
Kronik Hepatit B Virüs (HBV) İnfeksiyonunda HBV-DNA Düzeylerinin Saptanmasının Önemi

Aslı Gamze ŞENER*, İlhan AFŞAR*, Zafer BUYRAÇ**, Metin TÜRKER*

* Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı,

** Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Gastroenteroloji Kliniği, İZMİR

ÖZET

Hepatit B e antijeni (HBeAg) kronik hepatit B virüs (HBV) infeksiyonunda viral replikasyon, infektivite ve süregelen karaciğer hasarının önemli bir göstergesidir. HBV-DNA saptanması ise özellikle seronegatif olgularda mutant virüsle infeksiyonun saptanmasında, tedaviye başlama ve izleminde önemli bir basamaktır. Bu çalışmanın amacı, HBeAg/anti-HBe varlığında HBV-DNA'nın önemini vurgulamaktır. Toplam 92 serum örneği HBV-DNA için eş zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), HBeAg/anti-HBe için enzim immünassay (EIA) ile tarandı. HBV-DNA 92 örneğin 32 (%34.7)'sinde $10^5 \geq$ genom/mL, 60 (%65.2)'inde $10^4 \leq$ genom/mL idi. Otuziki örneğin 28 (%87.5)'i HBeAg pozitif/anti-HBe negatif, 4 (%12.5)'ü HBeAg negatif/anti-HBe negatif idi. Altmış örneğin ise 54 (%90)'ü HBeAg negatif/anti-HBe pozitif, 6 (%10)'sı HBeAg pozitif/anti-HBe negatif idi. HBeAg/anti-HBe tetkiki HBV-DNA'nın durumunu yansıtmayabilir. Bu nedenle kronik HBV infeksiyonunda HBeAg/anti-HBe yanında HBV-DNA bakılması uygundur.

Anahtar Kelimeler: Kronik hepatit B, HBV-DNA, Tanı

SUMMARY

Importance of Detection of HBV-DNA in Chronic Hepatitis B Infection

Hepatitis B e antigen (HBeAg) is an important marker of viral replication, infectivity and ongoing liver injury in chronic hepatitis B virus (HBV) infection. Furthermore HBV-DNA detection is crucial step in the diagnosis of HBV infection in seronegative cases: for detection of viraemia with mutant virus, for deciding about starting treatment and for monitoring the efficacy of treatment of HBV infection. The aim of this study was to detect of importance of HBV-DNA in HBeAg/anti-HBe existence. Totally 92 serum samples were screened for the presence of HBV-DNA with real-time polymerase chain reaction (PCR) and for HBeAg/anti-HBe with enzymeimmunoassay (EIA). HBV-DNA was $\geq 10^5$ genom copies/mL in 32 (34.7%) and $\leq 10^4$ genom copies/mL in 60 (65.2%) of 92 serum samples. Of 32 samples, 28 (87.5%) were HBeAg positive/anti-HBe negative, 4 (12.5%) were HBeAg negative/anti-HBe negative. Of 60 samples, 54 (90%) were HBeAg negative/anti-HBe positive, 6 (10%) were HBeAg positive/anti-HBe negative. Presence or absence of HBeAg/anti-HBe may not necessarily reflect the serum HBV-DNA, particularly in persistent infection. Consequently, it has been recommended that HBV-DNA with HBeAg/anti-HBe should be detected in chronic HBV infection.

Key Words: Hepatitis B, Chronic, DNA, Viral, Diagnosis

Kronik hepatit B (KHB) infeksiyonu, tüm dünyada ve ülkemizde önemli bir toplum sağlığı sorunudur. Dünya çapında 300 milyondan fazla insan hepatit B virüsü (HBV) ile kronik olarak infektidir^[1]. HBV'nin hızlı çoğalma kapasitesi ve ters transkripsiyon başmağı ile ilişkili olan yüksek hata oranı göz önüne alındığında infeksiyonun seyri sırasında en önemli etmen, kişinin bağışık yanıtıdır^[1]. Hepatit B hastalarında anti-HBe antikorlarının gelişmesi genellikle vireminin azalması ile sonuçlanır, ancak kor-promoter mutantların anti-HBe'den kaçışı virüsün patojenitesini artırmaktadır^[1]. HBeAg hepatositteki aktif viral replikasyon ve infektivitenin bir göstergesidir^[2]. Serolojik yöntemler HBV infeksiyonu tanısında önemli olmakla birlikte, moleküler bazlı teknikler tanı ve tedavinin izlenmesine yeni bir boyut getirmiştir^[3]. Bu çalışmada, hastanemiz gastroenteroloji kliniğinde kronik HBV infeksiyonu tanısıyla izlenen hastaların HBV-DNA düzeylerinin HBeAg/anti-HBe sonuçları ile ilişkisinin saptanması ve HBV-DNA'nın öneminin bir kez daha vurgulanması amaçlanmıştır.

MATERYAL ve METOD

Serum Örnekleri

Hastanemiz gastroenteroloji kliniğinde izlenmekle olan 92 kronik hepatitli hastanın serum örnekleri toplanarak -20°C'de saklandı. Serumlar bir kez çözülerek çalışıldı. Çalışma grubu içine sirozlu ve hepatoselüler karsinom (HSK)'lu hastalar alınmadı.

Serolojik İnceleme

HBeAg/anti-HBe tetkikleri makroELISA yöntemi ile (ortho-clinical diagnostics, USA) çalışılarak değerlendirildi.

Moleküler İnceleme

HBV-DNA hasta serumları robogene ekstraksiyon kiti ile üretici firma önerileri doğrultusunda işlemlenerek real time polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) yöntemi (ABIPRISM 7700) ile çalışıldı. Testin kantitasyon aralığı 10^3 - 10^8 genom/mL arasıydı. Yöntem "QCMD 2005 Proficiency Programme" tarafından denetlendi. Hastalar HBV-DNA yüküne göre 10^4 genom/mL ile altında ve 10^5 genom/mL ile üstünde çıkan sonuçlara göre iki gruba ayrılarak irdelendi^[4].

Histopatolojik İnceleme

Çalışma grubundaki hastalar karaciğer biyopsi sonuçlarına göre de değerlendirildi.

BULGULAR

HBeAg negatif bulunan 58 hastanın 33'ü erkek ve yaş ortalaması 38.27 ± 9.9 , 25'i kadın ve yaş or-

talaması 46.79 ± 12.5 idi. Histolojik aktivite indeksi (HAİ) ortalaması 7.9 ve evre ortalama 1.84 olarak bulundu (erkek HAİ ortalaması 6.88 ve evre ortalama 1.92, kadın HAİ ortalaması 9.82, evre ortalama 1.70).

HBeAg pozitif olan 34 hastadan 20'si erkek ve yaş ortalaması 29.47 ± 12.4 , 14'ü kadın ve yaş ortalaması 36.78 ± 16.6 idi. HAİ ortalaması 8, evre ortalama 2.04 olarak bulundu (erkek HAİ ortalaması 7.07, evre ortalama 1.64, kadın HAİ ortalaması 10.16, evre ortalama 2.86).

Çalışmaya alınan 92 hastanın 32 (%34.7)'sinde HBV-DNA düzeyi $\geq 10^5$ genom/mL, 60 (%65.2)'inde $\leq 10^4$ genom/mL olarak saptandı. HBV-DNA $\geq 10^5$ genom/mL olarak saptanan hastaların 28 (%87.5)'inde HBeAg pozitif/anti-HBe negatif, 4 (%12.5)'ünde HBeAg negatif/anti-HBe negatif idi. HBV-DNA düzeyi $\leq 10^4$ genom/mL olan hastaların 54 (%90)'ünde HBeAg negatif/anti-HBe pozitif, 6 (%10)'sında HBeAg pozitif/anti-HBe negatif idi. HBeAg negatif/anti-HBe negatif bulunan dört hastanın HBeAg serokonversiyon döneminde olduğu düşünüldü. Bu hastalar halen anti-HBe pozitifliği yönünden izlenmektedir. Sonuçlar Tablo 1'de görülmektedir.

TARTIŞMA

Kronik HBV infeksiyonunda HBeAg süregelen karaciğer hasarı, infektivite ve viral replikasyonun önemli bir göstergesidir. HBV-DNA ise mutant virüslerle vireminin saptanması, tedaviye başlanması ve takibinde yol göstericidir^[5]. HBeAg, HBV'nin aktif replikasyonunu göstermekle birlikte, HBeAg bulunmaması viral replikasyon olmadığı anlamına gelmez, çünkü HBeAg, mutant HBV (kor-promoter veya prekor mutant) infeksiyonu olan hastalarda saptanmaz^[6]. Anti-HBe varlığı, HBeAg negatif HBV infeksiyonlu hastalarda da bulunmakla birlikte, genel-

Tablo 1. HBeAg/anti-HBe ve HBV-DNA sonuçları

	HBV-DNA $\geq 10^5$ genom/mL	HBV-DNA $\leq 10^4$ genom/mL
• HBeAg pozitif/ anti-HBe negatif	28 (%87.5)	6 (%10)
• HBeAg negatif/ anti-HBe negatif	4 (%12.5)	-
• HBeAg negatif/ anti-HBe pozitif	-	54 (%90)
Toplam	32	60

likle HBeAg serokonversiyonunu gösterir. HBeAg pozitif hastalardaki HBeAg kaybı ve anti-HBe oluşumu hastalığın ilerleme riskinin düşmesiyle ilişkilidir^[7]. Hepatit B enfeksiyonunda HBV-DNA hibridizasyon testleriyle $\geq 10^5$ genom/mL değeri saptandığında tedavi önerilmektedir^[8]. Bununla birlikte HBeAg pozitif hastaların bazıları ve birçok HBeAg negatif hastada HBV-DNA düzeyleri dalgalıdır ve 10^5 genom/mL'nin altına kadar düşer^[9]. Bilindiği gibi günümüzde kullanılan PCR gibi hedef amplifikasyon testlerinin saptama sınırları çok daha düşüktür (100-1000 genom/mL) ve hastaların ilk değerlendirilmesi ve izlenmesinde yetersizdir. HBV-DNA'nın saptanması özellikle KHB hastalarının izlenmesinde en yararlı ölçüm haline gelmiştir^[6]. Kronik HBV enfeksiyonunda viral yük düzeyi ya da viral yük değişimi ile hastalığın çeşitli aktivite göstergeleri arasında belirgin bir korelasyon olduğu bildirilmektedir^[10]. Chu ve arkadaşları 165 Çinli KHB hastası ile yaptıkları araştırmada spontan ya da interferon (IFN) kullanımını sonucu HBeAg kaybı olan hastalarda serum HBV-DNA düzeylerinde ortalama 3 \log_{10} düşüş olduğunu bildirmektedir, ancak HBeAg kaybı ile ilişkili HBV-DNA eşliği bulunamamıştır^[9]. Aynı çalışmada, HBeAg pozitif hastalarda HBV-DNA düzeyinin HBeAg negatif hastalara göre daha yüksek olma eğiliminde olduğundan söz edilmektedir, ancak bazı HBeAg negatif hastalarda 10^8 genom/mL kadar yüksek düzeyler saptanmıştır. HBeAg negatif hastaların üçte birinde HBV-DNA düzeyleri sürekli $\geq 10^5$ genom/mL, üçte ikisinde ve tüm inaktif taşıyıcılarda düzey sürekli olarak $< 10^5$ genom/mL bulunmuştur.

Ökten ve arkadaşları 372 asemptomatik taşıyıcıda %80.4 anti-HBe, %12.4 HBeAg, %17.8 HBV-DNA pozitifliği bildirmektedir^[11]. KHB'li 53 olgunun irdelendiği bir çalışmada hastaların HBeAg pozitif/HBV-DNA pozitif ve anti-HBe pozitif/HBV-DNA pozitif olmak üzere iki gruba ayrılarak incelendiği, HBV-DNA'nın HBeAg pozitif hastalarda 2852 pg/mL, anti-HBe pozitiflerde 647 pg/mL bulunduğu bildirilmektedir^[12]. Özdemir ve arkadaşları ise 233 olguyu inceledikleri çalışmada %94 oranında HBeAg negatif/anti-HBe'nin ve 13 hastada HBV-DNA'nın pozitif saptandığını ve HBV-DNA pozitif olguların daha dikkatle izlenmesi gerektiğini vurgulamaktadır^[13].

Kronik HBV enfeksiyonlu hastaların HBeAg serokonversiyonundan sonra HBV-DNA, PCR ile saptanamaz duruma gelene kadar tedavinin sürdürülmesi önerilmektedir^[14,15].

Çalışmalarda genel olarak HBeAg ve HBV-DNA pozitiflikleri biraradadır^[16,17]. Çalışmamızda HBeAg pozitif örneklerin %87.5'inde HBV-DNA $\geq 10^5$ genom/mL olarak bulunmuştur. HBeAg negatif/anti-HBe pozitif örneklerde HBV-DNA %90 hastada $\leq 10^4$ genom/mL'dir. Tansuğ ve arkadaşlarının çalışmasında kronik HBV enfeksiyonunda HBV-DNA pozitifliği; HBeAg pozitif olanlarda %93.55, anti-HBe pozitif olgularda %4.26 olarak bildirilmektedir^[18]. Hibrid capture (Digene, Abbott) yöntemi ile çalışılan bir başka çalışmada ise kronik HBV hastalarında HBV-DNA pozitiflik oranı %5.5'tir^[19]. Oranlardaki farklılık yöntemlerin farklılığından kaynaklanmaktadır. HBV enfeksiyonunda prekor bölgesinde stop kodon oluşturan nokta mutasyonu olan suşlar etken olduğunda sadece HBeAg/anti-HBe sonuçları ile tanı konması ve viral replikasyonun saptanabilmesi söz konusu değildir^[19,20].

Bu bulgular ışığında HBV enfeksiyonunun tanısı ve tedavisinin izlenmesinde serolojik göstergelerin yanı sıra HBV-DNA'nın saptanmasının önemi bir kez daha vurgulanmıştır.

KAYNAKLAR

1. Tong S, Kim KH, Chante C, Wonds J. Hepatitis B virus e antigen variants. *Int J Med Sci* 2005;2:2-7.
2. You SL, Yang HL, Chen CJ. Seropositivity of hepatitis B e antigen and hepatocellular carcinoma. *Ann Med* 2004;36:215-24.
3. Servoss JC, Friedman LS. Serologic and molecular diagnosis of hepatitis B virus. *Clin Liver Dis* 2004;8:267-81.
4. Yuen MF, Ng IO, Fan ST, et al. Significance of HBV DNA levels in liver histology of HBeAg and anti-HBe positive patients with chronic hepatitis B. *Am J Gastroenterol* 2004;99:2032-7.
5. Hussain AB, Karamat KA, Anvar M, Kazmi SY, Tariq WV. Correlation of HBV DNA PCR and HBeAg in hepatitis B carriers. *Physicians Surg Pak* 2004;14:18-20.
6. Keeffe E, Dieterich D, Han SH, et al. A treatment algorithm for the management of chronic hepatitis B virus infection in the United States. *Clin Gastroent Hepatol* 2004;2:87-104.
7. Niederau C, Heintges T, Lange S, et al. Long-term follow-up of HBeAg positive patients treated with interferon alfa for chronic hepatitis B. *N Engl J Med* 1996;334:1422-7.
8. Lok AS, Heathcote EJ, Hoofnagle JH. Management of Hepatitis B: 2000-Summary of a workshop. *Gastroenterology* 2001;120:1828-53.
9. Chu CJ, Hussain M, Lok ASF. Quantitative serum HBV DNA levels during different stages of chronic hepatitis B infection. *Hepatology* 2002;36:1408-15.

10. Mommeja -Marin H, Mondou E, Blum R, Rousseau F. Serum HBV DNA as a marker of efficacy during therapy for chronic HBV infection: Analysis and review of the literature. *Hepatology* 2002;37:1309-19.
11. Ökten A, Demir K, Çakaloğlu Y ve ark. Kronik asemptomatik HBsAg taşıyıcılığı. *Gastroenterohepatoloji* 1996;7:178-83.
12. Yalçın K, Değertekin H, Alp N ve ark. Tedavi edilmemiş kronik hepatit B'li hastalarda serum HBV DNA düzeylerinin HBeAg/anti-HBe durumu, karaciğer histolojisi, ALT düzeyleri ve yaşla korelasyonu. *Gastroenterohepatoloji* 2003;14:178-82.
13. Özdemir S, Kural Sezer E, Sonsuz A ve ark. Ülkemizde asemptomatik sağlıklı HBsAg taşıyıcılığı. *Cerrahpaşa Tıp Derg* 1998;29:141-4.
14. Song BC, Suh DJ, Lee HC, Chung YH, Lee YS. Hepatitis B e antigen serokonversion after lamivudine therapy is not durable in patients with chronic hepatitis B in Korea. *Hepatology* 2000;32:803-6.
15. Ryu SH, Chung YH, Choi MH, et al. Long-term additional lamivudine therapy enhances durability of lamivudine-induced HBe Ag loss: A prospective study. *J Hepatol* 2003;39:614-9.
16. Lara CM, Gorrino MT, Campelo C, Lardelo P, Cisterna R. Detection of hepatitis B virus DNA and determination of surface antigen expression in peripheral blood mononuclear cells from patients with AIDS. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1994;13:267-9.
17. Altındış M. Hepatit B virüs (HBV) serolojik belirleyicileri ile HBV-DNA'nın varlığının karşılaştırılması. *İnfeksiyon Dergisi* 2002;16:141-5.
18. Tansuğ Ş, Ünal E, Düzgünsıvacı E, Günel H. HBsAg pozitif olguların ve bu olgularda HBV DNA düzeylerinin değerlendirilmesi. *Viral Hepatit Dergisi* 1999:129-36.
19. Öztürk R. Viral hepatitlerde olağan dışı serolojik ve moleküler tanı göstergesi kalıpları. Tabak F, Balık İ, Tekeli E (editörler). *Viral Hepatit 2005*. İstanbul Viral Hepatitle Savaşım Derneği, 2005:152-7.
20. Badur S. HBV DNA'nın virusa özgü antijen ve antikorlarla sıra dışı birlikteliği. *Viral Hepatit Dergisi* 1998;1:66-8.

Yazışma Adresi:

Uzm. Dr. Aslı Gamze ŞENER

İzmir Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi

Mikrobiyoloji Laboratuvarı

Yeşilyurt-İZMİR

e-mail: asgam@mynet.com

Makalenin Geliş Tarihi: 16.11.2005

Kabul Tarihi: 14.02.2006