

**T.C.
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİMDALI**

**KAN DONÖRLERİNDE HEPATİT B VİRUS CORE
ANTİKORLARININ SAPTANMASI**

Dr. Hasan KESBİÇ

UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN

Doç. Dr. Selçuk KAYA

**Bu tez Süleyman Demirel Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından 1400-TU-07
proje numarası ile desteklenmiştir.**

2007- ISPARTA

KABUL ONAY

Tıp Fakültesi Dekanlığına,

Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanlığı çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından uzmanlık tezi olarak kabul edilmiştir.

Uzmanlık Tez Savunma Tarihi: 07/12/2007

Tez Danışmanı : Doç. Dr. Selçuk KAYA SDÜ

Üye : Doç. Dr. Buket CİCİOĞLU ARIDOĞAN SDÜ

Üye : Doç. Dr. Mustafa DEMİRCİ SDÜ

Üye : Doç. Dr. Ali Kudret ADILOĞLU SDÜ

Üye : Yrd. Doç. Dr. Emel SESLİ ÇETİN SDÜ

ONAY: Bu uzmanlık tezi, Fakülte Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Fakülte Yönetim Kurulu Kararıyla kabul edilmiştir.

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER	i
KISALTMALAR	ii
TABLO VE ŞEKİLLER	iii
TEŞEKKÜR	iv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Tarihçe	3
2.2. Sınıflandırma	3
2.3. Genom Yapısı	5
2.4. Replikasyon Stratejisi	7
2.5. Viral Proteinler: Antijenik ve Fonksiyonel Özellikler.....	9
2.6. Duyarlılık - Dirençlilik	13
2.7. HBV Genotipleri.....	13
2.8. İmmün Kaçış Mekanizmaları.....	14
2.9. HBV Mutantları	16
2.10. Epidemiyolojisi	34
2.11. Bulaşma Yolları	38
2.12. Hepatit B’de Klinik Bulgular ve Tanı.....	41
2.13. Gizli HBV İnfeksiyonu.....	49
2.14. Tanı ve Tedavide Kullanılan Testler ve Standardizasyon	52
2.15. Tedavi	53
3. MATERYAL VE METOD	55
4. BULGULAR	59
5. TARTIŞMA	60
6. ÖZET	66
7. SUMMARY	67
8. KAYNAKLAR	68

KISALTMALAR

Ab	: Antikor
ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
Ag	: Antijen
ALT	: Alanin aminotransferaz
AST	: Aspartat aminotransferaz
Anti-HBs	: Hepatit B yüzey antijenine karşı oluşan antikor
Anti-HBc	: Hepatit B core antijenine karşı oluşan antikor
Anti-HBe	: Hepatit B e antijenine karşı oluşan antikor
cccDNA	: Covalently-closed-circularDNA
CDC	: Center for Disease Control
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DR	: Direct Repeats
EIA	: Enzyme Immunoassay
GRE	: Glucocorticoid Responsive Element
ELISA	: Enzyme linked immunosorbent assay
HBsAg	: Hepatit B surface (yüzey) antijeni
HBcAg	: Hepatit B core antijeni
HBeAg	: Hepatit B e antijeni
HBV	: Hepatit B virusu
HCC	: Hepatocellular carcinoma
Ig G	: İmmünglobülin G
Ig M	: İmmünglobülin M
IFN	: Interferon
ORF	: Open reading frame
OD	: Optik dansite
PBMC	: Periferal blood mononükleer ceels
PCR	: Polymerase chain reaction
RNA	: Ribonükleik asit
SD	: Standart deviasyon

TABLO VE ŞEKİLLER

Tablo 1: Viral Hepatit B’de Tanı

Tablo 2: Viral Hepatit B’de Klinik – Serolojik Korelasyon

Tablo 3: Anti-HBc Total Pozitif Olan Donörlerde Anti-HBs, Anti-HBe Oranları

Tablo 4: Anti-HBs Pozitiflik-Negatiflik Durumuna Göre HBeAg ve Anti-HBe Pozitiflikleri

Şekil 1: HBV’nin Elektron Mikroskopta Görünümü

Şekil 2: HBV Partikül Yapısı

Şekil 3: Genom Yapısı

Şekil 4: Viral Hepatit B’de Klinik – Epidemiyolojik Korelasyon

Şekil 5: Viral Hepatit B’de Serolojik – Moleküler Tanı

Şekil 6: Akut HBV Enfeksiyonunda Serolojik Profil

Şekil 7: Akut HBV Enfeksiyonunda İyileşmenin Serolojik Seyri

Şekil 8: HBV Enfeksiyonunda Kronik Progresyon

TEŞEKKÜR

Asistanlık sürem içerisinde bana her konuda destek olan Sayın Hocam Doç. Dr. Buket CİCİOĞLU ARIDOĞAN'a saygı, sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Anlayış ve desteğini esirgemeyen değerli hocam Doç. Dr. Mustafa DEMİRCİ'ye teşekkür ederim.

Tez çalışmamda büyük katkıları olan Değerli Hocam;

Doç. Dr. Selçuk KAYA'ya sonsuz minnet ve teşekkürlerimi sunarım.

Kimi zaman kardeş, kimi zaman arkadaş olan, Değerli Hocalarım; Doç. Dr. Ali Kudret ADİLOĞLU, Yrd. Doç. Dr. Emel SESLİ ÇETİN'e, Asistan Arkadaşlarıma, laboratuvarımızda beraber uyum içinde çalıştığımız sevgi dolu Teknisyen Arkadaşlarıma, iş yükümüze ortak olan değerli personelimize ve kan bankası çalışanlarına teşekkür ederim.

1. GİRİŞ

Hepatit B virusu (HBV) tüm dünyada önemli bir sağlık sorunu olan akut ve kronik B hepatiti hastalığının etkenidir. Parenteral yol, cinsel temas ve vertikal yolla bulaşır. Enfeksiyonun tanısında serumdaki göstergeleri yardımcı olur. HBV'nin aktif replikasyon göstergeleri HBsAg, HBeAg ve HBV-DNA'dır.

HBsAg akut hastalık süresince serumda pozitif saptanır. İyileşme ile birlikte ortadan kalkan HBsAg'in 6 aydan uzun süre pozitif saptanması taşıyıcılığı gösterir. HBeAg hem akut, hem de kronik hepatitlerde infektiviteyi gösterir. HBeAg varlığı ile HBV-DNA arasında kuvvetli ilişki bulunur.

HBsAg'in serumda tesbit edilemediği, anti-HBs'nin pozitifleşmediği dönemde (pencere periyodu); serumda sadece anti-HBcIgM pozitifliği ile hastalık tanınabilir. HBV enfeksiyonunun iyileşmesi, HBsAg'nin kaybolması ile birlikte HBV-DNA'nın negatifleşmesi olarak tanımlanır. Bununla birlikte spontan veya tedavi ile HBsAg'i kaybolan bazı hastalarda serum ve/veya karaciğerde hassas PCR teknikleri ile düşük düzeyde HBV-DNA varlığı gösterilmiştir. Böylece saptanamayan HBsAg ile birlikte kronik HBV enfeksiyonunu tanımlayan bu yeni durum okült; sessiz veya latent HBV enfeksiyonu olarak adlandırılmaktadır. Okült HBV enfeksiyonluların bir kısmında anti-HBc ve/veya anti-HBs pozitifdir. Hastaların önemli bir kısmında her ikisi de negatiftir.

HBV enfeksiyonunda tipik olarak HBsAg klirensini, anti-HBs oluşumu ve anti-HBc birlikteliği izler. Anti-HBs kaybolursa geçirilmiş enfeksiyona ait tek belirti olarak anti-HBc kalır. Okült HBV enfeksiyonu genellikle anti-HBc pozitifliği ile birlikte, nadiren sadece anti-HBs pozitifliği de olabilir. Okült HBV enfeksiyonu, akut B hepatiti iyileşmesini izleyerek görülebildiği gibi siroz veya kronik hepatitli hastalarda spontan ya da antiviral tedavi ile HBsAg seroklirensi sonrasında da oluşabilir.

Rutin yapılan HBsAg taramaları ile bulaşma riski düşük olmasına rağmen, hala transfüzyon ile HBV enfeksiyonu bulaşma riski bulunmaktadır. Okült HBV enfeksiyonunun buna katkısı vardır.

Organ nakilleri sırasında, vericideki okült HBV enfeksiyonu, alıcıya HBV enfeksiyonunu bulaştırabilir. Vericilerden okült HBV enfeksiyonu alma riski %25-%94 arasında değişmektedir.

Kan bankaları donör kabulünde asemptomatik gönüllülerde HBsAg testi uygulamaktadır. Asemptomatik gönüllülerden HBsAg negatif tesbit edilenler sağlıklı donör olarak kabul edilmektedir. Ancak HBsAg negatif olan bir kişi virusla karşılaşmış olabilir. Çünkü şahıs HBV ile enfekte olduğu halde serumda HBsAg tesbit edilemeyebilir. Yani şahıs pencere periyodunda olabilir. Bu durumda serumda sadece anti-HBcIgM tesbit edilebilir. Bir diğer durum 'Gizli Hepatit' olması ihtimalidir. Gizli Hepatit durumunda da HBsAg negatif bulunabileceğinden anti-HBc ve HBV-DNA testleri yapılmadan bu durum atlanabilir. Kan bankalarında anti-HBcAb araştırılması rutin olmadığından gizli hepatitli veya pencere periyodundaki bazı vakalar tesbit edilemeyebilir. Bu durum transfüzyon yoluyla hepatit bulaştırılmasına yol açabilir. B hepatitinin uzun dönem sonuçları ve toplumsal boyutu düşünüldüğünde bu durumun ne kadar önemli olduğu anlaşılabilir.

Bu çalışmada, kan donörlerinde anti-HBc pozitifliği araştırılarak hepatit B virus ile karşılaşma oranları ile HBsAg negatif pencere dönemindeki izole anti-HBc pozitif donörlerin belirlenmesi amaçlanmıştır. Ayrıca izole anti-HBc pozitif ve pencere dönemindeki donörlerin HBV bulaştırıcılığının olup olmadığı araştırılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

Hepatit B Virusu (HBV), uzun kuluçka süreli hepatit, serum hepatiti, MS-2 hepatiti ve viral hepatit B diye isimlendirilen infeksiyon hastalığının etkenidir.

2.1. Tarihçe

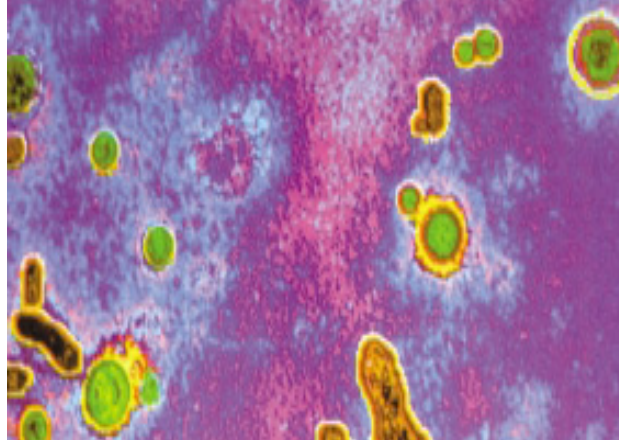
Direkt kan ve kan ürünleri ile bulaşan hepatit formu ilk kez 1883 yılında Lurman tarafından tanımlanmıştır. Bremen'de çiçek aşısı yapılan 1.289 tersane işçisinin 191'inde aşı uygulamasından sonra, bir kaç hafta ile 8 ay arasındaki süre içinde sarılık ortaya çıktığı saptanmış, aşılanmamış kişiler ise sağlıklı kalmışlardır (1, 2).

Gönüllü mahkumlar üzerinde 1930'lu yıllarda yapılan çalışmalar; infeksiyöz hepatit ve serum hepatiti etkenlerinin günümüzde herkes tarafından iyi bilinen bazı özellikleri hakkında önemli bilgiler kazandırmıştır (3). Krugman ve ark. 1950'li yılların sonu ile 1960'lı yılların ilk yarısında, New York'daki Willowbroke State School'da eğitim gören özürü çocuklar üzerinde yürüttüğü çalışmalar sonucunda; epidemiyolojik, klinik ve immünolojik olarak birbirinden tamamen farklı iki ayrı hepatit virusunun varlığını doğrulamışlardır (4).

1965 yılında Blumberg ve arkadaşları Avustralyalı bir yerlinin serumunda, çok sayıda kan transfüzyonu yapılmış bir hastanın serumu ile agar jelde presipitasyon veren bir antijen bulunduğunu göstermişler ve günümüzde “hepatit B yüzey antijeni-HBsAg” olarak bilinen bu proteine “Avustralya antijeni-Au antijeni” adını vermişlerdir. Dane ve arkadaşları 1970'de ,”Dane partikülü”nü tanımlamışlardır (3).

2.2. Sınıflandırma

Hepadnaviridae ailesinin: orthohepadnavirus (HBV, WHV, GSHV) kanatlı viruslarının bulunduğu avihepadnavirus (DHBV) olmak üzere iki cins altında sınıflandırılması önerilmektedir (5).



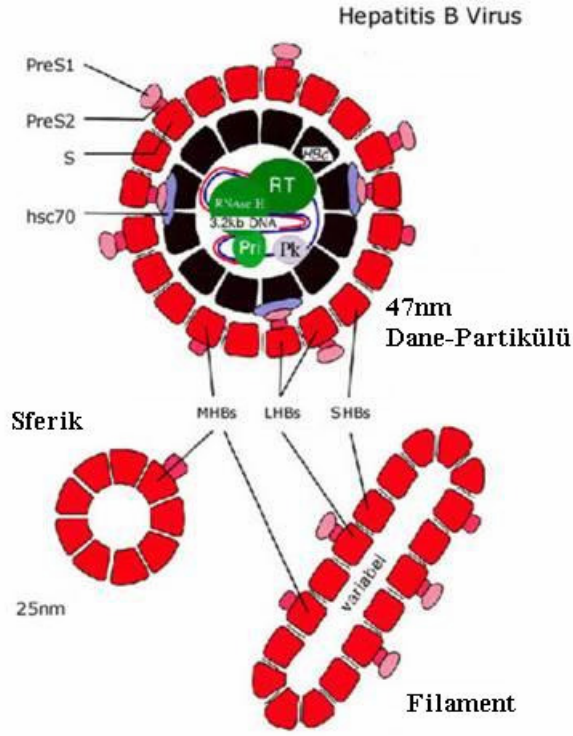
Şekil 1: HBV'nin Elektron Mikroskopta Görünümü

Hepatit B Virusu

HBV, Hepadnaviridae ailesinin orthohepadnavirus cinsinde yer alan hepatotropik, zarflı ve kısmen çift sarmallı bir DNA virusudur. Sadece 3200 nükleotidden oluşan genomik yapısı nedeniyle, bilinen tüm hayvan DNA virusları içinde en küçük olanıdır. Hepadnaviridae ailesinin üyeleri içinde insanlarda infeksiyon oluşturan tek tür HBV'dur. İnfekte hücrelerde birden fazla sayıda partikül tipi oluşumuna yol açması nedeniyle diğer hayvan viruslarından farklı bir yere sahip olan HBV'nun, kısmen saflaştırılmış preparasyonları elektron mikroskobunda incelenecek olur ise; büyüklük, yapı ve miktar gibi değişik özellikleri bakımından birbirine benzemeyen üç tip partiküle rastlanır.

- a) Yaklaşık 42 nm. (42-47 nm.) çapında, infeksiyöz özellikte, tam bir viryon yapısında, küresel şekilli, Dane partikülleri,
- b) Yaklaşık 22 nm. (16-25 nm.) çapında, içinde nükleik asit bulunmayan, non-infeksiyöz, küresel partiküller,
- c) Özellikle replikasyonun söz konusu olduğu kişilerin serumunda bulunan 22 nm. çapında, 50-500 nm uzunluğunda nükleik asit ihtiva etmeyen, non-infeksiyöz: tübüler partiküller,

Her üç form da infekte konak serumunda yüksek miktarda (200-500mg/ml) saptanabilen ve HBsAg adı verilen ortak yüzey antijenine sahip olup immunojeniktir. HBs antikorları ile reaksiyon verirler (2, 5, 7, 8).



Şekil 2: HBV Partikül Yapısı

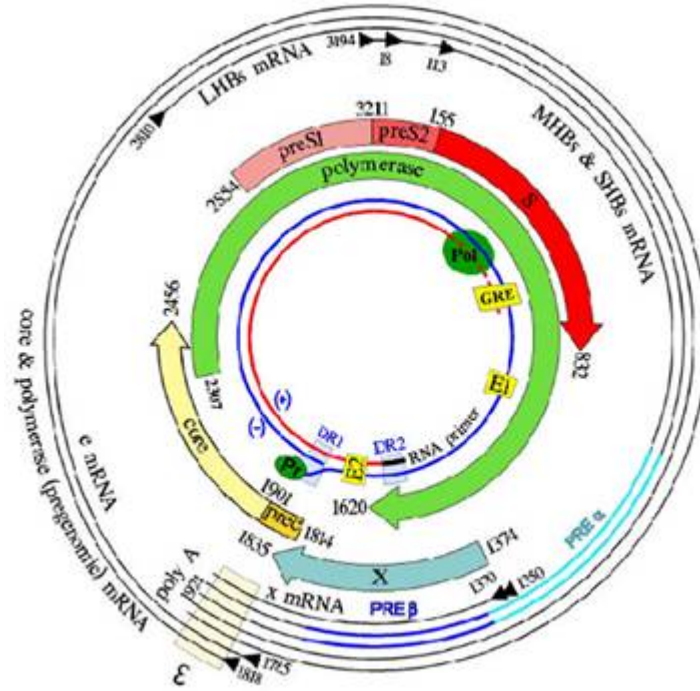
2.3. Genom Yapısı

HBV, kısmen çift sarmallı, sirküler bir DNA molekülü taşır. DNA'nın mol. ağırlığı 2.3×10^6 dalton, G+C oranı ise yaklaşık %49'dur. HBV-DNA; 3200 nükleotid taşıyan uzun (L veya negatif) ve 1800-2700 nükleotid içeren kısa (S veya pozitif) zincir olmak üzere iki sarmaldan meydana gelmiştir. Bu zincirler ortak baz çiftlerine sahip olup, sirküler bir yapı halinde bulunmakla beraber herbirinin 3' ve 5' uçları birleşik olmadığından aslında lineer moleküllerdir. İki sarmal arasında değişik uzunlukta tek sarmallı bir bölge vardır. Negatif zincirin 5' ucunda, sentez sırasında "primer" olarak görev yapan terminal bir protein bulunurken; pozitif zincirin 5' ucunda aynı işlevi yerine getiren bir RNA oligomeri yer alır. Negatif sarmalın 3' ucu ise 9-10 nükleotidlik artık uç (terminal redundancy) ile sonlanır. Bu alan viral replikasyon sırasında pozitif DNA sarmalının sentezindeki kısa zincirin tamamlanmasında ve sonuçta süper kıvrımlı, tamamen çift sarmallı, çember şeklindeki DNA molekülünün oluşumunda rol oynar (1, 6, 10).

Viral DNA'nın yapısal bütünlüğü her iki zincirin 5' uçlarında bulunan koheziv bölgelerden birbirlerine tutunmaları ile sağlanır. Bu bölgeler 10-12 nükleotidlik

yinelenen dizinlerden meydana gelmiş sabit bölgeler olup, DR (direct repeats) olarak adlandırılırlar. HBV'nda iki adet DR vardır. Uzun zincirin 5'ucu 1826. nükleotidde DR1 içinde, kısa olanın 5'ucu ise 1592. nükleotidde DR2 içinde yer alır. DR2 uzun zincirin 3'ucuna yakın bir yerde bulunur (5, 7).

HBV'nda genetik bilginin tamamı uzun sarmal üzerinde kodlanmış olup bu sarmal S, C, X ve P kısaltmaları ile gösterilen dört değişik protein kodlayan nükleik asit dizisi (open reading frame: ORF)'ne sahiptir. ORF'lerin transkripsiyonu promoter (prom=başlatıcı) ve enhancer (enh= güçlendirici) denilen düzenleyici dizinler tarafından kontrol edilmektedir. HBV genomunda fonksiyonel olarak tanımlanmış en az 4 promoter (pre-S1 prom, S prom, X prom ve pre-C prom) ve 2 enhancer (Enh 1 ve Enh 2) bölgesi bulunmaktadır. Ayrıca S geni içinde yer alan ve Enh 1 ile bağlantılı olarak glukokortikoid varlığında gen ekspresyonunu yaklaşık 5 kat kadar arttıran bir elemanın (GRE: glucocorticoid responsive element) varlığı da tanımlanmıştır (9, 10).



Şekil 3: Genom Yapısı

HBV-DNA'daki genler, arka arkaya dizilmiş ve birbirinden tamamen ayrı bölgelerde bulunmazlar, aksine bazı bölgelerde içiçe girmiş, diğer bir deyişle birbirleriyle çakışmış durumdadırlar. Örneğin genomun en uzun geni olan P geni; X ve C genleri ile kısmen, S geni ile tamamen çakışmış halde bulunmakta, sonuç olarak uzun

sarmal 1.5 defa okunmaktadır. Bu özellik nedeni ile HBV, bilinen hayvan virusları içinde en küçük genomik yapıya sahip olmakla birlikte, kendini kodlama kapasitesi en fazla olan virustur (1, 2, 5).

Gen organizasyonundan yukarıda kısaca bahsedilen uzun sarmaldaki, S geni yüzey proteinlerini, C geni kapsid proteinlerini, X geni X proteinini ve P geni de DNA polimerazı kodlamaktadır. Ancak başlangıç kodonları farklı olduğu için S geni üzerinde pre-S1, pre-S2 ve S olmak üzere üç, C geni üzerinde ise pre-C ve C olmak üzere iki bölge bulunmakta; dolayısıyla farklı başlangıç kodonlarından sentezlenen proteinler de farklı olmaktadır. Bu nedenle 4 adet ORF'e sahip olmasına rağmen HBV tarafından yedi değişik polipeptid üretilmektedir (10, 11, 12).

2.4. Replikasyon Stratejisi

HBV'nun konak hücreye bağlanmasında rol oynadığı düşünülen fibronektin, transferrin reseptörü, apolipoprotein H, polimerize insan serum albumini, pre-S2 glikan, HBV bağlayan faktör gibi birçok reseptör adayları tanımlanmıştır (13-15). Son yıllarda, her ne kadar, S proteinine özgü bazı reseptörlerin (endonexin II, siyaloglikoprotein, gibi) varlığı gösterilmiş olsa da, HBV'nin hepatositlere tutunmasında L ve M proteinlerinin de önemli olduğu saptanmıştır. In vitro olarak pre-S1 ve pre-S2'de karaciğere spesifik tutunma bölgeleri tanımlanmıştır (5, 7).

Hepadnavirusların replikasyonu ile ilgili bilgilerin çoğu hayvan modelleri üzerinde yürütülen çalışmalar sonucunda elde edilmiş olup, viral replikasyonda üç önemli özellik vardır (12):

1- DNA sarmallarının sentezi sırasında negatif iplikçiğin sentezi pozitif iplikçiğin sentezinden önce tamamlanmalıdır.

2- Viral polimeraz aynı zamanda, reverstranskriptaz olarak fonksiyon görür.

3- Negatif iplikçiğin sentezinde 5' ucuna kovalen olarak bağlı terminal protein "prime" edilirken, pozitif iplikçiğin priming'i viral genomik RNA'dan derive olan bir oligoribonükleotiddir.

Hepatosite bağlanan virusun konak hücre çekirdeğine nasıl ulaştığı tam olarak aydınlatılamamıştır. HBV muhtemelen reseptöre bağımlı endositoz yoluyla hücre içine girmekte, viral DNA ile nükleokapsid viriondan ayrılmakta ve işlenmeden konak hücre çekirdeğine taşınmaktadır.

Kısmen çift sarmallı ve her iki ucu serbest halde bulunan DNA'nın kısa sarmalının eksik olan bölümü endojen DNA polimeraz tarafından tamamlanır. Bu sırada uzun sarmalın 5' ve 3' uçları arasındaki açıklık da onarılmış ve sonuçta tümüyle çift sarmallı süper kıvrımlı, uçları kapalı sirküler yapıda bir HBV-DNA (cccDNA) meydana gelir. Replikasyonun normal seyri sırasında HBV-DNA'nın konak genomuna integrasyonu görülmez. HBV ile infekte bazı kişilerin serumunda nadir olarak HBcAg'nin varlığı gösterilmiş olsa da, bu antijen viral replikasyon sırasında konak hücre çekirdeğinde sıklıkla tespit edilebilmektedir. Bu nedenle HBcAg'nin nukleusa girmesinin cccDNA'nın ortaya çıkmasından önce olduğu tahmin edilmektedir (7,12,13).

Kalıp olarak cccDNA'dan konak hücre RNA polimerazının (RNA polymerase II) yardımı ve viral düzenleyicilerin (4 adet promoter; 2 adet enhancer) etkisiyle viral RNA'lar sentezlenir. HBV-RNA'ların hepsinin 3' uçları aynı nükleotidde (1934. nükleotid)'dir. Bunlar C genine ait ORF'den gelen sinyalin özelliğine göre ya mRNA, ya da pregenom görevi yaparlar.

HBV'nda fonksiyonu bilinen 4 mRNA transkripti tanımlanmıştır. Genomdan daha uzun olan 3.5 kb'lık kalıp, viral replikasyondan ve pre-C/C ile polimeraz proteinlerinin ekspresyonundan sorumludur. 2.4 kb'lık transkript Pre-S1, pre-S2 ve HBs Ag'ni kodlarken 2.1 kb'lık olanı pre-S1 haricindeki yüzey proteinlerini kodlamaktadır. En küçük (0.7 kb) transkript ise X proteininden sorumludur. Translasyon sırasında oluşan pregenom, kor partikülü içine yerleşir. Konak hücre sitoplazmasında devam eden replikasyon boyunca 3.5 kb lık RNA (+ RNA) dan (-) DNA sarmalı sentezlenir (12).

Negatif iplikçiğin sentez işlemi; DR1'in 3' ucundaki terminal proteinin bulunduğu yerden başlar. Sentez ilerledikçe RNA otomatik olarak RNase H etkisiyle tahrip edilir. Kısa zincirin sentezinde kalıp olarak uzun sarmal kullanılır. Sentez DR2'nin 3' ucundan başlar ve uzun zincirin 5' ucundaki terminal protein geçilinceye kadar devam eder. Genomun sirkülasyonu (-) iplikçiğin 3' ucundaki 9-10 nükleotidlik terminal artık sayesinde olur. Kısmen çift sarmallı sirküler yapıdaki kor kısmının kılıf proteinleri tarafından çevrelenmesi ve aynı zamanda polimerazın da tükenmesi nedeniyle kısa zincirin sentezi tamamlanamaz ve bu sarmal eksik kalır (7, 10, 13).

HBs proteinleri, endoplazmik retikulumda öncelikle transmembran proteinleri olarak sentezlenir. Oligomerizasyon, molekül içi ve moleküller arası disülfid

köprülerinin oluşmasıyla olgunlaşır ve tomurcuklanma sırasında membran lipidleri ile birlikte kor partiküllerini çevreleyip hücre dışına çıkarlar. Transgenik farelerde ve hücre kültürleri üzerinde yürütülen çalışmalarda pre-S1'in hücre içinde birikmesinin HBsAg sekresyonunu inhibe ettiği gözlenmiştir. Ancak pre-S1/HBs Ag oranının HBsAg'nin dışarı atılımındaki rolü kesin olarak bilinmemektedir. HBs Ag cccDNA formasyonunu inhibe ettiğinden bunun HBV replikasyonunda negatif feedback mekanizması olduğu kabul edilir (5, 6, 7).

2.5. Viral Proteinler: Antijenik ve Fonksiyonel Özellikler

Kılıf (Yüzey) Proteinleri

HBV-S geni tarafından kodlanan kılıf (yüzey) proteinleri (HBs), hem Dane partiküllerinin yüzeyinde, hem de infekte hastaların karaciğer ve serumlarında saptanan 22nm çapındaki eksik (küresel ve tübüler) viral partiküllerin yapısında bulunmaktadır. Aslında tek bir gen tarafından kodlanan bu proteinlerdeki farklılıklar sentezin aynı gen üzerindeki farklı başlangıç kodonlarından başlaması nedeniyle olmaktadır. 2850 ile 3174. nükleotidler arasında yer alan pre-S1 gen bölgesi 108 aminoasitten oluşan polipeptidi sentezlerken, 3174-157. nükleotidler arasında bulunan pre-S2 bölgesi 55 aminoasitlik bir protein molekülünü, 157-833. nükleotidler arasındaki S bölgesi ise 226 aminoasitten oluşan polipeptid sentezini gerçekleştirmektedir. Her üç bölgenin başlangıç kodonları farklı olmakla beraber ortak 3' ucuna sahip olduklarından, sentez hangi kodondan başlarsa başlasın aynı 3' ucunda sonlanmakta ve üç değişik protein molekülü sezlenmektedir (6, 11).

a-Okuma işlemi gen üzerindeki ilk kodondan başlarsa pre-S1+pre-S2+S bölgelerinin tümü okunacağından kılıfın büyük proteini (L proteini: LHBs) sentezlenir. Bu protein 39 kDa molekül ağırlığında 389 aminoasitten (bazen 400 aminoaside kadar uzar) oluşmuş bir polipeptid olup, glikolize edilmiş formu 42 kDa ağırlığındadır ve sırasıyla p39^S, gp42^S şeklinde gösterilir. LHBs en fazla Dane partiküllerinin yüzeyinde bulunur. Tübüler partiküllerin kılıfında da orta miktarda L proteinine rastlanır ama küçük küresel partiküllerdeki miktarı çok azdır (7, 12).

b-Okuma işlemi S geni üzerindeki ikinci kodondan başlarsa bu kez pre-S2+S bölgelerin ürünü olan orta protein (M proteini: MHBs) sentezlenir. Bu protein 33 kDa molekül ağırlığında 281 aminoasitten oluşmuş bir polipeptid (p33^S) olup, hemen daima

bir ya da iki bölgesinden glikolize edilmiş haldedir. Glikolize formu 36 kDa ağırlığındadır ve gp36^S şeklinde gösterilir. M proteininin 133-139. aminoasitleri arasındaki bölge gruba özgü, 137-143. aminoasitleri arasındaki bölge ise tipe özgü epitoplara olarak tanımlanmıştır (12).

c- Okuma işlemi sadece S bölgesini içerir ise kılıfın küçük proteini (S proteini: SHBs) sentezlenir. Bu protein 24 kDa molekül ağırlığında 226 aminoasitten oluşmuş bir peptid olup glikolize edilmiş formu 27 kDa ağırlığındadır. Sırasıyla p24^S ve gp27^S şeklinde gösterilir. HBsAg'nin büyük kısmını oluşturan SHBs kılıfın major proteini olarak bilinir ve B lenfositleri için epitopik bölgeye sahiptir (5, 13).

SHBs'yi oluşturan aminoasitlerin belli bölgelerdeki diziliş farklılıklarına göre HBsAg üzerinde en az 5 antijenik determinant (a, d/y ve w/r) bulunduğu saptanmıştır. Bütün subtiplerde ortak olarak yer alan gruba özgül "a" determinanti; 124-147. aminoasitler arasındaki hidrofilik bir bölgedir. Konvalesan serumdaki antikor bağlayan aktivitenin %80'i bu bölgede olup "a" determinantına karşı oluşan antikorlar HBV'nun hepatositlere bağlanmasını engeller ve tüm subtiplere karşı etkili bir bağışıklık sağlar. SHBs üzerindeki bu bölge; yapısında yer alan 7 adet sistein arasındaki intramoleküler disülfid köprülerince oluşturulan ve 124 ile 147. aminoasitleri çevreleyen iki ilmik sayesinde oldukça iyi bir şekilde korunmuştur. Viryonun dış yüzünde bulunan "a" determinanti; aşı veya doğal infeksiyon sonrası oluşan anti-HBs'lerin büyük kısmını bağlama özelliğine sahiptir (15).

Pepsin ile muamele edilerek pre-S1 ve pre-S2 gen ürünleri uzaklaştırılan; sonuçta içinde sadece S proteinleri bulunan HBsAg'den derive edilmiş plasma aşılı ile yapılan çalışmalar (maya mantarlarından üretilen ve içinde yalnız S kodu sekanslarını içeren aşılarda olduğu gibi), HBV'na karşı oldukça etkili bir bağışıklık oluştuğunu göstermiştir. S determinantına karşı gelişen humoral immün cevabın HBV'ndan korunmada etkili olması ve tüm HBsAg preparasyonlarında "a" determinantının bulunması, farklı veya benzer subtiplerle oluşan reinfeksiyonlardan korunmanın "a" determinantına karşı gelişen cevap ile olduğunu göstermektedir (16).

HBsAg'nin diğer iki determinanti d/y ve w/r'dir. SHBs'nin aminoasit 122 pozisyonunda lizin varsa "d", arginin varsa "y" determinanti oluşmakta; aminoasit 160 pozisyonundaki arginin "r" determinantını meydana getirirken, lizin "w" subtipinin

tanımlanmasına yol açmaktadır. Ancak “w” antijenik heterojenite gösterir. Tüm “w” determinantlarında lizin bulunmakla birlikte pozisyon 127’deki aminoasite göre 4 farklı “w” subtipi saptanmıştır. Bu determinantların kombinasyonları 4 subtip (adw, ard, ayw, ayr) halinde bulunur (6, 15, 17).

Kor Proteinleri

HBV genomu C geninde bir ORF bulunmasına rağmen, gen üzerinde okuma işleminin başladığı iki farklı kodon (nükleotid 1816 ve nükleotid 1903) yer alır. Bu nedenle pre-C ve C olmak üzere iki bölgeye ayrılan C geni, antijenik özellikleri farklı iki değişik protein (HBeAg ve HBcAg) sentezleme kabiliyetine sahiptir (5, 6).

HBeAg ile HBcAg ortak determinantlar içerir. Kanda dolaşan HBeAg spesifik olarak serum albumini, immunglobulin ve α -antitripsine bağlanma özelliğine sahip olduğundan yapısındaki HBcAg ile ilgili determinantlar maskelenir ve özgül olarak anti-HBe'ye bağlanabilirken, anti-HBc ile reaksiyona girmez. Ayrıca HBcAg'nin antikor bağlama özelliği bu antijenin yapısını oluşturan proteinin bütünlüğü ve konformasyonuna bağlıdır. p23^C kor partiküllerinde toplandığı zaman HBeAg determinantları maskelenmektedir. HBcAg, viral DNA'ya sıkıca bağlı bir molekül olduğundan anti-HBc ile reaksiyona girebilmesi ancak kor partiküllerinin parçalanması ve serbest polipeptid zincirlerinin açığa çıkması ile mümkün olabilmektedir. HBV ile infekte hasta serumlarında HBsAg ve HBcAg' den farklı özelliklere sahip, solubl bir antijen olarak tanımlanan HBeAg'nin fonksiyonu henüz tam olarak bilinmemektedir. In vitro araştırmalar sonucunda; HBeAg'nin viral replikasyon için gerekli olmadığı ispatlanmıştır (5, 11, 12).

HBeAg ekstrasellüler ortama (serum) sekrete edildiği halde, HBcAg için böyle bir durum söz konusu değildir. Bu nedenle dolaşımda serbest halde HBcAg'ne rastlanmaz. Kanda sadece Dane partiküllerinin içinde bulunur. Serum defalarca dondurulup, çözülür veya lipid eriticiler ile muamele edilir ise viryonlar parçalanır ve HBcAg serbestleşir (8, 13). Doğal infeksiyonun seyri sırasında, timusa bağımsız antijen özelliği gösteren HBcAg'ne karşı yüksek titrelerde antikor cevabı gelişmesi bu antijenin çok kısa bir süre de olsa, serumda serbest halde bulunduğunu düşündürmüştü, Chermello ve ark. (18) bu durumu kanıtlamışlardır. Ancak HBcAg'i ile anti-HBc süratle birleşip, kompleks oluşturduğundan serolojik tanıda HBcAg'nin saptanmaya çalışılması uygun değildir.

HBeAg ve HBcAg oldukça immünojendir. HBcAg'nin immunojenitesi HBsAg'den fazladır ve T hücre-bağımsız antijen özelliği gösterir. HBV ile infekte hastaların hemen tamamında gerek HBeAg gerekse HBcAg'ne karşı hem hücrenel hem de humoral cevap gelişir.

HBcAg'ne özgül T hücreleri; HBsAg humoral cevabını başlatabilir ya da bu yanıtta fonksiyonel yardım sağlayabilir. Böylece genetik kaynaklı S epitop cevapsızlığının üstesinden gelinmesine yardım eder. Bu nedenlerle S antijen aşılarna HBcAg eklenmesinin insanlardaki etkinliği arttırabileceği ve S antijenine cevapsızlığın söz konusu olduğu bireylerde antikor yanıtı geliştirebileceği düşünülmektedir (39,40). Ancak anti-HBs'nin tersine HBcAg'ne karşı oluşan antikorlar koruyucu değildir. Erken beliren ve uzun süre kalıcı özelliği olan anti-HBc antikorları, HBV enfeksiyonu geçiren sağlıklı bireyler yanında persistan HBV enfeksiyonlu hasta serumlarında da bulunur. Anti-HBc IgM akut dönemde; HBsAg'nin kaybolup anti-HBs'nin henüz belirmediği dönemde (window period) pozitifleşir. Fakat bu antikorumun tek başına akut enfeksiyonun göstergesi olarak algılanması yanlıştır. Çünkü bazı HBsAg taşıyıcıları ile çoğu kronik hepatitli hastada düşük titrelerde de olsa bu antikorlara rastlanır. Dolayısıyla anti HBc IgM'nin pozitifliğinden çok, negatif bulunması daha değerlidir (11, 13, 19).

P proteini

P geni, HBV genomunun yaklaşık 3/4'ünü kaplayan en uzun gendir. P proteini; revers transkriptaz, endonükleaz (RNase H) ve hem DNA, hem de RNA'ya bağımlı polimeraz aktivitesine sahiptir. Genetik analizler sonucunda aminoterminal uçtan karboksiterminal uca doğru düzenlenmiş değişik fonksiyonel domain'ler tanımlanmıştır(5, 20).

a. Terminal protein; negatif DNA sarmalının sentezlenmesinde RNA pregenomunun revers transkripsiyonu için "primer" olarak hizmet verir.

b. Spacer bölge; bu bölgenin enzim aktivitesi üzerine direkt etkisi yoktur, çıkarılması durumunda aktivite kaybı olmaz.

c. DNA polimeraz / revers transkriptaz aktivitesi,

d. RNase H aktivitesi; RNA pregenomunun sindirilip yok edilmesinde endonükleaz görevi üstlenir.

P proteininin immunojen özelliği vardır. Hasta serumunda bulunan anti-DNA polimeraz antikorları, sentetik peptid antijenleri ile gösterilebilmektedir (13).

X proteini

X geni, HBV genomunda 1376 ile 1838. nükleotidler arasında yer alan en küçük gen bölgesidir. X geni, transkripsiyonel transaktivatörler olarak görev yapan iki protein sentezler. Bu gen tarafından sentezlenen HBxAg, 154 aminoasitten meydana gelmiş, 16 kDa molekül ağırlığında, küçük, bazik bir proteindir. Viral siklus ve HBV patobiyolojisinde bu proteininin fonksiyonu (veya fonksiyonları) henüz tam olarak aydınlatılamamıştır (5, 7, 21).

HBxAg'nin HBV transkripsiyonunu da aktive ettiği gösterilmiştir. Ancak invitro çalışmalar bu proteinin gen ekspresyonu veya HBV replikasyonu için mutlaka gerekli olmadığını ortaya koymuştur (22, 23).

2.6. Duyarlılık - Dirençlilik

HBV, serum içinde 30-32°C'de 6 ay, -20°C'de ise yıllarca canlılığını korur. Kurutulmuş virus 25°C'de saklandığında bir hafta süreyle canlılığını devam ettirir. Kuru sıcak hava ile 180°C'de 1 saatte, otoklavda 121°C'de 15 dakikada, kaynatma ile 10-20 dakikada inaktive olur. Kimyasal ajanlardan; %0.1-%0.2 glutaraldehit, %0.5-%1'lik sodyum hipoklorid (veya 500 ppm serbest klor) izopropil veya etil alkol virusu inaktive eder. HBsAg içeren kan, plazma ve diğer kan ürünlerinin ultraviyole ışınlarına tabii tutulmasının infektivite ve antijenik yapı üzerine etkisi yoktur. İnfekte plazmanın Cohn etanol fraksiyonu sırasında elde edilen ürünlerde değişik oranlarda HBV bulunur. Fraksiyon I (=faktör VIII-fibrinojen) ve fraksiyon III'de (=protrombin) virus, buna karşılık fraksiyon II (=gamaglobulin) ve fraksiyon IV'de (=plazma proteini) çok miktarda HBsAg görülür (7, 8, 9).

2.7. HBV Genotipleri

Moleküler düzeyde yapılan çalışmalar sonucunda; HBV genomları arasında farklılıklar olduğu saptanmış ve birbirlerine benzerlik oranı %92 ve daha fazla olan HBV suşları aynı grupta toplanarak 6 farklı genotip belirlenmiştir. Bu genotipler ile HBsAg subtipleri arasındaki ilişkilerin saptanması amacıyla genom sekansları ile S geni sekansları karşılaştırılmış; S geni düzeyinde genotip farklılık sınırı %4 olarak tespit edilmiş ve genotip-subtip dağılımı yapılmıştır (7).

HBV taşıyıcılık oranları dünyanın değişik bölgelerinde önemli farklılıklar gösterir. Bu bir ölçüde genetik dağılım farklılığı ile paraleldir. HBV prevalansının düşük olduğu Kuzeybatı Avrupa ve A.B.D.'deki persistan taşıyıcılar arasında genotip A baskındır. Şu ana kadar HBV suşlarıyla ilgili sınırlı genetik bilginin elde edilebildiği Amazon bölgesi ve Peru gibi yüksek HBV prevalansına sahip ülkelerde ise genotip F'nin sık olduğu tespit edilmiştir. HBV bulaşında vertikal geçişin ilk sırada olduğu Doğu Asya ülkelerinde genotip B ve C'nin prevalansı yüksektir. Bu durum kısmen, vertikal geçişten sorumlu olan HBeAg pozitif (replikatif) dönemin daha uzun oluşu ile açıklanır. Vertikal geçişle infekte olan çocuklarda kronikleşme oranı yaklaşık %80'dir. Bu nedenle hepatit B'nin endemik olduğu bölgelerde, yüksek taşıyıcılık oranının devamında en önemli mekanizmanın vertikal geçiş olduğu kabul edilmektedir. Bunun aksine genotip A ve D'nin dominant olduğu Akdeniz ve Sahra-altı Afrika ülkelerinde horizontal geçiş daha önemlidir (17, 24).

2.8. İmmün Kaçış Mekanizmaları

Gerek konağa gerekse virusa ait bazı özellikler HBV'nun immün tanınmasını engelleyebilmektedir. HBV, reverse transcriptase enzimine sahip olduğu için intrasellüler evrimi sırasında kendi DNA'sını konak hücre genomuna integre etmekte ve bu sayede bağışık yanıtın ortaya çıkması ile ilgili süreçte görünmez hale gelmektedir. Prekor/kor geninde mutasyonlar meydana getirerek immün yanıt için anahtar hedeflerden biri olan HBeAg ekspresyonunda kayba yol açarak saklanabilmektedir (25). HBV, başta karaciğer olmak üzere bir çok dokuda bulunabilir. Pankreas ve böbreklerde karaciğerden farklı olarak mikrovasküler bariyer sistemi vardır. Virusun bu organlarda bulunması immün kaynaklı doku hasarına yol açmaz. Ancak pankreas ve böbrekler potansiyel bir rezervuar haline gelir. Karaciğer HBV ile tekrar tekrar infekte olur, viral temizlenme azalır. Bu durum viral persistansı kolaylaştırır (25).

Akut HBV infeksiyonunda; kılıf proteinlerine karşı oluşan antikorların serbest halde bulunan virüslara bağlanarak bir kompleks oluşturduğuna, virusun duyarlı hücrelere tutunup girmesinin engellendiğine ve kan dolaşımının virüstan temizlendiğine inanılmaktadır. İşte bu aşamada, değişik nedenlerle HBsAg ekspresyonunda bir kayıp olur veya yüzey proteinlerini kodlayan genlerde mutasyon oluşur ise anti-HBs varlığına rağmen infeksiyon devam eder (26, 27).

İmmun kaçışta birbirinden farklı en az üç mekanizma oynar (28, 29).

1. MHC ile bağlanmayı sağlayan bölgedeki peptid epitoplarını oluşturan aminoasitlerdeki mutasyonel değişiklikler antijen sunumunu etkileyebilir.

2. TCR temas residülerinde veya bu bölgenin konformasyonundaki mutasyonlar sonucu TCR'ün MHC-peptid kompleksine afinitesi kaybolur. T hücreleri kendine sunulan antijenleri tanıyamaz. Bu durumda T hücre aktivasyonu önlenir.

3. Proteinin peptid bağlarında değişiklikler (APL; Altered Peptid Ligands) meydana gelebilir. Bu durumda antijen aynı MHC molekülüne bağlanır ve antijene özgü aynı TCR ile ilişkiye girer. HBV kor proteininin T helper hücre epitoplarında meydana gelen mutasyonların antijen tanınmasında kayba yol açarak konak için daha yararlı olan hafif seyirli bir hepatite neden olduğu bildirilmiştir (30, 31).

Dolayısıyla; viral genomun translasyonuna ihtiyaç göstermeyen viral proteinleri (erken veya erken-acil) sunma yeteneği olmayan HLA molekülünü eksprese eden bir hasta, infeksiyonun ilk dalgasına karşı cevap oluşturamaz. Bu durumda immün kaçış ve infeksiyonun kronikleşmesi kolaylaşır (32, 33). Konu ile ilgili bir diğer determinant; TCR repertuarıdır.

T hücrelerinin MHC-peptid kompleksine cevap verme yeteneği TCR özgüllüğü ile belirlenir. TCR repertuarı, konağın MHC geçmişi ve self peptidleri ile şekillenir. T hücreleri gelişimleri sırasında kendi MHC'leri tarafından sunulan yabancı proteinleri tanıyacak ama organizmanın kendi peptidlerine veya yabancı MHC'lere kayıtsız kalacak TCR'ler eksprese ederler. T hücrelerinin gelişimi sırasında TCR repertuarının seçimi, T hücrelerinin %95'inde delesyona yol açabilir. T hücre repertuarındaki boşluklar nedeni ile bazı kişiler bazı viral proteinleri tanıyamaz (25, 34).

Neonatal HBV infeksiyonunda viral proteinler konak tarafından self proteinler olarak algılanır ve HBV antijeni için spesifik T hücre gelişimi kronik infeksiyon ve HBV immün toleransına imkan verecek klonal delesyon ile sonuçlanır. Böylece vertikal geçişli HBV, immün eliminasyondan kaçır. Ancak ilginç olarak bu tolerans bebeğin HBsAg ile aşılmasını takiben kırılabilir (35, 36).

2.9. HBV Mutantları

Kısmen çift sarmallı bir DNA virusu olan HBV, yaşam siklusu sırasında pregenomik RNA'dan revers transkripsiyonla DNA'ya dönüşür. Her ne kadar hızlı replikasyon yeteneğine sahip bir virus olarak bilinse de; revers transkriptaz enziminin ilk okuma yeteneğindeki zayıflık nedeni ile küçük mutasyonel değişimler ortaya çıkmaktadır. Genom üzerindeki herhangi bir yerde (S, pre C/C, X, P, promotor ve enhancer) ortaya çıkabilen bu mutasyonların;

a- Tek bir taban bazının değişimi (nokta mutasyonu),

b- Bir veya daha fazla sayıda nükleotidin silinmesi,

c- Aynı sekansın düz veya ters biçimde tekrar edilmesi,

d-Nükleotid sekanslarının yeniden düzenlenmesi, gibi farklı genetik mekanizmalarla oluşmaktadır. Bu nedenler ile HBV mutantlarının önemi: mutant suşun hayatiyetini devam ettirmesine imkan sağlamakta, aşı çalışmalarında ise başarısızlıklara yol açmaktadır (15, 37).

Yüzey (Kılıf) Mutantları

HBV kılıf varyantları ile ilgili olarak tanımlanan ilk önemli mutasyon; alellerdeki subtip determinant çiftlerinde (d/y veya w/r) saptanmıştır. Yapılan incelemeler bu immunolojik farklılığın esas olarak nükleotid 519 ve nükleotid 633'deki değişiklikten kaynaklandığını ortaya koymuştur. Sentez sırasında nükleotid 519'daki değişime bağlı olarak HBsAg'nin 122. aminoasidinde bulunan lizinin arginin ile yer değiştirmesi durumunda "d" determinantı "y" determinantına dönüşmekte; aynı şekilde nükleotid 633'ün sorumlu olduğu 160. aminoasitteki lizinin yerine arginin konması "w" determinantının "r"ye dönmesine sebep olmaktadır.

Her ne kadar klasik HBsAg subtiplerinde (adw, adr, ayw, ayr gibi) "a" determinantı ortak olmak şartıyla en az iki farklı determinant daha bulunursa da nadiren bu determinantlardan biri kaybolabilmektedir. Örneğin "adw" subtipinde 160. aminoasitte yer alan lizin "w" özgülüğü sağlamaktadır. Ancak bunun yerine asparagin gelmesi ile bu özgülük kaybolmakta, sonuçta "ad" subtipi ortaya çıkmaktadır. Bu duruma bir diğer örnek "adr" subtipindeki "d" determinantının kaybolması ile oluşan "ar" subtipidir. Aminoasit 122 pozisyonundaki lizinin yitilmesi ile iki değişik "ar" subtipi meydana gelmektedir.

Bunlardan ilkinde 144. aminoasitteki aspartik asit, glutamik asit'le, diğesinde 145. aminoasitteki glisin alanin'le yer değiştirmiştir (17, 24).

HBsAg fenotipleri arasında farklı coğrafi dağılımlar görülse de subtip değişikliğinin infeksiyonun doğası üzerinde herhangi bir etkisi yoktur. Tüm subtiplerde "a" determinantı ortak olduğundan ve bu bölgeye karşı oluşan antikorlar HBV'nun hepatositlere bağlanmasını engellediğinden; ister aşı, isterse doğal infeksiyonun geçirilmesi ile herhangi bir subtipten karşı gelişmiş olan humoral bağışık yanıt tüm serotiplere karşı koruyuculuk sağlar. Fakat "a" determinantındaki değişiklik hallerinde klasik HBsAg subtiplerine karşı meydana gelen antikorların koruyucu özelliği kalmaz. Konağın humoral immnitesinden kaçış mutasyonları genellikle sitotoksik lenfosit aktivitesinin olmadığı ancak yüksek antikor seviyeleri ile baskı altında tutulan, ileri derecedeki antijenik bölgelerde görülür. HBV kılıfı üzerinde bu duruma en uygun bölge 124.-147.aminoasitler arasında yer alan "a" determinantıdır. Yapısında yedi adet sistein bulunan ve sisteinler arası intramoleküler disülfid bağları sayesinde viryon dışına doğru çıkıntı yapmış iki kıvrım halindeki bu bölgenin dominant humoral bir epitopta bulunması gereken tüm özelliklere sahip olduğu gösterilmiştir. "a" determinantlarının tam bir antijenik yapı gösterebilmesi için 142. pozisyonda prolin bulunması gerekmektedir (7, 15).

Aşı ile ilişkili ilk kaçak mutant 1988 yılında İtalya'da grlmştir. HBeAg pozitif anneden doğduğu için pasif ve aktif immünizasyon uygulanan bir bebeğin yeterli düzeyde anti-HBs'ye sahip olduğu halde bir süre sonra HBsAg ve HBeAg pozitif hale geldiği ve kronik hepatit geliştiği saptanmıştır (38). Aynı aşının uygulandığı bazı kişilerde anti-HBs varlığına rağmen geçici HBs antijenemisi meydana gelmiş ve bir çocukta da HBeAg pozitifliği ile hastalık ortaya çıkmıştır (39).

Anne ve çocuktan elde edilen HBsAg epitoplari ile "monoklonal anti-a" antikorları karşılaştırıldığında çocuktan alınan HBsAg epitoplarının anti-a'ya annesinininkinden daha az bağlandığı saptanmıştır. Yapılan sekans analizleri sonucunda anneye ait "a" determinantının 145. pozisyonunda glisin bulunduğu halde ocuğunkinde arginin bulunduğu ortaya konmuştur. Aslında klasik HBsAg subtiplerinde 145. aminoasitte yer alan "glisin" invaryant olup, kolay kolay başka bir aminoasit ile yer değiştirmes ve moleküler konfigürasyonda 122. aminoaside yakın olarak durur. Normalde 587. nükleotidde bulunan taban bazı guanin (G)'dir. Ancak mutant suşlarda

guanin adenin (A) ile yer değiştirmekte, sonuçta GGA (glisin) yerine AGA(arginin) sentezlenmektedir. Bu durumda klasik HBsAg subtipleri ile hazırlanan aşıların koruyuculuğu yeterli olmamaktadır (40).

Benzer bulgular daha sonra Japonya'dan bildirilmiş; ayrıca aynı ailenin iki üyesinde 126. aminoasidde asparaginin (aslında treonin veya izolösin olmalı) bulunduğu yeni bir mutant tanımlanmıştır. Hepatit B aşı programına alınan ve uzun süredir çalışmaların devam ettiği Gambia'daki iki köyde; aşıya rağmen antikor geliştirmeyen iki çocuktan 141. pozisyonda glutamik asit (aslında lizin olmalı) bulunan bir suş izole edilmiştir. İlk zamanlarda köyün diğer üyelerinden alınan örneklerde tespit edilemeyen bu mutantın bir süre sonra başka bireylerde de gösterilmesi üzerine kitle aşılamalarında bu durumun sorun yaratabileceğine dikkat çekilmiştir. Singapur'da 144. aminoasitte asparagin-alanin değişimi olan bir olgu da rapor edilmiştir (15).

Daha sonra yapılan değişik çalışmalarda HBeAg pozitif anneden doğan ve doğumda immünproflaksi uygulanan çocuklardan elde edilen serumların incelenmesi sonucunda "a" determinantının değişik pozisyonlarında (126, 129, 132, 133, 134, 141, 142, 144) kombine mutasyonlara rastlanmış ve bu mutasyonların bazı olgularda 145. aminoasitteki glisin-arginin değişimi ile birlikte görüldüğu bildirilmiştir. Tayvan'da; HBV-S geninde meydana gelen mutasyonların klinik öneminin araştırılması amacıyla yapılan bir çalışmada, doğumda immünproflaksi uygulanan 27 ve aşılanmayan 21 taşıyıcı ocuk ile bunların annelerine ait serumlar incelenmiş; DNA sekans analizleri sonucunda aşılanmayan grupta bulunan çocuklardan 11'inde, 1896. nükleotidde guanin yerine adenin'in geçtiği bir precore mutanı saptanırken, immünproflaksi alan gruptaki 6 çocukta "a" determinant mutasyonu tespit edilmiştir. Bu olguların 4'ünde 145. pozisyonda glisin-arginin mutasyonu, 2'sinde ise 133 ve 144. aminoasitlerde değişiklik gözlenmiş, annelerden sadece birinin çocuğundaki ile aynı mutanta sahip olduğu bildirilmiştir. Bu gözlem sonucunda araştırcılar-doğumda uygulanan immünproflaksin kılıf mutantlarının ortaya çıkmasına neden olduğu- kanaatine varmışlardır (41).

Korunma amacıyla "monoklonal anti-a" veya "poliklonal anti-HBs" verilen karaciğer transplantlı bazı hastalar bir süre sonra aktif viral replikasyon göstergesi olan HBV-DNA açısından tekrar pozitif hale gelmiş; yapılan incelemeler sonunda bu

olgularda 145. aminoasitte glisin-arginin mutasyonu ve S proteininin diğer pozisyonlarında (137, 142, 144, 146) da mutasyonel değişiklikler olduğu saptanmıştır. S proteininin 145. aminoasit dışında kalan mutasyonları normal antijenik yapı gösterdiğinden ilk zamanlar bazı kuşkular olmakla beraber çok fazla önemsenmemiş, ancak daha sonra yapılan çalışmalar, karaciğer transplantasyonu yapılan hastalarda bu mutantların reinfeksiyona yol açtığını ve ciddi sorunlar yarattığını ortaya koymuştur (15, 27, 42).

HBV-S mutantları ile infekte olgularda, tek başına HBV-DNA pozitifliği, tek başına HBsAg pozitifliği, anti-HBs ile HBsAg'nin birlikteliği gibi alışılmadık serolojik profiller görülebilmektedir. Bu durumda HBsAg saptanmasında hangi tip (monoklonal veya poliklonal) antikor kullanıldığı da önem kazanmaktadır. Glasgow Viroloji Enstitüsü'nde yapılan bir çalışmada; HBV'nun endemik olduğu bölgelerde yaşayan çok sayıdaki aşı ve aşısız bireylerden elde edilen HBsAg reaktif serumlar, biri "monoklonal anti-a" diğer ikisi "poliklonal antikorlara" dayalı üç yöntem ile incelenmiş, serolojik profil uyumsuzluğu olan örnekler akut infeksiyonu konfirme etmek için PCR ile test edilmiş ve PCR pozitif bulunan serumların DNA sekans analizleri yapılmıştır. Papua Yeni Gine'den gelen viremik serumların yaklaşık %5'i monoklonal HBsAg testinde negatif bulunmuş, PCR pozitif 13 örneğin 9'unda daha önce ya hiç tanımlanmamış veya sadece bir kez tanımlanmış mutantlar ile alışılmışın dışında bir varyant saptanmıştır. Güney Afrika'dan gelen subtip ayw₂ sekansındaki örnekler özellikle poliklonal yöntemle zayıf olarak reaksiyon vermiştir. Sardinya'dan elde edilen anti-HBc pozitif, HBsAg negatif (monoklonal testlerde) serumların önemli bir kısmında PCR pozitif olarak bulunmuş, bazı örneklerde ise HBV infeksiyon göstergelerinden hiçbirisi saptanamamıştır. S geni ile ilgili 16 yeni varyant ve 2 yeni potansiyel epitop kümesinin tanımlandığı bu çalışma, tanısal etkinlik için yöntem duyarlılığının esas olduğuna işaret etmekte ve HBsAg saptama yöntemlerinin lokal sekans değişimlerine göre modifiye edilmesinin gerektiğine dikkat çekmektedir (43).

Kronik HBV-ilişkili hastalık nedeniyle karaciğer transplantasyonu yapılan ve profilaktik amaçla HBIG verilmesine rağmen fibröze kolestatik hepatit gelişimi ile kaybedilen 3 hastaya ait serum örneğinde nükleotid 1902'de mutasyonlar tespit edilmiştir. Olgulardan ikisinde 145. aminoasitte glisin-sistein, diğerinde ise glisin-arginin değişimi saptanmış ancak mutant virusun kılıf antijenleri monoklonal (anti-"a")

antikorlara dayalı yöntemler ile gösterilememiştir. Bu nedenle araştırcılar transplantasyon sonrası monitorizasyonda; HBsAg saptama yönteminin seçiminde dikkatli olunması gerektiğine ve graft infeksiyonun önlenmesi için “kodon 145-mutant yüzey antijenine” karşı oluşmuş monoklonal antikörlerin kullanılmasının daha uygun olacağına dikkat çekmişlerdir (44).

Kılıf geni ile ilgili mutasyonlar daha az sıklıkta pre-S1 ve pre-S2 bölgelerinde de (bir sekansın silinmesi, yer değiştirmesi veya yeniden düzenlenmesi şeklinde) ortaya çıkabilmektedir. Anti-HBs ve HBsAg'nin birlikte pozitif olduğu kronik hepatitli bir hastada pre-S2 bölgesinin 9-22. aminoasitleri arasında 14 aminoasitlik kısmın silindiği ve “a” determinantının ilk kıvrımında üç, ikinci kıvrımında ise bir aminoasidin yer değiştirdiği bir mutant tanımlanmıştır (10). İleri çalışmalar, özellikle kronik ve fulminant hepatitli olgularda pre-S gen mutasyonlu defektif HBV varyantlarına, daha sık rastlandığını ortaya koymuştur (27, 42, 44).

Konu ile ilgili en çarpıcı örneklerden birini HBV taşıyıcısı olan İtalyan cerrah oluşturur. İstemedi annesini infekte eden ve daha sonra fulminant hepatit nedeniyle her ikisi de ölen doktor ile anneye ait serum örneklerinin incelenmesi sonucunda genomik olarak birbiriyle tamamen benzer ve pre-S2 start kodonu (ATG)'nda bir çift nükleotid değişimi nedeniyle M proteini sentezleyemeyen defektif bir varyant izole edilmiştir. Daha sonra akut HBV infeksiyonlu ama farklı klinik seyir gösteren 18 hastanın serumları incelenmiş ve fulminant hepatit gelişen 5 hastanın 3'ünde pre-S2 start kodon mutasyonu olan varyant suşlar tespit edilmiştir. Bu bulgu “M proteininin HBV infektivitesi için gerekli olmadığı” hipotezini desteklemekte ayrıca önceden bildirildiği gibi pre-S2 defektif mutantlarının karaciğer yetmezliğinde rol oynayabileceğini ve sıklıkla fulminant hepatit ile ilişkili olduğunu göstermektedir (45).

Bir başka çalışmada ise ortotopik karaciğer transplantasyonunu (OLT) takiben fibröz kolestatik hepatit gelişen HBV reinfeksiyonlu bir hastada, S promoter bölgesinde değişiklikler olan bir mutantın varlığına dikkat çekilmiştir. Genomun sekans analizleri; S promotor'un düzenleyici CCATT'sinde bir nokta mutasyonu ve iki silinme bölgesi olduğunu göstermiştir. HBV plazmidini (pHBV 1.5) kullanılarak hepatoma hücreleri üzerinde yürütülen fonksiyonel deneyler sonucunda; tarif edilen bu değişimlerin kılıf proteinlerinin sentezinde disregülasyona yol açtığı; dolayısıyla L, M

ve S protein oranlarında sapmalara neden olduğu tespit edilmiş ve immüno-histokimyasal teknikler ile HBsAg'nin atipik intrasellüler dağılımı ve HBV-DNA'nın artmış nükleer lokalizasyonu yanında ekstrasellüler viral partiküllerdeki major fraksiyonların malformasyonları da gösterilmiştir. Siroz ve fibroze kolestatik hepatit ile viral proteinlerin hücre içi birikimi arasındaki ilişki daha önce bildirilmiştir. Ancak bu çalışma S promoter regülatör CCAAT motifinde meydana gelen mutasyonun viral retansiyondan sorumlu olduğunu göstermesi bakımından önemlidir (46).

Uzun süre HBIG verilen hastalarda, pre-S bölgesinde ortaya çıkan major değişiklikler (silinme ve/veya yer değiştirme) esas olarak OLT öncesinde görülür. OLT sonrasında gelişen HBV reinfeksiyonu sıklıkla varolan mutantın sağlam hepatositlere tutunmasıyla meydana gelir. Dolayısıyla bu durumda HBIG verilmesi pre-S bölgesinde seçici baskılamaya neden olmaz. OLT sonrası HBV reinfeksiyonu gelişen 20 hastanın serumları üzerinde yürütülen bir çalışmada; ekstrakte edilen HBV-DNA pre-S sekansları analiz edilmiş ve 11 olguda nokta mutasyonu, 7 olguda major değişiklikler (silinme/yer değiştirme) saptanmıştır. Nokta mutasyonu için, OLT öncesi veya sonrasında değişiklik tespit edilmezken silinme/yer değiştirme gibi major değişimlerin sıklıkla OLT öncesinde meydana geldiği görülmüştür. İlginç olarak OLT sonrasında major virus popülasyonunda farklılaşma saptanan bir hastada ise S promoter'un CCAAT motifinde mutasyona rastlanmıştır (47).

Hepatosit membranına bağlanma ve akut HBV infeksiyonu sırasında (S proteininden daha önce antikor cevabı oluşturma özelliğine sahip olan) pre-S1 bölgesinde de mutasyonel değişiklikler görülebileceği bildirilmiştir. Gerken ve ark.(48), HBsAg ve HBeAg pozitif, karaciğer kanserli bir hastadan pre S1 bölgesinin 183.baz çiftinde delesyon olan defektif bir mutant tanımlamışlar, sonraki yıllarda aynı varyant suş kronik hepatitli iki Japon'dan da izole edilmiştir. Japon hastaların birinden izole edilen mutantın 183. baz çiftindeki delesyon yanında pre-S2 bölgesinde 15 bazlık ilave bir frame ile pre-S1 ve pre-S2 bölgelerinde birkaç adet tek bazlık yer değişimleri ihtiva ettiği saptanmıştır. HBV genomunda pre-S1 bölgesinin 183. baz çiftindeki delesyon, pre-S2 promoter bölgesi ile pre-S1'deki T ve B hücre tanıma bölgelerini ortadan kaldırmakta, sonuç olarak virusun yok edilme mekanizması bozulmaktadır. Ayrıca virusun pre-S1 bölgesine karşı oluşan immün yanıt: S ve pre-S2 bölgelerinden bağımsız olarak düzenlenmekte ve her bir epitopun tanıma işleminin özgüllüğü major

histokompatibilite kompleksi tarafından etkilenmektedir (49). Pre-S1'in 21-47. aminoasitleri arasında kalan bölgenin konak hepatosit reseptörüne bağlanma özelliğine sahip olduğu bilinmekte ve bu domaine karşı oluşan antikorun virüsü nötralize edebileceği düşünülmektedir. Aynı zamanda pre-S1'in C terminal kısmındaki epitopun (aa 94-117) henüz tam olarak aydınlığa kavuşmamış olmakla beraber, en az iki adet T hücre tanıma bölgesi içerdiği sanılmaktadır. Bu peptide karşı oluşan antikorlar anti-HBe pozitif ama HBeAg negatif olan asemptomatik taşıyıcılarda tespit edilmektedir.

Bazı kronik hepatitli olgularda, pre-S1'in C terminaline karşı antikor oluşumu görülürken, pre-S'in 27-47. aminoasitleri arasındaki bölgeye karşı antikor yokluğu söz konusu olmaktadır. Pre-S1 bölgesinde delesyon saptanan defektif HBV mutantlarında pre-S1 56-117. kodonlarının kaybolması C terminal bölgesinde bulunan epitopun (aa 94-117) da kaybolması ile sonuçlanmaktadır. Pre-S bölgesinin bir bölümünü ya da tamamını kaybetmiş fakat pre-C/C sekansının 5' ucuna lokalize cis-acting sekanslarını koruyan defektif HBV varyantları replikasyon kapasitesine sahiptir. Pre-S1 HBV mutantlarının sıklığının araştırılması amacıyla yapılan bir ön çalışmada: alanin transaminazları normal olduğu halde HBeAg'i pozitif olan 5 hastanın 3'ünde bu tip varyantlar saptanmıştır. Bu veri kronik hepatitin bu döneminde pre-S1 defektif mutantlara sık rastlanabileceğini düşündürmektedir (49).

Prekor / Kor Mutantları

Son yıllarda; viral replikasyon kaybı olmaksızın anti-HBe serokonversiyonu gösteren bazı hastalardan izole edilen HBV-DNA'ların incelenmesi ile prekor/kor geni üzerindeki mutasyonların varlığı ortaya konmuştur.

Prekor bölgesinde görülen en önemli mutasyon HBeAg'nin üretilmemesi ile karakterize olan stop kodon oluşumudur. Normalde prekor bölgesinde stop kodon bulunmaz ve prekor bölgesinin başlangıç kodonundan başlayan sentez işlemi kor bölgesinin start kodonu ile devam eder. Eğer prekor bölgesinin 1896. nükleotidindeki guanin'in (G) yerine adenin(A) gelirse triptofan kodonu da denilen kodon 28 (TGG), stop kodon (TAG) haline gelir ve HBeAg'nin prokürsör proteini (p25') oluşamaz. Söz konusu nokta mutasyonu kor bölgesinin start kodonundan önce meydana geldiğinden ve HBeAg ile HBcAg farklı mRNA moleküllerinden sentezlendiğinden HBeAg üretilemez. Ancak HBcAg'nin sentezi devam eder. Bu mutasyonun yüksek frekansı, bu

nükleotidin signal e'nun enkapsidasyonunda stem-loop'da yerleşmesi ile açıklanmıştır. G/EA mutasyonu, baz çiftleşmesini ve stem-loopun bu anahtar parçasının stabilitesini geliştirir. Son ipuçları A 1896 mutasyonunun genomik duyarlılığının HBV genotipine bağlı olabileceğini düşündürmektedir. Nt 1896'ya karşılık gelen nt 1858-kodon 15 baz çifti, genotipe bağlı olarak korunur gibi görünmektedir (genotip A ve F için CCC, genotip B, C, D ve E için CCT). 1858 pozisyonunda C varlığı, 1896 pozisyonundaki G ile bir baz çiftleşmesi oluşturur. Bu nedenle 1858'de C-T mutasyonu olmaz ise G-C mutasyonu dışlanır (50-53).

HBV replikasyonu için HBeAg translasyonu gerekli değildir. Yapısal gen bölgesi olmayan prekor alanında ortaya çıkan mutasyonlar viral replikasyonu etkilemez. Aksine replikasyon yeteneğine sahip HBeAg negatif mutantların ortaya çıkmasına neden olur. HBeAg'nin gerçek fonksiyonu tam olarak bilinmemektedir. Ancak konağın HBV'una karşı gelişen cevabını kontrol ettiği sanılmaktadır. Aynı gen bölgesi tarafından sentezlendikleri için HBeAg ile HBcAg arasında yüksek oranda homoloji vardır ve ortak immunolojik determinantlara sahiptirler. Her iki molekülde sitotoksik cevapta hedef molekül özelliğindedir. Orijinal (wild) tip HBV ile oluşan enfeksiyonda şifa ve hastalık (sitotoksosite) arasındaki seyir, NK ve T hücre cevaplarına bağlı olarak gelişir. HBeAg sentezleyemeyen mutant suş muhtemelen konağın sitotoksik cevabından kaçarak hayatiyetini sürdürür; üstünde HBeAg bulunan hepatositler anti-HBe'nin de etkinliği ile bir süre sonra lizise uğrar ve sonuçta HBeAg negatif mutant suş dominant hale gelir (34). Ancak akut viral hepatit B enfeksiyonunun doğal seyri sırasında bu mutantların dominant hale gelmesi olağan değildir. HBeAg pozitif virus, genellikle enfeksiyonun erken dönemlerinde bulunur.

İnfekte hepatositlerin temizlenmesi muhtemelen ya membran üstünde bulunan antijenlere karşı gelişen humoral cevap ile ya da viral proteinlerden birindeki peptidlere karşı ortaya çıkan CTL cevabı ile olur. HBcAg'nin 1827. aminoasitleri arasındaki bir epitopa karşı duyarlanmış haldeki CD8+CTL'ler, kronik viral hepatit B'li hastalarda gösterilemediği halde akut viral hepatit B'li (HLA-A2 pozitif) hastalarda saptanmıştır. HBeAg pozitif hepatositlerin bağışık eliminasyonu devam ederken düşük oranlarda HBeAg negatif mutant ortaya çıkabilir ancak bunlar büyük ihtimalle HBV kaynaklı epitoplara karşı oluşan CTL cevabı ile engellenir. Dolayısıyla akut viral hepatit B'li olgularda prekor stop kodon mutantlarının görülmesinde iki faktör rol oynar. Bunlardan

ilki; bulaş sırasındaki HBeAg pozitif/HBeAg negatif virus oranı, ikincisi ise; bu varyantların ortaya çıkışını engelleyen CTL etkinliğindeki bozukluktur (15).

Prekor mutantlarının varlığı asemptomatik HBV taşıyıcılarında, kronik viral hepatit B'li olgularda, ciddi karaciğer hastalığı olanlarda ve fulminant hepatitli hastalarda gösterilmiştir (21). Yapılan birçok araştırmada kronik viral hepatit B'nin seyri sırasında ortaya çıkan HBeAg negatif vireminin hepatosellüler hasarı arttırdığı ileri sürülmüş ve prekor/kor mutantlarının fulminant hepatit ile hızlı progresyon gösteren kronik hepatit oluşumunda rol oynayabileceğine işaret edilmiştir. Ancak bu mutantların hangi mekanizma ile hepatositlere zarar verdiği tam olarak belli değildir. Bu konuda bazı görüşler ileri sürülmüştür. Bir görüşe göre serumda HBeAg mevcudiyeti spesifik T hücre cevaplarını hepatositlerden saptırarak maskeleyebilmektedir. Eğer mutant suş HBeAg üretilip bunu hepatosit yüzeyine eksprese ediyor ve serumda HBeAg bulunmuyor ise HBeAg'ne karşı wild tip HBV infeksiyonundakinden daha kuvvetli bir immünolojik saldırı ortaya çıkar ve sonuçta hepatosellüler hasar daha fazla olur. Bir diğer görüş; mutasyona uğramış prekor bölgesinden derive olan eksik peptidin immünolojik bir hedefmiş gibi davranmasıdır. Bu bağlamda, 1838'deki mutasyonun karaciğer hasarı patogenezinde rol oynayabileceği söylenmektedir. Son görüş ise mutant virusun hepatositler üzerine direkt sitopatik etki göstermesi ile ilgilidir. In vitro olarak prekor bölgesinde mutasyon olmayan viruslar hücre kültürlerinde predominant olarak HBeAg eksprese ve sekrete ederken, bu bölgeye ait sekansın delesyonu HBeAg sentezinde dramatik bir artışa neden olur. Prekor mutant tip, wild tip'ten daha fazla miktarda HBeAg sentezine neden olduğundan sitopatik bir virus gibi davranır (80, 81). Yapılan bir çok çalışmada fulminant hepatit ile HBeAg negatif mutantların birlikteliği ortaya konulmuştur. Bu mutantların fulminant hepatitli olgulardaki insidansı Amerika ve Hong Kong'da düşük, Yunanistan, İngiltere ve Japonya'da ise daha yüksek bulunmuştur (15, 21).

PCR ve restriction enzyme action kombinasyonu kullanılarak hepatit B virus taşıyıcıları üzerinde yürütülen bir çalışmada 1896. nükleotiddeki stop kodon mutasyonu ile nükleotid 1858 varyantlarının karaciğer hasarındaki (histolojik aktivite indeksine göre: HAI) ilişkileri araştırılmıştır. Wild tip ve TAG mutant virusun birlikte bulunduğu HBeAg pozitif hastaların %89'unda Knodell HAI 8 veya daha yüksek olmak üzere aktif karaciğer hasarı tespit edilmiştir. HBeAg negatif olgular içinde wild tip HBV ile infekte taşıyıcılarda prekor mutantlarından daha fazla inflamasyon ve fibrozis olduğuna dikkat

çekilmiş, C-1858 suşları ile infekte olanlarda ise T-1858 ile infekte olanlardan daha fazla inflamasyon ve fibrozis saptanmıştır (54).

HBV'nun perinatal bulaş insidansı annenin HBeAg/anti-HBe durumuna bağlıdır. HBeAg pozitif annelerden doğan bebekler %90 olasılıkla kronik HBV taşıyıcısı olurken son yıllarda anti-HBe pozitif anneden doğan bazı bebeklerde (HBV ile infekte) yaşamlarının erken dönemlerinde fulminant hepatit geliştiği bildirilmiştir. Konu ile ilgili çalışmalar anti-HBe pozitif annelerin, wild tip HBV yanında farklı prekor mutantları ile koinfekte olduklarını; bulaştan sonra bebeklerde karışık virus popülasyonunun seçim işleminin başladığını ve özellikle viral yaşam siklusunda avantajlı olan mutantların öne geçerek infeksiyona neden olduğunu ortaya koymuştur (55, 56).

Prekor gen bölgesinde stop mutasyonu sırasında veya sonrasında birçok değişiklik ortaya çıkabilir. Her ne kadar böyle mutantlarla infekte hastalar farklı klinik prezantasyonlar gösterse de; kronik hepatitli bir hastada birden fazla mutant bulunabileceği gibi, aynı viral genom üzerinde birden fazla mutasyona da rastlanabilir. Nükleotid 1858 pozisyonunda timin (T) yerine sitozin (C) geçmesi (CCT'nin CCC haline gelmesi), nükleotid 1899'da G-A mutasyonu yanında prekor promoterde da değişiklikler görülebilir (36, 39, 57). Prekor promoter bölgesindeki değişiklikler hem HBeAg sentezini hem de viral replikasyon seviyelerini etkilemektedir. Prekor promoter mutasyonlarının HBeAg ekspresyonunu azalttığı, pregenomik RNA sentezini etkilemediği ancak viral replikasyonda orta düzeyde bir azalma ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. Tersine prekor ORF'de doğal yoldan oluşmuş ve pozisyon 28'de bir terminasyon kodonu taşıyan mutantın nükleokapsid partiküllerindeki pregenomik mRNA'nın enkapsidasyonunu arttırdığı gösterilmiştir (58).

Kor promoter/enhancer II alanındaki (nt 1634-1782), nokta mutasyonları kısa delesyonlar veya insersiyonlar sonucunda pre-mRNA transkripsiyonunda azalma, C—mRNA'da artış meydana gelmekte; HBeAg sentezi iptal olurken kor ve pol proteinlerinin üretimi artmakta ve sonuçta viral partiküller daha fazla oluşmaktadır. Bu bölgede en sık tanımlanan nokta mutasyonları AT'den zengin ilk bölgeyi (nt 1758-1762) etkileyen A→T 1762 ve G→A 1764 mutasyonlarıdır (86-88). Kronik viral hepatit B'li hastalarda HBeAg negatif varyanta bağlı vireminin saptanmasında bölgesel farklılıklar görülmektedir. Kuzey Amerika ve Güney Avrupa'lı hastaların çoğunda

HBeAg negatif viremi, PCR ile saptanabilirken, Akdeniz bölgesinde yaşayan hastalar ile Japon'larda dot blot hidridizasyon tekniği genellikle yeterli olmaktadır. Bu hastalar klinik ve histolojik farklılıklar da göstermektedir. Amerika ve Güney Avrupa'lı olguların çoğunun karaciğer biyopsilerinde minimal düzeyde bir hepatit saptanırken, Akdeniz'liler ve Japon'larda yüksek düzeydeki viremi, ciddi histolojik bulgular ve sıklıkla siroz gelişimi ile birliktelik göstermektedir. Bölgesel farklılıklar; HBeAg pozitif ve negatif viruslarda bulunan ortak peptidlere karşı gelişen CTL yanıtının etkinliği ile ilişkili gibi görünmektedir. Hücresel cevabın etkinliği; genetik faktörler, antijen prezantasyonundaki farklı düzenlemeler ve ilk infeksiyon zamanı gibi çok değişik faktörlere bağlıdır. MHC class I genotip farklılıkları yanında Japonya ve Akdeniz bölgesinde HBV infeksiyonlarının neonatal ve çocukluk çağında daha yaygın olması, bu bölgelerde HBeAg negatif mutantlara neden daha sık rastlandığının açıklamasında yardımcı olabilir (15, 61).

HBeAg negatif mutantlar ile infekte olgularda alışılmadık serolojik profiller ile karşılaşılr. HBeAg'nin kaybolması HBV-DNA'da belirgin bir azalmayla birlikte dir. HBV-DNA bazı olgularda immunoblot tekniği ile her zaman gösterilemeyebilir; şüpheli durumlarda PCR tercih edilmelidir. Ancak PCR'ın da yetersiz kaldığı olgular bildirilmiştir. HBV-DNA testleri kullanıma girmeden önceki dönemlerde HBeAg; vireminin göstergesi olarak kabul edilmiş, ancak HBeAg negatif mutantların varlığının ortaya konulmasından sonra, HBeAg ve anti-HBe'nin vireminin çok güvenilir parametreleri olmadığı anlaşılmıştır. Bu nedenle klinik uygulamalarda anti-HBe antikorlarının varlığının saptanmasının HBV replikasyonu ve karaciğer hastalığı olmadığı anlamına gelmediği akıldan çıkarılmamalıdır. Viral replikasyonunun direkt göstergesi HBV-DNA'dır (37, 62).

Bhat ve ark. (63), 1990 yılında HIV ile infekte homoseksüel bir hastanın, HBsAg ve HBeAg pozitif ama anti-HBc seronegatif olduğunu tespit etmişler, HBV-DNA üzerinde yaptıkları incelemeler sonucunda prekor bölgesinde 36 baz çiftlik yer değiştirme yanında prekor ve kor genlerinde iki nokta mutasyonu bulunan yeni bir varyant tanımlamışlardır. Sonraki yıllarda yapılan çalışmalar ile kor-kor promoter bölgelerinde çeşitli değişiklikler bulunan yeni mutantların varlığı gösterilmiş ve kodon 84-101 arasındaki mutasyonların ciddi karaciğer hasarı ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir (64, 65).

Son yıllarda HBV taşıyıcılarında HBe minus suşlarının sıklığı ve dağılımı konusunda kayda değer bilgiler toplanmış, anti-HBe pozitif kronik aktif hepatitli hastalardaki ilk gözlemlerde olduğu gibi prekor mutantlar, HBeAg pozitif hastalarda da saptanmıştır (66, 67). Prekor HBe negatif mutantların, normal karaciğer fonksiyonlarına sahip anti-HBe seropozitif kronik taşıyıcılarda da sık olduğu gösterilmiştir (68, 69).

HBe minus mutantların varlığı, geniş çeşitlilik gösteren karaciğer hasarı ile ilişkilidir. Karaciğer hasarında virus tipinden ziyade viral replikasyon seviyesi önemlidir. Son zamanlarda prekor mutantları olan hastalarda daha çok anti-HBe serokonversiyonu ve daha az HBV reaktivasyonu gösterilmiştir. Anti-HBe serokonversiyonu, HBV-prekor mutantlarının birikimine bağlı olabilir. Ancak olguların çoğunda bu durum karaciğer hastalığının iyileşmesine ve uzun dönemli prognoza yol açmaktadır (70, 71).

Yapılan değişik çalışmalarda HBe minus suşlarla infekte hastaların IFN-a tedavisine cevap paterninde de farklılıklar tespit edilmiştir. Lok ve ark (70), Uzak Doğu'da yaptıkları bir çalışmada IFN tedavisinden önce prekor mutantları olan hastalarda serokonversiyonun daha erken oluştuğunu saptamışlardır. HBe minus suşların kor geninde daha fazla mutasyon olduğu için IFN'a devamlı cevap daha azdır. Bu nedenle yüksek dozda ve daha uzun süreli IFN tedavisi gerekir (72, 73).

Yukarıda da bahsedildiği gibi; HBcAg, bir kısmı HBeAg ile ortak olmak üzere hem T, hem B hücre epitoplarna sahiptir. HBV infeksiyonunda görülen karaciğer hasarının primer nedeni, başta hepatosit yüzeyine sunulan HBcAg olmak üzere HBV proteinlerinin küçük epitoplarna karşı gelişen hücresel immün cevaptır. HBV'nun konak tarafından başarılı bir şekilde yok edilip edilmemesinde; özgül MHC ve TCR repertuvarları özel öneme sahiptir. Ancak hasar oluşumunda humoral immünitinin (intrasellüler ve ekstrasellüler immün komplekslerin) de katkısı olduğu düşünülmektedir. Yeterli tanıma ve aktivasyon oluşursa infekte tüm hücreler parçalanır; viral replikasyon durdurulur ve anti-HBs'nin de katkıları ile hepatositlerin reinfeksiyonu önlenir. Eğer yeterli cevap ortaya çıkmaz ise infeksiyon devam eder. Sitotoksik T hücre cevabında; HBcAg'nin 18-27. aminoasitleri arasında kalan bölge özel öneme sahiptir. Hepatosit içi işlemde sonra HLA class I molekülleri tarafından hücre yüzeyine eksprese edilen HBcAg (ve HBV'nun peptid fragmanları) CD8+sitotoksik T hücreleri

tarafından tanınır ve infekte hepatosit tahrip edilir. Son yıllarda sitotoksik T lenfositlerinin infekte hepatositleri öldürmeden HBV'nu direkt olarak inaktive edebilme özelliğine sahip olduğu bildirilmiştir. HLA class II sınırlı CD4+ T helper hücreleri ise ekstrahepatik antijen sunan hücreler (özellikle makrofajlar) tarafından presente edilen viral peptid fragmanlarını tanırlar. Bu epitopların CD4+ hücrelerince tanınması, T hücre proliferasyonuna ve sitokin sentezinde stimulusa neden olur (11, 62, 74).

Kor bölgesi ile ilgili mutasyonlar sıklıkla immunolojik olarak seçime uğradığı düşünülen T helper ve B hücre epitoplarında ortaya çıkar. Ancak CD8+CTL epitopunda da (aa1827) mutasyonlar tanımlanmıştır. Kor bölgesinin T helper epitopu içinde yer alan aminoasit 12 pozisyonundaki treonin'in serin ile yer değiştirmesi, HBV'nun CD4+ T hücre cevabından kaçmasını sağlamaktadır. Treonin/serin mutasyonunun sadece Akdeniz ülkelerinde görülmesi, bu tip mutasyonun daha çok konağa ait faktörlere bağlı olarak meydana geldiğini düşündürmektedir. Ayrıca T helper hücre epitopu ile HBeAg/HBcAg'ne ait B hücre epitopu çevresinde yoğunlaşmış delesyonlar da saptanmıştır. Kor geninin ortasında değişik büyüklükteki delesyonlar uzun süreli hastalıkta gözlenir gibi görünmekte, ancak immün kaçış mutantları gibi rol oynamamaktadır. Gerçekten bunlar serokonversiyon sırasında kaybolurlar ve dominant negatif varyantlar olarak kabul edilebilirler. In vitro olarak silinmiş kor proteini ihtiva eden artifisyel füzyon proteinlerinin viral replikasyonu inhibe ettiği gösterilmiştir. Bu arada splicing (eklenme) varyantları denen ve orijinini RNA splicing olaylarından alan, diğer tip bir delesyonun varlığı da tanımlanmıştır. Pregenomik RNA içeren ve korun ikinci, üçüncü veya son aminoasidinden pol proteininin ikinci yarısının başlangıcına kadar olan bölümün delesyonu ile karakterize olan bu varyantların akut hepatit B infeksiyonunun kronik hepatite ilerlemesi ile ilişkili olabileceği ileri sürülmüştür. IFN tedavisinin özel tip veya daha yüksek sayıda kor mutasyonunu uyarmadığı ancak tedavi öncesinde kor geni mutasyonlarının varlığının tedaviye düşük cevaba yol açtığı gösterilmiştir (7, 62, 75, 76).

Kor promoter mutasyonları, prekor mutasyonları ile birlikte veya bunlar olmadan da ortaya çıkabilir. HBV-DNA üzerindeki kor promoter, X geninin 3' terminalinde yer alır ve 3.5 kb'lık mRNA'nın (pregenom-kor/polimeraz mRNA) transkripsiyonunu kontrol eder. Bu mRNA pregenom gibi davranarak kor proteini ve DNA polimeraz-revers transkriptaz'ın sentezinde rol oynar. Kor promoter aynı zamanda

HBeAg prekürsörünü kodlayan ve biraz daha uzun olan 3.5 kb'lık mRNA (prekor mRNA)'nın transkripsiyonunu da kontrol eder (12). Bu nedenle kor promoter'da ortaya çıkan mutasyonlar hem RNA (pregenom-kor/polimeraz mRNA veya prekor mRNA) hem de bunların gen ürünlerinin ekspresyonunu etkiler. Oysa spesifik mutasyonlarda sadece bir tip mRNA'nın transkripsiyonu etkileneceğinden ya tek başına HBeAg'nin üretimi durur ya da kor proteinleri ile DNA polimerazın üretimi bloke olur. HBV kor promoter'undaki iki komşu mutasyonun (nükleotid 1768'de C yerine T ve nükleotid 1770'de T yerine A geçmesi) pregenomik RNA transkripsiyonunda minör artış (yaklaşık 2-3 kat) ve bu transkripsiyondan bağımsız olarak viral enkapsidasyonda major artışla (on kattan daha fazla) sonuçlandığı ve ortaya çıkan mutantın fulminant hepatit ile yakından ilişkisi olduğu bildirilmiştir (64). Fransa, İngiltere ve A.B.D.'deki fulminant hepatitli hastalarda prekor bölgesinde mutasyonel değişiklikler olmaksızın kor-promoter'un 1762. (A-T) ve 1764. (G-A) nükleotidlerinde iki önemli nokta mutasyonu tarif edilmiştir (77). Fransa ve A.B.D.'de fulminant hepatitli hastalardan izole edilen bu tip mutantların ayrı bir önemi vardır. Çünkü bu ülkelerde HBV genotip A predominanttır ve genotip A'da prekor nokta mutasyonu (A1896) çok nadir görülür. Dolayısıyla genotip A'nın prevalan olduğu yerlerde fulminant hepatit B'ye, sıklıkla promoter bölgesinde mutasyonları olan HBV suşları neden olmaktadır.

Polimeraz Mutantları

Son yıllarda diğer viral hastalıkların tedavisi için geliştirilmiş olan gansiklovir, lamivudine ve famsiklovir gibi pek çok antiviral ilaç, günümüzde HBV replikasyonunu inhibe etmek amacıyla da kullanılmaktadır. Bu ajanlar her ne kadar HBV replikasyonunu baskılamakta oldukça etkili iseler de uzun süreli kullanımlarından sonra ilaca dirençli HBV suşları ortaya çıkmaktadır. Şu ana kadar ilaca bağlı en iyi tanımlanmış HBV mutantları lamivudine (LAM)'e dirençli olanlardır ve bunlar HIV suşları ile aynı mutasyona sahiptirler (62, 78).

Hepadnaviruslar, retroviruslarda olduğu gibi revers-transkripsiyon mekanizmasıyla çoğalır ve reverse transcriptase'larının katalitik domainin'de polimerizasyon aktivitesi için gerekli olan yüksek derecede korunmuş tirozin-metionin-aspartat-aspartat (YMDD) motifine sahiptirler. Uzun süre LAM verilen hastalarda tedavinin 32-40. haftalarından sonra daha fazla olmak üzere HBV-DNA'nın yeniden

pozitifleştiği saptanmış ve YMDD motifi incelendiğinde; metioninin valin veya izolösin ile yer değiştirdiği YVDD veya YIDD mutasyonları tespit edilmiştir (79- 81).

Famsiklovir (FAM) ise YMDD mutasyonundan ziyade reverse transcriptase'ın B domaininde, 508(V508L) ve 515(L515M) pozisyonundaki mutasyonlara neden olmaktadır (81, 82). Bu tip B domain yer değiştirmeleri, LAM tedavisini takiben YI/VDD ile ilgili olarak da tanımlanmıştır. Söz konusu mutant viral suşlar immunsuprese hastaların serumlarında daha yüksek titrelere ulaşmaktadır (83, 84).

X Mutantları

X gen bölgesi virusun replikasyonu ve ekspresyonu için çok önemlidir. Çünkü X proteini HBV genlerini transaktive etmekte ve kor promoter, enhancer II, DR1 ile DR2 bu bölgede yer almaktadır. Dolayısıyla burada ortaya çıkan mutasyonlar söz konusu yapıları da etkilemektedir (85):

a- HBxAg regülatör bir protein olup, HBV genleri yanında farklı hücrel gen promoterlarını da transaktive edebilme kapasitesindedir. Bu nedenle X-ORF'de meydana gelen nokta mutasyonları ve delesyonlar beklenenden daha az viral gen ekspresyonu ve replikasyonuna sahip bir fenotip oluşturur. Sonuçta HBV'una ilişkin serolojik göstergelerin çoğu veya tümü negatif bulunur.

b- X bölgesindeki mutasyonlar; replikasyon sırasında uzun ve kısa DNA iplikçiklerinin sentezinde önemli rol oynayan DR sekanslarının biri veya her ikisinde birden delesyonla sonuçlanabilir.

c- X-ORF'nin 3' delesyonları kor promoter'ı elimine eder. Ancak bu durumda kor polipeptidi; X promoter ve virus enhancer'in üst kısımlarında yapılmaya devam edebilir.

d-Normalde pre-C sekansındaki delesyonlar viral replikasyonu etkilemez. Fakat X bölgesindeki delesyon, pre-C bölgesi girişine kadar uzanır ise viral polimerazın pregenomik bağlanma alanları ve pregenomik paketlenme sinyalini etkileyebilir.

e- X bölgesinin orta kısmından yukarıya doğru uzanan delesyonlar polimeraz ORF'nin 3' ucunu da içine alır ve polimerazın kısmi delesyonu atenüasyona katkıda bulunur (22).

X geninde meydana gelen değişik mutasyonların fonksiyonel önemi tam olarak

açıklığa kavuşmamış olmakla beraber bu tip varyantların infektiviteleri zayıf, replikasyon seviyeleri düşüktür. Kronik HBV enfeksiyonlu, HCC'lu, fulminant hepatitli ve sirozun son döneminde bulunan hastalarda X geni üzerindeki 130. (AAG→ATG, lizin→methionin) ve 131. (GTC→ATC, valin→izolösin) kodonlarda nokta mutasyonları bildirilmiştir. Her iki mutasyonda transaktivasyon için gerekli olan ve genomun 132-139. kodonları arasında yer alan enhancer II-kor promoter bölgesine lokalizedir. Nükleotid 1655'deki C nin T ile yer değiştirdiği bir nokta mutasyonu da tanımlanmıştır (23). Nükleotid 1770-1777 arasındaki 8 nükleotidlik delesyonunun DNA ekspresyon ve replikasyonunu baskıladığı ve sonuçta HBsAg'nin negatif hale geldiği bildirilmiştir (85).

HBx mutantları beklenen serolojik profilden sapmalar gösteren hastalar, anti-HBc negatif yüksek düzeyde viremik hepatitliler, renal diyalize giren bireyler ve çok kan transfüzyonu yapılan hastalarda da gösterilmiştir (14, 86). Serolojik olarak sessiz nonB-nonC hepatitli olgulardan bu tip mutantların sorumlu olabileceği tahmin edilmektedir (87).

Aşılama ile Asosiye Mutantlar

Günümüzde aşı ile asosiye varyantların ilgisi ve sıklığı belirgin değildir. Aşılanan serilerin hemen tamamında önemli oranda, enfeksiyonun göstergesi olan anti-HBs gelişir.

HBV'nin yüzey geninin major hidrofilik bölgesinde yerleşmiş a determinanti adı verilen dominant bir nötralizan epitop belirlenmiştir. Benzer olarak kronik HBV enfeksiyonlu kişilerde HBV'nin klirensi ile HBsAg'nin serokonversiyonu ilişkilidir. HBs AG mutantların şu anda kullanılan tüm kan donörü testleri ve var olan tanısal reagenler ile tespit edilemeyeceğine dair kanıt vardır (97).

HBV enfeksiyonunun primer önlenmesi için örneğin HBsAg pozitif annelerden doğan bebeklerin aşılama ya da karaciğer transplant alıcılarında olduğu gibi immunoprofilaksi güçlü bir basınç oluşturur. Sonuçta a determinant bölgesinde escape (kaçış) mutasyonlar indüklenebilir. Bu olgularda HBV anti-HBs varlığında replike olabilir. A determinanta benzer mutasyonlar HBV enfeksiyonunun doğal seyri sırasında da ortaya çıkabilir. Kronik HBV'li hastalarda anti-HBs serokonversiyonundan sonra aktif viral replikasyon ve karaciğer hastalığı ile sonuçlanır. Rekombinant aşılama ile

immunize edilen çocuklarda aşı ile indüklenmiş kaçak mutantlar tanımlanmıştır. Karaciğer transplantasyonu yapılan hastalarda reinfeksiyonu önlemek için HBIG verilen hastalarda da a mutantları belirlenmiştir (97).

HBV yüzey geni CTL epitoplarını da içerir. Genellikle CTL epitoplarında viral mutasyonlar hücresel immuniteden korunabilir, böylece persistansa yol açabilirler. Tayvan çalışmasında CTL epitopları ile uyuşan yüzey geninin 40 ve 47. aa. pozisyonlarında mutasyonların sıklığının arttığı bildirilmiştir. Bu mutasyonların kronik enfeksiyona katkıda bulunduğunu önermektedir.

A determinant mutasyonları gözlenen hastalarda 2 karakteristik gözlenmiştir. Mutasyonların %94'ü ilk kısımda ve 126. pozisyonda daha sık etkilenmiştir. Aksine aşı ile indüklenen a determinantının 2. bölgesinde escape mutasyonlar belirlenmiştir. HBsAg'nin çeşitli mutasyonları ve multipl varyantları birçok ülkeden bildirilmiştir. Ancak frekansı en sık ve stabil olan mutasyon 145.aa varyantıdır. Bu yüzey antijeninin a determinantının 145. aa. deki glisin'in arginin'le yer değiştirmesini içerir.

Singapur çalışmasında HBs Ag pozitif annelerden doğan bebeklerde HBIG ve aşılama rağmen 345 bebekten 41'inde enfeksiyon ortaya çıkmıştır. Singapur'da bir başka çalışmada ise 2001 kişide HBV varyant taşıyıcılığı %0.8 oranında bulunmuştur.

Tayvan çalışmasında Hepatit B'ye karşı universal aşılamanın 10 yıllık takibi HBV a determinantının mutasyonlarında artışı işaret etmektedir. Bu mutasyonların prevalansı tamamiyle immunize olanlarda aşı yaptırmayanlara göre daha yüksektir ($p<0.0003$).

Çin'de yapılan universal aşılama ile, taşıyıcılarda dramatik azalma görülmüştür. Fakat aktif (aşı ile endüklenen) veya pasif (HBIG) olarak sağlanan antikorların bu seleksiyondaki gücü açık değildir. Zira Singapur'da çok iyi yapılmış çalışmalarda sürpriz sayıda G145R mutanı tanımlanmıştır.

Mutantla enfekte HBeAg (+) annelerden doğan 40 çocuktan 11'i aşıya yanıt vermemiştir. Ancak G145R mutanı sadece aşılananlarda değil (gerçi onlarda çok sıktır) ama doğal izolatlarda da ve tüm dünyada bulunmuştur. Şüphesiz G145R tek başına aşından kaçış için sorumlu olabilir. In vitro mutagenesis ve ekspresyonu S proteinine yöneliktir ve monoklonal antikorların bağlanma sınırını, ayrıca poliklonal antikorların bağlanmasını azaltır. Bir aminoasid değişikliğinin bu denli antijenik değişikliğe neden

olabilmesi düşündürücüdür. Bu da aşının kapsamı ile ilişkilidir. Böylece HBV üzerine etki edilip bunlar selekte olurken mutantlar replike olabilir. Aşıllılarda diğer mutantlar da bulunmuştur (Japonya'da T/I 126N), dramatik olmayan antijenik değişiklikle asosiyedir. Benzeri olgular, klinik durumlarda tanımlanmamıştır.

Gambia'da aşılama çalışmalarında çocukların bir enfeksiyon markeri olan anti-HBc(+) idi ve bunlarda K141E bulunmuştur. Yapılan çalışmalar aa139-147 pozisyonlarında meydana gelen substitüsyonlar ile antijenik özelliklerde anlamlı değişiklikler olduğunu göstermiştir. Varyantın mevcudiyeti HBsAg ve anti-HBs bağlanmasında olduğu gibi testlerin sensitivitesinde de önemli sapmalara, bu da diagnostik zorluklara neden olmaktadır. Anti-HBc(+) viremili hastalarda yanlış sonuç almanın nedeni varyantlardır. Bu da günümüz diagnostik testlerinde önemli bir problem olarak karşımıza çıkmaktadır.

Bunun somut bir kaç örneğini şöyle sıralayabiliriz: Dokuz yeni varyanttan bazıları sadece Papua Yeni-Gine'de bulunmuştur. Güney-Afrika'da subtiplerde ayw'yi saptamak büyük güçlükler göstermiştir. Sardinya'da aşılama çalışanlarının %3'ünde enfeksiyon gözlenmiş ve bunların %50'sinde viremi bulunmuştur. HBsAg (-) ve anti-HBc(+) aşılama veya aşılama yapılmamış hastalarda farklı varyantlar bulunmuştur. Araplardan en az üç HBs4 varyantı izole edilmiştir ve monoklonal antikor bağlantısının yetersizliği bildirilmiştir. Yalnızca T143L'si olan izolatlar ticari testlerle yeterince bağlanırken Araplarda olduğu gibi kompleks varyantlar söz konusu olduğunda (W133I, F134N, P142S, T143L, G145K) detekte edilemiyebilir. Benzer şekilde İspanya'da P120T aynı zamanda HBIG tedavisinden sonraki hastalarda bulunmuştur. Ticari testlerde mükemmel düzeyde bağlantı sağlamak için henüz monoklonallerin sayısı yetersizdir. Bu itibarla monoklonal ve poliklonal bazlı testlerle farklı sonuçlar alınması laboratuvarlar için alınması gereken dersleri içermektedir.

Aşılarla indüklenen nötralize edici antikorlar daha çok a determinantının uyumlu epitoplarına hedeflendirilmiştir. Yüzey antijenindeki bu aminoasiti yerine koymanın insanlarda HBV'nin replikasyon yapmasına izin vereceğine dair kanıt vardır. Hsu ve ark. yeni aşılama stratejilerinin araştırılması gerektiğini önerdiler. Buna göre, wild tip HBV'nin 200 yıl içerisinde kaybolacağını, 60-100 yılda G145 mutantının ana tip olarak belireceği öngörülmektedir. Bu öngörü günümüzdeki aşıların bu mutanta karşı kros-korumaya sahip olmasını hedef almaktadır (97).

2.10. Epidemiyolojisi

Bütün dünyada yaygın olarak görülen Hepatit B Virusuna (HBV) bağlı akut hepatitin ortalama %5'inin kronikleştiği ve bunların önemli bir bölümünün siroza dönüştüğü; sirozlu olgularda da hepatosellüler kanser gelişme riskinin oldukça yüksek olduğu bilinen bir gerçektir. Bu yüzden önemli bir sağlık sorunu olan HBV ile mücadelede başarılı olmak için epidemiyolojinin iyi bilinmesi gerekir.

Dünyada HBV İnfeksiyonu Prevalansı

HBV enfeksiyonunun dünyadaki dağılımı coğrafi bölgelere göre farklılıklar göstermektedir. Bu farklılıklar nedeniyle dünya; düşük, orta ve yüksek endemisite bölgelerine ayrılmıştır. Sınıflandırmanın oluşturulmasında, bölgedeki HBsAg ve anti-HBs pozitifliği oranları, enfeksiyonun alınma yaşı ve virusun en sık hangi bulaşma yoluyla alındığı gibi kriterler göz önüne alınmıştır. HBV endemisitesinin düşük olduğu bölgelerde HBV taşıyıcılık prevalansı %2'den azdır. Erişkinler açısından enfeksiyonla karşılaşma oranı da %20'yi aşmaz. Cinsel temas en önemli bulaşma nedenidir. Düşük endemisite profili Kuzey-Amerika, Kuzey ve Batı-Avrupa, Avustralya, Yeni Zelanda gibi gelişmiş ülkelerde görülmektedir (89).



Şekil 4: Viral Hepatit B'de Klinik-Epidemiyolojik Korelasyon

Orta endemisite profili Güney ve Doğu-Avrupa, Güney ve Orta-Amerika, Orta-Asya ile Türkiye'nin de içinde bulunduğu Orta-Doğu'da izlenmektedir. Bu grupta

toplumdaki HBsAg pozitifliği %2-10 arasında değişmektedir ve erişkinlerin %20-60'ında anti-HBs pozitifliği bulunmaktadır. Başlıca bulaşma yolu horizontal olmakla birlikte diğer bulaşma yolları da infeksiyonun yayılmasında rol oynarlar (93).

Afrika ve Asya gibi yüksek endemisite gösteren bölgelerde HBV infeksiyonunun epidemiyolojik paterni oldukça farklıdır. Toplumun %10'dan fazlası HBV ile kronik olarak infektidir ve erişkinlerin % 70'den fazlası daha önce geçirilmiş infeksiyon kanıtı (anti-HBs) taşırlar. Bu bölgelerin insanları yaşamlarının 10-20 yaşları arasında %50'nin üzerine çıkan oranlarda anti-HBs pozitifliği edinirler (89). Yüksek endemisite bölgelerinde perinatal veya horizontal bulaşma ana bulaşma yoludur (91). Dünyada HBsAg dağılımı ile kronik hepatit B ve primer hepatosellüler kanser arasında güçlü bir epidemiyolojik ilişki vardır (92).

Türkiye'de HBV İnfeksiyonu Prevalansı

Ülkemizde 1972 yılından günümüze kadar donörler, donör dışı normal popülasyon, çocuklar ve risk grupları gibi çeşitli gruplarda HBsAg seroprevalansının araştırıldığı çok sayıda çalışma yayımlanmıştır. Bu araştırmalardan elde edilen verilere göre, Türkiye'deki HBsAg seroprevalansı, ELISA yöntemi ile bölgeden bölgeye değişmek üzere %3.9-12.5 olarak belirlenmiştir. Güney-doğu Anadolu bölgesinden, özellikle Diyarbakır'dan genellikle % 10'un üzerindeki değerler bildirilmektedir (90). Bu sonuçlar orta derecede endemik bir bölgede olduğumuzu ve yurdumuzda 4 milyon civarında taşıyıcı bulunduğunu göstermektedir. HBsAg taramalarının yapıldığı çalışmalar içinde en çok yer alan gruplardan biri donörlerdir. Kızılay Kan Merkezi verilerine göre 1985 yılında incelenen 298.553 donöre ait kanda HBsAg pozitifliği %6.7 oranında iken daha sonraki yıllarda bu oran giderek azaldığı dikkat çekmektedir (153). Kızılay Kan Merkezi 1998 yılında 396.141 donörde %1.4 oranında HBsAg pozitifliği belirlemiştir. Sağlık Bakanlığı verilerine göre 1998 yılında Türkiye genelinde çalışılan 1.377.688 kanda ise %1.0 oranında HBsAg pozitifliği saptanmıştır (153). Kan vericilerindeki HBsAg seroprevalansında son yıllarda giderek belirginleşen bu azalmanın çeşitli nedenleri olabilir. Bunlardan biri toplumda, basının da etkisiyle hepatit bilincinin artmış olması ve tarama testlerinin yaygınlaşması nedeniyle daha çok insanın kendi durumunun farkına varması ve eğer kendinde HBsAg pozitifliği saptanmış ise donör olmak için başvuru girişiminde bulunmaması olabilir. Bir diğer neden ise kan

verenler içinde asker popülasyonunun yüksek olması durumunda HBsAg pozitifliği oranının yükseldiği gerçeğinin bilinmesidir. Asker donörlerde oranın yüksek çıkmasının bir nedeni bu kesimde yakın zamana kadar kitlesel aşılmalarda ortak enjektör kullanılması, bir diğeri ise HBsAg seroprevalansının yüksek olduğu Doğu-Güneydoğu bölgelerinden gelen askerlerin seropozitiviteyi yükseltmesi olabilir diye düşünülmektedir. Bu nedenle Kızılay Kan Merkezi 1985 yılında %75 olan asker donör oranını 1998'de %40'a kadar indirmiştir (153). Ülkemizde yenidoğan bebeklerde rutin olarak uygulanan hepatit B aşılarının HBsAg prevalansındaki azalmada henüz etkisi olduğu ise düşünülemez. Çünkü aşılama programına yurt çapında ancak 1998 yılında başlanmıştır. Kan verenler içinde asker, mahkum ve paralı donörlerin sayısının artması HBsAg pozitifliği oranını yükseltmesi yanında, tarama testlerinin yaygınlaşması ile HBsAg pozitifliği saptananların artık donör olmak için başvuramaları da HBsAg seropozitivitesini düşük gösterebilir. Bu nedenle donör verilerini normal yetişkin popülasyonu veya kontrol verisi olarak değerlendirirken dikkatli olmak gerekir.

Donör dışı normal popülasyonda HBsAg seroprevalansının araştırıldığı çalışmaların çoğu şehirlerde yaşayan erişkinlerde yapılmıştır. Halbuki toplumdaki normal popülasyona ait gerçek prevalansı bulabilmek için kentler ve kırsal kesimdeki tüm yaş gruplarının taranması gerekir. Kentten ve kırsal kesimden olguları bir arada içeren nadir çalışmaların bir kısmında belirgin seropozitivite farkının olmadığı, bazılarında da HBsAg pozitifliğinin kırsal kesimde kentlere göre düşük bulunduğu belirtilmektedir. Bu çalışmaların genel sonuçlarına göre HBsAg sıklığının %1.1-12.4 arasında değişmekte olduğunun belirlenmesine rağmen, bu konuda ayrıntılı araştırmalara ihtiyaç vardır (153). Bu grupta yapılan çalışmalar içinde en yüksek olgu sayısının bulunduğu araştırma (3544 olgu %4.5 HBsAg seropozitifliği) Sarpel ve ark. tarafından yapılmıştır (150). Ayrıca aynı yaş gruplarından olup sosyoekonomik gruplara göre HBsAg durumunu inceleyen bazı çalışmalar da yapılmış ve sosyo-ekonomik düzeyin düşmesine paralel olarak HBsAg pozitifliğinin arttığı saptanmıştır.

Türkiye'de çocuk yaş grubunda HBsAg seroprevalansının incelendiği çalışmalar oldukça yetersizdir. Araştırmalardan elde edilen verilere göre ülkemiz çocuklarında %2.0-12.1 oranlarında HBsAg pozitifliği saptanmıştır (153).

Tek başına HBsAg seropozitifliğinin bilinmesi bize ancak taşıyıcılar hakkında fikir verebilir. HBV enfeksiyonu için seropozitifliğin bilinmesinde önemli olan

göstergeler HBsAg yanında anti-HBs ve anti-HBc'dir. Hepatit göstergelerini belirlemeye yarayan ELISA kitlerinin yurtdışından ithal edilmesi nedeniyle tüm göstergelerin araştırıldığı seroepidemiolojik çalışmalar ülkemiz ekonomik şartlarına uygun olmaz. Bu nedenle hem daha ekonomik, hem de sağlıklı bir metod olarak kişide HBsAg ve anti-HBs göstergelerinin birlikte belirlenmesi yerine, inceleme yapılacak grubun önce anti-HBc yönünden taranması, anti-HBc pozitif bulunanlarda HBsAg'ne bakılması, HBsAg negatif bulunanlarda ise anti-HBs göstergesinin aranması uygun olur. Yukarıda anlatıldığı şekilde yapılan taramalarda tek başına HBsAg veya anti-HBs pozitiflikleri belirlenmemektedir. Tek başına HBsAg veya anti-HBs pozitiflikleri ise nadir görülmektedir. HBsAg ve anti-HBs'nin birlikte incelendiği çalışmalarda ise tek başına anti-HBc pozitifliği durumunu saptamak olanaksızdır. Tek başına anti-HBc varlığı ise daha sık görülmektedir. Ayrıca yalnızca HBsAg+anti-HBs bakılmasının başka sakıncaları da olabilir. Bu iki göstergenin pozitiflik toplamı gerçek HBV enfeksiyonu seropozitifliğini tam olarak göstermez. Çünkü anti-HBs pozitifliği enfeksiyonun geçirilmesi yanında aşılama sonucu da oluşur. Anti-HBc ise yalnız enfeksiyonu geçirmekle meydana gelmektedir. Bu nedenle HBV enfeksiyon seroprevalansının yapılacağı çalışmalarda uygulanabilecek en iyi yol gelecekte hepatit B aşılmasının daha da yaygınlaşacağı dikkate alınarak yukarıda bahsedilen öncelikle anti-HBc'nin taranacağı metoddur.

Ülkemizde HBV enfeksiyonu seroprevalansının araştırıldığı çalışmalar da oldukça yetersizdir. Bu grupta yapılan çalışmalar içinde en yüksek olgu sayısının bulunduğu araştırma (1190 olgu %7.1 HBsAg seropozitifliği, %21.9 anti-HBs seropozitifliği) Pasha ve ark. tarafından yapılmıştır (153). Anti-HBs'nin tarandığı çalışmalardan elde edilen verilere göre anti-HBs pozitifliği oranı %20.6-52.3 arasında değişmektedir (153). Böylece Türkiye'de HBV enfeksiyonu seroprevalansının (HBsAg pozitifliği+anti-HBs pozitifliği) %25-60 arasında olduğu söylenebilir ki bu oranlar gelişmiş ülkelere göre oldukça yüksektir.

Yurdumuzda HBV enfeksiyonu seroprevalansının en çok araştırıldığı olgular içerisinde risk grupları, özellikle sağlık personeli ilk sırayı almaktadır. Bu grupta ortalama %8 (3.5-16.4) HBsAg pozitifliği ve %40 (17.9-52.9) anti-HBs pozitifliği bulunmuştur (153). Çalışmaların çoğunda sağlık personelinde kontrol grubuna göre 1.5-2 kat kadar yüksek bir seropozitivite saptanırken, bazılarında önemli bir fark bulunamamıştır. Bazı çalışmalarda kanla direkt teması olan personelde seropozitivitenin

biraz daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Ayrıca meslekte geçen yıllar HBV infeksiyonunun seroprevalansını arttırmaktadır. 1992 yılında WHO (Dünya Sağlık Örgütü) ve ILO (Uluslararası Çalışma Örgütü) hepatit B'yi sağlık personeli için meslek hastalığı olarak kabul etmiştir. ABD ve Avrupa Topluluğu riskli personele ücretsiz ve zorunlu hepatit B aşısı uygulanmasını önermişlerdir (91). Yine ülkemizde yapılan diğer risk gruplarının incelendiği çalışmaların çoğunda kontrol grubuna göre yüksek seropozitivite oranları saptanmıştır (153).

Akut Hepatit B ülkemizde sporadik olarak her mevsimde görülür. Hastaneye başvuran akut viral hepatitli olguların çocuklarda %1.3-30'undan, yetişkinlerde ise %39-85'inden HBV sorumludur (91). Toplam seropozitivite oranı ise %25-60 olduğuna göre bazı yörelerimizde nüfusun yarıdan fazlası HBV ile karşılaşmış demektir. Sonuç olarak; böylesine önemli ve yaygın bir hastalığın Türkiye'deki epidemiyolojisini izleyebilmek, morbidite hızındaki artış veya azalış trendini saptayabilmek, hastalığın toplumumuzdaki kronikleşme oranını belirleyebilmek ve HBV'nun yurdumuz için başlıca bulaşma yolları ile infeksiyonun alındığı yaş grupları hakkında yorum yapabilmek, ayrıca hastalığın eradikasyonunda gerekli önlemleri ivedilikle alabilmek için hepatit B konusunda ülkemizde yapılan dağınık ve nisbeten küçük sayılara dayalı çalışmaların büyütülmesine ve bunların birbirine eklenmesine gerek vardır.

2.11. Bulaşma Yolları

Tek önemli rezervuarı insan olan HBV'nun yayılmasında taşıyıcılık kavramı oldukça önemlidir. Bugün dünyada 400-500 milyon taşıyıcı bulunduğu sanılmaktadır (88). Taşıyıcılar dışında kronik hastalar ve akut infeksiyonu geçirmekte olan bireylerin kan ve vücut sıvıları bulaşmada önemli rol oynar.

HBV'nun 4 ana bulaşma paterni vardır: İnfekte kan ya da vücut salgıları ile parenteral temas (perkütan), cinsel temas, infekte anneden yeni doğana bulaşma (perinatal-vertikal), infekte kişilerle cinsellik içermeyen yakın temas (horizontal).

HBV'nun bulaşmasında mevsim ve yaş faktörleri rol oynamaz. İnfeksiyonun yayılmasında su ve gıdaların önemi yoktur, çünkü fekal-oral yolla HBV bulaşmaz. Oral yolla bulaşma ancak infekte kanın hasarlanmış oral mukozaya temas etmesiyle gerçekleşebilir. Virus geçişinde göz ve bütünlüğü bozulmuş deri de önemli rol oynar(89).

Perkütan Bulaşma

Perkütan bulaşma, HBV infeksiyonunda en önemli bulaşma yollarından biridir. Virusun perkütan inokülasyonu, kan ve kan ürünlerinin transfüzyonu, hemodiyaliz, endoskopi, yapay solunum cihazı gibi tıbbi aletlerin kullanımı, akupunktur tatbiki, aynı enjektörün farklı bireylerde kullanımı ve dövme (tatuaj) yaptırmayla olmaktadır. Ayrıca kanla bulaşmışlığa bağlı olarak havlu, jilet, traş makinesi, diş fırçası, banyo malzemeleri gibi günlük eşyaların ortak kullanımı da perkütan bulaşmaya neden olabilir.

Kan ve kan ürünlerinde ELISA gibi duyarlı testlerle HBsAg taranmaya ve kan ihtiyacının karşılanmasında profesyoneller yerine gönüllü donörlerin kullanılmaya başlanmasından sonra transfüzyon aracılığıyla HBV'nun bulaşması çok azalmıştır. Nadir de olsa HBsAg negatif bulunan kanlarla da posttransfüzyon hepatit B oluşabilmektedir. Bu duruma taramalarda kullanılan kitlerin duyarlılık farklılıkları yanında, HBsAg negatif infeksiyöz HBV sağlıklı taşıyıcılarının varlığı neden olmaktadır (89). Pıhtılaşma faktör preparatları binlerce kişinin kanından oluşan plazma havuzlarından elde edilir. Bu tip preparatlar gösterilemeyecek kadar az olan HBsAg düzeyleri yüzünden bulaşma kaynağı olabilmektedirler.

Kan ve kan ürünleri dışında semen, tükürük, idrar, feçes, ter, gözyaşı, vaginal salgılar, sinoviyal sıvılar, beyin omurilik sıvısı ve kordon kanında da virus varlığı (HBsAg ve HBV-DNA pozitifliği) gösterilmiştir. HBeAg pozitif kişilerin serumlarında ml'de 10^8 - 10^{10} viryon, anti-HBe pozitif kişilerin serumlarında ise ml' de 10^1 - 10^7 viryon bulunduğu saptanmıştır. Doğrudan kandan oluşan eksüdalar, plevra ve periton sıvıları gibi vücut sıvılarındaki viryon yoğunluğu serumdaki ile benzer düzeydedir. Semen ve tükürükteki viryon yükü aynı bireyin serumundakine göre 10^3 kez daha azdır. Diğer salgılarda ise yoğunluk çok daha düşük olarak bulunduğundan bulaşmada önemli rol oynamazlar (90). Ancak sadece tükürük ve semenin bulaşmada önemli birer aracı olmaları söz konusudur (89).

Cinsel Temasla Bulaşma

HBV'nun bir diğer bulaşma yolu cinsel temastır. Homoseksüeller arası cinsel temas, HBV için en riskli seksüel bulaşma yoludur. Rektal mukoza mikrotravmalarına bağlı infekte kan veya infekte semen teması riski arttırmaktadır. Genital sekresyonlar kandan daha az konsantrasyonlarda virus içermelerine rağmen bu sekresyonlar

heteroseksüel temas sırasında bulaşmaya neden olmaktadır. Heteroseksüel yolla bulaşmada HBV taşıyıcılarının eşleri en çok tehlike altında olanlardır. Multipl heteroseksüel partneri veya başka cinsel yolla bulaşan hastalığı olanlarda risk daha fazladır. HBV enfeksiyonu riski diğer bir veneral hastalık hikayesi varlığında 2-3 kat, partner sayısı artmasına paralel olarak ise 3-11 kat artmaktadır (91).

Perinatal Bulaşma

Taşıyıcı annenin perinatal dönemde enfeksiyonu bebeğine geçirme olasılığı %40-50'dir (89). Bu oran, HBeAg pozitif bir annede daha yüksektir (90). Annenin HBV taşıyıcı olması durumundan başka, hamileliğinin üçüncü trimesterinde veya doğum sonrasında ilk iki ayı içinde akut hepatit B enfeksiyonu geçirmesi de bu tip bulaşmaya yol açabilir. Anneden çocuğa bulaşma, doğum esnasında veya doğumdan sonra oluşabilen deri ve mukozal sıyrıklarının enfekte maternal sıvılara teması, vaginal kanaldan geçiş sırasında anne kanının yutulması, sezaryen sırasında anne kanıyla temas veya plasenta hasarı sonucu maternal dolaşımın fetal dolaşıma karışması gibi nedenlerle meydana gelir. İntrauterin bulaşma oranı ise nadirdir (%5-10). Perinatal bulaşmanın en önemli özelliği, enfekte olan bebekte hastalığın kronikleşme oranının annenin HBeAg pozitif olduğu durumlarda %90 gibi çok yüksek düzeylere ulaşmasıdır. Anne sütünde HBsAg gösterilmiş olduğundan, anne sütü teorik olarak bulaştırıcı olabilir. Fakat bu bulaştırıcılık anne sütünün kesilmesini zorunlu kılmaz (92).

Horizontal Bulaşma

Parenteral, cinsel ya da perinatal temasla bulaşmanın söz konusu olmadığı durumlarda ortaya çıkan bulaşma, horizontal bulaşma olarak tanımlanır. Bu tip bulaşmanın mekanizması tam anlaşılmamıştır. Ancak, HBV'nun hepatositler yanı sıra perifer kanı mononükleer hücrelerinde de replike olabilme yeteneğinin olması nedeniyle, çok küçük miktarlardaki enfekte kanın, enfekte kişilerle cinsellik içermeyen yakın temastaki bireylerin hasarlı derileriyle temasının horizontal bulaşmaya yol açabileceği düşünülmektedir (59). Tükürük gibi vücut sıvılarının defektli deriyle teması da bulaşmaya neden olabilir. Horizontal yol özellikle ev içi bulaşmada önemlidir. HBV taşıyıcısı bulunan ailelerde enfeksiyonlu sayısının arttığı HBsAg pozitif bireylerin, seronegatif diğer aile fertleri ve akrabalarına HBV bulaştırdığı gösterilmiştir. HBV'nin zeka özürlü çocuk bakımevleri başta olmak üzere anaokulu, kreş, yatılı okul, kışla, yurt,

hapishane gibi yerlerde de kolay yayıldığı belirlenmiştir. Kalabalık yaşam şartları, kötü hijyen ve düşük sosyo-ekonomik düzey HBV'nun bulaşma oranını arttırmaktadır (89).

Ülkemizde HBV'nun temel bulaşma yollarını ve infeksiyonun alındığı yaş gruplarını kesin söylemek zordur. Bizde infeksiyon, çoğunlukla çocukluk ve genç erişkin dönemlerinde tüm bulaşma yolları ile alınmaktadır. Ancak ülkemizin pek çok yerinde hijyene yeterince önem verilmediğinden dolayı horizontal bulaşmanın ilk sırada yer aldığı söylenebilir. Horizontal bulaşma yolunun ülkemizde ilk sırada yer alışı, havlu, diş fırçası, jilet, makas, manikür-pedikür setleri gibi malzemelerin iyi dezenfekte edilmeden aile içinde, berberde, kuaförde ortak kullanılması; yaygın öpüşme alışkanlığı; çocuklar arasında oyun esnasındaki temaslar gibi faktörlere bağlıdır (91).

Risk Grupları

Hemofili başta olmak üzere sık sık kan ve kan ürünleri verilen hematoloji-onkoloji ve hemodiyaliz hastaları, iyice sterilize edilmemiş aletlerle dövme yaptıranlar, damar içi uyuşturucu kullananlar, erkek eşcinseller ve sağlık personelidir.

HBV taşıyıcılarının cinsel partnerleri, fahişeler, çok partnerli heteroseksüeller genital sekresyonlarda virus bulunması nedeniyle cinsel temasla bulaşma açısından risk taşırlar. Perinatal bulaşma yolu açısından riskli grup, HBV taşıyıcısı olan, hamileliğinin son trimesterinde veya doğum sonrasında ilk iki ayı içinde akut HBV infeksiyonu geçiren annelerin bebekleridir.

Horizontal bulaşma yönünden riskli gruplara ise sosyo-ekonomik düzeyi düşük ve kötü hijyen koşullarında kalabalık olarak yaşayan aileler örnek olarak verilebilir.

2.12. Hepatit B'de Klinik Bulgular ve Tanı

Akut hepatit B infeksiyonunun inkübasyon dönemi 4-28 hafta olarak belirlenmiş, fakat çoğu vakada bu aralık 60-180 gündür. Hepatitin ortaya çıkması serumda HBsAg'nin saptanmasından ortalama 4 hafta (1-7 hafta) sonradır (94, 95).

Viral hepatitler asemptomatik infeksiyondan, fulminan hastalığa kadar değişen farklı klinik seyir göstermektedir (96).

Akut hepatitin başlangıç semptomları nonspesifiktir. Semptomatik akut hepatit B hafif ve anikterik veya daha ciddi ve ikterle birlikte olabilir (94, 95). Sklerada ikter,

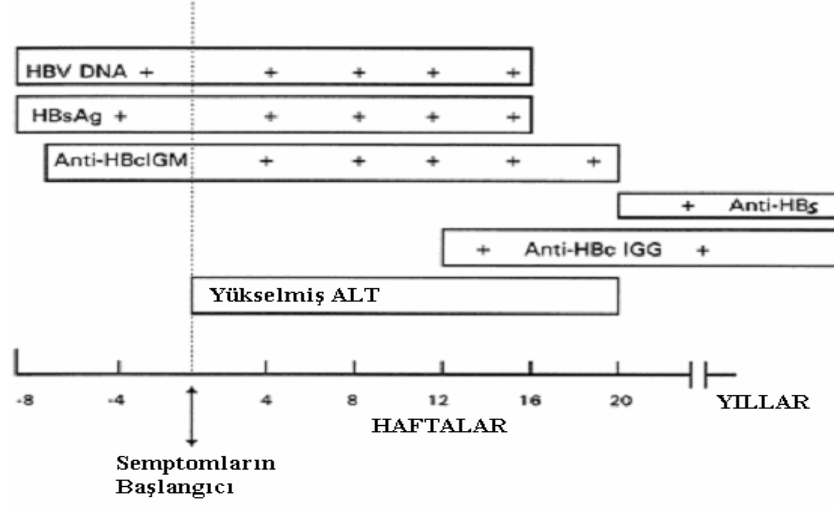
serum bilirubin düzeyi %2.5-3 mg üstünde olunca gerçekleşir. Tipik semptomları, halsizlik ve yorgunluk olup bunu iştahsızlık, bulantı, kusma ve sağ üst kadranda hafif künt bir ağrı takip eder. Preikterik dönemdeki bu semptomlar genellikle 3-10 gün sürer.

Sarılığın başlaması ve koyu idrar çıkması ile ikterik dönem başlar. İkterik vakalarda semptomlar ilerleyebilir, değişmeden kalabilir veya hızlıca düzelebilir. Sarılığın süresi genellikle 1-3 haftadır ve 4 haftayı nadiren aşar (94, 95, 98).

Akut hepatit B'li hastaların %10-20'sinde klinik olarak belirgin karaciğer hastalığı belirtilerinin başlamasından birkaç gün veya hafta önce eritematöz makülopapüler raş, ürtiker, artralji, nadiren artrit ve bazen de ateş ile kendini gösteren ve "serum hastalığına benzer sendrom" olarak isimlendirilen bir tablo mevcuttur. Preikterik dönemdeki bu belirtiler hepatit B'nin lehine teşhis koydurucudur. Bu tablo HBV'una bağlı olarak gelişen immün kompleks ile ilişkilidir. Bu semptomlar genellikle 2-10 gün sürer, sarılığın ortaya çıkmasıyla kalıcı değişiklik bırakmadan hızla ortadan kaybolur, nadiren ise haftalar veya aylarca sürebilir.

Yetişkinlerde akut hepatit B'nin klinik gidişi akut hepatit A ve C'den daha ciddi olmaya eğilimlidir, ancak genel tabloda benzerlik vardır ve genellikle ayırdedilemez (94, 98). Çoğu infeksiyonda belirgin semptom ve bulgu olmamasına rağmen serum transaminaz aktivitesinde anormallik mevcuttur (98). Akut hepatit B'de laboratuvar testleri normal gözlenir veya orta derecede azalmış hematokrit veya hemoglobine rastlanır.

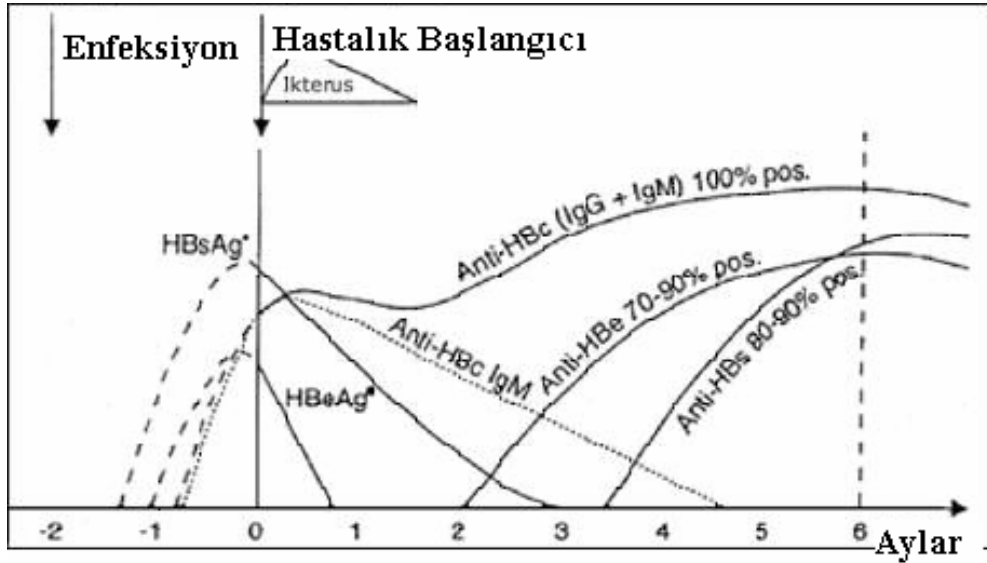
Total serum bilirubini genellikle 10-14 gün yüksektir ve çoğu hastada %10 mg'ı geçmez. Akut viral hepatitin esas göstergesi serum transaminaz aktivitesindeki hızlı yükseliştir. Transaminazların yükselmesi semptomlar başlamadan önce başlar ve genellikle semptomların birinci haftasında pik yapar. Serum pik düzeyi genellikle 1000 Ü/ml'nin üzerindedir ve alanin aminotransferaz (ALT), genelde aspartat aminotransferaz (AST)'dan daha fazla yüksektir (94, 95). Pik seviyeleri karaciğer hastalığı ile doğru orantılıdır, ancak prognostik faktör değildir. Serum alkalen fosfataz seviyesi normal veya hafif yükselmiştir. Serum albumin ve globulin konsantrasyonu genelde normaldir (94). Akut viral hepatitlerde protrombin zamanı normaldir. Ancak fulminan hepatitlerde değişicidir. Protrombin zamanınının 17 saniye üzerine yükselmesi prognozun ciddiyetini gösterir ve fulminan karaciğer yetmezliği gelişmesi yönünden değerlendirilmelidir (95).



Şekil 5: Viral Hepatit B’de Serolojik-Moleküler Tanı

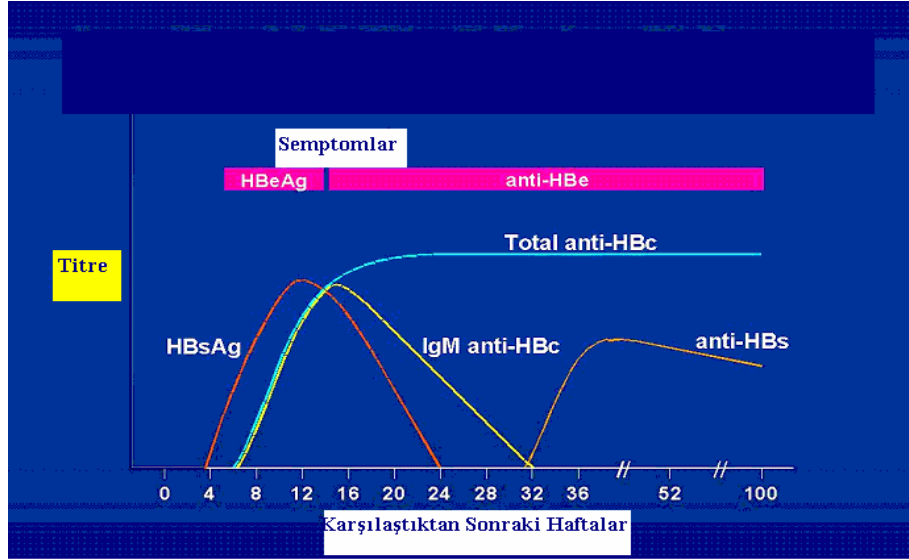
Uzamış akut Hepatit B’de anormal laboratuvar bulguları, hafif semptomlar ve anormal fizik bulgular 3-4 aydan, 12 aya kadar devam edebilir. Akut viral hepatitin sadece %3-5’inde 3-4 aydan fazla bu tablo oluşabilir. Uzamış akut hepatit B’nin prognozu tipik kısa gidişli hepatitten farklıdır, fakat uzamış akut hepatit B’yi hepatitin kronik formundan ayırmak, HBsAg’nin negatif olması ve hepatit düzelineye kadar zor olabilir.

Fulminan hepatit, karaciğer yetmezliği ve ensefalopatinin eşlik ettiği ciddi bir formdur ve böyle vakalarda mortalite çok yüksektir (94).



Şekil 6: Akut HBV Enfeksiyonunda Serolojik Profil

HBV enfeksiyonunun serolojik teşhisi: Akut viral hepatit B'yi klinik olarak diğer hepatitlerden ayırmak güçtür ve tanısı spesifik serolojik testlerle konulmalıdır. HBV ile temastan 1-12 hafta sonra veya semptomların başlangıcından 2-8 hafta önce inkübasyon periyodu boyunca HBsAg serumda saptanır ve 3 ay sonra kaybolur (94, 95, 98). HBsAg'nin 3 aydan daha uzun süre sebat etmesi kronik hepatit B enfeksiyonu gelişeceğini işaret etmektedir.



Şekil 7: Akut HBV Enfeksiyonunda İyileşmenin Serolojik Seyri

Yetişkinlerin %95'inde HBsAg kaybolur, %5'inde kronik HBsAg taşıyıcılığı gelişir. Kronik HBsAg taşıyıcılığı infekte olan yenidoğanlarda %90, bebeklerde %50 ve çocuklarda %20 oranlarında gerçekleşmektedir (96). HBsAg taşıyıcılığının yüksek olduğu risk gruplarında sadece HBsAg pozitifliği ile akut hepatit tanısı koymak doğru değildir. Hasta kronik HBsAg taşıyıcısı olabilir ve üzerine başka bir etkene bağlı karaciğer hasarı eklenebilir (97).

HBsAg	Anti-HBs	Anti-HBc	Yorum
+	-	-	Akut HBV infeksiyonunun erken dönemi. Nonspesifik reaksiyon ekarte edilmeli.
+	+/-	-	Akut veya kronik HBV infeksiyonu. Anti-HBcIgM ile ayırıcı tanıya gidilir.
-	+	+	Geçirilmiş infeksiyon. HBV'ye bağışıklıdır.
-	-	+	Çok önce geçirilmiş infeksiyon, düşük düzeyde HBV taşıyıcılığı, pencere dönemi, yalancı pozitiflik, nonspesifik reaksiyon olabilir. Anti-HBcIgM ileri tetkiki istenir. HBV aşısına ikincil yanıt aranır. Anti-HBe(+)liği ile birlikte olması yol göstericidir
-	-	-	Başka etyoloji aranır.
-	+	-	Aşı ile kazanılmış immünite.

Tablo 1: Viral Hepatit B'de Tanı

Anti-HBs, HBsAg kaybolduktan sonra ve genellikle hastalığın başlangıcından 3 ay sonra ortaya çıkar; iyileşmeyi ve immüneyi gösterir. Anti-HBs çoğu kişilerde hayat boyu kalıcıdır. Anti-HBs ile birlikte anti-HBcIgG pozitifliği doğal immüneyi, sadece anti-HBs pozitifliği aşılama ile oluşan koruyuculuğu gösterir. İmmunkompleks formasyonu ile birlikte artrit ve raş gelişen hastaların %10-20'sinde klinik hepatit bulguları başlamadan önce ve antijenemi esnasında anti-HBs ortaya çıktığı gösterilmiştir. Ayrıca HBsAg taşıyıcılarının %10-40'ında düşük titrede anti-HBs olabilir. Bu durum, mekanizma kesin olmamakla birlikte farklı subtiplerle aynı zamanda infeksiyon olmasına bağlanmaktadır (94, 95, 96, 98).

Anti-HBcIgM ve IgG semptomların başlamasıyla ortaya çıkar, IgM birkaç ay pozitif kalır ve hastalığın başlangıcından 4-8 ay sonra serumda tespit edilemez. HBsAg'nin serumdan kaybolup anti-HBs gelişinceye kadar geçen pencere döneminde anti-HBcIgM'in varlığı akut enfeksiyonu gösteren en önemli markerdir. Anti-HBcIgM'in sebat etmesi hastalığın kronikleşeceğinin işaretidir. Anti-HBcIgM kronik HBV enfeksiyonunda düşük titrede bulunur. Anti-HBcIgM'in 7-8S formunun kronik HBV enfeksiyonunda, 19S formunun ise akut enfeksiyonda dominant olduğu bildirilmektedir (94, 96, 98).

HBV'ne maruz kalanlarda anti-HBcIgG yıllarca veya hayat boyu pozitif kalabilir. HBsAg taşıyıcılarında anti-HBcIgG yüksek titrede bulunur. Anti-HBs olmadan yüksek titrede anti-HBcIgG olması viral enfeksiyonun devam ettiğini gösterir. Anti-HBs ile birlikte anti-HBcIgG'nin düşük titrelerde bulunması hepatit B enfeksiyonunun çok eskiden geçirildiğini gösterir (98).

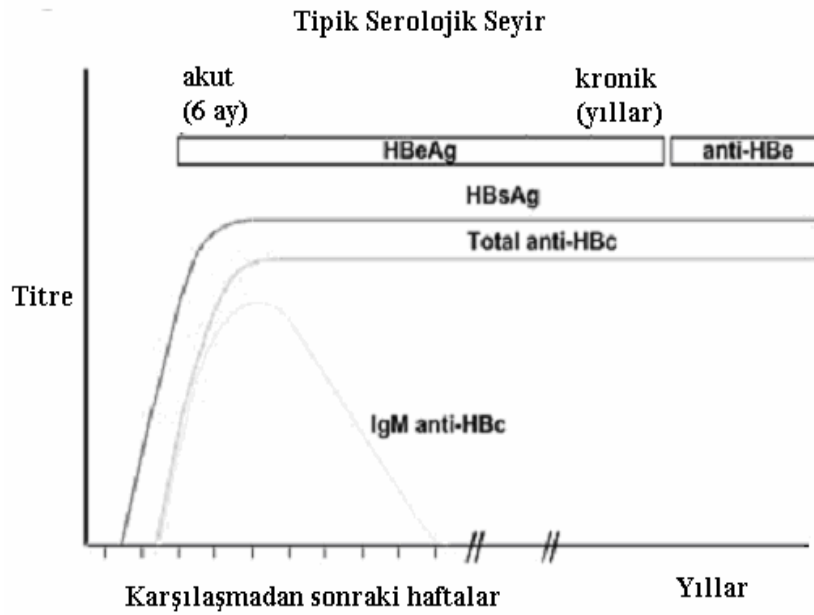
HBeAg viral replikasyonun devam ettiğini ve infektiviteyi gösterir, HBsAg'den kısa bir süre sonra pozitifleşir, 10 haftadan daha uzun süre devam etmesi enfeksiyonun kronikleşeceğinin belirtisidir. Anti-HBe nisbeten düşük infektivitenin ve hastalığın tamamen iyileşeceğinin güçlü bir göstergesidir. Anti-HBe genellikle akut enfeksiyondan yıllar sonra kaybolur. HBV-DNA viral replikasyonun en sensitif göstergesidir. HBsAg varlığında PCR ile serumda HBV-DNA tespiti viremi düzeyini ortaya koyan en iyi markerdir ve serum transaminaz düzeyleri ile koreledir (97, 98).

	HBsAg	Anti-HBs	Anti-HBc	Anti-HBc IgM	HBeAg	Anti-HBe	HBV-DNA
İnkübasyon	+	-	-	-	(+)	-	+
Akut	+	-	+	+	+	-	+
Sona ermiş enf.	-	+	+	-	-	+/-	-
Sağlıklı taşıyıcı	+	-	+	-	-(+)	+(-)	-(+)
Persistent	+	-	+	-(+)	-/+	+/-	-/+
Kron. aktif	+	-	+	+/-	+/-	-/+	+

Tablo 2: Viral Hepatit B'de Klinik-Serolojik Korelasyon

Kronik Hepatit B'de Klinik Bulgular ve Tanı: Sağlıklı yetişkinlerde akut enfeksiyondan sonra kronikleşme riski %5 civarındadır (99). Altı aydan uzun süre serumda HBsAg tespit edilmesi taşıyıcılığı ifade eder. Serum transaminaz değerleri normal olan ve karaciğer hastalığının diğer belirtileri olmayan HBsAg pozitif kişilere sağlıklı taşıyıcı terimi kullanılmaktadır (98). Kronik HBsAg taşıyıcılarının sadece %1-2'sinin her yıl HBsAg negatif olacakları tahmin edilmektedir. HBeAg kaybolduğu zaman HBV replikasyonu sona erer ve kronik HBsAg taşıyıcıları enfeksiyonun nonreplikatif dönemine geçerler. HBeAg-antiHBe serokonversiyonunun yıllık %2.7-25 oranlarında gerçekleştiği bildirilmektedir.

Genellikle taşıyıcılarda anti-HBc pozitifdir. HBeAg'nin pozitif, anti-HBe'nin negatif olması viral replikasyonun olduğunu; HBeAg'nin negatif anti-HBe'nin pozitif olması replikasyonun sona erdiğini gösterir. Ancak bazı durumlarda anti-HBe pozitif olmasına rağmen HBV-DNA'nın pozitif olması mutant bir HBV enfeksiyonunu gösterir (98). Bu durum kronik hepatitlerde prognoz ve tedavinin belirlenmesi bakımından oldukça önemlidir. Anti-HBe pozitif olgularda %20, HBeAg pozitif olgularda %80 oranında HBV-DNA'nın gösterilmesi, HBsAg pozitif vakalarda viral replikasyonun varlığını göstermesi bakımından özellikle kronik hepatitlerde PCR ile HBV-DNA bakılmasını zorunlu hale getirmiştir.



Şekil 8: HBV Enfeksiyonunda Kronik Progresyon

Yapılan çalışmalara göre HBeAg pozitif olan annelerde HBV'nin bebeklere geçiş riski %80-90 kadardır ve HBV enfeksiyonuna yakalanan yenidoğanların %85-90'ında kronik HBsAg taşıyıcılığı ve daha sonra da kronik karaciğer hastalığı gelişmektedir (80, 81). Hastalığın kronikleşmesi karaciğerde viral replikasyonun devam etmesine ve hastanın immünolojik durumuna bağlıdır.

Kronik hepatit sıklıkla sessiz bir hastalıktır. Çoğu hasta akut bir hastalık dönemi geçirdiğini hatırlamaz. Teşhis genellikle donör olarak kan verme esnasında veya rutin kan taraması sırasında HBsAg pozitif bulunduğu ve serum transaminazlarında orta derecede yükseklik tespit edildiği zaman konabilir.

Kronik hepatit B'de en önemli genel semptom yorgunluktur. Diğer semptomlar bulantı, üst abdominal ağrı, kas ve eklem ağrıları şeklindedir. Klinik bulgular sarılık, nadiren örümcek nevüs, büyük veya küçük karaciğer ve splenomegalidir. Ascit ve özefagus varis kanamaları geç ortaya çıkan portal hipertansiyon belirtileridir.

ALT, AST ve gamaglobulin orta derecede yükselmektedir. Serum bilirubin ve albumini ciddi hastalık dışında normaldir. Serum transaminazları karaciğerdeki hastalığın ciddiyetini tam olarak yansıtmaz ancak yaklaşık bir fikir vermesi açısından hafif şiddette <100 IU, orta şiddette 100-400 IU, ağır şiddette >400 IU olarak kullanılmaktadır (54).

Asemptomatik HBsAg pozitif 242 kan donörünün karaciğer biyopsilerinde %95 normal, %5 kronik aktif hepatit veya siroz bulguları tespit edilmiştir. Uzun dönemde, klinik ve histolojik olarak takibinde; taşıyıcıların %5.4'ünde kronik aktif hepatit geliştiği bildirilmiştir (100). Kronikleşme daha çok yenidoğan, homoseksüel, AIDS'li, lösemi ve kanser, böbrek yetmezliği ve immünsüpressif tedavi alanlar gibi immün sistemi yetersiz olan hastalarda görülür (98).

HBsAg taşıyıcılığı ile kronik hepatit arasındaki ayırım, karaciğerdeki kronik nekroinflamatuvar hastalığın histolojik olarak ortaya konması ile mümkündür. HBsAg pozitif, serum transaminazları yüksek olan kronik hepatitli bir hastada immünohistokimyasal yöntemlerle HBsAg ve HBcAg'nin gösterilmesi kesin teşhis koydurucudur (98).

2.13. Gizli HBV İnfeksiyonu

HBV infeksiyonunun iyileşmesi, HBsAg'nin kaybolması ile birlikte HBV—DNA'nın negatifleşmesi olarak tanımlanır. Bununla birlikte spontan veya tedavi ile HBsAg' si kaybolan bazı hastalarda serum ve/veya karaciğerde hassas PCR teknikleri ile düşük düzeyde HBV-DNA (genellikle $<10^3$ viral genom/ml) varlığı gösterilmiştir (101). Böylece saptanamayan HBsAg ile birlikte kronik HBV infeksiyonunu tanımlayan bu yeni durum okült: sessiz veya latent HBV infeksiyonu olarak adlandırılmaktadır. Okült HBV infeksiyonluların bir kısmında anti-HBc ve/veya anti-HBs pozitifdir. Hastaların önemli bir kısmında her ikisi de negatiftir.

Okült HBV infeksiyonu bazı hasta gruplarında daha sıktır (102):

- HCC'li kronik HCV infeksiyonu olanlar,
- antiHBc(+) vericilerden karaciğer alanlar,
- antiHBc(+) kronik hepatit C'liler,
- Kriptojenik siroz/ fibrozis olguları,
- Hemodiyaliz hastaları,
- İntravenöz uyuşturucu kullananlar.

Gizli HBV İnfeksiyonu Mekanizması

Okült HBV infeksiyonu iyi gösterilmiş bir klinik durum olmasına rağmen, mekanizması tartışmalıdır:

1-S bölgesinde mutasyon

Pre-S/S bölgelerindeki herhangi bir mutasyon HBsAg antijenitesini veya üretimini etkileyebilir. Bazı okült HBV infeksiyonlu hastalarda belli pre-S/S mutasyonları (amino asid [aa] 124-147, aa 98-156) gösterilmiştir (104). Tek bir mutasyon tanımlanmamasına rağmen, aynı bölgedeki mutasyonların sıklığının artması en azından bazı hastalarda patogeneze sorumlu olabilir (104, 105).

2- Genoma integrasyon

Okült HBV infeksiyonlu hastalarda genoma entegre veya serbest episomal HBV-DNA molekülleri gösterilmiştir (118). HBV-DNA entegrasyonu virus DNA

zincirinin yeniden düzenlenmesine neden olabilir. Sonuçta HBsAg ekspresyonu azalabilir veya durabilir. Okült HBV infeksiyonu olan HCC'lilerde HBV entegrasyon sıklığı fazla bulunmuştur (108).

3- Periferik kandaki mononükleer hücrelerde (PKMH) HBV infeksiyonu

Akut ve kronik HBV infeksiyonu sırasında PKMH'de HBV-DNA sıktır (106). HBV'ye bağlı karaciğer hastalığı nedeni ile karaciğer nakli olan hastalarda yüksek doz hiperimmünglobulin verilmesi serumda HBsAg'nin ve karaciğerde HBV-DNA'nın negatif kalmasını sağlar; bununla birlikte bu hastalarda PKMH'de HBV-DNA varlığı gösterilmiştir (107). Bu durum karaciğer nakli sonrasında nüks HBV infeksiyonlarından sorumlu olabilir.

4- HBV içeren immün kompleksler

Akut HBV infeksiyonu ardından anti-HBs oluşsa bile, kanda immünkompleks halinde HBV partiküllerinin varlığı devam edebilir. HBV içeren immünkomplekslerin nasıl devamlılığını sürdürdüğü belli değildir. Kronik HBV infeksiyonu sonrasında HBsAg negatifleşip HBV-DNA PCR ile pozitif saptanan okült HBV infeksiyonlu hastaların serumlarında ise HBV içeren immün kompleksler bulunmamıştır (108).

5-Konak immün cevabı

HBV infeksiyonunun seyri, konak immün cevabı ile viral replikasyon oranının dengesine bağlıdır. Virus eliminasyonunda hem hücresel, hem de humoral faktörler rol oynar. HBV proteinlerine karşı gelişen multispesifik yeterli T hücre cevabı ile virus klirensi olurken, yetersiz immün cevap, virusun kalıcı olmasına neden olur (103, 105). Teorik olarak konak immün cevabının azalması okült HBV infeksiyonu gelişimini kolaylaştırır. Karaciğer nakli sonrasında immünsupresyon ile HBV infeksiyonunun nüks etmesi buna bir örnektir. Ayrıca kronik C hepatitli hemodiyaliz hastalarında da okült HBV infeksiyon oranı (%36.4) yüksektir (111).

6- Koinfeksiyon

Kronik C hepatit'li hastalarda okült HBV infeksiyonu sıktır. Kronik HBV ve HCV ko-infeksiyonunda HBV-DNA düzeyi düşük olma eğilimdedir ve önemli oranda HBsAg klirensi gerçekleşir (115).

7- Diğer olası mekanizmalar

Nükleotid dizi analizlerine göre HBV'nin A'dan F'ye kadar 6 farklı genotipi tespit edilmiştir (119). Genotip, hastalık aktivitesini, prognozunu ve tedaviye cevabı etkilemektedir. Okült HBV enfeksiyonlu hastaların %61'i genotip D'dir. Buna karşılık HBsAg pozitif hastaların %53'ü genotip A'dır. Bu sonuçlarda okült HBV enfeksiyonu gelişiminde genotipin de etkili olabileceğini düşündürmektedir. Türkiye'deki HBV genotipi D' dir; diğer tipler nadir olarak görülmektedir (115).

Gizli HBV Enfeksiyonunun Klinik Önemi

Rutin yapılan anti-HCV ve HBsAg taramaları ile bulaşma riski düşük olmasına rağmen, hala transfüzyon ile HBV enfeksiyonu bulaşma riski 1/63.000, HCV enfeksiyonunun ise 1/103.000'dür. Okült HBV enfeksiyonunun buna katkısı vardır.

Organ nakilleri sırasında, vericideki okült HBV enfeksiyonu, alıcıya HBV enfeksiyonunu bulaştırabilir.

Hemodiyaliz hastalarında okült HBV enfeksiyon oranı %14-36'dır; Böbrek nakli sonrasında HBsAg negatif, anti-HBs pozitif bir hastada de-novo HBV enfeksiyonu bildirilmiştir. Bu hastanın nakil öncesindeki serumu retrospektif olarak incelendiğinde PCR ile HBV-DNA'nın pozitif olduğu görülmüştür (104).

Kriptojenik karaciğer hastalıklarında okült HBV prevalansı coğrafik bölgeye göre değişmektedir. Hindistan'dan yapılan bir çalışmada HBV ve HCV açısından serolojik göstergeleri negatif olan kronik hepatitli hastalarda PCR ile bakılan HBV-DNA oranı %10.8 olarak bulunmuştur (109).

Sitotoksik tedavi ve otolog kemik iliği naklinden sonra kronik hepatit B reaktivasyonu, hatta fulminan karaciğer yetersizliği gelişebilir (110, 111).

HBsAg negatif fulminan karaciğer yetersizliği vakalarının önemli bir kısmında (%0-47) HBV-DNA pozitif bulunmuştur (112, 113). Oranlardaki bu değişkenlik HBV'nin coğrafik dağılımı ile ilgilidir. Fulminan B hepatitli hastalarda çeşitli HBV mutasyonları bildirilmiştir (114).

HCV enfeksiyonu HCC gelişim riskini artırmaktadır. HBV ve HCV ko-enfeksiyonu bu riski daha da artırmaktadır. Sadece HCV enfeksiyonu olan hastalarla, HCV ile birlikte okült HBV enfeksiyonu olanlar, HCC gelişim süresi açısından

karşılaştırıldıklarında; okült HBV enfeksiyonu olanlarda daha erken sürede HCC geliştiği görülmüştür (116).

HBV ve HCV ko-enfeksiyonu sık görülen klinik bir durumdur. HCV ile okült HBV enfeksiyonunun birlikteliğinin klinik önemi bilinmemektedir. Bazı çalışmalar bu birlikteliğin siroz gelişme riskini daha çok arttırdığını vurgulamaktadır (117). Ayrıca IFN cevabı da iyi değildir.

Sonuç olarak, PCR gibi hassas testlerin gelişmesi ile okült HBV enfeksiyonu tanımlanmıştır. Bu klinik durumu saptamada anahtar HBV-DNA olduğu için kullanılan teknik ve standardizasyonu çok önemlidir. HBV'nin coğrafik dağılımı ve risk faktörlerinin varlığı prevalansı etkilemektedir. Patogenez ve klinik öneminin belirlenmesi için ise ilave çalışmalara gereksinim vardır.

2.14. Tanı ve Tedavide Kullanılan Testler ve Standardizasyon

HBV-DNA

HBV enfeksiyonunun virolojik tanısı ve izlenmesi, özgül antikorların, antijenlerin ve nükleik asidin saptanması ve kantitasyonu ile yapılmaktadır. HBV- DNA'nın kanda saptanması, aktif HBV replikasyonunun güvenilir bir göstergesi olup, enfeksiyonun tanısında, evrelendirilmesinde, tedaviye karar vermede ve tedavi başarısının izlenmesinde önemli rol oynamaktadır.

Tipik bir akut HBV enfeksiyonu sırasında kanda HBsAg, virusla karşılaşmadan 30-60 gün sonra (ALT düzeyinin yükselmesinden 2-4 hafta, semptomlar/sarılığın saptanmasından 3-5 hafta önce) olumlulaşmaktadır (123). HBV-DNA ise, HBsAg'den 3-5 hafta önce saptanabilmekte, tepe noktasına ulaştıktan sonra giderek azalmakta ve enfeksiyonun spontan olarak sonlanması ile kaybolmaktadır. Kronik HBV enfeksiyonu gelişen hastalarda enfeksiyonun dönemine bağlı olarak kan-HBV-DNA düzeyinde oynamalar saptanmakta, karaciğer dokusunda ise HBV-DNA olumluluğu kalıcı olmaktadır.

HBV-DNA Testleri

Testler iki grupta toplanır:

1. Hibridizasyon temelli testler (sinyal amplifikasyonu). Viral DNA, işaretli prob yardımıyla saptanır. Probdan elde edilen sinyal çoğaltılarak ölçülür. Dinamik

aralıkları geniş, duyarlılıkları 10^{5-6} kopya/ml civarındadır. Dinamik aralığı koruyarak daha duyarlı testlerin geliştirilmesi çalışmaları sürmektedir.

2. Nükleik asid amplifikasyon temelli testler. Viral DNA çoğaltıldıktan sonra saptanır. Nükleik asidin çoğaltılması amacıyla polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) veya transkripsiyon üzerinden amplifikasyon (TMA) gibi yöntemler kullanılabilir. Dinamik aralıkları dar, duyarlılıkları 50-1000 kopya/ml civarındadır.

HBV-DNA Testinin Amaca Uygun Kullanımı

HBV-DNA testi yöntemine karar verirken, amaç önemlidir:

1. HBsAg negatif HBV enfeksiyonunun tanısı: Kan/organ donörlerinin taranması veya gizli (okült) HBV enfeksiyonu tanısı amacını taşır (121).

2. HBV enfeksiyonun evrelendirilmesi: Kronik HBV enfeksiyonu ile inaktif HBsAg taşıyıcılığının ayırd edilebilmesinde diğer faktörlerin (HBeAg veya anti-HBe varlığı, ALT/AST düzeyi, karaciğer biyopsisi) yanısıra serum HBV-DNA miktarı da anlamlıdır (122).

3. Tedavi başarısının izlenmesi: Kronik HBV enfeksiyonu tedavisinde ana hedeflerden biri HBV replikasyonunu baskılamak olduğu için kantitatif HBV-DNA izlemi önemlidir. Antiviral tedavi ile viral yükün hızlı ve etkin düşürülmesi, başarı şansını arttırmaktadır (124, 125).

4. cccDNA'nın saptanması ve kantitasyonu: Özgüllük ve standardizasyon sorunları nedeniyle yöntemin kullanımı sınırlı ve genellikle araştırma amaçlıdır (120).

2.15. Tedavi

Kronik Hepatit B'de interferon tedavisi

1970'lerden beri denenen ve üzerinde en çok araştırma yapılan ajanlardan interferon (IFN) alfa2b kronik hepatit B'de kullanım için onay alan ilk ilaç olmuştur(126).

IFN tedavisi, pahalıdır ve yan etkileri fazladır. Ayrıca etkinlik oranı, vaka seçimine bağlı olarak çok değişir. Her kronik B hepatiti vakasına IFN kullanılmaz. Hangi vakalara kullanılacağına iyi anlaşılabilmesi için, öncelikle interferonların etki mekanizmaları ile HBV enfeksiyonunun seyrini anlatmak yararlı olacaktır.

IFN tedavisi için en uygun zaman, replikasyon döneminin immunaktivasyon fazıdır. Yani amaç; II. fazdan III. faza geçişi önlemek, replikatif virüsü hepatositlerden temizlemektir. IFN'dan öncelikle beklenen etki, viral replikasyonu inhibe ederek progressiv karaciğer harabiyetini durdurmak olmalıdır. Başka deyişle faz I, III ve IV'de tedavi genellikle gereksizdir. IFN'u, integrasyon safhasına girildikten veya karaciğer harabiyeti dekompanse hale (siroz, HCC) geldikten sonra kullanmanın bir anlamı olmayacaktır (127, 128, 129).

Akut Hepatit B' de İnterferon Tedavisi

Akut hepatit B'de az sayıda çalışmada IFN denenmiştir. Bununla beraber akut hepatit B'de IFN tedavisi gereksiz ve faydasız kabul edilmektedir (132).

İnterferon Dışı Tedaviler

İmmünomodülatör ilaçlar:

1- Kortikosteroidler,

2- Timozin alfa-1,

3-Hepatit B aşılı,

4-Diğer immünomodülatör ilaçlar:

Levamisol,

IFN beta ve IFN gama,

İnterlökin-2,

Koloni stimüle edici faktörler (130).

5-Nükleozid Analogları: HBV, RNA virusları gibi "reverse transcriptase" enzimi sayesinde RNA'dan DNA sentezi yapabilmektedir. Bu enzimi inhibe eden pek çok ilaç son yıllarda kronik HBV enfeksiyonunda denenmeye başlanmıştır. Bugün için kronik B hepatiti tedavisinde en çok ümit verici görünen lamivudin ve famsiklovirdir(131).

3. MATERYAL VE METOD

2007 Şubat-Mayıs ayları arasında SDÜ Tıp Fakültesi Hastanesi Kan Merkezi'ne başvuran 2538 kan donörü çalışmaya alındı. 2538 kan donörü; 18-65 yaş arası gönüllüler içinden seçilmiş ve anti-HCV, HIV ve HBsAg testleri VITROS (Johnson&Johnson Company) cihazında ELISA yöntemiyle taranmıştır. Kan donörlerinden 38 (%1.49)'i HBsAg pozitif bulunmuş ve ileri çalışmalara alınmamıştır. Geriye kalan 2500 HBsAg negatif kan donörü, anti-HBc total tespiti için çalışmaya dahil edilmiştir.

Donör kanları 10 dakika 4000 devirde santrifüj edildi. Biyokimya tüplerinde hemoliz olmamasına dikkat edildi. Serum örneklerinden HBsAg negatif olanlar numaralandırılarak steril eppendorflara, steril pipet uçları kullanılarak 1ml'lik miktarlarda aktarıldı. Aktarıma işlemi biten serumlar depolama şartlarına uygun olarak hemen eksi 80 derece dondurucuya nakledildi. Çalışma gününe kadar dondurucuda stoklandı.

Geriye kalan HBsAg negatif 2500 serum örneğine anti-HBc total testi çalışıldı. Bu çalışma sonucunda 401 serum örneği anti-HBc total pozitif olarak bulundu. 401 adet anti-HBc total pozitif serum örneğine; anti-HBsAb, HBeAg ve anti-HBeAb testleri çalışıldı.

Anti-HBc total, Anti-HBs, HBeAg ve Anti-HBe ELISA

Anti-HBc total, Anti-HBs, HBeAg ve Anti-HBe ELISA (DIA PRO, Diagnostic Bioprobes, Milano-Italy) insan serum veya plazmasında HBV virusuna spesifik antijen ve antikorların tespitinin yapıldığı enzyme linked immunoassay (ELISA) yöntemleridir. Mikroplak kuyucukları rekombinant protein ve HBV sentetik peptidlerinin multipl epitoplari ile kaplanmıştır. Serum veya plazmada HBV antijen ve antikorları varlığında, peptid ve rekombinant proteinler ile reaksiyona girer ve solid faza yapışırlar. Non-spesifik antijen ve antikorlar yıkama tamponu ile uzaklaştırılır. Antijenik proteinlere bağlı HBV spesifik human IgG, goat-anti-human IgG peroxidaz konjugatı ile reaksiyona girer ve kromojenik substratlı son reaksiyon ile gözlemlenebilir. Reaksiyonun yoğunluğu fotometrik olarak okutulur.

Test Prosedürleri

- Çalışmadan önce bütün reagentler oda ısısına getirildi.
- Mikroplaktan negatif kontrol, pozitif kontrol ve blank (kör kuyucuk) için 2 kuyucuk ayrıldı. Tüm serum örnekleri (negatif ve pozitif kontrol hariç) için, numune diluentinden 100µl dağıtıldı.
- İlk 2 kuyucuk blank için ayrıldıktan sonra negatif ve pozitif kontrol serumlarının 100µl'si mikroplağın sonraki ikişer kuyucuğuna ve her bir serum örneğinin 50 veya 100 µl'si diğer kuyucuklara sırasıyla eklendi.
- Yavaşça çalkalanıp, 37 °C'de 60 dakika inkübe edildi.
- Konsantre yıkama tamponu distile su ile 20 kat dilüe edildi. İnkübasyondan alınan plağın bütün kuyucukları boşaltıldı ve dilüe yıkama tamponu ile yıkandı ve kurutuldu. Bu yıkama işlemi 5 kez tekrarlandı.
- Her bir kuyucuk için 100 µl enzim konjugat (Horse Radish Peroksidaz) eklendi.
- 37 °C'de 60 dakika inkübe edildi.
- Yıkama işlemi tekrarlandı.
- Her bir kuyucuğa 100 µl substrat solusyonu (TMB:Tetra-Methyl-Benzidin) eklendi.
- 25 °C'de 20 dakika karanlıkta inkübe edildi.
- Renk reaksiyonunun sonlanması için her bir kuyucuğa stop solüsyonunun (2N sülfürik asit=H₂SO₄) 50 µl'si dağıtıldı.
- ELISA okuyucusunda (ELISA Reader ELX 800, Biotek) 450 nm dalga boyunda okutuldu.

HBcAb test'i: DIA.PRO-HBcAb hazır kiti içindeki recombinant HBcAg kaplı microplate'lerden oluşmaktadır. Üretici firmanın önerileri doğrultusunda yukardaki prosedüre uygun olarak çalışılmıştır.

Değerlendirme: (anti-HBcAb)Cut-off=(NC+PC)/5 formülü ile Cut-off değeri hesaplandı. Cut-off değeri örneğin optik dansite değerine bölündü. 0.9'dan küçük çıkan değerler negatif, 0.9-1.1 arası çıkan değerler borderline, 1.1'den büyük çıkan değerler ise pozitif olarak yorumlandı. Bu çalışmada borderline sonuç veren örnek tespit edilmedi.

HBsAb test'i: DIA.PRO-HBsAb hazır kiti içindeki recombinant HBsAg kaplı microplate'lerden oluşmaktadır. Prosedüre uygun olarak çalışılmıştır.

Değerlendirme: CAL 2 nin optik dansite değerinden yüksek çıkan değerler pozitif, düşük çıkan değerler negatif olarak yorumlandı.

HBeAg test'i/HBeAb test'i: Üretici firmanın HBeAg/HBeAb ortak kullanılan 'spesifik monoklonal anti-HBe antikor kaplı' plate'lerine serumlardan 50'şer mikrolitre miktarında aktarıldı. Farklı olarak: Antikor tesbiti için kit içinde hazır bulunan HBeAg solüsyonundan tüm kuyucuklara 50'şer mikrolitre eklendi. Diğer aşamalar HBeAg testinden farksız olarak uygulandı. Eğer örnekte anti-HBe antikorları varsa rekombinant HBe antijenleriyle birleşmek için kuyucuklara sıvanmış bulunan sabit miktarda anti-HBe antikorları ile yarışır. Kompetitif deney iki inkübasyondan oluşur: Birincisi; örnek ve rekombinant HBe antijeni ile, ikincisi ise; peroksidazla işaretli iki HBe monoklonal antikorlu içeren plate ile; solid fazdaki bağlı enzim konsantrasyonu serumdaki anti-HBe antikorlarının miktarı ve aktivitesi ile ters orantılıdır. Bu aktivite üçüncü inkübasyonda kromojen/substrat eklenmesi ile tespit edilir. Örnekteki HBe spesifik antikor konsantrasyonu, anti-HBe antikorlarının semikantitatif olarak ölçülmesini sağlayan cut-off değeri vasıtasıyla hesaplanır.

Değerlendirme: (HBeAg)Cut-off=NC+0.100 formülü ile Cut-off değeri hesaplandı. Örneğin optik dansite değeri, Cut-off değerine bölündü. 0.9'dan küçük çıkan değerler negatif, 0.9-1.1 arası çıkan değerler borderline, 1.1'den büyük çıkan değerler ise pozitif olarak yorumlandı. Borderline sonuç veren 8 örnek tekrar çalışılıp, negatif gruba dahil edildi.

Değerlendirme: (anti-HBeAb)Cut-off=(NC+PC)/3 formülü ile Cut-off değeri hesaplandı. Cut-off değeri örneğin optik dansite değerine bölündü. 0.9'dan küçük çıkan değerler negatif, 0.9-1.1 arası çıkan değerler borderline, 1.1'den büyük çıkan değerler ise pozitif olarak yorumlandı. Bu çalışmada borderline sonuç tespit edilmedi.

İstatistiksel Değerlendirme

Veriler SPSS 11.0 for Windows istatistik paket programında değerlendirilmiş ve istatistiksel anlamlılık için $p < 0.05$ kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

Çalışmaya alınan 2538 kan donöründen 38'i HBsAg pozitif bulundu. Yani Hepatit B taşıyıcılık oranı %1.49 olarak bulunmuştur. Geriye kalan HBsAg negatif 2500 serum örneğinin tamamına anti-HBcAb testi çalışılıp, 2099 örnek anti-HBcAb negatif bulunurken, 401 (%16.04) örnek anti-HBcAb pozitif tesbit edildi. Sonuçta bölgemiz kan donörlerinde hepatit B ile karşılaşma oranı %17.29 olarak bulundu.

Anti-HBcAb pozitif 401 donör serum örneğine sırasıyla anti-HBs, anti-HBe ve HBeAg testleri çalışıldı. Anti-HBcAb pozitif 401 donörün, 349 (%87)'u anti-HBs pozitif, 52 (%13)'si negatif bulundu. Yani izole anti-HBc pozitifliği %2 (52) olarak bulundu. Yine anti-HBcAb pozitif 401 donörün, 11 (%2.7)'i HBeAg pozitif ve 125 (%31.1)'i anti-HBe pozitif; 390 (%97.2) HBeAg negatif ve 276 (%68.9) anti-HBe negatif tesbit edildi. 114 örnekte anti-HBcAb, anti-HBsAb ve anti-HBeAb birlikte pozitif idi. 11 örnekte anti-HBcAb ile anti-HBeAb pozitif. 8 örnekte anti-HBcAb, anti-HBsAb ve HBeAg pozitif, 3 örnekte anti-HBcAb ve HBeAg pozitif bulundu. 39 örnekte sadece anti-HBcAb pozitif iken anti-HBsAb, anti-HBeAb, HBeAg negatif bulundu. Buna göre; salt anti-HBc pozitiflik oranı %1,5 olarak bulundu.

	Pozitif		Negatif	
	n	%	n	%
Anti-HBs (n=401)	349	87	52	13
Anti-HBe (n=401)	125	31,1	256	68,9
HBe Ag (n=401)	11	2,7	390	97,3

Tablo 3: Anti-HBc Total Pozitif Donörlerde Anti-HBs, Anti-HBe, HBeAg Oranları

	Anti-HBs (+)	Anti-HBs (-)
Anti-HBe(+) n=125	114(%91,2)	11(%8,8)
HBe Ag (+) n=11	8(%72,7)	3(%27,3)

Tablo 4: Anti-HBs Pozitif-Negatifliğine Göre HBeAg ve Anti-HBe Pozitifliği

5. TARTIŞMA

Tüm dünyada akut ve kronik HBV infeksiyonu önemli bir halk sağlığı problemi oluşturmaktadır. Hepatit B virusu, dünyada yıllık yaklaşık olarak bir milyon kişinin ölümüyle sonuçlanan kronik hepatit, siroz ve hepatosellüler karsinoma gibi hastalıkların en sık sebebidir. Neonatal immunizasyona rağmen dünyada halen 400 milyon kişi HBV taşıyıcısı konumundadır. HBsAg pozitifliği oranı Birleşik Amerika ve Kuzey Avrupa ülkelerinde %0.1-0.2 iken bu oran Afrika ve Uzak Doğu'da %10-15 civarındadır. Türkiye hepatit infeksiyonu yönünden orta endemisiteye sahip ülkeler grubunda yer almakta, HBsAg taşıyıcılık oranı %2-7, HBV seropozitifliği ise 20-60 olarak bildirilmektedir.

HBV ile karşılaşma oranlarına bakılabilmesi için farklı yöntemler uygulanabilir. HBV ile karşılaşma oranları hakkında bilgi edinebilmek için HBsAg, anti-HBc total ve anti-HBs değerlerine bakılabilir. Bu üç testten herhangi birinin veya ikisinin birlikte pozitifliği toplamı bize HBV ile karşılaşma oranını verir. Ancak anti-HBs antikoru aşılama sonucunda anti-HBc total oluşmadan bulunabileceği için, günümüzde bu testin uygulanması çok doğru değildir. Bu nedenle HBsAg, anti-HBc total düzeylerine bakılarak birinin, ya da herikisinin pozitifliği bizlere karşılaşma oranlarını vermesi açısından önemlidir. Bu çalışmada, 2538 kan donörü örneğinde 38 tane HBsAg pozitif tesbit edildi. Bu sonuç bize %1.49 HBsAg taşıyıcılığı oranını verdi. Geriye kalan 2500 örneğin 401'inde (%16.04'ünde) anti-HBc total pozitif bulunması ile bizim bölgemiz için karşılaşma oranının %17.29 olduğunu gösterdi. Türkiye'de karşılaşma oranı %20-60 sınırları arasındadır (153). Ülkemiz bu oran ile dünyada orta endemisite grubu ülkeler içindedir. Bizim bulduğumuz oran ülkemiz ortalamasından düşüktür. Ancak bizdeki oranın düşük çıkması çalışmaya aldığımız grubun kan donörlerinden seçilmiş olmasından kaynaklanabilir. Çünkü kan donörlerinde HBsAg pozitif olanların tekrar kan vermeye gelmemeleri ve hasta olanların donör olarak kabüllerinin kısıtlanmış olması gibi sebeplerle oranlar da düşük çıkmış olabilir. Yine de bizim bulduğumuz taşıyıcılık ve karşılaşma oranlarının, orta endemisite grubunda yer alan ülkemizde görülen oranlardan düşük çıkması; üstelik ülkemizde 1998 yılında başlayan aşı çalışma programından önceki toplumu gösterdiği için de sevindiricidir. Çünkü; çalışma grubumuzda yaş dağılımı 18-65 sınırları arasındadır. 1998 yılında

başlayan Hepatit B aşı çalışmaları ile ülkemizde HBsAg taşıyıcılık ve karşılaşma oranlarında bir azalma olacağı muhakkaktır. Bu aşılama grubu bizim çalışma grubu profilinde yer almadı. Bizim bölgemiz için karşılaşma oranlarının bu seviyede olması ve aşılama programı ile ileriki yıllarda bu oranların bölgemiz dahil tüm ülkemiz için daha da düşüş göstereceği ümit edilebilir.

Ülkemizde HBV enfeksiyonu seroprevalansının araştırıldığı çalışmalar oldukça yetersizdir. Bu grupta yapılan çalışmalar içinde en yüksek olgu sayısının bulunduğu araştırmalardan biri (1190 olgu %7.1 HBsAg seropozitifliği, %21.9 anti-HBs seropozitifliği) Pasha ve ark. tarafından yapılmıştır (133). Anti-HBs'nin tarandığı çalışmalardan elde edilen verilere göre anti-HBs pozitifliği oranı %20.6-52.3 arasında değişmektedir (133). Böylece Türkiye'de HBV enfeksiyonu seroprevalansının (HBsAg pozitifliği+anti-HBs pozitifliği) %25-60 arasında olduğu söylenebilir ki bu oranlar gelişmiş ülkelere göre oldukça yüksektir (153). Daha önce Isparta Kızılay Kan Merkezinde yapılan bir çalışmada bölgemizin 18-65 yaş sınırları arasındaki kan donörlerinde HBsAg pozitifliği oranı %2.29 bulunmuştur. Ankara'da 1985-91 yılları arasında askerlerde incelenen HBsAg oranları %5 ile 10.1 arasında rapor edilirken, İzmir'de bu oran %5.1 bildirilmiştir (135). Kıbrıs'ta yapılan bir çalışmada askerlerdeki HBsAg pozitiflik oranı %2.3 ve anti-HCV oranı ise %0.5 bildirilmiştir (136). Yine Isparta verileri, daha önce bölgemizde yapılan hepatit dışı hastalığı olanlarda saptanan %3.5 HBsAg pozitiflik oranı ile uyumludur (137). Mersin'deki bir çalışmada hastaneye başvuran hastalardaki HBsAg pozitifliği %13.66 ve anti-HCV oranları %3.9 bulunmuştur (138). Bu veriler, bölgemizde seropozitifliğin ülkemiz değerlerinin alt sınırlarında olduğunu göstermektedir.

Donör dışı normal popülasyonda HBsAg seroprevalansının araştırıldığı çalışmaların çoğu şehirlerde yaşayan erişkinlerde yapılmıştır. Halbuki toplumdaki normal popülasyona ait gerçek prevalansı bulabilmek için kentler ve kırsal kesimdeki tüm yaş gruplarının taranması gerekir. Kentten ve kırsal kesimden olguları bir arada içeren nadir çalışmaların bir kısmında belirgin seropozitivite farkının olmadığı, bazılarında da HBsAg pozitifliğinin kırsal kesimde kentlere göre düşük bulunduğu belirtilmektedir. Bu çalışmaların genel sonuçlarına göre HBsAg sıklığının %1.1-12.4 arasında değişmekte olduğunun belirlenmesine rağmen, bu konuda ayrıntılı araştırmalara ihtiyaç vardır (133). Bu grupta yapılan çalışmalar içinde en yüksek olgu

sayısının bulunduğu araştırma (3544 olgu %4.5 HBsAg seropozitifliği) Sarpel ve ark. tarafından yapılmıştır (133). HBsAg seropozitifliği bölgesel farklılık ve çalışılan grupların özelliklerine (asker, normal popülasyon, kan donörü gibi) bağlı olarak değişmektedir. Doğu ve Güney-doğu Anadolu Bölgesi'nde seropozitiflik oranları diğer bölgelere göre daha yüksektir. İstanbul'da yapılan çalışmalarda kan donörlerinde %4.4 ile %7.1 arasında pozitiflik bulunmuştur (148-152). Bizim çalışmamızda da HBsAg pozitifliği %1.49 olarak tespit edildi. Bu oran ülkemiz genelinden daha düşüktür.

Tek başına HBsAg seropozitifliğinin bilinmesi bize ancak taşıyıcılar hakkında fikir verebilir. HBV enfeksiyonu için seropozitifliğin bilinmesinde önemli olan göstergeler HBsAg yanında anti-HBs ve anti-HBc'dir. Hepatit göstergelerini belirlemeye yarayan ELISA kitlerinin yurtdışından ithal edilmesi nedeniyle tüm göstergelerin araştırıldığı seroepidemiolojik çalışmalar ülkemiz ekonomik şartlarına uygun olmaz. Bu nedenle hem daha ekonomik, hem de sağlıklı bir metod olarak kişide HBsAg ve anti-HBs göstergelerinin birlikte belirlenmesi yerine, inceleme yapılacak grubun önce anti-HBc yönünden taranması, anti-HBc pozitif bulunanlarda HBsAg'ne bakılması, HBsAg negatif bulunanlarda ise anti-HBs göstergesinin aranması uygun olur. Yukarıda anlatıldığı şekilde yapılan taramalarda tek başına HBsAg veya anti-HBs pozitiflikleri belirlenmemektedir (134). Ayrıca yalnızca HBsAg+anti-HBs bakılmasının başka sakıncaları da olabilir. Bu iki göstergenin pozitiflik toplamı gerçek HBV enfeksiyonu seropozitifliğini tam olarak göstermez. Çünkü anti-HBs pozitifliği enfeksiyonun geçirilmesi yanında aşılama sonucu da oluşur. Anti-HBc ise yalnız enfeksiyonu geçirmekle meydana gelmektedir. Bu nedenle HBV enfeksiyon seroprevalansının yapılacağı çalışmalarda uygulanabilecek en iyi yol gelecekte hepatit B aşılmasının daha da yaygınlaşacağı dikkate alınarak yukarıda bahsedilen öncelikle anti-HBc'nin taranacağı metoddur. HBsAg ve anti-HBs negatifliğinde anti-HBc pozitifliği izole anti-HBc olarak adlandırılmaktadır. Yapılan çalışmalar bunun oranının toplumda saptanan HBsAg pozitifliği oranı kadar olduğunu bildirmektedir (139). Ülkemizde yapılan çalışmalar bu oranın ortalama %3-5 kadar olduğunu göstermektedir (140-143). HBsAg negatif olgularda, HBV-DNA'nın saptanmış olması özellikle kan donörlerinde izole anti-HBc pozitifliğinin araştırılması gerekliliğini ortaya koymuştur (144-147). Bundan dolayı izole anti-HBc pozitifliği birçok ülkede donör tarama kriterleri arasına girmiştir ve pozitif saptanan kişiler donör olarak kabul edilmemektedir.

İzole anti-HBc pozitifliğinin akut infeksiyon göstergesi olan anti-HBcIgM pozitifliğinden kaynaklanıp kaynaklanmadığı da araştırılmalıdır. Değişik çalışmalarda %0 ile %3.3 arasında pozitiflik bulunmuştur (140, 141, 154). Önemli olan izole anti-HBc pozitifliğinde bulaştırıcılıktır. Bu konuda yapılan çeşitli çalışmalarda farklı sonuçlar elde edilmiştir. Donörlerde anti-HBc içeren kanlar ile infeksiyonun bulaşma oranının %14 olduğu bildirilmiştir (148). Bunun yanında İngiltere ve ABD’de çok sayıda donörde yapılan çalışmalarda izole anti-HBc pozitif donörlerin hiçbirinde HBV-DNA pozitifliğine rastlanılmamış ve donörlerde anti-HBc taranmasının anlamlı olmadığı bildirilmiştir (155, 156). İzole anti-HBc pozitifliği özel hasta gruplarında daha dikkatli değerlendirilmelidir. Yapılan çalışmalarda inflamatuvar hepatitli hastalar, hemodiyalizli veya organ transplantasyonu yapılan hastalar, homoseksüeller ve intravenöz uyuşturucu kullanımı öyküsü bulunan izole anti-HBc’li hastaların ortalama %40’ında HBV-DNA pozitif olarak bulunmuştur (157-159). Bizim çalışmamızdaki izole anti-HBc pozitif bulduğumuz olguların daha sonra HBV-DNA çalışması içine dahil edilmesi uygun olacaktır.

Hepatit B virüsü serolojik göstergelerinden anti-HBc, virüsle karşılaşmayı gösteren en duyarlı gösterge olmasına rağmen ticari olarak bulunan ve yaygın olarak kullanılan enzim immünassay (EIA) kitleri ile yalancı pozitiflik oranı oldukça yüksektir (160). HBV taramaları sırasında saptanan izole anti-HBc pozitifliğinin çapraz reaksiyon veren antikörlere mi ya da virüsle karşılaşmaya mı bağlı olduğunun ayırt edilmesi, özellikle HBV infeksiyon prevalansının yüksek olduğu ülkelerde önem taşımaktadır. Anti-HBc normalde HBsAg ile birlikte (akut hepatitB geçiren ve taşıyıcılarda) veya anti-HBs ile birlikte (infeksiyonu doğal yoldan geçirenlerde) bulunur. Ancak HBsAg ve anti-HBs’nin negatif saptandığı olgularda anti-HBc pozitifliğine çok sık rastlanmaktadır. Bu serolojik profilin prevalansı toplumlara göre değişmektedir (%0.1-20 arasında) ve dünyadaki dağılımı kronik HBsAg taşıyıcılık oranı ile paralellik göstermektedir (161). Tunus’tan bildirilen bir çalışmada, izole anti-HBc prevalansı %2.8 iken, İrlanda’da bu oran %0.51, Almanya’da mahkumlar arasında yapılan bir çalışmada ise %19.2 olarak bildirilmektedir (162-164). Ülkemizde yapılan çalışmalarını incelediğimizde, Özacar ve arkadaşları bu oranı %3.23, Mert ve arkadaşları ise %5 olarak saptamışlardır (160, 165). Bizim çalıştığımız grupta izole anti-HBc pozitiflik oranı %2 tesbit edildi. Bu oran ülkemiz oranlarından biraz daha düşüktür. İzole anti-

HBc pozitif 52 donörün 39 (%75)'unda antiHBe ve HBeAg negatif bulunmuştur. İzole anti-HBc pozitiflerin 3/4'ünü temsil eden salt anti-HBc pozitifliği olarak tanımlanan bu grup, yanlış pozitiflik veya mutant suşların varlığından kaynaklanabilir. HBV'nun S bölgesinde ortaya çıkan mutasyonlar serolojik tepkimeleri de etkilemekte, tek başına HBV-DNA pozitifliği, tek başına HBsAg pozitifliği, anti-HBs ve HBsAg'nin birlikte pozitifliği gibi alışılmışın dışında serolojik profillerin görülmesine sebep olmaktadır (37). HBV kılıfında meydana gelen bu değişiklikler tanı ve aşı programlarının yeniden dizayn edilmesini gündeme getirmekte, graft infeksiyonlarının önlenmesinde kodon 145 mutant yüzey antijenine karşı oluşan monoklonal spesifik antikorların kullanılabilceğini düşündürmektedir (44).

HBV infeksiyonunun genel seyri yüksek serum HBV-DNA düzeyleriyle birlikte HBeAg pozitif evreyi içermektedir. Daha sonra hastalar serokonversiyon sürecine girmektedir. Bu süreçte HBeAg kaybolur, anti-HBe oluşur. Genel olarak bu olay HBV-DNA'nın saptanamayacak düzeye düşeceğini ve aminotransferazların normal seviyeye geleceğini göstermektedir. Fakat bazı HBeAg negatif hastalar viremik kalmakta ve aktif karaciğer hastalıkları devam etmektedir (166, 167).

HBV yüzey geni mutantları çok çeşitli olup infeksiyöz ve patojendir. HBsAg'nin "a" determinantındaki mutasyonların immünproflaksi uygulanan taşıyıcılarda ortaya çıktığına işaret edilmiş ve aşılamanın güçlü bir humoral yanıt oluşturmaya karşın T hücre sitotoksik yanıtı oluşturmadığı: oysa HBV ile doğal infeksiyon sonucunda gelişen humoral bağışıklığın sitotoksik T hücre yanıtı ile birlikte olduğuna dikkat çekilmiş, bu tip mutantların aşı ile indüklendiği ileri sürülmüş ve bunlara "aşı ile indüklenen kaçak mutantlar" adı verilmiştir. Ancak "a" determinant mutantlarına aşısız taşıyıcılarda da rastlanmıştır (50). Böyle mutantların universal aşılama sonrası dominant hale gelebileceğinden kuşkulanylmaktadır (41, 51). Bununla beraber aşısız taşıyıcılarla birlikte yapılmış karşılaştırmalı çalışmalar yok denecek kadar azdır. Aşı yapılan taşıyıcılardaki HBV-S mutant oranının özgül coğrafi bölgelerdeki prevalansı ne kadar yansıttığı da tartışmalıdır. Ayrıca HBeAg pozitif annelerdeki HBV suşları doğumda karakterize edilmeli, doğumdan sonra çocukta saptanan mutantın annede bulunup bulunmadığı kesin olarak ortaya konmalıdır.

HBV-S mutantları ile ilgili olarak yapılmış kapsamlı seroepidemiolojik çalışmalar bu varyantların prevalansında coğrafi farklılıklar olabileceğini ortaya koymuştur. Singapur'da aşılınmış 43 taşıyıcı çocuğun 18 (%42)'inde "a" determinantında çeşitli değişikliklere rastlanırken: bu oranın Tayvan'daki orandan (6/27, %22) daha yüksek olduğuna dikkat çekilmiştir (41).

Sonuç olarak, bölgemiz kan donörlerinde hepatit B karşılaşma oranları (%17.53) Türkiye oranlarından düşük bulunmuştur. Kan donörlerinin %2'sinde izole anti-HBc pozitif bulunması; bu grubun özellikle kan donörlerinden alıcılara HBV bulaştırılmasında potansiyel risk oluşturabileceğini ortaya koymaktadır. Ayrıca, izole anti-HBc pozitiflerin 3/4'ünde tespit edilen salt anti-HBc pozitifliği, yanlış pozitifliğe veya mutant suşlara karşı dikkatli olmamız gerektiğini göstermektedir.

6. ÖZET

Hepatit B Virus (HBV) tüm dünyada önemli bir sağlık sorunu olan Akut ve Kronik B Hepatiti hastalığının etkenidir. HBV enfeksiyonu için seropozitifliğin bilinmesinde önemli olan göstergeler HBsAg yanında anti-HBs ve anti-HBc'dir. Hem daha ekonomik, hem de sağlıklı bir metod olarak inceleme yapılacak grubun önce anti-HBc yönünden taranması, anti-HBc pozitif bulunanlarda HBsAg'ne bakılması, HBsAg negatif bulunanlarda ise anti-HBs göstergesinin aranması uygun olur. Bu çalışmada, kan donörlerinde hepatit B virus ile karşılaşma oranları ile izole anti-HBc pozitif donörlerin belirlenmesi amaçlandı. Ayrıca izole anti-HBc pozitif ve pencere dönemindeki donörlerin HBV bulaştırıcılık göstergeleri araştırıldı.

SDÜ Tıp Fakültesi Hastanesi Kan Merkezi'ne 2007 Şubat-Mayıs ayları arasında başvuran 2538 kan donörü çalışmaya alındı. Kan donörlerinden 38'i HBsAg pozitif bulunmuş ve ileri çalışmalara alınmamıştır. Geriye kalan 2500 HBsAg negatif kan donörü serum örneklerine anti-HBc total çalışıldı. Bu çalışma sonucunda 401 serum örneği anti-HBc pozitif olarak bulundu. Bu serumların hepsine anti-HBsAb, HBeAg ve anti-HBeAb testleri çalışıldı.

Bölgemiz kan donörlerinde hepatit B ile karşılaşma oranı %17.29 olarak bulundu. anti-HBcAb pozitif 401 donörün, 349 (%87)'u anti-HBs pozitif, 11 (%2.7)'i HBeAg pozitif ve 125 (%31.1)'i anti-HBe pozitif olarak bulundu. 114 örnekte anti-HBcAb, anti-HBsAb ve anti-HBeAb birlikte pozitif idi. 11 örnekte anti-HBcAb ile anti-HBeAb pozitif. 8 örnekte anti-HBcAb, anti-HBsAb ve HBeAg pozitif, 3 örnekte anti-HBcAb ve HBeAg pozitif bulundu. 39 örnekte sadece anti-HBcAb pozitif iken anti-HBsAb, anti-HBeAb, HBeAg negatif bulundu.

Sonuç olarak, bölgemiz kan donörlerinde hepatit B karşılaşma oranları Türkiye oranlarından düşük bulunmuştur. Kan donörlerinde tespit edilen %2 oranındaki izole anti-HBc pozitifliği, bunların HBV bulaştırabileceği konusunda dikkat etmemiz gerektiğini ortaya koymaktadır.

Anahtar kelimeler: Hepatit B Virus, İzole anti-HBc, Donör

7. SUMMARY

Hepatitis B virus (HBV) is the agent of the acute and chronic Hepatitis B disease, a fundamental health problem all over the world. The important markers in showing the HBV infection are anti-HBs and anti-HBc besides HBsAg. It is convenient, at first, to scan the group for anti-HBc since the method is more economic and reliable; and if positive, thereafter to check the HBsAg; and if negative, then to look for anti-HBs. It is aimed in this study to determine the blood donors encountered Hepatitis B virus, and the isolated anti-HBc positive donors. In addition, the HBV infectivity indicators are investigated in the isolated anti-HBc positive donors and in the window-period donors.

2538 donors referring the Blood Bank of SDU Hospital between february and may 2007 participated in the study. 38 of the donors were found positive in HBsAg, and were excluded for further studies. The serum samples of the rest 2500 were assayed for anti-HBc total. 401 samples were found to have anti-HBc positivity, and all were tested for anti-HBsAb, HBeAg and anti-HBeAb.

Encountering the Hepatitis B in donors of our region was found 17.29%. 349 of 401 anti-HBcAb positive donors were anti-HBs positive, 11 (2.7%) HBeAg positive, and 125 (31.1%) were anti-HBe positive. Anti-HBcAb, anti-HBsAb and anti-HBeAb were positive together in 114 samples. 11 were found positive for anti-HBcAb and anti-HBeAb, and 8 were anti-HBcAb, anti-HBsAb and HBeAg positive. Anti-HBcAb and HBeAg together were positive in only 3 samples. 39 were only positive for anti-HBcAb, and negative for anti-HBsAb, anti-HBeAb and HBeAg.

In conclusion, the rates of encountering the Hepatitis B in donors of our region was found lower than in Turkey. 2% isolated anti-HBcAb positivity in donors suggests to be careful about these may have HBV infectivity.

Keywords: Hepatitis B virus, Isolated anti-HBc, Donor

8. KAYNAKLAR

1. Mahoney FJ. Update on diagnosis, management and prevention of hepatitis B virus infection. *Clin Microbial Rev* 1999; 12: 351-66.
2. Robinson WS: Hepadnaviridae: Hepatitis B virus and hepatitis delta virus. Mandeli GL, Douglas RG, Bennett JE (Eds). *Principles and Practice of Infectious Disease*. 3 rd ed. New York, Churchill Livingstone. 1990: 1204-31.
3. Purcell RH. The discovery of the hepatitis viruses. *Gastroenterology* 1993. 104: 955-63.
4. Krugman S, Giles JP, Hammond J. Infectious hepatitis: evidence for two distinctive clinical, epidemiological and immunological types of infection. *JAMA* 1967; 200: 365.
5. Seeger C, Mason WS. Hepatitis B virus biology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev* 2000: 64: 51-68.
6. Ganem D: Hepadnaviridae and their replication. Fields BN, Knipe DM, Howley PM (Eds). *Fields Virology* 3 rd ed. Lippincott, Raven Press. 1996, 2703-37.
7. Yenen OS: Viral hepatitler. Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M (Eds) *İnfeksiyon Hastalıkları*. İstanbul, Nobel Kitapevleri Ltd. Şti. 1996: 641-700.
8. Akan E: Viral hepatitler. Genel ve Özel Viroloji. 3. Baskı, İzmir, Saray Kitapevleri 1994: 502-49.
9. Serter D: Hepatit virusları ve viral hepatitler. *Virus, Riketsiya ve Klamidya Hastalıkları*, İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri, 1997, 175-206.
10. Thiollais P, Pourcel C, Dejean A. The hepatitis B virus. *Nature* 1985; 317: 489-95.
11. Lee WM: Hepatitis B virus infection. *N Engl J Med* 1997; 337: 1733-45.
12. Lau JYN, Wright TL. Molecular virology and pathogenesis of hepatitis B. *Lancet* 1993; 342: 1335-40.
13. Badur S: Hepatit B virusu (HBV): moleküler viroloji ve serolojik tanı. Kılıçturgay K (Ed) *Viral Hepatit 94*, İstanbul, Nobel Tıp kitabevleri Ltd. Şti. 1994: 65-90.
14. Neurath AR, Kent SBH, Parker K et al. Antibodies to a synthetic peptid from the pre-S(2) 120-145 region of the hepatitis B virus envelope are virus neutralizing. *Vaccine* 1986; 4: 35.
15. Thomas HC. Carman WF. Envelope and precore/core variants of hepatitis B virus. Martin PM, Friedman LS(Eds). *Viral Hepatitis*. *Gastroenterol. Clin. N Amer.* 1994: 23: 499-514.
16. Lemon SM, Thomas DL. Vaccines to prevent viral hepatitis. *N Engl J Med* 1997; 336: 196-204.
17. Arauz-Ruiz P, Norder H. Visona KA, Magnusius LO. Molecular epidemiology of hepatitis B virus in Central America reflected in the genetic variability of the small gene. *JID* 1997; 176: 851-8.

18. Chermello L, Pontisso P, Schiavon E, Thiers V, Tagariella G, Alberti A: Hepatitis B core antigen in serum during acute hepatitis B. *J Med virol* 1988; 24: 361-5.
19. Milich DR, Sallberg M, Maruyama T. The humoral immune response in acute and chronic hepatitis B virus infection. *Springer Semin Immunopathol* 1995; 17: 149-66.
20. Wang G-H, Seeger C. The reverse transcriptase of hepatitis B virus acts as a protein primer for viral DNA synthesis. *Cell* 1992; 71: 663-70.
21. Hepatitis B virus. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risk to human. Hepatitis viruses volume 59. Lyon 1994: 45-163.
22. Feitelson MA, Duan L-X, Guo J, Blumberg BS. X region detection mutants associated with surface antigen-positive hepatitis B virus infection. *Gastroenterology* 1995; 108: 1810-9.
23. Hsia CC, Yuwen H, Tabor E. Hot spot mutations in hepatitis B virus X gene in hepatocellular carcinoma *Lancet* 1996; 348: 625-6.
24. Moraes MT, Gomes SA, Niel C. Sequence analysis of pre S/S gene of hepatitis B virus strains of genotypes A, D, and F isolated in Brasil. *Arch virol* 1996: 141. 1767-63.
25. Rosenberg W. Mechanism of immune escape in viral hepatitis. *Gut* 1999; 44: 759-64.
26. Kato J, Hasegawa K, Torn A, et al. A molecular analysis of viral persistence in surface antigen-negative chronic hepatitis B. *Hepatology* 1996; 23: 389-95.
27. Protzer Knolle U, Naumann U, Bartenschlager R, et al. Hepatitis B virus with antigenically altered hepatitis B surface antigen is selected by high-dose hepatitis B immunoglobulin after liver transplantation. *Hepatology* 1998; 27: 254-63.
28. Bachmann MF, McKall Faienza K, Schmits R, et al. Distinct role for LFA-1 and CD28 during activation of native T cells, adhesion versus costimulation. *Immunity* 1997: 549-57.
29. Kundig I M, Shahinian A, Kwar K, et al. Duration of TCR stimulation determines costimulatory requirement of T cells. *Immunity* 1996; 5: 41 -52.
30. Carman WF, Boner W, Fattovich G, et al. Hepatitis B core protein mutations are concentrated in B cell epitopes in progressive disease and in T helper cell epitopes during clinical remission. *J Infect Dis* 1997; 175: 1093-100.
31. Bertoletti A, Sette A, Chisari FV, et al. Natural variants of cytotoxic epitopes are T-cell receptor antagonists for cytotoxic T cells. *Nature* 1994; 369: 407-10.
32. Thurs MR, Kwiatkowski D, Allsopp CE, et al. Association between an MHC class II allele and clearance of hepatitis B virus in the Gambia. *Engl J Med* 1995; 332: 1065-9.
33. Thursz MR, Thomas HC, Greenwood BM, et al. Heterozygote advantage for HLA class-II type in hepatitis B virus infection. *Nat Genet* 1997; 17: 11-2.

34. Moss PAH, Rosenberg WMC, Bell JI. The human T cell receptor in health and disease. *Ann Rev Immunol* 1992; 10: 71-96.
35. Milich DR, Jones JE, Hughes JL, et al. Is a function of the secreted hepatitis B antigen to induce immunologic tolerance in utero? *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 6599-603.
36. Jamieson BD, Ahmed R. T-cell tolerance: exposure to virus in utero does not cause a permanent deletion of specific T cell. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85: 2265-8.
37. Kılıçturgay K. Hepatit B virusunda (HBV) mutasyon ve getirdiği sorunlar. *Viral Hepatit Derg.* 1995; 1: 1-7.
38. Zanetti AR, Tanzi E, Manzillo G, et al. Hepatitis B variants in Europe. *Lancet* 1988; ii: 1132-3.
39. Carman WF, Zanetti AR, Karayiannis P, et al. Vaccine induced escape mutant of hepatitis B virus. *Lancet* 1990; 336: 325-9.
40. Thomas H.C. The emergence of envelope and precore/core variants of hepatitis B virus: the potential role of antibody selection. *J Hepatol* 1995; 22 (Suppl 1): 1-8.
41. Lee PI, Chang LY, Lee CY, Huang LM, Chang MH. Detection of hepatitis B surface gene mutation in carrier children with or without immunoprophylaxis at birth. *JID* 1997; 176: 427-30.
42. Ghany MG, Ayola B, villamil FG, et al. Hepatitis B virus S mutants in liver transplant recipients who were reinfected despite hepatitis B immune globulin prophylaxis. *Hepatology* 1998; 27: 213-22.
43. Carman WF, Van Deursen FJ, Mimms LT, et al. The prevalence of surface antigen variants of hepatitis B virus in Papua New Guinea, South Africa and Sardinia. *Hepatology* 1997; 26: 1658-66.
44. Hawkins AE, Gilson RJ, Gilbert N, et al. Hepatitis B virus surface mutations associated with infection after liver transplantation. *J Hepatol* 1996; 24: 8-14.
45. Pollicino T, Zanetti AR, Cacciola I, et al. Pre S2 defective hepatitis B virus infection in patients with fulminant hepatitis. *Hepatology* 1997; 26: 495-9.
46. Bock C-T, Tillmann HL; Maschek H-J, Manns MP, Trautwein C. A preS mutation isolated from a patient, with chronic hepatitis B infection leads to virus retention and misassembly. *Gastroenterology* 1997; 113: 1976-82.
47. Trautwein C, Schrem H, Tillmann HL, et al. Hepatitis B virus mutation in the pre-S genome before and after liver transplantation. *Hepatology* 1996; 24: 482-8.
48. Gerken G, Kremsdorf D, Capel, et al. Hepatitis B defective virus with rearrangement in the pre S gene during chronic HBV-infection. *Virology* 1991; 183: 555-65.
49. Nakajima E, Minami M, Ochiya T, Kagawa K, Okanoue T. PreS1 deleted variants of hepatitis B virus in patients with chronic hepatitis. *J Hepatology* 1994; 20: 329-35.

50. Yamamoto K, Horikawa M, Tsuda F, et al. Naturally occurring escape mutants of hepatitis B virus various mutations in the S gene in the carriers seropositive for antibody to hepatitis B surface antigen. *J Virol* 1994; 68: 2671-6.
51. Carman WF. The clinical significance of surface antigen variants of hepatitis B virus. *J Viral Hepat* 1997; 4 (Suppl 1): 11-20.
52. Li JS, Tong SP, Wen YM, Vitvitski L, Zhang Q, Trepo C. Hepatitis B virus genotype A rarely circulates as an HBe-minus mutant: possible contribution of a single nucleotide in the precore region. *J Virol* 1993; 67: 5402-10.
53. Bagci S, Torre F, Stuyver L, et al. Importance of hepatitis B virus genotypes for the development of precore/core gene mutations and the outcome of interferon treatment. *Hepatology* 1996; 24: 280.
54. Lindh M, Horal P, Dhillon AP, Furuta Y, Norkrans G. Hepatitis B virus carriers without precore mutations in hepatitis Be antigen-negative stage show more severe liver damage. *Hepatology* 1996; 24: 494-501.
55. Hawkins AE, Gilson RJC, Beath SV, et al. Novel application of a mutation assay: evidence of transmission of hepatitis B viruses with precore mutations and their detection in infants with fulminant hepatitis B. *J Med Virol* 1994; 44: 13-21.
56. Bahn A, Hilbert K, Martine U, Westedt J, von Weizsacker F, Wirth S. Deletion of a precore mutant after vertical transmission of different hepatitis B virus variants is correlated with fulminant hepatitis in infants. *J Med Virol* 1995; 47: 336-41.
57. Gallimore A, Glithero A, Godkin A, et al. Induction and exhaustion of lymphocytic choriomeningitis virus-specific cytotoxic T lymphocytes visualized using soluble tetrameric major histocompatibility complex class I-peptide complexes. *J Exp Med* 1998; 187: 1383-93.
58. Scaglioni PP, Melegari M, Wands JR. Biologic properties of hepatitis B viral genomes with mutations in the precore promoter and precore open reading frame. *Virology* 1997; 233: 374-81.
59. Moriyama K, Okamoto H, Tsuda F, Mayumi M: reduced precore transcription and enhanced core-pregenome transcription of hepatitis B virus DNA after replacement of the precore-core promoter with sequences associated with e antigen-seronegative persistent infection. *Virology* 1996; 226: 269-80.
60. Kurosaki M, Enomoto N, Asahina Y, et al. Mutations in the core promoter region of hepatitis B virus in patients with chronic hepatitis B. *J Med virol* 1996; 49: 115-23.
61. Minamitani S, Nishigucki S, Kuraki T, Otani S, Monna T. Detection by ligase chain reaction of precore mutant of hepatitis B virus. *Hepatology* 1997; 25: 216-22.
62. Torre F, Naoumov NV. Clinical implications of mutations in the hepatitis B virus genome. *Eur J Clin Invest* 1988; 28: 604-14.
63. Bhat RA, Ulrich PP, Vyas GN. Molecular characterization of a new variant of hepatitis B virus in a persistently infected homosexual man. *Hepatology* 1990; 11: 271-6.

64. Baumert TP, Rogers SA, Hasegawa K, Liang TJ. Two core promoter mutations identified in a hepatitis B virus strain associated with fulminant hepatitis result in enhanced viral replication. *J Clin invest* 1996; 98: 2268-76.
65. Gunther S, Piwon N, Iwanska A, Schilling R, Meisel H, Will H. Type, prevalence and significance of core promoter/enhancer II mutations in hepatitis B viruses from immunosuppressed patients with severe liver disease. *J Virol* 1996; 70: 8318-31.
66. Hamasaki K, Nakata K, Nagayama Y, et al. Changes in the prevalence of HBeAg-negative mutant hepatitis B virus during the course of chronic hepatitis B. *Hepatology* 1994; 20: 8-14.
67. Nitsuma H, Ishii M, Saito Y, et al. Prevalence of precore-defective mutant of hepatitis B virus in HBV carriers. *J Med Virol* 1995; 46: 397-404.
68. Laskus T, Rakela J, Tong MJ, et al. Naturally occurring hepatitis B virus mutants with deletion in the core promoter region. *J Hepatol* 1994; 20: 837-41.
69. Akarca US, Greene S, Lok AS. Detection of precore hepatitis B virus mutants in asymptomatic HBsAg-positive family members. *Hepatology* 1994; 19: 1366-70.
70. Lok AS, Akarca US, Greene S. Predictive value of precore hepatitis B virus mutation in spontaneous and interferon-induced hepatitis B e antigen clearance. *Hepatology* 1995; 21: 19-24.
71. Lai ME, Solinas A, Mazzoleni AP, et al. The role of precore hepatitis B virus mutants on the long-term outcome of chronic hepatitis B virus hepatitis: A longitudinal study. *J Hepatol* 1994; 20: 773-81.
72. Naoumov NV, Thomas MG, Mason AL, et al. Genomic variations in the hepatitis B core gene: a possible factor influencing response to interferon alfa treatment. *Gastroenterology* 1995; 108: 505-14.
73. Lopez Alcorocho JM, Bartolome J, Cotonat T, Carreno V. Efficacy of prolonged interferon-alpha treatment in chronic hepatitis B patients with HbeAb: comparison between 6 and 12 months of therapy. *J Viral Hepat* 1997; 4(Suppl. 1): 27-32.
74. Jung MC, Diepolder HM, Pape GR. T cell recognition of hepatitis B, and C viral antigens. *Eur J Clin invest* 1994; 24: 641-50.
75. Wakita T, Kakumu S, Shibata M, et al. Detection of pre-C and core regions mutants of hepatitis B virus in chronic hepatitis B virus carriers. *J Clin Invest* 1991; 88: 1793-801.
76. Rosmorduc O, Petit MA, Pol S, et al. In vivo and in vitro expression of defective hepatitis B virus particles generated by spliced hepatitis B virus RNA. *Hepatology* 1995; 22: 10-9.
77. Shunichi S, Suzuki K, Akahane Y, et al. Hepatitis B virus strains with mutations in the core promoter in patients with fulminant hepatitis. *Ann Int Med* 1995; 122: 241-8.

78. McCaughan GW, Spencer J, Koorey D, et al. Lamivudine therapy in patients undergoing liver transplantation for hepatitis B virus precore mutant-associated infection: high resistance rates in treatment of recurrence but universal prevention if used as prophylaxis with very low dose hepatitis B immune globulin. *Liver Transpl Surg* 1999; 5: 512-9.
79. Jardi R, Buti M, Rodriguez-Frias F, et al. Rapid detection of lamivudine-resistant hepatitis B virus polymerase gene variants. *J Virol Methods* 1999; 83: 181-7.
80. Seta T, Yokosuka O, Imazeki F, Tagawa M, Saisho H. Emergence YMDD motif mutants of hepatitis B virus during lamivudine treatment of immunocompetent type B hepatitis patients. *J Med Virol* 2000; 60: 8-16.
81. Melegari M, Scaglioni PP, Wands JR. Hepatitis B virus mutants associated with 3TC and famciclovir administration are replication defective. *Hepatology* 1998; 27: 628-33.
82. Aye TT, Bartholomeusz AJ, Shaw T, et al. Hepatitis B virus polymerase mutations during antiviral therapy in patient following liver transplantation. *J Hepatol* 1997; 26: 1148-1153.
83. Bartholomew MM, Jansen RW, Jeffers LJ, et al. Hepatitis B virus resistance to lamivudine given for recurrent infection after orthotopic liver transplantation. *Lancet* 1997; 349: 20-22.
84. Ling RD, Mutimer D, Ahmed M. et al. Selection of mutations in the hepatitis B virus polymerase during therapy of transplanted recipients with lamivudine. *Hepatology* 1996; 24: 711-3.
85. Uchida T, Saitoh T, Shinzawa H. Mutations of the X region of hepatitis B virus and their clinical implications. *Pathol Int* 1997; 47: 183-93.
86. Tennant BC, Mrosovsky N, McLean K, et al. Hepatocellular carcinoma in Richardsdn's ground squirrels (*Spermophilus richardsonii*): evidence for association with hepatitis B-like virus infection. *Hepatology* 1991; 13: 1215-21.
87. Fukuda R, Ishimura N, Kushiyaama Y, et al. Hepatitis B virus with X gene mutation is associated with the majority of serologically "silent" non-b, non-c chronic hepatitis. *Microbiol Immunol* 1996; 40: 481-8.
88. Moradpour D, Wands JR: Understanding Hepatitis B virus infection. *N Eng J Med* 1995, 332: 1092-1093.
89. Robinson WS: Hepatitis B virus and Hepatitis D virus. Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (Eds). *Principles and Practice of Infectious Diseases*, 4th edition, New York, Churchill Livingstone, 1995: 1406-1439.
90. Yenen OŞ: Hepatit B. Wilke Topçu A, Söyletir G, Doğanay M (Eds). *İnfeksiyon Hastalıkları*, 1. baskı, İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri, 1996: 664-691.
91. Balık İ: Hepatit B epidemiyolojisi. Kılıçturgay K (Ed). *Viral Hepatit '94*, 1. baskı, İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri, 1994: 91-101.

92. Hollinger FB: Hepatitis B virus. Fields BN, Knipe DM (Eds). *Virology*. 2nd edition, New York, Raven Press, 1990: 2171-2238.
93. Lamelin JP, Zaulin F, Trepo C: Lymphotropism of Hepatitis B and C viruses: An update and a newcomer. *Int J Clin Lab Res* 1995, 25: 1-4.
94. Robinson WS: Hepatitis B virus and Hepatitis D virus, *Principles and Practice of Infectious Diseases*, 4.th Edition (Eds: Mandell GL, Bennet JE, Dolin R), USA, Churchill-Livingstone; 1995: 1406-1439.
95. Terrault NA, Wright TL: Viral Hepatitis A Through G, Sleisenger. *Fordtran's Gastrointestinal and Liver Disease, Pathophysiology/ Diagnosis/ Menagement*, 6.th Edition (Eds: Feldman M, Scharschmidt BF, Sleisenger MH), W.B. Saunders Company, 1998: 1123-1170.
96. Koff RS: *Viral Hepatitis, Diseases of the Liver*, 7.th Edition (Eds: Schiff L and Schiff ER). Philadelphia, J.B. Lippincott Company, 1993: 492-577.
97. Hsu HH, Feinstone SM, Hoofnagle JH: *Acute Viral Hepatitis, Principles and Practice of Infectious Diseases*, 4.th Edition (Eds: Mandell GL, Bennet JE, Dolin R), USA, Churchill-Livingstone; 1995: 1136-1153.
98. Sherlock S, Dooley J: *Virus Hepatitis, Diseases of the Liver and Biliary System*, 10.th Edition, London, The Blackwellscience, 1997: 265-302.
99. Sherlock S, Dooley J: *Chronic Hepatitis, Diseases of the Liver and Biliary System*, 10.th Edition, London, The Blackwellscience, 1997: 303-335.
100. Dragosics B, Ferenci P, Hitchman E, Denk H. Long-term followup study of asymptomatic HBsAg-positive voluntary blood donors in Austria: a clinical and histologic evaluation of 242 cases. *Hepatology*, 1987 Mar-Apr, 7(2): 302-306.
101. Hu K. Occult hepatitis B virus infection and its clinical implications. *Journal of Viral Hepatitis* 2002; 9: 243-257.
102. Torbenson M, Thomas DL. Occult HBV. *Lancet Infect Dis* 2002; 2: 479-486.
103. Weinberger KM, Bauer T, Bohm S, Jilg W. High genetic variability of the group-specific 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: 1165-1174.
104. Carman WF. The clinical significance of surface antigen variants of hepatitis B virus. *J Viral Hepatol* 1997; 4 (suppl.1): 11-20.
105. Kohno H, Inoue T, Tsuda F, Okamoto H, Akahane Y. Mutations in the envelope gene of hepatitis B virus variants co-occurring with antibody to surface antigen in sera from patients with chronic hepatitis B. *J General Viral* 1996; 77: 1825-1831.
106. Bouffard P, Lamelin JP, Zoulim F, Pichoud C, Trepo C. Different forms of hepatitis B virus DNA and expression of HBV antigens in peripheral blood mononuclear cells in chronic hepatitis B. *J Med Virol* 1990; 31: 312-317.

107. Feray C, Zignego AL, Samuel D, et al. Persistent hepatitis B virus infection of mononuclear blood cells without concomitant liver infection. The liver transplantation model. *Transplantation* 1990; 49: 1155-1158.
108. 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: 992-997.
109. Yotsuyanagi H, Yasuda K, Lino S, et al. Persistent viremia after recovery from self-limited acute hepatitis B. *Hepatology* 1998; 27: 1377-1382.
110. Rehermann B, Ferrari C, Pasquinelli C, Chisari FV. The hepatitis B virus persists for decades after patients' recovery from acute viral hepatitis despite active maintenance of a cytotoxic T-lymphocyte response. *Nat Med* 1996; 2: 1104-1108.
111. Besiık F, Karaca C, Akyz F, et al. Occult HBV infection and YMDD variants in hemodialysis patients with chronic HCV infection. *J Hepatol* 2003; 38: 506-510.
112. Liaw Y-F. Role of hepatitis C virus in dual and triple hepatitis virus infection. *Hepatology* 1995; 22: 1101-1108.
113. Shih C-M, Lo SJ, Miyamura T, et al. Suppression of hepatitis B virus expression and replication by hepatitis C virus core protein in HuH-7 cells. *J Virol* 1993; 67: 5823-5832.
114. Norder H, Courouce AM, Magnius LO. Complete genomes, phylogenetic relatedness and structural proteins of six strains of the hepatitis B virus, four of which represent two new genotypes. *Virology* 1994; 198: 489-503.
115. Horasanlı S, Miladi A, Brillet R, Akyuz F, Kaymakoglu S, Pawlotsky JM, Badur S. Genotype determination and evaluation of the response to different treatment protocols in chronic hepatitis B patients in Turkey. *J of Clin Virol (6th Annual Meeting of the European Society for Clinical Virology (ESCV) 2003; (27) supp 1: 63.*
116. Chazouilleres O, Mamish D, Kim M, et al. 'Occult hepatitis' B virus as source of infection in liver transplant recipients. *Lancet* 1994; 343: 1685-1690.
117. Dueymes JM, Bodenes-Dueymes M, Mahe JL, Herman B. Detection of hepatitis B viral DNA by polymerase chain reaction in dialysis patients. *Kidney Int* 1993; 41 (Suppl): S161-166.
118. Chen PM, Fan S, Liu JH, et al. Reactivation of hepatitis B virus infection in two chronic GVHD patients after transplantation. *Int J Hematol* 1993; 58: 183-188.
119. Kubo S, Nishiguchi S, Tamori A, Hirohashi K, Kinoshita H, Kuroki T. Development of hepatocellular carcinoma in patients with HCV infection, with or without past HBV infection and relationship to age at the time of transfusion. *Vox Sang* 1998; 74: 129.
120. Mackay IM, Arden KE, Nitsche A. Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Res* 2002; 30: 1292-1305.

121. Mine H, Emura H, Miyamoto M, et al. High throughput screening of 16 million serologically negative blood donors for hepatitis B virus, hepatitis C virus and human immunodeficiency virus type-1 by nucleic acid amplification testing withand sensitive multiplex reagent in Japan. *J Virol Methods* 2003; 112: 145-151.
122. Lok ASF, McMahon BJ. Chronic Hepatitis B. *AASLD Practice Guidelines. Hepatology* 2001; 34: 1225-1241.
123. Mahoney FJ. Update on diagnosis, management, and prevention of hepatitis B virus infection. *Clin Microbiol Rev* 1999; 12: 351-366.
124. Paraskevis D, Haida C, Tassopoulos N, et al. Development and assessment of a novel real-time PCR assay for quantitation of HBV-DNA. *J Virol Methods* 2002; 03: 201-212.
125. 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: 626-629.
126. Regenstein F. New approaches to the treatment of chronic viral hepatitis B and C. *Am J Med*; 96 (suppl 1A): 47-51.
127. Lee WM: Hepatitis B virus infection. *N Engl J Med* 1997; 337 (24): 1733-45.
128. Henry L. Chan et al. Hepatitis B. Eugene R Schiff. Michael F. Sorrell, and Willis C. Maddrey.(ed). *Schiff's Diseases of The Liver*, Lippincott-Ravenpublishers 8. edit, Philadelphia 1990: 757-791.
129. Grob PJ. Hepatitis B: Virus, pathogenesis and treatment *Vaccine*1998; 16: 11-16.
130. Esteban JJ. Treatment of acute viral hepatitis. *Viral hepatitis A to F:an update. AASLD postgraduate course, Chicago, 1994: 266-77.*
131. Akarca US. Kronik B hepatitinde interferon dışı tedaviler ve interferon ile yapılan kombinasyonlar. Kılıçturgay K (Editör). *Viral Hepatit* 98. 1998: 119.
132. Omata M. Treatment of chronic hepatitis B infection. *N Engl J Med* 1998; 339: 114.
133. Mıstık R.: *Viral Hepatitle Savaşım Derneği Raporu, 2000.*
134. Taşyaran MA, Akdağ R, Akyüz M, Kaya A, Ceviz N, Yılmaz S: Erzurum bölgesi çocuklarında parenteral bulaşan hepatit viruslarının seroprevalansı. *Klimik Derg.* 1994, 7: 76-78.
135. Mıstık R, Balık Y. Türkiye’de viral hepatitlerin epidemiyolojisi: bir meta analiz. K. Kılıçturgay(ed), *Viral Hepatit* 98, 1.baskı. *Viral Hepatitle Savaşım Derneği*, Bursa, 1998: 9-20.
136. Altındış M, Yılmaz S, Dikengil T. Kuzey Kıbrıs bölgesi kan donörlerinde, askerlerde ve normal popülasyonda hepatit B, C ve HIV enfeksiyon sıklığı. *Viral Hepatit Derg* 2001; 3: 411-415.

137. Demirci M, Cicioğlu Arıdoğan B, Taşkın P, Arda M. Isparta'da değişik yaş gruplarında Hepatit B belirleyicilerinin seroprevalansı *Viral Hepatit Derg* 2001; 3: 198-200.
138. Delialioğlu N, Öztürk C, Aslan G. Mersin ilinde HBsAg, anti-HCV ve anti-HDV seroprevalansı. *Viral Hepatit Derg* 2001; 3: 416-418.
139. Silva AE, McMahon BJ, Parkinson AJ, Sjogren MH, Hoofnagle JH, Di Bisceglie M. Hepatitis B virus DNA in persons with isolated antibody to hepatitis B core antigen who subsequently received hepatitis B vaccine. *Clin Infect Dis* 1998; 26: 895-7.
140. Bahar IH, Yücesoy M, Yüce A, Abacıoğlu YH, Yuluğ N. Hepatit B tanısında atipik serolojik paternlerin değerlendirilmesi. II. Ulusal Viral Hepatit Simpozyumu Program ve Kongre Kitabı. Ankara, 1994; B-9: 93.
141. Kılıç H, şahin İ, Arınç H, Yıldırım MS, Koç AN. 1 Ocak 1994-31 Aralık 1995 tarihleri arasında 4427 hasta serumunda HBV markerlerinin serolojik profili. *Viral Hepatit Dergisi* 1997; 2: 121-4.
142. Mıstık R, Yılmaz E, Akalın H, Göröl G. Bursa bölgesinde hepatit B enfeksiyonundaki olağan dışı serolojik profiller prevalansı. *Viral Hepatit Dergisi* 2000; 1: 43-4.
143. Özacar T, Zeytinoğlu A, Erensoy S, Yapar N, Hoşgör M, Bilgiç A. Hepatit B virus serolojisinde salt anti-HBc olumluluğu ve HBV aşısına yanıt. *Viral Hepatit Dergisi* 1995; 2: 69-71.
144. Gomes SA, Yoshida CP, Niel C. Detection of hepatitis B virus DNA in hepatitis B surface antigen negative serum by polymerase chain reaction: Evaluation of different primer pairs and conditions. *Acta Virol* 1996; 40: 133-8.
145. Liang TJ, Bodenheimer HC, Yankee-Ronald-Brown NV, Chang K, Huang J, Wands JR. Presence of hepatitis B and C viral genomes in US blood donors as detected by polimerase chain reaction amplification. *J Med Virol* 1994; 42: 151-7.
146. Luo K, Zhou R, He C, Liang Z, Jiang S. Hepatitis B virus DNA in sera of virus carriers positive exclusively for antibodies to the hepatitis B core antijen. *J Med Virol* 1991; 35: 55-9.
147. Masumoto C, Nishioka K, Oguchi T, Misunaga NN, Tadokoro K, Juji T. Detection and quantation of HBV DNA by semi-nested PCR in donated blood: Comparison with HBV serological markers. *J Virol Meth* 1997; 66: 61-9.
148. Badur S. Posttransfüzyonel hepatit sorunu. *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 1991; 21: 234-42.
149. Pahsa A, Özsoy MF, Altunay H, Koçak N, Ekren Y, Çavuşlu ř. İstanbul'da hepatit B ve hepatit C seroprevalansı. *Gülhane Tıp Derg* 1998; 41: 325-30.
150. Sarper C. Kan donörleri ayaktan ve yatan hastalarda HBsAg ve anti-HCV araştırması. XXVII. Türk Mikrobiyoloji Kongresi Kongre Kitabı. Antalya, 1997: 175.

151. Yenen OŞ, Çavuşlu Ş, Aksu Y, Koçak N, Özsoy MF, Altunay H. Ten years (1987-1996) epidemiological trend of HIV, HBV and syphilis among blood donors in Istanbul. 3rd Congress of Balkan Military Medical Comitee Abstract Book. May 10-13, 1998: 57.
152. Altunay H, KMTD Çalışma Grubu: Türkiye’de kan merkezlerinde 1995-1999 yılları arasında HBsAg, anti-HCV, anti-HIV ve VDRL seroprevalansı. 1. Ulusal Kan Merkezleri ve Transfüzyon Tıbbi Kongresi Kongre/Kurs Kitabı. 24-29 Eylül, 2000: 276.
153. Mıstık R, Balık İ. Türkiye’de viral hepatitlerin epidemiyolojisi: Bir meta-analiz. Kılıçturgay K, Altunay H ve ark. (editör). Viral Hepatit’98. İstanbul: Viral Hepatitle Savaşım Derneği Yayını, 1998: 10-39.
154. Dumlupınar B, Özbiber Ş, Günaydın M, Leblebicioğlu H, Aydın M. Kan vericilerde hepatit B kor antikor seropozitifliğinin önemi. Klimik Dergisi 1994; 7: 85-6.
155. Allain JP, Hewitt PE, Tedder RS, Williamson LM. Evidence that anti-HBc but not HBV DNA testing may prevent some HBV transmission by transfusion. B J Haematol 1999; 107: 186-95.
156. Douglas DD, Taswell HF, Rakela J, Rabe D. Absence of hepatitis B virus DNA detected by polymerase chain reaction in blood donors who are hepatitis B surface antigen negative and antibody to hepatitis B core antigen positive from a United States population with a low prevalence of hepatitis B serologic markers. Transfusion 1993; 33: 212-6.
157. Joller-Jamelka HI, Wicki AN, Grob PJ. Detection of HBs antigen in “anti-HBc alone” positive sera. J Hepatol 1994; 21: 269-72.
158. Koşar A, Sütçü A, Altındış M, Yeksan M, Şengül AZ. Hemodiyaliz hastalarında serum anti-HBc düzeyleri. II. Ulusal Viral Hepatit Simpozyumu Program ve Kongre Kitabı. Ankara, 1994; B-11: 95.
159. Sanchez-Quijano A, Jauregui JI, Leal M, et al. Hepatitis B virus occult infection in subjects with persistent isolated anti-HBc reactivity. J Hepatol 1993; 17: 288-93.
160. Özacar T, Zeytinlioğlu A, Erensoy S, Yapar N, Hoşgör M, Bilgiç A. Hepatit B virus serolojisinde salt anti-HBc olumluluğu ve HBV aşısına yanıt. Viral Hepatit Dergisi 1995; 2: 69-71.
161. Mert A, Şentürk H, Aktuğlu Y. Sağlıklı kişilerde HBsAg (-), anti-HBs (-) ve anti-HBc (+)’liği ne anlama gelmektedir? Klinik Gelişim 1999; 12: 974-8.
162. Ben Ayed M, Triki H, Cointe D, et al. The isolated presence of anti-HBc antibodies: Prevalence and interpretation based on the results of viral DNA research and anti-HBs antibodies measurement after vaccination. Ann Biol Clin 2001; 59: 53-60.
163. O’Connell T, Thornton L, O’Flanagan D, et al. Prevalence of hepatitis B anti-core antibody in the Republic of Ireland. Epidemiol Infect 2000; 125: 701-4.

164. Neifer S, Molz B, Sucker U, Kreuzpaintner E, Weinberger K, Jilg W. High percentage of isolated anti-HBc positive persons among prisoners. *Gesundheitswesen*, 1997; 59: 409-12.
165. Zulfıkar B, Öztürk R, Kınık K, et al. İstanbul'da değişik yaşı grubundan sağlıklı kişiler, hamileler, dişı hekimleri ve berberlerde hepatitis B taraması sonuçları. III. Ulusal Viral Hepatit Simpozyumu. 7-9 Kasım Ankara, 1996: 20.
166. Hadziyannis SJ, Vassilopoulos D. Hepatitis B e antigen-negative chronic hepatitis B. *Hepatology* 2001; 34: 617-24.
167. Chan Lik-yuen H. Viral mutations and natural course of HBeAg negative chronic hepatitis B virus infection. A thesis for the degree of doctor of medicine. The Chinese University of Hong Kong, 2001.