

**T. C.
CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
MİKROBİYOLOJİ VE KLİNİK MİKROBİYOLOJİ
ANABİLİM DALI**

**HEPATİT B VİRUS SEROLOJİK BELİRLEYİCİLERİ İLE
HBV-DNA GÖRÜLME ORANLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ**

Dr.Haluk AVUNDUK

UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN ÖĞRETİM ÜYESİ

Prof. Dr. Yahya HAKGÜDENER

SİVAS

2006

İÇİNDEKİLER

SAYFA

• TEŞEKKÜR.....	ii
• ÖZET.....	iii
• İNGİLİZCE ÖZET.....	iv
• TABLOLAR.....	v
• ŞEKİLLER.....	vi
• GİRİŞ VE AMAÇ.....	2
• GENEL BİLGİLER.....	3
1.1.Hepatit B Virus İnfeksiyonları.....	3
1.2.Nükleik Asit Tespit Yöntemleri.....	20
1.3 Hepatit B Virus İnfeksiyonlarında Nükleik Asit Tespit Yöntemlerinin Yeri	36
• GEREÇ VE YÖNTEM.....	38
2.1.Örnek Alımı ve Hazırlanması.....	38
2.2.Kullanılan Sistem ve Cihazlar.....	38
2.3.Sinyal Amplifikasyonlu Solüsyon Hibridizasyon Antikor Yakalama Yöntemi ile HBV DNA Tayini.....	38
• BULGULAR.....	44
• TARTIŞMA.....	49
• SONUÇ.....	61
• KAYNAKLAR.....	62

TEŞEKKÜR

YetiŐmemde emeklerini esirgemeyen değerli hocalarıma, tez alıŐmalarımıda destek veren Sayın Prof.Dr.Yahya HAKGÜDENER hocama, tezimin istatiksels değerlendirmelerinde katkılarını ve yardımlarını esirgemeyen Biyoistatistik Anabilim Dalı öğretim üyesi Sayın Yrd.Doç.Dr.Ziyet ÇINAR hocama ve tezimin her aşamasında yardım eden tüm arkadaşlarıma çok teşekkür ederim.

ÖZET

Çalışmamızda, çeşitli polikliniklerden Hepatit B Virus (HBV) enfeksiyonu şüphesiyle gönderilen ve ELISA yöntemiyle serolojik markerleri bakılan hasta serumlarında, “Digene Hybrid Capture™ system HBV DNA assay” ile HBV DNA bakarak çıkan sonuçları serolojik markerler ile karşılaştırdık.

Çalışma için Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'na gönderilen 356 hasta serum örneği kullanıldı.

356 örnekten 336'sında (%94.4) HBsAg (+), 20'sinde (%5.6) HBsAg (-) idi. Anti-HBs 341'inde (%95.8) (-), 15'inde (%4.2) (+) idi. HBeAg 316'sında (%88.7) (-), 40'ında (%11.3) (+) idi. Anti-HBe 207'sinde (%58.1) (-), 149'unda (%41.9) (+) idi. Anti-HBc total 212'sinde (%59.5) (-), 144'ünde (%40.5) (+) idi. HBcIgM 353'ünde (%99.1) (-), 3'ünde (%0.9) (+) idi. Toplam 102'sinde de (%28.7) HBV DNA pozitif bulundu.

İstatistiksel olarak cinsiyet ve yaşa göre, anti-HBc total ve HBcIgM'ye göre HBV DNA görülme oranlarına bakıldığında aradaki fark anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$). HBsAg, anti-HBs, HBeAg ve anti-HBe'ye göre HBV DNA görülme oranlarına bakıldığında ise aradaki fark anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$). Özellikle HBsAg ve HBeAg HBV DNA sonuçları ile bir paralellik göstermektedir. Bu anlamlılık virusun belirlenmesi ve viral yükün izlenmesinde (sağaltım amacıyla) HBV DNA belirlenmesinin de gerekliliğini ortaya koymaktadır.

HBV DNA belirleyen yöntemler oldukça pahalıdır. Kullanım amacı dikkate alınarak doğru yöntem seçildiğinde tanı ve sağaltım izlenmesinde yararlı ve güvenilir yöntemlerdir.

SUMMARY

In our study, we compared the serologic marker results with the results of “Digene Hybrid Capture System HBV DNA Assay” determining HBV DNA in sera, sent from several polyclinics, of the patients who were examined by Elisa method serologically with the suspicious of Hepatitis B virus infection.

For the study 356 sera of the patients which sent to Laboratory of the Cumhuriyet University Microbiology and Clinical Microbiology Department were used.

Of the 356 samples, 336 (94,4%) were Hbs Ag positive, 20(5,6%) were Hbs Ag negative. 341(95,8%) were Anti Hbs negative, 15 (4,2%) were positive. 316(88,7%) were Hbe antigen negative, 40 (11,3%) were positive. 207(59,5%) were negative for Anti Hbe, 149(41,9%) were positive. Anti Hbc Total was negative in 212(59, 5%), positive in 144(40.5%). HBCIgM was negative in 353 (99, 1%), and positive in 3 (0,9%). 102(94,4%) were positive for HBV DNA in total.

As HBV DNA presence rates evaluated according to gender, age, AntiHBc total, HbcIgM the difference was not found to be statistically important($p>0,05$). As HBV DNA presence rates evaluated according to Hbs Ag, Anti Hbs, Hbe Ag and Anti Hbe the difference was found to be statistically important. This importance put forward the necessity of the HBV DNA determination in the determination of virus and in the follow up of the viral load.

The methods determining HBV DNA were so expensive. These are useful and reliable methods if the right method selected according to the aim of use.

TABLolar

	Sayfa
Tablo 1: Hepadnavirusların özellikleri.....	4
Tablo 2: HBV Genotip ve Subtiplerin Coğrafi Dağılımı.....	12
Tablo 3: “Digene Hybrid Capture™ system HBV DNA assay”de negatif kontrol ve pozitif standart HBV genom konsantrasyonları.....	42
Tablo 4: Cinsiyete göre HBV DNA görülme oranlarının karşılaştırılması.	45
Tablo 5: Yaşa göre HBV DNA görülme oranlarının karşılaştırılması	45
Tablo 6: HBsAg’ne göre HBV DNA görülme oranları	45
Tablo 7: Anti-HBs’ye göre HBV DNA görülme oranları	46
Tablo 8: HBeAg’ye göre HBV DNA görülme oranları	46
Tablo 9: Anti-HBe’ye göre HBV DNA görülme oranları	47
Tablo 10: Anti-HBc total’e göre HBV DNA görülme oranları.....	47
Tablo 11: Anti-HBcIgM’ye göre HBV DNA görülme oranları	48
Tablo 12: Çalışmada saptanan serolojik markerlere göre HBV DNA tespit durumları.....	50
Tablo 13: HBV’nin olağan serolojik/moleküler tanı kalıplarının yorumu.....	51
Tablo 14: HBV–DNA kantitatif testlerinin karşılaştırılması.....	60

ŞEKİLLER

	Sayfa
Şekil 1 : HBV Partiküllerinin Elektron Mikroskopisi ile Görünümü.....	5
Şekil 2: Hepatit B Virüsünün Genom Yapısı.....	7
Şekil 3 : HBV Genom ve Protein Yapısı.....	8
Şekil 4 : Hepatit B Virüsünün Kor Antijenlerinin Şematik Görünümü.....	11
Şekil 5 : Akut HBV İnfeksiyonunun Gidişi.....	15
Şekil 6 : Kronik HBV İnfeksiyonunun Gidişi.....	17
Şekil 7 : Digene Hybrid Capture™ system HBV DNA assay (LEADER™ 450)	43

GİRİŞ VE AMAÇ

İnsanlık tarihindeki yeri M.Ö. 5.yy.'da başlayan hepatit B infeksiyonu halen önemli infeksiyonlar arasındaki yerini korumaktadır. İnfeksiyon tanısına yönelik başta ELISA olmak üzere çok sayıda yöntem kullanımdadır.

DNA yapısının Watson Crick tarafından tarif edilmesinden bu yana moleküler biyolojideki en önemli adımlardan biri nükleik asit dizisinin in vitro çoğaltılmasının başarılmasıdır. Bu sayede infeksiyon hastalık etkenlerinin tanısında, tiplendirilmesinde, sağaltımlarının takibinde ve ilaç direncinin saptanmasında büyük adımlar atılmıştır. Nükleik asit dizisinin in vitro çoğaltılması temeline dayanan yöntemler özellikle mikroskopi ile görülmesi güçlük gösteren, kültürde üremesi zor, uzun zaman alan veya olanaksız olan mikroorganizmaların belirlenmesinde geniş kullanım alanı bulmuştur (1).

Hepatit B virus DNA (HBV DNA)'sının belirlenmesinin önemi anlaşılmaya başlandıkça bu alandaki yöntemlerin kullanımı artmış ve yeni arayışlar başlamıştır. HBV DNA belirlenmesinde PCR ve hibridizasyon yöntemleri sıkça kullanılmaktadır.

DNA hibridizasyon çalışmaları ilk olarak bakteriler arasındaki akrabalıkları göstermek amacıyla kullanılmıştır. Yöntem üzerinde bilgi ve deneyimlerin artması nükleik asit probe teknolojisinin gelişmesine neden olmuştur (2). Günümüzde hibridizasyon yöntemi organizmaların belirlenmesinde ve tanımlanmasında çok yaygın kullanım alanını içerir.

Çalışmamızda ELISA ile serolojik göstergeleri belirlenmiş olguların, hibridizasyon yöntemiyle HBV DNA'larına bakarak sonuçların serolojik belirteçlerle karşılaştırılması amaçlanmıştır.

GENEL BİLGİLER

Hepatit B Virus İnfeksiyonları:

Tarihçe:

Viral hepatit ilk olarak M.Ö.5. yüzyılda tanımlanmış bir hastalıktır. Hepatit B virusu (HBV) ile infekte olmuş kişilerle ilgili bilgilerin ilk kez Hipokrat tarafından ortaya konduğu bilinmektedir (3).

Daha sonraları 1883 Almanya'sında Bremen'de Lurman suççuğu aşı kampanyası sırasında kan veya kan ürünlerinin direkt inokülasyonu ile geçen bir hepatit formu tanımladı.(3-5). 1960 ve 1970'lerde Krugman ve arkadaşları bir seri çalışma sonrası iki tip viral hepatit tanımladılar. Aynı dönemde (1965) Blumberg ve Alter , çok sayıda kan transfüzyonu yapılmış bir hemofili hastasının serumunda , jel difüzyon deneyi sırasında belirlenen bir immünopresipitin gösterdi (6).Hasta Avusturalya asıllı Amerika'lı olduğu için Avusturalya antijeni (Au) adı verilmiştir. Başlangıçta konağa ait bir antijen olarak düşünölen Au antijeninin yıllar sonra akut hepatitle ilişkisi saptanmış ve "Hepatitis associated antigen- HAA ''olarak adlandırılmıştır.Daha sonraki çalışmalar B hepatiti ile ilişkisini ortaya koymuş ve "Hepatitis B surface antigen- Hepatit B yüzey antijeni- HBsAg" olarak bugünkü adını almıştır (6,7,8). Bu antijenin bulunmasıyla yapılan çalışmalar HBV'nün tüm dünyada önemli bir sağlık sorunu olduğunu ortaya koymuştur.

1970'de Dane ve arkadaşları HBV'nün kısmen saflaştırılmış preparasyonlarının elektron mikroskopik incelemelerinde üç değişik partiküle rastladılar. Bunlardan infeksiif özelliğe sahip, 42 nm. çapında olanlara "Dane partikülü" adını verdiler. Daha sonra HBV'nün Dane partikülü olduğu ve yüzeyinin hepatit B yüzey antijeni (HBsAg) ile kaplı olduğu gösterildi. Kor bölümü DNA ve hepatit B kor antijenini kapsıyordu. Bu antijenlere karşı gelişen antikorlar anti-HBs (HBsAg'ye karşı oluşan antikor) , anti-HBc (HBcAg'ye karşı oluşan antikor) olarak adlandırıldı. 1972'de üçüncü antijen hepatit e antijeni (HBeAg) tanımlandı (9-10).

Yapısı ve Genel Özellikleri:

HBV : Hepadnaviridae ailesinin Ortohepadnavirus cinsinde yer alan hepatotropik zarflı ve kısmen çift sarmallı bir DNA virüsüdür. Hepadnaviridae ailesi virion büyüklükleri ve ince yapıları birbirine benzeyen, genom replikasyonunda revers transkripsiyonuna gereksinim duyan, karaciğer tropizmi gösteren, persistan infeksiyon oluşturma gücünde ve hepatosellüler kanserler ile ilişkili ve infektif partiküller dışında kanda yüksek konsantrasyonlarda noninfektif kılıf antijen partikülü üreten virüslerdir. Bu ortak özelliklerine karşın virüslerin birbirinden farklılık gösteren özellikleri de bulunmaktadır.

Hepadnaviridae üyelerinin farklı özellikleri Tablo 1 de gösterilmiştir.

Tablo 1: Hepadnavirüslerin Özellikleri(11,12,13,14,15)

	Ortohepadnavirus			Avihepadnavirus
	HBV	WHV	GSHV	DBHV
Büyüklik	42 nm	40-42 nm	40-42 nm	46-48 nm
Genom	3.2 kb	3.3 kb	3.3 kb	3.0 kb
Viral DNA	Tamamlanmamış	Tamamlanmamış	Tamamlanmamış	Tam
Zarf proteinleri	L,M,S	L,M,S	L,M,S	L,S
Gen	S,C,P,X	S,C,P,X	S,C,P,X	S,C,P
Konak	İnsan Şempanze	Dağ sıçanı	Yer sincabı Dağ sincabı Amerika sincabı	Ördek Kaz Balıkçıl
Replikasyon	Karaciğer Böbrek Pankreas Beyaz küreler	Karaciğer Böbrek Pankreas Beyaz küreler Diğer	Karaciğer	Karaciğer Böbrek Pankreas Dalak Diğer
Hastalık	I.Aseptomatik Taşıyıcılık II.Hepatit III.HCC IV.Siroz	I.Aseptomatik Taşıyıcılık II.Hepatit III.HCC	I.Aseptomatik Taşıyıcılık II.Hepatit III.HCC	I.Aseptomatik Taşıyıcılık II.Hepatit
Dağılım	Tüm dünya	Doğu A.B.D	Californiya	Çin, A.B.D

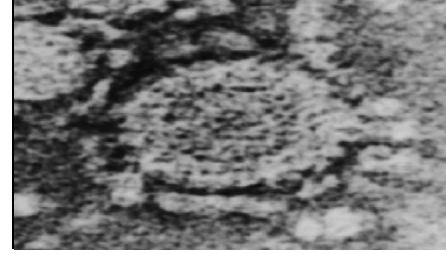
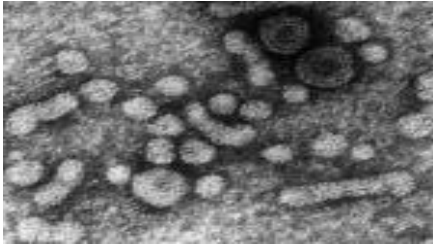
HBV: Hepatit B virusu, WHV: Woodchuck hepatit virusu, GSHV: Ground squirrel hepatit virusu, DBHV: Duck hepatit B virusu

HBV, sadece 3200 nükleotidden oluşan genomik yapısı nedeniyle, bilinen tüm hayvan DNA virüsleri içinde en küçük olanıdır. Hepadnaviridae ailesinin içinde insanlarda infeksiyon oluşturan tek virüstür. Yapısını araştırmak amacıyla hepatit hastalarının serumları elektron mikroskopunda incelendiğinde üç farklı partikülün varlığı saptanmıştır(Şekil 1) (7,12,13,16,17,18,19). Bunlar ;

a) Yaklaşık 42 nm çapında, infeksiyöz özellikte, tam bir viryon yapısında küresel şekilli, Dane partikülleri;

b) Yaklaşık 22 nm çapında, içinde nükleik asit bulunmayan, non-infektif, küresel partiküller.

c) Özellikle replikasyonun söz konusu olduğu kişilerin serumunda bulunan, 22 nm çapında, 50-500 nm uzunluğunda nükleik asit ihtiva etmeyen, non-infektif, tübüler partiküllerdir.



Şekil 1 : HBV Partiküllerinin Elektron Mikroskopisi ile Görünümü(20,21)

Her üç partikül de immunojeniktir ve anti-HBs antikorları ile reaksiyon verirler. İnfekte konak serumunda yüksek miktarda (200-500 µg/ml) saptanabilen HBsAg adı verilen ortak yüzey antijeni içerirler. İnfeksiyon oluşturma özelliği olmayan formlar daha fazla miktarda üretilir. Kanda dolaşan HBsAg'nin büyük bölümünü 22 nm'lik küresel partiküller oluşturur. Dane partiküllerinin sayısı 10^4 - 10^9 /ml arasında iken, non-infektif küresel partiküllerin miktarı 10^{13} /ml veya daha fazladır (12,13,14,22).

Duyarlılık ve Dirençlilik:

HBV, serum içinde 30-32°C'de 6 ay, -20°C'de ise yıllarca canlılığını korur. Serum içinde 60°C'ye 4 saat, albumin içinde ise aynı ısıya 10 saat dayanır. 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 gluteraldehit, % 0.5-1'lik

sodyum hipoklorid (veya 500 ppm serbest klor), izopropil veya etil alkol virüsü inaktive eder.

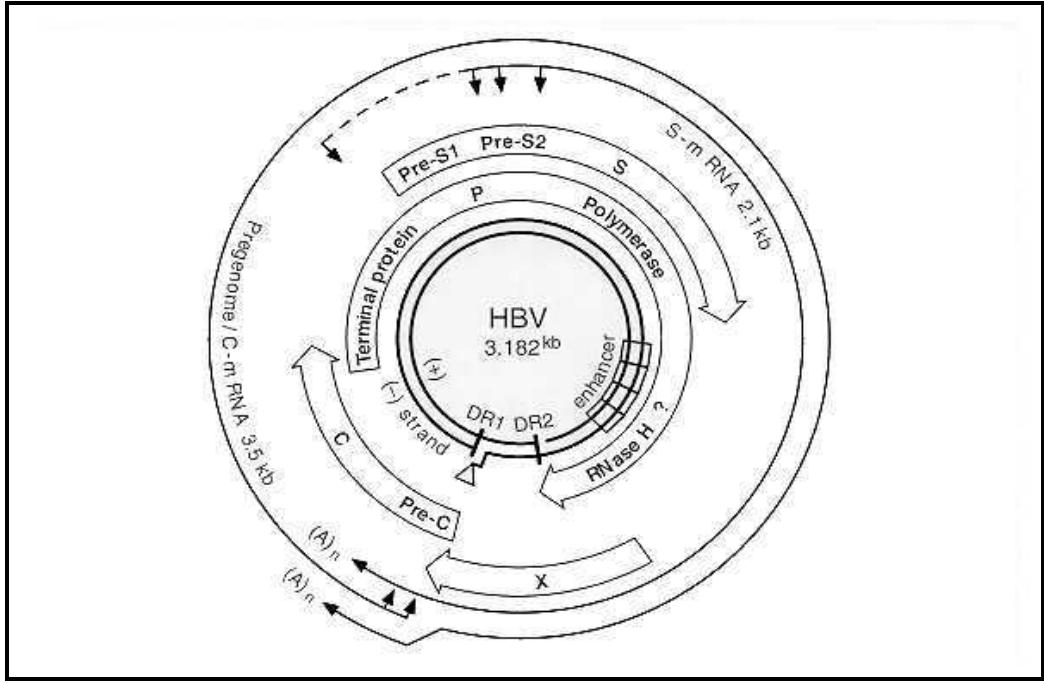
Genom Yapısı:

HBV, kısmen çift sarmallı, sirküler bir DNA molekülü taşır. DNA'nın molekül ağırlığı 2.3×10^6 dalton, G+C oranı ise yaklaşık % 49'dur. HBV-DNA; 3200 nükleotid içeren uzun (L veya negatif) ile 1800-2700 nükleotid uzunluğunda kısa (S veya pozitif) zincir olmak üzere iki sarmaldan oluşmuştur. Sirküler yapı halinde bulunmakla birlikte her birinin 3' ve 5' uçları birleşik olmadığından aslında lineer moleküllerdir. Negatif sarmalın 3' ucundaki 9-10 nükleotidlik artık uç viral replikasyon sırasında pozitif DNA sarmalının sentezindeki "template switching" işleminde DNA polimerazında etkisi ile kısa zincirin tamamlanmasında ve sonuçta süper kıvrımlı, tamamen çift sarmallı, çember şeklinde DNA molekülünün oluşumunda rol oynar (11,15,23).

Viral DNA'nın yapısal bütünlüğü DR (direct relaps) denilen sabit bölgeler aracılığı ile sağlanır. HBV'de iki adet DR vardır (12,14).

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 dizisi (open reading frame : ORF)'ne sahiptir (14,20). HBV-DNA'daki genler, arka arkaya dizilmiş ve birbirinden tamamen ayrı bölgelerde bulunmazlar, aksine bazı bölgelerde iç içe girmiş diğer bir deyişle birbiriyle 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 kez okunmaktadır. Bu özellik nedeni ile HBV, bilinen hayvan virüsleri içinde en küçük genomik yapıda olmakla birlikte, kendi kodlama kapasitesi en fazla olan virüstür (Şekil 2).

Uzun sarmaldaki S geni yüzey proteinlerini (L,M ve S), C geni kapsid proteinlerini (HBeAg ve HBcAg), X geni X proteinini (HBxAg) ve P geni de DNA polimerazı kodlamaktadır. Ancak başlangıç kodonları farklı olduğu için S geni üzerinde pre-S1, pre-S2 ve S olmak üzere üç, C geni üzerinde ise pre-C ve C olmak üzere iki bölge bulunmakta, dolayısıyla farklı başlangıç kodonlarından sentezlenen proteinler de farklı olmaktadır. Bu nedenle 4 adet ORF'e sahip olmasına rağmen HBV tarafından yedi değişik polipeptid üretilmektedir (17,23,24).



Şekil 2: Hepatit B Virüsünün Genom Yapısı (25)

Replikasyon :

HBV'nin hepatositlere tutunmasında L ve M proteinlerinin önemli olduğu saptanmıştır . İn-vitro olarak pre-S1 ve pre-S2 karaciğere özgül tutunma bölgeleri tanımlanmıştır (12,14). Son zamanlarda konak hücreye bağlanmada fibronektin, transferrin reseptörü, apolipoprotein H, polimerize insan serum albumini, pre-S2 glikan ve HBV bağlayan faktör gibi başka reseptörlerin varlığı da ortaya konmuştur (26,27,28,29,30).

Hepatosite bağlanan virüsün konak hücre çekirdeğine nasıl ulaştığı tam olarak aydınlatılmamıştır. Kısmen çift sarmallı ve her iki ucu serbest halde bulunan DNA'nın kısa sarmalının eksik olan bölümü endojen DNA polimeraz tarafından tamamlanır. Bu sırada uzun sarmalın 5' ve 3' uçları arasındaki açıklık da onarılmış ve sonuçta tümüyle çift sarmallı, süper kıvrımlı, uçları kapalı, sirküler bir yapıda bir HBV-DNA (cccDNA) oluşur. HBV ile infekte bazı kişilerin serumunda nadir olarak HBcAg'nin varlığı gösterilmiş olsa da, bu antijen viral replikasyon sırasında konak hücre çekirdeğinde sıklıkla belirlenebilmektedir. Bu nedenle HBcAg'nin nukleusa girmesinin cccDNA'nın ortaya çıkmasından önce olduğu düşünülmektedir (14,16,24).

Kalıp olarak cccDNA'dan konak hücre RNA polimerazının yardımı ve viral düzenleyicilerin etkisiyle önce viral RNA'lar sentezlenir.

Bunu konak hücre sitoplazmasında devam eden replikasyon boyunca 3.5 kb'lık RNA (+RNA)'dan (-) DNA sentezlenmesi izler (24).

Kısa zincirin sentezinde kalıp olarak uzun sarmal kullanılır. Kısmen çift sarmallı sirküler yapıdaki kor bölümünün kılıf proteinleri tarafından çevrelenmesi ve aynı zamanda polimerazın da tükenmesi nedeniyle kısa zincirin sentezi tamamlanamaz ve bu sarmal eksik kalır (14,16,24).

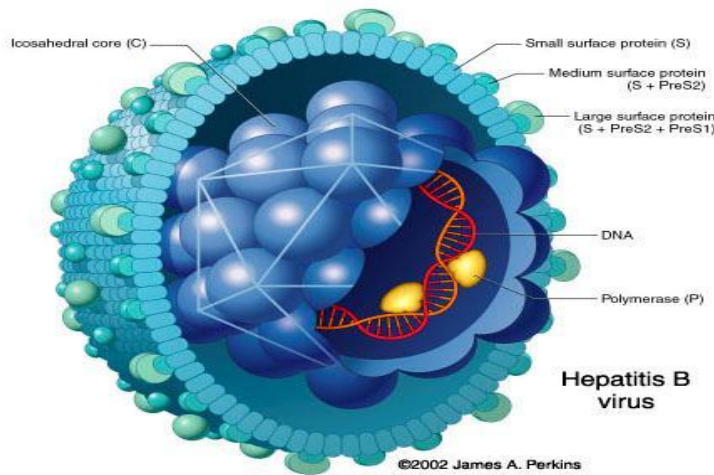
HBs proteinleri, endoplazmik retikulumda öncelikle transmembran proteinleri olarak sentezlenir. Oligomerizasyon, molekül içi ve moleküller arası disülfid köprülerinin oluşmasıyla olgunlaşır, tomurcuklanma sırasında membran lipidleri ile birlikte kor partiküllerini çevreleyip hücre dışına çıkarırlar.

Viral Proteinler

Yüzey Proteinleri:

Aslında tek bir gen tarafından kodlanan S bölgesi üzerindeki proteinlerin farklılıkları 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 (11,17).

Okuma işlemi gen üzerindeki ilk kodondan başlarsa pre-S1 + preS2 + S bölgelerinin tümü okunacağından kılıfın büyük proteini (LHBs: L protein) sentezlenir. LHBs en fazla DNA partiküllerinin yüzeyinde bulunur. Tübüler partiküllerin üzerinde de bulunabilirse de küresel partiküllerde çok azdır (Şekil 3) (14,16).



Şekil 3 : HBV Genom ve Protein Yapısı (31)

Viryonun konak hücreye bağlanmasında L proteininin rolü olduğuna inanılır. Yapılan çalışmalarda LHBs'nin 21-47 aminoasitleri arasındaki bölge hepatositlere tutunma özelliğine sahip olduğu ve bu bölgeye karşı gelişen antikorlara bağlanmayı engellediği gösterilmiştir (32,33).

Aseptomatik HBsAg taşıyıcılarında düşük düzeyde ama devamlı üretilen LHBs'nin hepatositlerde lezyon oluşumuna ve HCC gelişimine neden olabileceği düşünülmektedir. Hepatosit içinde pre-S1 ürünlerinin birikimi endoplazmik retikulumda dilatasyona yol açmakta, hücreler kalınlaşmakta, hidropik ve eozinofilik özellik kazanarak buzlu cam görünümü almakta, sonuçta koagülasyon nekrozu ile hücreler ölmektedir (11,16).

Okuma işlemi S geni üzerindeki ikinci kodondan başlarsa bu kez pre-S2 + S bölgelerinin ürünü olan orta protein (MHBs: M protein) sentezlenir (24).

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 (16).

L ve M proteinleri enfeksiyonun erken dönemlerinde ortaya çıkmakta ve bunlara karşı gelişen antikorların gösterilmesi iyileşmenin belirtisi olarak kabul edilmektedir (34).

HBV'nün karaciğer hücrelerine tutunmasında rolünün olabileceği düşünülen bir diğer reseptör de pre-S2 glandıdır. HBV'nin bu bölgeden mannoz bağlayan protein (MBP) aracılığı ile hepatositlere bağlandığı sanılmaktadır (34).

Okuma işlemi sadece S bölgesini içerir ise kılıfın küçük proteini (SHBs: S protein) sentezlenir. HBSAg'nin büyük bölümünü oluşturan SHBs kılıfın majör proteini olarak bilinir ve B lenfositler için epitopik bölgeyi içerir (12,16).

Kanda dolaşan S geni ürünlerinin yaklaşık % 5-15'i M, %1-2'si L ve geri kalan kısmı S proteininden oluşmaktadır. Küçük partiküllerde bazen LHBs'e hiç rastlanmayabilir ama Dane partiküllerinde L proteini daima vardır(11,14).

SHBs'yi oluşturan aminoasitlerin belli bölgelerdeki diziliş farklılıklarına göre HBsAg üzerinde en az beş antijenlik determinant (a, d, y, w ve r) bulunduğu saptanmıştır. Bütün subtiplerde ortak olarak yer alan gruba özgül "a" determinantına karşı oluşan antikorlar HBV'nün hepatositlere bağlanmasını engeller ve enfeksiyon sonrası oluşan anti-HBs'lerin büyük kısmını bağlama özelliği ile tüm subtiplere karşı etkili bir bağışıklık sağlar (34).

Pepsin ile işlem yapılarak pre-S1 ve preS2 gen ürünleri uzaklaştırılan ve sonuçta sadece S proteinleri bulunan HBsAg'den türetilmiş plazma aşılı ile yapılan çalışmalar, HBV'na karşı oldukça etkili bir bağışıklama olduğunu göstermiştir (28).

HBsAg subtiplerinin saptanması, infeksiyon kaynağının izinin sürülmesi ve HBV'nün bireyler veya toplumlar arasındaki yayılımının izlenmesinde önemli ipuçları verir. ABD'de "w" subtipi "r" den daha yaygın iken, Tayland'da en sık görülen subtip "r"dir (26,29).

Kor Proteinleri:

Pre-C ve C olmak üzere iki bölgeye ayrılan C geni, antijenik özellikleri farklı HBeAg ve HBcAg'yi sentezleme yeteneğindedir (11,12).

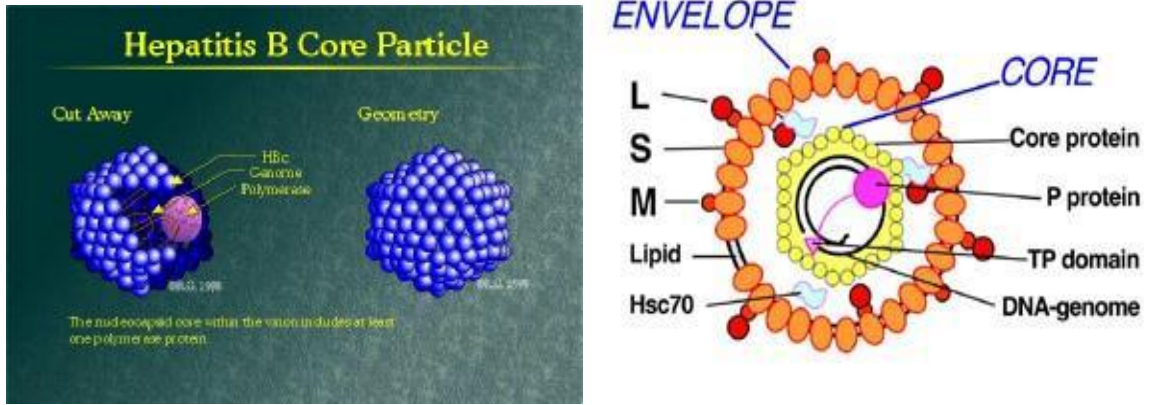
Her iki bölgeye ait stop kodon aynı nükleotidde bulunur. Böylece protein sentezi sırasında okuma işlemi hangi başlangıç kodonundan başlarsa başlasın aynı noktada sonlanır. Pre-C'den başlayan okuma işleminde her iki bölgede okunarak 212 aminoasitten oluşan, 25 kDa molekül ağırlığında bir polipeptid sentezlenir. Bu proteinin aminoasit sekansı; N terminal ucunda yer alan 29 aminoasitlik ek parça dışında HBcAg sekansı ile tamamen benzerdir. Bu ek sekans pre-C polipeptidlerini 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 salınır ya da nükleusa yönlendirilir (12).

HBcAg ile HBeAg ortak determinantlar içerir. Kanda dolaşan HBeAg özgül olarak serum albumini, immunglobulin ve antitripsine bağlanma özelliği içerdiğinden 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 HBcAg'den farklı özelliklere sahip, eriyik bir antijen olarak tanımlanan HBeAg'nin fonksiyonu henüz tam olarak bilinmemektedir. In vitro araştırmalar sonucunda; HBeAg'nin viral replikasyon için gerekli olmadığı ispatlanmıştır (12,17,24).

C geninin ikinci bölgesi tarafından sentezlenen polipeptidin ön bölümü 29 aminoasitlik ek sekanstan yoksun olması nedeniyle endoplazmik retikuluma

gidemez ve konak hücre sitoplazmasında kalır. Yüksek derecede saflaştırılmış viryon 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 (12,14,22).

HBeAg seruma salındığı halde, HBcAg için böyle bir durum söz konusu değildir. Bu nedenle dolaşımında rastlanmaz. Kanda sadece Dane partikülü içinde bulunur, viryonlar parçalanır ise HBcAg serbestleşir (Şekil 4) (16,22). Serolojik tanıda HBcAg'nin saptanmaya çalışılması uygun değildir.



Şekil 4 : Hepatit B Virüsünün Kor Antijenlerinin Şematik Görünümü(36,37)

HBeAg ve HBcAg oldukça immunojenidir. HBcAg'nin immunojenitesi HBsAg'den daha fazladır ve T hücre bağımsız antijen özelliği gösterir. HBV infeksiyonunda hastaların hemen hepsinde hem HBeAg hem de HBcAg'ye karşı humoral ve hücrel yanıt gelişir. HBcAg'ne özgül T hücreleri, HBsAg humoral yanıtını başlatabilir ya da bu yanıtı işlevsel yardım sağlayabilir. Böylece genetik kaynaklı S epitop yanıtızlığının üstesinden gelinmesine yardım etmek amacıyla S antijen aşlarına HBcAg eklenmesinin insanlardaki etkinliği artırabileceği düşünülür. (38,39). Anti-HBs antikorlarına karşın anti-HBc antikorları koruyucu değildir. Erken beliren ve uzun süre kalıcı özelliği olan anti-HBc antikorları, HBV infeksiyonu geçiren sağlıklı bireyler yanında persistan HBV infeksiyonlu hasta serumlarında da tespit edilebilir. Anti-HBc IgM akut dönemde; HBsAg'nin kaybolup anti-HBs'nin henüz belirmediği pencere döneminde pozitifleşir. Ancak bu antikorun tek başına akut infeksiyon göstergesi olarak değerlendirilmesi 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 olması daha değerlidir (16,17,39).

P Proteini :

P geni HBV genomunun $\frac{3}{4}$ 'ünü kaplayan en uzun genidir. P proteini ; Revers transkriptaz, endonükleaz (RNase H) ve hem DNA hem de RNA'ya bağımlı polimeraz aktivitesine sahiptir (15,40,41).

P proteininin immunojen özelliği vardır. Hasta serumunda bulunan anti-DNA polimeraz antikorları, sentetik peptid antijenleri ile gösterilebilmektedir (16).

X Proteini :

X geni, HBV genomundaki en küçük gen bölgesidir. Bu gen tarafından sentezlenen HBxAg'nin viral siklus ve HBV patobiyolojisindeki işlevi henüz tam olarak aydınlatılamamıştır (42). Ancak X proteini tümör supressör gen ürününün (p53) işlevini bozduğu, böylece HBV ile ilişkili hepatokarsinogenez sürecinin ilk aşamasında etkili olduğunu düşündürmekte ve HBxAg'nin hepatosellüler karsinom gelişiminde rol oynayabileceğini akla getirmektedir (11,12,40).

HBV Genotipleri :

Birbirlerine benzerlik oranları %92 ve daha fazla olan HBV suşları aynı grupta toplanarak altı farklı genotip belirlenmiştir (Tablo 2).

Tablo 2 : HBV Genotip ve Subtiplerin Coğrafi Dağılımı (15)

Genotip	Subtip	En sık görüldüğü bölge
A	adw ₂	Kuzeybatı Avrupa
	adw ₁	Sahra altı Afrika
B	adw ₂	Endonezya
	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

Prekor / Kor Mutantlar :

Son yıllarda, viral replikasyon kaybı olmaksızın anti-HBe serokonversiyonu gösteren bazı hastalardan izole edilen HBV DNA'ların incelenmesi ile prekor/kor geni üzerindeki mutasyonların varlığı ortaya konmuştur. Bu bölgede görülen en önemli mutasyon HBeAg'nin üretilmemesi ile karakterize olan stop kodon oluşumudur. HBeAg sentezleyemeyen mutant suş büyük olasılıkla konağın sitotoksik cevabından kaçarak canlılığını sürdürür, üstünde HBeAg bulunan hepatositler anti-HBe'nin de etkinliği ile bir süre sonra lizise uğrar ve sonuçta HBeAg negatif mutant suş baskın hale gelir. Yapılan bazı çalışmalarda kronik viral hepatit B'nin gidişi sırasında ortaya çıkan HBeAg negatif vireminin hepatosellüler hasarı arttırdığı ileri sürülmüş ve prekor/kor mutantlarının fulminant hepatit ile hızlı progresyon gösteren kronik hepatit oluşumunda rol oynayabileceğine işaret edilmiştir (34,42).

HBV taşıyıcısı anti-HBe negatif anneden doğan bazı bebeklerde yaşamlarının erken dönemlerinde beklenmemesine rağmen fulminant hepatit geliştiği bildirilmiştir. Konu ile ilgili çalışmalar anti-HBe pozitif annelerin, hastalık yapıcı HBV yanında farklı prekor mutantları ile koinfekte olduklarını, bulaştan sonra bebeklerde karışık virüs popülasyonunun seçim işleminin başladığını ve özellikle viral yaşam siklusunda avantajlı olan mutantların öne geçerek infeksiyona neden olduğunu ortaya koymuştur (43,44).

Doku Seçimi :

Karaciğer hücreleri HBV ile en fazla infekte olan hücrelerdir. Bunun yanı sıra HBV DNA ve bazen de viral antijenlerin monositlerde, B hücrelerinde, CD4 ve CD8 (+) T hücrelerinde, polimorfonükleer lökositlerde, nadiren cilt ve böbrek hücrelerinde bulunabildiği bilinmektedir (4,45,46).

Epidemiyoloji :

HBV; infekte vücut sıvılarına perkütan veya mukozal temas ile , infekte kişiyle cinsel temas ile, infekte anneden bebeğine perinatal yolla ve infekte kişiyle cinsellik içermeyen yakın temas ile bulaşır (47,48). Dünya nüfusunun yaklaşık % 45'i kronik HBV infeksiyonunun yüksek sıklıkta görüldüğü (nüfusun % 8'den fazlası HBsAg pozitif) bölgelerde, % 43'ü orta sıklıkta (nüfusun % 2-7'si HBsAg Pozitif) olduğu bölgelerde ve % 12'si düşük endemili (nüfusun % 2'den azı HBsAg pozitif) bölgelerde yaşamaktadır (3).

Yüksek risk grupları; intravenöz ilaç kullananlar, homoseksüel erkekler, birden fazla kişiyle cinsel ilişkide bulunanlar, kronik HBV enfeksiyonu olan biriyle aynı evde yaşayanlar, hemofili hastaları, hemodiyaliz hastaları ve bu birimde çalışanlar, kan ve enfekte gereçlerle işi gereği uğraşanları kapsamaktadır (47).

Tüm dünyada akut ve kronik HBV enfeksiyonlarının sonuçları ciddi halk sağlığı problemidir. Dünya nüfusunun yaklaşık % 5'i kronik HBV enfeksiyonu ile karşı karşıyadır (3).

Ülkemizde HBsAg seroprevalansını ölçmeye yönelik çalışmalar 1972'den itibaren yoğunluk kazanmıştır. HBsAg seroprevalansı ELISA yöntemi ile % 3.9-12.5 civarında belirlenmiştir. Bu değer bölgeden bölgeye değişmekte, Diyarbakır ve çevresinde en yüksek düzeylere ulaşmaktadır (14). Bu değerlerle Türkiye orta endemili bölgeler arasındadır (49).

Patogenez :

Virüsler tarafından karaciğerde oluşturulan hasarın mekanizması halen tam olarak bilinmemektedir. Hasarın mekanizmasının immunolojik temele dayandığı yönünde teoriler öne sürülmüştür. HBV enfeksiyonuna karşı gelişen hücresel ve humoral immün cevap ise karışıktır. Antikorların, kandan virüsün temizlenmesinde ve enfekte karaciğer hücrelerinin çevrelenmesinde, hücresel immünitinin ise virüs barındıran ve antikorlarla çevrelenerek işaretlenmiş hepatositlerin yıkımında rol aldığına inanılmaktadır.

Tanı :

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

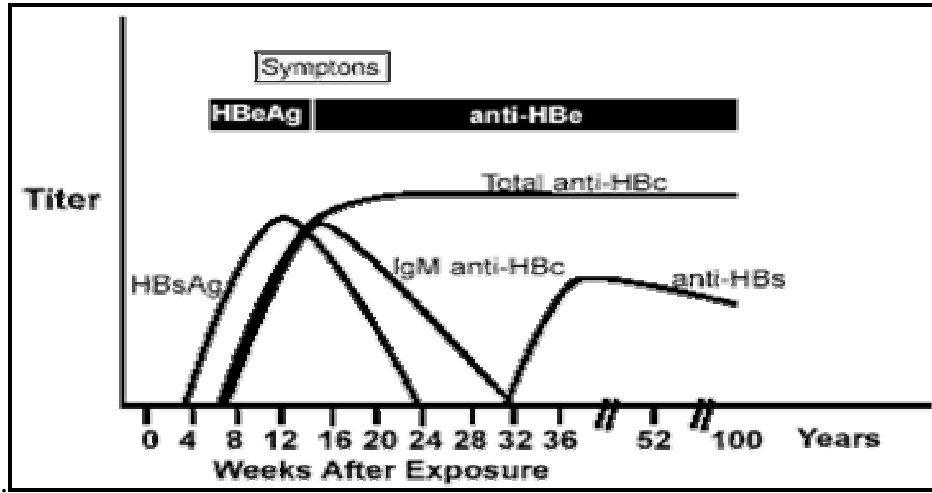
1-Biyokimyasal testler:

Akut B hepatitinde aspartat aminotransferaz (AST) ve alanin aminotransferaz (ALT) düzeylerinde normalin üst sınır seviyesinin 10-100 katına kadar olabilen yükselmeler saptanır. AST/ALT oranı 1'in altındadır (50). Aminotransferaz düzeylerinin en üst seviyeye ulaşmasından 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 B hepatitinde AST, ALT orta derecede yükselmektedir. Serum bilirübini ciddi hastalık dışında normaldir. Serum aminotransferaz düzeyleri karaciğerdeki hasarın derecesini tam olarak yansıtmaz (51).

2-Serolojik Testler :

Akut HBV enfeksiyonu: Akut enfeksiyonda ilk tespit edilen antijen HBsAg'dir. (Şekil 5). HBsAg en erken virüsün vücuda girişinden sonraki 1. veya 2. haftada, en geç 11. veya 12. haftada tespit edilir (4).



Şekil 5 : Akut HBV Enfeksiyonunun Gidişi (52)

Kendini sınırlayan enfeksiyonlarda HBsAg kompleman fiksasyon yöntemi ile 1-6 hafta boyunca tespit edilebilir. Ancak 20 hafta boyunca belirlenebildiği vakalar da vardır ki bu durum taşıyıcılıkla ilgilidir. HBsAg titresi sarılık ve diğer klinik belirtilerin ortaya çıkması ile düşmeye başlar.

Pasif hemaglutinasyon ve RIA (radioimmuno assay) yöntemleriyle yapılan çalışmalar HBeAg'nin HBsAg'nin belirmesinden birkaç gün sonra belirmediğini, titresinin HBsAg'ye paralel yükselip zirve yaptığını, semptomların görülmesinden sonraki 10 hafta içinde de düştüğünü göstermiştir. Bu tip enfeksiyonlarda HBeAg HBsAg'nin yok oluşundan hemen önce kaybolmaktadır. HBV DNA'nın C gen bölgesindeki mutasyonlar sonucu HBeAg'nin negatif olduğu aktif viral replikasyonlu HBV enfeksiyonları görülmüştür (45,53). Bu nedenle daha önce aktif enfeksiyon belirteci HBeAg iken şimdi HBV DNA'nın bu konuda daha anlamlı olduğu kabul edilmektedir (45,54,55,56).

HBeAg'nin kayboluşundan hemen sonra anti-HBe görülür. Anti-HBe HBV infeksiyonunun düzelmesinden sonraki 1-2 yıl boyunca belirlenebilir düzeyde kalmaya devam eder.

HBsAg ve HBeAg'den sonra DNA ve DNA polimeraz barındıran virionlar görülür. Klinik hepatit başlangıcıyla birlikte miktarları azalır ve klinik hepatit tablosunun bitmesinden hemen önce kaybolur.

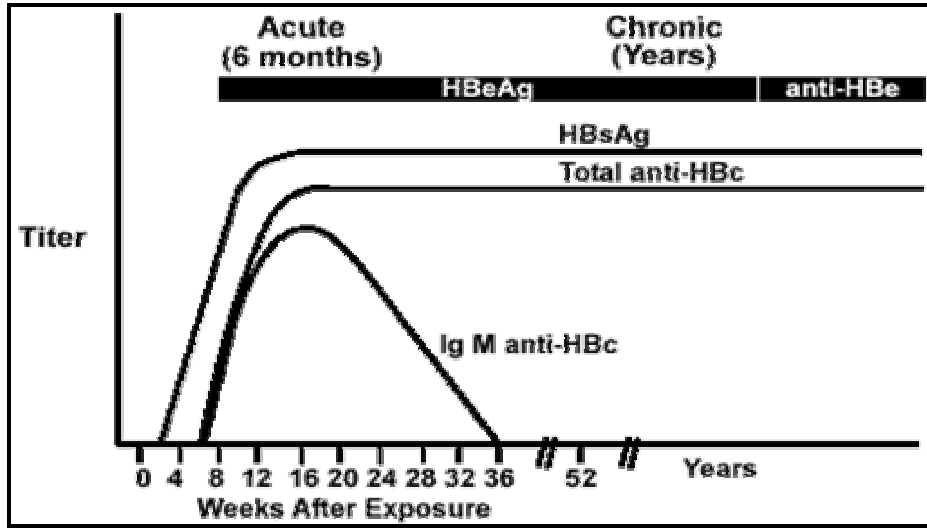
Dördüncü sırada klinik hepatit başlangıcından hemen önce anti-HBc görülür. HBsAg'nin varlığında hızla yükselir ve HBsAg'nin kaybolmasıyla düşmeye başlar. Çoğu hastada anti-HBc akut infeksiyondan 5-6 yıl sonra bile belirlenebilmektedir (9). Akut hepatitli hastaların çoğunda anti-HBc IgM tipindedir ancak anti-HBc IgG aktivitesi de mevcuttur.

Akut HBV infeksiyonu seyrinde HBsAg kaybolduktan bir süre sonra, hastalık başlangıcından üç ay sonra anti-HBs ortaya çıkar. Bu gruptaki hastaların yaklaşık yarısında HBsAg ve anti-HBs'nin negatif, yalnızca anti-HBc IgM'nin pozitif bulunduğu bir dönem olduğu ve bazen bu dönemin birkaç aya kadar uzadığı bilinmektedir. Bu dönem "*pencere dönemi (window period)*" veya "*kor periyodu (core period)*" olarak adlandırılır (57,58).

Düzelme döneminde anti-HBs cevabı HBsAg kaybolduktan 6-12 ay sonrasında kadar yavaş yavaş yükselir. Anti-HBs ile birlikte anti-HBc varlığı düzelme döneminde görülürken yalnız anti-HBs varlığı aşılama sonrasındaki birey serolojisini tanımlamaktadır (59,60).

Kronik HBV infeksiyonu : Sağlıklı yetişkinlerde akut infeksiyondan sonra kronikleşme riski % 5 civarındadır (51,61). Kronik hepatit B'li hastaların hemen tamamında HBsAg ve anti-HBc IgG pozitifdir (Şekil 6). 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 (4,51,53,62).

HBsAg taşıyıcılarının bir kısmında belirlenebilir düzeyde HBV DNA veya HBeAg saptanamamaktadır. Ayrıca bu hastaların çoğunda karaciğer hastalığı belirtilerinin olmadığı veya çok hafif düzeyde olduğu gözlenmektedir. Bu kişiler "sağlıklı taşıyıcı" olarak adlandırılmaktadır (4).



Şekil 6 : Kronik HBV İnfeksiyonunun Gidişi (52)

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

Enzim immünoassay (EIA) : Duyarlı ve özgül bir yöntemdir. Hasta serumuna araştırılan antijene özgü antikor eklenerek antijen –antikor çiftlerinin oluşması sağlanır. Bu antikorlara bağlanabilen, enzimle işaretli antikorlar ortama eklendikten sonra enzimle reaksiyona giren kromojenik substrat karışıma konur. Oluşan renkli reaksiyon ürünleri ölçülür (63).

Tekrarlayan yalancı pozitiflikler yöntemdeki düzenlemeler ile azaltılmaya çalışılmaktadır. EIA kitlerinin raf ömrü RIA kitlerinininkinden daha uzundur. Bu yöntem ile 0.25-0.5 ng/ml düzeyinde HBsAg tespit edilebilmektedir (64).

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

3- Direkt İnceleme, Hücre Kültürleri ve Hayvan Modelleri :

Klinik laboratuvarlarda ve HBV taramalarında uygulanabilir olmasada 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.

Sağaltım :

Akut hepatit B infeksiyonunda semptomatik ve destek sağaltım uygulanır. İyi dengelenmiş bir diyet ayarlanır. İlaç sağaltımına çoğunlukla gerek yoktur (50).

Günümüzde asemptomatik, sağlıklı HBsAg taşıyıcılarına yönelik etkili bir sağaltım şekli henüz bulunamamıştır.

Yapılan çok sayıda çalışma sonrasında kronik hepatit B infeksiyonlu ve aktif replikasyonu olan hastalarda interferon-alfa ile sağaltım uygulanmaya başlanmıştır (50).

Ayrıca antiviral ilaçlar üzerinde de çalışmalar yoğun şekilde devam etmektedir. Denenmiş veya denenmekte olan başlıca sağaltım seçenekleri;

a-Nükleozid analogları

b-Immunomodulator ilaçlar

c-Moleküler biyolojik yöntemler

d-İlaçların karaciğere hedeflenmesi ile yapılan sağaltımlar olarak sayılabilir. Bu sağaltım seçeneklerinin bir bölümünün sadece tarihi değeri kalmıştır. İnterferon dışında en umut verici olanlar nükleozid analoglarıdır.

Karaciğer sirozu varlığında transplantasyon bir miktar başarıya sahiptir. Hepatosellüler karsinomada prognoz çok kötüdür. Tümör rezeksiyonu kemoterapi veya radyoterapi uygulanmaktadır.

Korunma :

Hepatit B virüsünün toplumdaki yaygınlığını önlemede iki konu büyük önem taşımaktadır. Bunlardan biri genel önlemler olup, özellikle sağlık personelinin bulaşa yol açabilecek riskli temaslardan kaçınmalarını içerir. Kontrol önlemleri için hepatit B

virüsünün epidemiyolojik ve biyolojik özelliklerinin bilinmesi de gereklidir. Korunmada büyük önem taşıyan bir diğer konu da immunoproflaksidir.

HBV bulaşının önlenmesi aşağıdaki başlıklar altında incelenir;

1-Genel önlemler

2-Immunprofilaksi

a-Pasif bağışıklama

b-Aktif bağışıklama

c-Pasif + aktif bağışıklama

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

2-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 bir maya hücresinde (*Saccharomyces cerevisiae*) klonlanmıştır. Maya hücresinin genetik yapısı içerisine yerleştirilen ve hücrenin replikasyonu ile üretilen HBsAg'i iki aşamalı kromatografi işlemi ile purifiye edilmiştir (28).

Üç doz intramüsküler hepatit B aşısı uygulanan yenidoğan, çocuk ve genç erişkinlerin %95-99'unda koruyucu antikor düzeyi (anti-HBs > 10 mIU/ml) sağlanır. Ancak 40 yaşın üzerindekielerde ve immün yetmezliklerde bağışıklanma daha güçtür. Aşının immunojenitesi, hepatit B immunglobulini veya diğer aşılardan birlikte uygulanması ile azalmaz. Aşılardan ve antikor titresi > 10 mIU/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 (65,66).

Hepatit B aşısının standart uygulama şeması 0, 1 ve 6. aylar olmakla birlikte, enfekte 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 (67, 68).

Primer aşı şeması uygulanan kişilere, düzenli olarak rapel yapılmasının gerekip gerekmediği henüz netlik kazanmamıştır.

Hepatit B aşısının risk gruplarına uygulanması ile hastalığın insidansında herhangi bir azalma sağlanamamıştır (68,69). Bu nedenle bir yandan risk altındaki kişileri aşılama devam ederken, diğer yandan da aşının rutin çocukluk çağı aşıları arasına girmesi bir çok ülkede kabul görmüştür. Ülkemizde de 1998 yılında çocukluk çağı aşıları arasında yer almıştır.

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. İğne batması gibi yaralanmalarda ilk 48 saat içerisinde verilen HBIG'in, 3-7. günler arasında verileden daha etkili olduğu ile ilgili bilgiler vardır (70). 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 (71).

Mutant Virüsler :

HBV DNA polimerazın genomik kontrol aktivitesinin düşük olması HBV mutantlarının açığa çıkmasına neden olur. Bu varyantların bir bölümü konak immün yanıtından kurtulur. Dünyanın çeşitli ülkelerinden aşılanmış bireylerin virüsün moleküler varyantları ile HBV infeksiyonuna yakalandıklarına dair yayınlar vardır (72). Bu varyantların bazılarının oluşturduğu HBsAg'nin aşı tarafından oluşturulan antikorlarca tanınmadığı ve koruyucu düzeyde anti-HBs bulunduğu halde akut HBV infeksiyonunun olduğu gözlenmiştir. Araştırmalar "a" determinantındaki bir aminoasit değişiminin, anti-HBs antikorlarınca tanınan epitopta yapısal bir değişime neden olduğunu ve bu yapısal değişimin tanımayı olanaksızlaştırdığını göstermiştir.

Mutantlar ; artmış veya azalmış patojenite, replikasyon hızında azalma, HBsAg negatif infeksiyon ve konvansiyonel tekniklerle tüm antijen ve antikorları negatif infeksiyonlarla karşımıza çıkarırlar.

Nükleik Asit Tespit Yöntemleri :

DNA Yapısı:

DNA bir nükleotid polimeridir. Her bir nükleotid bir baz grubu (Adenin (A), Timin (T), Guanin (G), Sitozin (C)), bir riboz grubu (5 karbon atomlu siklik şeker) ve

bir fosfat grubundan oluşur. Bir DNA fragmanının bir ucunda daima 5' karbonu ve buna bağlı bir fosfat (5'-fosfat), diğer ucunda 3' karbonu ve buna bağlı bir hidroksil grubu (3'-OH grubu) bulunmaktadır.

Çift zincirli DNA'larda baz grupları karşılıklı olarak A ile T iki, G ile C üç hidrojen bağı oluşturarak birbirlerine bağlanırlar. DNA'nın kalıp olarak kullanılıp komplementer şeklinin oluşturulmasında DNA polimeraz görev alır.

Amplifikasyon Yöntemleri:

1-Hedef amplifikasyon yöntemleri:

Hedef amplifikasyon yöntemi hedef molekülün enzimatik replikasyon ile kolayca belirlenebilir düzeylere kadar arttırıldığı yöntemdir.

a-Polimeraz Zincir Reaksiyonu-Polymerase Chain Reaction (PCR) :

Üzerinde en çok çalışılan ve yaygın kullanılan hedef amplifikasyon yöntemidir (73).1983'te Kary Mullis tarafından ortaya atılan, 1985'te Saiki ve arkadaşlarının , 1987'de Mullis ve Faloona'nın geliştirdikleri bu yöntemde ısıya dayanıklı bir DNA polimeraz hedef genetik materyal miktarı her ısı döngüsü ile iki katına çıkarılır (74,75).

PCR ile DNA'nın çoğaltılabilmesi için tepkime karışımında şu ana maddelerin bulunması gerekmektedir; Çoğaltılacak olan hedef DNA, bu DNA'da çoğaltılması planlanan bölgenin iki ucundaki DNA dizisini özgül olarak tanıyıp bağlanacak olan DNA primerleri, primerlere bağlanıp bunlara 3' ucundan nükleotidleri ekleyerek sentez yapacak olan DNA polimeraz, sentezde kullanılacak olan deoksinükleotid trifosfatlar, polimerazın çalışması için gerekli tampon görevi yapacak maddeler, tuzlar ve enzim çalışması için önemli bir kofaktör olan magnezyum iyonları (76).

PCR üç basamaklı bir işlemdir;

İlk basamak“denaturasyon” basamağıdır. Burada DNA molekülünün ısıya dayanıklılık özelliğinden yararlanılarak ısı 95°C'ye yükseltilir ve DNA'nın iki zinciri birbirinden ayrılır.

İkinci sırada “bağlanma” basamağı vardır. Isı 55-60°C'ye düşürülür. İki primer kendilerine karşılık gelen sıralamayı bularak DNA zincirlerine hidrojen bağlarıyla bağlanırlar. Ortamda kalıp DNA'dan milyonlarca kez fazla primer bulunması; bunların küçük ve daha hareketli olması dolayısıyla ayrılan DNA'ların birbirlerine yeniden bağlanması yerine primerler kalıp DNA zincirlerine bağlanırlar.

Üçüncü basamak ise “uzama” basamağıdır. Bunun için ısı 72°C’ye çıkarılır. Isıya dayanıklı olan ve *Thermus aquaticus* adlı bakteriden elde edilen DNA polimeraz enzimi (*Taq* polimeraz) ile primerin 3’ ucuna nükleotidler eklenerek uzama işlemi gerçekleşir.

Isıya dayanıklı *Taq* polimeraz gibi bir enzimin bulunması her döngüde denatürasyon için arttırılan ısıda inaktive olan polimeraz yerine yeni polimeraz eklenmesi gereksinimini ortadan kaldırmıştır. Ayrıca her döngü sonrasında artarak biriken, ısıdan dolayı işlevini kaybetmiş polimerazın işleme engel olması gibi bir durum da ortadan kalkmıştır. Düşük ısılarda primerlerin kendilerine özgül olmayan yerlere bağlanması söz konusudur. *Taq* polimeraz sayesinde primer bağlanması ve uzaması sırasında yüksek ısılara çıkılabilmesi ile özgül olmayan bağlanmalarının azaltılması mümkün olmuştur. *Taq* polimerazın en etkin olduğu ısının 70-80°C arasında olduğu gösterilmiştir (77).

Tipik PCR programında denatürasyon işlemi için 3-5 dakika, bağlanma için 30 saniye- 2 dakika, uzama basamağı için 45-60 saniye süre önerilir. Ortalama döngü sayısı 35-45 kadardır (78). Sürelerin uzatılması veya döngü sayısının arttırılması genellikle çoğaltmayı arttırmamakta hatta bazen enzim denatürasyonuna neden olmaktadır.

İlk döngüde uzama basamağında primerin birinden başlayan işlem diğer primerin bağlandığı bölümü aşarak devam eder. Bu DNA parçalarına “uzun ürün” denir. Üzerlerinde diğer uçtaki primerin bağlanabileceği bölge bulunduğu için bir sonraki döngüde bunlar da kalıp görevi yaparlar. Ortamın tekrar soğutulması ile primerler hem ilk kalıp hem de bu yeni oluşmuş parçalar üzerinde kendilerine uygun yerlere bağlanırlar ve ikinci döngüde bunlar üzerinde de DNA sentezi yapılır. Ancak bu kez kalıp ilk primer bölgesinde sonlandığı için “kısa ürün” denen kısa DNA parçaları oluşur. Asıl çoğaltılan bölüm olan bu kısa ürünlerin miktarı 2^n (n:döngü sayısı) olarak hesaplanabilir (79). Bu sayede uygulanacak tanı yöntemleri için yeterli sayıda DNA elde etmek mümkün olabilmektedir.

DNA, primerler, nükleotidler, tampon solüsyonları ve enzim ısıya dayanıklı olduğundan ısı değişimlerini ardı ardına uygulamak döngüyü gerçekleştirmek için yeterlidir (79).

Kullanıma girdiği günden beri üzerinde çalışmalar devam eden PCR yönteminde ısıya dayanıklı DNA polimeraz enziminden sonra “thermal cycler”

denilen düzenek önemli bir gelişme olmuştur. Bu düzenek belirli ısılarda belirli süre değişmeden kalmayı sağlayan, ısı değişimlerinin kolayca ve hızlı yapılabildiği bir bloktan oluşmaktadır. Böylece her ısı düzenlenmesi sırasında çok sayıda işleme gerek kalmamış ve kontaminasyon riski ortadan kaldırılmıştır. Blok, tüplerin her tarafını aynı miktarda ısıtabilmekte böylece işlemin başarısı artmaktadır. Bu düzenek içinde kullanılan reaksiyon tüplerinin çeperleri inceltilecek ısı değişimlerinin daha hızlı ve kolay biçimde reaksiyon ortamına ulaştırılması olası olmaktadır.

Hedef DNA Seçimi :

DNA'nın PCR ile çoğaltılması değişik amaçlarla yapılabilir. DNA dizisi saptanacak ise veya mutasyonlar belirlenecek ise DNA'nın hangi bölgesinin çoğaltılacağı bellidir. İnfeksiyon hastalıklarının tanısında kullanılacak ise çoğaltılacak gen bölgesinin seçimi büyük önem taşır. Etken olabileceği düşünülen organizmanın öyle bir gen bölgesi seçilmelidir ki bu bölge başka hiçbir organizmanın gen bölgesi içinde bulunmamalıdır. Bu amaçlarla yapılan çalışmaların geldiği noktada artık bilgisayarlarla oluşturulan gen bankaları ile aranan mikroorganizmanın hangi özgül gen bölgesinin araştırılmasının daha iyi sonuç vereceği bilgisine ulaşmak olasıdır.

Örnek Hazırlanması :

Öncelikle işleme alınacak olan hücre ögelerinin saf olarak eldesi gerekmektedir. Nükleer materyalin saf eldesi öncesi iki ana karar verilmiş olmalıdır;

1-DNA bütün olarak mı gereklidir.

2-Miktar ne olmalıdır. Bunun için maliyet, kullanılacak yöntem etkinliği göz önünde bulundurulur.

Parçalama ve saflaştırılma işlemi sırasında elde edilmek istenen maddenin kaybedilip kaybedilmediğini veya işlevini koruyup korumadığını bilmek önemlidir.

Dayanıklılığı arttırmak, doğal hali korumak, oksidasyonu önlemek, donma derecesini düşürmek, çeşitli enzim işlevlerini düşürmek birçok durumda önemlidir. Bu amaçla tampon solüsyonlar kullanılır, ısı artışını önlemek için işlemler soğuk ortamda yapılır, saflaştırılan molekülü parçalayabilen DNaz, RNaz ve proteaz için inhibitörler ortama konur.

Hücre ekstralarının hazırlanmasında birkaç yöntem mevcuttur. Enzimler ile parçalanmada hedef hücrenin özelliğine göre lizozim, lizostafin gibi enzimler

kullanılır. Mekanik parçalanmada bir silindir içinde basınç uygulama, ultrasonik dalgalar ile sıvıda çok hızlı hareket eden kabarcıklar oluşturma ve cam boncuk ile çalkalayarak parçalama yöntemleri vardır. Bunların dışında hücreler NaCl, EDTA, sodyum perklorat çözeltisi, kloroform-izopentanol, trisodyum sitrat, RNaz, sodyum dodesil sülfat gibi maddelerin karıştırılarak hazırlandığı karışımlarla işlem yapılarak parçalama işlemi gerçekleştirilebilir (80). Tüm bu işlemler sonunda ulaşılması istenen hedef nükleer gereçlerin elde edilmesidir.

Primer Seçimi :

Amplifikasyon işleminin başarısını etkileyen en önemli etkenlerdendir. Genellikle primerler 25-35 baz uzunluğunda hazırlanırlar. Primerlerden biri DNA zincirlerinden birine, diğeri DNA zincirinin diğesine komplementer olarak bağlanır. Primerlerin birbirlerine uzaklıkları yani çoğaltılacak parçanın boyu 150-1000 nükleotid arasında olmalıdır. DNA polimerazlar bir süre işlem yaptıktan sonra DNA üzerinden ayrılırlar. Dolayısıyla uzun parçalarda verim azalmaktadır. Buna karşın çoğaltılacak parçanın boyunun mümkün olduğunca uzun olması jel elektroforezi gibi son aşamada ürün belirlenmesinde kullanılan yöntemlerde daha kolay belirlenmeye neden olmaktadır. Bu nedenlerle optimal miktar belirlenmeye çalışılır. Seçilen primer dizilerinin çoğaltılacak DNA dizisinde sadece bir kez bulunduğundan emin olunmalıdır. Primerin kendi içinde ve primerler arasında komplementer dizilerin olmamasına özen gösterilir. Kısa primer dizileri (20 bazdan az) yanlış bağlanmalara neden olur, bu yüzden tercih edilmez (81). Daha uzun primerlere ise genellikle gerek duyulmamaktadır. Uzun primerlerle sonuçta daha az DNA elde edilmektedir (82). Ayrıca beklenen özgüllük artışına da ulaşamamaktadır (82). Guanin ve sitozin arasında üçlü hidrojen bağı bulunması daha sıkı bağlanma sağladığından özellikle 3' ucunda guanin ve sitozinden zengin primerlerin uzama basamağını daha sağlam gerçekleştirdikleri bilinmektedir (78). Primerlerin içerdiği nükleotid oranları ile benzer olmalıdır (78).

Primer konsantrasyonu düşük olduğunda reaksiyon etkinliği düşük olmakta, yüksek olduğunda ise özgül olmayan amplifikasyon ürünleri açığa çıkarak özgüllük azalmaktadır (82). Ekonomik nedenlerle en fazla duyarlılık ve özgüllüğün sağlandığı en küçük konsantrasyondaki primer miktarı tespit edilmeye çalışılır. Yüksek konsantrasyonda primer varlığı primer dimerlerinin oluşumuna ve hedef DNA'nın amplifikasyonunun azalmasına neden olur.

PCR için primer seçimi yanında primer bağlanma sıcaklığı, iyon yoğunlukları, ek madde ve çözücülerin yoğunluğu önem taşımaktadır.

Primer bağlanma sıcaklığı örnekteki genetik kompleksite arttıkça daha önemli hale gelmektedir. Ampirik olarak belirlenen ısılarda küçük oynamalarla optimal değere ulaşılmaya çalışılır. Ampirik değer belirlenirken de hazırlanmış birtakım formüllerden yararlanılır (78). Genellikle optimal bağlanma sıcaklığı bu matematiksel formüllerle elde edilen değerden biraz yüksektir.

Magnezyum İyon Konsantrasyonu :

İşlem sırasında kullanılan iyonlardan en önemlisi magnezyumdur. DNA polimeraz enziminin en önemli kofaktörüdür. DNA zincirlerinin bir araya gelmesini, polimerizasyon sırasında nükleotidlerin yeni yapılan zincire eklenmesini kolaylaştırır.

Magnezyum konsantrasyonu arttıkça primerlerin bağlanması kolaylaşır ancak bu kez yeni sentezlenen zincirin kalıp DNA'dan ayrılması zorlaşır. Bu nedenle değişik magnezyum konsantrasyonları denenerek en iyi sonuç veren uygulamaya alınmalıdır.

Düşük konsantrasyonda iken primer bağlanma ve nükleotid eklenme işleminin etkinliği azalır, yüksek konsantrasyon ise düşük reaksiyon özgülüğünün nedenidir (82).

Deoksinükleotid Trifosfatlar :

Deoksinükleotid trifosfat (dNTP) konsantrasyonu, Mg^{+2} konsantrasyonu dikkate alınarak hesaplanır. Genellikle 20-200 mM arasında değişir. Çok fazla olduğunda özgülük azalır ve maliyet artar, çok az olduğunda ise amplifikasyon işleminin başarısı düşer (82).

Enzim Seçimi ve Konsantrasyonu :

PCR protokollerinde kullanılan polimeraz konsantrasyonları belirgin değişkenlik gösterir. Ancak *Taq* polimeraz için bu değer 1-2.5 U/100µl reaksiyondur (82). Enzim konsantrasyonu yüksek olduğunda bu durum jel elektroforezinde nonspesifik bant oluşumu ile sonuçlanır. Düşük olduğunda ise amplifikasyon işleminin etkinliği azalır (82).

İyi sonuç alabilmek için işlem boyunca enzimin en etkin olduğu pH değeri (DNA polimeraz için 8.4 civarındadır) korunmalıdır. Bu amaçla çeşitli tampon solüsyonlar kullanılır. Ayrıca tek değerli katyonların özellikle 50-60 mM düzeyinde potasyum iyonunun çoğaltmayı arttırdığı saptanmıştır (77). Yine karışımda jelatin bulunması benzer etkiyi göstermektedir (78).

Önceleri ısı değişimleri sırasında reaksiyon karışımındaki sıvının buharlaşmasını önlemek için üzerine mineral yağ veya parafin konulmaktaydı. Bu şekilde hem ısı kaybı azaltılmakta hem de karışımın pH değeri ile tuz yoğunlukları korunabilmekteydi. Ancak bu katman zaman zaman kontaminasyonların, işlemler sırasında sıçramaların nedeni oluyordu. Günümüzde küçük hacimlerde ve kısa döngü sürelerinde amplifikasyon işlemlerinin tamamlanıyor olması ve geliştirilmiş “thermal cyclers” denen ve tüplerin üst kısımlarını da ısıtabilen aletlerle çalışılmaya başlanması bu tabaka olmaksızın da işlemin beklenen sonuçlara ulaşabileceğini göstermiştir.

PCR Karışımının Hazırlanması :

PCR ile DNA amplifikasyonunda ana karışım şu şekilde hazırlanır:

a-10-50 mM reaksiyon tampon çözeltisi, pH'sı 8.2-8.9 arasında ayarlanmalı ve içinde 50-60 mM KCl, 1-2.5 mM MgCl₂ ve 100-200 µg/ml jelatin bulunmalıdır.

b-Karışımında her bir deoksinükleotid trifosfattan (dATP, dTTP, dGTP, dCTP) ortalama 200 µM bulunmalıdır.

c-Primerler 0.2-1 µM olarak karışıma eklenir.

d-1-2.5 U ısıya dayanıklı DNA polimeraz bulunur. Bu karışıma 100 µl kadar distile su eklenir.

Amplifikasyon Ürünlerinin Belirlenmesi :

DNA problemlerinin kullanılmaya başlanması ile amplifiye edilmiş nükleik asitlerin saptanmasında yeni yöntemler kullanıma girmiştir. Problemlerin enzim ile işaretlenmesiyle enzim immunoassay bu alana eklenmiştir (83). Daha sonra primerlerin digoksinin ile işaretlenmesi ve anti-digoksinin antikolarıyla yakalanması şeklinde tanımlanan immunokromatografik yöntem yaygınlaşmıştır (83). Işık yayılımı ile seyreden kimyasal reaksiyonlar kemiluminesan yöntemleri gündeme getirmiştir (83). Tüm bu gelişmelere rağmen araştırma laboratuvarlarında en sık kullanılan yöntem agaroz jel elektroforezidir.

Nükleik asitteki tekrarlayan şeker fosfat yapı bu çizgisel molekül üzerinde net bir negatif yükle örtülü bölüm oluşturur. DNA veya RNA'nın elektriksel alanda hareketi molekül ağırlığı veya uzunluğu ile orantılıdır. Bu iki özellik nükleik asit fragmanlarının elektroforetik ayırımı ile tanımlanmasında kullanılır. Çok sayıda örnek katı ama gözenekli ayırım ortamının bir ucunda ayrı kuyucuklara uygulanır. Voltaj uygulandığında her bir kuyucuktaki örnek doğrusal olarak bir hat üzerinde pozitif

elektroda doğru hareket eder. Bu ortam “jel” olarak bilinmektedir. Migrasyon miktarının bilinen standart ile karşılaştırılması boyut belirlenmesine izin verir. Ayırıcı ortamın kompozisyonu ve konsantrasyonu farklı bantlarda ayrılmış olan parçaların boyutlarını belirler. Jel kalınlığı, elektroforez yolunun uzunluğu, zaman ve voltaj diğer değişkenlerdir. Pratikte bu etkenler ampirik olarak uygulanır ve her çalışmada tekrar tekrar en iyisine doğru düzenlenir. Sık kullanılan agaroz genellikle horizontal elektroforez yatağında tampon solüsyonuna batırılmış halde kullanılır. Örneklerin sukroz veya bazı boya maddeleriyle karıştırılarak ağırlık kazanmaları sağlanır ve kuyucuklara yüklenir. En sık kullanılan elektroforez tamponları TAE (0.04 M Tris bazı, 0.02 M glasiyal asetik asit, 1mM EDTA) ve TBE (0.089 M Tris bazı, 0.089 M borik asit, 1 mM EDTA) tamponlarıdır. DNA parçalarının hareket hızını her iki tampon solüsyonu aynı miktarda etkiler. Ancak TAE tamponunu daha sık yenilemek gerekmektedir (84). Oluşan bantların gözlenmesinde en basit yol etidyum bromür gibi bazlar arasına giren ve UV ile görünebilen boyaların kullanılmasıdır. İnfeksiyon etkeni tanısı için uygulanan çalışmada elektroforez sonunda beklenen büyüklükte ve tek DNA bantı görülmelidir. Aksi halde kontaminasyon akla gelir.

PCR Modifikasyonları :

1-Multipleks PCR :

Bu yöntemde aynı amplifikasyon reaksiyonu içinde farklı hedefler için hazırlanmış çok sayıda primer çiftleri kullanılır (73). Farklı hedeflerin koamplifikasyonu birkaç amaca yöneliktir;

- a) DNA dizisinin daha fazla bölümü incelenmiş olur.
- b) Hedef genomda birbirleriyle ilgisiz segmentler belirlenmiş olur.
- c) Örneğin amplifiye edilebilirliğinin iç kontrolü gerçekleşir.
- d) Tek bir örnekteki çok sayıdaki patojeni test edebilen daha ekonomik bir yöntemdir.

2-Nokta Mutasyon Belirlenmesi :

Bir primerin enzimatik uzaması 3' ucunun kalıcı bir baz çiftine sahip olmasına bağlıdır. 3' ucundaki baz çiftinde bir uyumsuzluk varsa uzama olmaz dolayısıyla PCR yöntemiyle amplifikasyon gerçekleşmez. 3' ucundaki baz uyumsuzluğunu yani olası mutasyonları kapsayan primerler kullanarak uzama işleminin devamını ve

böylece amplifikasyonu tamamlayan yöntemler geliştirilmiştir. Kullanılan primerlerden yola çıkarak nokta mutasyonu belirlenir.

3-Dizi Belirlenmesi :

Nükleik asit dizi değişimlerinin infeksiyon seyrindeki etkisi arttıkça, DNA dizi belirlenmesi daha büyük önem kazanmaktadır. Örneğin aşılandığı halde HBV infeksiyonuna yakalanan bireylerde nedenin bir HBV mutanı olduğu dizi belirlenmesi ile anlaşılmıştır (73).

Burada yüksek düzeyde değişkenlik gösteren, geniş kapsamlı primerler kullanılır. Amplifikasyonu başaran primerin dizi analizi ile hedef dizi belirlenir.

4-Nested Amplifikasyon :

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 (73).

Birinci amplifikasyondan sonra ürünlerin diğer tüpe taşınma işlemi sırasında oluşan inhibitör maddelerin büyük kısmının uzaklaştırılmasını sağlamaktadır.

Ancak tüpten tüpe transfer rutin klinik laboratuvarlarında önerilen bir durum değildir. Çünkü taşınma sırasında aerosol halindeki amplifiye olmuş DNA ile kontaminasyon oldukça sıktır (73). Taşınma sırasındaki kontaminasyonu önlemek için tek tüpte tüm işlemlerin tamamlandığı yöntemler geliştirilmektedir (73).

5-Kantitatif PCR :

Dikkatle kontrol edilebilen durumlarda başlangıçtaki hedef molekül miktarı ile PCR ürün miktarı arasında direkt bir bağlantı olduğu görülmüştür (73). Reaksiyon protokolünün maksimum verim alacak şekilde elverişli hale getirilmesi, fazla sayıda döngüden kaçınılması, örneğin uygun şekilde hazırlanarak amplifikasyon etkinliğini düşüren inhibitörlerin uzaklaştırılması gibi faktörlere dikkat edilerek PCR sonucunun kantitatif eldesi sağlanmaktadır.

Bu amaçla hazırlanan ve biraz farklı bir yaklaşım izleyen tekniklerden biri “Taqman™” veya “5’ nükleaz assay” dir (79). Primerin uzaması sırasında üçüncü bir oligonükleotid eklenir. Bu oligonükleotid primerin uzayan zincirinin içine girer. Oligonükleotid bir floresan ile işaretlidir ve kendisinin tek başına nükleik asite bağlanarak uzama gibi bir yeteneği yoktur. Sonrasında 5’→3’ ekzonükleaz aktivitesi gereğince *Taq* polimeraz tarafından yıkılan bu parçadan geriye bir floresan grup kalır. Yayılan floresan şiddeti amplifikasyona uğrayan molekül miktarı ile orantılıdır (79).

Kantitatif PCR yöntemi üzerinde çalışmalar yoğunlaşmış durumdadır. Halen standardizasyon ve işlemin güvenilirliği konusunda çözümlenememiş noktalar bulunmaktadır (85).

Transkripsiyona Bağlı Amplifikasyon Sistemleri :

PCR yöntemi dışındaki hedef amplifikasyon sistemlerinin ilkidir (73). Transkripsiyona dayalı amplifikasyon- transcription based amplification system (TAS)’da her döngüde iki bölüm bulunmaktadır ; Hedef nükleik asite komplementer bir DNA molekül sentezi ve yeni sentezlenen bu cDNA’nın kalıp olarak kullanılarak DNA transkripsiyonudur. İşlemler sırasında reverse transkriptaz, ribonükleaz H (RNaz H) ve T7 RNA polimeraz enzimleri kullanılır. Tüm yöntem izotermal reaksiyonlardan oluşur (83).

60 dakika gibi bir sürede hedef nükleik asitin 10^7 kat artması söz konusudur. PCR yöntemindeki gibi oligonükleotid primerler kullanılır. Ancak bu primerlerin en az birinde T7 polimeraz için promotor bölge bulunur.

TAS’dan yola çıkarak “self-sustaining sequence replication (3SR)” veya “nucleic acid sequence-based amplification (NASBA)” teknikleri geliştirilmiştir.

3SR ile amplifikasyonda ürün 30 dakika sonunda 10^8 katına kadar çıkabilmektedir (73).

Zincir Yer Değiştirme Amplifikasyonu – Strand Displacement Amplification (SDA) :

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 diğer 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.

SDA izotermal (41°C'de ortalama 2 saat) bir reaksiyondur.

Ligasyon ile Aktive Edilmiş Transkripsiyon-Ligation Activated Transcription (LAT) :

LAT izotermal hedef amplifikasyon sistemidir. DNA ligaz, reverse transkriptaz, T7 RNA polimeraz ve RNaz H enzimlerinin kullanılması söz konusudur. Bu yöntemde hedef DNA kısmen çift zincirli, saç tokasına benzeyen ve T7 RNA polimeraz promotörü taşıyan bir primere bağlanır. Primerin tek zincirli olan kısmı hedef DNA'nın 3' ucuna komplementerdir. Primerin hedef DNA'ya hibridlenmesi ile T7 RNA polimeraz çok sayıda komplementer RNA üretir. İkinci primer RNA'ya bağlanır ve reverse transkriptaz RNA'nın DNA kopyasını üretir. DNA-RNA hibritlerinin RNA parçası RNaz H ile yıkılır ve serbest kalan DNA orijinal primerin bağlanması ve daha fazla RNA kopyalarının oluşturulması için görevi devam eder. İçerikteki malzemeler sınırlanıncaya kadar bu işlem sürer. Her bağlanmış DNA'dan 50-100 RNA kopyası oluşturulmasından dolayı işlem güçlü ve hızlıdır (83). 10^7 - 10^8 kat artış 3 saat içinde gerçekleşir.

Probe Amplifikasyonu

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

a-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 (73).

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. Bağlanmamış proplar uzaklaştırılır. Q-Beta replikaz ve bol miktarda ribonükleotid trifosfat eklenir. Q-Beta replikaz içinde probe bulunan ve bu kısmıyla hedefe bağlanmış RNA zincirini çoğaltır (73,83). Elde edilen ürünlerin kantitatif değerine ulaşmak mümkündür (73).

Sistem çok hızlıdır. 10 dakikada milyon kez çoğaltma söz konusudur.

b-Ligaz Zincir Reaksiyonu- Ligase Chain Reaction (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 denature edilir, 65°C'ye soğutularak 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.

Oldukça duyarlı olan bu yöntemde hedeften bağımsız oluşan bağlanmalar özgülüğü düşürmektedir.

c-Döngüsel Probe Teknoloji-Cycling Probe Technology :

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.

Jel elektroforezi veya kemiluminesan yöntemler ile probe parçalarının DNA kısımlarının belirlenmesi testin pozitif olduğunu gösterir. Burada probe parçalarının amplifikasyonundan çok birikimi söz konusudur.

Sinyal Amplifikasyonu :

Hibridizasyona dayalı yöntemlerde duyarlılığı arttırmanın bir başka yoludur. Ancak enzimatik amplifikasyon yöntemlerinin duyarlılığına yaklaşmak henüz mümkün olamamıştır (73). Bu yöntemde radyoizotop, enzim veya florokrom gibi hedef nükleik asiti işaretleyen maddelerin konsantrasyonunu arttırılarak sinyal gücünün arttırılması söz konusudur. En basit formu her bir proba çok sayıda sinyal

bağlanması şeklindedir. Hedef molekülün farklı bölgelerine bağlanan kısa fakat çok sayıda problemlerle veya bir ucu ile hedef moleküle bağlanan normalden uzun bir proba bağlanmış çok sayıda işaretli kısa problemlerle 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.

Nükleik Asit Hibridizasyon Yöntemi

a-Hibridizasyon Teorisi :

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. Baz çiftleşmesi DNA'lar arasında, DNA ve RNA arasında ve RNA'lar arasında gerçekleşebilir. Baz çiftleri arasında uyum ne kadar az ise molekülün kararlılığı o kadar az olur.

Bir dubleks yapı içinde yanlış baz çiftlerinin karşı karşıya gelmelerinin tolere edilebilmesi "stringency" olarak adlandırılır ve çevresel koşullarla kontrol edilir (86). Yüksek tuz yoğunluğu, düşük ısı, formamide yokluğu gibi bazı koşullarda baz çiftleşmesi çok iyi değildir. Düşük tuz, yüksek ısı, yüksek formamide varlığında mükemmel çiftler heliks yapısı oluşur.

b-Hibridizasyon Yöntemi : Temel noktalar

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

c-Probe :

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

d-Örnek Hazırlanması :

RNA veya DNA hedeflerin bütünlüğünün korunması zor olabilir. Örnek hazırlanmasında amaç probun hedef ile reaksiyona girebilmesi için hedef

bütünlüğünün korunmasıdır. Nükleik asitlerin fiziksel ve kimyasal benzerlikleri, kaynak ne olursa olsun, ekstraksiyon ve saflaştırma işlemlerinin tek tip metod ile yapılabilmesini sağlamaktadır. Önemli olan nokta DNA'nın endojen nükleazlardan ve hücrel proteinlerin enzimatik yıkımından korunabilmesi için hücrelerin hızla lizis edilerek DNA'nın izole edilmesidir. Aynı şekilde RNA hazırlanmasında da hızlı davranmak önemlidir.

e-Hibridizasyon İşlemini Etkileyen Faktörler :

Hibridizasyon işleminin duyarlılık ve özgüllüğü reaksiyon sırasında fiziksel ve kimyasal çevreden, hibrid moleküllerinin oluşumu ve belirlenmesinden ciddi oranda etkilenir. Elektriksel yükten çok diziye özel hidrojen bağları ile nükleik asitlerin etkileşmesine yardım etmek için seçilmiş reagenlerin karışımı hibridizasyon kokteyli olarak adlandırılır. İçerik sıklıkla değişim gösterir ancak tamponlar, tuzlar, formamid gibi denatüranlar, yüksek molekül ağırlıklı polimerler, taşıyıcı DNA veya RNA, reaksiyon yerinin temiz olması için deterjan, domuz serum albumini gibi maddeler bulunmaktadır (86).

f-Hibritlerin Belirlenmesi :

Hibritlerin elde edilmesi ve analizi için çok çeşitli teknikler kullanılmaktadır. Hibritlerin belirlenmesi daha çok işaretleme yöntemine dayanır. Araştırmalarda ve bazı laboratuvarlarda fosfor-32 (^{32}P), iyot-125 (^{125}I), sülfür-35 (^{35}S), karbon-14 (^{14}C), gibi radyoaktif işaretlemeler ve otoradyografik okuma ve sintillasyon sayımı yapılmaktadır (86). Radyoaktif probalar kısa yarı ömürlüdür, laboratuvar elemanlarına zararlıdır, atıkları çevre için sorun oluşturmaktadır.

Bazı çalışmalarda nükleik asitler direkt olarak florokrom gibi sinyal oluşturan maddeye bağlanırlar. Daha sık olarak nükleik asitler çok adımlı yöntemler ile indirekt olarak belirlenirler. Biotin tarihte nükleik asitlerde kullanılan ilk işaret olmuştur. Biotinin kendisi sinyal oluşturmaz ancak avidin veya streptavidin gibi sinyal oluşturan moleküllere bağlanır. Bromodeoksiuridin, digoksinin, sulfone gibi başka işaretler de vardır. Bu durumlarda belirleme işlevsel gruplara karşı yüksek afiniteli antikolar ile sağlanır. Bu antikolar genellikle direkt olarak sinyal oluşturan enzimlere veya florokroma bağlanır. Biotin anti-biotin antikoru ile belirlenir. Radyoaktif olmayan yöntemlerin hepsinde optimal duyarlılığı sağlamak için işlemin tespit kısmı önemlidir. Hibridizasyon işlemi başarılı olmuş olsa bile sinyal

oluşumunun başarısız olması, yerinin temiz olmaması sonucu olumsuz etkiler. Enzim işaretlerinin seçimi, enzim substratı (kolorimetrik veya kemiluminesan) ve hatta reagen kaynakları sonuçlar için önemlidir.

g-Hibridizasyon Yönteminin Kontrolü :

Her hibridizasyon yönteminde hem pozitif hem de negatif kontrol testin geçerliliği açısından çalışmaya eklenmelidir. Pozitif kontrol çalışmaya komplementer diziyi taşıyan örnektir. Hibridizasyon yöntemi için örnek hazırlama aşamasının doğru olup olmadığını test koşullarında probun varsa hedefe hibridleneceğinden emin olmamızı sağlamak için kullanılır. Negatif kontrol ise proba komplementer olmayan dizi taşır ve probe-hedef etkileşiminin özgüllüğünü monitorize etmede kullanılır.

Sıvı veya Solüsyon – Faz Hibridizasyonu

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

Hibridizasyon hidroksiapatit gibi katı bir matrikse hibridlerin bağlanması ile sabitlenir. Bu matriksin özelliği yalnızca dubleks yapıların bağlanmasıdır (86). Hibridler bağlandıktan sonra hibridize olmamış yapılar yıkanarak uzaklaştırılır. Problemler üzerindeki işaretler hibridizasyonun kantifikasyonunda yararlıdır. Bu yaklaşımın varyasyonu olan ticari bir yöntemde (Hibrid-Capture™) hedef DNA ve RNA problemleri ile oluşan RNA-DNA çiftlerine özel antikorlar kullanılır.

Solüsyon-faz hibridizasyon yönteminde başka bir çok varyasyon 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 karşılaşılabılır.

Katı Destekli Hibridizasyon

Bu yöntem dot/slot blot hibridizasyon, Southern ve northern hibridizasyon ve in situ hibridizasyon gibi çeşitlilikler gösterir. Bu yöntemlerde hibridizasyon bifazik ortamda yani katı faz (genellikle örnek) ve sıvı faz (genellikle probe) birlikteliğinde gerçekleşir.

a-Dot/Slot Blot Hibridizasyon :

Bu yöntemde çok sayıda örnek nitroselüloz veya naylon membran üzerine yapıştırılır. Yöntemin adı her bir örneğin membrandaki şeklinden esinlenerek verilmiştir. Örnekler el ile uygulandığında şekil daha dağınıktır (blot). Ticari olarak hazırlanmış sistemlerle örnekler genelde emme işleminin kullanımıyla uygulanır ve şekiller daha düzenlidir; yuvarlak (dot) veya uzamış (slot). Katı matriks çok sayıda örneğin aynı anda işleme alınmasına izin verir. Örnek ve kontrollerin tamamen aynı reajan ve ortamla karşılaşması yöntem standardizasyonunu artırır. Örnek hazırlanması nükleik asitin tamamen saflaştırılmasından hiçbir işlem uygulanmadan direkt çalışmaya alınmasına kadar değişkenlik gösterir. Bir miktar örnek yıkımı tolere edilebilir. Saflaştırılmış nükleik asit probe ile daha kolay etkileşeceğinden avantajlıdır. Ancak bu işlem uzun sürede sonuç veren ve zaman alıcı bir işlemdir.

Eğer hibridizasyon gerçekleşir ise ilgili noktada bir sinyal oluşur. Sinyalde kullanılan işaretlemeye göre sonuç ölçülür. Ancak bazen sonuç negatif veya pozitif olarak verilir ki bu negatif ve pozitif kontrollere göre örneğin verdiği sonuçtur. Hedef molekülün çok az olması veya hedefin çapraz reaksiyon göstermesi durumunda zayıf sinyal oluşabilir ve bu durum değerlendirmede sorun yaratabilir. Hibridize olan parçaların boyutlarıyla ilgili bilgi elde edilmez.

Bu testin bir değişimi ters dot/slot blot assaydir. Burada bir örnek birden fazla sayıda probe ile reaksiyona girer. İşaret örnekle beraber işlemde ilerler. Problar bir katı desteğe iliştilmişlerdir. Özel hibrid oluşum alanları belirlenir ve standart dot/slot blot assaydeki gibi değerlendirilir.

b-Southern ve Northern Hibridizasyon :

Her ikisi de nükleik asitlerin katı desteğe transferi, elektroforetik ayırımı ve ardından hibridizasyonuna dayanır. Böylece hem hibridizasyonun olup olmadığı hem de hibridize olan moleküllerin molekül ağırlıkları belirlenir (86).

Orijinal yöntem E.M. Southern (1975) tarafından southern blot hibridizasyon veya southern blotlama olarak adlandırılmıştır. Burada test edilen DNA'dır (84). Northern blotlama benzerliklerinden dolayı bu ismi almıştır. 1977'de Alwine ve arkadaşları tarafından geliştirilmiştir. Burada test edilen RNA'dır.

Her iki yöntem için de örnek hazırlanması zaman alıcıdır. Örnekteki nükleik asitte az miktardaki yıkımlar sonucu önemli ölçüde etkilendiğinden bol miktarda örnek gerekmektedir. Southern hibridizasyonda DNA minimal kesilmelerle

saflaştırılmalıdır. Kesilme ve yıkılmalar örnekte dağılık kırıklara neden olur, uygun tanıma dizilerinden özel kesilmeler için yeterli miktarın bulunabilmesini zorlaştırır. Saflığın olmaması restriksiyon enzim aktivitelerini bozar.

Northern hibridizasyon için RNA toplanır ve hazırlarken yıkım olmaması için maksimum dikkatle çalışılır.

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 (84). Ancak nonradyoaktif problemlerin kullanımında oluşan zemin kirliliği artışı gibi bir dezavantajı da bulunmaktadır. Isıtılarak veya UV çapraz bağlama ile nükleik asitler sabitlenir ve tüm membran işaretli probe ile hibridlenir. Daha sonra hibridizasyonu otoradyografik veya kolorimetrik bant belirlenmesi izler. Bu bantlarda problemlere komplementer diziler bulunmaktadır. Bu işlemler birkaç gün alabilir. Molekül ağırlığı normalden farklı bant varlığı genetik örnekteki bir değişimi gösteriyor olabilir.

c-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, kolorimetrik ve floresan yöntemler kullanılır. Hedefin doku veya hücre içinde yerleşiminin önemli olduğu durumlarda yöntem kayda değer, ancak zaman alıcıdır.

Hepatit B Virus İnfeksiyonlarında Nükleik Asit Tespit

Yöntemlerinin Yeri

1970'li yıllardan bu yana HBV infeksiyonlarında serolojik tanı oldukça önemli yer tutmaktadır (16). HBsAg, donör tarama testleri içerisinde yer alan, akut ve kronik hepatit B infeksiyonu olgularının tanısında en sık başvurulan göstergedir. 1980'li yıllarda moleküler biyolojik teknikler tıp alanında yaygın kullanıma girmiştir. Bu tekniklerin etkin biçimde kullanıldığı alanlardan biri de HBV infeksiyonlarıdır. Hepatit B virüs infeksiyonlarında serolojik testlerin yetersiz kaldığı durumlarda, anti-viral sağaltım izleminde, mutasyonların belirlenmesinde, hepatosellüler karsinoma

oluşum mekanizmasının aydınlatılmasında moleküler biyolojik yöntemler yaygın kullanım alanı bulmuştur (87).

HBsAg'nin negatif olduğu kan bankası donörlerinde HBV DNA varlığının gösterilmesi ve infeksiyon geçişinin belirlenmesi moleküler biyolojik tekniklerin kan bankacılığındaki önemini artırmıştır (45,88).

HBV DNA araştırmalarında hibridizasyon tekniklerinden yararlanılarak 1 pg düzeylerindeki HBV DNA'yı saptamak mümkündür (55,87). Bu yöntemlerde yapılan işlem; hasta serumunun denatürasyonu ile HBV DNA'nın açığa çıkarılması ile başlar. HBV DNA dizisine komplementer proplar ile hibridlenme işlemi gerçekleştirilir. Ortamda sabitleştirilen hibridlerin belirlenmesi ile işlem tamamlanır. Yöntemin kantitatif olması önemli bir avantajdır. Ancak örneklerdeki az sayıdaki HBV DNA'yı tespit edememesi amplifikasyon işlemlerinin bu alanda kullanımını gündeme getirmiştir (45,89).

HBV DNA belirlenmesinde önemi gün geçtikçe artan PCR yönteminde amplifikasyon işlemi sonrasında kalitatif sonuçlar elde edilmektedir. HBV DNA düzeyinin düşük olduğu hastalarda belirlenebilir düzeylere kadar DNA'yı amplifiye edebilmek önemli bir üstünlük sağlamıştır. PCR yöntemi ile kantitatif sonuç alabilmek yolunda çalışmalar devam etmektedir.

HBV DNA'nın infektivite ve viral replikasyon göstergesi olduğu bilinmektedir (45,54,55,90,91). Özellikle klasik olarak replikasyon göstergesi kabul edilen HBeAg'nin mutasyonlar sonucunda negatifleştiği hastalarda aktif infeksiyon ve HBV DNA'nın moleküler teknikler ile saptanması infektivite belirlenmesine yaklaşımı değiştirmiştir (87).

HBV infeksiyonu sağaltımında önemli adımların atılması, hasta takibinde serolojik tanının yanı sıra HBV DNA takibinde önemi artmıştır. Bu konuda özellikle kantitatif yöntemler önem kazanmıştır (45).

Karaciğer dışında HBV DNA belirlenmesi karaciğer transplantasyonu sonrası gözlenen reküren infeksiyonların nedenini açıklamaktadır (45).

HBV genomunda oluşan mutasyonların nükleik asit tespit yöntemiyle belirlenmesi bir başka önemli noktadır (45). Mutasyonlar sonucu patogeneizde farklılaşma, sağaltıma yanıtın bozulması, aşıya yanıtın yokluğu, klasik testlerle antijenlerin saptanamaması gibi durumlarla karşılaşılmaktadır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmamızda, 1 Ocak 2005 - 31 Aralık 2005 tarihleri arasında, Sivas Devlet Hastanesi, SSK Hastanesi, Askeri Hastane ve Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesine ait çeşitli kliniklerden hepatit ön tanısı ile gelen, ELISA yöntemiyle serolojik markerleri bakılan ve daha sonra HBV DNA belirlenmesi için tekrar laboratuvarımıza gönderilen 356 hasta örneği değerlendirilmeye alındı. ELISA yöntemiyle serolojik markerler Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi rutin Mikrobiyoloji laboratuvarında, HBV DNA ölçümü ise Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı laboratuvarında yapıldı.

Örnek Alımı ve Hazırlanması :

Çalışılan örnek serumdur. Kan örnekleri aseptik şartlarda boş, antikoagülan içermeyen, steril vacutaner tüplere alındı. 15-20 dakika bekledikten sonra yüksek devirde 10 dakika santrifüj edilerek serumları ayrıldı. Ayrılan serumlar kuru steril tüplere aktarıldı ve çalışma gününe kadar -20 °C’de saklandı. Kullanılacak serumların hemolizli ve lipemik olmamasına dikkat edildi.

Kullanılan Sistem ve Cihazlar :

Çalışmamızda kantitatif ölçüm için “Digene Hybrid Capture™ HBV DNA assay” sistemi kullanıldı. Bu sistem esas olarak belirlenmesin kemiluminesan yöntemi ile yapıldığı, sinyal amplifikasyonlu, solüsyon hibridizasyon antikor yakalama sistemidir. Çalışma sırasında “Digene Hybrid Capture System” çalkalayıcı, “Gen-Probe Leader™ 450 ” luminometre cihazı, “Elektro-mag Thermocouple Type” su banyosu, “nuvemix” vorteks ve 5-50, 50-200, 200-1000 µl’lik mikro pipetler kullanıldı.

Sinyal Amplifikasyonlu Solüsyon Hibridizasyon Antikor Yakalama Yöntemi ile HBV DNA Tayini :

Çalışma “Digene Hybrid Capture™ system HBV DNA assay” kit çalışma yöntemine aynen uyularak yapıldı (Şekil 7).

“Digene Hybrid Capture™ system HBV DNA assay” çalışmasında ilk olarak hedef DNA’yı içerdiği düşünülen örnek denatüre edilerek elde edilen tek zincirli DNA dizisine özel ve tüm diziyi kapsayan genomik HBV probu ile hibridlendi. Elde edilen RNA:DNA hibridi, deney tüpünün iç yüzeyinde kaplı olan anti-

RNA:DNA hibrid antikoruna tarafından yakalandı. Ortamda sabitleştirilen hibrid, alkalen fosfataz ile konjuge anti-hibrid antikoruna ile reaksiyona sokuldu ve kemiluminesan substrat ile tespit edildi. Substrat alkalen fosfataz ile reaksiyona girdi ve bu sırada yayılan ışık luminometrede “Relative Light Unit (RLU)” olarak ölçüldü.

Kullanılan Reaktifler :

Negatif kontrol : Taşıyıcı DNA, sodyum azidli

Pozitif standart 1 : 1.4×10^6 copies/ml.(5 pg/ml) HBV DNA ve taşıyıcı DNA

Pozitif standart 2 : 5.6×10^7 copies/ml.(200 pg/ml) HBV DNA ve taşıyıcı DNA

Pozitif standart 3 : 5.6×10^8 copies/ml.(2000 pg/ml) HBV DNA ve taşıyıcı DNA

Örnek hazırlama reajeni (sample preparation reagent) : “dithiothreitol (DTT)” içeren proteolitik solüsyon

Örnek dilüenti (sample diluent)

Denatürasyon reajeni (denaturation reagent) : Dilüe NaOH solüsyonu

İndikatör boya

Probe dilüenti : Sodyum azid içeren tampon solüsyon

HBV Probe : Tampon solüsyonda HBV RNA problemleri (ad ve ay subtipleri)

Tespit reajeni 1 (detection reagent 1) : Sodyum azidli tampon solüsyonu içinde anti-RNA:DNA-alkalen fosfataz konjugatı

Tespit reajeni 2 (detection reagent 2) : “LumiPhos® 530”

Yıkama tamponu paketi (Wash Buffer Pack)

Hibridizasyon tüpleri ve kapakları

Yakalama tüpleri (capture tubes) : Anti-RNA:DNA hibrid antikorları ile kaplı

Reajenler 2-8°C’de, hibridizasyon tüpleri ve kapakları ile yıkama tamponu paketi 15-30°C’de saklandı.

Reajen Hazırlanması :

Denatürasyon reajeni, HBV probe ve probe dilüenti ve yıkama tamponu dışında tüm reajenler kullanıma hazır.

1-Denatürasyon reajeni : Denatürasyon reajeni şişenin içine bir damla indikatör boya (indicator dye) eklenip karıştırılarak hazırlandı. Denatürasyon reajeninin renginin koyuya koyu mora dönüp dönmediği kontrol edildi. Bu aşamadan sonra kit içeriğinde belirtildiği şekilde 2-8 °C’de saklanarak solüsyonun üç ay boyunca etkinliğini koruması sağlandı. Bu süre içinde renkte açılma olduğunda kit önerisine uyularak yeniden indikatör boya eklendi.

2-HBV probu ve probe dilüent : Her çalışmada yeniden hazırlandı.

HBV probunun tüpün dip kısmında toplanması için önce santrifüj edildi. Test için gerekli probe karışımı (probe mix) hesaplandı (50 µl/test). Probe dilüent içinde HBV probe oranı 1/50 olacak şekilde karıştırılarak probe karışımı hazırlandı. Probe dilüent içine HBV probe eklendikten sonra 30 saniye maksimum hızda vortekslenerek karışmaları sağlandı.

3-Yıkama tamponu : Yakalama işlemi sırasında hazırlandı. Yıkama tamponu paketi (wash buffer pack) 3lt. steril distile suya eklendi ve karıştırıldı. Kontaminasyonu ve buharlaşmayı önlemek için ağzı kapalı tutuldu. 2-30 °C'de en fazla 3 ay boyunca saklandı.

Çalışma Yöntemi :

Soğukta saklanmakta olan örnek ve reagenler oda sıcaklığına çıkartılarak uygun sıcaklığa gelinceye kadar beklendi. Çalışmaya başlamadan önce su banyosunun 65°C'ye kadar ısınması sağlandı. Alınan hasta örnekleri 15 saniye vortekslenerek iyice karıştırıldı.

1-Örnek hazırlama :

Negatif kontrol ve pozitif standart 1, 2, 3'ün her biri için iki, hasta serumları için birer hibridizasyon tüpü sırayla numaralandı (önce kontrol, sonra standartlar en son hasta serumları olacak şekilde). Kontrol, standart ve her bir örnekten hibridizasyon tüplerinin dip kısımlarına, her seferinde ayrı uç kullanılarak 50µl pipetlendi. Tüplere 25 µl örnek dilüenti (sample diluent) eklendi. Aynı şekilde her bir tüpe 25 µl örnek hazırlama reajeni (sample preparation reagent) eklendi. Tüplerin kapatılarak kapatılarak çalkalayıcıda 1100 rpm'de 30 saniye çalkalandı. Kontrol ve standartların rengi açık yeşil-açık mavi olacak şekilde değişti. Tüpler 65 °C'lik su banyosunda 20 dakika inkübe edildi.

2-Denatürasyon ve Hibridizasyon :

Su banyosundan çıkarılan tüplere indikatör boya eklenmiş denatürasyon reajeninden 50 µl eklendi. Kapakları tekrar kapatılan tüpler çalkalayıcıda 1100 rpm'de 30 saniye karıştırıldı. Kontrol, standart ve örneklerin hepsinin mor renge dönüştüğü görüldü. 65 °C'lik su banyosunda 30 dakika inkübasyona alındı. Bu arada HBV probe karışımı hazırlandı. Inkübasyon bitiminde her bir tüp tek tek açılarak 50µl HBV probe karışımı konularak kapaklar kapatıldı. Tüpler 1100 rpm'de oda

sıcaklığında 5 dakika çalkalandı. Standartların mordan sarıya, serumların mordan sarı-yeşil veya sarı-maviye renk değiştirmesi gözlemlendi. 65°C'lik su banyosunda 60dakika inkübasyona bırakıldı. Bu arada her bir tüp için yakalama tüpleri (capture tubes) numaralandı.

3-Yakalama :

Tüpler su banyosundan alınarak oda sıcaklığına gelinceye kadar beklendi. Hibridizasyon tüplerinin içerikleri pipetle alınarak kendilerine karşılık gelen yakalama tüplerine konuldu. Yakalama tüpleri parafilm ile kapatılarak oda sıcaklığında 1100 rpm'de 60 dakika çalkalandı. Yakalama işleminden sonra tüpler lavaboya ters çevrilerek boşaltıldı ve temiz bir kurutma kağıdı üzerinde 1-2 dakika bekletilerek kurutuldu.

4-Tespit :

Tüplere oda sıcaklığına gelmiş tespit reagen-1 (detection reagent-1)'den 250 µl pipetlendi. Parafilm ile kapatılan tüpler birkaç kez hafifçe çalkalandı. Oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi.

5-Yıkama :

Tüpler lavaboya ters çevrilerek boşaltıldı. Yıkama tamponu ile beş kez yıkama yapıldı. Son yıkama sonrası tüplerin tamamen boşalmış olmasına dikkat edildi. Temiz bir kurutma kağıdı üzerine ters çevrilerek 5-10 dakika beklendi. Daha sonra temiz bir kurutma kağıdı veya peçete ile tüplerin üzeri silinerek kurutuldu.

6-Sinyal oluşumu :

Her bir örnek tüpüne 250 µl tespit reagen-2 (detection reagen-2) pipetlendi. Tüpler parafilm ile kapatılıp oda sıcaklığında karanlıkta 30 dakika inkübe edildi.

Süre bitiminde tüpler ıslatılmış kağıt peçete veya havluyla silinerek luminometrede yöntemine göre sırayla okutuldu.

7-Sonuçların değerlendirilmesi :

Bu aşamada aşağıda belirtilen kit kriterlerine uyuldu.

a-Kontrol tüplerinin sonuçları arasındaki farkın % 30'un altında olmasına dikkat edildi. Değerlendirmeye iki tüpün ortalama değeri alındı. Bunların arasındaki fark % 30'dan fazla olduğunda test geçersiz sayıldı.

b-Negatif kontrol RLU değerlerinin 10000 RLU'dan fazla olduğu durumlarda test geçersiz kabul edildi.

c-Pozitif standart ortalaması (PS_x) ve negatif kontrol ortalaması (NC_x) sonuçları arasında aşağıda sıralanan değerlendirmeler yapılarak testin geçerliliği belirlendi.

$$PS\ 1x / NCx = 1.5$$

$$PS\ 2x / PS\ 1x = 8.0$$

$$PS\ 3x / PS\ 2x = 4.0$$

Cut-off değeri, pozitif standart-1 tüplerinin RLU değeri cinsinden ortalaması şeklinde hesaplandı.

8-Örnek sonuçlarının yorumlanması :

RLU değeri cut-off değerinden yüksek olan örnekler “HBV DNA pozitif” olarak değerlendirildi ve bunların sonuçları rakamsal olarak pg/ml cinsinden kaydedildi.

RLU değeri PS1 ortalamasının 0.8 katından düşük olan örnekler negatif olarak değerlendirildi.

RLU değeri PS1 ortalamasının 0.8 katından yüksek, cut-off değerinden düşük olan örnekler düşük pozitif olarak değerlendirildi. RLU değeri ile birlikte 0-4 pg/ml olarak kaydedildi. Örnek sonuçlarının yorumlanmasında kullanılan negatif kontrol ve pozitif standartların içerdikleri HBV DNA konsantrasyonunun kit prospektüsüne göre farklı birimlerle ifadesi tablo 3’de gösterildi.

Tablo 3 : “Digene Hybrid CaptureTM system HBV DNA assay”de negatif kontrol ve pozitif standart HBV genom konsantrasyonları

Hedef	HBV Genomu			
	genom/ml	Genom/assay	Pg/ml	Pg/assay
Negatif kontrol	0	0	0.0	0.0
HBV pozitif standart 1	1.4x10 ⁶	7.0x10 ⁴	5.0	0.25
HBV pozitif standart 2	5.6x10 ⁷	2.8x10 ⁶	200.0	10.0
HBV pozitif standart 3	5.6x10 ⁸	2.8x10 ⁷	2000.0	100.0

İstatistiksel yöntem; çalışmanın verileri SPSS (versiyon 10.0) programına yüklenerek verilerin değerlendirilmesinde 2 x 2 düzenlerde khi-kare testi, Fisher's Exact khi-kare testi kullanılmıştır. ODDS oranı hesaplanarak % 95 (CI) (güven sınırları) bulunmuştur. Verilerimiz tablolarda birey sayısı ve yüzdesi şeklinde belirtilip yanılma düzeyi 0.05 olarak alınmıştır.

Şekil 7: "Digene Hybrid Capture™ system HBV DNA assay(LEADER™ 450)



BULGULAR

Araştırmamızda Sivas Devlet Hastanesi, SSK Hastanesi, Askeri Hastane ve Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nin çeşitli kliniklerinden hepatit şüphesiyle gönderilen, ELISA yöntemiyle serolojik markerleri bakılarak tekrardan moleküler yöntem ile HBV DNA bakılması istenen 356 hasta örneği çalışmaya alınmıştır. Gelen örneklerin cinsiyete göre 229'u (%64.3) erkek, 127'si (%35.7) ise kadındır. Yaş grubuna göre ise 333'ü (%93.5) erişkin, 23'ü (%6.5) çocuktur.

HBV DNA düzeyleri "Digene Hybrid Capture System HBV DNA Assay" ile kantitatif olarak "pg/ml" cinsinden ölçüldü.

ELISA ile bakılan serolojik markerlerden 356 örnekten 336'sında (%94.4) HBsAg (+), 20'sinde (%5.6) HBsAg (-) idi. Anti-HBs 341'inde (%95.8) (-), 15'inde (%4.2) (+) idi. HBeAg 316'sında (%88.7) (-), 40'ında (%11.3) (+) idi. Anti-HBe 207'sinde (%58.1) (-), 149'unda (%41.9) (+) idi. Anti-HBc total 212'sinde (%59.5) (-), 144'ünde (%40.5) (+) idi. HBcIgM 353'ünde (%99.1) (-), 3'ünde (%0.9) (+) idi.

356 örneğin hibridizasyon sonucuna göre 102'sinde HBV DNA pozitif. Bunların 42'sinde (%41.1) yalnız HBsAg pozitif, 21'inde (%20.5) HBsAg, HBeAg ve anti-HBc total birlikte pozitif, 20'sinde (%19.6) HBsAg, anti-HBe ve anti-HBc total birlikte pozitif, 9'unda (%8.8) HBsAg ve HBeAg pozitif, 2'sinde (%1.9) HBsAg ve anti-HBe pozitif, 2'sinde (%1.9) HBsAg ve anti-HBc total pozitif, 2'sinde (%1.9) HBsAg, anti-HBe, anti-HBc total ve anti-HBcIgM pozitif, 1'inde (%0.9) HBsAg negatif, 1'inde (%0.9) HBsAg negatif anti-HBs pozitif, 1'inde HBsAg, HBeAg, anti-HBe ve HBcIgM pozitif ve 1'inde de (%0.9) HBsAg ve anti-HBe pozitif.

Bütün bu veriler (yaş grubu, cinsiyet ve serolojik markerler) tek tek HBV DNA görülme oranlarına göre istatistiksel olarak karşılaştırıldı.

Cinsiyete göre HBV DNA görülme oranlarına bakıldığında $X^2=0.11$, $P=0.734$ $P>0.05$ olarak bulundu ve buna göre kadın ve erkek oranı önemsiz olarak kabul edildi (Tablo 4).

Tablo 4 : Cinsiyete göre HBV DNA görülme oranlarının karşılaştırılması

Cinsiyet	HBV DNA				Toplam
	pozitif		negatif		
	n	%	n	%	
Erkek	67	29.3	162	70.7	229
Kadın	35	27.6	92	72.4	127
Toplam	102	28.7	254	71.3	356

Yaşa göre HBV DNA görülme oranları karşılaştırıldığında $X^2=0.57$, $P=0.448$ $P>0.05$ olarak bulundu , buna göre erişkin ve çocuk yaş grubu arasındaki fark önemsiz kabul edildi (Tablo 5).

Tablo 5 : Yaşa göre HBV DNA görülme oranlarının karşılaştırılması

Yaş	HBV DNA				Toplam
	pozitif		negatif		
	n	%	n	%	
Erişkin	97	29.1	236	70.9	333
Çocuk	5	21.7	18	78.3	23
Toplam	102	28.7	254	71.3	356

HBsAg'ye göre HBV DNA görülme oranı incelendiğinde, $X^2=3.89$, $P=0.048$ $P<0.05$ olarak bulundu. Buna göre farklılık önemli bulunmuştur; HBsAg pozitif bireylerde daha fazla pozitiflik saptanırken, negatif olanlarda daha az negatifliğe rastlanmıştır (Tablo 6).

Tablo 6 : HBsAg'ne göre HBV DNA görülme oranları

HBsAg	HBV DNA				Toplam
	pozitif		negatif		
	n	%	n	%	
Pozitif	100	29.8	236	70.2	336
Negatif	2	10.0	18	90.0	20
Toplam	102	28.7	254	71.3	356

Anti-HBs'ye göre HBV DNA görülme oranları incelendiğinde, ODDS = 0.17 , %95 CI 0.02 : 1.31 , P =0.041 , P<0.05 olarak bulundu. Buna göre farklılık önemli bulunmuştur (P<0.05). Anti-HBs'nin negatif olduğu bireylerde daha fazla oranlarda pozitiflik saptanırken, pozitif olanlarda daha az pozitiflik saptanmıştır (Tablo 7).

Tablo 7 : Anti-HBs'ye göre HBV DNA görülme oranları

Anti-HBs	HBV DNA				Toplam
	pozitif		negatif		
	n	%	n	%	
Pozitif	1	6.7	14	93.3	15
Negatif	101	29.6	240	70.4	341
Toplam	102	28.7	254	71.3	356

HBeAg'ye göre HBV DNA görülme oranları incelendiğinde, $X^2=47.35$, ODDS = 10.16 , %95 CI 4.74 : 21.79 , P=0.000 , P<0.005 olarak bulundu. Buna göre farklılık önemli bulunmuştur (P<0.05).

HBeAg'si pozitif olan bireylerde daha fazla pozitiflik saptanırken , negatif olan bireylerde daha az oranda pozitiflik saptanmıştır (Tablo 8). HBeAg pozitif bireylerde HBV DNA'nın pozitif olma durumu negatife göre 10.16 kez fazladır. Bulduğumuz ODDS oranı önemlidir.

Tablo 8 : HBeAg'ye göre HBV DNA görülme oranları

HBeAg	HBV DNA				Toplam
	pozitif		negatif		
	n	%	n	%	
Pozitif	30	75.0	10	25.0	40
Negatif	72	22.8	244	77.2	316
Toplam	102	28.7	254	71.3	356

Anti-HBe'ye göre HBV DNA görülme oranlarına bakıldığında, $X^2=13.9$, ODDS = 0.39 , %95 CI 0.23 : 0.64 , $P=0.000$, $P<0.05$ olarak bulundu. Buna göre fark önemli bulunmuştur ($P<0.05$) (Tablo 9).

Anti-HBe'si negatif olan bireylerde daha fazla pozitiflik saptanırken , pozitif olanlarda daha az pozitiflik saptanmıştır. Anti-HBe'si pozitif bireylerde HBV DNA pozitiflik oranı 0.39 kez daha fazladır bu ODDS oranı önemlidir .

Tablo 9 : Anti-HBe'ye göre HBV DNA görülme oranları

Anti-HBe	HBV DNA				Toplam
	pozitif		negatif		
	n	%	n	%	
Pozitif	27	18.1	122	81.9	149
Negatif	75	36.2	132	63.8	207
Toplam	102	28.7	254	71.3	356

Anti-HBc total'e göre HBV DNA görülme oranlarına bakıldığında, $X^2=0.79$, ODDS=1.23, %95 CI 0.77 : 1.96, $P=0.372$, $P>0.05$ olarak bulundu. Buna göre karşılaştırmada farklılık önemsiz bulunmuştur (Tablo 10). ODDS oranı önemsizdir.

Anti-HBc total pozitif olanlarda HBV DNA oranı 1.23 kez fazla iken ODDS önemsizdir.

Tablo 10 :Anti-HBc total'e göre HBV DNA görülme oranları

Anti-HBc total	HBV DNA				Toplam
	pozitif		negatif		
	n	%	n	%	
Pozitif	45	31.3	99	68.8	144
Negatif	57	26.9	155	73.1	212
Toplam	102	28.7	254	71.3	356

Anti-HBcIgM'ye göre HBV DNA görülme oranlarına bakıldığında, ODDS=5.06, %95 CI 0.45 : 56.42, P=0.198, P>0.05 olarak bulundu. Buna göre yapılan karşılaştırmada fark önemsiz bulunmuştur (Tablo 11).

Anti-HBcIgM'si pozitif bireylerde HBV DNA'nın pozitif olma oranı negatiflere göre 5.06 kez fazla olmasına rağmen ODDS önemsizdir (Çünkü %95 güven aralığı (CI) 1'i içermektedir).

Tablo 11 : Anti-HBcIgM'ye göre HBV DNA görülme oranları

Anti-HBcIgM	HBV DNA				Toplam
	pozitif		negatif		
	n	%	n	%	
Pozitif	2	66.7	1	33.3	3
Negatif	100	28.3	253	71.7	353
Toplam	102	28.7	254	71.3	356

TARTIŞMA

Tanımlandığı ilk günden itibaren HBV infeksiyonu tıp tarihindeki önemini hiçbir zaman kaybetmemiştir. Dünya üzerinde 300 milyondan fazla taşıyıcı bulunduğu ve her yıl 50 milyon yeni B hepatiti olgusunun saptandığı bilinmektedir (7,14,15). Ülkemizde, kronik B hepatit infeksiyonu % 4-10 arasında olup orta derecede endemik ülkeler arasında yer almaktadır. Kronikleşme eğiliminde, ciddi klinik gidiş gösteren bir hastalık tablosu oluşturur, ortalama % 5'inin kronikleştiği ve bunların önemli bir bölümünün siroza dönüştüğü; sirozlu olgularda da hepatosellüler kanser gelişme riskinin oldukça yüksek olduğu bilinen bir gerçektir (7,14,18). HBV ile savaşmada başarılı olmak için sağaltımın yönlendirilmesinde hızlı ve doğru tanının önemi büyüktür(7,14,15,92-94). Tanısında özgül serolojik testlere gerek duyulmaktadır. HBV infeksiyonlarının rutin tanısında en sık kullanılan yöntemler, HBV göstergelerinin ELISA yöntemiyle serolojik olarak belirlenmesidir. HBsAg, inkübasyon periyodu sırasında (semptomlar gelişmeden önceki 2-7. haftalardan itibaren) serumda pozitif olarak bulunur ve hastalık süresince devam edip iyileşme döneminde kaybolur. Anti-HBs, genellikle iyileşme sırasında yükselmeye başlar. Anti-HBc, HBV infeksiyonu ile daha ilişkili marker olup semptomlar sırasında genellikle pozitifdir. Anti-HBs ve anti-HBc uzun ömürlüdür. Anti-HBc IgM akut hastalık tanısında iyi ölçüttür. Ancak, erkenden tespit edilemez düzeylere iner, en fazla 6-24 ay pozitif olarak saptanabilir. Yalancı pozitif ve negatif sonuçlara da rastlanmaktadır. HBsAg'nin pozitifleşmesinden sonraki 1-2 hafta içinde HBeAg pozitifleşir. Bu dönemde serumda HBV DNA'sı saptanabilir. HBeAg pozitifliğinden anti-HBe pozitifliğine geçiş iyileşme ve viral replikasyonun devamı açısından iyi bir kriterdir. Kronik taşıyıcılığa ilerleme durumunda, akut infeksiyonun 6 ay sonrasında da HBsAg pozitifliği ile beraber HBeAg veya anti-HBe pozitifliği devam eder (13).

HBV infeksiyonu tanısındaki gelişmelerin son geldiği noktada moleküler biyolojik yöntemler bulunmaktadır. İnfekte bireylerin serumlarında HBV DNA belirlenmesinin klinisyene sağladığı birtakım yararlar vardır :

1-HBV DNA düzeyinin yüksek olması viral replikasyonun fazla olduğunu, düşük olması viral replikasyonun az olduğunu göstermektedir. Viral replikasyon durumuna göre seçilecek sağaltım protokolleri değişmektedir (45,54,55,60,90).

2-Anti-viral sağaltım alan hastaların izlenmesinde HBV DNA düzeyi çok önemlidir. α -interferon sağaltımı alan hastalarda HBV DNA'nın hızla düşmesi sağaltıma yanıtın iyi olduğunun göstergesidir (4,50,54,95). Sağaltım öncesi HBV DNA düzeyi düşük olan hastaların interferon sağaltımına daha iyi yanıt verdikleri gösterilmiştir (96).

3-HBV varyantlarının tanınmasında, replikasyon ve enfeksiyona ait serolojik bulgunun olmadığı enfeksiyonlarda HBV DNA'ya yönelik testler önemlidir (4,88).

4-Kan bankacılığında donörlerin HBV açısından infektivitesinin belirlenmesinde sterilize edilen materyallerin HBV açısından kontrolünde HBV DNA varlığı araştırılır. Yapılan bir çalışmada HBsAg negatif, karaciğer enzimleri normal sınırlarda olan 206 donöre ait kan örneklerinin 9'unda HBV DNA belirlenmiştir (88,91).

Çalışmamızda, ELISA yöntemiyle serolojik markerleri bakılmış olup HBV DNA belirlenmesi için gönderilen 356 hastanın kan örneğinde "Digene Hybrid Capture™ system HBV DNA assay" yöntemi ile HBV DNA belirlenmesi yaptık. Bulduğumuz HBV DNA'ları tek tek serolojik markerler ile karşılaştırdık. Bu karşılaştırmada markerlerin HBV DNA pozitifliği ile uyum oranını belirleyebilmeyi amaçladık.

356 hastayı 229 erkek, 127 kadın ve 333 erişkin 23 çocuk olarak, ELISA yöntemiyle bakılan ve tespit edilen hepatit B markerlerini ise HBV DNA ile birlikte bulunma durumlarına göre 10 gruba ayırdık (Tablo12).

Tablo 12 : Çalışmada saptanan serolojik markerlere göre HBV DNA tespit durumları

Serolojik markerler	HBV DNA (5 pg/ml>)
HBsAg	42
HBsAg+HBeAg+Anti-HBc total	21
HBsAg+AntiHBe+Anti-HBctotal	20
HBsAg+HBeAg	9
AntiHBs	1
HBsAg(-)	1
HBsAg+HBeAg+AntiHBe+Anti-HBc total	1
HBsAg+AntiHBe	3
HBsAg+Anti-HBc total	2
HBsAg+AntiHBe+Anti-HBctotal+HBcIgM	2
Toplam	102

Hepatit B infeksiyonunun değişik dönemlerinde (akut, sağlıklı taşıyıcı, kronik aktif hepatit) ve virusun mutant varlığına göre değişik serolojik tanı kalıpları oluşur. HBV infeksiyonunun değişik dönemlerine ait olağan tanı göstergesi kalıpları ve bunların anlamları aşağıda verilmiştir (Tablo 13)(8).

Tablo 13 : HBV'nin olağan serolojik/moleküler tanı kalıplarının yorumu (8)

Etken	Kalıp	Yorum
Hepatit B	HBsAg+, AntiHBs-, Anti-HBcIgM+ HBeAg+/-, AntiHBe-, HBV DNA+	Akut infeksiyon
	HBsAg-, AntiHBs+, Anti-HBc total+, HBeAg-, AntiHBe+, HBV DNA-	İyileşmiş infeksiyon
	HBsAg+, AntiHBs-, Anti-HBc total+, HBeAg-, AntiHBe+,HBV DNA+*	Sağlıklı taşıyıcı
	HBsAg+, AntiHBs-, Anti-HBc total+, HBeAg+, AntiHBe-, HBV DNA+**	Kronik infeksiyon

* <10⁵ kopya/ml ; ** >10⁵ kopya/ml

Yaptığımız çalışmanın değerlendirilebilmesi açısından yapılan bir çok araştırma ile karşılaştırdığımızda ;

Mıstık ve arkadaşlarının Uludaę üniversitesinde yaptıkları bir çalışmada, 92 HBsAg pozitif serumda hibridizasyon yöntemiyle 31 (%34) örnekte HBV DNA pozitif bulunmuştur (97).

Uludaę üniversitesinde yapılan diğer bir çalışmada 185 HBsAg pozitif örneğin 46'sında (%25) HBV DNA pozitif bulunmuş ve bunların 22'sinde (%48) HBeAg, 21'inde (%46) anti-HBe, 2'sinde (%4) HBeAg ve anti-HBe pozitif, 1'inde ise (%2) HBEAg ve anti-HBe negatif olarak belirlenmiştir (98).

Zaaijer ve arkadaşlarının, 109 HBsAg pozitif serumda hibridizasyon yöntemi kullanarak yaptıkları çalışmada, HBV DNA pozitiflik oranı % 28 olarak bulunmuştur. Aynı çalışmada HBeAg pozitif 30 serum örneğinin 20'sinde (%67) ve HBeAg

negatif 79 serum örneğinin 10'unda (%13) HBV DNA pozitif olarak saptanmıştır (90).

Aşçı ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, HBsAg pozitif serumlarda HBV DNA pozitifliği % 42 bulunurken, HBeAg pozitif 56 serum örneğinin 44'ünde (%78) HBV DNA pozitif olarak tespit edilmiştir. Aynı çalışmada HBV DNA pozitifliği anti-HBe pozitif örneklerde %15, HBeAg ve anti-HBe pozitif örneklerde % 33 ve HBeAg ve anti-HBe negatif örneklerde %12 oranında hesaplanmıştır (98).

Yücesoy ve arkadaşlarının hepatit B serolojik belirleyicileri değişik profillerde olan 247 hasta serum örneğinde yaptıkları bir çalışmada, HBV DNA araştırılmış, HBsAg, anti-HBc ve HBeAg pozitif 45 kronik hepatit olgusunun 36'sında(%80); HBsAg,anti-HBc ve anti-HBe pozitif 148 kronik hepatit olgusunun ise 18'inde (%12.16) HBV DNA pozitif bulunmuştur. HBsAg,anti-HBc total, HBeAg ve anti-HBe'nin birlikte pozitif olduğu 2 olgunun 2'sinde de ayrıca HBsAg, anti-HBc total pozitif ve HBeAg, anti-HBe'nin negatif olduğu 2 olgunun 2'sinde de HBV DNA pozitif olarak bulunmuş. Tüm belirleyicileri negatif olan 10 olgunun, tek anti-HBc pozitif olan 15 olgunun, yalnız anti-HBc ve anti-HBe pozitif olan 14 olgunun hiç birisi pozitif olarak bulunmamış. Tek başına HBsAg pozitif olan 7 olgunun 1'inde, yalnızca anti-HBc total ve HBeAg pozitif olan 2 olgunun 1'inde HBV DNA pozitif olarak elde edilmiş. Serum HBV DNA'sının HBeAg pozitifliği ile paralellik gösterdiği sonucuna varmışlar (99).

Pekbay ve arkadaşlarının PCR ile yaptığı çalışmada, HBeAg pozitif 49 hastanın 40'ında (%81) ve anti-HBe pozitif 163 örneğin 39'unda (%24) HBV DNA'yı pozitif olarak belirlenmiş (100).

Özaras ve arkadaşlarının bir çalışmasında sağlıklı HBsAg taşıyıcısı 97 olgunun HBV DNA'sına bakılmış. Bu olguların 28'inde (%29) HBV DNA pozitifliği saptanmış, bununda 12'sinde (%42) HBeAg pozitif olarak bulunmuştur (101).

Kılıç ve arkadaşlarının Kayseri Erciyes üniversitesinde yaptıkları bir çalışmada HBsAg taşıyıcısı 41 hastada HBV DNA bakılmış ve 2 (%5) hastada pozitif (≥ 5 pg/ml), 20 (%49) hastada 0-4 pg/ml arası, 19 (%46) hastada ise negatif olarak bulunmuştur. Negatif 19 hastanın hepsinde HBeAg negatif, anti-HBe pozitif olarak, pozitif 2 hastanın birinde HBeAg negatif, anti-HBe pozitif ve 0-4 pg/ml arası bulunan 20 hastanın ise hepsinde HBeAg negatif, anti-HBe pozitif olarak saptanmış. 41 hastanın hepsinde de anti-HBcIgG pozitif olarak belirlenmiş (102).

Demirtürk ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, HBsAg pozitif 188 hasta serumu değerlendirilmiş. Bunların 40'ında HBV DNA pozitif olarak bulunmuştur. HBV DNA'sı pozitif hastaların 14'ünde (%35) HBeAg, 26'sında (%65) anti-HBe pozitif olarak bulunmuştur (103).

Durmaz ve arkadaşlarının yaptıkları iki yöntem ve iki gruplu çalışmada, "Real-time" PZR ve "Hybrid Capture" yöntemlerinin karşılaştırılması, HBsAg (+), HBeAg (+) ve HBsAg (+), HBeAg (-), anti-HBe (+) olan iki farklı hasta grubu üzerinde yapılmış. Real-time PZR ile test edilen 125 serumda 1.grupta %96 (24/25), 2.grupta %40 (40/100) oranında HBV DNA pozitifliği saptanırken ; Hybric Capture sistemi ile çalışılan 300 serumda sırasıyla bu oranlar %90 (49/55) ve %18 (44/245) olarak belirlenmiş (104).

Otlu ve arkadaşlarının çalışmasında HBsAg pozitif 361 hasta araştırmaya dahil edilmiş, bunların 255'inde (%71) HBV DNA pozitif bulunmuştur. HBV DNA'sı negatif olan 106 hastanın hiç birinde HBeAg pozitifliği görülmemiş. Bunlarında 87'sinin (%82) anti-HBe'si pozitif iken 19'unun negatif saptanmış (105).

Sayan ve arkadaşlarının Kocaeli üniversitesinde yaptıkları bir çalışmada, 836 serum örneği incelenmiş ve HBsAg negatif 39 örnekte HBV DNA belirlenmiş (106).

Köse ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, HBsAg pozitif 3709 hastada HBV DNA bakarak 581'inde (%15.6) pozitif bulmuşlar. HBV DNA pozitif hasta grubunun 285'inde (%49.05) HBeAg pozitifliği, 236 olguda (%40) anti-HBe pozitifliği belirlemişler. HBeAg negatif olan 2144 olgunun 264'ünde (%12.3) HBV DNA pozitifliği saptanmış (107).

Deguchi ve arkadaşlarının kronik HBV hastaları üzerinde yaptıkları bir çalışmada , hastalarda HBsAg ve anti-HBs birlikte gösterilememiş, HBeAg ve HBsAg birlikte HBV DNA ile gösterilmiştir (108).

Drosten ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, anti-HBc pozitif/HBsAg negatif 160 hasta serumunda HBV DNA bakılmış bunun 20'sinde (%12.5) HBV DNA belirlenmiş. Bunun %37'sinde anti-HBs pozitif olarak bulunmuş (109).

Peignoux ve arkadaşlarının çalışmasında 108 inaktif HBsAg taşıyıcısı, HBeAg ve anti-HBe'side tespit edilmiş hastaların yaklaşık %86'sında HBV DNA belirlenmiş (110).

Fisher ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, HBV enfeksiyonu tanımlanan 309 olgunun 91'i (%29) akut HBV olarak bulunmuş. Bunun 54'ünde (%59) HBV

DNA belirlenmiş. Olguların 93'ünde (%30) HBeAg pozitif, 196'sında (%63.5) HBeAg negatif /HBsAg pozitif ve 20'si (%6.5) HBsAg pozitif, anti-HBcIgM pozitif olarak bulunmuş (111).

Schalm ve Buster'in yaptığı çalışmada HBeAg pozitif ve negatif sağlıklı taşıyıcılara bakılmış. Anti-HBe taşıyıcılarında HBV DNA saptanma düzeyi %17 olarak tespit edilmiş ve bunlarda HBV DNA kalıcılık düzeyi %96 olarak belirlenmiştir. HBeAg negatif olanlarda çok düşük oranda HBV DNA tespit edilmiş. Ayrıca HBsAg pozitif sağlıklı taşıyıcılarda HBV DNA'nın daha fazla artma riski olduğunu da belirtmişlerdir (112).

Weber ve arkadaşlarının kan donörleri üzerinde yaptıkları çalışmada, anti-HBcIgM ve total anti-HBc antibodylerin belirlenmesinden 1 hafta sonra HBV DNA'nın düşük düzeyde tespit edilebildiğini bildirmişlerdir. İnfeksiyondan 3-5 hafta sonra ve HBsAg'nin görünmesinden 1-2 hafta önce HBV DNA'nın belirlenebileceğini, anti-HBc pozitif taşıyıcılarda HBV DNA yakalama hata riskinin düşük olduğu gösterilmiştir (113).

Akahane ve arkadaşlarının 19 hasta (anti-Hbc pozitif) üzerinde yaptığı çalışmada, anti-HBc ve HBV DNA arasındaki korelasyona bakılmış; Bunların 16'sında HBsAg pozitif, 18 hasta anti-HBe pozitif HBV taşıyıcısı, 4 hastada HBcIgM pozitif, 13 hastada HBeAg pozitifmiş. 19 hastada da HBV DNA gösterilmiş. Özellikle HBsAg titresiyile HBV DNA düzeyi arasında bir bağlantı olduğunu bildirmişler (114).

Poljak ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, 252 HBsAg pozitif serum örneği kullanılmış. HBV DNA için Hybrid Capture ve Cobas-HBV yöntemleri kullanılmış. 252 örneğin 143'ünde HBsAg pozitif (bunun 38'inde HBeAg pozitif ve 105'inde HBeAg negatif taşıyıcı) kronik HBV infeksiyonu belirlenmiştir. 252 hastanın 173 tanesinde her iki yöntemde de HBV DNA pozitif olarak bulunmuş (115).

Balderas ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, kronik karaciğer hastası 118 serum örneği kullanılmış. Örnekler A,B,C,D olmak üzere 4 gruba ayrılmış. A grubunda; 30 hasta HBsAg(+),HBcAg(+),HBeAg(+), B grubunda; 19 hasta HBsAg(+), anti-HBc(+), anti-HBe(-) ve HBeAg(-), C grubunda; 28 hasta anti-HBc(+), anti-HBe(+), anti-HBs(+), D grubunda; 41 hasta markerler negatif olarak izlenmiş.

A grubunda HBV DNA tümünde pozitif, B grubunda 3 hastada HBV DNA pozitif, C+D grubunda 7 hastada HBV DNA pozitifmiş (bu grupta nadir görülüyor) (116).

Busch'ın kan donörleri üzerindeki araştırmasında HBsAg ve anti-HBc değerleri ile değişik nükleik asit testleri ile elde edilen HBV DNA'ların karşılaştırılmasında çok bariz bir bağlantı olmadığı, bunun daha iyi gözlenebilmesi için ise değerlerin birkaç yıl sürekli gözlenerek değerlendirilmesi gerektiğini söylüyorlar (117).

Erensoy ve arkadaşlarının Ege üniversitesinde yaptıkları bir çalışmada, 443 hasta serum örneği hibridizasyon yöntemiyle test edilerek serolojik göstergeleriyle karşılaştırılmış. HBsAg pozitif 302 örneğin 138'inde (%45.7), HBsAg negatif 141 örneğin 3'ünde (%2.1) HBV DNA bulunmuş. HBsAg pozitif olanların 45'inde (%14.9), HBsAg negatif olanların 24'ünde (%17) HBV DNA pozitif/negatif olarak saptanmış. HBsAg pozitif örneklerin 119'unda (%39.4), HBsAg negatif örneklerin 114'ünde (%80.9) HBV DNA saptanamamış. HBeAg pozitif, anti-HBe negatif 106 örneğin 96'sında (%90.6); HBeAg negatif, anti-HBe pozitif 150 örneğin 30'unda (%20); HBeAg ve anti-HBe pozitif 13 örneğin 7'sinde (%53.8); HBeAg ve anti-HBe negatif 20 örneğin 4'ünde (%20) HBV DNA pozitif bulunmuş. Bunların pozitif/negatif olma durumları sırasıyla %3.8, %18, %30.8 ve %40 olarak bulunmuş. Serolojik göstergeleri negatif olan ve anti-HBs pozitif olan örneklerin hiç birisinde HBV DNA gösterilememiş. Anti-HBc ve anti-HBe pozitif 2 örnekte (%6.7), salt anti-HBc pozitif 1 örnekte HBV DNA belirlenebilmiş. HBeAg pozitif, anti-HBe negatif gruptakilerin HBV DNA bulunma oranları HBeAg negatif, anti-HBe pozitif gruptakilerden anlamlı olarak yüksek ($p=0.0000$) izlenmiştir (118).

Yücesoy ve arkadaşlarının 42 kronik hepatit ön tanılı (hastaların tümünde HBsAg ve total anti-HBc belirleyicileri pozitif, anti-HBs ve anti-HBcIgM antikorları negatif) hasta serumları ile yaptıkları çalışmada, örneklerin 19'unda (%45.2) HBV DNA saptamışlar. HBeAg pozitif 16 olgunun 12'sinde (%75), HBeAg negatif, anti-HBe pozitif 26 olgunun 7'sinde (%26.9) HBV DNA olumlu bulunmuş (119).

Dündar ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada, 721 olguda HBV DNA ile beraber HBsAg; bu olguların ise 318'inde ise ilaveten diğer markerler de çalışılmış. 721 örneğin 140'ında (%19.4) HBV DNA pozitif bulunurken, 272'sinde (%37.7) HBsAg pozitif bulunmuş. HBV DNA pozitif olguların 109'unda (%77.86) HBsAg pozitif, 31'inde (%22.14) negatif bulunmuş. HBV DNA ve HBeAg'nin birlikte

çalışıldığı 318 olgunun 52'sinde (%16.35) HBV DNA pozitif olarak bulunurken, 52 olgunun 27'sinde (%51.92) HBeAg'de pozitif, 25'inde (%48.07) ise negatif bulunmuş. HBV DNA pozitif örneklerin tamamında anti-HBs, anti-HBe ve anti-HBc negatif olarak izlenmiştir (120).

Altındış'ın yaptığı çalışmada, 155 hasta serum örneği kullanılmış. HBsAg pozitif 110 örneğin 22'sinde (%20), HBsAg negatif 45 örneğin 2'sinde (%4.4) HBV DNA pozitif olarak bulunmuş. HBeAg pozitif, anti-HBe negatif 24 örneğin 15'inde (%62.5), HBeAg negatif, anti-HBe pozitif 72 örneğin 4'ünde (%5.5), HBeAg ve anti-HBe birlikte pozitif 7 örneğin 2'sinde (%29), HBeAg ve anti-HBe'nin negatif olduğu 9 örneğin 1'inde (%11.1) HBV DNA pozitif bulunmuş. HBeAg pozitif, anti-HBe negatif örneklerdeki HBV DNA oranı, HBeAg negatif, anti-HBe pozitiflerdekine göre oldukça anlamlı bulunmuş ($P<0.05$) (121).

Türet ve Fidan'ın yaptıkları çalışmada, HBsAg pozitif 280 hasta serum örneği kullanılmış. Bunların 70'inde (%25) HBV DNA pozitif bulunmuş, bunlardan da 50'sinde HBeAg pozitif, 2'sinde de hem HBeAg hem de anti-HBe pozitif olarak saptanmış. HBeAg negatif olarak bulunan 212 serumun 18'inde (%8.5) ise HBV DNA pozitifliği belirlenmiş (122).

Sönmez ve arkadaşlarının iki ayrı yöntem kullanarak yaptıkları çalışmada, HBsAg pozitif 80 serum örneği kullanılmış; bütün örneklerde anti-HBc total pozitif olarak bulunmuş. HBeAg 18 serumda pozitif iken anti-HBe 62 serumda belirlenmiş. 80 örnekten yöntemin birisinde 7 diğerinde 5'inde HBV DNA tespit edilmiş aralarındaki farklılık önemli bulunmamış ($p>0.05$) (123).

Kullandığımız hibridizasyon yönteminin cut off değeri 5 pg/ml HBV DNA düzeyi idi. HBV DNA'yı yakalamak amacıyla kullandığımız RNA probe ad ve ay subtiplerinin HBV genomunun tamamı ile hibridize olacak şekilde hazırlanmıştı. Oluşan DNA:RNA hibridlerinin ölçümü kemiluminesan yöntem ile yapıldı.

Erhardt ve arkadaşları yaptıkları benzer çalışmada kemiluminesan yöntemin radyoaktif olmayan tespit ve işaretleme yöntemlerinin çoğundan daha duyarlı olduğunu belirlemişlerdir (55).

Barlet ve arkadaşları kemiluminesan ölçüm yapan "Digene Hybrid Capture™ system HBV DNA assay" ile radyoaktif ölçüm yapan bir başka hibridizasyon yöntemini karşılaştırmışlar; iki yöntemin duyarlılık ve özgüllüğünü benzer

bulmalarına rağmen düşük düzey HBV DNA varlığında “Digene Hybrid Capture™ system HBV DNA assay”in daha duyarlı olduğunu göstermişlerdir (54).

Çalışmamızda, HBV DNA belirlenmesi için kullandığımız yöntem, duyarlı bir sistem olup kantitatif değer (pg/ml) verebilmemize karşın çok düşük düzeydeki HBV DNA miktarını (4700 kopya/ml >) tespit edememektedir. Bunun yanında Taqman probe kullanılan real-time PCR’ın duyarlılığı 10 kopya/ml’dir ama bu yöntem ile de kantitatif değer verilememektedir (124).

Feinman ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada HBV enfeksiyonunda düşük düzeyde virüs olduğunda tanımlamada Hibridizasyon yönteminin çok duyarlı olduğu söylenmektedir (125).

Eroğlu ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada, 75 serum örneğinde PCR ve hibridizasyon yöntemleriyle HBV DNA’sının belirlenmesi karşılaştırılmış; PCR ile 75 serumun 27’sinde (%36) pozitiflik saptanırken, hibrid yakalama ile 75 serumun 24’ünde (%32) pozitiflik saptanmış. Buna göre PCR’nin hibridizasyon yöntemine göre daha duyarlı olduğu, fakat istatistiksel olarak aralarında anlamlı bir fark olmadığı belirtilmiştir (126).

Aspirall ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, iki hibridizasyon yöntemi ve PCR yöntemini karşılaştırmışlardır. Bu yöntemlerden biri olan “Digene Hybrid Capture™ system HBV DNA assay”in aynı gün sonuç vermesinin, saflaştırma yapılmadan serum örneğinin bu sistemle çalışabilmesinin, radyoaktif olmayan yöntemle ölçüm yapmasının önemli üstünlükleri olduğunu belirtmektedirler (127).

Bizde hibridizasyon yöntemi ile yaptığımız çalışmada bir kişinin tüm işlemleri tek başına yapabildiğini, aynı gün içerisinde sonuçların elde edildiğini gördük. Sadece 50µl hasta serumu çalışma için yeterli oldu ve serum saflaştırmaya gerek olmadan işleme alındı. Aynı anda çok sayıda serum çalışmaya katıldı. Tüm bunlar göz önüne alındığında yöntemin rutin uygulamaya uygun olduğu belirlendi.

Çalışmamızda gelen 356 örneği ilk olarak kadın-erkek ve erişkin-çocuk olarak bölümlendirdik bunlarda görülen HBV DNA oranlarını karşılaştırdık. Cinsiyete ve yaşa göre HBV DNA oranını incelediğimizde önemsiz ($p>0.05$) olarak belirledik. Cinsiyet ve yaşla ilgili sadece serolojik markerlerle karşılaştırmalar olup HBV DNA ile karşılaştırılan yayınlara rastlayamadığımız için bu parametreleri karşılaştırmadık.

Serolojik markerleri tek tek ele aldığımızda; 356 serum örneğinin 336'sında (%94.3) HBsAg pozitif, bununda 100'ünde (%29.8) HBV DNA pozitif olarak bulundu. HBsAg negatif 20 örneğin ise 2'sinde (%10) HBV DNA pozitif. Yapılan benzer çalışmalarda HBsAg pozitiflerde HBV DNA görülme oranı çok değişkenlik göstermektedir (%19-72 arasında bir oranda), HBsAg negatiflerde ise bu oran %2-10 arasında değişmektedir. HBsAg pozitif ve negatif arasındaki farklılık önemli bulunmuştur ($p<0.05$). Tek olarak HBsAg pozitif bulunması akut hepatit B virus enfeksiyonunu göstermektedir. Fakat viral replikasyonu tespit için HBeAg'yi de göstermek gerekmektedir. Bulunan değerlerin bu kadar farklı olması, her iki parametrenin de zaman zaman negatif bulunması, viral replikasyonun belirlenmesi için HBV DNA saptanmasının gerekliliğini ve güvenilirliğini göstermektedir.

Anti-HBs 356 örneğin 15'inde (%4.2) pozitif bulundu bunun sadece 1'inde (%6.7) HBV DNA pozitif, 341'inde (%95.8) negatif bulundu bunun ise 101'inde (%29.6) HBV DNA pozitif. Benzer çalışmalarda anti-HBs pozitiflerde HBV DNA görülme oranları %0-5 arasında, anti-HBs negatiflerde ise HBV DNA görülme oranları yine değişkenlik göstererek %29-100'lere varan düzeylerde görülmektedir. Anti-HBs pozitif ve negatif değerler arasındaki farklılık önemli bulunmuştur ($p<0.05$). Anti-HBs, aşılama sonrası da pozitifleştiğinden tek başına pozitifliği HBV ile karşılaşmayı göstermemektedir.

HBeAg 356 olgunun 40'ında (%11.2) pozitif olup bunun 30'unda (%75) HBV DNA pozitif. 316 olguda (%88.76) HBeAg negatifti, burada da HBV DNA 72'sinde (%22.8) pozitif bulundu. Buradaki farklılık oldukça önemli bulunmuştur ($p<0.05$). Yapılan diğer benzer çalışmalarda da HBeAg pozitifliği ile beraber HBV DNA görülme oranları oldukça yüksek bulunmuştur. Aktif viral replikasyonun işaretleri olan HBeAg ve HBV DNA pozitifliği arasında doğru bir ilişki vardır (121,123). Özellikle HBeAg pozitif kronik hepatitlilerde hangi yöntemle bakılırsa bakılsın HBV DNA görülme oranı %95-100 gibi oldukça yüksek oranlardadır (119). Yani HBeAg pozitif serumlarda HBV DNA bakılarak viral replikasyon için daha güvenilir karar vermek ve hastalığın prognozunu değerlendirmek, sağaltımı planlamak mümkün olabilir. HBV DNA tanı testlerinin kullanılmasından önceki dönemlerde HBeAg vireminin tek göstergesi olarak kabul edilirken, HBeAg negatif mutantların varlığının belirlenmesinden sonra HBeAg ve anti-HBe'nin vireminin çok güvenilir göstergeleri olmadığı anlaşılmıştır (27,122).

356 olgunun 149'unda (%41.8) anti-HBe pozitif, bunlardan da 27'sinde (%18.1) HBV DNA pozitif. 207 örnekte (%58.1) anti-HBe negatif, bunun ise 75'inde (%36.2) HBV DNA pozitif. Aralarındaki farklılık önemli bulunmuştur ($p < 0.05$). Benzer çalışmalarda da oranlar değişik olsada aynı şekilde anti-HBe negatifliğinde HBV DNA görülme oranları daha yüksek bulunmuştur. Anti-HBe pozitifliği ile beraber HBV DNA bulunan çalışmaların sonuçları oldukça farklılık göstermektedir. Bu farklı sonuçlar yöresel suşlar, incelenen olguların sayısal ve klinik farkları, örneklerin alınma zamanı, kullanılan tekniklerin duyarlılık farklarından kaynaklanıyor olabilir (123,128). HBV DNA ile HBeAg ve anti-HBe serolojik profilleri arasında çelişkili sonuçların elde edilmesi, mutant bir HBV enfeksiyonunun göstergesi olabilmektedir (122).

Anti-HBc total'ye baktığımızda 356 olgunun 144'ünde (%40.4) pozitif bulduk, bunun 45'inde (%31.3) HBV DNA pozitif. 212 olguda da anti-HBc total negatif, burada da 57'sinde (%26.9) HBV DNA pozitif. İkisi arasındaki HBV DNA görülme oranları farkı önemli bulunmamıştır ($p > 0.05$).

Anti-HBcIgM 356 örnekte 3'ünde (%0.85) pozitif bulundu, 2'sinde (%66.7) HBV DNA pozitif. 353 örnekte (%99.15) ise anti-HBcIgM negatif, bununda 100'ünde HBV DNA pozitif. Burada da aralarındaki fark önemsiz bulunmuştur ($p > 0.05$). Weber ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada anti-HBcIgM ve anti-HBc total belirlenmesinden 1 hafta sonra HBV DNA belirlenmesinin çok düşük olduğu fakat anti-HBc bulunması enfeksiyonla kesin teması gösterdiğinden HBV DNA belirlenmesinde hata riskinin çok az olduğunu göstermişler (113). Anti-HBc tespit edilmesi mutlak akut enfeksiyonu göstermez, bazı taşıyıcılarda ve kronik hepatitlilerde de az miktarda anti-HBc antibodylerine rastlanmaktadır. Bu nedenle anti-HBc'nin olmasından çok olmaması daha değerlidir (15).

Bizim çalışmamızda ve yapılan diğer bütün çalışmalardaki bulunan değerler arasında çok değişik oranlarda farklılıklar bulundu. Bu farklılıkların nedenlerine bakacak olursak; Çalışılan test yöntemleri ve buna bağlı olarak testlerin duyarlılık oranları oldukça farklıydı. Aşağıda örnek olarak tabloda görüldüğü gibi yöntemler ve bunların duyarlılık sınırları 4700 kopya/ml ile <50 kopya/ml arasında değişmektedir (Tablo 14)(124). Çalışmada kullanılan testlerin bazıları kalitatif bazıları

kantitatif sonuç vermektedir, aynı yöntemlerde bile kullanılan cut off değerleri farklı olabilmektedir. Bu yüzden yöntemler arasında bir standart oluşturulamamıştır.

Tablo 14 : HBV-DNA kantitatif testlerinin karşılaştırılması (124)

Test	Yöntem	Duyarlılık (Conversion factor)
Digene hybrid-capture II ultra sensitive (Digene corp)	Hybrid capture signal amplification	4700 copies/ml (NO CE mark)
Versant HBV DNA 3.0 (bDNA) (Bayer Diagnostics)	Semi-automated bDNA signal amplification	2000 copies/ml (1 IU/ml=5.6 copies/ml)
Cobas amplicor HBV monitor (Roche molecular systems)	Semi-automated quantitative RT-PCR	200 copies/ml (1 IU/ml=5.6 copies/ml)
Cobas taqman 48 HBV (Roche molecular systems)	Real time PCR with TaqMan probe	<50 copies/ml (1 IU/ml=5.8 copies/ml)
Real art HBV PCR assay (Artus-Biotech)	Real time PCR	<50 copies/ml (1 IU/ml=5.8 copies/ml)

Farklılıkların bir başka nedeni ise çalışma gruplarının (kan merkezi donörleri, hepatit şüphesi ile hastane polikliniklerine baş vuranlar, sağaltım alan veya almayan kronik hepatitliler gibi) ve örnek sayılarının birbirinden değişik olmasıdır.

Farklı serolojik profillerin ortaya çıkmasındaki en önemli neden ise mutant HBV infeksiyonlarının oluşmasıdır. Aktif bağışık cevap varlığına rağmen virüste meydana gelen genetik değişiklikler mutant süşun replikasyonuna devam etmesini sağlamakta, bu da tanıda karışıklıklara ve aşı çalışmalarında başarısızlıklara neden olmaktadır. Bu nedenle HBV mutantlarının önemi her geçen gün artmaktadır.

Kullandığımız hibridizasyon yöntemi duyarlı bir test olması, aynı gün sonuç vermesi yanında kantitatif bir test olduğundan, antiviral sağaltımın sonucunun izlenmesini de sağlamaktadır. Ayrıca kronik HBV infeksiyonu, viral replikasyonun yüksek düzeyleriyle karakterize olduğundan, özellikle HBsAg ve HBeAg pozitifliği belirlenen hastalarda replikasyon düzeyinin belirlenebilmesi, kronik infeksiyon gelişimiyle ilgili fikir verebilecektir. Düşük HBV DNA pozitifliği düşük HBV replikasyonunu, yüksek HBV DNA pozitifliği yüksek HBV replikasyonunu göstermekte, buda farklı sağaltım rejimlerinin seçimine olanak sağlamaktadır (127,129,130,131).

Çalışmalar arasında sayısal değerlerdeki farklılıklara rağmen, bizim araştırmamızdaki sonuçlar da diğerlerine paraleldir.

SONUÇ

Bu çalışmada son yıllarda hepatit B virus infeksiyonu tanısında önemli bir yeri olan “Digene Hybrid Capture™ system HBV DNA assay” yöntemi ile elde ettiğimiz HBV DNA sonuçlarının serolojik profillerle uyumluluğunun karşılaştırılması amaçlanmıştır.

HBV infeksiyon tanısı ve prognozunun izlenmesinde sık kullanılan serolojik göstergeler tek başına yeterli değildir. Gerek şüpheli serolojik profillerde, gerek sağlıklı taşıyıcılarda, gerekse kronik hepatitli hastalarda mutlaka HBV DNA düzeyine bakılması gerektiği çalışmamızda da gösterilmiştir. Kan bankası donörleri üzerinde de yapılan çalışmalar var olmakla birlikte, testler hem pahalı hem de işlemler uzun sürdüğünden donör kaybını arttırıp, kan maliyetini yükselteceğinden kan bankalarında kullanılması şu an için önerilen bir yöntem değildir.

HBV DNA düzeyi, HBV infeksiyonunun antiviral sağaltımının izlenmesi açısından da çok önemlidir. Antiviral sağaltımın amacı, HBV replikasyonunun durdurulması ve daha sonra virüsün eradike edilmesidir. Antiviral sağaltımın maliyeti ve yan etkileri gibi olumsuz yanlarından kaçınabilmek için, sağaltım uygulanacak olguların seçiminde dikkat edilerek viral replikasyonun en kesin göstergesi olan HBV DNA düzeyinin diğer serolojik belirleyicilerle beraber belirlenmesinin büyük önemi olduğu düşüncesindeyiz.

Çalışmalardaki çıkan farklı sonuçların ortadan kaldırılabilmesi ve tüm birimlerde bir standart sağlanması için çalışılan yöntemlerin ve cut off değerlerinin aynı şekilde olması gerekliliğine inanmaktayız ki; Tespit edilen hastaların her yerde ortak bir sağaltım protokolleri oluşturulsun.

Hibridizasyon yöntemi kolay, hızlı, tek eleman ile işlemin tamamlanabildiği kantitatif bir yöntemdir. Rutin uygulamada kullanıma uygundur. Hasta izleminde, ilaç etkilerinin karşılaştırılmasında yeğlenen duyarlı bir yöntemdir. Ancak duyarlılığı ve özgüllüğü PCR yönteminden düşük ve maliyeti daha yüksektir. Kullandığımız yöntemin hem duyarlılık hem de özgüllüğünün attırılması için ve maliyetin düşürülmesi için bir takım çalışmaların yapılması gerektiğini düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

1. Kocagöz T. Nükleik asit çoğaltma yöntemleri. Mikrobiyoloji Bülteni 2000; 34:113-17.
2. Kawai H, Feinstone SM. Acute Viral Hepatitis. In: Mandell GL, Bennett JE., Dolin R (eds). Principles and Practice of Infectious Diseases. Fifth edition. Philadelphia, London, Toronto, Montreal, Sydney, Tokyo, Edinburgh: Churchill Livingstone, 2000:1279-97.
3. Mahoney FJ. Update on diagnosis, management, and prevention of Hepatiti B virus infection. Clin Microbiol Rev. 1999; 12:351-66.
4. Robinson WS. Hepatitis B Virus and Hepatitis D Virus. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds). Principles and Practice of Infectious Diseases. Fifth edition, Philadelphia, London, Tokyo, Edinburgh: Churchill Livingstone. 2000:1652-85.
5. Kıyan M. Hepatit B Virusu. In: Kılıçturgay K, Badur S (eds). Viral Hepatit 2001. Birinci baskı, İstanbul: Viral Hepatitle Savaşım Derneği,2001:86-120.
6. Blumberg BS, Alter HJ. A new antigen in leukemic serum. JAMA. 1967;191: 541-5.
7. Ustaçelebi Ş: Temel ve Klinik Mikrobiyoloji, 1.Baskı, Güneş Kitabevi, Ankara, 1999 :871-880.
8. Dündar İ, İnal S, Tabak F(eds). ;Geçmişten Günümüze Viral Hepatitler, Viral Hepatit 2005 :10-20.
9. Luo KX, Zhou R, He C, Liang ZS,Jiang S, et al. Hepatitis B Virus DNA in Sera of Virus Carriers Positive Exclusively for Antibodies to the Hepatitis B Core Antigen. Journal of Medical Virology 1991;35:55-9.
10. Magnus LO, Espmark JA. New specificities in Australia antigen-positive sera distinct from the Le Bouvier determinants. J Immunol. 1972;109:1017-21.
11. Ganem, D.: Hepadnaviridae and their replication. Virology , Fields BN, Knipe DM, Howley PM(eds). 3. baskı. Lippincott, Raven Press 1996;2703-2737.
12. Robinson, W.S.: Hepadnaviridae and Their Replication. Fields, B.N, Knipe, D.M (eds): Fundamentel Virology. 2nd ed. Lippincott, Raven Press Ltd, 1991:989-1201.

13. Robinson W.S.: Hepatitis B Virus and Hepatitis D Virus, Principles and Practice of Infectious Diseases, 4th. Edition (Eds: Mandell, G.L. Bennet, J.E. Dolin, R.), USA, Churchill-Livingstone 1995; 1406-1439.
14. Yenen, O.Ş.: Viral Hepatitler. Topçu, A.W., Söyletir G., Doğanay M.(Eds) İnfeksiyon Hastalıkları. İstanbul, Nobel Kitabevleri Ltd.Şti. 1996;641-700.
15. Kıyan, M.: HBV İnfeksiyonu. Kılıçturgay, K.(Eds). Viral Hepatit '98. Bursa 1998: 65-93.
16. Badur, S.: Hepatit B Virus (HBV); Moleküler Viroloji ve Serolojik Tanı. In: Kılıçturgay, K.(Eds) Viral Hepatit '94. İstanbul: Viral Hepatit Savaşım Derneği. 1994:65-90.
17. Lee, W.M.: Hepatitis B Virus Infection. N.Engl. J. Med.1997: 1;337:1733-1745.
18. Serter, D.: Hepatit Virüsleri ve Viral Hepatitler. Virüs, Riketsiya ve Klamidya Hastalıkları, İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri, 1997;175-206.
19. Badur, S. Hepatit B Virus. Ağaçfidan, A., Badur, S., Türkoğlu, S.(Eds). İnfeksiyon Hastalıklarının Laboratuvar Tanısında Moleküler Yöntemler. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayın No: 42. İstanbul, 2002:155-160.
20. HBV Elektron Mikrokobik Görünümü. www.nih.go.jp/niid/virology2/aboutthehepatitis.html.
21. HBV Elektron Mikrokobik Görünümü. protist.i.hosei.ac.jp/.../enlargement/C/HBV-8C
22. Akan, E.: Viral Hepatitler. Genel ve Özel Viroloji. 3. Baskı. İzmir Saray Kitabevleri. 1994;542-549.
23. Thiollais, P., Pourcel, C., Dejean, A.: The Hepatitis B Virus. Nature;1985;317:489-495.
24. Lau, J.Y.N., Wright, T.L.: Molecular Virology and Pathogenesis of Hepatitis B. Lancet;1993;342:1335-1340.
25. Macnab, J.C.B., Onions, D. Tumor Viruses; Genome map of HBV. www.gsbs.utmb.edu/microbook/ch047.htm
26. Arauz-Ruiz, P., Norder, H., Visona, K.A., Magnius, L.O.: Molecular Epidemiology of Hepatitis B Virus in Central America Reflected in The Genetic Variability of The Small Gene. JID;1997;176:851-818.
27. Kılıçturgay, K.: Hepatit B Virusunda (HBV) Mutasyon ve Getirdiği Sorunlar. Viral Hepatit Dergisi ;1995:1:1-7.

28. Lemon, S.M., Thomas, D.L.: Vaccines To Prevent Viral Hepatitis. *N Engl J Med*; 1997;336: 196-204.
29. Morales, M.T., Gomes, S.A., Niel, C. Sequence Analysis of Pre S/S Gene of Hepatitis B Virus Strains of Genotypes A, D and F Isolated in Brasil. *Arch Viral* ; 1996;141:1767-1773.
30. Ou, J.H., Yeh, C.T.,Yen, T.S.B.: Transport of Hepatitis B Virus Pre-Core Proteins into Nucleus After Cleavage of Its Signal Peptide. *J.Virol*;1989;63: 5238-5243.
31. Perkins, J.A.: HBV Genome. www.rit.edu/~japfaa/infectious.html, 2002.
32. Kann, M., Lu, X., Gerlich, W.H.: Recent Studies on Replication of Hepatitis B Virus. *J Hepatol*;1995;22(Suppl 1):9.
33. Santantonio, T., Jung, M.C., Schneider, R.: Hepatitis B Virus Genomes That Cannot Synthesize Pre-S2 Proteins Occur Frequently and as Dominant Virus Populations in Chronic Carriers in Italy. *Virology*;1992;188:948-95,.
34. Thomas, H.C., Carman, W.F.: Envelope and Precore/core Variants of Hepatitis B Virus. *Gastroenterol Clin. N. Amer*;23:499-514, 1994.
35. Thomas, H.C., Foster, G.R., Sumiya, M.: Mutation of Gene For Mannose-Binding Protein Associated with Choronic Hepatitis B Viral Infection. *Lancet*; 1996;348:1417-1419.
36. The Hepatitis B Virus Page. www.globalseve.net/~roberttg/HBV/hbvports.htm
37. Slonczewski, J.:What is HBV. *Biology* 238: Microbiology, May 2003. biology.kenyon.edu/slonc/bio38/scuderi/parti.html.
38. Geissler, M., Tokushige, K.,Chante, C.C., Zurawski, V.R., Wands, J.R.: Cellular And Humoral Immune Response to Hepatitis B Virus Structural Proteins in Mice After DNA-Based Immunization. *Gastroenterol*;1997;112: 1307-1320.
39. Milich, D.R., Sallberg, M., Maruyama, T.: The Humoral Immune Response in Acute and Chronic Hepatitis B Virus Infection *Springer Semin Immunopathol*; 1995;17:149-166.
40. Tekelli, A., Tabak F(eds). ;Hepatitis B Virüsünde Mutasyon ve Önemi, *Viral Hepatitis* 2005 :160-168.
41. Wang G-H., Seeger, C. The Reverse Transcriptase of Hepatitis B Virus Acts as a Protein Primer for Viral DNA Synthesis, *Cell* ; 1992;71:663-670.
42. IARC; Monographs On The Evaluation Of Carcinogenic Risk To Human. Hepatitis B Virus. *Hepatitis Viruses* Volume 59. Lyon 1994;45-163.

43. Bahn, A., Hilbert, K., Martine, U., Westedt, J., Weizsacker, F., Wirth, S.: Deletion of a Precore Mutant After Vertical Transmission of Different Hepatitis B Virus Variants is Correlated with Fulminant Hepatitis in Infants. *J.Med. Virol.*; 1995;47:336-341.
44. Hawkins, A.E., Gilson, R.J.C., Beath, S.V.: Novel Application of a Mutation Assay : Evidence of Transmission of Hepatitis B Viruses with Precore Mutations and Their Detection in Infants with Fulminant Hepatitis. *B.J.Med.Virol.*;1994;44:13-21.
45. Brechot, C., et al. Polymerase Chain Reaction for the diagnosis of Viral Hepatitis B and C. *Gut, Supplement*;1993;39:44.
46. Mason, A., Yoffe, B., Noonan, C., et al. Hepatitis B Virus DNA in Peripheral-blood Mononuclear Cells in Chronic Hepatitis B After HBsAg Clearance. *Hepatology*; 1992;16:36-41.
47. Tassopoulos, N.C., Papaevangelou, G.J., Karayannis, A.R., et al. Detection of Hepatitis B Virus DNA in Asymptomatic Hepatitis B Surface Antigen Carriers: Relation to Sexual Transmission. *Am J Epidemiol*; 1987;126:587-91.
48. Mitsuda, T., Mori, T., Ookawa, N., et al. Demonstration of mother to infant transmission of hepatitis B virus by means of polymerase chain reaction. *The Lancet* ;1989 ;14:886-89.
49. Karagöz, K., Felek, S., Kalkan, A., Akbulut, A., Kılıç, S.S., ve ark. Hepatit B Virusunun Horizontal Yolla Geçişinin Araştırılması. *Viral Hepatit Dergisi* ; 1997(2); 3:100-5.
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 Hepatit Savaşım Derneği;2001:129-34.
52. By David Paar, M.D.*,Associate Professor of Medicine, Director, HIV care/TDCJ correctional Managed Core, Hepatitis B Virus: Transmission, Prevention, Treatment and HIV Co-infection. *THE BODY*, June/July 2001.
53. Okamoto, H., Yotsumoto, S., Tsuda, F., Machida, A., Mayumi, M., et al. Quantitative and qualitative Differences in Serum HBV Between HBeAg Positive Carriers and Those Positive for Anti-HBe. *Japan. J.Exp.Med.*1989;59,6:259-62.

54. Barlet, V., Cohard, M., Thelu, M.A., et al. Quantitative detection of Hepatitis B Virus DNA in Serum Chemiluminescence: Comparison With Radioactive Solution Hybridization Assay. *Journal of Virological Methods* 1994;49:141-52.
55. Erhardt, A., Schaeffer, S., Athanasiou, N., Kann, M., Gerlich, W.H., et al. Quantitative Assay of PCR-Amplified Hepatitis B Virus DNA Using a Peroxidase-Labelled DNA Probe and Enhanced Chemiluminescence. *J. Clin. Microbiol.*1996;34,8:1885-91.
56. Corden, S., Ballard, A.L, Ijaz, S., et al. HBV DNA levels and transmission of hepatitis B by health care workers. *Journal of Clinical Virology*. Volume 27, Issue 1, May 2003:52-58.
57. Bilim Tıbbi Tahlil Laboratuvarı//Bilimsel Bültenler:: Viral Hepatitler. www.HBV DNA\ Bilim Tıbbi Tahlil Lab...4-2006.
58. The Liver and Biliary Tract. In:Robbins, S.L., Cotran, R.S., Kumar,V(eds). *Pathologic Basis of Disease*. Third edition, Philadelphia, London, Toronto, Mexico City, Rio De Janeiro, Tokyo: W.B. Saunders Company, 1984:884-959.
59. Mesleki Tıp Dergisi, doktor, hastane dergisi.com. [http:// doktordergisi.com/sayi9/busayide37.asp.2-2006](http://doktordergisi.com/sayi9/busayide37.asp.2-2006).
60. Juszczuk, J. Clinical course and consequences of hepatitis B infection. Volume 18 supplement 1, Feb. 2000:S23-S25.
61. Pawlotsky, J.M., Bastie, A., Lonjon, I., et al. What technique should be used for routine detection and quantitation of HBV DNA in clinical samples? *Journal of Virological Methods*. 1997;65:245-53.
62. McCormick, M.K., Dockter, J.M., Linnen, D., Kolk, Y., Wu and Giachetti, C. Evaluation of a new molecular assay for detection of human immunodeficiency virus type 1 RNA, hepatitis C virus RNA, and hepatitis B virus DNA. *Journal of Clinical Virology*. Jan.2006:1-20.
63. Bilgehan, H. *Klinik Mikrobiyolojik Tanı*. Barış Yayınları, Fakülteler Kitabevi, 3. Baskı, 2002:274-283.
64. Hollinger, F.B., Dienstag, J. Hepatitis B and D Viruses. In: Murray, P.R., Baron, E.J., Tenover, M.C., Tenover, M.A.(eds). *Manuel of Clinical Microbiology*. Seventh edition, Washington, D.C: American Society for Microbiology, 1999:1025-42.
65. Hadler, S.C., Francis, D.P., Maynard, J.E. Long Term Immunogenicity and Efficacy of Hepatitis B Vaccine in Homosexual Men. *N.Engl.J.Med.*;1986;315:209-214.

66. Orenstein, W.A., Hinman, A.R., Bart, K.J., Hadler, S.C. Immunization Principles and Practice of Infectious Diseases, 4th. Edition, (Eds: Mandell, G., Bennet, J.E., Dolin, R.), USA, Churchill-Livingstone; 1995, 2770-2790.
67. Clements, M.L., Miskovsky, E., Davidson, M. Effect of age on the Immunogenecity of Yeast Recombinant Hepatitis B Vaccines Containing Surface Antigen (S or PreS2+S Antigen). *J.Infection Dis*;1994;170:510-516.
68. Tekeli, E. Korunma. Kılıçturgay, K.(Eds). *Viral Hepatit '98*. Bursa 1998: 132-135.
69. Hoofnagle, J.H., Toward Universal Vaccination Against Hepatitis B Virus. *N.Engl. J.Med*;1989;321:1333-34.
70. Henderson, D.K. Postexposure Prophlaxis for Occupational Exposure to Hepatitis B, Hepatitis C and Human Immundeficiency Virus. *Surg.Clin. North Am.* 1995;75:1175-1187.
71. Beasley, R.P., Hwang, L.Y., Lee, G.C. Prevention of Perinataly Transmitted Hepatitis B Virus Infections With Hepatitis B Immunglobulin and Hepatitis B Vaccine. *Lancet*; 1983;2:1099.
72. Koff, R.S. Hepatitis B Virus and Hepatitis D Virus. In: Gobarch, S.L., Barlet, J.G., Blacklow, N.R.(eds). *Infectious Diseases*. Second edition, USA:W.B. Saunders Company. 1998:2107-13.
73. Persing, D.H. In vitro Nucleic Acid Amplification Techniques. In: Persing, D.H., Smith, T.F., Turnover, F.C., White, T.J.(eds). *Diagnostic Molecular Microbiology Principles and Applications*. Washington, D.C: American Society for Microbiology, 1993:51-87.
74. Mullis, K.B., Faloona, F.A., et al. Specific synthesis of DNA in vitro via polymerase catalysed chain reaction. *Methods Enzymol.* 1987;155:335-50.
75. Mullis, K.B. The Unusual Origin of the Polymerase Chain Reaction. *Sci Am.* 1990;262:56-65.
76. Yokosuka, O., Tagawa, M., Omata, M. PCR Detection of Hepatitis B Virus. In: Persing, D.H., Smith, T.F., Turnover, F.C., White, T.J.(eds). *Diagnostic Molecular Microbiology Principles and Applications*. Washington, D.C: American Society for Microbiology, 1993:322-26.
77. Bej, A.K., Mahbubani, M.H. Thermostable DNA Polymerases for In Vitro DNA Amplifications. In: Griffin, H.G., Griffin, A.M.(eds). *PCR Technology Current Innovations*. Ann Arbor, London, Tokyo: CRC Pres, 1994:219-37.

78. Mahbubani, M.H., Bej, A.K. Applications of PCR Methodology in Clinical Diagnostics. In: Griffin, H.G., Griffin, A.M.(eds). PCR Technology Current Innovations. Ann Arbor, London, Tokyo: CRC Pres,1994:307-25.
79. Lenstra, J.A., Bleumink-Pluym, N.M.C. PCR in veterinary diagnostics. November 24-26, 1997 meeting.Lelystad.
80. Temizkan, G. Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler: Genel Bakış. In: Temizkan, G., Arda, N.(eds). Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 199:1-17.
81. McCreedy, B.J. Detection of Viral Pathogens Using PCR Amplification. In: Wiedbrauk, D.L., Farkas, D.H.(eds). Molecular Methods for Virus Detection. California: Academic Press, INC., 1995:175-91.
82. Persing, D.H. Target Selection and Optimization of Amplification Reactions. In: Persing, D.H., Smith, T.F., Turnover, F.C., White, T.J.(eds). Diagnostic Molecular Microbiology Principles and Applications. Washington, D.C: American Society for Microbiology, 1993:88-104..
83. Wiedbrauk, D.L., Drevon, A.M. Nucleic Acid Detection Methods. In: Wiedbrauk, D.L., Farkas, D.H.(eds). Molecular Methods for Virus Detection. California: Academic Press, INC., 1995:1-24.
84. Stoler, D.L., Michael, N.L. Nucleic Acid Blotting Techniques for Virus Detection. In: Wiedbrauk, D.L., Farkas, D.H.(eds). Molecular Methods for Virus Detection. California: Academic Press, INC., 1995:39-74.
85. Abacıoğlu, H. Nükleik Asit Tabanlı Kantitatif Testlerde Tanısal Sorunlar: HBV, HCV ve HIV deneyimi. Mikrobiyoloji Bülteni. 2000;34:199-203.
86. Unger, E.R., Piper, M.A. Molecular Diagnostics: Basic Principles and Techniques. In: Henry, J.B., Davey, F.R., Nakomura, R.M., Pincus, M.R., Woods, G.L.(eds). Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods. Nineteenth edition, Philadelphia, London, Toronto, Montreal, Sydney, Tokyo: W.B. Saunders Company, 1996:1338-53.
87. Badur, S. Viral Hepatitlerin Tanısında Moleküler Biyoloji Teknikleri. In: Kılıçturgay K, Badur S (eds). Viral Hepatit 2001. Birinci baskı, İstanbul: Viral Hepatitle Savaşım Derneği;2001: 447-62.
88. Wang, J.T., Wang, T.H., Sheu, J.C., Shih, L.N., Lin, J.T., Chen, D.S. et al. Detection of Hepatitis B Virus DNA by Polymerase Chain Reaction in plasma of

- Volunteer Blood Donors Negative for Hepatitis B Surface Antigen. *The Journal of Infectious Diseases*, 1991; 163:397-99.
89. Hess, G., Reuschling, M., et al. Toward Routine Diagnosis of Hepatitis B Virus Deoksiribonucleic Acid. *Clinical Biochemistry*, 1993;26:289-93.
90. Zaaijer, H.L., Borg, F.T., Cuypers, H.T.M., Hermus, M.C.A.H., Lelie, P.N., et al. Comparison of Methods for Detection of Hepatitis B Virus DNA. *J.Clin. Microbiol.*1994;32:2088-91.
91. Okan, A., Yücesoy, M., Akpınar, H., Bahar, H., Tankurt, E. ve ark. Asemptomatik Hepatit B Virüsü Taşıyıcılarında Serum HBV-DNA Düzeyleri. *Viral Hepatit Dergisi* 1997(2);3:94-9.
92. Akan, E.: Genel ve Özel Viroloji, 2. Baskı, Türkiye Klinikleri Yayınevi, Ankara, 1989.
93. Ustaçelebi, Ş.:Genel Viroloji, 1. Baskı, Hacettepe Taş Kitapçılık Ltd. Şti. Ankara,1992.
94. Akan, E.: Genel ve Özel Viroloji, 3. Baskı, Saray Kitabevleri, İzmir, 1994;449-502.
95. Balık, İ. İnterferonlar ve Kronik Hepatit B'de Kullanımı. In: Kılıçturgay K, Badur S (eds). *Viral Hepatit 2001*. Birinci baskı, İstanbul: Viral Hepatitle Savaşım Derneği;2001:135-51.
96. Taşova, Y., Saltoğlu, N., Erdurak, Ö., Aksu, H.S.Z. ve ark. Kronik Hepatit B İnfeksiyonlarında İnterferon Sağaltımsi. *Viral Hepatit Dergisi* 1998(1);4:46-50.
97. Mıstık, R., Akalın, H., Heper, Y., Özakın, C., Helvacı, S., Töre, O. HBV DNA'sının PCR ve Hibridizasyon Yöntemleriyle Karşılaştırmalı Olarak Gösterilmesi, IV. Ulusal Viral Hepatit Simp.Kongre Kitabı s:145. 4-6 Kasım 1998,Ankara.
98. Aşçı, Z., Akbulut, A., Doymaz, M.Z., Felek, S., Kılıç, S.S. Serumda HBV DNA'sının PCR yöntemiyle taranması ve HBV serolojik göstergeleriyle karşılaştırılması. *Viral Hepatit Dergisi*; 1996:2:6-9.
99. Yücesoy, M., Bahar, İ.H., Yuluğ, N. Hepatit B Virus (HBV) Serolojik Belirleyicileri ile HBV DNA'nın Karşılaştırılması. *İnfeksiyon Dergisi*, 1999;13(4):581-584.
100. Pekbay, A., Günaydın, M., Bedir, A. HBV tanısında kullanılan HBV DNA ve diğer göstergelerin karşılaştırılması. *Türk Klin. Mikrobiyol. İnf. Hast. Kongre Kitabı*, s:26, 6-10 Ekim 1997, Ankara.

101. Özaras, R., Mert, A., Şentürk, H., Tabak, F., Takan, V., Akdoğan, M., Aktuğlu, Y. Sağlıklı HBsAg Taşıyıcılarında HBV DNA Pozitiflik Oranı. IV. Ulusal Viral Hepatit Simpozyumu Program ve Kongre Kitabı.S:144, 4-6 Kasım 1998, Ankara.
102. Kılıç, H., Karagöz, S., Aygen, B. Kronik Asemptomatik HBV Taşıyıcılarında Serum HBV DNA Düzeyleri. IV. Ulusal Viral Hepatit Simpozyumu Program ve Kongre Kitabı.S:146, 4-6 Kasım 1998, Ankara.
103. Demirtürk, N., Eldemir, H., Aktepe, O.C., Altındiş, M., Kahraman, A. HBsAg Pozitifliği Saptanan Hastalarda Serolojik ve Biyokimyasal Bulguların Değerlendirilmesi Kronik Hepatit Tanısında Yeterli mi? VI. Ulusal Viral Hepatit Simpozyumu Program ve Kongre Kitabı.S: 46, 31 Ekim-2 Kasım 2002, Ankara.
104. Tekerekoğlu, M.S., Aktaş, E., Durmaz, R. Hepatit B Virus DNA'sının Belirlenmesinde "Real-Time" Polimeraz Zincir Reaksiyon Yöntemi ile "Hybrid Capture" Sisteminin Karşılaştırılması. VI. Ulusal Viral Hepatit Simpozyumu Program ve Kongre Kitabı.S: 115, 31 Ekim-2 Kasım 2002, Ankara.
105. Otlu, B., Çiçek, A., Durmaz, R., Temel, İ. HBV-DNA Konsantrasyonlarının HBeAg ve ALT Düzeyleriyle İlişkisi. 2. Ulusal Viroloji Kongresi Konferans ve Sunumlar S:253, 13-17 Eylül 2005-Kemer, Antalya.
106. Sayan, M., Meriç, M., Mutlu, B., Çelebi, S., Willke, A. HBs Antijen Negatif Bireylerde Gizli (occult) Hepatit B Virus İnfeksiyonu. 2. Ulusal Viroloji Kongresi Konferans ve Sunumlar S:265, 13-17 Eylül 2005-Kemer, Antalya.
107. Köse, Ş., Akman, S., Karacan, S., İyi, T. HBsAg Pozitif Olgularda HBV DNA, HBeAg ve AntiHBe Prevalansının Değerlendirilmesi. . 2. Ulusal Viroloji Kongresi Konferans ve Sunumlar S:270, 13-17 Eylül 2005-Kemer, Antalya.
108. Deguchi, M., Yamashita, N., Kagita, M., Asari, S., Iwatani, Y., Tsuchida, T., Inuma, K. and Mushahwar, I.K. Quantitation of hepatitis B surface antigen by an automated chemiluminescent microparticle immunoassay. Journal of Virological Methods. 115;2, 2004, 217-222.
109. Drosten, C., Nippraschk, T., Manegold, C., Meisel, H., Brixner, V., Roth, W.K., Apedjinou, A. and Günther, S. Prevalence of hepatitis B virus DNA in anti-HBc-positive/HBsAg-negative sera correlates with HCV but not HIV serostatus. Journal of Clinical Virology, 29;1, 2004, 59-68.

110. Peignoux, M.M., Boyer, N., Colombat, M., Akremi, R., et al. Serum hepatitis B virus DNA levels and liver histology in inactive HBsAg carriers. *Journal of Hepatology*, 36;4, 2002: 543-546.
111. Fisker, N., Pedersen, C., Lange, M., Nguyen, K.T.T., Georgsen and Christense, P.B. Molecular epidemiology of hepatitis B virus infections in Denmark. *Journal of Clinical Virology*, 31;1, 2004: 46-52.
112. Schalm, S.W. and Buster, E.H.C.J. Management of hepatitis B virus infected health care workers based on HBV DNA levels. *Journal of Clinical Virology*, 27;3, 2003: 231-234.
113. Weber, B., Mühlbacher, A. and Melchior, W. Detection of an acute asymptomatic HBsAg negative hepatitis B virus infection in a blood donor by HBV DNA testing. *Journal of Clinical Virology*, 32;1, 2005: 67-70.
114. Akahane, Y., Okada, S.İ., Sakamoto, M., Wakamiya, M., Kitamura, T., Tawara, A., Naitoh, S., Tsuda, F. And Okamoto, H. Persistence of hepatitis B viremia after recovery from acute hepatitis B: correlation between anti-HBc titer and HBV DNA in serum. *Hepatology Research*, 24;1, 2002: 8-17.
115. Poljak, M., Marin, I.J., Seme, K., Brinovec, V., Maticiç, M., Volkar, J.M., Leynicar, G. and Vince, A. Second-generation Hybrid capture test and Amplicor monitor test generate highly correlated hepatitis B virus DNA levels. *Journal of Virological Methods*, 97;1-2, 2001: 165-169.
116. Renteria, I.B., Espinosa, L.E.M., Carrillo, M.A.D., Martinez, F.J.M. and Saldana, H.A.B. Detection of Hepatitis B Virus in Seropositive and Seronegative Patients with Chronic Liver Disease Using DNA Amplification by PCR. *Archives of Medical Research*, 33;6, 2002: 566-571.
117. Busch, P.M. Should HBV DNA NAT replac HBsAg and/or anti-HBc screening of blood donors? *Transfusion Clinique et Biologique*, 11;1, 2004: 26-32.
118. Erensoy, S., Özacar, T., Zeytinoğlu, A., Arda, B., Bilgiç, A. Serumda Hepatit B Virus DNA'sının (HBV DNA) Hepatit B Virus (HBV) Serolojik Göstergeleriyle Karşılaştırılması. *İnfeksiyon Dergisi*;1995:9(1-2):157-160.
119. Yücesoy, M, Bahar, İ.H., Yuluğ, N. Kronik B Hepatitlilerde Hepatit B Virus DNA'sının Gösterilmesi. *Mikrobiyol. Bült.*; 1995:29: 39-46.
120. Dündar, İ.H., Saltoğlu, N., Yaman, A., Aslan, A., Çetiner, S. Hepatit B Virus Markerleri ile HBV-DNA ilişkisi. *Türk Mikrobiyol. Cem. Derg.*;1994:24:240-242.

121. Altındış, M. Hepatit B Virus (HBV) Serolojik Belirleyicileri ile HBV DNA'nın Varlığının Karşılaştırılması. *İnfeksiyon Dergisi*;2002: 16(2): 141-145.
122. Türet, S., Fidan, I. HBsAg Pozitif Serum Örneklerinde Hepatit B Virus DNA'sının Hibridizasyon Yöntemi ile Belirlenmesi ve HBeAg ve Anti-HBe Pozitiflikleriyle Karşılaştırılması. *Mikrobiyol. Bült.*;1999: 33: 215-221.
123. Sönmez, E., Durmaz, R., Kızılkaya, N., Özbilge, H., Günal, S., Yoloğlu, S. HBsAg Pozitif Serumlarda HBV-DNA'nın İki Ayrı PCR Yöntemi ile Taranması ve Sonuçlarının Serolojik Göstergelerle Karşılaştırılması. *Flora*; 1996:3:172-176.
124. Hatzakis, A., Magiorkinis, E., Haida, C. HBV virological assesment. *Journal of Hepatology*, 44(2006) S71-S76.
125. Feinman, S.V., Berris, B., Guha, A., Sooknanan, R., Bradley, D.W., Bond, W.W. and Maynard, J.E. DNA: DNA Hybridization method for the diagnosis of hepatitis B infection. *Journal of Virological Methods*, 8;3, 1984: 199-206.
126. Eroğlu, C., Pekbay, A., Esen, Ş., Havuz, S., Sünbül, M., Günaydın, M., Leblebicioğlu, H. Hepatit B Virus DNA'sının Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ve Hibrit Yakalama Sistemi ile Belirlenmesi. *Viral Hepatit Dergisi*, 2001(3), 390-392.
127. Aspinall, S., Steele, A.D., Peenze, I., Mphahlele, M.J., et al. Detection and quantitation of hepatit B virus DNA: comparison of two commercial hybridization assays with polymerase chain reaction. *Journal of Viral Hepatitis*, 1995;2:107-11.
128. Türkoğlu, S., Badur, S. *İnfeksiyon hastalıkları tanısında PCR*. 1. baskı, İstanbul: 1995,Nobel Tıp Kitabevi.
129. Stephen, K.N., Chan, T.M., Ignatius, K.P., Lai, K.N. Comparison of the second-generation Digene Hybrid Capture Assay with the Branched-DNA Assay for measurement of Hepatitis B Virus DNA in serum. *Journal of Clinical Microbiol*; 1999:2461-2465.
130. Butterworth, L.A., Prior, S.L., Buda, J., Faoagali, L. Comparison of four methods for quantitative measurement of hepatitis B viral DNA. *Journal of Hepatology*, 1996:24:686-691.
131. Yücesoy, M., Taşlı, H., Bahar, İ.H., Yuluğ, N. Farklı serolojik belirleyicilerin değerlendirilmesinde HBV DNA saptanmasının önemi. 9. Türk Klinik Mikrobiyoloji İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi, Kongre kitabı ; 3-8 Ekim 1999:poster no: P129, S:199.

