

İZOLE ANTI-HBC POZİTİFLİĞİ BULUNAN KAN DONÖRLERİNDE
HBV DNA'NIN ARAŞTIRILMASI

FAHRİYE KÖTEN

YÜKSEK LİSANS TEZİ
MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

2009

CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

İZOLE ANTİ-HBC POZİTİFLİĞİ BULUNAN KAN DONÖRLERİNDE
HBV DNA'NIN ARAŞTIRILMASI

Fahriye KÖTEN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI

DOÇ. DR. A. YASEMİN ÖZTOP

SİVAS

2009

Bu çalışma Cumhuriyet Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanmış ve jürimiz tarafından Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan Prof. Dr. Ömer Poyraz

Üye Doç. Dr. A. Yasemin Öztop

Üye Yrd. Doç. Rana Taşkın

ONAY

Bu tez çalışması,..... tarihinde Enstitü Yönetim Kurulu tarafından belirlenen ve yukarıda imzaları bulunan jüri üyeleri tarafından kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Tijen KAYA TEMİZ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRÜ

Bu tez Cumhuriyet Üniversitesi Senatosu'nun 24.09.2008 tarihli 007 sayılı toplantısında kabul edilen Sağlık Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Tez Yazım Klavuzu adlı yönergeye göre hazırlanmıştır.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

ÖZET.....	i
İNGİLİZCE ÖZET.....	ii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	v
KISALTMALAR DİZİNİ.....	vi
1 GİRİŞ.....	1
2 GENEL BİLGİLER.....	3
2.1 Tarihçe.....	3
2.2 Taksonomi.....	4
2.3 Hepatit B Virusunun Yapısı.....	5
2.3.1 Genom Yapısı.....	7
2.3.2 Viral Proteinler: Antijenik ve Fonksiyonel Özellikleri.....	9
2.3.2.1 Kılıf (Yüzey) Proteinleri.....	9
2.3.2.2 Kor Proteinleri.....	11
2.3.2.3 P Proteinleri.....	14
2.3.2.4 X Proteinleri.....	14
2.4 HBV Genotipleri.....	15
2.5 HBV Mutasyon Tipleri.....	16
2.5.1 Precore/core Geni Mutasyonları.....	16
2.5.2 S Geni Mutasyonları.....	16
2.5.3 P Geni Mutasyonları.....	17
2.5.4 X Geni Mutasyonları.....	17
2.6 Replikasyon Stratejisi.....	17
2.7 Virusun Dirençliliği.....	20
2.8 HBV'nun Patogenez.....	20
2.8.1 HBV'nun İmmun Kaçış Mekanizmaları.....	21
2.9 HBV'nun Yaptığı Hastalıklar.....	22
2.9.1 Akut Hepatit B.....	22
2.9.2 Kronik Hepatit B.....	23
2.9.3 Gizli Hepatit B.....	24
2.10 Hepatit B Enfeksiyonunun Laboratuvar Tanısı.....	27
2.10.1 Biyokimyasal Testler.....	27

2.10.2 Direkt inceleme, Hücre Kültürleri ve Hayvan Modelleri.....	27
2.10.3 Serolojik Testler.....	28
2.10.3.1 Serolojik Göstergeler.....	29
2.10.4 HBV Tanısında Moleküler Yöntemler.....	30
2.10.4.1 Hibridizasyon Yöntemi.....	30
2.10.4.1.1 Sıvı veya Solüsyon-Faz Hibridizasyon.....	30
2.10.4.1.2 Katı Destekli Hibridizasyon.....	31
2.10.4.2 Amplifikasyon Yöntemleri.....	32
2.10.4.2.1 Polimeraz Zincir Reaksiyon (PCR)	32
2.10.4.2.2 Sinyal Amplifikasyon.....	37
2.10.4.2.3 Zincir Yer Değiştirme Amplifikasyon.....	37
2.10.4.2.4 Probe Amplifikasyonu.....	38
2.11 Laboratuvar Testlerinin Yorumlanması.....	39
2.11.1 Akut HBV İnfeksiyonu.....	39
2.11.2 Kronik HBV İnfeksiyonu.....	40
2.11.3 Gizli HBV İnfeksiyonu.....	41
2.11.4 Olağan Dışı Tanı Kalıpları.....	42
2.11.5 HBV DNA ile Birlikte Olağan Dışı Serolojik Kalıplar.....	44
2.12 Tedavi.....	45
2.12.1 Kronik Hepatit B’de İnterferon Tedavisi.....	45
2.12.2 Akut Hepatit B’de İnterferon Tedavisi.....	45
2.13 Korunma.....	46
2.14 Hepatit B’nin Epidemiyolojisi.....	47
2.14.1 Bulaşma Yolları.....	47
2.14.2 Dünyada HBV İnfeksiyonu.....	48
2.14.3 Türkiye’de HBV İnfeksiyonu.....	49
2.14.4 Gizli Hepatit B İnfeksiyonu Prevalansı.....	51
3 GEREÇ VE YÖNTEM.....	54
3.1 Örnek Alımı ve Hazırlanması.....	54
3.2 Kullanılan Sistem ve Cihazlar.....	54
3.3 Kullanılan Kitler.....	54
3.3.1 Anti-HBc (total) ELISA Kiti.....	54
3.3.2 Anti-HBs ELISA Kiti.....	55
3.3.3 Anti-HBc IgM ELISA Kiti.....	55

3.3.4 Anti-HBe/HBeAg ELISA Kiti.....	55
3.3.5 HBV DNA İzolasyon Kiti.....	55
3.3.6 Real-Time PCR Kiti.....	55
3.4 Testlerin Yapılışı.....	56
3.4.1 Anti-HBc (total).....	56
3.4.2 Anti-HBs.....	56
3.4.3 Anti-HBc IgM.....	56
3.4.4 Anti-HBe ve HBeAg.....	57
3.4.5 HBV DNA'nın İzolasyonu.....	57
3.4.5.1 Bio Robot M48 Çalışma Prensibi.....	58
3.4.6 Real-Time PCR.....	58
3.5 istatistiksel Yöntem.....	59
4 BULGULAR.....	60
4.1 Anti-HBc (total) Testi Sonucu.....	60
4.2 Anti-HBs Testi Sonucu.....	61
4.3 Anti-HBc IgM Testi Sonucu.....	63
4.4 HBeAg/Anti-HBe Testi Sonucu.....	63
4.5 İzole Anti-HBc Pozitifliği.....	64
4.6 İzole Anti-HBc'li serumlarda HBV DNA'nın saptanması.....	65
5 TARTIŞMA.....	66
6 SONUÇLAR.....	74
KAYNAKLAR.....	75
ÖZGEÇMİŞ.....	86

ÖZET

İZOLE ANTI-HBC POZİTİFLİĞİ BULUNAN KAN DONÖRLERİNDE HBV DNA'NIN ARAŞTIRILMASI

Fahriye KÖTEN

Yüksek Lisans Tezi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Danışman Doç. Dr. A. Yasemin ÖZTOP

2009, 86 sayfa

Sivas yöresinde Şubat-Haziran 2008 tarihlerinde kan donörü olarak kabul edilen 987 bireyin serumunda anti-HBc (total) oranının belirlenmesi ve izole anti-HBc pozitifliği bulunan serumlarda HBV DNA varlığının araştırılması amaçlandı. Serumlarda Anti-HBc, Anti-HBs, Anti-HBc IgM, HBeAg/Anti-HBe göstergeleri mikro ELISA ile, HBV DNA real time PCR (Qiagen, Corbett Research) ile araştırıldı.

Çalışma sonunda 987 serumun 209'unda (%21.1) anti-HBc pozitif bulundu. Anti-HBc pozitif 209 serumun 33'ünde (%15.7) anti-HBs negatif, anti-HBs negatif 33 serumun 7'sinde anti-HBeAg, tamamında ise, anti-HBcIgM ve HBeAg negatif olarak saptandı. Böylece çalışılan serumların 26'sında (%2.6) izole anti-HBc profili bulunurken, birinde (%0.01) HBV DNA'sı (61 copies/ml, 8.7 IU/ml) belirlendi.

İzole anti-HBc profili taşıyan kan donörlerinin HBV'nü bulaştırma riski taşıdığı, bu durumun ülkemizde kan bankacılığı açısından dikkate alınmasının gerektiği sonucuna varıldı.

Anahtar kelimeler: Kan donörü, İzole Anti-HBc, HBV DNA

ABSTRACT

RESEARCH OF HBV DNA IN BLOOD DONORS WHERE ISOLATED ANTI-HBC POSITIVENES IS FOUND

Fahriye Köten

Master of Science Thesis, Department of Microbiology

Advisor Doc. Dr. A. Yasemin OZTOP

2009, 86 pages

In February-June 2008, in Sivas region, in the sera of 987 individuals accepted as a blood donor, it was aimed to search HBV DNA existence and determine the rating of anti-HBc (total) in the sera containing is plated anti-HBc positiveness. In the sera, it was also searched anti-HBc, anti-HBs, anti-HBc IgM, HBeAg/ Anti-HBe markers with micro ELISA, HBV DNA with Real-time PCR (Qiagen, Corbett Research).

In the end of study, it has been found (% 21.1) anti-HBc positive in the 209 sera out of 987 sera. It has been determined in the 33 sera out of 209 positive sera as (% 15.7) anti-HBs negative, in the 7 sera out of 33 sera as anti-HBeAg, in total of them as anti-HBc IgM and HBeAg negative.

Accordingly, as it has been found (% 2.6) isolated anti-HBc profile in the 26 sera which were worked on, (% 0.01) HBV DNA as (61 copies/ 8.7 IU/mL) has been determined only one of them.

It has been concluded that blood donors carrying isolated anti-HBc profile have the risk of HBV infection and accordingly this matter has to be put into consideration related to blood banking in our country.

Key words: Blood donor, Isolated anti-HBc, HBV DNA

Bu alışma T-247 Proje numaralı ‘İzole Anti-HBc Pozitifliği Bulunan Kan Donörlerinde HBV DNA’nın Araştırılması’ proje adı ile Cumhuriyet Üniversitesi Bilimsel Araştırma Fonu tarafında desteklenmiştir.

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1. Hepadnaviridae üyelerinin farklı özellikleri.....	5
Çizelge 2. HBV genleri ve bu genler tarafından sentezlenen proteinlerin özellikleri.....	8
Çizelge 3. HBV genotip ve subtiplerinin coğrafi dağılımı.....	15
Çizelge 4. HBV'nün serolojik göstergeleri.....	42
Çizelge 5. Kan donörlerinin yaş ve cinsiyete göre dağılımı.....	60
Çizelge 6. Anti-HBc pozitifliğinin yaş ve cinsiyete göre dağılımı.....	61
Çizelge 7. Anti-HBc'si pozitif donörlerdeki Anti-HBs oranlarının yaş ve cinsiyete göre dağılımı.....	62
Çizelge 8. Anti-HBs pozitifliğinin kantitatif olarak değerlendirilmesi.....	63
Çizelge 9. Anti-HBc (+), Anti-HBs(-) serumlarda Anti-HBcIgM, HBeAg ve Anti-HBe oranları.....	63
Çizelge 10. Anti-HBc'si pozitif serumlarda araştırılan serolojik göstergelerin birlikte bulunma durumu.....	64
Çizelge 11. İzole Anti-HBc pozitifliğinin yaş gruplarına göre dağılımı.....	64
Çizelge 12. Kan donörlerinde ve İzole Anti-HBc pozitifliğinde HBV DNA'nın bulunma durumu.....	65

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Hepatit B yüzey antijeninin üç formu.....	6
Şekil 2. Hepatit B virusunun genom yapısı.....	8
Şekil 3. Hepatit B virusunun kor antijenlerinin şematik görünümü.....	13
Şekil 4. Hepatit B Virüsünün Replikasyonu.....	19
Şekil 5. Akut HBV infeksiyonunun seyri ve Akut HBV İnfeksiyonunun Kronikleşmesi.....	40

KISALTMALAR DİZİNİ

HBV: Hepatit B virusu

HBsAg : Hepatit B yüzey antijeni

Anti-HBs : Hepatit B yüzey antikoru

Anti-HBc (total) : Hepatit B 'core' antikoru

Anti-HBc IgM : Hepatit B 'core' antikoru immunglobulin M

HBeAg : Hepatit B 'e' antijeni

Anti-HBe : Hepatit B 'e' antikoru

HBV DNA : Hepatit B virusu deoksiribonükleik asit

PCR : Polimeraze Chain Reaction (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)

ELISA : Enzyme-Linked İmmunosorbent Assay (Enzime Bağlı İmmünosorban yöntem)

1. GİRİŞ

Hepatit B, Hepatit B virüsünün (HBV) neden olduğu karaciğerin bir infeksiyon hastalığıdır. HBV infeksiyonu tüm dünyada 350 milyondan fazla insanı etkileyen önemli bir sağlık problemidir ve akut hepatit, asemptomatik taşıyıcılık, kronik hepatit, hepatosellüler karsinom ve sirozdan oluşan geniş bir hastalık grubundan sorumludur. Son yıllarda bu hastalıklara gizli (occult) HBV infeksiyonu da dahil edilmiştir.

HBV infeksiyonunun değişik dönemlerinde (akut, sağlıklı taşıyıcı, kronik aktif hepatit) ve virüsün mutasyona uğraması nedeniyle değişik serolojik tanı kalıpları vardır. Akut HBV infeksiyonu değişik klinik gidişler gösterebilir. Tamamen iyileşme görülebilir. Bu durumda kişilerin serumlarında HBV proteinleri ve HBV DNA saptanamaz. Hastalığın bulaştırılması ve komplikasyon gelişmesi söz konusu değildir (1). Hastalığın devam etmesi durumunda ise, üç farklı klinik form olabilir. Bunlar, kronik HBV infeksiyonu, sağlıklı taşıyıcılık ve gizli HBV infeksiyonudur

Gizli HBV infeksiyonu, HBV infeksiyonu sonrası spontan veya tedaviyle HBsAg'si saptanamayan hastalarda duyarlı PCR teknikleriyle serum veya karaciğer dokusunda HBV DNA'nın saptandığı kronik HBV infeksiyonu olarak tanımlanır (2). Kan ve organ nakillerinde gizli HBV infeksiyonlu kişiler bulaştırıcılık açısından risk oluşturmaktadırlar (3). Çünkü, HBsAg'nin saptanamayacak kadar düşük düzeyde olduğu anti-HBc'nin pozitif olduğu serumlarda HBV DNA'sı bulunabilmektedir (4). HBsAg negatif, anti-HBc pozitif kişilerden yapılan kan nakli sonunda HBV enfeksiyonunun geliştiği gösterilmiştir (5). Bütün serolojik göstergeleri negatif kişilerin serum ve karaciğerlerinde HBV DNA saptanmıştır. HBsAg'si negatif hastalardan böbrek naklini takiben yapılan immunsupresyon veya kanser kemoterapisi sonrasında HBsAg pozitifliği saptanmıştır (6). Gizli HBV infeksiyonunun nedenleri arasında mutasyon, virüs DNA'sının konak genomuna integrasyonu, immun komplekslerin oluşumu, konağın bağışık yanıtı, koinfeksiyon bulunur. Gizli HBV infeksiyonlularda anti-HBc ve/veya anti-HBs negatif veya az bir kısmında pozitifdir.

HBV infeksiyonunun olağan dışı serolojik göstergelerinden biri de izole anti-HBc pozitifliğidir. HBsAg'ye karşı oluşan antikor yani anti-HBc infeksiyon sırasında oluşur ve uzun süre kanda kalır (7). İzole anti-HBc pozitifliği bulunan kişilerin serumlarında sadece anti-HBc saptanmaktadır ve HBV taramalarının yaygınlaşmasıyla dikkat çekmiştir. Bu durumun nedenlerinin başında yalancı pozitiflik gelmektedir.

Kan donörlerinin HBV infeksiyonu yönünden taranması yasal olarak zorunludur. Bu nedenle donör kanlarında HBsAg antijeninin aranması uygulanmaktadır. Fakat HBsAg testi negatif kanlar ile HBV'nin bulaşabildiği saptanmıştır. HBsAg ve anti-HBs negatif, anti-HBc pozitif kan donörlerinin transfüzyon sonrası hepatite neden oldukları bildirilmiştir (8,9). Bu tür bulaşı önlemek için kanlarda nükleik asit saptama yöntemlerinin uygulandığı ülkeler bulunmaktadır. HBsAg negatif virüs içeren kanları belirlemek için bazı ülkelerde kan donörleri anti-HBc yönünden araştırılmaktadır. Bu yolun gizli infeksiyonları saptamak için yararlı olduğu bildirilmiştir (10).

Bu çalışmada, HBsAg'si negatif olan ve donör kanı olarak kabul edilen serumlarda anti-HBc antikorunun oranının belirlenmesi ve izole anti-HBc pozitifliği bulunan serumlarda real-time PCR yöntemiyle HBV DNA varlığının araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Tarihçe

Viral hepatit Hipokrat tarafından ilk kez tıbbi kayıtlara geçirilen eski bir hastalıktır. Hastalığın bilimsel tanımı 1865'te Virchow tarafından yapılmış ve "kataral ikter" adı ile tanımlanmıştır.

Lurman 1883'de kan ve kan ürünleriyle bulaşabilen formunu bildirmiş ve 1960'lı yılların ilk yarısında Krugman ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmalar sonucunda; epidemiyolojik, klinik ve immunolojik olarak birbirinden tamamen farklı iki ayrı hepatit virüsünün varlığını doğrulamışlardır (11). HBV'nün tarihçesinde 1965 yılı dönüm noktasıdır. Hepatit araştırmalarında bu tarihe kadar olan süreye "gümüş çağ", sonraki döneme ise "altın çağ" denilmiştir. 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 (12). Bu antijenin bulunmasıyla yapılan çalışmalar HBV'nün tüm dünyada önemli bir sağlık sorunu olduğunu ortaya koymuştur.

Dane ve arkadaşları 1970'de HBV'nün kısmen saflaştırılmış preparasyonlarının elektron mikroskopik incelemelerinde üç değişik partiküle rastlamışlardır. Bunlardan infeksiyöz özelliğe sahip, 42 nm çapında olanlara "Dane partikülü" adı verilmiştir. Daha sonra HBV'nün Dane partikülü olduğu ve yüzeyinin hepatit B yüzey antijeni (HBsAg) ile kaplı olduğu gösterilmiştir. Kor bölümü DNA ve hepatit B kor antijenini kapsamaktadır. Bu antijenlere karşı gelişen antikorlar anti-HBs (HBsAg'ye karşı oluşan antikor) olarak adlandırılmıştır. 1972'de üçüncü antijen hepatit e antijeni (HBeAg) tanımlanmıştır (13).

2.2 Taksonomi

HBV, *Hepadnaviridae* ailesinin *Orthohepadnavirus* cinsinde yer alan bir DNA virüsüdür. HBV'nün *Hepadnaviridae* ailesinin protipi olarak belirlenmesi önemli bir gelişmedir. HBV'nün keşfinden sonra bazı memeli hayvanlar ile kuşlarda hepatite neden olan değişik yeni virüsler bulunmuştur. 1978 yılında kronik aktif hepatit ve hepatomalı *Marmata monax* (bir cins dağ sıçanı) otopsilerinde sık bulunan ve *Woodchuck hepatitis virus* (WHV) adı verilen yeni bir virüs keşfedilmiştir. 1980 yılında Kuzey California'da yaşayan ve *Spermophilus beecheyi* denilen vahşi yer sincaplarından *Ground squirrel hepatitis virus* (GSHV) izole edilmiştir. Sonraki yıllarda ABD'de ticari amaçla yetiştirilen hepatosellüler karsinomalı (HCC) Pekin ördeklerinde *Duck hepatitis B virus* (DHBV)'un varlığına dikkat çekilmiştir (9). *Hepadnaviridae* ailesi içerisinde yer alan bu virüsler virion büyüklükleri, ince yapıları genom replikasyonunda revers transkripsiyonuna gereksinim duymaları, karaciğer tropizmi göstermeleri, persistan infeksiyon oluşturma güçleri ve hepatosellüler kanserler ile ilişkilileri ve infektif partiküller dışında kanda yüksek konsantrasyonlarda noninfektif kılıf antijen partikülü üretmeleri gibi ortak özelliklere sahip olmalarının yanı sıra bir takım farklılıklar da göstermektedirler (9).

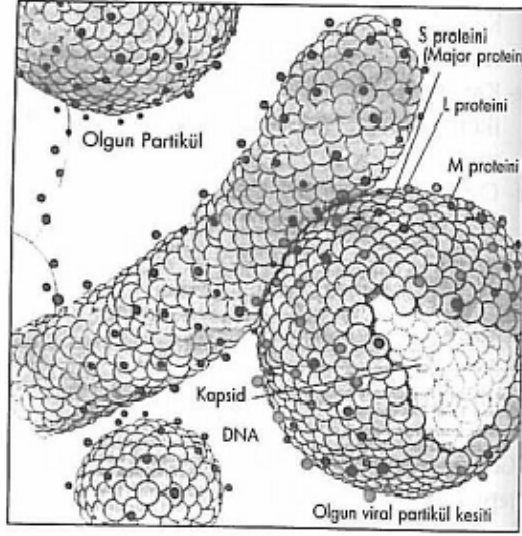
Hepadnaviridae üyelerinin farklı özellikleri Çizelge 1'de gösterilmiştir

Çizelge 1. Hepadnaviridae üyelerinin farklı özellikleri (14)

	Orthohepadnavirus			Avihepadnavirus
	HBV	WHV	GSHV	DBHV
Büyükklük	42 nm	40-42 nm	40-42 nm	46-48 nm
Genom	3.2 kb	3.3 kb	3.3 kb	3.0 kb
Viral DNA	Tamamlanmamış	Tamamlanmamış	Tamamlanmamış	Tam
Zarf Proteinleri	L, M, S	L, M, S	L, M, S	L, S
Gen	S, C, P, X	S, C, P, X	S, C, P, X	S, C, P
Konak	İnsan Şempanze	Dağsıçanı	Yer sincabı Dağ sincabı Amerika sincabı	Ördek Kaz Balıkçıl
Replikasyon	Karaciğer Böbrek Pankreas Beyaz küreler	Karaciğer Böbrek Pankreas Beyaz küreler Diğer	Karaciğer	Karaciğer Böbrek Pankreas Dalak Diğer
Hastalık	Aseptomatik taşıyıcılık Hepatit Siroz HCC	Aseptomatik taşıyıcılık Hepatit HCC	Aseptomatik taşıyıcılık Hepatit HCC	Aseptomatik taşıyıcılık Hepatit
Dağılım	Tüm dünya	Doğu A.B.D.	California	Çin A.B.D.

2.3 Hepatit B Virusü'nün Yapısı

HBV, *Hepadnaviridae* ailesinin *orthohepadnavirus* cinsinde yer alan hepatotropik, zarflı ve kısmen çift sarmallı bir DNA virüsüdür. HBV, sadece 3200 nükleotidden oluşan genomik yapısı nedeniyle, bilinen tüm hayvan DNA virüslerinin içinde en küçük olanıdır. *Hepadnaviridae* ailesinin üyeleri içinde insanlarda infeksiyon oluşturan tek tür HBV'dür. İnfekte hücrelerde birden fazla sayıda partikül tipi oluşumuna yol açması nedeniyle diğer hayvan virüslerinden farklı bir yere sahip olan HBV'nün, kısmen saflaştırılmış preparasyonları elektron mikroskopunda incelenecek olur ise; büyüklük yapı ve miktar gibi değişik özellikleri bakımından birbirine benzemeyen üç tip partiküle rastlanır (Şekil 1) (15).



Şekil 1. Hepatit B yüzey antijeninin üç formu (15)

a) Yaklaşık 42 nm. (42-47 nm.) çapında, infeksiyöz özellikte, tam bir viriyon yapısında, küresel şekilli, Dane partikülleri.

b) Yaklaşık 22 nm. (16-25 nm.) çapında, içinde nükleik asit bulunmayan, infeksiyon yapmayan küresel partiküller;

c) Özellikle replikasyonun söz konusu olduğu kişilerin serumunda bulunan, 22 nm. çapında, 50-500 nm uzunluğunda nükleik asit içermeyen, infeksiyon yapmayan; tübüler partiküller.

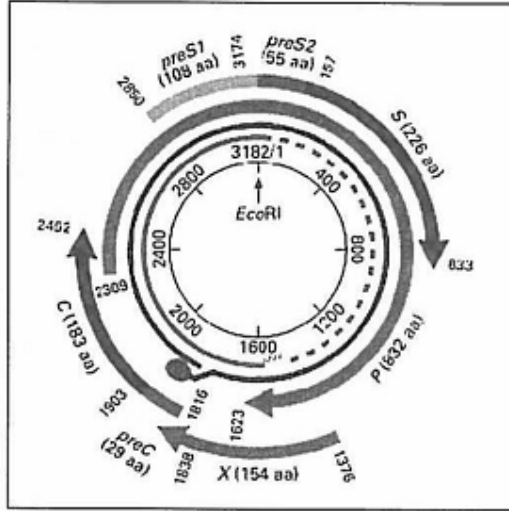
Her üç form da infekte konak serumunda yüksek miktarda (200-500 mg/ml) saptanabilen ve HBsAg adı verilen ortak yüzey antijenine sahip olup, immunojeniktir (16).

2.3.1 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; 3.200 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 her birinin 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 "kalıp zincir" işleminde DNA polimerazın da etkisi ile kısa zincirin tamamlanmasında ve sonuçta süper kıvrımlı, tamamen çift sarmallı, çember şeklindeki DNA molekülünün oluşumunda rol oynar (17).

Viral DNA'nın yapısal bütünlüğü her iki zincirin 5' uçlarında bulunan koheziv bölgelerinden birbirlerine tutunmaları ile sağlanır. Bu bölgeler 10-12 nükleotidlik yinelenen dizinlerden meydana gelmiş sabit bölgeler olup, DR (direct repeats) olarak adlandırılır (18).

Son yıllarda moleküler biyoloji alanındaki gelişmeler HBV genom yapısının ortaya konulmasında, nükleotid dizilişi ve gen bölgelerinin belirlenmesinde büyük katkılar sağlamıştır. HBV'de genetik bilginin tamamı uzun sarmal üzerinde kodlanmış olup bu sarmal S, C, X ve P kısaltmaları ile gösterilen dört değişik protein kodlayan nükleik asit dizisine (open reading frame: ORF) sahiptir. HBV-DNA'daki genler, arka arkaya dizilmiş ve birbirinden tamamen ayrı bölgelerde bulunmazlar, aksine bazı bölgelerde iç içe 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 nedeniyle HBV, bilinen hayvan virüsleri içinde en küçük genomik yapıya sahip olmakla birlikte, kendini kodlama kapasitesi en fazla olan virüsdür (18) (Şekil 2).



Şekil 2. Hepatit B Virüsünün Genom Yapısı (15)

Gen 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 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 (19) (Çizelge 2).

Çizelge 2. HBV Genleri ve Bu Genler Tarafından Sentezlenen Proteinlerin Özellikleri (19)

Gen Bölgesi	Nükleotid yerleşimi	Protein	Aminoasit sayısı	Molekül ağırlığı (kDa)	
				Nonglikolize	Glikolize
Pre-S1	2850-3174	LHBs	389	39	42
Pre-S2	3174-157	MHBs	281	33	36
S	157-833	SHBs	226	24	27
Pre-C/C	1816-2452	HBcAg	212	15	-
C	1903-2452	HBcAg	183	19	-
P	2309-1623	DNA pol	832	92	-
X	1376-1838	HBxAg	154	16	-

2.3 Viral Proteinler: Antijenik ve Fonksiyonel Özellikleri

2.3.2.1 Kılıf (yüzey) Proteinleri

HBV-S geni tarafından kodlanan kılıf (yüzey) proteinleri (HBs), hem Dane partiküllerinin yüzeyinde hem de infekte hastaların karaciğer ve serumlarında saptanan 22 nm. çapındaki küresel ve tübüler (eksik viral) partiküllerin yapısında bulunmaktadır. Daha önceleri S gen ürününün tek bir protein molekülünden oluştuğu sanılmış ancak son yıllarda jel elektroforez tekniği ile yapılan çalışmalar; yüzey proteinlerinin değişik molekül ağırlıklarında, glikoze ve nonglikoze altı farklı oranlarda bir araya gelmesi ile oluştuğunu ortaya koymuştur. Tek bir gen tarafından kodlanan bu proteinlerdeki farklılıklar sentezin aynı gen üzerindeki farklı başlangıç kodonlarından başlaması nedeniyle olmaktadır. 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 sentezlenmektedir (14,19).

Okuma işlemi gen üzerindeki ilk kodondan başlarsa pre-S1 + pre-S2 + S bölgelerinin tümü okunacağından kılıfın büyük proteini (L protein:LHBs) sentezlenir. LHBs en fazla Dane partiküllerinin yüzeyinde bulunur. Tübüler partiküllerin kılıfında da orta miktarda L proteinine rastlanır ama küçük küresel partiküllerdeki miktarı çok azdır (20).

Viriyonun konak hücreye bağlanmasında L proteininin rolü olduğuna inanılmaktadır. Henüz tam olarak tanımlanmış bir reseptör olmamasına rağmen LHBs'nin 21-47. aminoasitleri arasındaki bölgenin hepatositlere tutunma özelliğine sahip olduğu saptanmış ve bu bölgeye karşı oluşturulan antikorların bağlanmayı engellediği gösterilmiştir. Dane partiküllerinin oluşumu, bir araya gelmesi ve konak hücreden salınması için M proteininin varlığı şart olmamakla birlikte S ve L proteinlerinin mutlaka sentezlenmiş olması gerekmektedir.

Asemptomatik HBsAg taşıyıcılarında düşük düzeyde ama devamlı üretilen LHBs'in hepatositlerde lezyon oluşumuna ve HCC gelişimine neden olabileceği düşünülmektedir. Hepatosit içinde pre-s1 ürünlerinin birikimi endoplazmik retikulumda dilatasyona neden olmakta, hücre balonlaşmakta, hidropik ve eozinofilik özellik kazanarak buzlu cam görünümü almakta, sonuçta koagülasyon nekrozu ile hücreler ölmektedir.

Okuma işlemi S geni üzerindeki ikinci kodondan başlarsa bu kez pre-S2 + S bölgelerinin ürünü olan orta protein (M proteini: MHBs) sentezlenir. Her üç partikül

tipinde de minör komponent olarak bulunan MHBs replikasyonun olmadığı durumlarda HBsAg içinde yer almaz. Bu nedenle pre-S2 antijeninin varlığı viral replikasyonun bir göstergesi olarak kabul edilir (20).

L ve M proteinleri infeksiyonun erken dönemlerinde ortaya çıkmakta ve bunlara karşı gelişen antikorların gösterilmesi iyileşmenin habercisi olarak kabul edilmektedir (15).

HBV'nün karaciğer hücrelerine tutunmasında rolünün olabileceği düşünülen bir diğer reseptör de pre-S2 glikandır. HBV'nün bu bölgeden mannoz bağlayan protein (MBP) aracılığı ile hepatositlere bağlandığı sanılmaktadır. Okuma işlemi sadece S bölgesini içerirse kılıfın küçük proteini (S protein: SHBs) sentezlenir. HBsAg'nin büyük kısmını oluşturan SHBs kılıfın major proteini olarak bilinir ve B lenfositleri için epitopik bölgeye sahiptir (18,20).

Daha önce sadece S proteini ihtiva ettiği sanılan klasik HBsAg'nin son yıllarda yapılan değişik çalışmalar sonucunda değişik oranlarda diğer kılıf proteinlerini (L ve M) de içerdiği anlaşılmıştır. Kanda dolaşan S geni ürünlerinin yaklaşık %5-15'i M, %1-2'si L ve geri kalan kısmı S proteininden oluşmaktadır. Yapılan fraksiyonel çalışmalar bu üç proteinin, çeşitli HBV partikül tipleri arasında eşit miktarda dağılmadığını ortaya koymuştur. Küçük partiküllerde bazen LHBs'e hiç rastlanmayabilir ama Dane partiküllerinde L proteini daima vardır. L proteininin reseptör tanıma alanına sahip olması ve viriyonlarda diğer partiküllerden farklı olarak daha fazla miktarda yer alması konak hücre yüzey reseptörlerine bağlanmada Dane partiküllerini avantajlı hale getirmektedir (17).

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" determinantına karşı oluşan antikorlar HBV'nün hepatositlere bağlanmasını engeller ve tüm subtiplere karşı etkili bir bağışıklık sağlar. Viriyonun dış yüzeyinde bulunan "a" determinantı; aşı ve doğal infeksiyon sonrası oluşan anti-HBs'lerin büyük kısmını bağlama özelliğine sahiptir .

Pepsin ile muamele edilerek pre-S1 ve pre-S2 gen ürünleri uzaklaştırılan; sonuçta içinde sadece S proteinleri bulunan HBsAg'den derive edilmiş plazma aşılı ile yapılan çalışmalar, HBV'ne karşı oldukça etkili bir bağışıklık oluşturduğunu göstermiştir. S determinantına karşı gelişen humoral immun cevabın HBV'nden korunmada etkili olması ve tüm HBsAg preparasyonlarında "a" determinantının bulunması farklı ve

benzer subtiplerle oluşan reinfeksiyonlardan korunmanın “a” determinantına karşı gelişen cevap ile olduğunu göstermektedir (21).

HBsAg subtipleri arasında biyolojik farklılıklara rastlanmaz. Yeryüzündeki dağılımları da benzer değildir. Bu nedenlerle epidemiyolojik çalışmalarda, HBsAg subtiplerinin saptanması, infeksiyon kaynağının izinin sürülmesi ve HBV'nun bireyler ve toplumlar arasındaki yayılımın izlenmesinde önemli ipuçları verir. A.B.D.'de “w” subtipi “r”den daha yaygın iken, Tayland'da en sık görülen subtip “r” dir, “adw”; Kuzey Avrupa, Amerika ve Avustralya'da “ayr”; Doğu Avrupa, Doğu Akdeniz, Kuzey ve Orta Asya'da predominanttır. Malezya, Japonya, Tayland ve Endonezya'da “adr” daha sık olmakla beraber “adw” subtipine de rastlanmaktadır (22).

HBsAg: Kompleks yapıda bir antiyendir. Protein, karbonhidrat ve lipidlerden yapılmıştır. Küresel ve filamentöz parçacıklar bu antiyenin polimerleridir. HBs proteinlerinin fazla yapılmasının nedeni az sayıda antikorları bağlayıp, geri kalanlarının immun sistemden kaçmasını sağlamak olduğu düşünülmektedir. Hem virionlarda hem de kanda serbest olarak bulunan HBV, infekte kişilerin %95'inde serumda ilk beliren işarettir (23).

2.3.2.2 Kor Proteinleri

HBV genomu C geninde bir ORF bulunmasına rağmen, gen üzerinde okuma işleminin başladığı iki farklı kodon 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 yeteneğine sahiptir (17,18).

Her iki bölgeye (HBeAg ve HBcAg) ait stop kodon aynı nükleotitte bulunur. Dolayısıyla protein sentezi sırasında okuma işlemi hangi başlangıç kodonundan başlarsa başlasın aynı ortak noktada sonlanır. Pre-C'den başlayan okuma işleminde her iki bölge de okunarak 212 aminoasitten oluşan, 25 kDa molekül ağırlığında bir polipeptid sentezlenir. İşlenmemiş haldeki bu proteinin aminoasit sekansı; n terminal ucunda yer alan 29 aminoasitlik ek parça dışında, HBcAg sekansı ile tamamen benzerdir. Bu ek sekans, sentez sırasında giderek uzamaya başlayan pre-C polipeptidini endoplazmik retikuluma yönlendirir, burada bir peptidaz tarafından C terminal bölgesindeki 34 aminoasitlik bölüm kesintiye uğrar ve işlenmiş protein haline gelerek ya golgi cisimciği üzerinden HBeAg olarak sekrete edilir ya da çekirdeğe yönlendirilir (19).

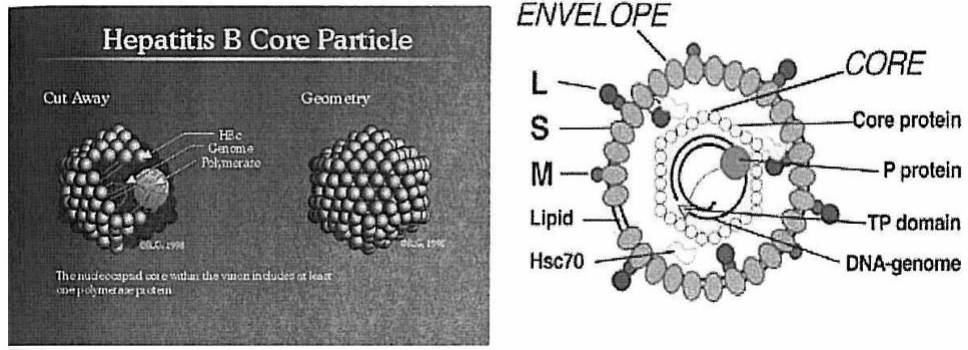
HBeAg ile HBcAg ortak determinantlar içerir. Kanda dolaşan HBeAg spesifik olarak serum albumini, immunglobulin ve antitripsine bağlanma özelliğine sahip

olduğundan yapısındaki HBcAg ile ilgili determinantlar maskelenir ve özgül olarak anti-HBe'ye bağlanabilirken, anti-HBc ile reaksiyona girmez. 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 HBeAg'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 (18,19).

Yüksek düzeyde viremik HBsAg taşıyıcılarının serumları üzerinde yürütülen çalışmalarda, bu serumların bol miktarda HBeAg içerdiği saptanmış; replikasyonda rol oynayan pre-C/C geni tarafından sentezlenmesi nedeni ile HBeAg'nin aktif HBV replikasyonunun belirlenmesinde uygun bir gösterge olabileceği düşünülmüş ve uzun yıllar vireminin tespit edilmesi amacıyla önemli bir parametre olarak kullanılmıştır. Ancak HBV-DNA testlerinin yaygın olarak kullanılmaya başlaması ve anti-HBe ile birlikte HBV-DNA seropozitifliği de gösteren kronik hepatitli hastalarda bir HBV mutantının tanımlanmasından sonra gerek HBeAg gerekse anti-HBe'nin vireminin saptanmasında çok güvenilir parametreler olmadığı anlaşılmıştır (24).

C geninin ikinci bölgesi tarafından sentezlenen polipeptidin ön kısmı 29 aminoasitlik ek sekansdan mahrum olduğu için endoplazmik retikulumda gidemez ve konak hücre sitoplazmasında kalır. Yüksek derecede saflaştırılmış virion korlarında ve HBV ile infekte hasta hepatositlerinde gösterilebilen HBcAg sıklıkla intranükleer yerleşimlidir. Ancak aktif hastalık döneminde ve aşırı viral replikasyon gösteren olgularda sitoplazmada da yaygın olarak saptanabilir (16,18).

HBeAg ekstra selüler ortama (serum) sekrete edildiği halde, HBcAg için böyle bir durum söz konusu değildir. Bu nedenle dolaşımında serbest halde HBcAg'ne rastlanmaz. Kanda sadece Dane partiküllerinin içinde bulunur. Serum defalarca dondurulup, çözülür veya lipid eriticiler ile muamele edilirse virionlar parçalanır ve HBcAg serbestleşir (16,20).



Şekil 3: Hepatit B Virüsünün Kor Antijenlerinin Şematik Görünümü (25)

HBeAg ve HBcAg oldukça immunojenlerdir. HBcAg'nin immunojenitesi HBsAg'den daha fazladır ve T hücre-bağımsız antijen özelliği gösterir. HBV ile infekte hastaların hemen tamamında gerek HBeAg gerekse HBcAg'ne karşı hem hücresel hem de humoral cevap gelişir. Değişik çalışmalar; her iki antijenin de T ve B hücrelerini tanıyan epitoplara sahip olduğunu ortaya koymuştur (18,19). HBcAg'ne özgül T hücreleri; HBsAg humoral cevabını başlatabilir ya da bu yanıtı fonksiyonel yardım sağlayabilir. Böylece genetik kaynaklı S epitop cevapsızlığının üstesinden gelmesine yardım eder. Bu nedenlerle S antijen aşılara HBcAg eklenmesinin insanlardaki etkinliği artırabileceği ve S antijenine cevapsızlığın söz konusu olduğu bireylerde antikor yanıtı geliştirebileceği düşünülmektedir. 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-HBcIgM akut dönemde; HBsAg'nin kaybolup anti-HBs'nin henüz belirmediği dönemde pozitifleşir. Fakat bu antikorun tek başına akut enfeksiyon 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 (19,20).

HBcAg: Nükleokapsid geninin özel ürünüdür. Serumda serbest halde bulunmaz. Karaciğer biyopsisi sonrası immün elektron mikroskobu ve indirekt immunfloresan yöntemi ile hepatositlerin nükleusunda görülebilir (26). Genellikle virionun kor kısmında HBc proteinleri birleşerek, HBV DNA ve DNA polimerazı dıştan sararlar .

HBeAg: HBV'nün kor kısmında yer alan internal bir antijendir. Serumda bulunması viral parçacıkların, DNA polimerazın, HBV DNA'nın varlığını, hepatit B'nin aktif olarak çoğaldığını gösterir. Kısa ömürlü olup HBsAg ile hemen hemen aynı dönemde ortaya çıkar ve daha önce kaybolur. 10 haftadan uzun süreli kalması enfeksiyonun kronikleşeceğini, negatifleşmesi ise özellikle de anti-HBe'nin ortaya çıkması ile birlikte ise iyileşmeye doğru gidişi gösterir (23,27,28). Fakat mutant HBV türleri hiç HBeAg üretmeyebilirler ve anti-HBe varlığında da replikasyona devam edebilirler, bu durumda serum HBV DNA'sı ölçülebilir düzeydedir. Bu mutant virüslerin kanıtı için virüs genotipinin moleküler analizi yapılmalıdır.

2.3.2.3 P Proteini:

P geni, HBV genomunun yaklaşık ¾'ünü kaplayan en uzun genidir. P proteini; revers transkriptaz, endonükleaz (RNase H) ve hem DNA hem de RNA'ya bağımlı polimeraz aktivitesine sahiptir (17,19).

P proteininin immunojen özelliği vardır. Hasta serumunda bulunan anti-DNA polimeraz antikorları, sentetik peptid antijenleri ile gösterilebilmektedir (20).

2.3.2.4 X Proteini:

X geni, HBV genomunda en küçük gen bölgesidir. X geni, transkripsiyonel transaktivatörler olarak görev yapan iki protein sentezler. Bu gen tarafından sentezlenen HBxAg küçük bazik bir proteindir. Viral siklus ve HBV patobiyolojisinde bu proteinin fonksiyonu henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Diğer taraftan X proteini tümör supressör gen ürününün işlevini bozar. Bu durum HBV ile ilişkili hepatokarsinogenez sürecinin ilk aşamasında, X proteininin etkili olduğunu düşündürmekte ve HBxAg'nin hepatosellüler karsinom gelişiminde rol oynayabileceğini akla getirmektedir (29).

2.4 HBV Genotipleri

Moleküler düzeyde yapılan çalışmalar sonucunda; HBV genomları arasında farklılıklar olduğu saptanmış ve birbirlerine benzerlik oranı %92 ve daha fazla 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 (14) (Çizelge 3).

Çizelge 3: HBV Genotip ve Subtiplerinin Coğrafi Dağılımı (14)

Genotip	Subtip	En sık görüldüğü bölge
A	adw ₂	Kuzeybatı Avrupa
	adw ₁	Sahra altı Afrika
B	adw ₂	Endonezya, Çin
	adw ₁	Vietnam
C	adw ₂	Doğu Asya
	adrq'	Japonya, Kore, Çin
	adrq-	Fransız Polinezyası
	ayr	Vietnam
D	ayw ₂	Akdeniz bölgesi
	ayw ₃	Hindistan, Pakistan, Yakın Doğu
E	ayw ₄	Batı ve Sahra altı Afrika
F	adw ₄ q-	Orta Amerika, Şili, Arjantin, Peru, Amazon bölgesi

2.5 HBV Mutasyon Tipleri

HBV ile infekte bireylerde infeksiyon yaşı arttıkça, viral popülasyonda mutant virüslerin ortaya çıktığı saptanmıştır. Deneysel olarak HBV'nin mutasyon hızı her infeksiyon yılında 10 000 bp için 1 nükleotid olarak hesaplanmıştır. HBV uzun yıllar kronik olarak kaldığından, mutant kökenler zaman içinde birikmekte ve popülasyona hakim olmaktadır. Bunun yanında antiviral tedavi edilmesi “wild type” virüse göre, replikasyon üstünlüğü olan mutant virüslerin seleksiyonu daha hızlı olmaktadır.

2.5.1 Precore/core geni mutasyonları

Ağır karaciğer hastalığı ve aktif viremi olan birçok hastada, HBeAg'nin negatif olduğu görülmüştür. Bu hastalarda precore/core geninde 1896. nükleotidin mutasyonu ile stop kodon oluşmakta ve HBeAg translasyonu durmaktadır. Çekirdek proteini (HBcAg) sentezi bu kodondan daha sonra başladığı için bu mutasyondan etkilenmemektedir. “e-minus” olarak adlandırılan bu varyant virüsler fulminan hepatit ve ağır kronik karaciğer hastalıklarında tanımlanmıştır. HBV mutasyonlarının genotiplerle ilişkili olduğu gösterilmiştir. Precore 1896 mutasyonu A genotipinde nadirdir. Core promoter 1762 mutasyonu ise genotip B'den çok genotip C'de görülmekte ve daha ağır inflamasyona neden olmaktadır (30).

2.5.2 S geni mutasyonları

HBV'ne karşı nötralizan antikor yanıtına neden olan “a” determinantında, 124-147. aminoasitler arası, tüm subtiplerde oldukça korunmuş bir bölgedir. Özellikle 145. pozisyonda bulunan glisin, arjinine değişmesine neden olan mutasyonlar, virüste büyük antijenik değişikliklere neden olmaktadır. Bu bölgede olan aminoasit değişiklikleri HBsAg'nin üç boyutlu yapısında önemli değişikliğe yol açmakta, anti-HBs'nin nötralizan etkisinden kurtulmasına ve replikasyona devam etmesine neden olmaktadır. Rekombinant HBsAg içeren aşılarla immunize edilen çocuklarda, HBsAg ve anti-HBs birlikteliği ile görülen bu mutant kökenler, aşı ile indüklenmiş “kaçak mutantlar” olarak adlandırılmaktadır. Kronik HBV infeksiyonu olan ve aşılanmış kişilerde de, “a” determinantını etkileyen mutasyonlar saptanmış ve bu mutasyonların doğal olarak oluşabileceği gösterilmiştir (31).

2.5.3 P geni mutasyonları

Lamuvudin ve famsiklovir gibi viral revers transkriptaz inhibitörü olan ilaçlarla, tedavi sonrası görülmeye başlanmıştır. Lamuvudinle tedavisi sırasında P geninde pek çok mutasyon gösterilmiş ve bunlardan üç tanesinin ciddi lamuvudin direncine neden oldukları saptanmıştır. Polimeraz enziminin C katlantısındaki tirozin (Y), methionin (M), aspartat (D)ve aspartat (D) aminoasitlerinden YMDD motifi, methioninin izolösün veya valine değişmesi, B katlantısındaki lösünün methionine değişmesi, valinin lösine değişmesi, lamuvudin direncinden sorumlu tutulmaktadır. YMDD mutasyonları S genini de etkilemekte ve 529. pozisyondaki alaninin threonin değişmesi, S geninde stop kodon oluşturmakta ve HBsAg sekresyonunun durmasına neden olmaktadır.

2.5.4 X geni mutasyonları

X genindeki mutasyonlar, transkripsiyonun kontrolünü ve X proteinin fonksiyonunu etkiler. X geninin Cp//ENII lokusunda olan mutasyonlar, virüsün replikasyon aktivitesinde büyük değişikliklere neden olmaktadır (31).

2.6 Replikasyon Stratejisi

HBV'nün konak hücreye bağlanmasında rol oynadığı düşünölen fibronektin, transferin reseptörü, apolipoprotein h, polimerize insan serum albumini, pre-S2 glikan, HBV bağlayan faktör gibi birçok reseptör adayını tanımlanmıştır (20). Son yıllarda, her ne kadar, S proteinine özgü bazı reseptörlerin (endonexin II, siyaloglikoprotein, gibi) varlığı gösterilmiş olsa da, HBV'nün hepatositlere tutunmasında L ve M proteinlerinin önemli olduğu saptanmıştır. İn vitro olarak pre-S1 ve pre-S2'de karaciğere özgöl tutunma bölgeleri tanımlanmıştır (18).

Pre-S1 ürünü olan L protein, karaciğör plazma membranına ve mononökleer hücrelere bağlanabilir. Mononökleer hücrelerde saptanmakla birlikte, HBV'nün bu hücrelerde aktif olarak replike olduğuna dair bir kanıt yoktur. L ve M proteinleri hepatoblastom hücrelerine de direkt olarak tutunabilir (18). Hepadnavirusların replikasyonu ile ilgili bilgilerin çoğu hayvan modelleri üzerinde yürütölen çalışmalar sonucunda elde edilmiş olup viral replikasyonda üç önemli özellik vardır :

- a) DNA sarmallarının sentezi sırasında negatif iplikçiğın sentezi pozitif iplikçiğın sentezinden önce tamamlanmalıdır.
- b) Viral polimeraz aynı zamanda, revers transkriptaz olarak fonksiyon görür.

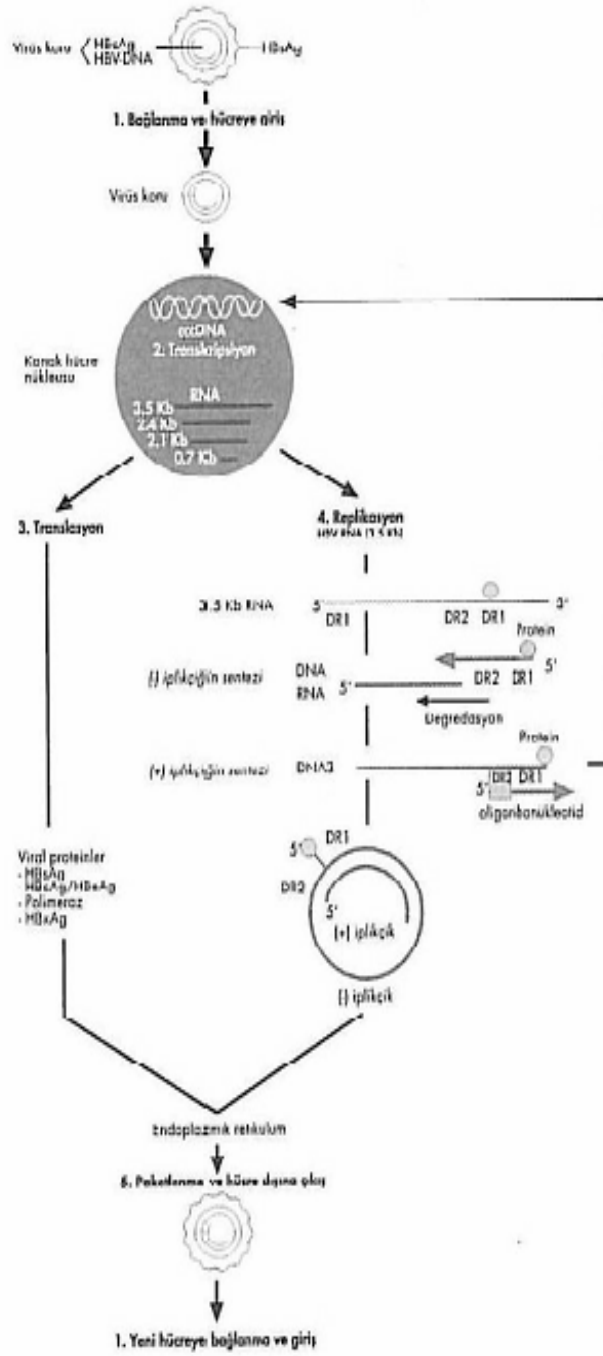
c) Negatif iplikçiğin sentezinde 5' ucuna kovalen olarak bağlı terminal protein "prime" edilirken, pozitif iplikçiğin primingi viral genomik RNA'dan derive olan bir oligoribonükleotiddir.

Hepatosite bağlanan virüsün 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 ift 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 (20).

Kalıp olarak cccDNA'dan konak hücre RNA polimerazının (RNA polimeraz II) yardımı ve viral düzenleyicilerin (4 adet promoter; 2 adet enhancer) etkisiyle viral RNA'lar sentezlenir. Bunu konak hücre sitoplazmasında devam eden replikasyon boyunca 3.5 kb'lık RNA (+RNA)'dan (-) DNA sarmalı sentezlenmesi izler .

Kısa zincirin sentezinde kalıp olarak uzun sarmal kullanılır. Kısmen ift sarmallı sirküler yapıdaki kor kısmının kılıf proteinleri tarafından çevrelenmesi ve aynı zamanda polimerazın da tükenmesi nedeniyle kısa zincirin sentezi tamamlanmaz ve bu sarmal eksik kalır (20) (şekil 3).

HBs proteinleri, endoplazmik retikulumda öncelikle transmembran proteinleri olarak sentezlenir. Oligomerizasyon, molekül içi ve moleküller arası disülfid köprülerinin oluşmasıyla olgunlaşır, tomurcuklanma sırasında membran lipidleri ile birlikte kor partiküllerini çevreleyip hücre dışına çıkarlar.



Şekil 4. Hepatit B Virüsünün Replikasyonu (32)

2.7 Virüsün Dirençliliği

HBV, serum içinde 30-32°C' de 6 ay, -20°C'de ise yıllarca canlılığını korur. Serum içinde 60°C'ye 4 saat dayanabilir, albumin içinde aynı sıcaklık derecesindeki dayanıklılığı daha uzun olup, 10 saat kadardır. Kurutulmuş virüs 25°C'de saklandığında 1 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 izopropil veya etil alkol virüsü inaktive eder. HBsAg içeren kan, plazma ve diğer kan ürünlerinin ultraviyole ışınlarına tabii tutulmasının infektivite ve antijenik yapı üzerine etkisi yoktur (14).

2.8 HBV'nün Patogenezi

HBV enfeksiyonunda karaciğer hasarının oluşmasında viral faktörlerden çok konak immün yanıtın rolü vardır. Yüksek düzeyde viral replikasyon gösteren fakat normal karaciğer enzim düzeyi ve histopatolojisine sahip olan kronik taşıyıcılar, virüsün direkt sitopatik etkisi olmadığını göstermektedir. Ayrıca hücre kültürlerinde üretilen virüsün, hücre canlılığı üzerine etkisi görülmemiştir. Yapılan araştırmalar virüsün temizlenmesi ve karaciğer hasarının spesifik immün yanıtla bağlı olduğunu göstermiştir. Akut enfeksiyonda birçok viral antijene karşı CD4 + ve CD8 + T hücre yanıtları görülmektedir. CD4 + T hücre yanıtları özellikle kor ve polimeraz proteinlerine, daha az olarak da yüzey proteinlerine karşı gelişir. Virüsün temizlenemediği kronik enfeksiyonlarda CD4 + ve CD8 + T hücre yanıtları belirgin olarak azalmıştır, buna karşın hem akut hem de kronik enfeksiyonlarda humoral yanıtlar görülmektedir. Özellikle Tümör Nekrotizan Faktör alfa (TNF- α) ve İnterferon -gamma (IFN- γ), HBV'nün temizlenmesinde etkili olmaktadır. Bu sitokinler iki ayrı yolu aktive ederek nükleokapsidlerin ve viral nükleik asidin yıkılmasını sağlamaktadırlar. Akut enfeksiyonda, virüsü temizlemek için immün sistemin birçok kola aktive olduğu görülmektedir. Transaminazların yükseldiği dönemde, HBV proteinlerine karşı antikor sentezlenmeye başlanmış olmaktadır. Bunlar içinde en kritik olanı anti-HBs antikorlarıdır. Sınırlı akut enfeksiyon sırasında HBcAg, HBeAg ve HBsAg'ye karşı güçlü CD4 + T hücre yanıtları gelişmektedir. İyileşen akut HBV enfeksiyonunda CD4 + T hücrelerinde Tip 1 sitokin yanıtı izlenmekte buna karşı kronik enfeksiyonlarda Tip 2 sitokin yanıtı oluşmaktadır. Sınırlı akut HBV enfeksiyonunda Tip 1 hücre yanıtlarının

yanında güçlü poliklonal ve multispesifik sitotoksik T hücreleri (CTL) yanıtları da gözlenmiştir. Kor, zarf ve polimeraz proteinlerinin birçok epitopuna karşı olan bu CTL yanıtı, virüsün temizlenmesinde önemli rol oynamaktadır. Fakat karaciğer gibi organlarda bu yanıtlardan çok, sitokinler virüsün temizlenmesini sağlamaktadır. TNF- α , HBV mRNA'sının yıkımını hızlandırır, ayrıca "core promoter" TNF- α , IFN- γ ve IFN- α 'ya duyarlıdır ve bu sitokinlerin varlığında inhibe olmaktadır. HBV spesifik CTL'ler karaciğerdeki doku hasarından da sorumludur, CTL infekte hepatositi tanıyınca apoptotik sinyal gönderir ve hepatositin ölümüne neden olur. Biyopsi örneklerinde apoptotik hepatositler asidofilik olarak görülür. CTL'ler sitokinler aracılığıyla bölgeye makrofaj ve doğal öldürücü (NK) hücrelerini çağırır. Fazla HBsAg eksprese eden olgularda bunun sonucunda fulminan hepatit gelişmektedir (33).

2.8.1 HBV'nün İmmun Kaçış Mekanizmaları

Gerek konağa gerekse virüse ait bazı özellikler HBV'nün immün tanınmasını engelleyebilmektedir. HBV, revers transkriptaz enzimine sahip olduğu için intrasellüler evrimi sırasında kendi DNA'sının konak hücre genomuna entegre 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 (34).

Yapılan çalışmalar karaciğer parankim yoğunluğunun, HBV proteinlerini eksprese eden hepatositlere T lenfosit girişini sınırlı hale getirdiğini ve bazı T lenfositlerin infekte hücreler ile kısıtlı bir şekilde temasa geçtiğini ortaya koymuştur. Pankreas ve böbreklerde karaciğerden farklı olarak mikrovasküler bariyer sistemi vardır. Mikrovasküler bariyerler bu dokulardaki HBsAg eksprese eden hücrelere HBsAg özgül sitotoksik T hücrelerin girişini ve saldırısını engelleyebilir. Virüsün 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 temizleme azalır. Bu durum viral persistansı kolaylaştırır (34).

Akut HBV enfeksiyonunda; kılıf proteinlerine karşı oluşan antikorların serbest halde bulunan virüslere bağlanarak bir kompleks oluşturduğuna, virüsün duyarlı hücrelere tutunup girmesinin engellendiğine ve kan dolaşımının virüsten temizlendiğine inanılmaktadır. İşte bu aşamada, değişik nedenlerle HBsAg ekspresyonunda bir kayıp olur veya yüzey proteinlerini kodlayan genlerde mutasyon oluşur ise anti-HBs varlığına rağmen enfeksiyon devam eder.

Viral genomun kopyalanması sırasında bir hata oluşursa bu durum farklı aminoasitlerin oluşması ve farklı proteinlerin sentezlenmesi ile sonuçlanır. Yaşamsal önemi olmayan proteinleri sentezleten kod değişikliklerinde, virüs yaşamını sürdürmeye devam eder. Ancak virüsün immun epitoplara mutasyona uğramıştır. İşte bu mutasyonlar immun kaçış mutasyonları olarak adlandırılır. İmmun kaçışta birbirinden farklı en az üç mekanizma rol oynar (35).

1. MHC ile bağlanmayı sağlayan bölgedeki peptid epitoplara oluşturulan 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 meydana gelebilir. Bu durumda antijen aynı MHC molekülüne bağlanır ve antijene özgü aynı TCR ile ilişkiye girer. HBV kor proteininin T yardımcı hücre epitoplarda meydana gelen mutasyonların antijen tanınmasında kayba yol açarak konak için daha yararlı olan hafif seyirli bir hepatite neden olduğu bildirilmiştir (36).

2.9 HBV'nün Yaptığı Hastalıklar

2.9.1 Akut Hepatit B

Akut HBV enfeksiyonunun inkübasyon zamanı 6 hafta ile 6 ay arasında değişmektedir. Bu dönem hastalığın 1. evresine karşılık gelmektedir. Fakat çoğu olguda bu aralık 60-180 gündür. Hepatitin ortaya çıkması serumda HBsAg'nin saptanmasından ortalama 4 hafta (1-7 hafta) sonradır. İnkübasyon zamanı hastanın yüksek viral yüklerle karşılaştığında veya perkütan yolla enfekte olduğunda kısalır. Temastan sonra HBsAg için özgül yüksek titreli antikor uygulanması (HBIG) inkübasyon zamanını uzatır ve enfeksiyonu engelleyebilir. Akut HBV enfeksiyonunun klinik bulguları yüksek oranda yaşa bağlıdır. İnfekte yeni doğanların hemen tamamı asemptomatiktir. 1-5 yaş arasındaki çocukların yalnızca %5-10'unda klinik bulgu vardır. Daha ileri yaşta çocuk ve erişkinlerin yaklaşık %10-30'u semptomatik hale gelir (37).

Akut HBV enfeksiyonunun klinik semptomları gribe benzemektedir. Bazı hastalar sarılık, koyu renkli idrar ve hepatomegali gibi bulgulardan yakınmaktadır. HBV enfeksiyonunun prodromal periferik fazı; çoğu hastada 1-2 hafta kadar sürebilir ve HAV enfeksiyonundan daha sinsi ve daha uzun sürebilir. Akut viral hepatitin ikterik fazına

sıklıkla klinik olarak sarılığın takip ettiği koyu renkli idrar eşlik eder. İkterin oluşumuyla semptomlar geriler ve genellikle ateş düşer. İkterin faz ortalama bir ay kadar devam eder.

Akut Hepatit B'nin klinik tanısı, karaciğer enzimlerinin artması ve viral antijen, antikor ve nükleik asitin saptanmasıyla konur. Semptomatik akut HBV enfeksiyonu olan hastaların %1'inden azında fulminan hepatik yetmezlik gelişir. Bulgular HBV enfeksiyonuna karşı infekte hepatositlerin masif nekrozu ile sonuçlanan aşırı güçlü immün yanıtı ile ilişkili olduklarını düşündürmektedir. HBcAg'ye karşı oluşan bu immün yanıt (anti-HBc IgM) hemen hemen her zaman pozitifdir. Bununla birlikte HbsAg ve HBeAg her zaman ölçülemez.

Akut HBV enfeksiyonunun patolojik özellikleri lobüler bozukluğa yol açan hem dejeneratif ve hem de rejeneratif parenkimal değişiklikler içermektedir. T lenfositleri akut HBV enfeksiyonu sırasında viral klirensin sağlanmasında önemli rol oynar. Öte yandan; onlar infekte hepatositlerin yüzeyinde eksprese edilen HBV nükleokapsit epitoplarını tanıyarak hepatosellüler hasara neden olurlar (37).

2.9.2 Kronik Hepatit B

En az 6 ay HBsAg pozitif hastaların; kronik HBV enfeksiyonu olduğu kabul edilir. Bu hastalar süresiz pozitif ve sonuç olarak enfeksiyonun 2. evresinde kalır. 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. Kronik hepatit B'nin semptomları belirsiz ve nonspesifiktir. Hastaların serum aminotransferaz enzimleri biraz yüksek olabilir. Ek olarak HBV virionları, aktif viral replikasyonu gösteren DNA polimeraz aktivitesi ve HBV DNA kanda tespit edilebilir. Karaciğer biopsisinde, hepatosellüler nekrozun eşlik ettiği aktif inflamasyon ve bazen fibrozis saptanabilir. Kronik hepatit sıklıkla sessiz bir hastalıktır. Çoğu hasta akut bir hastalık dönemi geçirdiğini hatırlamaz. Tanı genellikle donör olarak kan verme esnasında veya rutin kan taraması sırasında HBsAg pozitif bulunduğu ve serum transaminazlarında orta derecede yükseklik tespit edildiği zaman konabilir.

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 (38).

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.

Siroz geliştiğinde; semptomlar genellikle daha belirgin hale gelir. Kronik HBV enfeksiyonu ve sirozlu hastaların %12-55'inde hepatosellüler karsinom gelişir (37).

2.9.3 Gizli Hepatit B

HBV enfeksiyonunun iyileşmesi, HBsAg'nin kaybolması ile birlikte HBV-DNA'nın negatifleşmesi olarak tanımlanır. Bununla birlikte spontan veya tedavi ile HBsAg'ni kaybolan bazı hastalarda serum ve/veya karaciğerde hassas PCR teknikleri ile düşük düzeyde HBV-DNA (genellikle $<10^3$ viral genom/ml) varlığı gösterilmiştir (39). Böylece saptanamayan HBsAg ile birlikte kronik HBV enfeksiyonunu tanımlayan bu yeni durum gizli: sessiz veya latent HBV enfeksiyonu olarak adlandırılmaktadır. Gizli HBV enfeksiyonluların bir kısmında anti-HBc ve/veya anti-HBs pozitifdir. Hastaların önemli bir kısmında her ikisi de negatiftir.

Sınıflandırılmamış kronik hepatit veya HCC (Hepatosellüler Karsinoma)'lı hastalarda, hepatit C virüsüne karşı oluşan antikorların olmadığı durumda (HCC'ye ilişkin en yaygın ikinci etiyoloji), HBsAg'nin yokluğunda HBV DNA'ların düşük seviyeleri karaciğer dokularında ya da kanda belirlenmektedir. HBsAg ve Anti-HCV testine negatif sonuç veren kronik karaciğer hastalarının karaciğer dokularının %13-71'inde ve serumunun da %5-55'inde gizli HBV bulunmuştur. HCC'de, anti-HBc taşıyıcılarının %14-100'unda gizli HBV ve HBV göstergeleri olmayan hastaların %8-87'sinde gizli HBV bulunmuştur. HBV enfeksiyonunun klinik ve biyolojik spektrumunda GHB(Gizli Hepatit B)'nin asıl yeri iyi bilinmemektedir. Kronik HBV üzerine yapılan çalışmalar, HBsAg belirlenemedikten sonra, HBV DNA'sının serumda (%28) ya da karaciğerde (%94) yıllarca kaldığını göstermiştir. Bunun yanında, kan gönüllüleri, normal karaciğer fonksiyon testleri olan bireyler gibi karaciğer hastalığı olmayan kişilerde ve normal kişilerde gizli hepatit B gözlemlenmiştir.

Gizli HBV taşıyıcılarının epizomal karaciğerlerinin varlığına ve serbest HBV genomlarına rağmen niçin HBsAg negatif oldukları hala cevaplanmamış bir sorudur. Bu bireylerin bazıları; ya antijenik olarak değişikliğe uğrayan HBV S proteini üreterek; ki

bu (en hassas olanlar kullanılsa bile) mevcut HBsAg yöntemleriyle saptanamamaktadır, ya da S geni ekspresyonunu ve/veya viral yenilenmeyi engelleyen mutasyonları taşıyarak viral değişkenler tarafından etkilenmektedirler (40). Ancak virüsün genomik heterojenliği vakaların çoğundaki gizli durumda görülmemektedir. Gizli HBV'nün kişiden kişiye geçtiğine ve alıcıda klasik akut hepatit B tetiklediğine ve gizli HBV taşıyıcılarının tipik hepatit B serolojik profilinin yeniden görülmesiyle birlikte infeksiyonun yeniden akut bir aktivasyon gösterdiğine dair gözlemler (şempanzeler üzerinde yapılan deneyler ve insanlarda kan ve organ nakli sonuçlarının gözlemlenmesi ile) yapılmıştır (41). HBV aktivitelerinin engellenmesinden sorumlu mekanizmalar geniş ölçüde hala belirsizdir ve ortaya konan bütün hipotezler dolaylı kanıtlara dayanmaktadır. Mevcut veriler ortaya koymaktadır ki; (a) taşıyıcının bağışıklık tepkisi, (b) diğer bulaşıcı etmenlerle koenfeksiyon, ve (c) epigenetik faktörler gizli durumunun tetiklenmesinde önemli rol oynayabilmektedir.

Transfüzyon tespitinde, non-A, non-B hepatiti için yerini tutucu göstergeler olarak en başta anti-HBc kullanılmıştır. Anti-HCV izlenmesi uygulamasından bu yana, bu test artık gerekli değildir fakat gizli HBV bulaşmasını engelleme nedeniyle kullanılmaktadır (42). Bazı çalışmalarda gecikmiş HBV DNA vericileri test edilirken anti-HBc değerleri bulunmuştur. İlgili alandaki HBV'nin epidemiyolojisine bağlı kalarak, anti-HBc pozitif kan ünitelerindeki diğer HBV belirteçlerinin dağılımı oldukça farklı olabilmektedir. Kuzey Avrupa ve Kuzey Amerika gibi düşük prevalanslı bölgelerde, anti-HBc-pozitif örneklerinin çoğu aynı zamanda anti-HBs taşımaktadır. Yüksek anti-HBs seviyeleri olan örnekler devamlı olarak HBV DNA negatiftir fakat yukarıda belirtildiği gibi bazı düşük seviyeli anti-HBs pozitif birimleri HBV DNA içerebilir.

Yüksek antikor titrelili örnekler genellikle anti-HBe içermesine rağmen, anti-HBs'si olmayan anti-HBc genellikle 'izole-anti-HBc' diye adlandırılır. Avrupa'daki ve Kuzey Amerika'daki izole-anti-HBc prevalansı oldukça düşüktür. HBV DNA içeren örneklerin yüzdesi, ya kan verenlerden ya da genel popülasyonda, %0 ve %7-7 arasında değişmektedir. İzole anti-HBc prevalansı İngiltere'de %0-07 ve Almanya'da %1-5 olarak bildirilmiştir (43). HBV infeksiyonunun yüksek frekanslı olduğu ülkelerde, örneğin Yunanistan (%15-8), Çin (%70-0) ve Gana (%83-6), izole anti-HBc sırasıyla şu değerlerdedir: %1-9 %2-7 %12-7 (50). Ancak raporlar arasında anti-HBc prevalansının karşılaştırılması zorlukla yapılmaktadır. Gerçek reaktiviteyi

belirlemek için çoklu ardışık testler de dâhil algoritmeler gereklidir (43). Bu zorluğu aşmak için, Japon kan bankaları son zamanlarda ≥ 32 seviyede anti-HBc cut-off aglütinasyon titresi oluşturmuşlardır, bu seviyenin altında, kan vermelerin enfeksiyonsuz olduğu görülmüştür (muhtemelen yanlış pozitif ya da belirlenemeyen anti-HBs).

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. Gizli HBV enfeksiyonunun da buna katkısı vardır. Organ nakilleri sırasında, vericideki gizli HBV enfeksiyonu alıcıya HBV enfeksiyonunu bulaştırabilir. Hemodiyaliz hastalarında gizli HBV enfeksiyon oranı %14-36'dır; Böbrek nakli sonrasında HBsAg negatif, anti-HBs pozitif bir hastada HBV enfeksiyonu bildirilmiştir. Bu hastanın nakil öncesindeki serumu retrospektif olarak incelendiğinde PCR ile HBV-DNA'nın pozitif olduğu görülmüştür (44). Kriptojenik karaciğer hastalıklarında gizli 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 (45). HBsAg negatif fulminan karaciğer yetersizliği vakalarının önemli bir kısmında (%0-47) HBV-DNA pozitif bulunmuştur (46). Oranlardaki bu değişkenlik HBV'nin coğrafik dağılımı ile ilgilidir. Fulminan B hepatitli hastalarda çeşitli HBV mutasyonları bildirilmiştir (47).

HCV enfeksiyonu HCC gelişim riskini artırmaktadır. HBV ve HCV koinfeksiyonu bu riski daha da artırmaktadır. Sadece HCV enfeksiyonu olan hastalarla, HCV ile birlikte gizli HBV enfeksiyonu olanlar, HCC gelişim süresi açısından karşılaştırıldıklarında; gizli HBV enfeksiyonu olanlarda daha erken sürede HCC geliştiği görülmüştür (48).

HBV ve HCV ko-infeksiyonu sık görülen klinik bir durumdur. HCV ile gizli HBV enfeksiyonunun birlikteliğinin klinik önemi bilinmemektedir. Bazı çalışmalar bu birlikteliğin siroz gelişme riskini daha çok arttırdığını vurgulamaktadır (49).

Sonuç olarak, PCR gibi hassas testlerin gelişmesi ile gizli 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.

2.10 Hepatit B İnfeksiyonunun Laboratuvar Tanısı

Hepatit B infeksiyonu, virüse ait antijenik yapılar ve bunlara karşı oluşan antikorların kolay belirlenebilmesi nedeniyle rutin tanısının kısa zamanda konabildiği bir infeksiyondur. Tanıda kullanılan testler;

2.10.1 Biyokimyasal Testler

Akut hepatit B'de asparat aminotferaz (AST) ve alanin aminotferaz (ALT) düzeylerinde normalin üst sınır seviyesinin 10-100 katına kadar olabilen yükselmeler saptanır. AST/ALT oranı 1'in altındadır (50). Aminotferaz düzeylerinin en üst seviyeye ulaşmasında 1-8 gün sonra serum bilirubin düzeyleri zirveye ulaşır. Çoğu ikterik hastada maksimum bilirubin düzeyi 10mg/dl'nin altındadır. Serum alkalen fosfataz düzeyleri normaldir veya hafif düzeyde artış söz konusudur.

Kronik hepatit B'de AST, ALT orta derecede yükselmektedir. Serum bilirubini ciddi hastalık dışında normaldir. Serum amino transferaz düzeyleri karaciğerdeki hasarın derecesini tam olarak yansıtmaz (51).

2.10.2 Direkt İnceleme, Hücre Kültürleri ve Hayvan Modelleri

Klinik laboratuvarlarda ve HBV taramalarında uygulanabilir olmasa da HBV ile ilişkili antijen veya partikül varlığı belirlenmesinde immünfloresan inceleme, ince kesitlerin elektron mikroskobu ile incelenmesi zaman zaman kullanılmaktadır.

İncelemelerde hepatositlerde HBsAg'nin sitoplazmada, HBcAg'nin ise çekirdekte yerleştiği görülmüştür. Aktif replikasyon döneminde HBcAg'lerin sitoplazmada da bulunduğu gözlenmiştir.

Sağlıklı yetişkin ve fetal hepatosit primer kültürlerinde HBV üretilmesine yönelik çalışmalar devam etmektedir. Ancak düşük yoğunlukta virüs üretimi mümkün olabilmektedir.

Şempanze ve yüksek düzey primatlarda hepatit B infeksiyonu oluşturmak olasıdır ancak çok kullanışlı bir yöntem değildir. İnfeksiyon insanlardakine çok benzer ama daha hafif gidişlidir. Şempanze modeli viral inaktivasyon, aşı güvenlik ve etkinliği kontrolü, dezenfeksiyon kinetiği, infektivite belirlenmesi ve immünopatoloji, seroepidemiolojik çalışmalarda kullanılmaktadır. Son zamanlarda Pekin ördeği, fare gibi yeni hayvan modelleri denenmektedir.

2.10.3 Serolojik Testler:

HBV enfeksiyonunun serolojik tanısında geçmişten günümüze çok farklı yöntemler kullanılmıştır. Bunlar içerisinde yakın geçmişte ve bugün halen en yaygın kullanım alanı bulanlar radio immünoassay (RIA) enzim immünoassay (EIA) 'dir.

Radio immünoassay (RIA): Yıllarca EIA'dan daha popüler bir yöntem olmuştur. Ancak raf ömrünün kısa olması, radyoaktif atıkların ortadan kaldırılmasının güçlüğü ve çalışanları için risk taşıması nedeniyle tüm dünyada vazgeçilmektedir.

Enzim immünoassay (EIA): Duyarlı ve özgül bir yöntemdir. Hasta serumuna araştırılan antijene özgü antikor eklenerek antijen- antikor çiftlerinin oluşması sağlanır. Bu antikora bağlanabilen, enzimle işaretli antikorlar ortama eklendikten sonra enzimle reaksiyona giren kromojen substrat karışımına konur. Oluşan renkli reaksiyon ürünleri ölçülür (52).

Tekrarlayan yalancı pozitiflikler yöntemdeki düzenlemelerle azaltılmaya çalışılmaktadır. EIA kitlerinin raf ömrü RIA kitlerinininkinden daha uzundur. Bu yöntem ile 0.25-0.5 ng/ml düzeyinde HBsAg tespit edilebilmektedir.

EIA tekniğinin , enzim multiplid immünoassay test (EMIT) ve ELISA olmak üzere iki önemli tipi vardır.

ELISA'da antijen veya antikor kaplı yüzeylerden yararlanılmakta ve her reaktif eklenmesinden sonra reaksiyona girmeyen maddelerin yıkanma ile ortamdan uzaklaştırılması gerekmektedir. Yıkama işlemi gerektiren bu teknik "heterojen sistemler" olarak bilinir. ELISA ile enzim bağlı bir antikor kullanarak antijen veya antikorlar saptanabilir. Değerlendirme enzim ile substratın oluşturacağı renk reaksiyonuna göre yapılır. Oluşan renkli reaksiyon ürünlerinin miktarı enzim bağlı reaktiflerin ve dolayısıyla katı yüze bağlanan antijen ve antikorun miktarını belirler (52).

ELISA'da katı yüzey olarak selüloz, poliakrilamid dekstran, polistiren veya polipropilenden hazırlanan tüpler boncuklar veya mikro kuyucuklu plaklar kullanılır. Boncukların katı yüzey olarak kullanıldığı sisteme makro sistem ELISA, mikro kuyucuklu plakların kullanıldığı sisteme mikro sistem ELISA denir. Deneyde kullanılan enzim bağlı antikorlar konjugat adını alır. Konjugatların özellikleri deney sonucunu etkileyebildiğinden, kullanılan enzimlerin stabil ve yüksek aktiviteye sahip olmaları gerekir. Günümüzde enzim olarak peroksidaz ve alkalin fosfataz kullanılmaktadır.

Reaksiyonun son aşamasında eklenen substratın başlangıçta renksiz, enzimle etkileştikten sonra renkli ürün oluşturması gerekir. Alkalen fosfataz konjugatlarında substrat olarak p-nitrofenil fosfat, peroksidaz konjugatlarında ise , o-fenilendiamin kullanılır.

2.10.3.1 Serolojik Göstergeler

HBsAg: Çok duyarlı testlerle, temastan sonra en erken 1-2 hafta, en geç 12 hafta içinde saptanabilir. Özellikle fulminan hepatitlerde HBsAg negatif olanların prognozunun daha iyi olabileceği bildirilmiştir. HBsAg'nin serumda en az altı ay varlığını sürdürmesi kronik infeksiyonun göstergesidir (27).

Anti-HBc: İnfeksiyonun seyirinde başlangıcı takiben birkaç haftada saptanabilen, ilk ortaya çıkan antikordur. Akut dönemde IgM ortaya çıkar ve 10 ay kadar pozitif kalır, HBsAg kaybolduktan sonra, ALT yükselmesinden önce, IgG ortaya çıkar, sürekli pozitif kalır ve IgM'nin yokluğunda geçirilmiş infeksiyon veya kronik infeksiyonu gösterir. Bu bilgi, anti-HBs pozitif olduğunda bu durum aşılardan mı kaynaklı, yoksa geçirilmiş infeksiyon mu anlamada bize yardımcı olur. Bu antikorlar virüsü etkisizleştiremezler (28). Salt anti-HBc pozitifliği görülme sıklığı %2-12 arasında değişmektedir. Anti-HBc'nin yanlış pozitifliği, tüm salt anti-HBc pozitifliklerinin %60-70'ini oluşturur (53).

Anti-HBe: HBeAg'nin kaybolmasından birkaç hafta sonra, HBsAg negatifleşmeden anti-HBs oluşmadan ortaya çıkar. Akut hepatitli hastalarda düzelmeyi, kronik HBV infeksiyonu olan hastalarda ise virüs replikasyonunun ortadan kalktığını düşündürür (pre-core mutantlar hariç). 1-1,5 yıl pozitif kalabilir ve bulaştırıcılığın düşük olduğunu gösterir (27). Uzakdoğuda HBeAg pozitif emziren annenin bebeklerinde bir yaşına kadar %90'nın üstünde taşıyıcılık belirlenmesine rağmen anti-HBe oluşmuş annelerin bebeklerinde bu oran %10-30'dur (28).

Anti-HBs: Ortaya çıkan son antikordur ve hepatit B'yi etkisizleştirebilir. Serumda saptanması vücudun infeksiyonla baş edebildiğini gösterir. HBsAg kaybolduktan sonra ve genellikle başlangıçtan üç ay sonra ortaya çıkar. Çoğu kişide hayat boyu kalıcıdır. İmmünkompleks oluşumu ile birlikte artrit ve döküntü gelişen hastaların %10-20'sinde klinik hepatiti bulguları başlamadan önce ve antijenemi esnasında anti-HBs'nin ortaya çıktığı gösterilmiştir. HBsAg taşıyıcılarının %10-40'ında

düşük titrede anti-HBs pozitif olabilir. Bu durum; mekanizması kesin olarak bilinmemekle birlikte, farklı subtiplerle aynı zamanda infeksiyon olmasına bağlanmaktadır. Aşılama ile de anti-HBs pozitifleşir fakat bu koruma %10 olmayabilir nadirende olsa mutant suşlar suçlanmaktadır. Tek başına anti-HBs pozitifliği aşılama, anti-HBc ile pozitifliği ise doğal bağışıklığı gösterir (28).

2.10.4 HBV Tanısında Moleküler Yöntemler

2.10.4.1 Hibridizasyon Yöntemi

Hibridizasyon fizyolojik koşullardaki kararlı çift zincirli DNA yapısının direkt sonucudur. Bu reaksiyonun temelini iki ayrı zincirin geriye dönüşlü ve baz dizisine özgül bağlanması oluşturmaktadır. DNA zincirlerinden hiç birisi işaretlenmediğinde işleme bağlanma (annealing) adı verilir. Zincirlerden biri işaretli ise bu zincir probe olarak adlandırılır ve işleme hibridizasyon denir.

Hibridizasyon reaksiyonu nükleik asit içeriği bilinmeyen bir örneğin analizinde kullanıldığında yöntem hibridizasyon yöntemi olarak adlandırılır. Komplementer baz çiftleşmesinde kompozisyonu bilinen bir fragman ile kompozisyonu bilinmeyen bir başka fragmanda komplementer dizinin var olup olmadığı araştırılır.

Hibridizasyon reaksiyonunun özgülüğü probe ile sağlanır. Probe iyi tanımlanmış bir nükleik asit (DNA veya RNA) dizisidir. Çoğunlukla problemler rekombinan teknoloji ile üretilirler.

2.10.4.1.1 Sıvı veya Solüsyon-Faz Hibridizasyonu

Sıvı hibridizasyon yönteminde hem örnek hem de probe sıvı içerisinde etkileşirki bu reaksiyon kinetiğini maksimum hale getirir. Öncelikle örnekteki protein ve lipid temizlenir. Bu arada oluşacak nükleik asit hasarı en az düzeydedir. Daha sonra örnek denatüre edilir, randomize formda kesilir, ardından tek zincirli problemler eklenir.

Hibridizasyon hidrokseptit gibi katı bir matrisle hibridlerin bağlanması ile sabitlenir. Hibridler bağlandıktan sonra hibridize olmamış yapılar yıkanarak uzaklaştırılır.

Solüsyon-faz hibridizasyon yönteminde başka bir varyans kullanımdadır. Belirleme yöntemine göre reaksiyon ürünü ölçülür. Düşük pozitif reaksiyonun yorumu zordur. Çünkü solüsyonda özgül hedeften az miktarda bulunması durumunda da, zayıf çapraz reaksiyon veren hedeften bol miktarda bulunması durumunda da düşük pozitif reaksiyon ile karşılaşılabilir.

2.10.4.1.2 Katı Destekli Hibridizasyon

Dot blot hibridizasyon, Southern ve Northern hibridizasyon ve in situ hibridizasyon gibi çeşitleri vardır. Bu yöntemlerde hibridizasyon bifazik ortamda yani katı faz (genellikle örnek) ve sıvı faz (genellikle probe) birlikteliğinde gerçekleşir.

Dot Blot Hibridizasyon: HBV-DNA aramak için kullanılan bu klasik teknikte, serum örnekleri NaOH ile muameleden sonra nitroselüloz membranlar üzerine damla şeklinde yerleştirilir; daha sonra işaretli prob (daha önceden klonlanarak hazırlanmış ve uygun biçimde işaretlenmiş HBV-DNA) kullanarak hibridizasyon aşamasına geçilir. İşaretlemede genellikle p^{32} den yararlanır ve sonuçlar otoradyografi ile değerlendirilir. Pozitif örneklerde, serumun bulunduğu bölgede siyah lekeler görülmektedir. Bu tip uygulamaların sonunda "pg/ml" düzeyinde HBV-DNA saptanmakta olup, deneyin duyarlılığı 0.1-1 pg veya 10^5 partikül/ml kadardır. Dot blot tekniğinin duyarlılığı bir laboratuvaradan diğerine farklılık göstermekte olup, belirli bir standardizasyonu sağlamak amacıyla "sıvı faz hibridasyonu" tekniği geliştirilmiştir. I^{125} işaretli problemlerin kullanıldığı bu uygulamada kolon kromatografisi ile örnekteki DNA ile hibride olan ve olmayan problemleri ayırmak mümkündür (hibride olmamış problemler kolonda kalırken, elüsyon sonucu serumdaki HBV-DNA ile birleşmiş işaretli prob tüplerde toplanır). Gama sayıcılarla yapılan ölçümler ile, örnekteki HBV-DNA'nın varlığı ve miktarı hesaplanabilir. Dot-blot tekniğine oranla yinelenebilir sonuçlar veren bu tekniğin pahalı olması ve çok sayıda örnekte çalışmak için uygun olmaması kullanımı kısıtlamaktadır.

Southern ve Northern Hibridizasyon: Her ikisi de nükleik asitlerin katı desteğe transferi, elektroforetik ayrımı ve ardından hibridizasyona dayanır. Böylece hem hibridizasyonun olup olmadığı hem de hibridize olan moleküllerin molekül ağırlıkları belirlenir (54).

Her iki yöntem içinde örnek hazırlanması zaman alıcıdır. Northern hibridizasyon için RNA toplanır.

Agaroz jelde boyutlarına göre ayrılmış parçalar naylon veya nitroselüloz membrana standart kapiller transfer, basınçlı/vakumlu transfer gibi yöntemlerle transfer edilir. Naylon membranın daha fazla gerilmeye dayanıklı olması, nükleik asit bağlama kapasitesinin daha fazla olması gibi üstünlükleri vardır. Isıtılarak veya UV çapraz bağlama ile nükleik asitler sabitlenir ve tüm membran işaretli prob ile hibridlenir. Daha sonra hibridizasyonu otoradyografik veya kolorimetrik bant belirlenmesi izler. Bu bantlarda problemlere komplementer diziler bulunmaktadır.

İn situ Hibridizasyon: İn situ hibridizasyon basit olarak özel genetik bilgi belirlenmesidir. Bu özel tip katı destekli metod, lam üzerine fiske edilmiş morfolojik olarak bütün doku, hücre veya kromozomların hibridizasyonu işlemini kapsar. Belirlenmede otoradyografik, kolorometrik ve floresan yöntemler kullanılır. Hedefin doku veya hücre içinde yerleşiminin önemli olduğu durumlarda yöntem kayda değer, ancak zaman alıcıdır.

2.10.4.2 Amplifikasyon Yöntemleri

2.10.4.2.1 Polimeraz Zincir Reaksiyonu-Polymerase Chain Reaction (PCR)

Polimeraz zincir reaksiyonu ;dizisi bilinen iki bölge arasındaki gen parçasını in vitro koşullarda çoğaltmak için kullanılır. PCR, in vitro koşullarda genomik DNA'nın istenilen bölgesine özgü primerler kullanılarak, konsantrasyonunun moleküler açıdan değerlendirilebilir düzeye çıkartılması işlemidir (55).

Amplifikasyon işleminde ilk önce iki oligonükleotid (primer) ve dört deoksिनükleotid trifosfatın (dNTP) varlığında DNA 95°C'ye kadar ısıtılarak denatüre edilir. İkinci aşamada ısı 55°C-65°C arasına düşürülerek spesifik primerlerin koplementer dizilerine yapışması (annealing) gerçekleştirilir. Son aşamada 72°C'de DNA polimerazın yerini tutan ve yüksek ısıdan etkilenmeyen Taq polimeraz enzimi, ortamda bulunan deoksिनükleotid trifosfatların 5'→3' yönünde eklenmesiyle zincirin uzamasını sağlar. Bu ısı değişimi döngüsünde DNA iki katına çıkmakta ve bu tekrarlanan her döngüde DNA geometrik olarak artmaktadır (55).

PCR'nin etkinliği; onun özgüllüğü, verimliliği ve doğruluğu ile ölçülür. Yüksek oranda özgül PCR, tasarlanmış hedef dizisi olan bir amplifikasyon ürünü oluşturur. Daha verimli amplifikasyon birkaç döngü ile daha çok ürün oluşturur. İdeal bir PCR, yüksek özgüllük, verim ve doğruluğa sahip olmalıdır. Çalışmalar bu üç değişkenin her biri tampon şartları, PCR döngü rejimi (Örneğin her bir basamağın ısı ve süresi) ve DNA polimerazı çeşitli PCR bileşenleri tarafından etkilenir (56).

Polimeraz Zincir Tepkimesinin Bileşenleri: Polimeraz zincir tepkimesinin kesin koşulları ve döngünün her bir basamağının zamanı; örnek, amplifiye olacak bölgenin uzunluğu ve primerlerin dizisi tarafından belirlenir. Tepkime koşulları değişken olup en yüksek duyarlılık için dikkatlice yönetilmeye ve en verimli hale getirilmeye gereksinim duyar. Bu nedenle en uygun koşullar aşağıda sıralanmış PCR bileşenlerinde yapılacak düzenlemeler ile sağlanır.

- a) Enzim (Taq DNA polimeraz)
- b) Deoksinükleotit Trifosfatlar (dNTP)
- c) Magnezyum derişimi
- d) Tampon
- e) Oligonükleotit (primer)
- f) Hedef Diziler
- g) Isılar ve Döngü Sayısı

a) Enzim: Taq DNA polimeraz enzimi *Thermus aquaticus*'dan elde edilmiş ısıya dayanıklı bir DNA polimeraz enzimidir. Bu enzimin değişik rekombinat tipleri üretilmiştir ve bu enzim 5'-3' polimerizasyona bağımlı ekzonükleaz etkisi taşıırken 3'-5' ekzonükleaz etkisi yoktur. PCR tepkimesinde diğer değişkenlerin elverişli olduğu koşullarda bu enzimin önerilen değişim aralığı, 100µl'lik tepkimedeki 1-5 ünite arasındadır. Taq polimeraz enzim derişimi yüksek ise jel görüntüsünde özgül olmayan arka plan ürünler oluşabildiği gibi düşük olduğu durumlarda istenilen PCR tepkime ürünleri elde edilemez.

b) Deoksinükleotit Trifosfatları: PCR tepkimesinde hedef dizinin bileşimi ve uzunluğu için uygun en düşük dNTP derişiminde karar kılınmalıdır. Örneğin, 100µl'lik tepkimedeki 20µM'lık her bir dNTP derişimi teorik olarak 400 bç'lik bir dizinin 10 pmol'ünü ya da DNA'nın 2,6µg'ını sentezlemek için yeterlidir. Her bir dNTP'nin 20-200µM arasındaki derişimi verim, özgülük ve doğruluk arasındaki en iyi denge ile sonuçlanmaktadır. PCR'nin hem özgülüğü hemde doğruluğu düşük dNTP derişimleri kullanılarak artırılır. Düşük dNTP derişimleri hedef olmayan yörelerde hatalı kullanımı en aza indirger ve hatalı birleşmiş nükleotitlerin uzama olasılığı azaltır (56).

c) Magnezyum Derişimi: PCR tepkimesinde magnezyum derişimi primer yapışmasını, hem kalıp hem de PCR ürününün zincir ayrışma ısılarını, ürün özgülüğünü, primer-dimer kalıntılarının oluşumu ile enzim etkinliğini ve doğruluğunu etkileyebilmektedir. Taq DNA polimeraz kalıp DNA, primerler ve dNTP'ler ile

bağlanmışın üzerinde serbest magnezyum gerekmektedir. Bundan dolayı PCR'ler toplam dNTP derişiminin üzerinde 0.5-0.25 mM magnezyum içermelidir.

d) Tampon İçeriği: PCR için önerilen tampon 10-50 mM derişimdeki 20 arasındaki Tris HCl'dir. Tamponun içerisine primer yapışmasını kolaylaştırdığı için potasyum klorür (KCl) veya sodyum klorür (NaCl) eklenebilmektedir. NaCl ve KCl 50 mM üzerindeki derişimlerde Taq polimeraz enziminin etkisini engellemektedir. Jelatin ve Bovin serum albumin (BSA, 100 µg/ml) ve Tween 20 veya Laureth 12 (%0.05-0.1) gibi iynik olmayan deterjanlar enzimi kararlı kılmada yardımcı olurlar (56).

e) Oligonükleotidler (Primer): Bir PCR'de başarılı bir amplifikasyon için oligonükleotidler (primerler) doğru tasarlanmalıdır. Seçilmiş primer dizilimi PCR ürününün büyüklüğü ve yerini belirlemesi yanında ürün veriminde önemli olduğu gösterilmiş bir fiziksel değişken olan amplifiye ürünün primer yapışma sıcaklığını tanımlar. Primerin 0.1-0.5µM arasındaki deişimi genellikle en elverişli olanıdır. Daha yüksek primer derişimleri hatalı dizilimlemeye neden olabilmektedir (56).

Tipik olarak primerler %50-60 Guanin+Sitosin (G+C) bileşimine sahip 18-28 baz uzunluğundaki nükleotitlerdir. Bir primer çiftinin hesaplanmış primer yapışma sıcaklığı dengelenmiş olmalıdır. Bu amaç için pratik olarak Adenin (A) veya Timin (T) için 2°C, Guanin (G) veya Sitosin (C) için 4°C'lik hesaplama kullanılabilir. Uygulamaya bağlı olarak 55°C ile 80°C arasında istenilir. Primer-dimer kalıntılarının oluşumuna neden olması ve istenilen ürün verimini azaltması nedeniyle primer çiftlerinin 3' uçlarındaki eşleşmeden sakınılmalıdır. Ayrıca primerlerin 3' uçlarında C ve G'lerin serbestçe kullanımı (3 ya da daha fazla) G+C'den zengin dizilerde hatalı dizilimlemeler oluşturulabilir. Olası ise primerler içinde palindromik diziler olmasından sakınılmalıdır (56).

f) Hedef Diziler: Hedef diziler doğrusal DNA'lardan çok kapalı dairesel DNA'ları da taşıdığından belirgin şekilde daha az etkin olarak amplifiye edilir. Bundan dolayı polimeraz zincir tepkimesinde kalıp olarak kullanılmadan önce plazmit DNA'ları doğrusal hale getirmek istenir. Kalıp DNA'daki hedef dizilerin derişimi belirgin olarak koşullara göre değişir ve sıklıkla deneycinin kontrolü altında değildir (56).

g) Isılar ve Döngü Sayısı: Tipik denatürasyon koşulları 95°C de 30 saniye veya 97°C de 15 saniyedir. Zincir ayrışma ısısında DNA'yı denatüre etmek yalnızca birkaç saniye almakla birlikte geri kalan tepkime tüpünün iç kenarının zincir ayrışma ısısına ulaşma zamanıdır. Primer yapışması için gerekli zaman uzunluğu ve ısısı amplifikasyon primerlerinin baz içeriğine, uzunluğuna ve derişimine bağlıdır.

Uygulanabilir yapışma ısısı amplifikasyon primerlerinin gerçek primer yapışma sıcaklığının 5°C altındadır. Taq DNA polimeraz ısıların sınır aralıkları üzerinde etkin olduğundan primer uzaması yapışma basamağını da kapsayan düşük ısılarda oluşacaktır (56).

Polimeraz zincir tepkimesinde diğer değişkenlerin en elverişli olduğu koşullarda döngü sayısı, hedef DNA'nın başlangıç derişimlerine bağılı olacaktır. Bir tek kopya geni amplifiye etmek amacıyla 40 döngüden daha fazla döngü yapıyor ise PCR ile ilgili bazı ciddi hatalar vardır.

PCR Tipleri:Multipleks PCR

Broad- Ranger PCR (Consensus PCR)

Nested ve Semi- Nested PCR

In Situ PCR

Real-Time PCR

Real-Time PCR: Nükleik asit amplifikasyonu ile eş zamanlı olarak artış gösteren floresans sinyalin ölçülmesiyle kısa sürede, kantitatif sonuç verebilen PCR yöntemidir. Ticari olarak geliştirilmiş tipleri bulunmaktadır. Bunlar:

LightCycler sistem: Yalnızca çift zincirli DNA'ya bağlandıklarında floresans veren boyalar (Cyber green) kullanılarak, sentezlenen çift zincirli DNA artışı, ortaya çıkan floresansın miktarı ile ölçülmektedir. Primerin bağlanmasını takiben gerçekleştirilen uzama aşamasında hedef DNA'nın çift sarmal hale gelmesiyle DNA'ya bağlanan "cyber green" miktarı artmakta ve buna bağılı olarak yayılan floresans miktarında artış gözlenmektedir.

Bu uygulamada, floresans artışı her zaman spesifik amplifikasyonu göstermeyebilir. Çünkü, çift sarmal DNA'ya entegre olan "Cyber green", ortamda hedef moleküller olmadığında, primerlerin kendi aralarında gerçekleşecek olan bağlanmalar (primer dimerleri) sonucunda da yapıya katılarak floresans oluşumuna sebep olabilmektedir. Bu olumsuz faktörü gidermek için amplifikasyon ürünlerinin "melting curve" (erime eğrisi) analizi yapılmaktadır. Her çift sarmal DNA, kendine özgü "melting temperature, Tm" (Çift sarmal DNA'nın %50'sinin tek sarmal hale geçmesi için gerekli sıcaklık) değerine sahiptir. PCR amplifikasyonunun ardından sıcaklık yavaş yavaş yükseltilerek, belirli aralıklarla tüpteki floresans miktarı kaydedilir. Çift sarmal DNA zincirleri birbirinden ayrılmaya başlayınca "Cyber green" boya serbest kalmakta ve floresans miktarı azalmaktadır. Denatürasyon olduğunda floresans sinyal aniden düşmektedir. Erime eğrisinden yararlanılarak amplikonun Tm derecesi

saptanabilmektedir. Klinik örneğe ait Tm derecesi, aynı koşullarda işleme alınan pozitif kontrolün Tm derecesiyle karşılaştırılarak, PCR sonucunun doğru veya hatalı olduğuna karar verilmektedir.

Light Cyclers'ın bir diğer uygulama şekli, hedefe özgül problar kullanmaktır. Burada amplifikasyon ürünüyle özgül olarak bağlanan problarla testin duyarlılığı arttırılmıştır. Farklı boylarla işaretli iki spesifik problardan biri 3' ucundan floresans boya ile işaretli (donör boya), diğeri 5' ucundan alıcı boya (acceptor dye) ile işaretlenmiştir. Problar hedef ampikonlar üzerinde birbirine yakın (1-5 nükleotit uzaklıkta) yerde bağlanmakta ve işaretli uçlar yanyana gelmektedir. İki boyanın yan yana gelmesiyle açığa çıkan enerji ikinci prob üzerindeki alıcı boyayı etkileyerek floresans oluşumuna yol açmaktadır. Floresans miktarı, ortamdaki hibridizasyonun derecesine diğeri bir ifade ile PCR siklusu süresince oluşan ampikonların miktarına bağlı olarak artmaktadır.

TaqMan sistem: Bu sistemde 5' ve 3' uçlarında florokrom maddelerle işaretli prob kullanılmaktadır. Prob'un 5' ucunda raportör florokrom (6-carboxyfluorescein=6-FAM), 3' ucunda ise baskılayıcı florokrom (6-carboxy-tetramthyl-rhodamine=TAMRA) bulunmaktadır. Prob, tek sarmal hale getirilen hedef molekül üzerinde, primerlerin bağlanma bölgesi arasında kalan yere bağlanır. Prob-hedef molekül arasındaki hibridizasyon devam ettiği sürece raportör florokrom maddenin sinyal oluşturması, 3' uçtaki baskılayıcı florokrom tarafından engellenmektedir. Primerlerin hedef nükleik asite bağlanmasını takiben başlatılan primer uzaması probun bağlandığı noktaya kadar geldiğinde, sentezin devam edebilmesi için Taq DNA polimeraz enzimi 5'→3' nükleaz aktivitesini kullanarak probu 5' uçtan yıkamaya başlar. Böylece raportör florokrom serbest hale geçer ve sinyal oluşturur. Her siklusta üretilen ampikon miktarına paralel olarak sinyal şiddetide artmaktadır.

Real-time PCR kısa sürede kantitatif sonuç verebilmektedir. Tüpler açılmadan tanıya gidildiği için kontaminasyon riski düşüktür. Elektroforeze gerek kalmadan amplifikasyon esnasında sonuç alınabilmektedir. Ayrıca floresan veren problar kullanılarak hedef nükleik asitteki mutasyonlar saptanabilmektedir (57).

Tipik nested amplifikasyon protokolünde ilk amplifikasyon döngüsü tek bir primer çifti ile 15 ila 30 döngü olacak şekilde tamamlanır. Bu basamak sonrasında elde edilen amplifikasyon ürünü başka bir tüpe aktarılır. Burada ilk primer çifti ile çoğaltılan dizinin içeriğine özel, farklı primer çifti kullanılarak yeni amplifikasyon işlemi

gerçekleştirilir. İkinci amplifikasyon yine 15 ila 30 döngü ile tamamlanır ve ürün jel elektroforezi ile belirlenir.

Nested amplifikasyon işleminin duyarlılığı oldukça yüksektir. Sıklıkla tek bir kopya hedef dizisi bu işlem sonrası kolaylıkla belirlenebilecek kadar amplifiye edilebilir.

2.10.4.2.2 Sinyal Amplifikasyon

Hibridizasyona dayalı yöntemlerde duyarlılığı arttırmanın bir başka yoludur. Ancak enzimatik amplifikasyon yöntemlerinin duyarlılığına yaklaşmak henüz mümkün olmamıştır. Bu yöntemde radyoizotop, enzim veya florokrom gibi hedef nükleik asiti işaretleyen maddelerin konsantrasyonu artırılarak sinyal gücünün artırılması söz konusudur. En basit formu her bir proba çok sayıda sinyal bağlanması şeklindedir. Hedef molekülün farklı bölgelerine bağlanan kısa fakat çok sayıda problarla veya bir ucu ile hedef moleküle bağlanan normalden uzun bir proba bağlanmış çok sayıda işaretli kısa problarla sinyal amplifikasyonu yapılır. En son geliştirilen şekilde hem hedef molekülün farklı bölgelerine fazla sayıda uzun problemlerin bağlanması hem de bu uzun problemlere işaretli çok sayıda kısa problemler bağlayarak oldukça güçlü sinyal oluşumu gerçekleştirilmiştir.

2.10.4.2.3 Zincir Yer Değiştirme Amplifikasyonu

DNA polimeraz, çift zincirli hedef DNA molekülünün tek zincirindeki kesilmiş bir bölgesinden başlayarak ve bir zinciri ayırıp diğeri üzerinde ilerleyerek DNA sentezleyebilme yeteneğindedir. Yeni oluşan bu ürün yeni çentikler ve yer değiştirmeler için substrat görevi görür.

Bu teknolojiye asıl nokta restriksiyon endonükleaz enziminin kalıp DNA'yı bir noktadan kesmesidir. Oluşan 3' ucu DNA polimeraz tarafından uzatılır. Bu sırada 5' ucu ile başlayan zincir serbest kalır. Serbest kalan zincirin 3' ucuna diğeri primer bağlanır ve uzayarak çift zincirli DNA haline getirir. Primer içerisinde bulunan restriksiyon bölgesinden yeniden DNA kesilir ve aynı işlem en başından tekrar gerçekleşir. Bu tekrarlar ile özgül bir bölge çoğaltılmış olur.

2.10.4.2.4 Probe Amplifikasyon

Hedef molekül belirlenmesinde bir başka alternatif strateji; probu amplifiye etmektir.

Ligaz Zincir Reaksiyonu (LCR): LCR yönteminde dört adet ve hedef dizinin tamamını kapsayan işaretli oligonükleotid primer kullanılır. Test örneğine yüksek miktarda oligonükleotidler ve ısıya dayanıklı DNA ligaz eklenir. Hedef DNA 94°C'ye ısıtılarak denatüre edilir. 65°C'ye soğutulur oligonükleotidlerin hedefe bağlanması sağlanır. Her iki oligonükleotid birbirlerine yakın ve açık olan kısımlardan DNA ligaz yardımıyla aralarındaki boşluk doldurularak bağlanırlar. İkinci denaturasyonda hedef DNA'dan ayrılan bu bağlı oligonükleotid primer çiftleri kalıp gibi davranarak yeni primerlerin bağlanmasına, aradaki boşluğun ligaz enzimi ile doldurulmasına ve böylece amplifikasyona olanak sağlar.

Döngüsel Probe teknoloji: Oldukça hızlı, izotermal, lineer probe amplifikasyon sistemidir. DNA-RNA-DNA probu gereksinir. Yöntemde DNA-RNA-DNA probundaki RNA kısmı hedef DNA'nın komplementeridir ve hedef DNA ile hibridlenir. Reaksiyon karışımındaki RNaz H, hibridlenmiş bu RNA'yı yıkar ve hedef ile uyumsuz olan kenardaki DNA'lar hedeften uzaklaşır. Bir taraftan uzaklaşan DNA'lar solüsyonda birikirken diğer taraftan aynı işlem bir başka probe segmenti ile tekrarlanır.

Q-Beta Replikaz Sistemi: Q-Beta replikaz Q-Beta bakteriyofajının genomik RNA'sını çoğaltan, 215 KDa'luk RNA bağımlı RNA polimerazdır. Q-Beta genomuna kısa problemler sokulduğunda bile enzim, genom çoğaltma işlemine devam edebilmektedir. Q-Beta replikaz sistemi enzimin bu aktivitesine dayanır (58).

Burada hedefe komplementer bir RNA dizisi Q-Beta RNA dizisine sokulur. Hedef nükleik asitin bulunduğu solüsyon çift zincirli formların ayrılması için ısıtılır. İçinde hedefe komplementer probe bulunan Q-Beta RNA dizisi solüsyona eklendikten sonra solüsyon soğutulur ve böylece hedef ile probun hibridlenmesi sağlanır. Bağlanmış problemler uzaklaştırılır. Q-Beta replikaz ve bol miktarda ribonükleotid trifosfat eklenir. Q-Beta replikaz içinde probe bulunan ve bu kısmıyla hedefe bağlanmış RNA zincirini çoğaltır (58).

2.11 Laboratuvar Testlerinin Yorumlanması

2.11.1 Akut HBV İnfeksiyonu

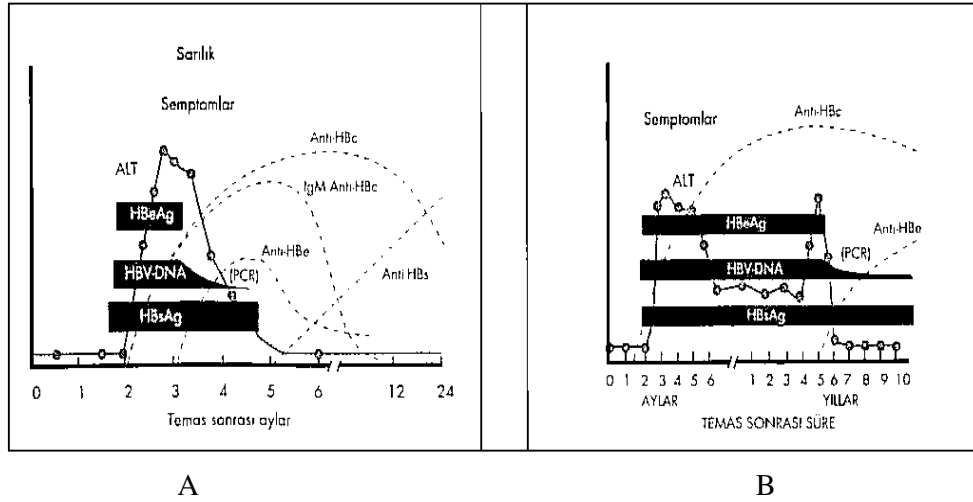
Akut infeksiyonda ilk tespit edilen antijen HBsAg'dir. HBsAg en erken virüsün vücuda girişinden sonraki 1. veya 2. haftada, en geç 11. veya 12. haftada tespit edilir ve 3 ay sonra kaybolur (59). HBsAg'nin 3 aydan daha uzun süre sebat etmesi kronik hepatit B infeksiyonu gelişeceğini işaret etmektedir. Yetişkinlerin %95'inde HBsAg kaybolur, %5'inde kronik HBsAg taşıyıcılığı gelişir.

Anti-HBs, HBsAg kaybolduktan sonra ve genellikle hastalığın başlangıcından 3 ay sonra ortaya çıkar, iyileşmeyi ve immüniteyi gösterir. Anti-HBs çoğu kişilerde hayat boyu kalıcıdır. Anti-HBs ile birlikte anti-HBcIgG pozitifliği doğal immüniteyi, sadece Anti-HBs pozitifliği aşılama ile oluşan koruyuculuğu gösterir (59,60).

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 infeksiyonu gösteren en önemli markerdir. Anti-HBcIgM'in sebat etmesi hastalığın kronikleşeceğini işaretidir. Anti-HBcIgM kronik HBV infeksiyonunda düşük titrede bulunur. Anti-HBcIgM'in 7-8S formunun kronik HBV infeksiyonunda, 19S formunun ise akut infeksiyonda dominant olduğu bildirilmektedir (59,60).

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 infeksiyonun devam ettiğini gösterir. Anti-HBs ile birlikte anti-HBcIgG'nin düşük titrelerde bulunması hepatit B infeksiyonunun çok eskiden geçirildiğini gösterir (60).

HBeAg, viral replikasyonun devam ettiğini ve infektiviteyi gösterir, HBsAg'den kısa bir süre sonra pozitifleşir, 10 haftadan daha uzun süre devam etmesi infeksiyonun kronikleşeceğini belirtisidir. Anti-HBe nisbeten düşük infektivitenin ve hastalığın tamamen iyileşeceğini güçlü bir göstergesidir. Anti-HBe genellikle akut infeksiyondan 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 (60).



Şekil 5. A)Akut HBV İnfeksiyonunun Seyri B)Akut HBV İnfeksiyonunun Kronikleşmesi (61)

2.11.2 Kronik HBV İnfeksiyonu

Sağlıklı yetişkinlerde akut infeksiyondan sonra kronikleşme riski %5 civarındadır (51). Kronik hepatit B'li hastaların hemen tamamında HBeAg ve anti-HBcIgG pozitifdir. HBeAg'nin pozitif olması viral replikasyonun olduğunu, HBeAg'nin negatif anti-HBe'nin pozitif olması replikasyonun sona erdiğini gösterir. Ancak bazen anti-HBe'nin negatif olup HBV DNA'nın pozitif olduğu belirlenmektedir. Bunun HBeAg kodlama bölgesi ile ilgili bir mutasyondan kaynaklandığı bilinmektedir (23,26,27).

Hastalığın kronikleşmesi karaciğerde viral replikasyonun devam etmesine ve hastanın immünolojik durumuna bağlıdır. Virüsün atılmaması muhtemelen HBV antijenini tanıyan spesifik T hücre yetmezliğiyle ilişkilidir. Eğer konağın immün cevabı zayıf ise, karaciğer hasarı oluşmaksızın normal karaciğer fonksiyonu ile birlikte virüs çoğalmaya devam eder. Böyle hastalar sağlıklı taşıyıcıdır. Hücrel immün cevabı biraz daha iyi olan hastalarda hepatosellüler nekroz devam eder, fakat hücrel cevap virüsü temizlemek için yetersiz olduğundan hastalık kronik hepatitle sonuçlanır.

Kronik HBV infeksiyonunda hastalığın gidişi aktif viral replikasyon ve karaciğer hasarının derecesiyle sıkı ilişkilidir. Kronik infekte olguların yarısında aktif viral replikasyon vardır ve serum aminotransferazları yüksek düzeydedir. Bu olguların %15-20'sinde 5 yıl içinde siroz gelişir. Kronik infekte olguların her yıl %7-20'sinde kendiliğinden HBeAg negatifleşmesi görülür ve bu da karaciğer hastalığının

alevlenmesi ile birlikte. HBsAg'nin kendiliğinden kaybolması ise daha nadirdir, her yıl olguların %1-2'sinde görülür ve bu hastalar yine de ömür boyu infektif kalırlar. "sağlıklı taşıyıcı" denilen gruptaki hastalarda da HBeAg negatif, enzimler ve patoloji normaldir ve bunlarda hastalığın alevlenmesi nadir, HBsAg negatifleşmeside %15 civarındadır (28).

2.11.3 Gizli HBV İnfeksiyonu

HBsAg (-), ama anti-HBc pozitif şahıstan yapılan kan nakli ile HBV bulaşı olabildiği gösterilmiştir (62). HBV'nin bütün serolojik göstergelerinin negatif olduğu şahısların karaciğer ve serumlarında HBV DNA saptanmıştır. Kronik karaciğer hastalıklı ve primer hepatosellüler karsinomalı kişilerde düşük seviyeli HBV enfeksiyonu bildirilmiştir. HBsAg (-) hastalarda böbrek naklini takiben yapılan immunsupresyon veya kanser kemoterapisi sonrasında HBsAg(+) olanlar saptanmıştır.

Bu gözlemlerden sonra gizli HBV enfeksiyonu kavramı önemli yer tutmaya başlamıştır. Gizli HBV enfeksiyonu, saptanamayan HBsAg ile birlikte kronik HBV enfeksiyonu olarak tanımlanmaktadır; bu hastalarda serumda ya da karaciğerde düşük miktarda ($<10^4$ genom/ml) HBV DNA, PCR veya diğer moleküler yöntemlerle gösterilebilmektedir (63). Başka bir ifadeyle gizli HBV enfeksiyonu HBsAg negatif, akut fazın pencere dışı dönemde HBV ilişkili antikorlar pozitif ya da negatif iken HBV DNA'nın düşük titrede pozitif olma durumudur. Gizli HBV enfeksiyonun tanı göstergeleri kısmen değişken olup, HBsAg-, AntiHBs-/+, AntiHBc total-/+, HBeAg-/+, AntiHBe-/+, HBV DNA +($<10^4$ kopya) şeklinde görülebilir (64). Gizli HBV enfeksiyonunda HBV DNA aralıklı pozitif olabileceğinden negatif DNA sonucu varlığında testler tekrarlanmalıdır.

Gizli HBV enfeksiyonlu olan hastaların çok büyük bir kısmında anti-HBc ve/veya antiHBs negatif olmakla birlikte, az bir kısım hastada bu tanı göstergeleri pozitifdir.

Çizelge 4 HBV Serolojik Göstergeleri (20)

HBsAg	AntiHBs	AntiHBc IgM	AntiHBc IgG	HbeAg	AntiHBe	HBV DNA	
+	-	+		+/-	-	+	Akut enfeksiyon
-	+		+	-	+	-	İyileşmiş enfeksiyon
+	-		+	-	+	+*	Sağlıklı Taşıyıcı
+	-		+	+	-	+**	Kronik İnfeksiyon
-	-/+		-/+	-/+	-/+	+***	Gizli HBV İnfeksiyonu

Not: * $<10^5$ kopya/ml ; ** $>10^5$ kopya/ml; *** $<10^4$ kopya/ml

2.11.4 Olağan Dışı Tamı Kalıpları

İzole Anti-HBc Pozitifliği

İzole anti-HBc pozitifliği %2-12 oranında saptanmaktadır (65). Anti-HBs'nin kaybolup anti-HBc'nin devam ettiği veya anti-HBs'nin hiç gelişmeden sadece anti-HBc totalin geliştiği olgular vardır.

İzole anti-HBc pozitifliğinin ana nedeni yalancı pozitifliktir (%60-70); yalancı pozitif olgularda anti-HBs titresi genel olarak düşüktür (66). Bu durum özellikle HIV ve HCV enfeksiyonlu hastalarda rastlanmaktadır. Örneğin kronik HCV'li hastaların yaklaşık yarısında anti-HBc pozitifdir (65). Özgül olmayan çapraz reaksiyona neden olan bu antikorlar IgM yapısında olup bazı indirgeyicilerle elimine edilebilir. İzole anti-HBc yalancı pozitifliği söz konusu ise uygulanan hepatit B aşısına primer cevap alınır; yani antikor titresi aşı uygulamaları sonrasında yavaş yavaş yükselip 4. ay civarında pik yapar. Eğer ilk doz aşından sonra kuvvetli bir antikor yanıtı gelişirse anti-HBc'nin pozitif

olduğuna karar verilir. Aşıya cevap olmayan olgularda düşük düzeyde taşıyıcılıkla birlikte kronik hepatit B infeksiyonu var olduğu düşünülür (66).

İzole anti-HBc pozitifliğinin diğer bir nedeni düşük düzey taşıyıcılık olup, bunlarda HBsAg mevcut metotlarla saptanamayacak düzeydedir. Bu olguların bir kısmından mutant kökenler sorumludur.

İzole anti-HBc’li olguların %5-15’lik kısmından anti-HBs yanıtı gelişmemesi sorumludur. Diyabet hastaları, böbrek yetmezlikliler ve HIV infeksiyonu ve diğer bağışıklık yetmezliği olanlarda anti-HBs gelişmeyebilir. Bazı olgulardan ise anti-HBs ve anti-HBc oluşmakta, ama zamanla anti-HBs kaybolup sadece anti-HBc saptanmaktadır (67).

Akut hepatiti doğal seyrinde görülen pencere döneminde (2hafta-2 ay) izole anti-HBc pozitifliği saptanır.

İzole anti-HBc pozitifliğinin diğer nedenleri arasında HBcAg dışındaki antijenlere konağın yanıt verememesi, pasif transfer, kan transfüzyonu ve transplasental geçiş sayılabilir (67).

Tek başına HBsAg pozitifliği

Bu durum değişik nedenlerle oluşabilir:

- 1) İnfeksiyonun başlangıç devrinde anti-HBcIgM ve HBeAg’nin geç gelişimi.
- 2) Anti-HBc cevabı geliştiremeyen kronik HBv infeksiyonu
- 3) HBV tip 2 infeksiyonu
- 4) Perinatal olarak infekte olma
- 5) Özgül olmayan reaksiyonlar
- 6) Klinik örneğin kontaminasyonu.

HBsAg ve anti-HBs’nin birlikte pozitifliği

HBsAg’nin “a” determinantını kodlayan gen bölgesindeki mutasyonlar, adwv ve adyr subtiplerinde birliktelikle (farklı alt tiplerle aynı anda infekte olan kişilerde) ilişkili olabilir.

Bu durum bağışıklık yanıtı bozulanlarda saptanabilmektedir. Özellikle kronik aktif hepatitlilerde (birliktelik viral replikasyon ve aktif inflamasyonla ilişkili), damar içi uyuşturucu kullananlarda, hemodiyaliz uygulananlarda bu tablo görülebilmektedir. Ayrıca göstergeleri bilinmeden hepatit B aşısı yapılanlarda gerçekte kronik HBV infeksiyonlular arasında da böyle bir birliktelik saptanmıştır (68).

Tek başına anti-HBs pozitifliği

Bu olağan dışı kalıp, hepatit B aşısı veya hiperimmunglobulin uygulanması ya da kan ürünleri kullanımına bağlı olabilir. Hasta kanlarıyla sürekli temas edenlerde infeksiyöz olmayan viryonla tekrarlı karşılaşma da izole anti-HBs yanıtına neden olabilir. Anneden bebeğe pasif transferle geçen antikorlar bebekte izole anti-HBs pozitifliği yapabilir (69).

2.11.5 HBV DNA ile Birlikte Olağan Dışı Serolojik Kalıplar

HBV DNA'nın belirlenmesi ile de farklı kalıplar saptanmıştır. Bunlardan klinikte sık rastlananlar aşağıda özetlenmiştir.

HBsAg +, Anti HBc -, HBV DNA +

İncelemeler sonucu HBV tip 2 infeksiyonu olduğu bildirilenlerin aslında yeni bir tip virusle infeksiyon sonucu değil, anti-HBc negatifliğinin bağışık yanıtta selektif bir eksiklikten kaynaklandığı belirtilmiştir. Bu durumu mutant kökenlerin varlığıyla veya immun kompleks oluşumuyla açıklayanlarda vardır (70).

Anti HBs +, HBV DNA +

İyileşmiş ve anti HBs gelişmiş akut viral hepatit B olgularının bir kısmının mononükleer hücrelerinde beş yıldan fazla devam eden aktif halde viral genom bulunabilir (70). Kato ve ark. bu durumun özellikle pre-s bölgesinde meydana gelen mutasyonlarla ilişkili olduğunu bildirmiştir (71).

Anti HBe +, HBV DNA +

Bu durum Akdeniz bölgesinde daha sık görülmektedir ve prekor bölgesinde oluşan mutasyonla ilişkilidir. Bu profili gösteren kronik hepatit B olguları interferon tedavisine daha dirençlidir (70).

2.12. Tedavi

2.12.1 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.

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 infeksiyonunun 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 (72).

,

2.12.2 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 (73).

İnterferon Dışı Tedaviler

İmmünomodülatör ilaçlar:

- 1- Kortikosteroidler,
- 2- Timozin alfa-1,
- 3-Hepatit B aşılıarı,
- 4-Diğer immünomodülatör ilaçlar:
 - Levamisol,
 - IFN beta ve IFN gama,
 - İnterlökin-2,
 - Koloni stimüle edici faktörler

5-Nükleozid Analogları: HBV, RNA virüsleri 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 (74).

2.13.Korunma

Hepatit B virüsünün toplumdaki yaygınlığını önlemede iki konu büyük önem taşımaktadır. Bunlardan biri genel önlemler olup, özellikle sağlık personelinin bulaşma yol açabilecek riskli temaslardan kaçınmalarını içerir. Kontrol önlemleri için hepatit B virusunun epidemiyolojik ve biyolojik özelliklerinin bilinmesi de gereklidir. Korunmada büyük önem taşıyan bir diğer konuda immunoproflaksidir.

HBV bulaşımın önlenmesi aşağıdaki başlıklar altında incelenir;

1-Genel önlemler

2-İmmunoprofilaksi

a-Pasif bağışıklama

b-Aktif bağışıklama

c- Pasif + aktif bağışıklama

Pasif Bağışıklama: B tipi hepatite karşı immünite kazanmış kişilerin veya hastalığın konvelasan döneminde olanların serumlarından elde edilen hepatit B immunglobulini ile sağlanır.

Aktif Bağışıklama: 1970’li yıllarda çalışmalarına başlanan, 1981’de ABD’de lisans alan plazma kaynaklı aşılardan sonra yerini yavaş yavaş rekombinant teknoloji ile hazırlanmış aşılara bırakmışlardır. Rekombinant aşı geliştirme çalışmaları, hepatit B virüs DNA’sında yer alan ve HBsAg’ni kodlayan gen olan “s” geninin izolasyonu ile başlamıştır. “S” geni bir plazmid içerisine yerleştirilmiş ve E. Coli veya maya hücrelerinde (*Saccharomyces cerevisiae*) klonlanmıştır. Maya hücrelerinin genetik yapısı içerisine yerleştirilen ve hücrenin replikasyonu ile üretilen HBsAg’i iki aşamalı kromatografi işlemi ile purifiye edilmiştir .

Üç doz intramüsküler hepatit B aşısı uygulanan yenidoğan, çocuk ve genç erişkinlerin %95-99’unda koruyucu antikor düzeyi (anti-HBs > 10mlU/ml) sağlanır. Ancak 40 yaşın üzerindeki kişilerde ve immün yetmezliklerde bağışıklanma daha güçtür. Aşının immünojenitesi, hepatit B immunglobulini veya diğer aşılardan birlikte

uygulanması ile azalmaz. Aşılanan ve antikor titresi > 10mIU/ml olan kişilerin yaklaşık % 50'sinde 5-10 yıl sonra antikor titresi saptanabilen düzeylerin altına inebilir. Ancak bu durumda bile anamnestic antikor yanıtı ile hastalığa karşı koruyuculuğun devam edeceği bildirilmiştir (75).

Hepatit B aşısının standart uygulama şeması 0,1 ve 6. aylar olmakla birlikte, infekte olma riski yüksek kişilerde 0, 1, 2, 12 şeması önerilir. Her iki şema ile de aşının etkinliği %90'ın üzerindedir. İleri yaş, obezite, sigara kullanımı ve immün yetmezlik antikor oluşumunu olumsuz etkileyen faktörler arasında sayılabilir (76).

Yapılan çalışmalar HBV ile temas etmiş kişilerde uygulanan hepatit B hiperimmunglobulinin (HBIG) koruyucu olduğunu göstermiştir. Temas sonrası HBIG uygulama zamanının, koruyuculuk üzerine etkisi net olarak belirlenememiştir. Temas sonrası profilaksinin en önemli gerekçelerinden birisi HBV ile infekte anneden doğan bebeklerdir. Perinatal infeksiyonun %90 kronikleştiği bilinmektedir. Bu bebeklere hemen doğumu takiben 0.5 ml HBIG ve hepatit B aşısı birlikte uygulanırsa, % 94 oranında koruma sağlanabilmektedir (77).

2.14. Hepatit B'nin Epidemiyolojisi

2.14.1 Bulaşma yolları

HBV temel olarak parenteral yolla, infekte kan ve sıvılarla perkutan ve mukozal temas, infekte kişiyle cinsel ilişki ve perinatal yolla bulaşmaktadır.

Parenteral yol: Kan ve kan ürünleri nakil, damar içi uyuşturucu kullananlarda ortak enjektör kullanımı ve diğer ortak kullanılan kesici ve delici aletler aracılığıyla bulaşma en önemli bulaşma yoludur. HBsAg negatif anti-HBc pozitif olanlardan yapılan kan ve dokuların aktarımı ile de virüsün bulaşabildiği gösterilmiştir (78).

Cinsel yolla bulaşma: Taşıyıcıların cinsel salgılarında HBV bulunmakta ve cinsel eşlerinin mukozal giriş kapılarından girerek infeksiyona neden olmaktadır. Travmatik ilişkilerde ve başka bir cinsel hastalığın bulunması durumunda bulaşma riski daha da artmaktadır.

Taşıyıcı anneden bebeğe bulaşma: Transplasetal (in utero), perinatal veya postnatal anne sütü ile bulaşma olabilir. İn utero bulaşma %10-15 oranındadır. En sık doğum sırasında infekte kan ve salgılar aracılığıyla bulaşma olmaktadır. HBeAg pozitif olan annelerden bulaşma daha yüksek orandadır.

Diğer bulaşma yolları: Aynı ev içinde yakın yaşama koşulları da HBV bulaşına neden olmaktadır. Virüsün tükürük ve idrarda bulunması, özellikle bu yollarla bulaşma olduğunu düşündürmektedir. Yapılan bir çalışmada HBeAg pozitif olgularda, idrarda HBV DNA pozitifliği %91 oranında bulunmuştur (79).

2.14.2 Dünyada HBV İnfeksiyonu

Dünya nüfusunun yaklaşık %5'inde kronik HBV infeksiyonu vardır. (300 milyon kişi). Her yıl yaklaşık 500 bin ile 1 milyon kişi HBV ile ilgili nedenlerden ölmektedir. HBV infeksiyonunun görülme sıklığı ve yaygın bulaşma şekli dünyanın farklı bölgelerinde Dünya Sağlık Örgütü'ne göre değişiklikler göstermektedir. Buna göre dünya ülkeleri 3 gruba ayrılır:

Yüksek endemisite bölgeleri: Toplumda HBsAg pozitifliği %8'in üzerindedir. Dünya nüfusunun % 45'i bu bölgelerde yaşar. Japonya ve Hindistan dışında kalan birçok Asya ülkesi, Amazon bölgesi, Pasifik adaları, Avustralya ve Yeni Zelanda yerlileri bu grupta yer alır. Bu ülkelerde hayat boyu HBV ile karşılaşma riski %60'tan fazladır. İnfeksiyonun çoğu kronikleşme riskinin yüksek olduğu yeni doğan ve erken çocukluk döneminde kazanılmaktadır. Anne HBsAg pozitif ve HBeAg pozitif ise immunoproflaksi uygulanmadığı takdirde bebek %70-90 oranında infekte olur. Anne HBsAg pozitif HBeAg negatif ise bu oran %5-20'ye iner. HBV taşıyıcısı annelerin bebekleri doğumda infekte olmamışlarsa erken çocukluk döneminde yakın temasla infekte olurlar. Güneydoğu Asya ülkelerinde HBsAg pozitif annelerin %35-50'si HBeAg pozitiflerdir ve çocukluktaki kronik HBV infeksiyonlarının %30-50'si perinatal yolla kazanılmıştır. Diğer bölgelerdeki HBsAg pozitif kadınların HBeAg pozitifliği düşüktür ve bulaşma daha çok erken çocukluk döneminde olmaktadır. Bu ülkelerde çocuklarda kronik infeksiyon gelişmesi %1-2 oranında olup perinatal bulaş olgularının %10-20'sinden sorumludur.

Orta endemisite bölgeleri: HBsAg pozitifliği %2-7 arasında olup, Dünya nüfusunun % 43'ü bu bölgelerde yaşar. Bu bölgelerde hayat boyu HBV ile karşılaşma riski %20-60 olup, infeksiyon tüm yaş gruplarında görülür. Gebe kadınların %2-7'si HBsAg pozitif olup bunların %20'den az bir kısmı HBeAg pozitifdir. Kronik infeksiyonların içinde perinatal infeksiyon daha seyrek (10-20). Kuzey Afrika ülkeleri, Ortadoğu ülkeleri, Türkiye'nin de içinde bulunduğu Akdeniz havzası, Doğu Avrupa ve Rusya orta endemisite ülkeleri arasında yer alır.

Düşük endemisite bölgeleri: Toplumdaki HBsAg pozitifliği %2'nin altındadır ve Dünya nüfusunun %12'si bu bölgelerde yaşar. ABD, Kuzey ve Batı Avrupa ülkeleri ve Avustralya düşük endemisite ülkeleridir. Bu ülkelerde hayat boyunca HBV enfeksiyonuyla karşılaşma riski %20'den azdır. Enfeksiyonların çoğu erişkinlerde ve risk gruplarında görülür (80).

2.14.3 Türkiye'de HBV Enfeksiyonu

Ülkemizde 1972 yılından günümüze kadar donörler, donör dışı normal popülasyon, çocuklar ve risk grupları gibi çeşitli gruplarda HBsAg seroprevalansının araştırıldığı çok sayıda çalışma yayınlanmıştır. 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 (81). 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 oranın giderek azaldığı dikkat çekmektedir (82).

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 (82) Ülkemizde yenidoğan bebeklerde rutin olarak uygulanan hepatit B aşısının 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 başvurmamaları da HBsAg seropozitivitesini düşük gösterebilir. Bu nedenle donör verilerini normal yetişkin popülasyonu veya kontrol verisi olarak değerlendirirken dikkatli olmak 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 (82). Bu grupta yapılan çalışmalar içinde en yüksek olgu

sayısının bulunduğu araştırma (3544 olgu %4.5 HBsAg seropozitifliği) Sarpel ve ark. tarafından yapılmıştır. 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 çocuklarda HBsAg seroprevalansının incelendiği çalışmalar oldukça yetersizdir. Araştırmalardan elde edilen verilere göre ülkemiz çocuklarında %2.0-12.1 oranlarında HBsAg pozitifliği saptanmıştır (82). 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. Yapılan taramalarda tek başına HBsAg veya anti-HBs pozitiflikleri belirlenememektedir. 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 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 (82). Anti-HBs’nin tarandığı çalışmalardan elde edilen verilere göre anti-HBs pozitifliği oranı %20.6-52.3 arasında değişmektedir (82). 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 infeksiyonu 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 (82). 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 (83). Yine ülkemizde yapılan diğer risk gruplarının incelendiği çalışmaların çoğunda kontrol grubuna göre yüksek seropozitivite oranları saptanmıştır (82). 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 (83). 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'nün 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.

2.14.4 Gizli Hepatit B İnfeksiyonu Prevalansı

Gizli HBV farklı coğrafi bölgelerde ve nüfuslarda HBV'nün genel prevalansını yansıtmaya rağmen dünya çapında yaygın bir durumdur.

HCV'den etkilenen hastaların gizli HBV prevalansının en yüksek olduğu bireyler kategorisi olarak düşünülmesinde genel bir mutabakat söz konusudur (84,85). Özellikle HBV DNA Akdeniz havzasında bulunan HBsAg negatif HCV taşıyıcılarının yaklaşık üçte birinde saptanabilmektedir ve bu prevalans Uzakdoğu Asya ülkelerinde daha da yüksektir (86).

Karaciğer hastalarının yanı sıra parenteral olarak geçen infeksiyonlardan yüksek risk kategoride olan bireylerde de geniş bir şekilde gizli HBV araştırması yapılmıştır. Gizli HBV prevalansı Baltimore'deki damar içi uyuşturucu bağımlılarında %45 ve Japonya'daki hemofilyaklar %51 olarak rapor edilmiştir (87). Bunun aksine hemodiyaliz hastaları üzerinde gerçekleştirilen çalışmalar oldukça değişken sonuçlar ortaya koymuştur ve en son yapılan çalışmalarda gizli HBVnin prevalansının %0 dan %36 ya kadar değişiklik gösterdiği bildirilmektedir (88). Ancak ifade edildiği gibi sonuçlarda görülen bu tutarsızlıklar çalışmalarda kullanılan yöntemlerin farklı duyarlılık ve özgüllüklerine bağlıdır. Bu doğrultuda, bazı yazarların gizli HBV'yi hemodiyaliz ünitelerinde virüs salgınına muhtemel bir neden olarak algıladıklarını (bu durumda hem hastalar hem de çalışanlar için enfeksiyon riski oluşturmaktadır) ve bütün hemodiyaliz hastaları için HBV DNA taraması dahil bazı önlemler alınması gerektiğini önerdiklerini dikkate almak önemli görünmektedir (89).

Gizli HBV prevalansının mevcut verilerinin oldukça değişken olduğu bir hasta kategorisi ise HIV taşıyan bireylerdir ve yayımlanan prevalans %0 ile %89 arasındadır ve diğer araştırmaların önemli bir kısmı bu iki uç arasında sonuçlar rapor etmektedir (90). Bu çeşitli çalışmalarda kullanılan yöntemlerin hassasiyet ve spesifiklik bakımından büyük farkları bir önceki incelemede dile getirilmiştir (91). Bu nedenledir ki en yüksek gizli HBV prevalansına ulaşan çalışmanın hem çok hassas HBV DNA amplifikasyon prosedürü kullandığına hem de her bir bireyden seri serum örnekleri incelediği dikkate alınmalıdır. Aslında serum HBV DNA seviyelerinin gizli HBV taşıyıcılarında bile dalgalanma gösterdiğinden HBV testinin zamanla tekrar edilmesinin gizli HBV durumunun tanımlanmasında iyi bir yol olduğu ortaya çıkmaktadır (92).

Sağlıklı görünen bireylerin sayısı göz önüne alındığında gizli HBV kan bağışçılarında genel nüfusa oranla oldukça geniş bir şekilde araştırılmıştır. Yinede mevcut veriler yeterli bilgi vermemektedir. Kan bağışçıları arasında bu gizli enfeksiyon batı dünyasında nadiren görülmekteyken gelişmekte olan ülkelerde daha sık saptanmaktadır (93). Kuzey Kanada da yaşayan Inuit'ler arasında HBsAg negatif taşıyanların gizli HBV prevalansını değerlendirmek amacıyla yapılan son bir çalışmada anti-HBc pozitif taşıyıcılarının %18'inde ve HBV seronegatif bireylerin %8'inde HBV DNA (94), başka bir çalışmada normal transaminaz değerleri olan HBV/HCV negatif olan sağlıklı Koreli 195 kişinin 31inde (%16) gizli HBV bulunmuştur. Hong Kong'dan

124 sağlıklı hemotopietik kök hücre bağışıclarının 19'unda (%15.3) gizli HBV genomu tespit etmişlerdir.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Şubat-Haziran 2008 tarihleri arasında, Sivas Numune Hastanesi Kan Merkezi ve Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Kan Merkezine gönüllü olarak başvuran ve kan donörü olarak kabul edilen 987 kişinin serumu çalışmaya alındı. Çalışmaya alınan serumlarda Anti-HIV, Anti-HCV antikörleri ve HBsAg negatifti. Bu testler Numune Hastanesi Kan merkezi ve Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarında yapıldı.

Çalışmamızda 987 serumun tümünde total anti-HBc araştırıldı. Anti-HBc total pozitiflere anti-HBs testi uygulandı. Anti-HBs negatif olan serumlarda anti-HBc IgM, HBeAg ve Anti-HBe varlığı araştırıldı. Anti-HBc total pozitif, diğer tüm serolojik göstergeleri negatif olan serumlar izole anti-HBc pozitif olarak değerlendirilerek, bu serumlarda HBV DNA varlığı araştırıldı. Bu testler Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda yapıldı.

3.1 Örnek Alımı ve Hazırlanması

HBsAg, HIV ve HCV yönünden değerlendirilen ve kan donörü olarak kabul edilen kişilerin serumları steril mikrosantrifüj tüplere her serum örneği için ikişer tane olmak üzere alındı. Her bir donöre numara verildi ve her donörün yaş ve cinsiyet bilgileri kaydedildi. Serumlar çalışma yapılacağı güne kadar -20°C'de saklandı.

3.2 Kullanılan Sistem ve Cihazlar

1. Mikropipetler (10µl-200µl)
2. Mikrosantrifüj Tüpler (Ependorf tüpler)
3. Derin dondurucu (-20°C)
4. ELISA Mikroplak Yıkayıcısı (Organon Teknika)
5. ELISA Mikroplak Okuyucusu (Bio-Tek EL 312)
6. Etüv
7. HBV DNA İzolasyon Cihazı (BIO ROBOT M48)
8. Real-Time PCR Cihazı (Corbett Research)

3.3 Kullanılan Kitler

3.3.1 Anti-HBc (total) ELISA Kiti (Abbott Murex, UK): Kit 96 testlik ve mikro ELISA tipindedir. Kitimiz Hepatit B core antijeni ile kaplı kuyucuklar, tampon

çözelti içeren örnek sulandırıcı, peroksidaz bağlı monoklonal anti-HBc enzim konjugat, 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) ve hidrojen peroksit içeren kromojen, anti-HBc içeren pozitif kontrol, anti-HBc içermeyen negatif kontrol, glisin/borat içeren yıkama çözeltisi ve 1N sülfürik asit içeren stop çözeltisi içermektedir.

3.3.2 Anti-HBs ELISA Kiti (Abbott Murex, UK): Kit 96 testlik, mikro ELISA tipindedir. Kitimiz Hepatit B yüzey antijeni (HBsAg) ile kaplı kuyucuklar, tampon çözelti içeren örnek sulandırıcı, peroksidaz bağlı HBsAg antikor enzim konjugat, 3,3',5,5'- tetramethylbenzidine (TMB) ve hidrojen peroksit içeren kromojen, anti-HBs ve HBsAg içermeyen negatif kontrol, 10 mlU/ml anti-HBs kalibratör, 100 mlU/ml anti-HBs kalibratör, glisin/borat içeren yıkama çözeltisi ve 1N sülfürik asit içeren stop çözeltisi içermektedir.

3.3.3 Anti-HBc IgM ELISA Kiti (Abbott Murex, UK): Kit 96 testlik, mikro ELISA tipindedir. Kitimiz IgM'e karşı oluşturulmuş antikorlar ile kaplı kuyucuklar, tampon çözelti içeren örnek sulandırıcı, tampon çözelti bovine protein içeren sulandırıcı, peroksidaz bağlı HBcAg içeren enzim konjugat, 3,3',5,5'- tetramethylbenzidine (TMB) ve hidrojen peroksit içeren kromojen, pozitif ve negatif kontroller, glisin/borat içeren yıkama çözeltisi ve 1N sülfürik asit içeren stop çözeltisi içermektedir.

3.3.4 Anti-HBe / HBeAg ELISA Kiti (Abbott Murex, UK): Kit 96 testlik, mikro ELISA tipindedir. Kitimiz monoklonal HBeAg ile kaplı kuyucuklar, tampon çözelti içeren sulandırıcı, peroksidaz bağlı monoklonal HBeAg enzim konjugatı, 3,3',5,5'- tetramethylbenzidine (TMB) ve hidrojen peroksit içeren kromojen, rekombinant HBeAg içeren neutralising antigen, negatif kontrol , HBeAg ve Anti-HBe için ayrı pozitif kontroller, glisin/borat içeren yıkama çözeltisi ve 1N sülfürik asit içeren stop çözeltisi içermektedir.

3.3.5 HBV DNA İzolasyon Kiti (Qiagen, Hamburg): HBV DNA izolasyon kiti İzolasyon aşamasında kullanılan (İnternal kontrol, taşıyıcı RNA, Elution AVE buffer), Buffer AL (Liziz buffer) , MagAttract, İsoopropanol, Buffer AW1, Buffer AW2, ethanol, Buffer AVE içermektedir.

3.3.6 Real- time PCR Kiti (Qiagen, Hamburg): Real-time PCR kiti HBV RG/TM İnternal kontrol, HBV RG/TM Master, HBV RG/TM Standart1, HBV RG/TM Standart 2, HBV RG/TM Standart 3, HBV RG/TM Standart 4, HBV RG/TM Standart 5 içermektedir.

3.4 Testlerin Yapılışı

3.4.1 Anti-HBc (total): Kit yönergesine göre şu şekilde yapıldı; 50 µl örnek sulandırıcıdan reaksiyon kuyularına dağıtıldı. İki kuyuya 50 µl negatif kontrol iki kuyuya 50µl pozitif kontrol ve her bir kuyuya 50 µl serumlardan eklendi. Etüvde 37°C'de 30 dak. bekletildi. Yıkama işlemi yapıldı. Her kuyuya 50 µl konjugat eklendi ve 37°C'de 30dk. bekletildi. Yıkama işlemi yapıldı. Her kuyuya 100 µl substrat çözeltisi (kromojen) eklendi ve 37°C'de 30 dak. bekletildi. Süre tamamlandıktan sonra her bir kuyuya 50 µl stop çözeltisi eklendi. Mikroplak okuyucusunda 490 nm dalga boyunda absorbans değerleri ölçüldü. Pozitif ve negatif kontrol değerlerine göre cutoff değeri hesaplandı ve serumların absorbans değerleri cutoff değerle karşılaştırılarak sonuçların pozitif ve negatifliği belirlendi.

3.4.2 Anti-HBs: Kit yönergesine göre şu şekilde uygulandı: 25 µl sulandırıcı reaksiyon kuyularına dağıtıldı. İki kuyuya 75 µl negatif kontrol, iki kuyuya 75 µl 10 mIU/ml, iki kuyuya 100 mIU/ml kalibratör ve geri kalan her bir kuyuya 75 µl serumlar eklendi. 60 dak. 37 °C nemli ortamda bekletildi. Yıkama işlemi yapıldı. Her bir kuyuya 50 µl konjugat dağıtıldı. 60 dak. 37 °C nemli ortamda bekletildi. Yıkama işlemi yapıldı. Her bir kuyuya 100 µl substrat çözeltisi (kromojen) eklendi ve tekrar 37°C'de 30dk. nemli ortamda bekletildi. Süre tamamlandıktan sonra her bir kuyuya 50 µl stop çözeltisi eklendi. Mikroplak okuyucuda 490 nm dalga boyunda negatif kontrollerin, kalibratörlerin ve serumların absorbans değerleri ölçüldü. Kalibratörlerin absorbans değerleri kantitatif değerlere çevrildi. (≥ 10 – < 100 IU/mL) zayıf bağışık, (≥ 100 IU/mL) kuvvetli bağışık olarak değerlendirildi. (< 10 IU/L) bu değerden düşük veriler de negatif olarak belirlendi.

3.4.3 Anti-HBc IgM: Kit yönergesine göre şu şekilde uygulandı: Her bir serumdan 10 µl alındı ve örnek sulandırıcıyla 1ml'ye tamamlanıp serum ve örnek sulandırıcının homojen bir şekilde karışması sağlandı. Kontrollere örnek sulandırıcı

eklenmedi. Her bir kuyuya 75 µl sulandırıcı dağıtıldı. İki kuyuya 25 µl negatif kontrol, iki kuyuya 25 µl pozitif kontrol geri kalan her bir kuyuya 25 µl serum ve örnek sulandırıcı karışımından dağıtıldı. 37°C’de 30 dak. bekletildi. Yıkama işlemi yapıldı. Her bir kuyuya 50 µl konjugat dağıtıldı ve 37°C’de 30dak. bekletildi. Yıkama işlemi yapıldı. Her bir kuyuya 100 µl substrat çözeltisi (kromojen) dağıtıldı ve 37°C’de 30 dak. bekletildi. Süre tamamlandıktan sonra her bir kuyuya 50 µl stop çözeltisi dağıtıldı. Mikroplak okuyucuda 490 nm dalga boyunda negatif, pozitif kontrollerin ve serumların absorbans değerleri ölçüldü. Pozitif ve negatif kontrol değerlerine göre cutoff değeri hesaplandı ve serumların absorbans değerleri cutoff değeri karşılaştırılarak sonuçların pozitif ve negatifliği belirlendi.

3.4.4 Anti-HBe ve HBeAg: Kit yönergesine göre şu şekilde uygulandı: 96 testlik plağımızın yarısı Anti-HBe için yarısında HbeAg testi için kullanıldı. İlk olarak her bir kuyuya 25 µl sulandırıcı dağıtıldı. Anti-HBe çalışacağımız tarafa anti-Hbe pozitif kontrolden iki kuyuya 75 µl, HbeAg çalışacağımız tarafa HBeAg pozitif kontrolden iki kuyuya 75 µl, her iki tarafada iki kuyuya 75 µl negatif kontrolden ve 75 µl serumlardan dağıtıldı. Anti-HBe çalışılacak tarafa 50 µl neutralising antijen dağıtıldı. Bütün kuyulara 50 µl konjugat dağıtıldı ve 90dak. 37°C’de bekletildi. Yıkama işlemi yapıldı. Her bir kuyuya 100 µl substrat çözeltisi (kromojen) dağıtıldı ve 37°C’de 30 dak. bekletildi. Süre tamamlandıktan sonra kuyulara 50 µl stop çözeltisi dağıtıldı. Mikroplak okuyucuda 490 nm dalga boyunda negatif, pozitif kontrollerin ve serumların absorbans değerleri ölçüldü. Pozitif ve negatif kontrol değerlerine göre cutoff değeri hesaplandı ve serumların absorbans değerleri cutoff değeri karşılaştırılarak sonuçların pozitif ve negatifliği belirlendi.

3.4.5 HBV DNA’nın İzolasyonu: Bio Robot M48 cihazının çalışma yönergesi uyarınca kitlerin, ve serumların ön hazırlık aşamaları yapıldı ve cihaza yerleştirildi. DNA izolasyonu cihazda gerçekleşti. Mikrosantrifüj tüplerinde viral DNA elde edildi.

Ön hazırlık aşamaları: İnternal control 20 µl x 26 (serum sayımız), carrier RNA 1 µl x 26, Elution buffer 39 µl x 26 karışım hazırlandı 26 tüpe paylaştırıldı ve üzerlerine 400 µl serum eklenerk cihazda uygun yerlere yerleştirildi. Daha sonra sırayla; 23ml etanol, Buffer AW2 66ml + 160ml etanol karışımı, Buffer AW1 27ml + 35ml etanol karışımı, Buffer AVE 10.1ml, Manyetik partikül (Magattract suspension B) 2.1 ml,

Proteinaz 5.5 ml, Buffer AL14.3ml + 99ml Carrier RNA, Isopropanol 18.8ml cihaza verildi. Bilgisayardan uygun program seçilerek izolasyon aşaması başlatıldı.

3.4.5.1 Bio Robot M48 Çalışma Prensibi

Nükleik asiti saf olarak elde etme işlemi liziz, bağlama, yıkama ve saf nükleik asiti elde etme aşamalarından oluşmaktadır.

Liziz: Bu aşamada hazır olarak bulunan Qiagen proteaz ve Buffer AL + carrier RNA karışımı kullanılmaktadır. viral yapının dışında yer alan protein tabaka parçalanarak içeride yer alan nükleikasit açığa çıkar ve nükleik asitin manyetik partiküllere yapışması sağlanır.

MagAttract manyetik partiküllere nükleikasitin bağlanması: Örnekler içerisinde bulunan viral DNA manyetik partiküllere bağlanır. Ortamın tuz ve pH koşulları manyetik partiküllere protein ve ortamda bulunan diğer kontamine maddelerin bağlanmasını engeller. Bundan sonraki diğer enzimatik reaksiyonlara ve PCR aşamasına nükleik asitlerin katılımı gerçekleşmiş olur.

Manyetik partiküllere bağlanan nükleik asiti yıkama: Viral DNA'yı manyetik partiküller üzerinde saf olarak bırakmak için sırayla yıkama işlemlerinden geçirilir. Saf olarak nükleik asitler manyetik partiküller üzerinde kalır.

Viral DNA'yı manyetik partiküllerden ayırma: Bu aşamada Buffer AVE kullanılır. Buffer AVE RNase ve %0.04 oranında sodium azide içerir. Sodium azide , RNase ile birlikte mikrobial kontaminasyonu önler. Manyetik partiküllerden viral DNA cihaza yerleştirilmiş steril boş tüplere Buffer AVE solüsyonuyla yıkanarak alınır.

3.4.6 Real-Time PCR: Kitin çalışma yönergesine uygun olarak işlemler yapıldı. İnternal kontrol vorteklendi. Miks içerisine 26 µl internal kontrol konuldu. Miksler (primerler var) hazırlandıktan sonra vortekslendi. PCR bloğu buzdolabından çıkarıldı ve PCR bloğuna 26 hasta + 5 standart + 1 negatif kontrol için 32 adet küçük PCR ependorf tüp dizildi. Tüm tüplere 30 µl miks dağıtıldı. İlgili tüplere 20 µl donör DNA ekstraktı, standartlardan ve negatif kontrolden dağıtıldı. Standartlar 27 nolu ependorf tüpten başlayarak 5,4,3,2,1 standartı ve negatif kontrol konuldu. En küçük

standarttan başlanır. Ependorf tüplerin kapakları hemen kapatıldı ve tüm tüpler cihaza yerleştirildi. Tüp yerleştirilen yerin kapağı ve cihazın kapağı kapatıldı. Bilgisayardan gerekli veriler girildi ve start verilerek cihaz çalışmaya başladı. Çalışma bittikten sonra sonuçlar değerlendirildi.

3.5 İstatistiksel Yöntem

Çalışmamızın verileri SPSS (ver:13.0) programına kaydedildi. Daha sonra ki kare testi yöntemi kullanılarak sonuçların istatistiki değerlendirilmesi yapıldı.

4. BULGULAR

İzole anti-HBc pozitifliği bulunan kan donörlerinde HBV DNA varlığının araştırıldığı bu çalışmada, çalışmaya alınan 987 bireyin 899'u (%91.1) erkek, 88'i (%8.9) kadındı. Yaşları 18-61 arasında değişen bireylerin yaş ortalaması 35.2 olarak saptandı. Yaşlar 18-29, 30-39, 40-49, ve 50⁺ olarak gruplandırıldı. 18-29 yaş grubunda 433 (% 43.8) , 30-39 yaş grubunda 327 (% 33.1), 40-49 yaş grubunda 188 (%19.1), 50⁺ yaş grubunda 39 (%3.9) kişi bulunmaktaydı (Çizelge 5).

Çizelge 5 Kan donörlerinin yaş ve cinsiyete göre dağılımı

Yaş Grupları	Erkek		Kadın		Toplam	
	n	(%)*	n	(%)*	n	(%)
18 – 29	390	(90.1)	43	(9.9)	433	(43.8)
30 – 39	302	(92.4)	25	(7.6)	327	(33.1)
40 – 49	170	(90.4)	18	(9.6)	188	(19.1)
50 ⁺	37	(91.7)	2	(8.9)	39	(3.9)
Toplam	899	(91.1)	88	(8.9)	987	(100.0)

*sattır yüzdesi

4.1 Anti-HBc (total) Testi Sonucu:

Toplam 987 serumun 209'unda (21.1) anti-HBc (total) pozitif bulundu. Erkeklerin 200'ünde (% 20.2), kadınların 9'unda (% 0.9) 209 anti-HBc pozitif. Anti-HBc oranlarının cinsiyetler arasındaki dağılımı istatistiksel olarak karşılaştırıldığında aradaki farkın önemsiz olduğu bulundu ($X^2=6,938$ $p> 0.05$). Yaş gruplarında anti-HBc bulunma oranlarına bakıldığında; 18-29 yaş grubundaki 433 bireyin 40'ında (% 9.2), 30-39 yaş grubundaki 327 bireyin 75'inde (% 22.9), 40-49 yaş grubundaki 188 bireyin 68'inde (% 36.1), 50⁺ yaş grubundaki 39 bireyin 26'sında (% 66.6) anti-HBc saptandı. Yaş gruplarındaki anti-HBc oranlarının durumu istatistiksel olarak karşılaştırıldığında farkın önemli olduğu bulundu ($X^2= 111$ $p <0.05$). Ayrıca her yaş grubu içindeki erkek ve kadın donörlerin anti-HBc oranları istatistiksel olarak karşılaştırıldığında aradaki farkın önemsiz olduğu saptandı (Fisher's Exact test $p> 0,05$) (Çizelge 6).

Çizelge 6 Anti-HBc pozitifliğinin yaş ve cinsiyete göre dağılımı

Yaş Grupları	Erkek		Kadın		Toplam	
	n	(%)*	n	(%)*	n	(%)*
18 – 29 (n=433)	39	(9)	1	(0.2)	40	(9.2)
30 – 39 (n=327)	73	(22.3)	2	(0.6)	75	(22.9)
40 – 49 (n=188)	63	(33.5)	5	(2.6)	68	(36.1)
50 ⁺ (n=39)	25	(64.1)	1	(2.5)	26	(66.6)
Toplam (n=987)	200	(20.2)	9	(0.9)	209	(21.1)

*sattır yüzdesi

4.2 Anti-HBs Testi Sonucu:

Toplam 209 Anti-HBc pozitif olan serumun 176'sında (% 84) anti HBs pozitif, 33'ünde (% 16) negatif olarak saptandı. Anti-HBs'si pozitif olan 176 serumun 167'si (% 79.9) erkek, 9'u (% 4.3) kadın donöre aitti. 33 anti-HBs'si negatif bireylerin hepsi erkekti. Cinsiyetler arasında anti-HBs oranlarının dağılımı istatistiksel olarak karşılaştırıldığında farkın önemsiz olduğu bulundu ($X^2=1.763$ $p> 0.05$).

Yaş gruplarında anti-HBs bulunma oranlarına bakıldığında; 18-29 yaş grubunda 39 kişinin 33'ünde (% 84.6) pozitif, 6'sında (% 15.3) negatif, 30-39 yaş grubunda 76 kişinin 63'ünde (% 82.8) pozitif, 13'ünde (% 17.1) negatif, 40-49 yaş grubunda 68 kişinin 55'inde (% 80.8) pozitif, 13'ünde (% 19.1) negatif, 50⁺ yaş grubunda 26 kişinin 25'inde (96.1) pozitif, 1'inde (% 3.8) negatif bulundu. Anti-HBs oranları yaş grupları arasında istatistiksel olarak karşılaştırıldığında farkın önemsiz olduğu bulundu ($X^2=3.460$ $p> 0.05$). Her yaş grubu içindeki erkek ve kadın donörlerin anti-HBs oranları istatistiksel olarak karşılaştırıldığında aradaki farkın önemsiz olduğu saptandı (Fisher's Exact Test $p>0.05$) (Çizelge 7).

Çizelge 7. Anti-HBc'si pozitif donörlerdeki Anti-HBs oranlarının yaş ve cinsiyete göre dağılımı

Yaş Grupları	Erkek (n=200)				Kadın (n=9)				Toplam (n=209)			
	P		N		P		N		P		N	
	n	(%)*	n	(%)*	n	(%)*	n	%	n	(%)*	n	(%)*
18 – 29 (n=39)	32	(82.1)	6	(15.3)	1	(2.5)	-	-	33	(84.6)	6	(15.3)
30 – 39 (n=76)	61	(80.2)	13	(17.1)	2	(2.6)	-	-	63	(82.8)	13	(17.1)
40 – 49 (n=68)	50	(73.5)	13	(19.1)	5	(7.3)	-	-	55	(80.8)	13	(19.1)
50+ (n=26)	24	(92.3)	1	(3.8)	1	(3.8)	-	-	25	(96.1)	1	(3.8)
Toplam (n=209)	167	(79.9)	33	(15.7)	9	(4.3)	-	-	176	(84.2)	33	(15.7)

*satur yüzdesi

P: Pozitif

N: Negatif

Anti-HBs pozitif 176 serumdaki antikor düzeyleri kantitatif olarak değerlendirildiğinde, 54'ünün (%25.8) zayıf bağışık ($\geq 10 - < 100$ IU/mL), 122'sinin (%12.3) kuvvetli bağışıklık (≥ 100 IU/mL) özelliği gösterdiği bulundu (Çizelge 8).

Çizelge 8 Anti-HBs pozitifliğinin kantitatif olarak değerlendirilmesi

		Sonuçlar	
		n	(%)*
AntiHBs (n=209)	Bağışık		
	Zayıf ($\geq 10 - < 100$ IU/mL)	54	(25.8)
	Kuvvetli (≥ 100 IU/mL)	122	(58.3)
	Bağışık olmayan (< 10 IU/L)	33	(15.7)

*sattır yüzdesi

4.3 Anti-HBc IgM Testi Sonucu

Anti-HBc pozitif, Anti-HBs negatif 33 serumun tümünde anti-HBc IgM negatif olarak bulundu (Çizelge 9).

4.4 HBeAg/ Anti-Hbe Testi Sonucu

Anti-HBc pozitif, Anti-HBs negatif 33 serumun tümünde HBeAg negatif, 26'sında (% 79) anti-HBe negatif, 7'sinde (% 21) anti-HBe pozitif (Çizelge 9).

Çizelge 9 Anti-HBc (+), Anti HBs (-) serumlarda AntiHBc IgM, HBeAg ve Anti HBe oranları

		Pozitif		Negatif	
		n	(%)*	n	(%)*
Anti-HbcIgM (n=33)		-	-	33	(100)
HbeAg (n=33)		-	-	33	(100)
Anti-Hbe (n=33)		7	(21)	26	(79)

*sattır yüzdesi

Çizelge 10. Anti-HBc'si pozitif serumlarda araştırılan serolojik göstergelerin birlikte bulunma durumu

Serolojik göstergeler	Toplam	
	n	(%)*
Anti-HBc (+) / AntiHBs (+) (n=209)	176	(17.8)
Anti-HBc(+) / AntiHBe (+) (n=33)	7	(0.7)
İzole Anti-HBc (+) (n=987)	26	(2.6)

*satur yüzdesi

4.5 İzole Anti-HBc Pozitifliği

Toplam 987 serumun 209'unda anti-HBc (total) pozitif bulundu. Anti-HBc pozitif bulunan serumların 33'ünde anti-HBs'nin negatif olduğu saptandı. Bu serumların da 26'sının anti-HBc IgM, HBeAg ve anti-HBe yönünden negatif olduğu belirlendi. Böylece toplam 987 serumun 26'sının (% 2.6) izole anti-HBc profili taşıdığı bulundu.

Yaş grupları içerisinde izole anti-HBc pozitifliğinin dağılımına bakıldığında; 18-29 yaş grubundaki 433 kişinin 4'ünde (% 15.3), 30-39 yaş grubundaki 327 kişinin 9'unda (%34.6), 40-49 yaş grubundaki 188 kişinin 12'sinde (% 46.2), 50⁺ yaş grubundaki 39 kişinin 1'inde (%3.8) izole anti-HBc pozitifliği vardı. Yaş grupları arasında izole anti-HBc oranlarının dağılımı istatistiksel olarak karşılaştırıldığında aradaki farkın önemli olduğu bulundu ($X^2=11.23$ $p<0.05$) (Çizelge 11).

Çizelge 11. İzole-Anti-HBc pozitifliğinin yaş gruplarına göre dağılımı

Yaş Grupları	İzole Anti-HBc Pozitifliği	(%)*
18 – 29 (n=433)	4	(15.3)
30 – 39 (n=327)	9	(34.6)
40 – 49 (n=188)	12	(46.2)
50 ⁺ (n=39)	1	(3.8)
Toplam (n=987)	26	(2.6)

* satur yüzdesi

4.6 İzole Anti-HBc'li serumlarda HBV DNA'nın Saptanması

İzole Anti-HBc pozitifliği saptanan 26 serumun 1'inde (%3.8), toplam donörlerin yani 987 donörün 1'inde (%0.1) HBV DNA saptandı. HBV DNA'nın miktarı 61 copies/ml veya 8.7 IU/mL olarak bulundu. (Çizelge 12).

Çizelge 12 Kan donörlerinde ve İzole anti-HBc pozitifliğinde HBV DNA'nın bulunma durumu

	HBV DNA Pozitif		HBV DNA Negatif	
	n	(%)*	n	(%)*
İzole Anti-HBc Pozitif (n= 26)	1	(3.8)	25	(11.9)
Toplam Kan Donörü (n=987)	1	(0.1)	25	(2.5)

*satur yüzdesi

5. TARTIŞMA

Kan nakli modern tıpta yaşamsal öneme sahip bir işlemdir. Fakat bu yolla çok sayıda infeksiyon etkeninin bulaşma riski vardır. Bu nedenle kan ürünlerinin güvenliği transfüzyon tıbbında önemlidir. Geniş popülasyonlardan toplanan kan ürünlerinden patojenlerin bulaşma riski kaçınılmazdır. Günümüzde; gelişmiş ülkelerde, genel olarak transfüzyonla bulaşan viral infeksiyon riski oldukça azalmıştır. Kan bağışçısı seçme kriterlerinin uygulanması, kan bağışçısı tarama testlerindeki gelişmeler; antijen, antikor ve viral genom tespitine yönelik duyarlı ve gelişmiş yöntemlerin kullanılması ile bu ülkelerdeki transfüzyonla bulaşan infeksiyon riski azaltılmıştır. Ancak ülkemiz gibi gelişmekte olan ülkelerde halen transfüzyonla bulaşan infeksiyon riski yüksektir.

HBV infeksiyonunun değişik dönemlerinde (akut, sağlıklı taşıyıcı, kronik aktif hepatit) ve virüsün mutasyona uğraması nedeniyle değişik serolojik tanı kalıpları vardır. Bazen olağan dışı serolojik profillere de rastlanmaktadır. HBsAg negatif anti-HBc pozitif kişilerden yapılan kan nakli sonunda HBV infeksiyonunun geliştiği gösterilmiştir (5,6). Bütün serolojik göstergeleri negatif kişilerin serum ve karaciğerlerinde HBV DNA saptanmıştır. Bunun nedenleri arasında, akut HBV infeksiyonunun geçmesinden sonra virüsün yok edilemeyebildiği ve çok düşük düzeylerde tutulduğu, HBsAg mutantlarıyla infeksiyonun bulunduğu, tarama yöntemleriyle saptanamayacak düşük düzeyde HBsAg'in varlığı ve immun kompleks oluşumu sayılabilir. HBsAg'si negatif hastalardan böbrek naklinden sonra, immunsupresyon veya kanser kemoterapisi alanlarda yapılan testlerde HBsAg pozitifliği saptanmıştır (6,20). Bu gözlemlerden sonra son yıllarda gizli HBV infeksiyonundan söz edilmeye başlanmıştır. Gizli hepatit olgularının %20'sinde HBV DNA dışındaki tüm hepatit göstergeleri negatiftir (95). Gizli HBV infeksiyonunun tanı göstergeleri HBsAg-, anti-HBs-/+, anti-HBc total-/+, HBeAg-/+, antiHBe-/+, HBV DNA + ($<10^4$ kopya) şeklinde de olabilir. Gizli HBV infeksiyonunun nedenleri arasında virüsün mutasyona uğramış olması, virüs DNA'sının konak genomuna integrasyonu, immun komplekslerin oluşması, konağın bağışık yanıtı, koinfeksiyon bulunur. Gizli HBV infeksiyonlu kişilerin genellikle anti-HBc ve/veya anti-HBs göstergeleri negatif veya az bir kısmında pozitifdir. Kan ve organ nakillerinde gizli HBV infeksiyonlu kişiler bulaştırıcılık açısından risk oluşturmaktadırlar (3). Çünkü, HBsAg'nin saptanamayacak kadar düşük düzeyde olduğu anti-HBc'nin pozitif olduğu serumlarda HBV DNA'sı bulunabilmektedir (4).

Kan transfüzyonu ve organ tranplantasyonlarının artması ile genel toplumdaki gizli hepatit B infeksiyonunun prevalansının belirlenmesi son derece önemli hale gelmiştir. Donör kanlarının HBsAg yönünden taranması HBV infeksiyon bulaşını önemli derecede önlemesine karşın, yine de HBV transfüzyon sonrası gelişen hepatitlerin önemli nedenlerinden biri olmaya devam etmektedir. Yapılan çalışmalar HBsAg'ni negatif, ancak HBV DNA ve anti-HBc pozitif kişilerin HBV bulaşmasında önemli olduğunu göstermektedir (96). Bu tür bulaşı önlemek için kanlarda nükleik asit saptama yöntemlerinin uygulandığı ülkeler bulunmaktadır. Kan bankaları için havuzlanmış plazma örneklerinde çalışmaya uygun ticari kitler vardır. Bir çalışmada transaminazları normal HBsAg'leri negatif donörlerin % 4'ünde, başka bir çalışmada ise, %11'inde HBV DNA saptanmıştır (97,98).

HBsAg'ni negatif olan ve HBV içerebilen kan donörlerini belirleyebilmek için bazı ülkelerde anti-HBc testi yapılmaktadır. Bu yolun gizli infeksiyonları saptamak için yararlı olduğu bildirilmiştir (99). Bu nedenle kan güvenliğini sağlamak için HBsAg testlerinin yanı sıra anti-HBc antikor testinin de uygulanması önemli hale gelmiştir. Ülkemizde kan donörlerinde anti-HBc'nin rutin olarak taranması zorunlu değildir.

Anti-HBc, HBV infeksiyonu ile karşılaşıldığının bir göstergesidir. Akut, kronik veya iyileşmiş infeksiyonun belirteci olarak kullanılmaktadır. Gizli hepatit infeksiyonu olan kişilerde anti HBc pozitifliğinin anti-HBc negatifliğine göre daha sık bulunduğu bildirilmiştir (100,101).

Yurdumuzda sağlıklı kişilerde ve kan donörlerinde anti-HBc total pozitifliğini araştıran bir çok çalışma bulunmaktadır. Bal ve arkadaşları, HBsAg'ni negatif 9282 kan bağışçısında anti-HBc pozitifliğini %18 olarak saptamışlardır (102).

Durupınar ve arkadaşlarının kan vericilerde anti-HBc seropozitifliğini araştırdıkları çalışmada, HBsAg'ni negatif olan 152 kan verici, anti-HBc yönünden taranmış, 41'inde (% 41) anti-HBc pozitif ve anti-HBc'si pozitif vericilerin 29'unda (%70.7) anti-HBs bulunmuştur (103).

İzmir'de yapılan bir çalışmada HBsAg'ni negatif 152 kan vericisinde anti-HBc araştırılmıştır. 152 kişinin 58'inde (% 38) anti-HBc pozitif bulunmuştur. Anti-HBc'si olumlu 18 bireyde (% 31) anti-HBs saptanmıştır (104).

Ülkemizde sağlıklı kişilerde yapılan çalışmalarda anti-HBc pozitiflik oranının %26.3-44.7 arasında olduğu ve oranların, bölgeden bölgeye değiştiği bildirilmektedir. (105). Ayrıca anti-HBc prevalansının bazı yerlerde % 51.8'e kadar yükseldiği saptanmıştır. (106). Çalışmamızda bu oran %21.1 bulunmuş, yurdumuzdaki

çalışmalarla ve Dünya Sağlık Örgütü'nün yurdumuz için belirlediği orta endemik bölge kriterlerine uymaktadır. HBsAg ve anti-HBc testlerinin birlikte çalışılması transfüzyon ile HBV geçişini büyük ölçüde engelleyecektir. Ancak böyle uygulamalar HBV prevalansının düşük olduğu (< %3) gelişmiş ülkeler için uygun görülmektedir. Fakat bu uygulama, HBV infeksiyonunun endemik olduğu bölgelerde ve seropozitifliğin yüksek olduğu gelişmiş ülkelerde, bağışçıların çoğunun reddedilmesine neden olacağı şeklinde görüş bulunmaktadır (107).

Dizer ve arkadaşları tarafından immünizasyon amacıyla hastane personeli ve sağlıklı kişilerde HBV'üyle karşılaşma durumunun araştırıldığı bir çalışmada, anti-HBc total yönünden taranan 1729 kişinin pozitiflik oranları yaş gruplarına göre değerlendirilmiş; Anti-HBc pozitifliği, 11 yaş grubunda % 1.75, 12 yaş grubunda %3.28, 17 yaş grubunda %10.76, 18 yaş grubunda %12.42, 20 yaş grubunda %22.58, 25-40 yaş grubunda ise %25.33 olarak belirlenmiştir. (108).

Çalışmamızda anti-HBc pozitiflik oranlarının yaş gruplarına ve cinsiyete göre dağılımı değerlendirildiğinde, 18-29 yaş grubunda % 9.2, 30-39 yaş grubunda % 22.9, 40-49 yaş grubunda % 36.1, 50⁺ yaş grubunda % 66.6 olduğu bulunmuştur. Yaş grupları arasında anti-HBc pozitiflik oranlarının dağılımı istatistiksel olarak karşılaştırıldığında farkın önemli olduğu (p<0.05), cinsiyetler arasında ise, farkın önemli olmadığı (p>0.05) saptanmıştır. Anti-HBc pozitiflik oranının 50⁺ yaş grubunda en yüksek olduğu görülmüştür. Bu sonuca göre yaş arttıkça HBV ile karşılaşma oranının artmış olduğu söylenebilir.

HBsAg'ni negatif, anti-HBc'si pozitif kişilerde HBV'nün varlığını araştıran çalışmalar yapılmıştır. Hoofnagle ve arkadaşları bu serolojik göstergeleri taşıyan bireylerde HBV DNA saptamış ve HBV infeksiyonu bulaştırma riskine dikkat çekmişlerdir (107).

Başka bir çalışmada, anti-HBs ve anti-HBc pozitifliğinin birlikte olan kişilere ait kan ürünlerinin bulaş riski taşımadığı gösterilmiştir (109). Kan ürünü ve bağışçı kayıplarını azaltmak için anti-HBc'ni pozitif bulunan serumlarda anti-HBs'nin çalışılarak, pozitif bulunan kişilerin donör olarak kabul edilebileceği öne sürülmüştür (110). Ancak, anti-HBs pozitif kanlarda HBV'nün bulaştığının saptanmasıyla, bazı ülkelerde anti-HBs'nin kantitatif değerini belirlemeye yönelinmiştir (110, 111). Bu ülkelerdeki gibi, anti-HBs düzeyi belirli bir titrenin üzerinde bulunan kan ürünlerini hastaya nakledip, düşük titrelerde olanları imha etmek, ürün, bağışçı ve ekonomik kayıpları azaltsa da yeterli olmamaktadır. Tüm bunların yanında, ek testlerin yaratacağı

personel sıkıntısı da sonuç alma süresini uzatacak ve dolayısıyla torbalanan kanın kullanıma girmesi gecikecektir.

Anti-HBs antikorunun varlığı, HBV enfeksiyonunun geçirildiğinin veya aşılama sonucu bağışıklığın oluştuğunun bir göstergesidir. Ülkemizde ve dünyada toplumdaki anti-HBs oranlarının belirlendiği çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Yılmaz ve arkadaşları acil servise başvuran yaşları 7-90 arasında değişen 447'si (%38) kadın, 727'si (% 62) erkek olmak üzere toplam 1174 hastanın anti-HBs antikor varlığını araştırdıkları çalışmada, anti-HBs pozitifliğinin bulunma oranlarını cinsiyetler arasında karşılaştırdıklarında farkın önemsiz olduğu bulmuşlardır ($p>0.05$). Yaş grupları incelendiğinde ise, <20 yaş grubunda anti-HBs oranının %16.1 olduğu ve diğer yaş gruplarıyla kıyaslandığında bu değer anlamlı olarak düşük olduğunu belirtmişlerdir (112).

Çalışmamızda 209 donörün 176'sında (%17.8) anti-HBc ve anti-HBs pozitifliği saptanmıştır. Toplam 176 serumun 54'ünde (%25.8) $\geq 10 - < 100$ IU/mL (zayıf bağışık), 122'sinde ≥ 100 IU/mL (kuvvetli bağışık) düzeyinde anti-HBs antikor bulunmuştur. Bu sonuca göre 176 bireyin HBV enfeksiyonu geçirmiş olduğu anlaşılmıştır. Anti-HBs erkeklerin 167'sinde (%79.9), kadınların 9'unda (% 4.3) pozitif bulunmuştur. Anti-HBs bulunma oranlarının cinsiyete ve yaş gruplarına göre dağılımı istatistiki olarak değerlendirildiğinde farkın önemsiz olduğu saptandı ($p>0.05$). Erkek ve kadın donörlerin anti-HBs pozitifliklerinin yaş grupları içerisinde dağılımları istatistiksel olarak karşılaştırıldığında farkın önemsiz olduğu bulundu ($p>0.05$). Yurdumuzda anti-HBc pozitif kan donörlerinde anti-HBs antikor titrelerinin değerlendirildiği bir çalışmaya rastlayamadığımız için sonuçlarımızın karşılaştırılması yapılamamıştır. Fakat ülkemizdeki anti-HBs prevalansının % 50.0'ye kadar yükseldiği bildirilmektedir (113).

Çalışmamızda anti-HBc'si pozitif 209 serumun 33'ünde Anti-HBs negatif, 33 serumun 7'sinde anti-HBe pozitif, tümünde anti-HBcIgM, HBeAg negatif olarak saptandı. Buna göre 7 bireyin serumlarında anti-HBc ve anti-HBe'nin birlikte bulunduğu ve HBV enfeksiyonunu yeni geçirmiş olduğu anti-HBs antikorlarının saptanamayacak düzeyde veya oluşma döneminde olduğu şeklinde yorumlandı. Çalışmamız izole anti-HBc profili gösteren bireylerde HBV'nü araştırmaya yönelik olduğu için bu bireylerde HBV DNA'sına bakılmadı.

HBV enfeksiyonunun 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 (114, 115).

HBV enfeksiyonunun olağan dışı serolojik göstergelerinden biri izole anti-HBc pozitifliği. HBcAg'ne karşı oluşan antikor yani anti-HBc enfeksiyon sırasında oluşur ve uzun süre kanda kalır (7). İzole anti-HBc pozitifliği bulunan kişilerin serumlarında sadece anti-HBc saptanmaktadır ve bu profil HBV'ne yönelik taramalarının yaygınlaşmasıyla dikkat çekmiştir. Bu durumun nedenlerinin başında yalancı pozitiflik, gelmektedir. Diğer bir neden HBsAg'nin saptanamayacak düzeyde olduğu taşıyıcılık durumudur. Bu olgularda mutasyona uğrayan virüsler bulunmaktadır. Ayrıca, diyabet, böbrek yetmezliği ve HIV enfeksiyonu gibi bazı hastalıklarda anti-HBs yanıtının gelişmediği görülmüştür. Bazı olgularda anti-HBs kaybolup, anti-HBc saptanmaktadır. İzole anti-HBc akut hepatit B'nin doğal seyrindeki pencere döneminden de kaynaklanabilir. HBcAg dışındaki antijenlere konağın yanıt vermemesi, pasif transfer, kan nakli ve transplental geçiş izole anti-HBc pozitifliğinin nedenleri arasındadır (3).

İzole anti-HBc sıklığı çeşitli çalışmalarda %20'ye varan oranlarda bildirilmiştir. İzole anti-HBc'nin prevalansı Avrupa ve Kuzey Amerika'da oldukça düşüktür. İngiltere'de %0.07, Almanya'da %1.5 olarak bildirilmiştir. HBV enfeksiyonunun fazla görüldüğü Yunanistan'da %1.9, Çin'de %2.7 ve Gana'da %12.7'ye kadar çıkmıştır (107).

İstanbul'da değişik yaş gruplarını içeren bir çalışmada izole anti-HBc oranı % 4.64 olarak bulunmuştur (116). Özacar ve arkadaşlarının hepatit B serolojisinde salt anti-HBc olumluluğu ve HBV aşısına yanıt konulu çalışmalarında izole anti-HBc oranını % 3.23 olarak saptamışlardır. (117). Şimdiye kadar Sivas ilinde bu oranı bildiren bir çalışma yapılmamıştır. Çalışmamızda 987 donörün 26'sında (% 2.6) izole anti-HBc pozitifliği saptanmıştır.

Çalışmamızda izole anti-HBc profilinin yaş gruplarındaki durumu incelendiğinde; Bu profilin, 18-29 yaş grubundaki 433 kişinin 4'ünde (% 15.3)', 30-39 yaş grubundaki 327 kişinin 9'unda (%34.6)', 40-49 yaş grubundaki 188 kişinin 12'sinde (% 46.2), 50+ yaş grubunda 39 kişinin birinde (%3.8)'inde bulunduğu görüldü. İzole anti-HBc pozitiflik oranlarının yaş grupları arasındaki dağılımı istatistiksel olarak karşılaştırıldığında aradaki farkın önemli olduğu bulunmuş ($p < 0.05$) ve bu oranın en fazla 40-49 yaş aralığında olduğu görülmüştür.

İzole anti-HBc profili taşıyan bireylerde HBV DNA bulunma durumu bulaştırıcılık açısından önemlidir. Yapılan çalışmalar HBsAg'ni negatif, HBV-DNA ve anti-HBc'si pozitif kişilerin HBV'nün bulaşmasında önemli olduğunu göstermektedir (96).

Theris ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, seronegatif üç olguda PCR ile HBV-DNA saptanmış ve bu örneklerle şempanzeler infekte edilerek, seronegatif kişilerin de HBV yönünden bulaştırıcı olabilecekleri gösterilmiştir (118).

Zerki ve arkadaşları 5043 donörün % 21.47'sinde izole anti-HBc profili saptamış, anti-HBc'si pozitif serumların % 1.25'inde ise HBV-DNA bulmuşlardır (119).

Başka bir çalışmada HBsAg'ni ve anti-HBs'si negatif, anti-HBc total'i pozitif hastaların % 8.2'sinin karaciğer iğne biyopsilerinde HBV DNA pozitif bulunmuş ve anti-HBc pozitifliğinin karaciğer transplantasyonu reddinin sebebi olması gerektiği bildirilmiştir. (120).

Hui ve arkadaşlarının kök hücre vericileri üzerinde yaptığı bir çalışmada ise, HBsAg'ni negatif olan katılımcıların %75,8'inde anti HBc'si pozitif olmasına rağmen sadece %17'sinde PCR ile gösterilebilen gizli hepatit B infeksiyonunun olduğu bulunmuştur (121). Silva ve arkadaşlarının Brezilya'da, anti-HBc'si pozitif kan vericilerinde yaptığı bir çalışmada, gizli hepatit B infeksiyonunun prevalansı % 3.3 bulunmuştur (122). Bu oran Brezilya gibi HBV prevalansının düşük olduğu Almanya, ABD ve Venezuela gibi ülkelerde bildirilen oranlara yakındır (%0-7.7). Bu çalışmada HBV DNA pozitifliği ile anti HBs pozitifliği arasındaki ilişki incelenmiş, anti HBs'si bulunan 86 bireyin 3'ünde ve antikoru bulunmayan 64 bireyin 2'sinde HBV DNA pozitif bulunmuştur.

El-Zaatari ve arkadaşlarının Lübnan'da yaptıkları bir çalışmada, üç büyük hastaneden toplanan 5511 donör kanı anti-HBc ve HBV DNA yönünden incelemeye alınmış ve 5511 donörün 203'ünde (%3.7) anti-HBc pozitif bulunmuştur. 203 pozitif anti HBc'si bulunan 203 serumda real-time PCR yöntemiyle HBV DNA çalışılmış ve 11'inde (%5.4) HBV DNA pozitif bulunmuştur. HBV DNA düzeyleri 400 copies/ml'nin altında saptanmıştır (123).

Mısır'da yapılan bir başka çalışmada ise, kan donörü olarak kabul edilen 712 kişinin 78'inde (%10.96) anti-HBc pozitif, bunların 9'unda (%11.54) HBV DNA pozitif bulunmuştur (124).

Wang ve arkadaşlarının transaminazları normal HBsAg'si negatif kan donörlerinin %4'ünde, Pao ve arkadaşları ise, %11'inde HBV DNA'nın pozitif olduğunu bildirmişlerdir (125,126).

Yurdumuzda Altındış ve arkadaşları tarafından yapılan "Kantitatif anti-HBc ölçümü ile HBV-DNA varlığının araştırılması" adlı çalışmada HBsAg negatif 232 bireyin 22'sinde (% 9.5) anti-HBc pozitif bulunmuş, anti-HBc pozitif serumların tamamında HBeAg ve anti-HBcIgM negatif, 3'ünde (% 13.6) anti-HBeAg, 17'sinde (%77.3) ise anti-HBs pozitif saptanmıştır. Anti-HBc pozitif 22 serumdan 15'inde (%68.2) düşük, 7'sinde (% 31.8) yüksek düzeyde pozitiflik bulunmuş, düşük düzeyli antikor bulunan serumların hiçbirinde HBV-DNA saptanmazken, yüksek düzeyli anti-HBc pozitif serumların birinde HBV-DNA pozitif bulunmuştur HBsAg negatif olgularda, HBV DNA'nın saptanmış olmasının özellikle kan donörlerinde izole anti-HBc pozitifliğinin araştırılması gerekliliği belirtmişlerdir (127).

Güney ve arkadaşları 'Kan vericilerin serumlarında saptanan HBsAg negatifliğinin doğrulanması' çalışmalarında, 198 sağlıklı erkek vericiden alınan HBsAg'leri negatif olan kanlarda farklı bir ELISA kitiyle HBsAg, anti-HBc ve PCR ile HBV DNA araştırmışlar, serumların tümünde HBsAg negatif, 20'sinde (%10) anti-HBc pozitif saptamışlardır. Anti-HBc antikorlu bulunan serumların birinde HBV-DNA bulunmuştur.

Pekbay ve arkadaşlarının çalışmasında da HBsAg negatif 57 hastanın 1 (%1.75)'inde HBV-DNA pozitif bulunmuştur (128).

Bal ve arkadaşları 'İzole anti-HBc pozitif olgularda HBV DNA varlığının araştırılması ve bu olguların kan bankacılığı açısından önemi' adlı çalışmalarında, HBsAg negatif 9282 serumda HBsAg, anti-HBc ve anti-HBs testleri ELISA yöntemiyle, HBV DNA testi ise real-time PCR yöntemiyle araştırılmış, HBsAg negatif donörlerin %18 (1679/9282)'i anti-HBc pozitif saptanmıştır. Bunların 1504 tanesinde anti-HBs çalışılmış ve 225 (%15)'i negatif olarak bulmuştur. İzole anti-HBc pozitif 225 serumun 218'inde HBV DNA araştırılmış ve 1 (%0.45)'inde pozitiflik saptanmıştır (102).

Çalışmamızda 987 kan donörününün 26'sında izole anti-HBc profili saptanmış ve bunların birinde (% 3.8), kan donörlerinin ise % 0.1'inde HBV DNA pozitifliği bulunarak bu bireyin gizli hepatit B'nin göstergelerini taşıdığı belirlenmiştir. Saptanan HBV DNA düzeyinin 61 copies/ml veya 8.7 IU/ml olduğu hesaplanmıştır. Yapılan çalışmalarda gizli hepatit B enfeksiyonlu olgularda HBV DNA düzeylerinin düşük

(<1000 copies/ml) olduğu bildirilmektedir (129,130,131). Çalışmamızdaki HBV DNA düzeyinin de düşük olduğu, bu durumun diğer çalışmalarla uyumlu olduğu görülmüştür. İncelenen izole HBc profili taşıyan diğer bireylerde HBV DNA bulunmaması bireylerdeki bağışıklık durumuna veya yapılan teste bağlı olabilir.

Sonuç olarak, izole anti-HBc profili taşıyan kan donörlerinin HBV'n bulaştırma riski taşıyabildikleri, HBsAg tarama testlerinin transfüzyonla ilişkili HBV enfeksiyonlarını tamamen önleyemeyeceği, HBsAg'nin yanısıra anti-HBc total antikor testlerinin de uygulanmasının transfüzyon sonrası hepatit B gelişme riskini aza indireceği, bunun yanı sıra ülkemizin hepatit B açısından orta endemik bölgede bulunması nedeniyle, donör kaybının da olacağı göz önünde tutularak, ülkemizdeki kan bankacılığı yönünden donör kanlarında anti-HBc taramasının değerlendirilmesinin uygun olacağı görüşüne varılmıştır.

6. SONUÇLAR

1. Sivas il sınırları içerisinde yaşayan ve gönüllü olarak kan merkezlerine başvuran 987 donörün 209'unda (%21.1) anti-HBc pozitif bulundu. Anti-HBc pozitiflik oranları yaş grupları arasında istatistiksel olarak karşılaştırıldığında aradaki farkın önemli olduğu ($p<0.05$), cinsiyetler arasında ise, farkın önemsiz olduğu bulundu ($p>0,05$).
2. Anti-HBc pozitif serumların tamamında anti-HBs çalışıldı ve 33'ünde (%15.7) anti-HBs negatif bulundu. Bireylerin Anti-HBs sonuçları kantitatif olarak değerlendirildiğinde 54'ünün (%25.8) zayıf bağışık, 122'sinin (%12.3) kuvvetli bağışık olduğu saptandı. Anti-HBs oranlarının yaş grupları ve cinsiyetler arasındaki dağılımları istatistiksel olarak karşılaştırıldığında farkın önemsiz olduğu bulundu ($p>0.05$).
3. Anti-HBs'si negatif serumların tamamında HBeAg ve anti-HBcIgM negatif, 7'sinde (%21) anti-HBe pozitif saptandı.
4. Toplam 987 kan donörününün 26'sınının (% 2.6) izole anti-HBc profili taşıdığı saptandı.
5. Kan donörlerinin birinde (% 0.1) HBV DNA (61 copies/ml veya 8.7 IU/ml) bulundu.

KAYNAKLAR

1. Yuen MF, Lai CL: Treatment of chronic hepatitis B. *Lancet Infect Dis* 1: 232-241, 2001
2. Akyüz F, Beşışık F. Okült HBV İnfeksiyonu. Çakaloğlu , Ökten A(eds). HepatitB, (Ulusal uzlaşma toplantı metinleri), İstanbul Medikal Yayıncılık, 2003: 77-89.
3. Öztürk R. Viral hepatitlerde olağan dışı serolojik ve moleküler tanı göstergesi kalıpları. Tabak F, Balık İ, Tekeli E. Viral hepatit 2005, Viral hepatitle Savaşım Derneği, İstanbul; 2005: 152-158.
4. Mert A, Şentürk H, Süve İ ve ark: HBsAg ve Anti-HBs negatif, Anti-HBc pozitif olguların çeşitli yönlerden incelenmesi *Viral Hep. Derg.* 1996, 2: 93-95.
5. Grob P, Jilg W, Bornhak H, Gerken G, Gerlich W, Gunther S, Hess G, Huding H, Kitchen A, Margolis H, Michel G, Trepo C, Will H, Zanetti A, Mushahwar L. Serological pattern "anti HBc alone" report on a workshop. *J Med Virol* 2000; 62: 450-55.
6. Wright TL, Terrault NA, Ganem D. Hepatitis B Virüs, in "Richman DD, Whitley RJ, Hayden Fg (eds), *Clinical Virology* "Churchill Livingstone, Inc, 1997.
7. Mcintyre A, Tinniswood RD, Nimmo GR, Kerlin P, Wood GM: Isolated hepatitis B core antibody-can response to hepatitis B vaccine help elucidate the cause. *Aust NZ Med*, 1992, 22:19-22
8. Bhatti FA, Ullah Z, Salamat N, Ayub M, Ghani E. Anti-hepatitis B core antigen testing, viral markers and occult hepatitis B virus infection in Pakistani blood donors: implications for transfusion practice. *Transfusion.* 47: 74-79,2007.
9. Hennig H, Puchtal, Luhn J, Schlenhe P, Goerg S, Kirchner H. Frequency and load of hepatitis B virus in first-time blood donors with antibodies to hepatitis B core antigen. *Blood donors with antibodies to hepatitis B core antigen. Blood* 100, (7): 2637-2641, 2002.
10. Gerlich WH, Wagner FF, Chudy M and . HBsAg Non Reactive HBV infection in blood donors: Transmission and pathogenicity *Journal of Medical Virology* 79: S32-S36, 2007.
11. Krugman S, Giles JP, Hammond J. Infectious hepatitis: evidence for two distinctive clinical, epidemiological and immunological types of infection. *JAMA* 1967:200:365.

12. Dündar İ, İnal S, Tabak F (eds).; Geçmişten Günümüze Viral Hepatitler, Viral Hepatit 2005: 10-20.
13. Purcell RH. The discovery of the hepatitis viruses. Gastroenterology 1993; 104: 955-63.
14. Yenen OŞ: Viral Hepatitler. Topçu AW, Söyleitr G, Doğanay M (eds) İnfeksiyon Hastalıkları. İstanbul, Nobel Kitabevleri Ltd. Şti. 1996: 641-700.
15. Testut P, Renard CA, Terradillos O, et al. A new Hepadnavirus endemic in arctic ground squirrels in Alaska. J Virol 1996; 70: 4210-9.
16. Akan E: Viral hepatitler. Genel ve Özel Viroloji. 3. Baskı, İzmir, Saray Kitabevleri 1994; 502-49.
17. Ganem D: Hepadnaviridae and their replication. Fields BN, Knipe Dm, Howley Pm (eds). Fields Virology 3 rd ed. Lippincott, Raven Press, 1997, 2703-37.
18. Robinson WS: Hepadnaviridae and their replication. Fields BN, Knipe DM (eds) Fundamental Virology. 2 nd ed. New York, Raven Pres Ltd, 1991: 989-1021.
19. Lee WM: Hepatitis B virus infection. N Engl J Med 1997; 337: 1733-45.
20. Badur S. Hepatit B virüsü (HBV) moleküler viroloji ve serolojik tanı. Kılıçturgay K,(ed) Viral Hepatitle Savaşım Derneği, İstanbul; 1994: 65-90.
21. Lemon SM, Thomas DL. Vacciens to prevent viral hepatitis. N Engl J Med 1997; 348: 1417-9.
22. Arauz-Ruiz P, Norder H, Visona KA, Magnus LO. Molecular epidemiology of hepatitis B virus in Central America reflected in the genetic variability of the small gene. JID 1997: 176:851-8.
23. Köse Ş. Viral Hepatitlerde İmmünglobulinler ve derideki histopatolojik değişimler. Anadolu Üniversitesi Tıp Fakültesi İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Bakteriyoloji ABD. Uzmanlık tezi Eskişehir 1991.
24. Kılıçturgay K. Hepatit B virusunda (HBV) mutasyon ve getirdiği sorunlar. Viral Hepatit Derg. 1995; 1:1-7.
25. Slonczewski J. What is HBV. Biology 238: Microbiology, May 2003. biology.kenyon.edu/slonc/bio38/scuderi/parti.html.
26. Felek S. KC ve safra yolları sistemik infeksiyon hastalıkları. Nobel Tıp Kitabevleri 2000: 200-202.
27. Ertekin V. Erzurum merkez 16-17 yaş grubu çocuklarda Hepatit B seroprevalansı, risk faktörleri ve aile taraması. Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları A:B:D: Uzmanlık tezi Erzurum 2001.

28. Acar F. Erzurum ve çevresinde Hepatit B seroprevalansının araştırılması. Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Bakteriyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları A.B.D. Uzmanlık tezi 2002.
29. Seeger C, Mason WS. Hepatitis B virus biology. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2000. 64: 51- 68.
30. Oketani M, Oketani K, Xiaohong C, Arima T. Low level wild-type and pre-core mutant Hepatitis B viruses and HBeAg negative reactivation of chronic Hepatitis B. *J Med Virol* 1999; 58: 332-7.
31. Ngui SL, Watkins RP, Heptonstall J, Teo JG. Selective transmission of Hepatitis B virus after percutaneous exposure. *J Infect Dis* 2000; 181: 838-43.
32. thorgeirsson SS. Hepatic stem cells in the liver regenerations. *FA-SEB J* 1996 ;641-700.
33. Lunn ER, Hoggarth BJ, Cook WJ. Prolonged Hepatitis b surface antigenemia after vaccination. *Pediatrics* 2000; 105: E81.
34. Rosenberg W. Mechanism of immune escape in viral hepatitis. *Gut* 1999; 44: 759-64.
35. Bachmann MF, McKall Faienza K, Schmits R, et al. Distinct role for LFA-1 and CD 28 during activation of native T cells: adhesion versus costimulation. *Immunity* 1997; 7: 549-57.
36. 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 in progressive remission. *J Infect Dis* 1997; 175: 1093-100.
37. Başustaoğlu A, Kubar A, Yıldırım ŞT, Tanyüksel M. (Ed.). *Klinik Mikrobiyoloji* 9. Baskı Cilt-2. 2009; 110: 1644-1646.
38. Sherlock S, Dooley J: *Virus Hepatitis, Diseases of the Liver and Biliary System*, 10.th Edition, London, The Blackwellscience, 1997: 265-302.
39. Hu K. Occult hepatitis B virus infection and its clinical implications. *Journal of Viral Hepatitis* 2002; 9: 243-257.
40. Chaudhuri V, Tayal R, Nayak B, Acharya SK, Panda SK. Occult hepatitis b virus infection in chronic liver disease full-length genome and analysis of mutant surface promoter. *Gastroenterology* 2004;127:1356-1371.
41. Dickson RC, Everhart JE, Lake JR, Wei Y, Seaberg EC, Wiesner RH, et al. Transmission of hepatitis B by transplantation of livers from donors positive for antibody to hepatitis B core antigen. *Gastroenterology* 1997;113:1668-1674.

42. Kleinman SH, Busch MP: HBV: amplified and back in the blood safety spotlight. *Transfusion* 2001;41:1081-1085.
43. Hennig H, Puchta I, Luhm J, Schlenke P, Goerg S, Kirchner H: Frequency and load of hepatitis B virus DNA in first-time blood donors with antibodies to hepatitis B core antigen. *Blood* 2002; 100:2637-2641.
44. Carman WF. The clinical significance of surface antigen variants of hepatitis B virus. *J Viral Hepatol* 1997; 4 (suppl.1): 11-20.
45. Yotsuyanagi H, Yasuda K, Lino S, et al. Persistent viremia after recovery from selflimited acute hepatitis B. *Hepatology* 1998; 27: 1377-1382.
46. Liaw Y-F. Role of hepatitis C virus in dual and triple hepatitis virus infection. *Hepatology* 1995; 22: 1101-1108.
47. 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.
48. 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.
49. 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.
50. Ökten A. B Tipi Viral Hepatit (Klinik Gidişi ve Sağaltım). In: Kılıçturgay, K. (Eds) *Viral Hepatit'94*. İstanbul: Viral Hepatit Savaşım Derneği. 1994:107-19.
51. Kurt H. Klinik bulgular. In: Kılıçturgay K, Badur S (eds). *Viral hepatit 2001*. Birinci baskı, İstanbul: Viral hepatitle Savaşım Derneği; 2001: 129-34.
52. Ustaçelebi Ş: Genel Viroloji 1. Baskı, Hacettepe Taş Kitapçılık, 1992.
53. Kroes AC: Role of testing for antibody to hepatitis B core antigen to prevent transmission of hepatitis B virus in organ and tissue transplantation. *Transplant Proc.* 1996; 28: 937-938.
54. Unger Er, Piper MA, Moleküler Diagnostics: Basic Principles and Techniques. In: Henry JB, Davey FR, Nakomura RM, Pincus MR, Woods GL, (eds). *Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods*. Nineteenth edition, Philadelphia, London, Toronto, Montreal, Sydney, tokyo: W.B. Saunders Company, 1996: 1338-53
55. Kayrın L, Aksoy K, Tuli A, Çürük MA, Attila G. Tamda DNA teknikleri. Adana: 6. Biyokimya Yaz Okulu, 2003.

56. Aksoy K, Kayrın I, Tuli A. Tanıda Moleküler Genetik Yöntemleri. Adana: 9. Biyokimya Yaz Okulu, 2006.
57. Morris T, Robertson B, Gallagher M. Rapid reverse transcription-PCR detection of hepatitis C virus RNA in serum by using the Taqman fluorogenic detection system. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 293-6.
58. Persing DH. In vitro Nucleic Acid Amplification Techniques. In: Persing DH, Smith TF, Turnover FC, White TJ (eds). *Diagnostic Molecular Microbiology Principles and Applications*. Washington, D:C: American Society for Microbiology, 1993:51-87.
59. Filippini P, Coppola N, Pisapia R, Scolastico C, Marrocco C, Zaccariello A, et al. Impact of occult hepatitis B virus infection in HIV patients naive for antiretroviral therapy. *AIDS* 2006;20:1253-1260.
60. Allain JP. Occult hepatitis B virus infection: implications in transfusion. *Vox sanguinis* 2004;86:83-91.
61. Terrault NA, Wright TL: *Viral Hepatitis A Through G*, Sleisenger & Fordtran's *Gastrointestinal and Liver Disease, Pathophysiology/ Diagnosis/ Management*, 6.th Edition (Eds: Feldman M, Scharschmidt BF, Sleisenger MH), W.B. Saunders Company, 1998: 1123-1170.
62. Grob P, Jilg W, Bornhak H, Gerken G, Gerlich W, Gunther S, Hess G, Huding H, Kitchen A, Margolis H, Michel G, Trepo C, Will H, Zanetti A, Mushahwar I. Serological pattern "anti-HBc alone": report on a workshop. *J Med Virol* 2000;62:450-55.
63. Akyüz F, Beşışık F. Okült HBV enfeksiyonu. Çakaloğlu Y, Ökten A (eds). *Hepatitis B, (Ulusal uzlaşma toplantı metinleri)*, İstanbul Medikal Yayıncılık, 2003:77-89.
64. Torbenson M, Thomas DL. Occult Hepatitis B. *Lancet Infect Dis* 2002; 2:479-86.
65. Wright TL, Terrault NA, Ganem D. Hepatitis B Virus, in "Richman DD, Whitley RJ, Hayden FG (eds), *Clinical Virology*" Churchill Livingstone, Inc, 1997,633-81.
66. Mert A, Ozaras R, Tabak F, Ozturk R, Bilir M, Aktuğlu Y, Senturk H. The significance of presence of anti-HBc without HBsAg and anti-HBs in healthy subject. *World J Gastroenterol* 2004; (in press).
67. Hofer M, Joller-Jemelka H, Grob PJ, Luthy R, Opravil M. Frequent chronic hepatitis B virus infection in HIV-infected patients positive for antibody to hepatitis B core antigen only. *Swiss HIV Cohort Study. Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1998; 17:6-13.

68. Zaaijer HL, Lelie PN, Vandenbroucke-Grauls CM, Koot M. Concurrence of hepatitis B surface antibodies and surface antigen: implications for postvaccination control of health care workers. *J Viral Hepat* 2002;9:146-8.
69. Balık I. Salt anti-HBs olumluluğu *Viral Hepatit Derg* 1998;4:64.
70. Badur S. HBV DNA'nın virus özgü antijen/antikorlarla sıra dışı birliktelikleri. *Viral Hepatit Derg* 1998;4:66-8.
71. Kato J, Hasegawa K, torii N, Yamauchi K, Hayashi N. A molecular analysis Of viral persistence in surface antigen-negative chronic hepatitis B. *Hepatology* 1996;23:389-95.
72. Grob PJ. Hepatitis B: Virus, pathogenesis and treatment *Vaccine* 1998; 16: 11-16.
73. Omata M. Treatment of chronic hepatitis B infection. *N Engl J Med* 1998; 339: 114.
74. Akarca US. Kronik B hepatitinde interferon dışı tedaviler ve interferon ile yapılan kombinasyonlar. Kılıçturgay K (Editör). *Viral Hepatit* 98. 1998: 119.
75. Orenshtein WA, Hinman AR, Bart KJ, Hadler SC. *İmmunization Principles and Practice of Infectious Diseases 4th Edition* (Eds: Mandell G, Bennet JE, Dolin R.) USA, Churchill-Livingstone; 1995,2770-2790.
76. Tekeli E. Korunma . Kılıçturgay K (EDs). *Viral Hepatit '98*. Bursa 1998: 132-135.
77. Beasley RP, Hwang LY, Lee GC. Prevention of Perinataly Transmitted Hepatitis B Virus Infections With hepatitis B Immunglobulin and Hepatitis B Vaccine. *Lancet*;1983:2107-13.
78. Knutsson M, Kidd- Ljunggren K. Urine from chronic Hepatitis B virus carriers: Implications for infectivity. *J Med Virol* 2000; 60: 17-20.
79. Akbulut A, Kılıç SS, Kalkan A, Papıla Ç. Elazığ ili ve yöresinde Hepatit B prevalansının araştırılması. *Viral Hepatit Derg*. 1995; 1: 29-33.
80. Mahoney FJ. Update on diagnosis, manegement and prevention of Hepatitis B infection. *Clin Microbiol Rev* 1999; 12: 351-66.
81. Yenen OŞ: Hepatit B. Wilke Topçu A, Söyletir G, Doğanay M (Eds). *İnfeksiyon Hastalıkları*, 1. baskı, İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri,1996: 664-691.
82. Mıstık R: *Viral Hepatitle Savaşım derneği raporu*, 2000.
83. Balık İ: Hepatit B epidemiyolojisi. Kılıçturgay K (Ed.) *Viral Hepatit'94*, 1. baskı, İstanbul, Nobel Tıp Kitebevleri,1994:91-101.
84. Chemin I, Trepo C. Clinical impact of occult HBV infections. *J Clin Virol* 2005;34:S15-S21.

85. Hu KQ. Occult hepatitis B virus infection and its clinical implications. *J Viral hepat* 2002;9:243-257.
86. Pollicino T, Squadrito G, Cerenzia G, Cacciola I, Raffa G, Crax A, et al. Hepatitis B virus maintains its pro-oncogenic properties in the case of occult HBV infection. *Gastroenterology* 2004;126:102-110.
87. Torbenson M, kannangai R, Astemborski J, Strathdee SA, Vlahov D, Thomas DL. High prevalence of occult hepatitis B in Baltimore injection drug users. *Hepatology (Baltimore, MD)* 2004;39:51-57.
88. Siagris D, Christofidou M, Triga K, Pagoni N, Theocharis GJ, Goumenos D, et al. Occult hepatitis B virus infection in hemodialysis patients with chronic HCV infection. *J Nephrol* 2006;19:327-333.
89. Minuk GY, Sun Df, Greenberg R, Zhang M, Hawkins K, Uhanova J, et al. Occult hepatitis B virus infection in a North American adult hemodialysis patient population. *Hepatology (Baltimore, MD)* 2004;40:1072-1077.
90. Torres-Baranda R, Bastidas-Ramirez BE, Maldonado-Gonzalez M, Sanchez-Orozco LV, Vazquez-Vals E, Rodriguez-Noriega E, et al. Occult hepatitis B in Mexican patients with HIV, an analysis using nested polymerase chain reaction. *Ann Hepatol* 2006;5:34-40.
91. Puoti M, Torti C, Bruno R, Filice G, Carosi G. Natural history of chronic hepatitis B in co-infected patients. *J Hepatol* 2006;44:S65-S70.
92. Filippini P, Coppola N, Pisapia R, Scolastico C, Marrocco C, Zaccariello A, et al. Impact of occult hepatitis B virus infection in HIV patients naive for antiretroviral therapy. *AIDS* 2006;20:1253-1260.
93. Allain JP. Occult hepatitis B virus infection: implications in transfusion. *Vox sanguinis* 2004;86:83-91.
94. Minuk GY, Sun DF, Uhanova J, Zhang M, Caouette S, Nicolle LE, et al. Occult hepatitis B virus infection in a North American community-based population. *J Hepatol* 2005;42:480-485.
95. Torbenson M, Thomas DL: Occult hepatitis B: *Lancet Infect Dis* 2: 479-486, 2002.
96. Gutierrez C, Leon G, Loureiro CL, Uzcategui N., Liprandi F, Pujol FH. Hepatitis B virus DNA in blood samples positive for antibodies to core antigen and negative for surface antigen. *Clin Diagn Lab Immunol* 1999; 6: 768-70.

97. Wang JT, Wang TH, Seu C et al. Detection of HBV-DNA by PCR in plasma of volunteer bloods negative for hepatitis B surface antigen. *J Infect Dis* 1991; 95: 591-6.
98. Pao CC, Yao DS, LIN C, et al. Serum HBV-DNA in HBV seropositive and seronegative patients with normal liver function. *Am J Clin Pathol* 1991; 95:591-6.
99. Gerlich WH, Wagner FF, Chudy M and . HBsAg Non Reactive HBV infection in blood donors: Transmission and pathogenicity *Journal of Medical Virology* 79: S32-S36, 2007.
100. Cacciola I, Pollicino T, Squandrito G, Cerenzia G, Orlando ME, Raimondo G. Occult hepatitis B virus infection in patients with chronic hepatitis C liver disease. *N Engl J Med* 1999; 341: 22-6.
101. Fukuda R, Ishimura N, Niigaki M, et al. Serologically silent hepatitis B virus coinfection in patients with hepatitis C virus-associated chronic liver disease: clinical and virological significance. *J Med Virol* 1999; 58: 201-7.
102. Bal SH, Heper Y, Kumaş LT, Mıstık R, Töre O. İzole anti-HBc pozitif olgularda HBV DNA varlığının araştırılması ve bu olguların kan bankacılığı açısından önemi. *Mikrobiyol Bul.* 2009;43:243-250.
103. Durupınar B, Özbüber Ş, Günaydın M, Leblebicioğlu H, Aydın M. Kan vericilerde Hepatit B kor antikor seropozitifliği ve önemi. *Klinik Derg.* 1994; 7(2): 85-86.
104. Işık K, Köse Ş, Havuk A, Karaca B. İzmir bölgesi kan donörlerinde kimi serolojik viral göstergelerin araştırılması. *Türkiye Ekopatoloji Derg.* 1996; 2 (1-2): 33-35.
105. Badur S. Posttransfüzyon hepatit B sorunu. *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 1991;21:234.
106. Ulusoy S, Bilgiç A. Hastane personelinde hepatit B virus serolojik göstergeleri. *İnfeksiyon Dergisi* 1994;8:5-6.
107. Allain JP. Occult hepatitis B infection: implications in transfusion. *Vox Sang* 2004;86:83-91.
108. Dizer U, Görenek L, Can M, Coşkun Ö, Şengü A, Özgüven V. Hastane personelinde ve değişik yaş gruplarında hepatit B virusu infeksiyonu prevalansı. *Gata İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara: Van Tıp Dergisi* 2000; 7 (3): 98-101.
109. Mosley JW, Stevens CE, Aach RD, et al. Donor screening for antibody to Hepatitis B core antigen and Hepatitis B virus infection in transfusion recipients. *Transfusion* 1995; 35: 5-12.

110. Chaudhuri V, Nanu A, Panda SK, Chand P. Evaluation of serologic screening of blood donors in India reveals a lack of correlation between anti-HBc titer and PCR-amplified HBV DNA. *Transfusion* 2003;43:1442-8.
111. Drosten C, Weber M, Seifried E, Roth WK. Evaluation of a new PCR assay with competitive internal control sequence for blood donor screening. *Transfusion* 2000;40:718-24.
112. Yılmaz K, Alagözölü H, Aktaş C, korkmaz İ, Bakıcı MZ. Acil servise başvuran seçilmiş hastalarda HBsAg, Anti-HBs ve Anti-HCV seroprevalansı. *Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi, Acil Tıp Anabilim Dalı, Sivas: MN-Klinik Bilimler& Doktor* 2002; 8 (3): 284-286.
113. Sırmatel F, Güleç N, Baydar I, Karaoğlu I. Gaziantep bölgesinde HBV antijen ve antikor taşıyıcılığının yaş gruplarına göre dağılımı. *Viral Hepatit Savaşım Derneği III. Viral Hepatit Simpozyumu program ve Kongre Kitabı, Ankara* 1996,17.
114. Hadziyannis SJ, Vassilopoulos D. Hepatitis B e antigen-negative chronic hepatitis B. *Hepatology* 2001; 34: 617-24.
115. 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.
116. Zülfikar B, Öztürk R, Kınık K, Öçlü F, Mert A, Aydın CSF, Danışman S, Özcan G. İstanbul'da değişik yaş grubundan sağlıklı kişiler, hamileler, diş hekimleri ve berberlerde hepatit B taraması sonuçları. 3. Ulusal Viral Hepatit Sempozyumu, 7-9 Kasım, 1996, Ankara Program ve Kongre Kitabı, P-20.
117. 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.
118. Theirs V, Nakajima E, Kremsdorf D, et al. Transmission of hepatitis B From hepatitis B seronegative subject . *Lancet* 1988; 2: 1273-5.
119. Zekri Ar, Awlia AA, El Mahalawi H, Ismail EF, Mabrouk GM. Evaluation of blood units with isolated anti-HBc fort he presence of HBV-DNA. *Dis Markers* 2002; 18: 107-10.
120. Van Theil DH, De Maria N, Colantoni A, Friedlander L. Can hepatitis B core antibody positive livers be used safely for transplantation: Hepatitis B virus

- detection in the liver of individuals who are hepatitis B core antibody positive. *Transplantation* 1999; 68: 519-22.
121. Hui C, Lau E, Wu H et al. Fibrosis progression in chronic hepatitis C patients with occult hepatitis B coinfection. *J Clin Virol* 35: 185-92.
 122. Silva CM, Costi C, Costa C, et al. Low rate of occult hepatitis B virus infection among anti-HBc positive blood donors living in a low prevalence region in Brazil. *J Infect* 2005; 51(1): 24-9.
 123. El-Zaatiri M, Kanma H, Naboulsi –Majzoub M, Haidar M, Ramlawi F, Mahfoud Z, Ramia S. Hepatitis B virus DNA in serum of ‘anti-HBc only’- positive healthy Lebanese blood donors: significance and possible implications. *Journal of Hospital Infection* (2007) 66, 278-282.
 124. El-Zayadi AR, Ibrahim EH, Bardan HM, Saeid A, Moneib NA, Shemis MA, Abdel-Sattar RM, Ahmady MA, El-Nakeed A. Anti-HBc screening in Egyptian blood donors reduces the risk of hepatitis B virus transmission. *Transfusion Medicine*, 2008,18,55-61.
 125. Wang JT, Wang TH, Seu C, et al. Detection of HBV-DNA by PCR in plasma of volunteer bloods negative for hepatitis B surface antigen. *J Infect Dis* 1991; 95: 591-6.
 126. Pao CC, Yao DS, Lin C, et al. Serum HBV-DNA in HBV seropositive and seronegative patients with normal liver function. *Am J Clin Pathol* 1991; 95:591-6.
 127. Altunış Mustafa, Aktepe OC, Çetinkaya Z, Kızıldı N, Kalaycı R. Kantitatif Anti-HBc ölçümü ile HBV-DNA varlığının karşılaştırılması. Kocatepe Üniversitesi Tıp fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Afyon: *Viral Hepatit Dergisi* 2006; 11(3): 138-141.
 128. Pekbay A, Günaydın M, Eroğlu C, Bedir A, Esen Ş, Leblebicioğlu H. Hepatit B virus (HBV) serolojik göstergeleri ile HBV-DNA arasındaki korelasyon. *Viral Hepatit Dergisi* 2001; 2: 302-4.
 129. Weinberger KM, Bauer T, Böhm S, et al. High genetic variability of the group-specific-a-determinant of hepatitis B virus surface antigen and the corresponding fragment of the viral polymerase in chronic virus lacking detectable HbsAg in serum. *J Gen Virol* 2000; 81: 1165-74.
 130. Alhababi F, Salam TA, Tong CY. The significance of ‘anti-HBc only’ in the clinical virology laboratory. *J Clin Virol* 2003; 27: 162-9.

131. Noborg U, Gusdal A, Horal P, et al. Levels of viraemia in subjects with serological marker softpast or chronic hepatitis B virus infection. *Scand J Infect Dis* 2000; 32: 249-52.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı : Fahriye Köten
Doğum Yeri ve Tarihi : Sivas, 09/06/1983
Yabancı Dil : İngilizce
İletişim Adresi : Kazancılar Cad. Akbulut Apt. Kat:2 No:3 SİVAS
E-posta Adresi : fahriyekoten@hotmail.com

Eğitim Bilgileri

Lisans : Cumhuriyet Üniversitesi Fen/Edebiyat Fakültesi
Biyoloji Bölümü

İş Bilgileri

Biyolog : Sivas İl Halk Sağlığı 2005-2006
Biyolog : Sivas Numune Hastanesi 2007-2008
Memur : Tarım ve Kırsal Kalkınmayı Destekleme Kurumu 2009-