

## HEPATİT B VİRUS DNA POZİTİFLİĞİ VE SEROLOJİK TESTLER\* DNA positivity of Hepatitis B virus and serological tests

Hatice ÖZBİLGE<sup>1</sup>, Fadile Yıldız ZEYREK<sup>1</sup>, Ayser UZALA MIZRAKLI<sup>2</sup>, Bülent TÜMKAYA<sup>3</sup>

### Özet

**Amaç:** Hepatit B ön tanısı ile laboratuvara gönderilen örnekler üzerinde yapılan bu çalışmada, Hepatit B Virus (HBV) DNA pozitifliği tespit edilen hastaların serolojik testlerinin durumu ve hastanın o sırada tedavi alıp almadığı incelenmiştir.

**Gereç ve Yöntem:** HBV DNA kantitatif olarak real time polimeraz zincir reaksiyon (PCR) uyla, serolojik testler ise enzim immuno assay (EIA) yöntemiyle çalışılmıştır.

**Bulgular:** HBV DNA ve HBV seroloji çalışılan toplam 208 serumun 86 (% 41)'sında HBV DNA pozitifliği bulunmuştur.. HBsAg pozitif 145 örneğin 74 (% 51)'ünde, HBeAg pozitif 36 örneğin 29 (% 80.5)'unda, antiHBe pozitif 125 örneğin 49 (% 39.2)'unda HBV DNA varlığı saptanmıştır.

**Sonuç:** Sonuç olarak hastayı değerlendirirken serolojik değerler, HBV DNA pozitifliği, diğer laboratuvar testleri, hastanın tedavi alıp almadığı ve hastanın kliniği bir bütün olarak düşünülmelidir.

**Anahtar Kelimeler:** Hepatit B virus DNA; PCR; Tedavi

### Abstract

**Aim:** In this study, the clinical specimens of patients with pre-diagnosis of hepatitis B virus infection were examined; serological markers and therapy situation of patients with HBV DNA positive were compared.

**Material and Methods:** HBV DNA was investigated by quantitation of DNA using real-time polymerase chain reaction (PCR) and serological markers by enzyme immunoassay (EIA).

**Results:** HBV DNA was positive in 86 (41 %) of the sera of 208 patients. The HBV DNA was detected in 74 (51 %) of 145 HBsAg positive patients, in 29 (80.5 %) of 36 HBeAg positive patients and in 49 (39.2%) of 125 antiHBe positive patients.

**Conclusion:** It was concluded that in order to evaluate serologic markers of patients, HBV DNA positivity, other liver laboratory tests, treatment and clinical appearance should all be considered.

**Key Words:** Hepatitis B virus DNA; PCR; Therapy

Tüm dünyada akut ve kronik HBV enfeksiyonu önemli bir halk sağlığı problemi oluşturmaktadır. Hepatit B virüsü, dünyada yıllık yaklaşık olarak bir milyon kişinin ölümüyle sonuçlanan kronik hepatit, siroz ve hepatosellüler karsinoma gibi hastalıkların en sık sebebidir (1). Neonatal immunizasyona rağmen dünyada halen 400 milyon kişi HBV taşıyıcısı konumundadır(2). Türkiye hepatit enfeksiyonu yönünden orta endemisiteye sahip ülkeler grubunda yer almakta, HBsAg taşıyıcılık oranı % 2-7, HBV seropozitifliği ise 20-60 olarak bildirilmektedir (3).

HBV' ye ait antijenlerin veya antikörlerin hasta serumunda saptanmasını sağlayan serolojik testler enfeksiyonun hangi evrede olduğunu belirlemede ve infektivitenin değerlendirilmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır (4). Serolojik testlerin yetersiz kaldığı durumlarda ve atipik serolojik vakalarda tanıya gitmede, antiviral tedavinin izlenmesinde, çeşitli mutasyonların tespitinde moleküler biyoloji tekniklerinin kullanıldığı görülmektedir. Kantitatif PCR metodları yüksek sensitivitelere sahip olduğu için de kullanılmaktadır (4-9). Son zamanlarda kullanımı gittikçe yaygınlaşan real-time PCR (RT-PCR) tekniği HBV DNA'nın kantitasyonuna imkan sağlayan hızlı ve basit bir testtir. Bu yöntem, termocycle süresince oluşan PCR ürününün vermiş olduğu floresansın belirli zaman aralıklarında ölçülmesi temeline dayanır. Sonuçta, HBV yüzey geni için düzenlenmiş bir prob ve bilinen

\*Klinik 2003 XI. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Kongresi, 30 Mart-3 Nisan 2003, İstanbul

Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi 63200 ŞANLIURFA Mikrobiyoloji. Y.Doç.Dr.<sup>1</sup>, Uzm.Dr.<sup>2</sup>, Dahiliye. Araş.Gör.Dr.<sup>3</sup>.

Geliş tarihi: 16 Nisan 2003

konsantrasyonları içeren referans standartlarla HBV DNA kantitasyonuna ulaşılır. Bu teknikle serumda çok az miktarda HBV DNA genom kopyası varsa bile tespit edilebilir (8, 9). Tedavi sırasında HBV DNA konsantrasyonundaki artmalar ilaç dirençli varyantları akla getirir, bu nedenle tedaviyi izlemek açısından HBV DNA'nın kantitasyonu önemlidir (10). Ayrıca HBV DNA kantitasyonu invaziv cerrahi girişim yapılacak HBV taşıyıcısı kişilerde enfeksiyon riskini saptamada da kullanılabilir (11).

Bu çalışmada amaç, HBV DNA araştırdığımız hastaların serolojik testlerinin ne durumda olduğunu, hastanın o sırada tedavi alıp almadığını, tespit edilen viral yük miktarı ile bu durumların ilişkisini, HBV DNA kantitasyonunun bize sağlayacağı avantaj ve dezavantajları incelemektir.

## GEREÇ VE YÖNTEM

Hastanemizin farklı kliniklerinden hepatit B ön tanısı ile laboratuvarımıza gönderilen serumların Hepatit B serolojik testleri enzim immuno assay (Abbott/ AxSYM® cihaz ve makro EIA kitleri) yöntemiyle, HBV DNA testi ise real-time polimeraz zincir reaksiyonu (ABI PRISM® 5700 DNA sequencer, TaqMan® 1000 RXN PCR Core Reagents) yöntemiyle çalışılmıştır. Hastalardan alınan kan serumları ayrıldıktan sonra test zamanına kadar -20 °C' de saklanmıştır. DNA ekstraksiyonu Nucleospine DNA izolasyon kiti ile hazırlanmıştır. HBV DNA kantitasyon aralığı  $3 \times 10^2$  ile  $3 \times 10^8$  kopya/ml serum olarak alınmıştır. 1000 kopya/ml üzeri HBV DNA seviyeleri pozitif olarak kabul edilmiştir.

HBV DNA ve hepatit B seroloji testlerinden elde edilen sonuçlar yüzde değeri olarak hesaplanmıştır. HBeAg ile HBV DNA, HBsAg ile HBV DNA pozitif ve negatif sonuçları sayısal değerlerinden 2x2 cross tablolar hazırlanarak, istatistiksel olarak karşılaştırmada Fischer's exact test kullanılmıştır. İstatistiksel analizlerde SPSS 10,0 istatistik paket programı kullanılmıştır. Güvenirlik değeri olarak  $p < 0,05$  değeri alınmıştır.

## BULGULAR

Hastaların 86 (% 41)'sında HBV DNA, 145 (% 69.7)' inde HBsAg, 28 (%13.5)' inde antiHBs, 36 (%17.3)' sında HBeAg, 125 (%60.1)' inde antiHBe, 175 (%84.1)' inde antiHBc total, 2 (%1)' sinde AntiHBcIgM tespit edilmiştir (Tablo I). Serolojik testleri yapılmış ve HBV DNA pozitifliği saptanmış toplam 86 hasta viral yük miktarına bağlı olarak 3 gruba ayrılmıştır. 1000-100.000 kopya/ ml virus içeren grupta 46 (%53.5), 100.000-1.000.000 kopya/ ml virus içeren grupta 16 (%18.6), 1.000.000 kopya/ ml üzerinde virus içeren grupta 24 (%27.9) hasta yer almıştır (Tablo II). Hastaların 41 tanesinin antiviral tedavi aldığı belirlenmiştir. HBsAg negatif 63 hastanın 12'sinde, HBsAg pozitif 145 hastanın 74 (% 51)' ünde HBV DNA pozitif bulunmuştur. İki grup istatistiksel olarak değerlendirildiğinde ikisi arasında oldukça anlamlı fark saptanmıştır ( $P < 0.001$ ).

HBeAg negatif 172 hastanın 57' sinde, HBeAg pozitif 36 hastanın 29 (% 80.5)'unda' unda HBV DNA pozitif bulunmuştur. İki grup istatistiksel olarak değerlendirildiğinde ikisi arasında oldukça anlamlı fark saptanmıştır ( $P < 0.001$ ). HBeAg negatif olup HBV DNA tespit edilen grupta yer alan hastaların % 75.4'ünün HBV DNA viral yük miktarının 100. 000 kopya/ ml altında olduğu tespit edilmiştir.

**Tablo I.** HBV DNA varlığına göre serolojik testlerin durumu

	HBV DNA pozitif	P değeri	
HBsAg	pozitif (145)	74 (% 51)	P<0.001
	negatif (63)	12 (%19)	
Anti HBs	pozitif (28)	5 (% 17)	P<0.05
	negatif (180)	81 (% 45)	
HBeAg	pozitif (36)	29 (% 80)	P<0.001
	negatif (172)	57 (% 33)	
AntiHBe	pozitif (125)	49 (% 39)	P>0.05
	negatif (83)	37 (% 44)	
AntiHbcIgM	pozitif (2)	2 (% 100)	P>0.05
	negatif (206)	84 (% 40)	
AntiHBctotal	pozitif (175)	81 (% 46)	P<0.001
	negatif (33)	5 (%15.2)	

**Tablo II.** HBV DNA kopya miktarına göre hastaların serolojik testlerinin durumu

HBV DNA (kopya / ml)	1000-100,000		100,000-1,000,000		1,000,000 üstü	
	Negatif	Pozitif	Negatif	Pozitif	Negatif	Pozitif
HBsAg	11 (% 12.8)	35 (% 40.7)	1 (% 1.2)	15 (% 17.4)	0 (% 0)	24 (% 27.9)
AntiHBs	41 (% 47.7)	5 (% 5.8)	16 (% 18.6)	0 (% 0)	24 (% 27.9)	0 (% 0)
HBeAg	43 (% 50)	3 (% 3.5)	10 (% 11.6)	6 (% 7)	4 (% 4.7)	20 (% 23.3)
AntiHBe	13 (% 15.1)	33 (% 38.4)	6 (% 7)	10 (% 11.6)	18 (% 20.9)	6 (% 7)
AntiHbcIgM	45 (% 52.3)	1 (% 1.2)	16 (% 18.6)	0 (% 0)	23 (% 26.7)	1 (% 1.2)
AntiHBctotal	4 (% 4.7)	42 (% 48.8)	0 (% 0)	16 (% 18.6)	1 (% 1.2)	23 (% 26.7)

## TARTIŞMA

HBeAg'nin kaybolması ve anti HBe'nin pozitifleşmesi iyileşmeyi işaret etmesine rağmen günümüzde bu konuda bazı şüpheler oluşmuştur (12). Birçok toplumda anti HBe ve HBV DNA'nın birarada pozitifliği gösterilmiştir (5, 13). Bazı hastalarda HBeAg negatif, anti-HBe pozitif ve HBV DNA pozitif olarak uzun süre devam edebilmektedir. Bu tür durumlar virüsün prekor bölgesindeki mutasyonlar sonucu meydana gelebilmektedir (14-16). Bazı araştırmacılar HBeAg negatif kronik hepatit B hastalarının

sayısının HBeAg pozitiflerden daha yüksek olabileceğine işaret etmişlerdir (17).

HBV DNA varlığı saptanmış anti HBe' si pozitif ve HBeAg' si negatif toplam 43 hastanın 30' unda düşük miktarda, 4' ünde ise bir milyonun üzerinde HBV DNA saptanmıştır. Düşük viral yük saptanan 30 hastadan toplam 11'nin antiviral tedavi aldığı (10 hasta lamivudin+ interferon tedavisinin 12. ayında, bir hasta lamivudin tedavisinin 6. ayında) görülmüştür. Bir milyon üzerinde viral yük saptanan 4 hastadan 3' ünün antiviral tedavi aldığı (2 hasta lamivudin+ interferon tedavisinin 12. ayında, bir hasta lamivudin tedavisinin 6. ayında) tespit edilmiştir. Özellikle viral yük miktarı yüksek olan bu 4 hastada virüsün aktif replikasyonu ve

bunların muhtemelen mutant suşlar olabileceği düşünülmüştür. HBeAg negatif ve HBV DNA pozitif hastaların % 93.7'sinde precore mutasyon (A189G), % 89.9' unda core promoter TA mutasyon olduğu bildirilmiştir (16). HBeAg negatif kronik hepatit B enfeksiyonuna sahip hastaların ise % 40'unda precore mutasyon, % 74' ünde core promoter mutasyon saptanmıştır (15).

Çalışmamızda HBeAg pozitif 36 örneğin 29 (% 80.5)'unda HBV DNA varlığı tespit edilmiştir. HBeAg pozitif vakalarda HBV DNA varlığı çeşitli çalışmalarda Pekbay ve ark. (12) %81.6, Heper ve ark. (18) % 61 olarak bildirilmiştir. Bu çalışma sonuçlarından da anlaşılacağı gibi, bazı hastalarda HBeAg pozitif olmasına rağmen HBV DNA negatif bulunmaktadır. Bunun nedeni bölgesel olarak mutant suşların yayılımının değişkenliğinden olabilir. Ayrıca, HBV DNA ve hepatit B seroloji sonuçlarını değerlendirirken hastaların tedavi alıp almadığının bilinmesi de önemlidir. Bazı durumlarda, özellikle HBeAg pozitif olgularda, HBV DNA negatif veya düşük pozitif çıktığında bu durumun o sırada alınan antiviral tedaviye bağlı olabileceği de akla gelmelidir. Çalışmamızda HBeAg pozitif olup HBV DNA tespit edilemeyen 7 hastanın 4'ünün antiviral tedavi aldığı belirlenmiştir.

HBsAg negatif donörler üzerinde yapılan değişik çalışmalarda % 4-17 şeklinde değişen oranlarda HBV DNA pozitifliği bildirilmiştir (5). Çalışmamızda HBsAg negatif toplam 63 vakanın 12 (%19)'sinde HBV DNA pozitifliği saptanmıştır. HBsAg negatif HBV DNA pozitif 12 olgunun 11' inin düşük viral yüke sahip olduğu belirlenmiştir. HBsAg negatif HBV DNA pozitif bu 12 olgunun diğer serolojik testleri incelendiğinde sadece 3'ünde AntiHBe (ikisinde antiHBs pozitif birinde antiHBs negatif) tespit edilirken, hiçbirinde HBeAg pozitifliği saptanmamıştır.

Seronegatif ancak HBV DNA' sı pozitif bulunan kişilerin serumlarının deney hayvanlarına verilmesiyle HBV enfeksiyonu ortaya çıkması; ayrıca HBsAg negatif olup, transaminazları yüksek bulunan donörlerin %9'unda HBV DNA

saptanması, moleküler biyoloji tekniklerinin HBV konusundaki önemini göstermiştir (5). Seronegatif kişilerde bu HBV DNA pozitifliğinin mutant suşlara bağlı olabileceği bildirilmiştir (19). Çalışmamızda hepatit B için tüm serolojik testleri negatif olan 4 olguda HBV DNA pozitifliği tespit edilmiştir. Bunların viral yük miktarlarının 30.000 kopya/ml den az olduğu, ancak 4 hastanın da transaminazlarının yüksek olduğu belirlenmiştir.

Anti HBs eşliğinde HBV DNA'ya rastlandığı çeşitli çalışmalarda bildirilmiştir (5, 20). Çalışmamızda, Anti HBs pozitif 28 örneğin sadece 5'inde düşük miktarda HBV DNA varlığı saptanmıştır.

Real time PCR'in, HBV kantitasyonu ile antiviral tedaviyi takip imkanı sağladığı, cerrahi girişim yapılacak HBV' li hasta için en uygun zamanı tespit etmekte işe yaradığı, çeşitli mutant suşları yakalamakta yardımcı olduğu bilinmektedir. Ancak kantitatif PCR metodlarının yüksek orandaki sensitivitelere rağmen standardizasyon, kontaminasyon ve yeniden tekrarlanabilirlik gibi birtakım problemleri bildirilmiştir (9, 21). Bu nedenle çalışmalarda bu konuda hassasiyetle durulması, özellikle düşük oranda HBV DNA pozitifliği olan hastaları değerlendirirken daha dikkatli olunması, seroloji olarak uyumsuz bulunan durumların sorgulanması ve gerektiğinde PCR testinin tekrarlanmasının yararlı olacağı düşünülmüştür.

Sonuç olarak, virüs replikasyonunun en iyi göstergelerinden biri olan HBV DNA'nın kantitatif olarak saptanması önemlidir. Ancak, HBV enfeksiyonlarını değerlendirirken hastanın serolojik testleri, HBV DNA miktarı, karaciğer ezimleri, hastanın tedavi alıp almadığı ve hastanın klinik durumu bir bütün olarak düşünülmelidir.

#### KAYNAKLAR

1. Lee WM. Hepatitis B virus infection. N Engl J Med 1997; 337: 1733–1745.
2. Perrillo RP. Treatment of chronic hepatitis B. In Hollinger FB, Lemon SM, Margolis H.S Viral

- hepatitis and liver disease Williams & Wilkins, Baltimore, 1991, p 616–62
3. Balık İ. Hepatit B Epidemiyolojisi. 'Kılıçturgay K (ark), Viral Hepatit '94, I. Baskı' Kitabında Viral Hepatitle Savaşım Derneği, İstanbul, 1994, s 91
  4. Robinson WS. Hepatitis B virus and Hepatitis D virus. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R ve ark Principles and practise of infectious diseases Churchill Livingstone, New York, 2000, ss 1652- 1684
  5. Badur S. Hepatit B virusu. In: Ağaçfıdan A, Badur S, Türkoğlu S. İnfeksiyon hastalıklarının laboratuvar tanısında moleküler yöntemler. M. G. G. AS matbası. İstanbul, 2002, ss155-160
  6. Bilgiç A, Özacar T. Hepatit B ve D virüsleri. In: Ustaçelebi Ş (ed), Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Güneş Kitabevi, Ankara 1999, ss 871-878.
  7. Bilgiç A, Özacar T. Hepatit B virusu. Willke Topçu A, Söyletir G, Doğanay M. İnfeksiyon hastalıkları ve mikrobiyolojisi. Nobel Tıp kitabevi, İstanbul, 2002. 2. baskı, ss 1350-1370
  8. Simpson PR, Yu XH, Redza ZM, Anson JG, Chan SH, Lin Y. Quantitation of hepatitis B virus DNA using competitive PCR and scintillation proximity assay. J Virol Methods 1997; 69: 197–208.
  9. Matsumoto C, Nishioka K, Oguchi T, et al. Detection and quantitation of HBV DNA by semi-nested PCR in donated blood: comparison with HBV serological markers. J Virol Methods 1997; 66: 61–69.
  10. Lai CL, Chien RN, Leung NW ve ark. A one-year trial of lamivudine for chronic hepatitis B. Asia hepatitis Lamivudine Study Group. N Engl J Med 1998; 339: 61–68.
  11. Brechtbuehl K, Whalle SA, Dusheiko GM, Saunders NA. A rapid real time quantitative polymerase chain reaction for hepatitis B virus J Virol Methods 2001; 93: 105-113 .
  12. Pekbay A, Günaydın M, Eroğlu C, Bedir A, Esen Ş, Leblebicioğlu H. Hepatit B virüsü (HBV) serolojik göstergeleri ile HBV DNA arasındaki korelasyon. Viral Hepatit Dergisi 2001; 2: 302-304.
  13. Norder H, Brattstrom C, Magnius L. High frequency of hepatitis B virus DNA in Anti-HBe positive sera on longitudinal floow-up of patients with renal transplants chronic hepatitis B J Med Virol 1989; 27: 322-328.
  14. Rizzetto M, Volpes R, Smedile A. Response of pre-cor mutant chronic hepatitis B infection to lamivudin. J Med Virol 2000; 61: 393-402.
  15. Chan HL, Tsang SW, Liew CT, et al. Viral genotype and hepatitis B virus DNA levels are correlated with histological liver damage in HBeAg negative chronic hepatitis B virus infection. Am J Gastroenterol 2002; 97: 406-412.
  16. Yoo BC, Park JW, Kim HJ, Lee DH, Cha YJ, Park SM. Precore and core promoter mutations of hepatitis B virus and hepatitis B e antigen-negative chronic hepatitis B in Korea. J Hepatology 2003; 38: 98-103.
  17. Suk A, Lok F. Hepatitis B infection: Pathogenesis and management. J Hepatol 2000; 32 : 89- 97.
  18. Heper Y, Mısıık R, Özakın C, Töre O. Hepatit B virus (HBV) markerleri ile HBV- DNA ilişkisi: Bursa bölgesi sonuçları. Viral Hepatit Dergisi 1999; 2: 137-139.
  19. Thiers V, Nakajima E, Kremsdorf D, et al. Transmission of Hepatitis B from Hepatitis B seronegative subject. Lancet 1998; 2: 1273-1276.
  20. Pao CC, Yao DS, Lin CY, et al. Serum hepatitis B virus DNA in hepatitis B virus seropositive and seronegative patients with normal liver function. Am J Clin Pathol 1991; 95: 591-596.
  21. Gauthier J., Bourne E.J., Lutz M.W, et al. Quantitation of hepatitis B viremia and emergence of YMDD variants in patients with chronic hepatitis B treated with lamivudine. J Infect Dis 1999; 180:1757–1762.