tenofovir isoproksil fumarat
- Klevudin
- Timozin

4) Kombinasyon tedavileri (87-89).

2.11. Korunma

Pasif immunizasyon

HBV aşısı ile birlikte uygulanan HBIG; HBsAg pozitif annelerin bebeklerinin korunmasında, HBsAg pozitif kan veya vücut sıvılarıyla perkutan veya mukozal temaslının korunmasında ve HBsAg pozitif kişi ile cinsel temaslının korunmasında etkili olmaktadır. HBIG ayrıca karaciğer nakli sonrasında HBV enfeksiyonu rekürrensini önlemek için uzun süreli uygulanır (29, 50).

Aktif immunizasyon

İlk geliştirilen aşılar da HBV taşıyıcılarının plazma örneklerinden saflaştırılan HBsAg bulunmakta idi. Daha sonra gen teknolojisi yardımıyla HBsAg kodlayan genin maya ya da memeli hücrelerine transfeksiyonu ile elde edilen saflaştırılmış HBsAg rekombinant aşılar geliştirildi. HBV aşısının etkinliği anti-HBs gelişmesi ile izlenmektedir. Temas öncesi aktif bağışıklama için hepatit B aşısı tüm yenidoğan ve infantlara, daha önce aşılanmamış çocuk ve ergenlere, yüksek risk grubunda olan erişkinlere önerilmektedir (50).

Aşılamada, genellikle 0. 1. ve 6. aylarda olmak üzere üç dozlu şema kullanılmaktadır. Rekombinant aşının, kas içi üç doz uygulanması sonucu %95–99’unda koruyucu düzeyde antikor oluşmaktadır. Primer aşılamadan sonra 10 mIU/mL üzerindeki anti-HBs yanıtı veren kişilerde tam koruma sağlanmaktadır. Çocuklar ve ergenlik dönemindekiler daha yüksek antikor yanıtı oluşturdukları için, antikor düzeyi erişkinlerden daha uzun süre devam etmektedir. Anti-HBs, yaklaşık 5 yıl sonra koruyucu düzeyin altına inerse bile, aşılamadan sonra immünolojik bellek geliştiği için HBV ile karşılaşıldığında anamnestic yanıt verilmektedir. Bu dönemde tek doz aşı yapılması bu yanıtın daha da artmasını sağlamaktadır (29, 50, 90).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji laboratuvarımıza Ağustos 2014-Ağustos 2015 tarihleri arasında çeşitli kliniklerden gönderilen HBsAg pozitif 2437 hastanın serumu incelendi. ELISA yöntemiyle HBsAg pozitif bulunan 2437 hastanın, HBV DNA ve HBsAg sonuçları retrospektif olarak karşılaştırıldı.

Hastanemizin farklı kliniklerinden Hepatit B ön tanısı ile laboratuvarımıza gönderilen kan örnekleri HBsAg açısından değerlendirmek için; HBsAg Qualitative II eliza kiti kullanılarak otomatize ELISA cihazında (ARCHITECT 2000, Abbott Diagnostic, ABD) üretici firma önerilerine uygun olarak çalışıldı.

3.1. HBsAg saptanması

ARCHITECT HBsAg Qualitative II tetkiki, insan serum ve plazmasında HBsAg'nin kalitatif belirlenmesi için kullanılan, kimyasal reaksiyonun ürettiği ışığın ölçümünü değerlendirmeye dayalı kemiluminesan mikropartikül immunoassaydir. Çok sayıda örneğin aynı anda taranması için uygundur.

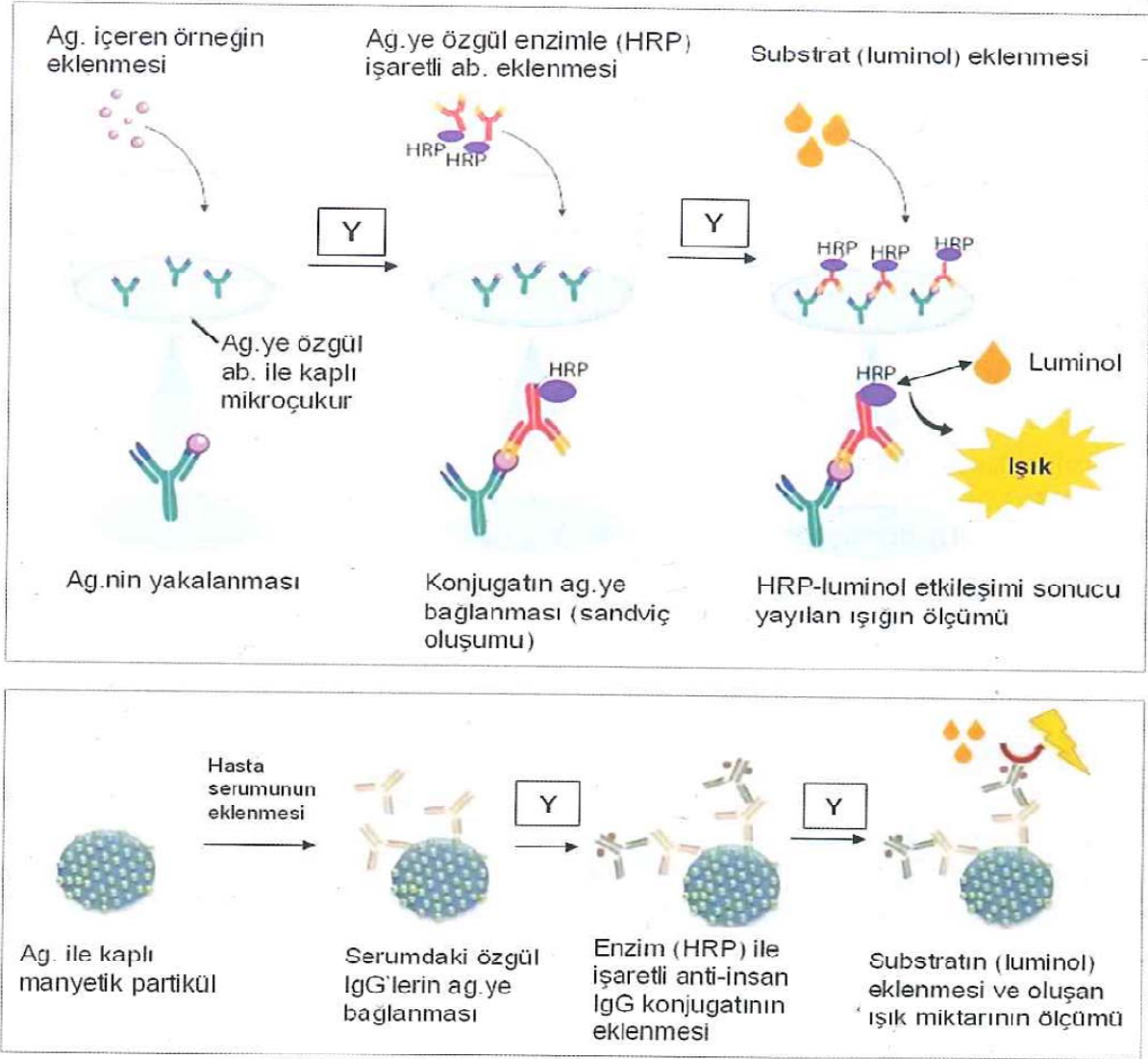
Kemiluminesan mikropartikül immunoassay yönteminde antijen veya antikoru immobilize etmek için katı faz olarak mikropartiküller kullanılmaktadır. Örnekler, monoklonal anti-HBs antikoları ile kaplı mikropartiküllerin bulunduğu reaksiyon kuyularında inkübe olmaktadır. Mikropartiküllerdeki antijen-antikor kompleksi, akrininium ile işaretli poliklonal anti-HBs konjugatı ile tespit edilmektedir.

Çalışılacak kan örnekleri 4000 devirde en az 30 dakika santrifüj edilerek serumlarına ayrıldıktan sonra otomatize ELISA cihazındaki (ARCHITECT 2000, Abbott Diagnostic, ABD) taşıyıcı (rak)'lara yerleştirildi.

HBsAg Qualitative II Reagent Kit İçeriği

- **Mikropartiküller:** 1 veya 4 ŐiŐe protein (Őıđır serum albümin) stabilizatörleriyle MES tamponu içerisinde anti-HBs (fare, monoklonal, IgM, IgG) kaplı mikropartiküller.
- **Konjugat:** 1 veya 4 ŐiŐe fosfat tamponunda insan plazması ve protein stabilizatörleriyle anti-HBs ve anti-HBs akrininium işaretli konjugat.
- **Yardımcı wash buffer:** 1 ya da 4 ŐiŐe MES tamponu içeren yardımcı yıkama tamponu.
- **Pre-trigger solüsyonu:** Pre-trigger çözeltisi %1.32 hidrojen peroksit içermektedir.
- **Trigger solüsyonu:** Trigger özeltisi 0.35 N sodyum hidroksit içermektedir.
- **Wash buffer:** Fosfat tamponlu tuz çözeltisi içermektedir.

HBsAg Qualitative II testi kemifleks olarak adlandırılan esnek test protokolleri kullanan tek aşamalı bir immunolojik testtir. İlk aŐamada örnek, anti-HBs kaplı paramanyetik mikropartiküller ve anti-HBs akrininium işaretli konjugat ile bir reaksiyon karıŐımı oluşturmak için birleŐtirilir. Örnekte bulunan HBsAg, anti-HBs kaplı mikropartiküllere ve anti-HBs akrininium işaretli konjugata bağlanır. Yıkamadan sonra reaksiyon karıŐımına yardımcı yıkama tamponu eklenir. Diğer bir yıkama dönüŐümünden sonra pre-trigger ve trigger solüsyonları reaksiyon karıŐımına eklenir (Şekil 3.1.).



Şekil 3.1. Kemiluminesan Mikropartikül Immunoassay yöntemindeki aşamalar (57)

Kısaca özet olarak cihazın (ARCHITECT 2000, Abbott Diagnostic, ABD) çalışma prosesi aşağıdaki gibidir:

1. Cihaz açma/kapama düğmesinden açılarak startup yaptırılır.
2. Cihazın eksik kit ve solüsyonları varsa tamamlanır. Eksik kitler ana menüden reagents ikonu seçilir. Yıkama solüsyonu, atıklar, reaksiyon kapları, trigger ve pre-triggeri tamamlamak için; ana menüden supplies ikonu seçilir ve F2'ye basılır hangileri değiştirildiyse üzerine tıklanır ve done ikonu seçilir.
3. Günlük yıkama için; ana menüden running ikonları sarartılır ve ekrandan pause ikonu seçilerek cihaz ready konumuna alınır. Cihazın reagent carousel kapağı açılır. Yıkama solüsyonu ve çeşme suyu ile hazırlanan %0,05'lik solüsyon kapakları açık olarak cihazda pozisyon 1'e yerleştirilir. Reagent carousel kapağı kapatılır.

Ana menüden sistem ikonu seçildikten sonra çıkan ekrandan maintenance ikonu seçilir, ekrana gelen menüden daily ikonu tıklanır, çıkan ekrandan daily maintenance yazısı sarartılır ve F5'e basılır. Proceed ikonu iki kere tıklanır. Yaklaşık yarım saat süren günlük yıkama başlar. İşlem bittikten sonra sistem ikonu aktif hale gelir. Sistem ikonu tıklanır, daily running ikonu seçilir, proceed ikonuna ve sonrasında done ikonuna basılır. Böylece günlük yıkaması bitmiş olur.

4. Testler yeterli miktarda serum ve plazma ile çalışılmaktadır. Miktarı az olan numuneler ise cihaza ait sample cup'lar kullanılarak çalışılmaktadır.
5. Çalışılacak numuneler örnek taşıyıcı (rak)'lara yerleştirilir. Ana menüden orders ikonu tıklanır, patient order ikonu seçilir, rak numarası, donörün ismi ve seri numarası yazılır. Çalışılacak testler seçilir ve F3 ikonuna basılır. Rak yerine yerleştirilince cihaz testleri çalışmaya başlar.
6. Cihaz çalışmayı tamamladıktan sonra sonuçlara results review ikonundan bakılır. Defter kaydı alınır. Sonuçlara bakıldıktan sonra tüm sonuçlar seçilir, realese ikonu seçilerek sonuçlar hafızaya alınır.
7. Çalışılan test sonuçları bilgisayar çıktısı alınarak tarih sırasına göre arşivlenir.
8. Kalibrasyon yapılır.



Şekil 3.2. İnönü Üniversitesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda kullanılan ELISA cihazı

3.2.HBV DNA saptanması

HBV DNA'nın saptanması için gerçek zamanlı PCR yöntemi kullanıldı. Yöntemi uygulamaya başlamadan önce HBV DNA izolasyonu sağlandı.

DNA izolasyonu (Ekstraksiyon)

DNA ekstraksiyonu için otomatize QIASymphony (QIAGEN, Almanya) cihazında üretici firmanın önerileri doğrultusunda "QIASymphony Virus/Pathogen Midi Kit" (QIAGEN, Almanya) otomatik ekstraksiyon kiti kullanıldı.

QIASymphony Virus/Pathogen Midi Kit İçeriği

- RC (Reagent Cartridge)
- ER (Enzyme Rack)
- PL (Piercing Lid)
- AVE (Buffer AVE(20 ml))
- AVE (Buffer AVE(2 ml))
- CARRIER (Carrier RNA)
- RSS (Reuse Seal Set)

Hastalardan alınan kan örnekleri 2500 devirde 15 dakika santrifüj edilerek serumlarına ayrıldıktan sonra test zamanına kadar -20 derecede saklandı. Çalışma aşamasında serumların oda ısısında erimesi beklenip ardından kısa süreli vortekslenerek homojenize olması sağlandı.

Ekstraksiyona alınacak örnek serum miktarı 600 µl olarak belirlendi. Cihazdaki işlem sonrası elde edilen DNA ekstraksiyon ürünü 60 µl olup çalışmalara alınım süresine kadar -20°C' de saklandı.

Kısaca özet olarak QIASymphony (QIAGEN, Almanya) cihazının çalışma prosesi aşağıdaki şekildedir:

Cihaz açılır, 3 dakika beklenir.

1. "Login" seçilir, password yazılır," OK" tuşuna basılır.
2. Atık çekmecesini açılır.
 - Boş unit box'lar yerleştirilir.
 - Atık poşeti yerleştirilir.
 - Atık bidonu yerleştirilir.

- Pipet uçlarının gittiği aparat temizlenir.
- Çekmece kapatılır, ekranda beliren yazıda “YES” seçilir.
- 3. Elaute çekmecesini açılır, kullanacağımız pleyt veya tüp adaptörleri yerleştirilir.
- 4. Reagent çekmecesini açılır, kitler ve pipet uçları yerleştirilir.
- 5. Reagent çekmecesini kapatılır, ekranda beliren yazıda “YES” seçilir. Cihaz tarama yapar.
- 6. Örnekler taşıyıcılar içine dizilen tüplere yerleştirilir ve cihaza yüklenir. Ekranda yükleme yapılan Batch’ler görülür.
- 7. Tüpler okutulduktan sonra “EDIT ID” seçilir ve tüplere barkot verilir, işlem bittikten sonra “NEXT “ seçilir.
- 8. “Select all” seçilir, “Virus” seçilir, “Virus cellfree NO IRC:500” seçilir, “NEXT” seçilir.
- 9. Volüm ayarlanır, örneklerin hangi “SLOT” gitmesini istiyorsak o “SLOT” seçilir, “QUEENE” seçilir.
- 10. Ekranda “RUN” seçilir ve cihaz çalışmaya başlar.
- 11. Cihaz çalışmayı tamamladıktan sonra “login” seçilir, password yazılır, “OK” tuşuna basılır ve ekstraksiyon ürünleri çıkarılır.
- 12. Cihazda sırayla atık çekmecesini, elaute çekmecesini, reagent çekmecesini açılır, gerekli düzenleme yapılır, atıklar çıkarılır.
- 13. Ekranda “Main” ardından “Maintenance” seçilir ve “start UV” seçilip süre ayarlanır. İşlem bittikten sonra cihaz kapatılır.



Şekil 3.3. İnönü Üniversitesi Moleküler Mikrobiyoloji Laboratuvarı’nda DNA izolasyonu için kullanılan cihazlar

3.3 Polimeraz zincir reaksiyonu

Çalışılan örneklerde HBV DNA'nın varlığını araştırmak amacıyla PZR yapıldı. HBV DNA gerçek zamanlı PCR kiti (artus HBV QS-RGQ Kit, QIAGEN, Almanya) içeriğindeki, DNA ekstraksiyon ürünleri ve rotor disk sıvı dağıtım sistemi için kullanılan QIAgility (QIAGEN, Almanya) cihazına yerleştirildi.

Artus HBV QS-RGQ Kit İçeriği

- HBV RG/TM Master
- HBV RG/TM Quantitation standard 1
- HBV RG/TM Quantitation standard 2
- HBV RG/TM Quantitation standard 3
- HBV RG/TM Quantitation standard 4
- HBV RG/TM Quantitation standard 5
- HBV RG/TM İnternal kontrol, su

QIAgility cihazı çalışılan hasta sayısına göre amplifikasyon miks miktarını belirleyip 0.2 ml'lik tüplere 30 mikrolitre dağıtır. Toplam hacim 50 mikrolitre olacak şekilde bakteri DNA ekstraksiyon ürünlerinden 0.2 ml'lik tüplere 20 mikrolitre ekler.



Şekil 3.4. İnönü Üniversitesi Moleküler Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda sıvı dağıtım sistemi için kullanılan cihaz (QIAgility)

DNA Amplifikasyonu

Sıvı dağıtım işlemi tamamlandıktan sonra rotor disk cihazdan çıkarıldı ve rotor-disc heat sealer kullanılarak diskin üzeri yapıştırıldı ve amplifikasyon için önceden programlanmış gerçek zamanlı PCR cihazına (Rotor-Gene Q, CORBETT Research Pty Ltd. Avusturya) yerleştirildi ve aşağıda gösterilen program uygulandı.

Tablo 3.1. HBV DNA için Amplifikasyon programı

Evre	Sıcaklık	Süre	Siklus sayısı
Ön denaturasyon	95°C	10 dakika	1
Hedef DNA denaturasyon	95°C	15 saniye	45
Primer bağlanması	55°C	30 saniye	
Primer Uzaması	72°C	15 saniye	



Şekil 3.5. İnönü Üniversitesi Moleküler Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda kullanılan Real-time PCR cihazı

3.4. Verilerin Değerlendirilmesi

HBsAg varlığı araştırılması açısından çalışılan örneklerde elde edilen kemiluminesan reaksiyon relatif ışık ünitesi (RLU) olarak ölçüldü. Örnekte bulunan HBsAg miktarı ile Architect immunassay sistem optiğinin ölçtüğü RLU arasında doğrusal bir ilişki bulunmakta idi. Örnekte HBsAg'nin var olup olmadığını belirlemek için reaksiyondaki kemiluminesan sinyal ile kalibrasyonla tanımlanmış olan cutoff sinyali kıyaslandı (sample/cutoff, S/CO). Eğer kemiluminesan sinyal cutoff sinyaline eşit

ya da daha fazla ise örneğin HBsAg pozitif olduğu düşünöldü. Çalışılan numune S/CO değeri<1.0 ise nonreaktif; S/CO değeri>=1.0 ise reaktif olarak rapor edildi.

HBV DNA amplifikasyonu için önceden programlanmış gerçek zamanlı PCR cihazında (Rotor-Gene Q, CORBETT Research Pty Ltd. Avusturya) çalışılan örneklerde 400 kopya/ml üzeri değer HBV DNA pozitif olarak kabul edildi.

Kemiluminesan mikropartikül immunoassay yöntemiyle serolojik olarak HBsAg pozitif bulunan 2437 örneğe gerçek zamanlı PCR yöntemiyle HBV DNA bakılmıştır. Örneklerin kadın-erkek sayısı, erişkin-çocuk sayısı ve HBV DNA istemi yapan kliniklerin sayısı yüzde oranı şeklinde belirtilmiştir.

Artus HBV QS-RGQ Kit, olası PCR inhibisyonunu belirlemek için ikinci bir amplifikasyon sistemini içerir (internal kontrol-IC). IC, Rotor-Gene Q'nun farklı bir floresans kanalı kullanılarak saptanır. Kalite kontrolde "Quality Control for Molecular Diagnostics" (QCMD, Glasgow, İskoçya) örnekleri ile test içi, testler arası geçerlilik ve güvenilirlik çalışması yapıldı.

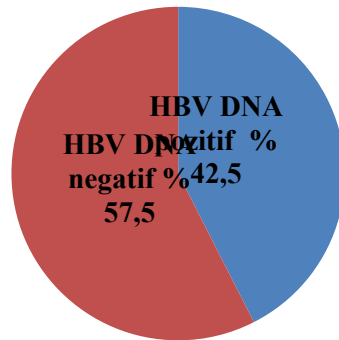
4. BULGULAR

Çalışmamızda İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji laboratuvarı'mıza Ağustos 2014-Ağustos 2015 tarihleri arasında hastanemizin çeşitli kliniklerinden gönderilen 2437 HBsAg pozitif hasta serumu HBV DNA yönünden incelendi.

Gelen örneklerin 1548'i (%63.5) erkek, 889'u (%36.5) ise kadına aitti. Yaş grubuna bakıldığında 2368'i (%97.2) 18 yaş üzeri (erişkin), 69'u (%2.8) ise 18 yaş altında (çocuk) idi. Hastaların yaş ortalaması 47 (yaş aralığı 2-92) idi.

Araştırmamızda HBsAg pozitif olan 2437 örnekten 1037'sinde (% 42.5) HBV DNA pozitif, 1400'ünde (%57.5) HBV DNA negatif bulunmuştur (tablo 4.1. ve şekil 4.1.). 1037 HBV DNA pozitif olgunun viral yük miktarının 435 kopya/ml-9 milyar 782 milyon kopya/ml arasında olduğu gözlemlendi.

HBsAg Pozitif Hastalar



Şekil 4.1. HBsAg(+) hastalarda HBV DNA görülme oranı

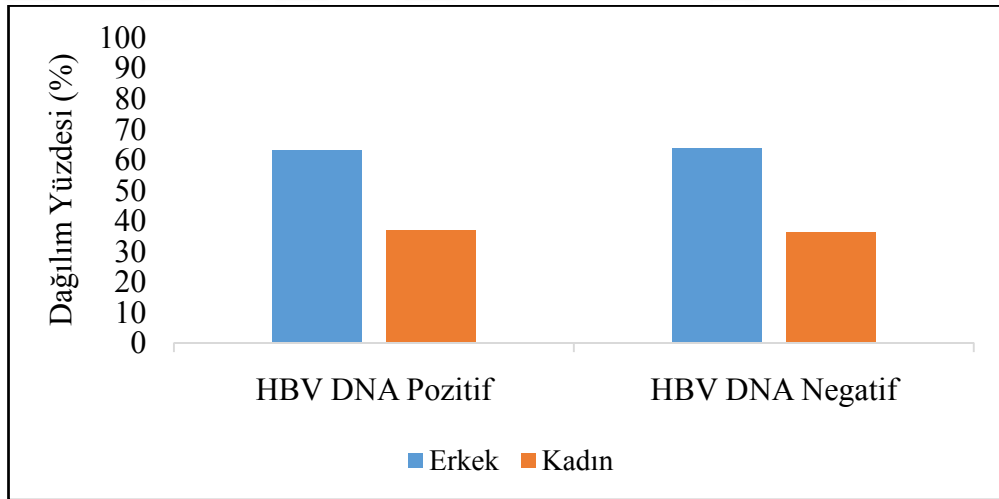
Tablo 4.1. HBsAg ‘ye göre HBV DNA görülme oranları

	HBV DNA				
	Pozitif	n %	Negatif	n %	Toplam
HBsAg Pozitif	1037	42.5	1400	57.5	2437

Cinsiyete göre HBV DNA görülme oranlarına bakıldığında 1548 erkek hastanın 654’ü (% 42.2) HBV DNA pozitif, 894’ü (57.8) HBV DNA negatifti. 889 kadın hastanın ise 383’ü (%43) HBV DNA pozitif, 506’sı (%57) HBV DNA negatifti (tablo 4.2. ve şekil 4.2.).

Tablo 4.2. Cinsiyete göre HBV DNA görülme oranlarının karşılaştırılması

Cinsiyet	HBV DNA				Toplam
	Pozitif	n %	Negatif	n %	
Erkek	654	42.2	894	57.8	1548
Kadın	383	43	506	57	889
Toplam	1037	42.5	1400	57.5	2437



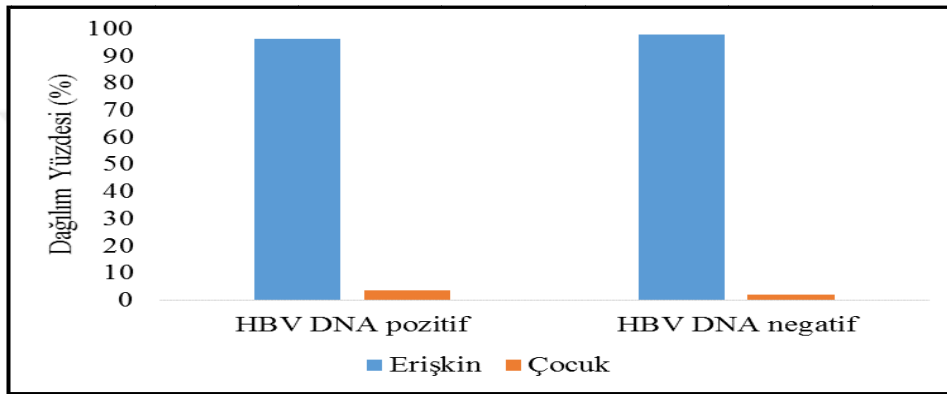
Şekil 4.2. HBV DNA (+) veya (-) olan hastalarda erkek-kadın oranı

Yaşa göre HBV DNA görülme oranlarına bakıldığında 2368 erişkin hastanın 999’u (%42) HBV DNA pozitif , 1369’u (%58) HBV DNA negatifti. Çocuk yaş grubundaki 69 hastanın 38’i (%55) HBV DNA pozitif iken 31’i (%45) HBV DNA negatifti (tablo 4.3. ve şekil 4.3.).

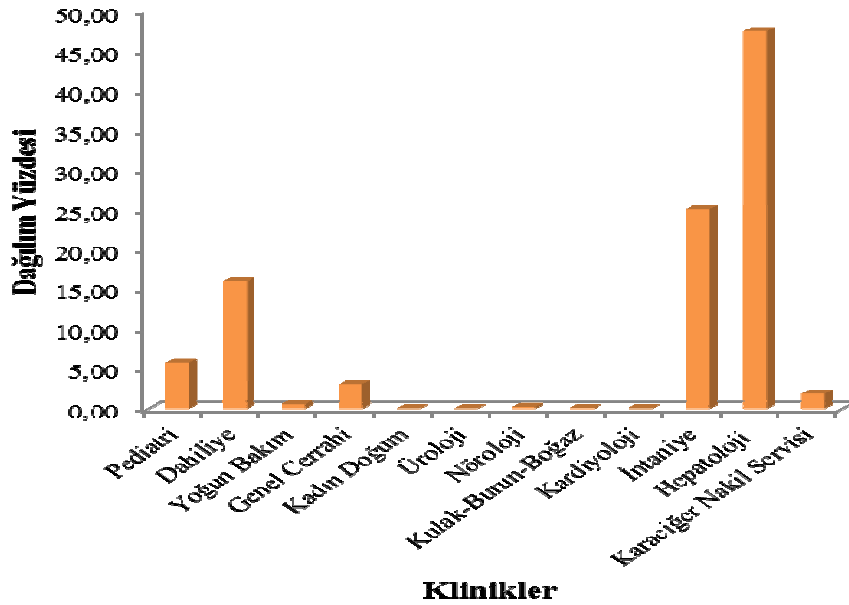
HBV DNA istemi yapan çeşitli kliniklerin dağılımına baktığımızda en fazla hepatoloji bölümü tarafından istem yapıldığı görülmektedir (şekil 4.4.).

Tablo 4.3. Yaş grubuna göre HBV DNA görülme oranlarının karşılaştırılması

Yaş	HBV DNA				Toplam
	Pozitif	n %	Negatif	n %	
Erişkin	999	42	1369	58	2368
Çocuk	38	55	31	45	69
Toplam	1037	42.5	1400	57.5	2437



Şekil 4.3. HBV DNA (+) veya (-) olan hastalarda erişkin-çocuk yaş grubu oranı



Şekil 4.4. HBV DNA istemi yapan kliniklerin dağılımı

5. TARTIŞMA

Tüm dünyada ve ülkemizde Hepatit B virüs infeksiyonu yaygın olarak görülmektedir (9). Zarfsız, kısmen çift sarmallı DNA virüsü olan HBV, karaciğere tropizm göstermesi ve hepatosellüler karsinoma yol açması nedeni ile önemli hepatotropik virüsler içerisinde yer almaktadır. Dünya Sağlık Örgütü; 2 milyara yakın kişinin HBV ile karşılaşmış olduğunu, 400 milyondan fazla insanın da kronik HBV taşıyıcısı olduğunu bildirmektedir. Bu olgulara her yıl 50 milyon yeni vaka eklenmektedir. HBV' ün neden olduğu siroz, hepatosellüler kanser gibi kronik ve akut komplikasyonlar sonucu yılda 2 milyona yakın kişi hayatını kaybetmektedir (47, 48).

Türkiye HBV sıklığı açısından orta derecede endemik bölgeler arasında yer almaktadır. Avrupa Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi'nin Eylül 2010'da hepatit B'ye ilişkin raporuna göre; Türkiyede hepatit B prevalansı bölgelere göre %2-8 arasında değişmektedir. Bu oran ülkemizde yaklaşık 4 milyon kişinin HBV taşıyıcısı olduğunu göstermektedir (9, 52).

Ülkemizde yapılan çalışmalarda hepatit B prevalansının batı bölgelerinde doğu bölgelerine oranla daha az olduğu gözlenmektedir. Malatya'da yapılan bir çalışmada hepatit şüphesi ile başvuran hastalarda HBsAg pozitifliği %13 (92), Diyarbakır, Batman, Mardin ve Şanlıurfa illerinde yapılan bir çalışmada %7 (93) , Aydın'da yapılan bir çalışmada %1,9 (94), Bolu'da yapılan bir çalışmada %2,85 (95), Mersin'de yapılan bir çalışmada %2,2 (96) ve Ankara'da yapılan bir çalışmada %2.9 (97) olarak bildirilmiştir. HBsAg seroprevalansının araştırıldığı otuz değişik çalışmada Doğu ve Güneydoğu Anadolu'da infekte olma yaşının çocukluk çağına indiği anlaşılmaktadır (91).

Türkiye Avrupa ülkeleri ile kıyaslandığında genel popülasyonda hepatit B prevalansının en yüksek olduğu ülkeler arasındadır. HBsAg prevalansı siroz hastalarında %64, hepatosellüler karsinomlularda ise %54 olarak bildirilmiştir (54).

Hepatit B virüs; akut hepatite, kronik hepatite veya taşıyıcılığa neden olmaktadır. Aynı zamanda kronik viral infeksiyonların en sık sebeplerinden birisidir. Erken yaşta bu virüs ile karşılaşmak kronikleşmeyi artırmaktadır. HBV infeksiyonunda; kronikleşen olguların siroza dönüşmesi ve hepatosellüler karsinom gelişme riski nedeniyle çok hızlı şekilde tanısının konularak, erken dönemde tedavisinin planlanması gereklidir (28).

HBV infeksiyonunun yayılmasında en önemli etmen HBV taşıyıcılığıdır. HBV başlıca vertikal (anneden çocuğa), parenteral (kan ve kan ürünleri, intravenöz ilaç kullanımı), horizontal (hijyen alışkanlıkları, ortak diş fırçası kullanımı), cinsel ilişki ve medikal işlemler ile bulaşmaktadır. Endeminin derecesi ile HBV infeksiyonunun bulaş yolları arasında yakın ilişki bulunmaktadır. Horizontal geçiş Orta doğu ve Akdeniz ülkelerinde en sık rastlanılan geçiş yoludur. Ayrıca HBV'ün vertikal geçiş durumunda daha fazla kronikleşme eğilimi gösterdiği bildirilmiştir.

Ülkemizde ise horizontal geçiş başlıca bulaş yoludur. Gebelerde HBsAg ve özellikle de HBeAg prevalansının düşük olmasından dolayı vertikal geçiş muhtemelen daha az görülmektedir. Aile içinde HBV bulaşı başlıca çocukluk ve adolesan dönemde gerçekleşir. Bu durum yenidoğan ve çocukların aşılmasının ve ailelerin bulaş yolları hakkında bilgilendirilmesinin çok önemli olduğunu göstermektedir (53).

Ülkemizde değişik yaş gruplarındaki çalışmaların sonuçları bazı farklılıklar gösterse de HBV ile karşılaşmanın adolesan çağının başlangıcından itibaren yükselme eğilimine girdiği görülmektedir. Bu sonuçlara göre aşısı olmayan adolesan çağındaki kişilerin de aşılması gerekmektedir. Sağlık Bakanlığı, aşılama risk gruplarına, okul öncesi ve okul dönemindeki çocuklara kademeli olarak yaygınlaştırmıştır (55).

Hepatit B infeksiyonu perinatal, perkütan, cinsel temas, açık yara ve yakın kişisel temas ile bulaşabilir. HBV vücut dışında uzun süre yaşayabilmektedir. Erkek cinsiyet ve hepatit B ile karşılaşma yaşı infeksiyonunun kronikleşme ihtimalini artıran risk faktörlerindedir (98). HBV ile akut karşılaşma sonrası kişide kronik HBV infeksiyonu gelişme riski; HBeAg pozitif annelerden doğan bebeklerde %90, 5 yaşın altındaki çocuklarda %25-30 ve erişkinlerde ise %5'ten azdır. Ayrıca, immun sistemi baskılanmış kişilerde kronik HBV infeksiyonu gelişme ihtimali daha yüksektir (99).

Sağlık merkezlerinde kullanılan malzemeler, cihazlar vb. ile ilişkili olarak hastadan hastaya hepatit B bulaş riski mevcuttur (100). HBV'ün infekte sağlık çalışanlarından hastalara bulaştırılması ise oldukça nadir görülmektedir (99).

HBV enfeksiyonu akut, fulminan formlara dönüşebilir veya kronikleşerek, siroz ve HCC'ye neden olabilir. Ayrıca "sağlam taşıyıcılık" olarak adlandırılan persistan viremiye rağmen aminotransferazların ve karaciğer histolojisinin normal olduğu tabloya da yol açabilmektedir (101). HBV enfeksiyonunda görülen klinik tablolar hem akut hem de kronik hastalıkta değişkenlik göstermektedir. Akut fazda; subklinik veya anikterik hepatitten, ikterik hepatite, bazı olgularda fulminan hepatite kadar değişen tablolara neden olurken, kronik fazda ise asemptomatik taşıyıcılıktan, kronik hepatit, siroz ve HCC'ye kadar değişebilen bir seyir gösterebilmektedir (50).

HBV enfeksiyonunda inkübasyon süresi 45–120 gündür. Klinik şekli yaş, cinsiyet, virüsün genetik yapısı, diğer hepatotrop virüs varlığı, infekte kişinin immun durumu ve hastalığa tanı konulan evreye göre değişmektedir. Yetişkinlere göre çocuklarda ve gençlerde daha hafif veya asemptomatik olarak seyreder. HBV enfeksiyonu 4 yaşın altındaki çocuklarda %90, 30 yaşın üzerindeki yetişkinlerde ise %60 oranında asemptomatiktir. Akut HBV enfeksiyon öyküsü olmayanlarda yüksek oranda taşıyıcılık olması hastalığın daha çok subklinik geçirildiğini gösterir ve bu olgularda kronikleşme eğilimi daha fazladır (102). HBV enfeksiyonu geçiren kişilerin %5'inde enfeksiyon kronikleşirken, %0,5'inde de siroza ilerlemektedir. Ayrıca HBV taşıyıcısı kişilerde HCC gelişme ihtimali infekte olmayan kişilere göre 100 kat daha fazladır (19, 29).

HBV enfeksiyonlarının rutin tanısında HBV'ye ait antijenlerin ve antikorların hasta serumunda saptanması enfeksiyonun özgül tanısı için yaygın kullanılan yöntemlerdir. Virüse ait HBsAg, HBeAg ve bu antijenlere karşı gelişen antikorlar (anti-HBc IgM, total anti-HBc, anti-HBs ve anti-HBe) "enzym immunoassay" (EIA) ve "radio immunoassay" (RIA) yöntemleriyle tespit edilebilir (103).

HBsAg, enfeksiyonun inkübasyon periyodunda (semptomlar başlamadan önceki 2-7. haftalardan itibaren) serumda pozitif olarak bulunur ve hastalık süresince bulunmaya devam ederek iyileşme döneminde kaybolur. Anti-HBs ise iyileşme döneminde yükselmeye başlar. Anti-HBc semptomlar sırasında pozitif olarak bulunur. Anti-HBs ve anti-HBc uzun süre pozitif seyreder. Anti-HBc IgM akut hastalık tanısının en önemli göstergesidir. Ancak kısa sürede tespit edilemeyecek düzeylere iner. HBeAg, HBsAg'nin pozitifleşmesinden sonraki 1-2 hafta içinde pozitifleşir. Bu dönemde

serumda HBV DNA saptanabilir. HBeAg pozitifliğinden anti-HBe pozitifliğine geçiş iyileşmeyi gösteren bir kriterdir. Kronik taşıyıcılık gelişmesi durumunda akut enfeksiyonun 6 ay sonrasında da HBsAg pozitifliği ile beraber HBeAg veya anti-HBe pozitifliği devam eder (20).

HBeAg; moleküler tanı testleri ile HBV DNA tespit edilmeden önce, vireminin en önemli belirteci olarak değerlendirilmekteydi. Ancak yıllar içinde HBeAg negatif mutantların tespit edilmesi ile HBeAg ve anti-HBe'nin vireminin göstergeleri olarak değerlendirilmesinin güvenilir bir yöntem olmadığı anlaşılmıştır (106). Viral replikasyonun ve infektivitenin belirlenmesinde kullanılan HBV DNA tespiti, özellikle serolojik göstergelerin yetersiz kaldığı olgularda HBV enfeksiyonunun saptanmasında, tedavi ve prognozun değerlendirilmesinde yardımcı olmaktadır. Son zamanlarda nükleik asit amplifikasyon testlerinin hızla gelişmesiyle HBV DNA miktarının belirlenmesi, özellikle viral replikasyonun belirlenmesine ve hastaların tedaviye yanıtlarının izlemine olanak sağlamaktadır (107).

Moleküler yöntemlerle HBV DNA belirlenmesinin klinisyene sağladığı bir takım yararlar vardır:

- 1- HBV DNA düzeyinin yüksek düzeyde olması viral replikasyonun fazla olduğunu gösterirken, düşük düzeyde olması viral replikasyonun az olduğunu göstermektedir. Viral replikasyon durumuna göre tedavi protokolü seçimine karar verilmektedir (39, 65).
- 2- Anti-viral tedavi alan hastaların izleminde HBV DNA düzeyinin belirlenmesi çok önemlidir. Alfa-interferon tedavisi alan hastalarda HBV DNA'daki hızlı düşüş tedaviye yanıtın iyi olduğunu göstermektedir (75, 104). Tedavi öncesinde HBV DNA düzeyi düşük olan hastalar interferon tedavisine daha iyi yanıt vermektedirler (76).
- 3- Replikasyon ve enfeksiyona ait serolojik bulgunun olmadığı enfeksiyonlarda ve HBV varyantlarının tanınmasında HBV DNA'ya yönelik testler önem kazanmaktadır (61, 104).
- 4- Yapılan bir çalışmada HBsAg negatif, karaciğer enzimleri normal sınırlarda olan 206 donöre ait kan örneklerinin 9'unda HBV DNA belirlenmiştir. Bu nedenle kan bankacılığında HBV açısından taramalarda HBV DNA varlığı araştırılması çok önemli olmaktadır (61, 65).

Moleküler yöntemlerle HBV DNA belirlenmesi için kullanılan testlerden; "Digene hibrid yakalama II ultra sensitive (Digene corp) testi" hibrid yakalama sinyal amplifikasyon yöntemi ile çalışır, duyarlılığı 4700 copies/ml'dir. "Versant HBV DNA

3.0 (bDNA) (Bayer Diagnostics) testi” yarı otomatize bDNA sinyal amplifikasyon yöntemi ile çalışır, duyarlılığı 2000 copies/ml (1 IU/ml=5.6 copies/ml)’dir. “Cobas amplikor HBV monitör (Roche moleküler sistemleri) testi “yarı otomatize kantitatif RT-PCR yöntemi ile çalışır, duyarlılığı 200 copies/ml (1 IU/ml=5.6 copies/ml)’dir. “Cobas taqman 48 HBV (Roche moleküler sistemleri) testi” Real-time PCR with Taqman probe yöntemi ile çalışır, duyarlılığı <50 copies/ml (1 IU/ml=5.68copies/ml)’dir. “Real art HBV PCR assay (Arthus-Biotech) testi” Real-time PCR yöntemi ile çalışır, duyarlılığı <50 copies/ml (1 IU/ml=5.68copies/ml)’dir (106). Kullanılan testler ve seçilen yöntemlere göre duyarlılık sınırları 4700 kopya/ml ile <50 kopya/ml arasında değişmektedir. Çalışmamızda Real-time PCR yöntemi olarak Real art HBV PCR assay (Arthus-Biotech) kullanıldı. Testin duyarlılığı <50 copies/ml (1 IU/ml=5.68copies/ml) idi. 400 kopya/ml üzeri değer HBV DNA pozitif olarak değerlendirildi.

Yaptığımız çalışmanın değerlendirilebilmesi açısından ülkemizde yapılan diğer çalışmalara bakacak olursak; Külah ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, HBsAg pozitif 430 hasta serumunu değerlendirmiş ve bunların 229’unda (%53) HBV DNA’yı pozitif olarak bulmuşlardır (105). Sağlık ve arkadaşları yaptıkları çalışmada HBsAg pozitif 402 hasta serum örneğinin 370’inde (%92) HBV DNA’yı pozitif olarak saptamışlardır (108). Altındiş yaptığı çalışmada HBsAg pozitif 110 hasta serum örneğinin 22’sinde (%20) HBV DNA’yı pozitif olarak bildirmiştir (109). Koçoğlu ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, HBsAg pozitif 451 hasta serumunun 202’sinde (%44.8) HBV DNA’yı pozitif olarak belirlemişlerdir (110). Demirtürk ve arkadaşları 188 HBsAg pozitif hasta serumunun 40’ında (%21) HBV DNA’yı pozitif olarak bulmuşlardır (111). Otlu ve arkadaşları HBsAg pozitif 361 hasta serumunun 255’inde (%71) HBV DNA’yı pozitif olarak saptamışlardır (112). Köse ve arkadaşları HBsAg pozitif 3709 hastanın 581’inde (%15.6) HBV DNA’yı pozitif olarak bulmuşlardır (113). Eroğlu ve arkadaşları PCR ve hibridizasyon yöntemleriyle HBV DNA belirlenmesini karşılaştırmışlar; PCR yöntemi ile %36, hibrid yakalama yöntemi ile %32 oranında HBV DNA pozitifliği bildirmişlerdir (116). Yurt dışı çalışmalarda ise; Peignoux ve arkadaşları 108 inaktif HBsAg taşıyıcısı hastanın 93’ünde (%86) HBV DNA’yı pozitif olarak belirlemişlerdir (114). Poljak ve arkadaşları 252 HBsAg pozitif serum örneğinde HBV DNA için Hybrid Capture ve Cobas-HBV yöntemlerini kullanmış ve her iki yöntemde de 173 (%68.6) örnekte HBV DNA’yı pozitif olarak bulmuşlardır (115). Odaibo ve arkadaşları 105 HBsAg taşıyıcısı hastanın 86’sında (%81.9) HBV DNA’yı pozitif olarak belirlemişlerdir (117). Chen ve

arkadaşları Güney doğu Çin’de yaptıkları çalışmada 8439 HBsAg taşıyıcısı hastanın 1420’sinde (%16.8) HBV DNA’yı pozitif olarak saptamışlardır (118). Hasan ve arkadaşları Bangladeş’te yaptıkları çalışmada 125 HBsAg taşıyıcısı hastanın 56’sında (%44.8) HBV DNA’yı pozitif olarak bulmuşlardır (119). Çalışmamızda ülkemizde ve yurt dışında yapılan çalışmalara benzer şekilde HBsAg pozitif olguların %42.5’inde (1037/2437) HBV DNA’yı pozitif olarak saptadık.

Ülkemizde çocuklarda HBV seroprevalansı ile ilgili yapılan çalışmalarda HBsAg pozitifliği %0.1-%12 arasında değişmektedir (120). HBV infeksiyonunun bulaşması ülkemiz gibi orta endemik bölgelerde daha çok horizontal yolla olmaktadır. Özellikle 6 yaş ve altında aile içi yakın temasla aynı havlunun, sakızın veya diş fırçasının paylaşılması HBV infeksiyonunun bulaşmasını kolaylaştırmaktadır. Bu nedenlerden dolayı çocuklarda rutin Hepatit B aşısının yapılması, HBV infeksiyonunun önlenmesi ve taşıyıcılığın azalması yönünden çok önemlidir. İnfeksiyonun yaşamın erken döneminde kazanılmasıyla kronikleşmenin artmasından dolayı aşılama daha da önem kazanmıştır. Hepatit B aşısı 1998 yılından itibaren “Ulusal Hepatit B Aşı Programı”(UHBAP) çerçevesinde rutin aşılama takvimine girmiş, yenidoğan döneminden itibaren 3 doz uygulanmaya başlanmıştır (121). Ulusal aşılama programı başlamadan önce yapılan çalışmalarda; Üner ve arkadaşları HBsAg pozitifliğini %9.8 (122), Arabacı ve arkadaşları %9.5 (123), Energin ve arkadaşları %3.4 (124) olarak bildirmişlerdir. Ulusal aşılama programının başlamasından sonra yapılan çalışmalarda ise Araz; yaptığı çalışmada HBsAg pozitiflik oranını %1.1 (125), Şahin ve arkadaşları %1.3 (126), Çopur Çiçek ve arkadaşları %2,4 oranında saptamışlardır (121). Yapılan çalışmalara göre; aşılama programının başlamasından sonra HBsAg pozitiflik oranlarında azalma görülmektedir (127). Bizim çalışmamızda ise HBsAg pozitif olguların %2.8’i 18 yaş altında belirlenmiştir.

HBsAg pozitiflik oranını İnci ve arkadaşları Artvin’de yaptıkları çalışmada hastaları cinsiyetlerine göre değerlendiklerinde; erkeklerde %4.71, kadınlarda %3.30 (128), Tunç ve arkadaşları Siirt’te yaptıkları çalışmada erkeklerde %61, kadınlarda %39 (129), Iraz ve arkadaşları İstanbul’da yaptıkları çalışmada erkeklerde %6.7, kadınlarda %4.4 olarak tespit etmişlerdir (130). Yapılan diğer çalışmalara benzer şekilde bizim çalışmamızda da erkeklerdeki HBsAg seropozitifliğinin kadınlara göre daha yüksek olduğunu gördük. Bizim çalışmamızda HBsAg pozitif olguların %63.5’i erkek, %36.5’i kadın olarak belirlendi. Yapılan çalışmalarda erkeklerde HBsAg seropozitifliğinin

kadınlara göre daha yüksek olması; toplu yaşam alanlarında (yurt, kahvehane, askerlik, berber) erkeklerin daha fazla bulunması ve ortak malzemelerin (tırış vb) kullanılmasına bağlı olduğu bildirilmiştir (130).

HBV DNA ile HBsAg ilişkisini değerlendiren çok sayıda çalışma yapılmış ve farklı sonuçlara ulaşılmıştır. Çalışmaların büyük çoğunluğunda HBsAg ve HBV DNA düzeyleri arasında pozitif ilişki saptanmıştır. Bununla birlikte herhangi bir ilişkinin saptanmadığı veya negatif ilişkinin saptandığı çalışmalar da mevcuttur (108). HBsAg pozitif olmasına rağmen; infeksiyonun immun yanıt fazı sonrası nonreplikatif dönemde aktif viral replikasyonun göstergesi olan HBV DNA negatif saptanabilir. Bu dönemde immunohistokimyasal yöntemler ile hepatosit sitoplazmasında ve serumda HBsAg bulunmasına karşın HBV DNA gösterilemeyebilir. Ayrıca tedavi gören olgularda, asemptomatik ya da sağlıklı hepatit B taşıyıcılarında HBsAg pozitif olmasına rağmen HBV DNA negatif belirlenebilir (131, 132).

Ülkemizde yapılan çalışmalarda; Külah ve arkadaşları HBsAg pozitif olgularda HBV DNA negatifliğini %47 (105), Sağlık ve arkadaşları %8 (108), Altındiş %80 (109), Koçoğlu ve arkadaşları %55.2 (110), Demirtürk ve arkadaşları %79 (111), Otlu ve arkadaşları %29 (112), Köse ve arkadaşları ise %84 (113) olarak bulmuşlardır. Yurtdışında yapılan çalışmalarda ise; Peignoux ve arkadaşları HBsAg pozitif olgularda HBV DNA negatifliğini %14 (114), Poljak ve arkadaşları %31.4 (115), Odaibo ve arkadaşları %18.1 (117), Chen ve arkadaşları %83.2 (118), Hasan ve arkadaşları ise %55.2 olarak saptamışlardır (119). Çalışmamızda ülkemizde ve yurt dışında yapılan çalışmalara benzer şekilde %57.5 oranında HBV DNA negatifliği saptadık.

Hepatit B virüs infeksiyonunun saptanmasında serolojik gösterge olarak HBsAg hala önemini korumaktadır. Bunun yanında HBV DNA'nın tespit edilmesinin; viral replikasyonun ve infektivitenin belirlenmesinde, antiviral tedaviye yanıtın takibinde ve prognozun değerlendirilmesinde en önemli moleküler test olduğu kanısındayız.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

- 1- Çalışmamızda İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji laboratuvarımıza Ağustos 2014-Ağustos 2015 tarihleri arasında çeşitli kliniklerden gönderilen HBsAg pozitif 2437 hastanın serumu HBV DNA açısından incelendi.
- 2- ELISA yöntemiyle HBsAg pozitif bulunan 2437 hastanın, HBV DNA ve HBsAg sonuçları retrospektif olarak karşılaştırıldı.
- 3- HBsAg pozitif 2437 örnekten 1037'sinde (%42.5) HBV DNA pozitif, 1400'ünde (%57.5) HBV DNA negatif bulundu.
- 4- İncelenen serum örneklerinin 1548'i erkek, 889'ı kadın hastalara aitti.
- 5- Hasta popülasyonunun 2368'i erişkin, 69'u çocuk yaş grubunda idi. Yaş ortalaması 47 olarak belirlendi.
- 6- Yaşa göre HBV DNA görülme oranları; 2368 erişkin hastanın 999'u (%42) HBV DNA pozitif , 1369'u (%58) HBV DNA negatif olarak bulundu. Çocuk yaş grubunda ise 69 hastanın 38'i (%55) HBV DNA pozitif, 31'i (%45) HBV DNA negatif olarak belirlendi.
- 7- Cinsiyete göre HBV DNA görülme oranları; erkek hastalarda %42, kadın hastalarda %43 HBV DNA pozitifliği belirlendi.

Çalışmamızda, hepatit B infeksiyon tanısında kullanılan serolojik markerlardan HBsAg pozitif saptanan olgularda, HBV DNA sonuçları retrospektif olarak incelenerek aralarındaki uyum karşılaştırıldı.

Hepatit B infeksiyonunda, HBV yüzey antijeni olan HBsAg en çok başvuru alan serolojik belirteçlerdendir. Dolayısıyla HBsAg Hepatit B infeksiyonun göstergesi olarak değerlendirilmektedir. Ancak serolojik marker olarak tek başına infektivitenin belirlenmesinde, antiviral tedavi yanıtının ve prognozun değerlendirilmesinde yetersiz kalmaktadır. HBV DNA'nın saptanması ise tedavi ve takipte en duyarlı yöntem olarak kabul edilmektedir.

Çalışmamızda HBsAg pozitif olgularda %42.5 oranında HBV DNA pozitifliği belirlendi.

Sonuç olarak; HBsAg pozitif saptanan olgularda viral replikasyonun gösterilmesi ve antiviral tedavinin takibi için HBV DNA düzeyinin belirlenmesinin önemli olduğu düşüncesindeyiz.



7.KAYNAKLAR

1. Nebbia G, Peppia D, Maini MK. Hepatitis B infection: current concepts and future challenges. *QJM* 2012, 105(2): 109-13.
2. Pan CQ, Duan ZP, Bhamidimarri KR, Zou HB, Liang XF, Li J, Tong MJ. An algorithm for risk assessment and intervention of mother to child transmission of hepatitis B virus. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2012, 10(5): 452-9.
3. Borgia G, Carleo MA, Gaeta GB, Gentile I. Hepatitis B in pregnancy. *World J Gastroenterol* 2012, 18(34): 4677-83.
4. Bzowej NH. Optimal management of the hepatitis B patient who desires pregnancy or is pregnant. *Curr Hepat Rep* 2012, 11(2): 82-9.
5. Giles ML, Visvanathan K, Lewin SR, Sasadeusz J. Chronic hepatitis B infection and pregnancy. *Obstet Gynecol Surv* 2012, 67(1): 37-44.
6. European Association for the Study of the Liver. EASL Clinical Practice Guidelines: management of chronic hepatitis B virus infection. *J Hepatol* 2012, 57(1): 167-85.
7. Yogeswaran K, Fung SK. Chronic hepatitis B in pregnancy: unique challenges and opportunities. *Korean J Hepatol* 2011, 17(1): 1-8.
8. Allain JP, Stramer SL, Carneiro-Proietti ABF, Martins ML, Lopes da Silva AN, Ribeiro M, Proietti FA, Reesink HW. Transfusion-transmitted infectious diseases. *Biologicals* 2009, 37: 71-7.
9. Özdemir D, Kurt H. Hepatit B virüsü infeksiyonlarının epidemiyolojisi. Tabak F, Balık İ, Tekeli E. (eds). *Viral Hepatit* 2007. 1. baskı. İstanbul: Viral Hepatitle Savaşım Derneği, 2007, 108-17.
10. Allain JP. Occult hepatitis B virus infection: implications in transfusion. *Vox Sang* 2004, 86: 83-91.
11. Biswas R, Tabor E, Hsia CC, Wright DJ, Laycock ME, Fiebig EW. Comparative sensitivity of HBV NATs and HBsAg assays for detection of acute HBV infection. *Transfusion* 2003, 43: 788- 98.
12. Broker E, Grabarczyk P, Liszewski G, Mikulska M, Allain JP, Letowska M. Characterization of HBV DNA positive/HBsAg negative blood donors identified in the Polish NAT screening program. *Hepatology* 2006, 44: 1666-74.
13. Kocagöz T. Nükleik asit çoğaltma yöntemleri. *Mikrobiyol Bült* 2000, 34: 113-7.

14. Değertekin H, Oğuz AK. Akut ve Kronik HBV İnfeksiyonunda Doğal Seyir. *Güncel Gastroenteroloji* 2010, 14(2): 54-8.
15. Ustaçelebi Ş, Ergünay K. Hepatit B virusun (HBV) moleküler virolojisi. İçinde: Tabak F, Balık İ, Tekeli E (çeviri editörleri). *Viral Hepatit* 2007, 1. baskı. İstanbul, Viral Hepatitle Savaşım Derneği, 2005: 96-107.
16. Özsan M. HBV infeksiyonunda mikrobiyolojik tanı. İçinde: Tabak F, Balık İ, Tekeli E (çeviri editörleri). *Viral Hepatit* 2007, 1. baskı. İstanbul, Viral Hepatitle Savaşım Derneği, 2005: 124-33.
17. Horvat RT, Tegtmeier GE. *Klinik Mikrobiyoloji*. İyigün CP, Avcı İY (Çevirenler). 9. Baskı, Ankara: Atlas Kitapçılık, 2009: 1641–59.
18. Vyas GN, Yen TSB. Hepatitis B virus – Biology, pathogenesis, epidemiology, clinical description, and diagnosis. In: Specter S (ed). *Viral Hepatitis–Diagnosis, Therapy, and Prevention*. New Jersey, Springer, 2014.
19. Bayram A. Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi ve Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Kan Merkezlerine Başvuran Kan Vericilerinde HBsAg Negatifliğinde HBV DNA'nın Araştırılması. Uzmanlık tezi, İzmir: Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, 2011.
20. Dündar İH, İnal S. Geçmişten günümüze viral hepatitler. İçinde: Tabak F, Balık İ, Tekeli E (çeviri editörleri). *Viral Hepatit* 2005. İstanbul, Viral Hepatitle Savaşım Derneği, 2005: 10-20.
21. Erensoy S. Hepatit B virüs (HBV) biyolojisi. İçinde: 3. *Ulusal Viroloji Kongresi Kitabı*, Uludağ, 2007: 156-8.
22. Akçalı S. Hepatit Virüsleri. İçinde: : Tıbbi Mikrobiyoloji, Us AD, Başustaoğlu A (Çeviri editörleri). *Medical Microbiology*, Patrick RM, Ken SR, Murray PR, Rosenthal KS, Phaller MA. 7. Baskı, Ankara, Pelikan Kitabevi, 2016.
23. Roth WK. Hepatitis B and blood transfusion. *ISBT Sci Series* 2007, 2: 178-83.
24. Robinson WS, Hepadnaviridae. In: Mandell GL, Douglas RG, Bennelt JE (eds). *Principles and Practice of Infectious Disease*, 5thed. New York, Churchill Livingstone, 2000: 1652-85.
25. Seeger C, Zoulim F, Mason WS. Hepadnaviruses. In: Knipe DM, Howley PM (eds). *Fields Virology*, 5thed. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 2007: 2978-3029.
26. Seeger C, Mason WS. Hepatitis B virus biology. *Microbiol Mol Bio Rev* 2000, 64 (1): 51-68.

27. Robinson WS. Hepadnaviridae and Their Replication. In: Knipe DM, Howley PM (eds). *Fields Virology*, 5thed. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 2007.
28. Robinson WS. Hepatitis B Virüs and Hepatitis D Virüs, *Principles and Practice of Infectious Diseases*. In: Mandell, GL, Bennet, JE (eds). Edison, 7thed. USA, Churchill-Livingstone, 2010: 2059.
29. Özacar T. Hepatit B virüsü. İçinde: Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M (çeviri editörleri). *İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*. İstanbul, Nobel Tıp Kitabevi, 2008: 1882-904.
30. Ergon C, Abacıoğlu H. Hepatit Virüsleri. İçinde: *Tıbbi Mikrobiyoloji*, Us AD, Başustaoğlu A (Çeviri editörleri). *Medical Microbiology*, Patrick RM, Ken SR, Murray PR, Rosenthal KS, Phaller MA. Tıbbi Mikrobiyoloji. 6.Baskı, Ankara, Atlas Kitapçılık, 2010: 645-59.
31. Çetin M. Hastanede Sorunlu Mikroorganizmalar: Viruslar ve Prion. *DAS Kongre kitabı*, 2003.
32. Locarnini S, McMillan J, Bartholomeusz A. The hepatitis B virus and common mutants. *Semin Liver Dis* 2003, 23(1): 5-20.
33. Kıyan M. Hepatit B virüsü. İçinde: Kılıçturgay K, Badur S (çeviri editörleri). *Viral Hepatit*, 1. Baskı. İstanbul, Viral Hepatitle Savaşım Derneği, 2003: 86-120.
34. Badur S. Viral Hepatitler. İçinde: Ustaçelebi Ş, Abacıoğlu H, Badur S (editörler). *Moleküler, Klinik ve Tanısal Viroloji*. İstanbul, Güneş Kitabevi, 2004: 183-98.
35. Dienstag JL. Chronic Viral Hepatitis. In: Mandell GL, Bennet JE, Dolin R. *Principles and Practice of Infectious Diseases*, 6th edition. Philadelphia, Churchill Livingstone, 2005: 1593.
36. Moola N, Kew M, Abruthnot P. Regulatory elements of hepatitis B virus transcription. *J Viral Hepat* 2002, 9: 323-31.
37. Kidd-Ljunggren K, Miyakawa Y, Kidd AH. Genetic variability in hepatitis B viruses. *J Gen Virol* 2002, 83(6): 1267-80.
38. Weber B. Genetic variability of the S gene of hepatitis B virus: clinical and diagnostic impact. *J Clin Virol* 2005, 32(2): 102-12.
39. Echevarria JM, Avellon A. Hepatitis B virus genetic diversity. *J Med Virol* 2006, 78(Suppl 1): 36-42.

40. Sertoz RY, Erensoy S, Pas S, Ozacar T, Niesters H. Restriction fragment length polymorphism analysis and direct sequencing for determination of HBV genotypes in a Turkish population. *New Microbiol* 2008, 31(2): 189-94.
41. Norder H, Couroucé AM, Coursaget P, Echevarria JM, Lee SD, Mushahwar IK, Robertson BH, Locarnini S, Magnius LO. Genetic diversity of hepatitis B virus strains derived worldwide: genotypes, subgenotypes, and HBsAg subtypes. *Intervirology* 2004, 47: 289-309.
42. Özdemir D, Balık İ. Ülkemizde Hepatit B Virusu (HBV) Genotip Dağılımı. *Viral Hepatit* 2002, 1: 451-4.
43. Lok ASF, McMahon BJ. Chronic Hepatitis B. *Hepatology* 2001, 34: 1225–41.
44. Loeb KR, Jerome KR, Goddard J, Huang M, Cent A, Corey L. High-throughput quantitative analysis of hepatitis B virus DNA in serum using the TaqMan fluorogenic detection system. *Hepatology* 2000, 32: 626–9.
45. Lok ASF, McMahon BJ. Chronic hepatitis B. AASLD practice guidelines. *Hepatology* 2007, 45(2): 507-39.
46. Tian Y, Yang W, Song J, Wu Y, Bing N. Hepatitis B Virus X Protein-Induced Aberrant Epigenetic Modifications Contributing to Human Hepatocellular Carcinoma Pathogenesis. *Mol. Cell. Biol.* 2013, 33(15): 2810-16.
47. Hepatitis B. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204/en/> 19.08.2016.
48. Allain JP, Reesink HW, Lucey C. A European perspective on the management of donors and units testing positive for hepatitis B virus DNA. *Transfusion* 2006, 46: 1256-8.
49. Taşyaran MA. HBV enfeksiyonu epidemiyolojisi. Kılıçturgay K, Badur S (eds). *Viral Hepatit* 1.baskı. İstanbul: Viral Hepatitle Savaşım Derneği, 2001: 121-8.
50. Güçlü E, Geyik MF. Hepatit B Enfeksiyonu ve Korunma. *Konuralp Tıp Dergisi* 2012, 4(2): 54-8.
51. Zahn A, Li C, Danso K, Candotti D, Owusu-Ofori S, Temple J. Molecular characterization of occult hepatitis B in genotype E-infected subjects. *J Gen Virol* 2008, 89: 409-18.
52. Hepatitis B and C Surveillance. <http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/viralhepatitis/hepatitis/Pages/european-network-hepatitis.aspx> 19.08.2016
53. Değertekin H, Güneş G. Horizontal transmission of hepatitis B virus in Turkey. *Public Health* 2008, 122: 1315-7.

54. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Hepatitis B and C in the EU neighbourhood: prevalence, burden of disease and screening policies, 2010.
55. Mıstık R. Ülkemizde kronik viral hepatitlerin epidemiyolojisi. *Klinik* 2007, 20 (özel sayı 1): 61-3.
56. The 61st Annual meeting of the American Association for the study of liver diseases (AASLD). A nationwide prevalence study and risk factors for hepatitis A, B, C and D infections in Turkey, 2010.
57. Dürdal Us A. İşaretli Katı Faz Yöntemleri. *Temel İmmünoloji ve Seroloji*. Ankara, Hipokrat Kitabevi, 2016: 163.
58. O'Brien C, Moonka D. Antiviral chemotherapy for viral hepatitis. In: Specter S (ed). *Viral Hepatitis-Diagnosis, Therapy and Prevention*. New Jersey, Humana Press, 1999: 251.
59. Malik AH, Lee WM. Chronic Hepatitis virus B infection: Treatment strategies for the next millennium. *Ann Int Med* 2000, 132: 723-31.
60. Koziel MJ, Siddiqui A. Hepatitis B virus and hepatitis delta virus. In: Mandell, Bennett, Dolin (eds). *Principles and Practice of Infectious Diseases*, 6th ed. London, Churchill Livingstone, 2005: 1864-87.
61. Kimura T, Rokuhara A, Matsumoto A. New enzyme immunoassay for detection of hepatitis B virus core antigen (HBcAg) and relation between levels of HBcAg and HBV DNA. *J Clin Microbiol* 2003, 41: 1901-6.
62. Birben E. Polimeraz zincir reaksiyonu. *Astım Allerji İmmünoloji* 2006, 4(2): 92-4.
63. Valasek MA, Repa JJ. The power of real-time PCR. *Advances in physiology education* 2005; 29(3): 151-9.
64. Garibyan L, Avashia N. Research Techniques Made Simple: Polymerase Chain Reaction (PCR). *J Invest Dermatol* 2013; 133(3): 6.
65. VanGuilder HD, Vrana KE, Freeman WM. Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. *BioTechniques* 2008; 44(5): 619-26.
66. Karahan AG, Cicioğlu Arıdoğan B, Çakmakçı ML. *Genel Mikrobiyoloji Uygulama Kılavuzu*, 1. Baskı, 2002.
67. Köksal F. Nükleik asit çoğaltma yöntemleri. İçinde: Durmaz R (editör). *Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji*. İstanbul, Print Center, 2001: 23.

68. Kessler HH, Preininger S, Stelzl E, Daghofer E, Santner BI, Marth E, Lackner H, Stauber RE. Identification of different states of hepatitis B virus infection with a quantitative PCR assay. *Clin Diagn Lab Immunol* 2000, 7(2): 298-300.
69. Gürses G. HBsAg Negatif Olgularda HBV DNA Pozitifliğinin Araştırılması. Harran Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mikrobiyoloji Anabilim dalı. Yüksek Lisans Tezi, Şanlıurfa, 2006.
70. Ireland JH, O'Donnell B, Basuni AA, Kean JD, Wallace LA, Lau GK, Carman WF. Reactivity of 13 in vitro expressed hepatitis B surface antigen variants in 7 commercial diagnostic assay. *Hepatology* 2000, 31(5): 1176-82.
71. Hadzakis A, Magiorkinis E, Haida C. HBV virological assesment. *J Hepatol* 2006, 44: 71-6.
72. Pawlotsky JM. Hepatitis B virus (HBV DNA) assays (methods and practice use) and viral kinetics. *J Hepatol* 2003, 39: 31-5.
73. Stuyver L, Van Geyt C, De Gent S, Van Reybroeck G, Zoulim F, Geert Leroux-Roels G, Rossau R. Line probe assay for monitoring drug resistance in hepatitis B virus-infected patient during antiviral therapy. *J Clin Microbiol* 2000, 38(2): 702-7.
74. Hu K. Occult hepatitis B virus infection and its clinical implications. *J Viral Hepat* 2002, 9: 243-57.
75. Cabrerizo M, Bartolome J, Caramelo C, Barril G, Carreno V. Molecular Analysis of Hepatitis B Virus DNA in Serum and Peripheral Blood Mononuclear Cells from Hepatitis B Surface Antigen-Negative Cases. *Hepatology* 2000, 32: 116-23.
76. Cacciola I, Pollicino T, Squadrito G, Cerenzia G, Villari D, de Franchis R, Santantonio T, Brancatelli S, Colucci G, Raimondo G. Quantification of Intrahepatic Hepatitis B Virus (HBV) DNA in Patients with Chronic HBV Infection. *Hepatology* 2000, 31: 507-12.
77. Torbenson M, Thomas DL. Occult HBV. *Lancet Infect Dis* 2002, 2: 479-86.
78. Afyon M. HBsAg Negatif Bağış Kanlarında Anti-HBc IgG ve HBV DNA PCR Çalışılarak Occult Hepatit B Virusu Enfeksiyonu Araştırılması. Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı. Uzmanlık tezi, Ankara: Gülhane Askeri Tıp Akademisi Askeri Tıp Fakültesi, 2011.
79. Blackberg J, Kidd-Ljunggren K. Occult hepatitis B virus after acute self-limited infection persisting for 30 years without sequence variation. *J Hepatol* 2000, 33: 992-7.

80. Xunrang L, Yan AW, Liang R, Lau GK. Hepatitis B virus(HBV) reactivation after cytotoxic or immunosuppressive therapy-pathogenesis and management. *Rev Viral Med* 2001, 11: 287-99.
81. Weinberger KM, Bauer T, Bohm S, Jilg W. High genetic variability of the groupspecific a determinant of hepatitis B virus surface antigen (HBsAg) and the corresponding fragment of the viral polymerase in chronic virus carriers lacking detectable HBsAg in serum. *J General Virol* 2000, 81: 1165-74.
82. Besisik F, Karaca C, Akyüz F, Horosanli S, Onel D, Badur S, Sever MS, Danalioglu A, Demir K, Kaymakoglu S, Cakaloglu Y, Okten A. Occult HBV infection and YMDD variants in hemodialysis patients with chronic HCV infection. *J Hepatol* 2003, 38: 506-10.
83. Horosanlı S, Miladi A, Brillet R, Akyuz F, Kaymakoğlu S, Pawlotsky JM, Badur S. Genotype determination and evaluation of the response to different treatment protocols in chronic hepatitis B patients in Turkey. *J Clin Virol* (6th Annual Meeting of the European Society for Clinical Virology (ESCV) 2003, 27(Suppl. 1): 63.
84. Öztürk R. Viral hepatitlerde olağan dışı serolojik profiller ve moleküler tanı göstergesi kalıpları. İçinde: Tabak F, Balık İ, Tekeli E. (çeviri editörleri). *Viral Hepatit* 2005, 1. baskı. İstanbul, Viral Hepatitle Savaşım Derneği, 2005: 152-8.
85. Alhababi F, Sallam TA, Tong CY. The significance of 'anti-HBc only' in the clinical virology laboratory. *J Clin Virol* 2003, 27: 162-9.
86. Zaaier HL, Lelie PN, Vandenbroucke-Grauls CM, Koot M. Concurrence of hepatitis B surface antibodies and surface antigen: implications for postvaccination control of health care workers. *J Viral Hepat* 2002, 9(2): 146-8.
87. McMahon BJ. Chronic hepatitis B. AASLD practice guidelines. *Hepatology* 2007, 45(2): 507-39.
88. Öztoprak N. Kronik Hepatit B tedavisi algoritması. İçinde: Tabak F, Balık İ (çeviri editörleri). *Viral Hepatit* 2009, 1. Baskı. İstanbul, Viral Hepatitle Savaşım Derneği, 2009: 87-102.
89. Beşışık F. Kronik B hepatiti tedavisinde nukleozid analogları. İçinde: Tabak F, Balık İ, Tekeli E (çeviri editörleri). *Viral Hepatit* 2007, 1. Baskı. İstanbul, Viral Hepatitle Savaşım Derneği, 2007: 196-205.
90. Tekeli E. Hepatit B virüs infeksiyonunda korunma. İçinde: Tabak F, Balık İ, Tekeli E (çeviri editörleri). *Viral Hepatit* 2007, 1. Baskı. İstanbul, Viral Hepatitle Savaşım Derneği, 2007: 178-82.

91. Taşyaran MA. HBV İnfeksiyonu Epidemiyolojisi. İçinde: Tekeli E, Balık İ (editörler). *Viral Hepatit* 2003. Ankara, Viral Hepatitle Savaşım Derneği, 2003: 121-8.
92. Duman Y, Kaysadu H, Tekerekoğlu MS. Hepatit B Virüsü İnfeksiyonunun Seroprevalansı. *İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi* 2009, 16(4): 243-5.
93. Mehmet D, Melikşah E, Şerif Y, Günay S, Tuncer O, Zeynep S. Prevalence of hepatitis B infection in the southeastern region of Turkey: comparison of risk factors for HBV infection in rural and urban areas. *Jpn J Infect Dis* 2005, 58: 15-9.
94. Sakarya S, Tuncer G, Yaşa G, Çiçek C, Kadıköylü G, Yükselen V. Aydın bölgesindeki kan donörlerinde HBsAg, ve anti-HCV prevalansı ve yaş ve cinsiyetle ilişkisi. *Klimik* 2001, 14: 22-4.
95. Karabay O, Serin E, Tamer A, Gökdoğan F, Alpteker H, Özcan A. Hepatitis B carriage and Brucella seroprevalence in urban and rural areas of Bolu province of Turkey: a prospective epidemiologic study. *Turk J Gastroenterol* 2004, 15: 11-3.
96. Öner S, Yapıcı G, Şaşmaz CT, Kurt AO, Buğdaycı R. Hepatitis B, hepatitis C, HIV, and VDRL seroprevalence of blood donors in Mersin, Turkey. *Turk J Med Sci* 2011, 41 (2): 335-41.
97. Kaçmaz B. Ankara ilinde hepatit B ve hepatit C infeksiyonu seroprevalansı. *Viral Hepatit* 2003, 2: 97-101.
98. Tsay PK, Tai DI, Chen YM, Yu CP, Wan SY, Shen YJ, Lin DY. Impact of gender, viral transmission and aging in the prevalence of hepatitis B surface antigen. *Chang Gung Med J* 2009, 32: 155-64.
99. Lok AS, McMahon BJ. Chronic hepatitis B: update 2009. AASLD Clinical Guidelines. *Hepatology* 2009, 50: 661-2.
100. Lanini S, Puro V, Lauria FN, Fusco FM, Nisii C, Ippolito G. Patient to patient transmission of hepatitis B virus: a systematic review of reports on outbreaks between 1992 and 2007. *BMC Med* 2009, 7: 15.
101. Matsumara H, Moriyama M, Goto I, Tanaka N, Okubo H, Arakawa Y. Natural course of progression of liver fibrosis in Japanese patients with chronic liver disease type C a study of 527 patients at one establishment. *J Viral Hepat* 2000, 7: 268-75.
102. Aşkar E. Sağlık Çalışanlarında Hepatit B ve Hepatit C Seroprevalansı. İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı. Uzmanlık tezi, İstanbul: Şişli Etfal Eğitim ve Araştırma Hastanesi, 2006.

103. Kane M, J Banatvala, Villa G Da, Esteban R. Are booster immunisations needed for lifelong Hepatitis B immunity? *Lancet* 2000, 355: 561-5.
104. Bayık M. Güvenli Kan. Damla, KMTD 2004, 59: 10-2.
105. Külah C, Cömert F, Özlü N, Eroğlu Ö, Tekin İÖ. Hepatit B Virus (HBV) İnfeksiyonunda Serolojik Belirteçler, Transaminaz Düzeyleri Ve HBV DNA'nın Birlikte Değerlendirilmesi. *Viral Hepatit Dergisi* 2007, 12(3): 111-15.
106. Avunduk H. Hepatit B Virüs Serolojik Belieleycileri İle HBV DNA Görülme Oranlarının Değerlendirilmesi. Uzmanlık tezi, Sivas: Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, 2006.
107. Özdemir D, Balık İ. Ülkemizde Hepatit B Virusu (HBV) Genotip Dağılımı. *Viral Hepatit Dergisi* 2002, 1: 451-4.
108. Sağlık İ, Mutlu D, Öngüt G, Güvenç Hİ, Akbaş H, Ögünç D, Çolak D. Kronik Hepatit B Enfeksiyonu Olan Hastalarda HBsAg ve HBeAg Değerlerinin HBV DNA ve Alanin Aminotransferaz Düzeyleri ile Karşılaştırılması. *Viral Hepatit Dergisi* 2013, 19(3): 119-22.
109. Altındış M. Hepatit B Virüs (HBV) Serolojik Belirleyicileri ile HBV DNA'nın Varlığının Karşılaştırılması. *İnfeksiyon Dergisi* 2002, 16(2): 141-5.
110. Koçoğlu E, Taş T, Mengeloğlu FZ, Karabörk Ş, Ceylan K. HBV DNA Düzeyleri ile HBV Serolojik Göstergeleri Arasındaki İlişkinin Araştırılması. *J Viral Hepat* 2013, 19: 54-7.
111. Demirtürk N, Eldemir H, Aktepe OC, Altındış M, Kahraman A. HBsAg Pozitifliği Saptanan Hastalarda Serolojik ve Biyokimyasal Bulguların Değerlendirilmesi Kronik Hepatit Tanısında Yeterli mi? *VI. Ulusal Viral Hepatit Simpozyumu Program ve Kongre Kitabı*, Ankara, 2002: 46.
112. Otlu B, Çiçek A, Durmaz R, Temel İ. HBV DNA Konsantrasyonlarının HBeAg ve ALT Düzeyleriyle İlişkisi. 2. Ulusal Viroloji Kongresi Konferans ve Sunumlar ie Prevalansının Değerlendirilmesi. *2. Ulusal Viroloji Kongresi Konferans ve Sunumlar Kitabı*, Antalya, 2005: 270.
113. Köse Ş, Oğuz-Gülcü F, Topaloğlu S, İyi T. Hepatit B Virus (HBV) DNA Düzeyleri ile Serum Alanin Aminotransferaz Düzeyleri ve HBV Serolojik Göstergeleri Arasındaki İlişki. *Viral Hepatit Dergisi* 2011, 17(2): 57-6.
114. Peignoux MM, Boyer N, Colombat M, Akremi R, Pham BN, Ollivier S, Castelnau C, Valla D, Degott C, Marcellin P. Serum hepatitis B virus DNA levels and liver histology in inactive HBsAg carriers. *J Hepatol* 2002, 36(4): 543-6.

115. Poljak M, Marin IJ, Seme K, Brinovec V, Matiçić M, Volkar JM, Leynicar G. and Vince, A. Second-generation Hybrid capture test and Amplicor monitor test generate highly correlated hepatitis B virus DNA levels. *J Virol Methods* 2001, 97(1-2): 165-9.
116. Eroğlu C, Pekbay A, Esen Ş, Havuz S, Sünbül M, Günaydın M, Leblebicioğlu H. Hepatit B Virus DNA'sının Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ve Hibrit Yakalama Sistemi ile Belirlenmesi. *Viral Hepatit Dergisi*, 2001(3): 390-2.
117. Odaibo GN, Ola SO, Olaleye OD. Hepatitis B Virus DNA in Patients With HbsAg in South Western Nigeria. *J Med Virol* 2013, 85(2): 214-8.
118. Chen P, Yu C, Wu W, Wang J, Ruan B, Ren J, Yang S, Xu K, Yu L, Li L. Serological Profile Among HBsAg-Positive Infections in Southeast China: A Community-Based Study. *Hepat Mon* 2013, 13(1).
119. Hasan KN, Rumi MA, Hasanat MA, Azam MG, Ahmed S, Salam MA, Islam LN, Hassan MS. Chronic carriers of hepatitis B virus in Bangladesh: a comparative analysis of HBV DNA, HBeAg/anti-HBe, and liver function tests. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2002, 33(1): 110-7.
120. Üstün C, Başuguy E, Deveci U. Çocuk cerrahi polikliniğine başvuran hastalarda hepatit b ve hepatit c seroprevalansı. *Nobel Med* 2009, 5(S1): 4-9.
121. Çopur Çiçek A, Özkasap S, Dereci S, Şahin K, Ulusan Gündoğdu DZ, Dilek AR, Ertürk A. Rize İlinde Çocuk Hastalarda Hepatit A, B ve C Seroprevalansı. *Viral Hepat J* 2012, 18: 102-6.
122. Üner A, Kırımı E, Tuncer İ, Ceylan A, Türkoğlan MK, Abuhandan M. Seroepidemiology of hepatitis B virus infection in children in the Eastern Anatolia. *East J Med* 2001, 6: 40-2.
123. Arabacı F, Demirli H. Van'da 6-10 Yaş Grubu Çocuklarda Hepatit A ve B Seroprevalansı. *İnfeksiyon Dergisi* 2005, 19: 457-60.
124. Energin VM, Elmas Ş, Sert A. Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları polikliniğine başvuran çocuk hastalarda Hepatit B sıklığı. *Selçuk Tıp Dergisi* 2007, 24: 161-6.
125. Araz NÇ. Gaziantep Çocuk Hastanesi Pediatri Polikliniği'ne Başvuran Olgularda Hepatit B Belirliyecileri Sıklığı. *Gaziantep Tıp Dergisi* 2007: 1-3.
126. Şahin Y, Aydın D. 6 yaş ve altı çocuklarda Hepatit B seroprevalansı. *Fırat Tıp Dergisi* 2005, 10(4): 169-72.

127. Demiraslan H, Aksöz S, Çitil BE. Adıyaman'daki Öğrencilerde HBsAg ve Anti-HCV Seropozitifliği. *Viral Hepatit Dergisi* 2008, 13(3): 103-5.
128. İnci A, Okay M, Güven D. Artvin Devlet Hastanesi'ne Başvuran Hastalarda HBsAg, Anti-HBs, Anti-HCV ve Anti-HIV Seroprevalansı. *Viral Hepatit Dergisi* 2013, 19(1): 41-4.
129. Tunç N, Eraydın H, Çetinkaya E, Oduncu MK, Toy Ş. Siirt Devlet Hastanesi'ne Başvuran Hastalarda HBsAg, Anti-HBs, Anti-HCV ve Anti-HIV Seroprevalansı. *Viral Hepatit Dergisi* 2011, 17(1): 7-11.
130. Iraz M, Gültepe B, Doymaz MZ. Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi'ne Başvuran Hastalarda HBsAg, Anti-HBs ve Anti-HCV Seroprevalansı. *Viral Hepatit Dergisi* 2013, 19(3): 106-9.
131. Kansu A. Kronik B Hepatitine Yaklaşım ve Tedavi. *J Curr Pediatr* 2005: 3.
132. Sonsuz A. Kronik Hepatit B ve Delta. İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi etkinlikleri Sempozyum Dizisi, İstanbul, 2002: 67-78.