

T.C
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MİKROBİYOLOJİ ANABİLİMDALI

**HBsAg NEGATİF OLGULARDA HBV DNA
POZİTİFLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

Gülcan GÜRSES

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Doç.Dr. Mustafa ULUKANLIGİL

ŞANLIURFA

2006

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Hepatit B virüsü (HBV) enfeksiyonu tüm dünyada ve ülkemizde yüksek morbidite ve mortaliteye neden olduğu için halen çok önemli bir sağlık sorunudur. Bu nedenle kronik hepatit olgularının tanısının konulması viral replikasyonun belirlenerek sağaltımın düzenlenmesi büyük önem taşımaktadır. Günümüzde HBV enfeksiyonlarında tanı için rutin olarak genelde serolojik markerlar incelenir. Fakat mutant suş enfeksiyonları olması halinde viral replikasyonun belirlenmesinde serolojik belirleyiciler yetersiz kalabilmektedir. Bu durumda HBV replikasyonunun belirlenmesinde en güvenilir sonuç verdiği belirtilen HBV DNA'nın kullanımı gündeme gelmektedir.

Çalışmamızda serolojik yöntemlerle HBsAg (-) negatif bulunan olgularda da HBV DNA'nın pozitif olabileceği gösterilmeye çalışılmıştır.

Bu çalışmanın her aşamasında benden desteklerini esirgemeyen Mikrobiyoloji ABD Öğretim Üyesi ve tez danışmanım Doç. Dr. Mustafa ULUKANLIGİL'e, Mikrobiyoloji ABD Başkanı Prof. Dr. Sami TAŞÇI'ya, Doç. Dr. Hatice ÖZBİLGE'ye ve Yrd. Doç. Dr. Füsun BÖLÜKBAŞI'ya çok teşekkür ediyorum. Ayrıca maddi manevi desteğini hiçbir zaman esirgemeyen eşime ve aileme de teşekkürlerimi sunuyorum.

İÇİNDEKİLER

1.	GİRİŞ	1
2.	Hepatit B Virüsü.....	2
3.	Hepatit B Virüsünün Yapısı.....	2
4.	Epidemiyoloji	5
5.	Bulaş Yolları.....	7
6.	İnfectivite.....	9
7.	Patogenez.....	9
8.	Akut Hepatit B.....	12
9.	Kronik Hepatit B.....	14
10.	İnaktif HBsAg de Yapılması Gerekenler.....	16
11.	Hepatit B İnfeksiyonu İçin Taranması Gerekenler.....	17
12.	HBV den Korunma.....	17
13.	HBV İnfeksiyonunda İmmün Yanıttan Kaçma Mekanizmaları.....	21
14.	HBV Genetik Yapısı.....	23
15.	Hepatit B Virüsü Mutasyonları.....	25
	1-Precore-core bölgesi mutasyonları.....	26
	2-Precore bölgesindeki diğer mutasyonlar.....	31
	3-Core bölgesi mutasyonları.....	32
	4-Surface geni mutasyonları.....	33
	5-Polimeraz geni mutasyonları.....	36
	6-X geni mutantları.....	37
16.	HBV Tanı Yöntemleri.....	39
	Serolojik Tanı.....	39
	HBsAg.....	39
	HBeAg.....	40
	Anti-HBc IgM.....	40
	Anti-HBc IgG ve anti-HBc IgM.....	41
	Anti-HBe.....	41
	Anti-HBs.....	42
	Serolojik Testlerin Yorumlanması.....	43

	Direkt Tanı.....	43
	1-Hücre Kültürü.....	43
	2-Viral Antijenlerin Gösterilmesi.....	43
	3-Viral Nükleik Asitlerin Gösterilmesi.....	44
	İnsitu Hibridizasyon.....	44
	İnsitu PCR.....	44
	Serum örneklerinde sıvı hibridizasyon.....	44
	Serum örneklerinde PCR.....	45
	Mutant virüs infeksiyonlarında tanı.....	45
	Antiviral direncin saptanması.....	45
17.	Serolojik Testler ve PCR.....	46
18.	PCR Yöntemi.....	47
19.	Real-Time PCR.....	48
	İnterkalatör Boya Metodu.....	49
	Hidroliz prob metodu	51
	Hibridizasyon prob metodu.....	52
20.	GEREÇ VE YÖNTEM.....	54
21.	BULGULAR.....	55
22.	TARTIŞMA VE SONUÇ.....	59
23.	KAYNAKLAR.....	67

ŞEKİL DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 1: HBV nin temel yapısı.....	3
Şekil 2: Hepatit B virüsünün elektron mikroskobundaki görünümü.....	3
Şekil 3: HBV nin elektron mikroskobundaki görünümünün şematik gösterimi.....	3
Şekil 4: Hepatit B prevelansının coğrafik dağılımı	5
Şekil 5: Uzun süreli taşıyıcı dağılımı.....	6
Şekil 6: Hepatit B virüsü genomunun şematik gösterimi.....	25
Şekil 7: Precore/Core geni precore stop kodon mutasyonunun şematik görünümü....	30
Şekil 8: Kronik HBV taşıyıcılarında precore mutant ile klinik ilişkisi	31
Şekil 9: HBsAg nin a determinantı.....	35
Şekil 10 a: İnterkalatör boya metodu.....	49
Şekil 10 b: İnterkalatör boya metodu.....	50
Şekil 10 c: İnterkalatör boya metodu.....	50
Şekil 11 a: Hidroliz prob metodu.....	51
Şekil 11 b: Hidroliz prob metodu.....	51
Şekil 11 c: Hidroliz prob metodu.....	52
Şekil 12 a: Hibridizasyon prob metodu.....	52
Şekil 12 b: Hibridizasyon prob metodu.....	53
Şekil 12 c: Hibridizasyon prob metodu.....	53
Şekil 12 d: Hibridizasyon prob metodu.....	53
Şekil 12 e: Hibridizasyon prob metodu.....	54

TABLO DİZİNİ

	Sayfa
Tablo 1: Serolojik testlerin yorumlanması.....	43
Tablo 2: HBsAg negatif HBV DNA pozitif 27 hasta.....	58

ÖZET

HBsAg Negatif Olgularda HBV DNA Pozitifliğinin Araştırılması

Gülcan GÜRSES

Mikrobiyoloji, Yüksek Lisans Tezi

Dünyada kan yoluyla en fazla yayılan viral enfeksiyon olan hepatit B virüsü (HBV), kronik karaciğer hastalığı ve hepatosellüler karsinoma gelişme riski açısından önemli bir toplum sağlığı sorunudur.

HBV DNA'nın ölçülmesi kronik hepatit B enfeksiyonuna yaklaşımda önemli bir parametredir. Donörlerde HBV antikoru mevcut yada mevcut olmadan HBsAg negatif fakat HBV DNA pozitif olduğu durumlarda gizli HBV enfeksiyonundan söz edilir. Gizli HBV enfeksiyonunun frekansı HBV DNA ve HBsAg testlerinin her ikisinde duyarlılığına bağlıdır.

En fazla kan ünitelerinde bulaşıcılık olduğu için buralarda HBsAg taranması yapılmaktadır, HBsAg negatif componentlerin bir kısmı pencere döneminde serolojileri negatiftir fakat enfeksiyonun geç dönemleri esnasında da negatif olabilir.

Bu çalışmada HBV DNA'nın tanı ve takipteki önemi ile hepatit B'li hastalarda serolojik markerler ile HBV DNA arasındaki ilişki araştırıldı.

2002-2005 yılları arasında hastanemize HBV DNA istemiyle 2355 hasta başvurdu. HBV DNA sonuçları; hepatit markerları ve AST, ALT değerleriyle birlikte kontrol edilerek yorumlandı.

Çalışmamızda 260 HBsAg negatif olgunun 27 sinde (% 10,4) HBV DNA pozitifliği saptanmıştır. 27 HBV DNA pozitif olgunun viral yük miktarlarına bakıldığında 1 hastada 10^8 kopya/ml, 1 hastada 10^7 , 1 hastada 10^5 , 8 hastada 10^4 ve 16 hastada 10000 kopya/ml nin altında viral yük bulunmuştur.

HBV DNA pozitif bu 27 olgunun hepatit markerları incelendiğinde 19'unda (%70,3) anti-HBc IgG pozitifliği, 15'inde (% 55,5) anti-HBs pozitifliği, 14'ünde (%51,8) anti-HBe pozitifliği bulunmuştur. HBsAg negatif HBV DNA pozitif 27

hastanın 6'sında tüm serolojik göstergeler (Anti-HBs, Anti-HBe, Anti-HBc, HBeAg, HBcIgM) negatif bulunmuştur..

Bu sonuçlar Güneydoğu Anadolu bölgesi ve özellikle Şanlıurfa'da gizli HBV enfeksiyonun önemli oranlarda olduğunu ve özellikle bulaşta önemli rol oynayan transfüzyon kanlarında Hepatit B virusunun yalnız ELISA testleri ile taranılmasının yeterli olmayacağı bunun yanında bu sonucu konfirme edecek ikinci bir sistemin (moleküler tabanlı) gerekli olduğunu ortaya koymaktadır.

Anahtar Kelimeler: Occult HBV, HBsAg negatif HBV DNA pozitif, HBV mutantları.

ABSTRACT

Searching HBV DNA positive when HBsAg is negative

Gülcan GÜRSES

Microbiology, Master Thesis

The hepatitis B virus (HBV), which is the most widespread viral infection transmitted by blood, is a significant public health problem in terms of chronic liver disease and hepatocellular carcinoma.

The measurement of HBV DNA levels in serum has become an important tool for managing chronic HBV infection. Donations negative for HBsAg, but positive for HBV DNA, with or without the presence of HBV antibodies, correspond to occult HBV infection. The frequency of occult HBV infection depends on the relative sensitivity of both HBsAg and HBV DNA assays.

While most infectious blood units are removed by screening for Hepatitis B surface antigen (HBsAg), there is clear evidence that transmission by HBsAg-negative components occurs, in part, during the serologically negative window period, but more so during the late stages of infection.

In this study, the relationship between serological markers and HBV DNA is studied to determine the importance of HBV DNA in both diagnosis and follow up hepatitis B patients.

Between 2002 and 2005 years 2355 patients came our hospital with HBV DNA request. We commended the results of HBV DNA with by checking hepatitis markers and AST-ALT results.

In our searches it is found that from 260 HBsAg negative patients of 27 (10,4%) is positive When it is looked into the viral load amount of 27 HBV DNA positive patients, in 1 patient 10^8 , in 1 patient 10^7 , in 1 patient 10^5 , in 8 patients 10^4 and in 16 patients under 10000 copy/ml viral load is found.

When the hepatitis markers of 27 HBV DNA positive patients are looked into, in 19 patients (70,3 %) positive for anti-HBc IgG, in 15 patients (55,5 %) positive for anti-HBs, in 14 patients (51,8 %) positive for anti-HBe are found.

From 27 patients that are negative for HBsAg positive for HBV DNA of six patients' hepatitis markers (Anti-HBs, Anti-HBe, Anti-HBc, HBeAg, HBcIgM) are negatives.

We understand from these results that in southeast region and particularly Sanliurfa occult HBV infection is very high rates and ELISA test system is not enough to screen HBV in particularly transfusion blood which plays a crucial role in spreading. Also we understand that in addition to ELISA test, a second system (molecular) is necessary to confirm results.

Key words: Occult HBV, HBsAg negative HBV DNA positive, HBV mutants.

GİRİŞ

Hepatit B (HBV) enfeksiyonu ülkemizde ve dünyada yaygın olarak görülmekte olup kronikleşen viral enfeksiyonların başında gelmektedir. Toplumun sosyo-ekonomik ve kültürel durumu enfeksiyonun bulaş, yayılım ve ortaya çıkışını etkilemektedir. HBV enfeksiyonu yüksek morbidite ve mortaliteye neden olması açısından halen ciddi bir halk sağlığı sorunu olmaya devam etmektedir. Enfeksiyon; taşıyıcılarda asemptomatik kalabildiği gibi, %20-40 oranında siroz, primer hepatoselüler karsinoma ve kronik karaciğer hastalığına yol açabilmektedir (54,191).

Dünya çapında 2 milyarın üzerinde insanın hepatit B virüsü ile karşılaştığı bildirilmektedir. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) B hepatiti taşıyıcılığının 400 milyona ulaşacağını bildirmektedir. Ülkemizde ise hepatit B virüsü ile enfekte kişilerin yaklaşık 4,5 milyon civarında olduğu tahmin edilmektedir (167,195,127,75).

Türkiye hepatit enfeksiyonu yönünden orta endemisiteye sahip ülkeler grubunda yer almaktadır. HBsAg taşıyıcılık oranı % 2-7, HBV seropozitifliği ise % 20-60 olarak bildirilmektedir. Batı ülkelerindeki taşıyıcılık oranı ise % 1 civarlarındadır (18).

Hepatit B virüsü, bağışıklık sistemini aktive ederek enfekte karaciğer hücrelerine saldırmasını uyarak dolaylı yoldan hücreleri tahrip eder. Ancak bağışıklık sistemi her zaman hepatit B virüs enfeksiyonunu tamamen ortadan kaldıramaz. Kronik enfeksiyonu olan hastaların %25-40 kadarı sonunda, hepatit B virüsü ile bağlantılı bir hastalık nedeni ile ölmektedir. Hepatoselüler karsinoma vakalarının %75-90'ı, kronik hepatit B'nin sonucudur. Organ/doku nakledilenler veya HIV ile enfekte bireyler gibi bağışıklık sorunları olan insanlarda kronik enfeksiyon riski büyük ölçüde artar.

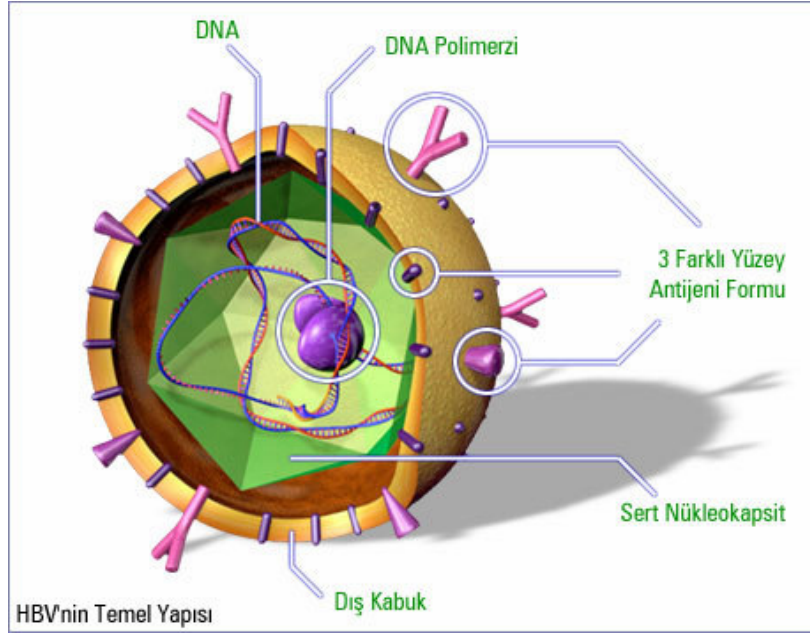
Dünya'da hepatit B'den bir günde ölenlerin sayısının AIDS'ten bir yılda ölenlerden daha fazla olduğu saptanmıştır. Dünyada en çok görülen enfeksiyon hastalıklarından biri olan hepatit B, bütün dünyadaki önde gelen dokuzuncu ölüm nedenidir (19).

HEPATİT B VİRÜSÜ

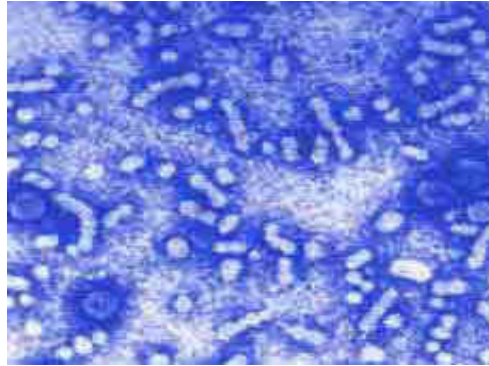
Hepatit B virusu (HBV) küçük, hepatotrop bir DNA virusu olup, doğal olarak sadece insanları enfekte eder. Bundan ötürü doğadaki kaynağı, bu virusla enfekte kişilerdir. Karaciğere özgü hayvan DNA viruslarını içeren, Hepadnavirus ailesinin bir üyesi olup, uzun kuluçka dönemli serum hepatitinin etkenidir. 1940 ve 1950'lere kadar serum hepatiti, infeksiyöz hepatit (A hepatiti)'den ayırt edilememiştir. Bu tarihlerden sonra gönüllüler üzerinde yapılan çalışmalarla, antijenik ve biyolojik farklılıklar ortaya konmaya başlanmıştır. Bu buluşlardan en önemlisi 1965'de Blumberg ve arkadaşlarının insan serum proteinlerinin polimorfizmi üzerinde çalışırken 'Australia (Au)' antijenini keşfetmeleridir. Araştırmacılar, Avusturalya kökenli bir Amerikalının kanında, çok sayıda kan transfüzyonu yapılmış hemofilili bir hastadan elde edilen serum ile agar jel difüzyonda presipitin bandı oluşturan bir antijen saptamışlardır. Başlangıçta konağa ait bir antijen olarak düşünülen Au antijeninin yıllar sonra akut hepatitle ilişkisi saptanmış ve "Hepatitis associated antigen-HAA" olarak isimlendirilmiştir. Daha sonraki çalışmalar B hepatiti ile ilişkisini ortaya koymuş ve "Hepatitis B surface antigen- Hepatit B yüzey antijeni – HBsAg" olarak bugünkü ismini almıştır. Bu antijenik yapının bulunmasından sonra yapılan araştırmalar HBV'nün tüm dünyada önemli bir sağlık sorunu oluşturduğunu ortaya koymuştur (177).

HEPATİT B VİRÜSÜNÜN YAPISI

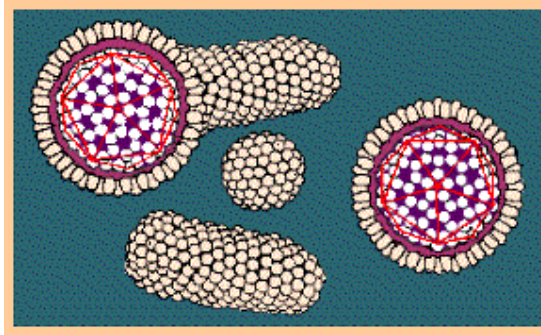
Hepatit B virüsü üç farklı protein tarafından kaplanan, katı bir kapsül içinde yer alan virüs DNA'sı ve enzimlerden oluşur. Bu proteinlere bazen hepatit B yüzey antijenleri adı da verilir. Son derece hassas algılama aygıtlarını kullanan araştırmacılar, kan örneklerinde virüs varlığını tespit etmek için bu proteinleri kullanır. Kapsülün içindeki virüs DNA'sı ve enzimler virüsün yaşam çekirdeğini oluşturur; virüsler bu çekirdek sayesinde yeni bedenlere bulaşabilir ve çoğalabilir. Aşağıdaki resimde HBV partikülünün temel yapısı görülüyor. Üç Hepatit B yüzey antijeni (HBsAg) içeren dış yüzey katı nükleokapsiti çevreler. Nükleokapsitin içinde HBV genomik DNA ve virüs DNA polimerazı bulunur (76).



Şekil-1: HBV nin temel yapısı (76)



Şekil-2: Hepatit B virüsünün elektron mikroskopundaki görünümü



Şekil-3:HBV'nin elektron mikroskopundaki görünümünün şematik gösterimi

HBV, hepatotrop olduğundan ve DNA içerdiğinden Hepadnavirus grubuna sokulan, 42 nm çapında çok kompleks antijenik yapıya sahip bir virüstür. Virion, yani komplet infeksiyöz virüse "Dane" partikülü de denir. Virion, kısmen çift sarmallı DNA içeren bir iç çekirdek (core) ve bunu çevreleyen bir zarftan (HBsAg) ibarettir. İç çekirdekte HBcAg ve solubl HBeAg vardır.

HBV'nin 6 genotip, 12 subtipi vardır. Subtipler, HBsAg'nin yapısındaki küçük değişikliklere göre ayrılır. "a" determinantı tüm subtiplerde bulunur ve bağışıklığı sağlar, d/y ile w/r alt determinantları ise 12 serolojik alt tipi oluşturur (ayw, ayr, adw,...).

HBV-DNA'sı üzerinde virüsün antijenlerini kodlayan 4 gen bulunur. PreS/S geni pre-S1, pre-S2 ve HBsAg'ini kodlar. C geninin pre-C ve C denen iki bölgesi vardır, HBeAg ile HBcAg'i kodlar. Pre-C mutantları HBeAg sentezleyemez. P geni DNA polimeraz ve endonükleaz enzimlerini ve X geni ise HBxAg'i kodlar.

HBV'nin son yıllarda önemleri iyice anlaşılan bazı mutantları tanımlanmıştır. Zarf ve Pre-C bölgesi mutantları en dikkati çekenleridir. Aşı, prognoz ve tedavi açısından önemleri vardır.

Virüs karaciğer hücresi çekirdeğinde, DNA polimerazı yardımıyla çoğalır. Önceleri sadece hepatositlerde ürediği sanılan HBV'nin pankreas, kemik iliği hücreleri, lenfosit ve granülositlerde de çoğalabildiği gösterilmiştir. Bununla beraber primer üreme organı karaciğerdir. Hepatositlerde çoğalmasını tamamlayan virüs ve antijenleri buradan kana bulaşır. Kanda daha çok HBsAg partikülleri, kısmende Dane partikülleri bulunur. Portörlerde çoğunlukla kanda sadece HBsAg vardır, infeksiyöz virüs (Dane) partikülleri bulunmaz. Portörlerde, infeksiyöz virüs olmaksızın devamlı HBsAg üretimini sağlayan mekanizmanın, HBV-DNA'sının hepatosit DNA'sına integre olması ve dolayısıyla HBsAg sentezinin karaciğer hücresi tarafından yapılması ile olduğu anlaşılmıştır. HBV'ye bağlı karaciğer kanseri de, HBV-DNA'sı ile integre olmuş hepatositlerin zamanla kanser hücresine dönüşme eğilimi göstermesi sonucu oluşmaktadır. HBV'nin oluşturduğu karaciğer harabiyeti, vücudun virusa karşı geliştirdiği immün yanıt sonucu olmaktadır. Yani HBV'nin direkt sitopatik etkisi yoktur (19).

EPİDEMİYOLOJİ

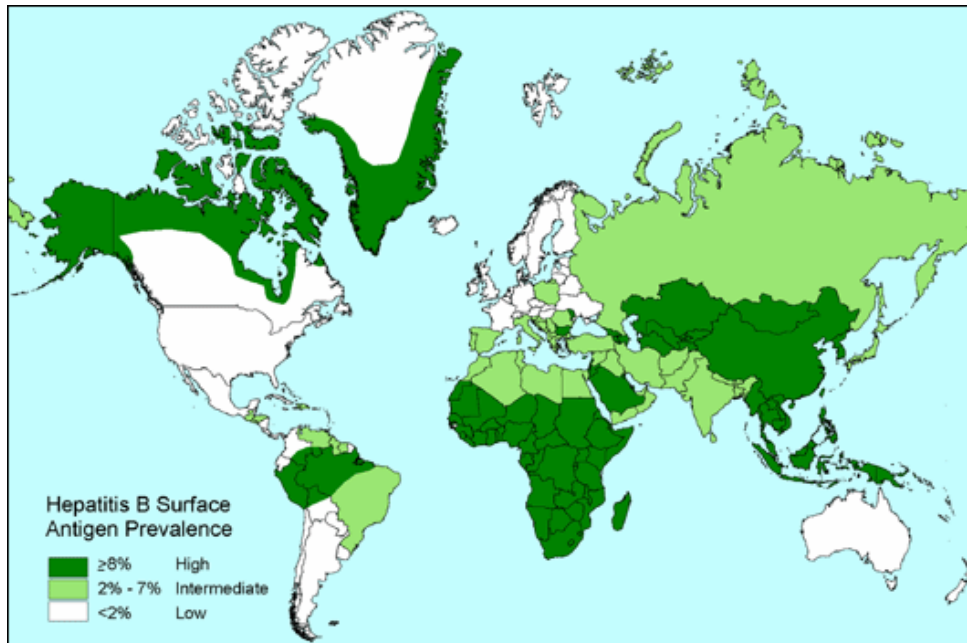
Dünya üzerindeki ülkeler HBV enfeksiyonunun görülme sıklığına göre üç gruba ayrılır:

1-Prevalansın Yüksek Olduğu Ülkeler (Yüksek Endemik Ülkeler): Kronik HBV enfeksiyonunun %8'den fazla görüldüğü ülkelerdir. Hastalık çocukluk döneminde alınır ve kronik karaciğer hastalığı ve hepatosellüler karsinoma ile sağlık sorunları oluşturur. Uzak doğu ülkeleri, kuzey Afrika, orta doğu ülkeleri ve Amazon bölgesi bu grupta yer alır.

2-Kronik HBV Enfeksiyonunun %2-8 Arasında Görüldüğü Ülkeler (Orta Derecede Endemik Ülkeler): Ülkemiz ile birlikte Akdeniz'e kıyısı olan güney Avrupa ülkeleri ve orta Amerika ülkelerinin yer aldığı bu grupta daha çok çocukluk döneminde akut enfeksiyon şeklinde geçirilen hastalık ile birlikte kronik karaciğer hastalığı sorun oluşturmaktadır.

3-Prevalansın %2'den Düşük Olduğu Ülkeler (Düşük Endemik Ülkeler): Hastalık genç ile erişkinler arasında yayılır ve hem akut, hem de kronik enfeksiyon şeklinde görülür. Kuzey Avrupa ülkeleri, ABD, İngiltere, Avustralya gibi ülkeler bu grupta yer alır (173).

Şekil-4: Hepatit B prevalansının coğrafik dağılımı 2005 (CDC) (149)

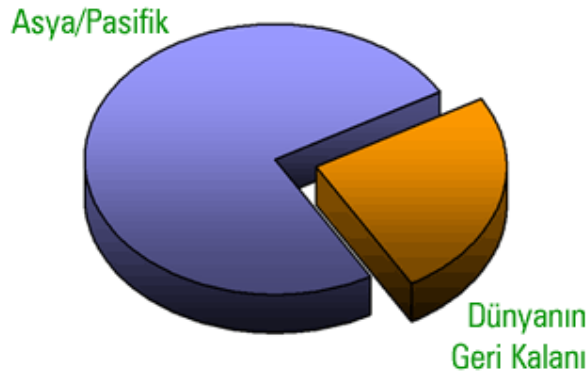


Halen dünyada yaklaşık 350 milyon, ülkemizde de 3 milyon kişi HBV taşıyıcısıdır. Her yıl dünyada 50 milyon yeni hepatit B enfeksiyonu ve HBV'ye bağlı 1-2 milyon ölüm bildirilmektedir. Ülkemiz nüfusunun yaklaşık % 5'i HBV taşıyıcısıdır ve en az 3 kişiden biride enfeksiyon ile karşılaşmıştır (55).

Avrupa'da her yıl 900.000 - 1 milyon insan hepatit B virüsü ile enfekte olmaktadır. ABD'de her yıl 140.000-320.000 akut hepatit B enfeksiyonunun gerçekleştiği hesaplanmıştır. Bu enfeksiyonların çok büyük bir bölümü, kronik hastalığa neden olmadan kendiliğinden iyileşmektedir (97).

Türkiye, HBsAg taşıyıcılığı bakımından dünyada orta derecede endemik sayılabilecek durumdadır. Ülkemizde ve ülkemizde bulunduğu coğrafi bölgede bulaş daha çok çocukluk çağında olmaktadır ve bu grupta kronikleşme oranı yüksektir. Halbuki akut B hepatiti geçiren erişkinlerde kronikleşme oranı düşüktür. Perinatal bulaş, taşıyıcı annelerdeki HBeAg pozitivitesinin düşük oranda olması nedeni ile nadirdir. En önemli bulaş yolu horizontal yani ailevi yakın çevre içinde olmaktadır (55).

Şekil-5: Uzun süreli taşıyıcı dağılımı



- Dünyada 350 milyon uzun süreli taşıyıcı var (77)
- Her yıl HBV enfeksiyonundan 1 milyon dolayında insan ölmekte (109).
- HBV, dünyada 9. ölüm nedenidir (28)
- Uzun süreli taşıyıcıların %75'i Asya/Pasifik'te yaşamaktadır (69)

BULAŞ YOLLARI

Ana Bulaşma Şekilleri

Kan Nakli (Kan, Kan Ürünleri)

Sıvılar (Kan, Sperm)

Organ ve Doku Nakli

Anneden Bebeğe

Virüslü İğneler ve Şırıngalar

Çocuktan Çocuğa

Hastalığın, günlük temas, çalışma ya da temizlik alanlarının paylaşımıyla değil, enfekte kişilerin kan ya da vücut sıvıları yoluyla yayıldığı bildirilmiştir. Virüs, beden sıvılarının diğer insanlara temas etmesi yoluyla bulaşır. HBV'nin en yoğun olduğu vücut sıvıları sırasıyla, kan, semen ve vaginal sekresyonlardır. Bu vücut sıvılarıyla bulaş riski daha fazladır. Bunların dışındaki diğer vücut sıvıları da (tükürük, ter, gözyaşı, süt, nazofarengeal sıvılar, asit mayi) potansiyel olarak enfeksiyözdür. Hepatit B virüsü genital sistem mukozalarından ve cilt yüzeyinde oluşan yaralardan geçebilir. Hepatit B virüsüne sık rastlanan bölgelerde, virüs taşıyan annelerin doğum sırasında bebeklerine virüs bulaştırdıkları gözlemlenmiştir. HBV-pozitif özelliğine sahip kadınlar ve yeni bebekler açısından bu çok önemli bir konudur. Kronik hepatit B hastalığının sık görüldüğü bölgelerde hastalığın çocuklar arasında hızla yayıldığı rapor edilmiştir.

Hepatit B virüsünün az görüldüğü bölgelerde, tanımlı risk grupları içindeki yetişkinlerde hastalığa daha fazla rastlanmaktadır. Uyuşturucu bağımlılarının kullandığı iğne ve şırıngalar ve güvenli olmayan cinsel ilişki ana bulaşma yoludur. Sağlık çalışanları da genel nüfusa oranla daha fazla risk taşır. Test edilmemiş kan örneklerinin kullanılması da enfeksiyona yol açabilmektedir.

Asya Pasifik bölgesinde, hastaların çoğu virüsü doğum zamanı ya da doğum zamanına yakın bir zamanda edinir. Dünyanın geri kalanında, hepatit B virüsünün, cinsel temas ya da kontamine kana maruz kalım yoluyla, adolesan ya da yetişkin dönemde edinilme olasılığı daha yüksektir (167,75,130).

Vertikal bulaşıcılık çocuk yaş grubunda özellikle endemik bölgelerde önemli bir bulaş mekanizmasını oluşturur. HBsAg dışkı, idrar, safra, göz yaşı, tükürük, semen, anne sütü, vajinal sekresyonda da bulunur (91,111,51). Endemisitesi düşük

olan bölgelerde enfeksiyon horizontal bulaşmaktadır, yüksek endemik bölgelerde perinatal bulaşıcılık ön plandaysa da bu bölgelerde yapılan çalışmalar horizontal bulaşmanın da önemli olduğunu göstermektedir (86). Ülkemizde hem vertikal hem de horizontal bulaşma önemlidir. Horizontal bulaşmada pediatrik yaş grubunda aile içi sıkı temasla olmaktadır. Mental retarde hastaların devam ettiği okullarda da horizontal bulaşma önemlidir. HBV'nin bulaşması o ülkenin yaşam tarzına da bağlıdır, ülkemizde sünnet, kan kardeşliği önemli bulaş yollarını oluşturmaktadır. Seksüel yaşamın adolesan çağında başladığı ülkelerde cinsel yolla bulaş önem kazanmaktadır. Ülkelerin bulaş yollarının bilinmesi HBV'ye karşı aşılama zamanını daha iyi ortaya koymaktadır.

HBV parenteral, cinsel temas ve perinatal yol ile bulaşmaktadır Vertikal bulaşma in utero transplasental, perinatal veya postnatal olabilir, sıklıkla perinataldır, doğum sırasında enfekte kan, amnion sıvısının yutulmasına, materno fetal mikrotransfüzyona bağlıdır (193). Anne hamileliğinin 1.trimestrinde B hepatitini geçirirse ve antikor oluşturursa HBV'nin vertikal bulaşma riski yoktur, HBV ftopatiye neden olmaz. Üçüncü trimesterde ve erken postpartum devrede akut hepatit geçiren ve özellikle HBeAg pozitif aktif viral replikasyonu olan annelerin çocukları risk grubu teşkil etmektedir. HBeAg pozitif olanlarda bulaşıcılık riski % 70-90 dır (163,162). HBe Ag pozitif olan annelerin çocuklarında bulaşma riski % 88, HBeAg negatif olanlarda % 13 oranında saptanmıştır (162). HBV perinatal bulaşıcılığında annenin viremi durumu da önemlidir, HBV DNA titrasyonu çok yüksek annelerin transplasental bulaştırdıkları gösterilmiştir (89). Pasif ve aktif immünizasyona rağmen viremisi yüksek olan annelerden doğan yenidoğanlara enfeksiyonun transplasental bulaştığı gösterilmiştir. Seksiyo ile doğum anne sütünün verilmemesi enfeksiyon riskini azaltmamıştır. Bu çocuklar doğar doğmaz aşılmalıdır.

İNFEKTİVİTE

HBV'nin stabilitesi her zaman HBsAg'nin stabilitesiyle paralel değildir. Eter, asit (pH 2.4)'de en az 6 saat ve ısı (98°C'de 1dakika, 60°C'de 10 saat) ile immünojenite ve antijenik özellik kaybolmadığı halde enfektivite kaybolmaktadır. Eğer virus yoğunluğu çok fazla ise bu işlemler sonucu inaktivasyon tam olamamaktadır. HBsAg, %2,5 sodyum hipoklorit varlığında 3 dakikada antijenik özelliğini ve enfektivitesini yitirir. Serumda enfektivite doğrudan kaynatmakla 2 dakikada, 121°C'de 0,5 atm basınç altında 20 dakikada, 160 °C'de kuru sıcak havada 1 saatte kaybolur. Son çalışmalar HBV'nin sodyum hipoklorit (500 mg serbest Cl/ml) ile 10 dakikada, % 0,1-2 aköz gluteraldehit, %70 izopropil alkol %80 etil alkolde 2 dakikada inaktive olduğunu göstermiştir. HBV 30-32 °C saklandığında en az 6 ay - 20°C'de 15 yıl enfektivitesini yitirmemektedir (174).

PATOGENEZ

HBV enfeksiyonunda karaciğer hasarının oluşmasında viral faktörlerden çok konak immün yanıtının rolü vardır. Yüksek düzeyde viral replikasyon gösteren, fakat normal karaciğer enzim düzeyi ve histopatolojisine sahip olan kronik taşıyıcılar; virusun direkt sitopatik etkisi olmadığını göstermektedir. Ayrıca hepatosit kültürlerinde üretilen virusun hücre canlılığı üzerine etkisi görülmemiştir. HBV enfeksiyonunu doğumda alan yenidoğanlarda yüksek viral replikasyon ve yüksek kronik enfeksiyon oranına rağmen karaciğerde hafif hasar saptanmaktadır. Bu durumun aksi, HBV'ye bağlı fulminan hepatitlerde görülmektedir. Bu olgularda düşük virus düzeyi, fakat masif hepatosellüler nekroz vardır. Yenidoğanlarda virusa karşı immün yanıt gözlenmemesine karşın, fulminan hepatit tablosunda güçlü immün yanıt vardır.

Yapılan araştırmalar virusun temizlenmesi ve karaciğer hasarının spesifik immün yanıtlara bağlı olduğunu göstermiştir. Akut enfeksiyonda birçok viral antijene karşı CD4+ ve CD8+ T hücre yanıtları görülmektedir. CD4+ T hücre yanıtları

özellikle kor ve polimeraz proteinlerine, daha az olarak da yüzey proteinlerine karşı gelişir. Virusun temizlenemediği kronik enfeksiyonlarda CD4+ ve CD8+ T hücre yanıtları belirgin olarak azalmıştır. Buna karşın hem akut, hemde kronik enfeksiyonlarda humoral yanıtlar görülmektedir. Kronik enfeksiyonlarda HBsAg fazlalığı nedeniyle anti-HBs antikorları saptanamamaktadır.

HBV enfeksiyonu patogenezi inceleyebilmek için hayvan modelleri oldukça kısıtlıdır. Doğal olarak HBV ye toleran olan transgenik farelere, HBV antijenleri ile duyarlılaştırılmış farelerden sitotoksik hücreler aktarılmış ve aktarılan hücre sayısı ile ilişkili olarak akut karaciğer hasarı geliştiği görülmüştür. Bu gözlemlere dayanarak virusun temizlenmesi ve virusla enfekte hepatositlerin harabiyetinden sitotoksik hücrelerin sorumlu olduğu kabul edilmektedir. Bununla birlikte sitotoksik hücrelerin sayısı virusla enfekte hücre sayısına göre oldukça azdır. Bu nedenle virusun temizlenmesinde inflamatuvar sitokinlerin aracılık ettiği ikincil mekanizmalarında rol oynadığı düşünülmektedir. Özellikle TNF-alfa ve IFN-gamma HBV nin temizlenmesinde etkili olmaktadır. Bu sitokinler iki ayrı yolu aktive ederek nükleokapsidlerin ve viral nükleik asidin yıkılmasını sağlamaktadır. Bu sitokin yanıtları karaciğerde Kupffer hücreleri tarafından güçlendirilmekte ve karaciğer hücrelerine zarar vermeden virusun temizlenmesi sağlanmaktadır. Sitokinler konak savunmasında hem viral replikasyonu baskılayarak direkt olarak, hem de baskın immün yanıt tipini belirleyerek indirekt rol almaktadırlar. Akut HBV enfeksiyonunda güçlü poliklonal hücresel yanıt hastalığın seyrini etkilemede önemlidir. Etkin immün yanıtın başlatılması için tipl sitokin salınımı gereklidir. Akut yanıtta yetersizlik olduğunda enfeksiyon kronikleşmekte, bu durumda optimal düzeyden az olan inflamatuvar yanıt nedeniyle hepatik fibrozis aktive edilmektedir.

Akut enfeksiyonda immün sistemin birçok kolu virusu temizlemek için aktive olmaktadır. Transaminazların yükseldiği dönemde HBV proteinlerine karşı antikorlar sentezlenmeye başlanmış olmaktadır. Bunlar içinde en kritik olanı anti-HBs antikorlarıdır. Sınırlı akut enfeksiyon sırasında HBcAg, HBeAg ve HBsAg proteinlerine karşı güçlü CD4+ T hücre yanıtları gelişmektedir. HBcAg ye karşı MHC-II sınırlı CD4+ T hücre yanıtları HBV nin serumdan temizlenmesi ile aynı dönemdedir ve vireminin kontrolünde en etkin mekanizmadır. Anti-HBs sentezi T hücreye bağımlıdır ve zayıf T hücre yanıtlarında düşük titrede antikor sentezlenir.

HBV spesifik CD4+ T hücreler aynı zamanda HBV spesifik sitotoksik T hücreleri (CTL) aktive ederler. HBV spesifik CTL yanıtları da CD4+ hücre yanıtlarına paraleldir. Kronik HBV enfeksiyonunda ise hastaların periferik kanlarında gösterildiği gibi zayıf CTL yanıtı vardır (103,179).

İyileşen akut HBV enfeksiyonunda hücresel yanıtın gücü dışında, fonksiyonel karakterizasyonu da farklılık göstermektedir. İyileşen akut HBV enfeksiyonunda CD4+ T hücrelerde tip 1 sitokin yanıtı gözlenmekte, buna karşın kronik enfeksiyonda tip 2 sitokin yanıtı görülmektedir. İnterferon tedavisine yanıt veren kronik taşıyıcılarda, yanıt vermeyenlere oranla IL-12 ve tip 1 sitokinlerde artış olduğu gösterilmiştir. Fakat bunun neden bazı kişilerde olduğu henüz açıklanamamıştır. Farelerde yapılan deneysel çalışmalarda HBcAg proteinine karşı yanıtı belirlemede bazı haplotiplerin farklılığa neden olduğu görülmüştür. Benzer şekilde bir araştırmada MHC-II antijeninde DRB*1302 alleli bulundurma ile HBV enfeksiyonuna direnç arasında ilişki görüldüğü bildirilmiştir. Sonuç olarak HBV ye karşı CD4+ T hücre yanıtları ve sitokin profili genetik olarak kontrol edilmektedir. Bununla birlikte tip 1 veya tip 2 sitokin yanıtı oluşmasında antijenin tipi ve miktarında etkili olmaktadır. Farelerde ağırlıklı olarak HBcAg tip 1, HBeAg ise tip 0 veya tip 2 T hücre sitokin yanıtına neden olmaktadır. Bu nedenle de HBV enfeksiyonunun erken döneminde fazla miktarda HBeAg ekspresyonunun olduğu kişilerde tip 2 T hücre sitokin yanıtının değişebileceği düşünülmektedir.

Sınırlı akut HBV enfeksiyonunda; tip 1 T hücre yanıtlarının yanında güçlü, poliklonal ve multispesifik CTL yanıtları da gözlenmiştir. Kor, zarf ve polimeraz proteinlerinin birçok epitopuna karşı olan bu CTL yanıtı, virusun temizlenmesinde önemli rol oynamaktadır. Fakat karaciğer gibi solid organlarda bu yanıtlardan çok, sitokinler virusun temizlenmesini sağlamaktadır. Çünkü karaciğerin sıkı hücre yapısı CTL'lerin enfekte hücrelere ulaşmasını engellemektedir. Bununla birlikte CTL'lerden salınan sitokinler direkt olarak HBV replikasyonunu inhibe edebilmektedir. TNF-alfa, HBV mRNA'sının yıkımını hızlandırmaktadır. Ayrıca 'core promoter', TNF-alfa, IFN-gama ve IFN-alfa'ya duyarlıdır ve bu sitokinlerin varlığında inhibe olmaktadır (102).

HBV-spesifik CTL ler enfeksiyonun kontrolündeki rollerinin dışında karaciğerde oluşan doku hasarındanda sorumlu tutulmaktadır. Kronik HBV

enfeksiyonunda CTL yanıtları periferde zayıf olmasına karşın karaciğer içinde devam etmektedir. Histolojik olarak portal aralıklarda ve bazı hepatik lobüllerde CD8+ T hücrelerin çoğunlukta olduğu mononükleer hücre infiltrasyonu ile birlikte hepatosit nekrozu görülmektedir. Bu sürekli ve etkin olmayan CTL yanıtı karaciğer hasarına neden olmaktadır. CTL, enfekte hepatositi tanıyınca apoptotik sinyal göndermekte ve hepatositin ölümüne neden olmaktadır. Bu olay biyopsi örneklerinde apoptotik hepatositlerin, asidofilik 'Councilman cisimcikleri' olarak görülmesiyle de histolojik olarak desteklenmektedir. CTL'ler daha sonra sitokinler aracılığı ile bölgeye makrofaj ve NK hücrelerini çağırır. Fazla miktarda HBsAg eksprese eden olgularda bunun sonucunda fulminan hepatit gelişmektedir (73).

AKUT HEPATİT B

Kuluçka Dönemi Belirtileri:

- Grip benzeri belirtiler
- Yorgunluk hali
- Mide ağrısı
- İshal
- Deride döküntü olabilir

Tipik Belirtiler

- Gözlerin ve derinin sararması ile bilinen sarılık durumu
- Açık renk dışkı
- Koyu renk idrar gelişebilir

Akut Hepatitli hastaların bir kısmı daha sonra kendini iyi hissederek iyileşirken bir kısmında kronik taşıyıcılık ve diğer ciddi durumlar gelişebilir.

Çocuk yaş grubunda özellikle yenidoğan ve süt çocukluğunda HBV asemptomatik olarak seyreder. Yaş arttıkça, adolesan çağında ve erişkinlerde semptomatik hastalık görülür. Semptomatik hastalık süt çocukluğunda % 5, 1-5 yaş grubunda % 5-15 oranında görülür. Yorgunluk, zayıflama, anoreksi, kusma, ateş, baş ağrısı, burun akıntısı, boğaz ağrısı, öksürük gibi nonspesifik semptomlar gözlenir. Miyalji, fotofobi, artralji hastaların 1/3'ünde görülür. Artrit, anjioödem, makülopapüller döküntü, ürtiker, böbrek tutulumunu belirten hematüri, proteinüri B hepatitinin prodromal döneminde immün sistem yoluyla ortaya çıkan başlıca bulgulardır (192).

Glomerülonefrit genellikle endemik bölgelerde çocukluk çağında görülür. Membranöz veya membranoproliferatif glomerülonefrit tarzındadır, genellikle selim seyrederek, çocukların % 85'i bir yılda spontan remisyona girer, kronik böbrek yetersizliği riski azdır. Çocukluk çağında yüzde, ekstremitelerde, kalçada kaşıntısız simetrik yassı papüllerle seyreden genellikle anikterik hepatitle giden Gianotti-Crosti sendromu görülebilir (64).

Fülminan hepatitte serolojik göstergeler negatif olabilir, bu durum da HBV'ye bağlı fülminan hepatit oranlarının tam olarak tespit edilememesine yol açmaktadır. Neonatal dönemde fülminan hepatit son derece nadir bir tablodur. Anti HBe pozitif olan annelerin bebeklerinde fülminan hepatit gelişebildiği bildirilmektedir (180). Fülminan hepatitli çocuklarda bazik core promotor ve precore bölgeleri incelenmiş ve mutasyonlar tespit edilmiştir (183,61).

Serolojik Seyri:

İnkübasyon dönemi sonuna doğru kanda HBsAg belirir. Aynı anda, infeksiyöz virüsün varlığına yani aktif virüs replikasyonuna işaret eden markerler de (HBeAg, HBV-DNA) kanda tespit edilir. Hem akut hem de kronik Hepatit B'de serumda HBeAg ve HBV-DNA (Pre-C mutant enfeksiyonları dışında) genellikle birarada bulunur. Bu dönemdeki hasta çok bulaşıcıdır. Genellikle klinik bulgular başlamadan önce veya kısa süre sonra HBV-DNA ve HBeAg kaybolur. HBsAg pozitifleşmesinden ortalama 4 (1-7) hafta sonra klinik ve biyokimyasal bulgular ortaya çıkar. HBsAg virüsle temastan 1-12 hafta sonra serumda belirir ve genelde klinik bulguların sona ermesine kadar negatifleşir.

HBcAg kanda serbest halde bulunmaz, sadece hepatositlerin nükleusunda tespit edilebilir. Akut B hepatitinde ilk oluşan antikorlar, HBcAg'e karşı oluşan anti-HBc'dir. Klinik belirtilerle birlikte ortaya çıkar. IgG tipi ömür boyu kalıcıdır. Anti-HBc IgG, geçirilmiş HBV enfeksiyonunun en iyi göstergesidir. IgM tipi Ab'lar ise doğal olarak akut enfeksiyonun göstergesi olan markerdir. 6-18 hafta kadar kalıcıdır. Bir kısım kronik hepatit vakalarında da özellikle aktivite zamanlarında, virüs replikasyonu ile uyumlu olarak düşük titrelerde serumda bulunabilir. Rutinde kullanılan ticari anti-HBc IgM testlerinin cutoff değeri yüksek tutularak, kronik B hepatitli vakalarda görülen düşük titre pozitiflikleri bertaraf edilmiş ve anti-HBc IgM pozitifliğinin akut B hepatitine özgü bir bulgu olarak algılanması sağlanmıştır.

İyileşme döneminde HBsAg'nin kaybolmasıyla, HBsAg'e karşı Ab'lar, anti-HBs gelişir. Anti-HBs, iyileşmeyi ve HBV'e karşı bağışıklığı gösteren markerdir. HBsAg'nin kayboluşu ve anti-HBs oluşumu arasında bir pencere fazı "Window period" görülebilir. Bu süre 2 hafta-1 yıl arasında değişebilir, testlerin duyarlığı arttığından nadir görülmeye başlanmıştır. Bu dönemdeki bir vakada yanlışlıkla sadece HBsAg bakılmış olursa akut B hepatiti atlanabilir. Bu fazda akut B hepatiti tanısını koyduran tek marker, anti-HBc IgM'dir.

HBeAg'nin kaybolmasıyla da anti-HBe ortaya çıkar. Bu durum, viral replikasyonun, dolayısıyla bulaşıcılığın azaldığı veya kaybolduğuna ve prognozun iyiliğine işaret eder. Anti-HBe genellikle 6-12 ay içinde kaybolur.

Akut B hepatitlerinin %10 kadarında serolojik seyir, bu anlatılandan biraz farklı olabilir. Örneğin; klinik belirtiler çıkar çıkmaz HBsAg'nin hızla kaybolduğu ve anti-HBs'nin de hemen oluştuğu, HBsAg ve anti-HBs'nin birlikte serumda bulunabildiği veya HBsAg kaybolmasına, normal iyileşme olmasına rağmen anti-HBs'nin oluşmadığı, daha nadiren hiçbir HBV markeri görülmeden sadece HBV-DNA tespiti ile tanı konan atipik serolojik seyirli vakalar görülebilmektedir (19).

KRONİK HEPATİT B

Belirtiler

HBsAg'nin 6 ay HBeAg'nin 10 haftadan fazla sürmesi kronikleşmeyi gösterir. Kronik Hepatit B'nin seyirinde başlıca iki dönem dikkat çeker.

Replikasyon dönemi:

Karaciğerde aktif viral replikasyon ve buna paralel olarak yoğun hücre harabiyeti vardır. Serumda HBeAg ve HBV-DNA pozitifdir. Transaminazlar yüksek seyreder. Hastanın infeksiyözitesi yüksektir. Bu dönem ne kadar uzun sürerse kronik aktif hepatit ve siroz gelişme riski o kadar yüksektir. Bu riski azaltmak için antiviral tedavi uygulanır. Tersine kısa sürede HBeAg negatifleşip anti-HBe oluşmuşsa risk azalır. Transaminazlar da genellikle normal seyreder. Pre-C mutantlarında bu kriter geçerli değildir. Serumda HBeAg negatif olmasına rağmen HBV-DNA pozitifdir.

HBeAg (-) kronik Hepatit B'li bir hastada transaminazlar yüksek seyrediyorsa mutant enfeksiyonu düşünölmeli ve HBV-DNA araştırılmalıdır.

İntegrasyon dönemi:

İmmün yanıtla replikasyon durdurulur ve replikasyon döneminden integrasyon dönemine yıllar içinde geçiş olur. Virüs genomunun bazı bölümleri genellikle HBsAg sentezleyen kısmı, hepatosit genomuna integre olur. Artık viral replikasyon olmamasına rağmen HBsAg, hepatositlerce üretilir ve buradan seruma geçer, genellikle ömür boyu sürer.. Serumda HBeAg ve HBV DNA negatiftir. İntegrasyonun Hepatit B'ye bağılı karaciğer kanseri gelişiminde de rolü vardır. İntegrasyona uğramış hücrenin kanser hücresine dönüşme riski 200 kat daha fazladır (19).

HBV'nün kronikleşmesi şahsın yanıtına ve immün sistemin durumuna bağılıdır. Erişkin dönemde bu kronikleşme %10 iken neonatal dönemde bu oran %90'lara ulaşmaktadır.

HBV direkt olarak sitopatik değildir, karaciğerde oluşan harabiyet hepatositlerin immün yıkımına bağılıdır. Şayet şahsın immün sistemi virüsün temizlenmesi için yeterli immün cevabı vermezse o şahısta sitoliz ve karaciğer harabiyeti olmaz ve şahıs taşıyıcı kalır. HBV'nin immün patogeneğinde T hücrelerinin ve sitokinlerin üzerinde durulmaktadır. Kronik HBV enfeksiyonunda TH2 cevabı baskındır. Kronik taşıyıcı annelerden doğan çocuklarda HBV'nün persistansı immünolojik toleransa bağılıdır. Yenidoğanlarda bu fenomene 'immün escape' denmektedir. HBeAg plasentadan geçer ve enfekte hepatositlerin yıkımında target olan nükleokapsid proteinlerine selüler immün cevabın oluşmasını engeller. HBe Ag self antijen olarak ortaya çıkar ve HBe Ag spesifik hücrelerin negatif seleksiyonuna neden olur. T hücre toleransı TH1/TH2 dengesini bozar. Ayrıca antiHBc IgG'nin target olan HBcAg'lerini bloke etmesi ve sitotoksik T hücrelerinin bu enfekte hepatositleri tanımamasını engellemesi de mevcuttur (84).

İnaktif HBsAg de Yapılması Gerekenler:

Hasta 6-12 ay aralıklarla izlenmelidir. Transaminazlarda yükselme saptanırsa HBV DNA bakılmalıdır. HBV DNA $< 10^4$ kopya/mL ise diğer transaminaz yüksekliği nedenleri ekarte edilmelidir. HBV DNA $\geq 10^4$ kopya/mL ise karaciğer biyopsisi yapılmalıdır. Biyopside nekroinflamatuvar aktivite ≥ 4 ise tedavi verilmelidir. Biyopside nekroinflamatuvar aktivite < 4 ise biyopsi her beş yılda bir tekrarlanmalıdır. İzlem sırasında hepatosellüler kanser (HSK) yönünden de alfafetoprotein düzeyi takip edilmeli ve abdominal ultrasonografi yapılmalıdır.

Yüksek serum HBV-DNA düzeyine sahip ancak normal alanin aminotransferaz (ALT) düzeyleri olan HBeAg pozitif hastalar 3-6 aylık aralıklarla izlenmelidir. ALT düzeyi yükseldikten sonraki 3-6 aylık izlem periyodunda, HBeAg pozitifliği devam ediyorsa ve serum HBV DNA düzeyi $>10^5$ kopya/mL ise karaciğer biyopsisi yapılmalıdır. Biyopside nekroinflamatuvar aktivite ≥ 4 ise antiviral tedavi düşünülmelidir. KHB enfeksiyonu olan hastalarda izlem: ALT düzeyleri yükselmiş olan HBeAg pozitif hastalarda spontan HBeAg serokonversiyonu olabileceğinden tedavi kararı verilmeden önce 3-6 aylık izlem önerilmelidir.

KHB enfeksiyonu kriterlerine uyan hastalarda (serum HBV DNA düzeyi $> 10^5$ kopya/mL ve persistan veya intermitan ALT yüksekliği) karaciğer biyopsisi düşünülmelidir.

HSK için izlem: Yüksek oranda HSK gelişme riskine sahip kronik HBsAg taşıyıcıları (örn; 45 yaş üstü erkekler, sirotik hastalar, HSK için aile öyküsü olanlar, enfeksiyon başlangıcı perinatal veya erken çocukluk döneminde olanlar) periyodik olarak 3-6 ayda bir hem alfafetoprotein , hem de abdominal ultrasonografi ile takip edilmelidir.

Yeterli kanıt olmasa da endemik bölgelerdeki düşük riskli kronik HBsAg taşıyıcılarında periyodik olarak alfafetoprotein düzeylerinin izlenmesi düşünülmelidir (182).

Hepatit B Enfeksiyonu İçin Taranması Gerekenler

Yüksek endemik bölgelerde yaşayan aşılanmamış kimseler,
 Hepatit B virusu (HBV) ile enfekte anneden doğan çocuklar,
 Ailesinde hepatit B enfeksiyonu bulunan çocuklar,
 Kan ve kan ürünleri alan hastalar. Hemodiyaliz hastaları,
 Akut veya kronik karaciğer hastalığı bulunanlar,
 İntravenöz ilaç bağımlısı çocuklar,
 Kemoterapi alan hastalar veya kronik hastalığı nedeniyle hastaneye bağımlı olanlar,
 Organ transplantasyon adayları,
 Yüksek risk grupları,
 Persistan yorgunluk ve/veya sağ üst kadrın rahatsızlığı açıklanamayan hastalar,
 Karaciğer hastalığının fiziksel özellikleri bulunan hastalar (skleral ikter, sarılık, hepatomegali, palmar eritem, vb.)
 Serum aminotransferaz (ALT, AST) düzeylerinde açıklanamayan artışlar olan hastalar.
 Yüksek risk grupları:
 İntravenöz ilaç kullanıcıları veya kokain bağımlıları (yeni ya da önce).
 Güneydoğu Asya'dan, Afrika'dan insanlar ve yerli nüfuslar.
 Karışık cinsel hikayesi olan bireyler.
 Sağlık alanında çalışanlar.
 İndex bir vakanın aile bireyleri.
 Dövmesi olanlar, steril olmayan teknikler kullanılarak kulak veya vücut deldiren ya da akupunktur yaptıran bireyler (76).

HBV 'DEN KORUNMA

Kişinin ve toplumun sağlığını bu denli tehdit eden kronik HBV enfeksiyonunun tedavisinde anti viral ajanlarla başarı oranı, tedaviye cevap verme kriterlerindeki hastalarda dahi % 40-50 oranındadır, aynı zamanda bu tedavi ajanları hem kişiye hem de ülke ekonomisine yük getirmektedir. Tüm gelişmiş ülkelerin birleştiği nokta HBV'nin önlenmesi için kitlesel korunma yapılmasıdır.

HBV'den korunma ilk olarak risk grubuna ait olan şahısların ve taşıyıcı annelerin çocuklarının korunması ile başlamıştır. Ancak bazı endemik bölgelerde virüsün geçişinin vertikal olması ve süt çocukluğu döneminde de kronikleşmenin yüksek oranda olmasından dolayı aşılanmanın yenidoğan döneminde başlatılması önerilmiştir. Dünya Sağlık Teşkilatı da 1997 yılından itibaren HBV aşısının tüm dünyada yeni doğanlara yapılmasını şart koşmaktadır. Bugün bir çok ülkede HBV aşısı aşı takvimine girmiştir. ABD'de yapılan bir çalışmada gebelerin taranması, risk gruplarının aşılanması, adolesanların aşılanması, yenidoğanların aşılanması durumunda ancak 2015 yılında HBV'nin eradike edilebileceği belirtilmiştir (72). Orta endemisite kuşağında bulunan ülkemizde hem horizontal hem de vertikal geçişin bulunması, tüm hamile kadınların taranamaması dolayısı ile Hepatit B aşılmasına yenidoğan döneminden itibaren başlanmalıdır.

İnsanlar Hepatit B virüsünün bulaşma yolları konusunda bilinçlendirilebilirse bu hastalığa yakalanma riski önemli ölçüde azalır. Özellikle Hepatit B taşıyan anne adayları, çok eşli cinsel yaşamı olan ve geçmişte cinsel yolla bulaşan hastalıklara yakalanan kişiler, kan ve vücut sıvılarına maruz kalan sağlık çalışanları HBV bulaşma yollarına karşı önlem ve eğitim almalıdır. Kan donörlerinin HBsAg yönünden "enzyme immunassay" ile taraması yapılmalıdır. HBsAg pozitif bireyler ve bunlarla temas eden / edebilecek olanlar virüsün bulaşma yolları, oluşacak hastalığın sonuçları hakkında bilgilendirilmeli ve eğitilmelidir. Sağlık personeli HBsAg pozitif bireyler ve riskli materyallerle temas öncesi ve sonrası korunma yöntemleri hakkında eğitilmelidir. Hastane içi bulaşmanın önlenmesine yönelik tedbirler alınmalıdır.

Virüs bulaşmayan kişilere hepatit B aşısının yapılması hepatit B enfeksiyonunu önleyebilir. Üç farklı aşıdan oluşan aşılanma süreci hastaların yaklaşık %90 - 95'inde etkili olmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü 2001 yılına kadar çocuklar arasında yeni taşıyıcıların sayısını yüzde seksen oranında azaltmayı hedefliyor. Bazı durumlarda virüs bulaştıktan hemen sonra aşı yapılarak enfeksiyon oluşması önlenir. Aşıdan yararlanabilecek kişiler arasında hepatit B taşıyan annelerden dünyaya gelen çocuklar, iğne batması nedeniyle hepatit B bulaşan sağlık çalışanları ve hepatit B enfeksiyonu taşıyan kişilerin cinsel partnerleri yer alıyor.

Hepatit B aşısı ilk antikanser aşısıdır ve Hepatit B aşılmasına 1981'de plazma kökenli aşılarla başlanmıştır, daha sonradan bunların yerini gen mühendisliği aracılığı

ile bir maya mantarı olan *Saccharomyces cerevisiae* içine HBs Ag geni yerleştirilerek elde edilen rekombinan aşılardan almıştır (10,67). Ülkemizde kullanılan aşılardan 3 doz aşılardan sonra % 90'ın üzerinde immünite sağlanmaktadır. Aşının uygulanması 1.ve 2. aşı arasında bir ay bırakılarak ülkelerin epidemiyolojik verilerine göre farklı takvimlerle yapılabilir. Aşı sonrası koruyucu anti HBs düzeyi 10 mU/ml dir. 0,1,2 ve 0,1,6 aylık aşı takvimleri karşılaştırıldığı zaman birincisinde antikor titrasyonunun daha erken dönemde başladığı ancak 2. takvime göre GMT'sinin düşük olarak tespit edilmiştir (92,71). Çocukluk aşı takvimine göre bazı ülkelerde 2, 4,6 veya 2, 4,12. aylarda da aşı uygulanmış ve antikor titrasyonunda herhangi bir farklılık gözlenmemiştir. Ancak vertikal bulaşmanın önemli olduğu bölgelerde aşı mutlaka yenidoğan döneminden itibaren başlatılmalıdır. Aşı DPT, MMR, Act HIB, BCG gibi diğer aşılardan birlikte yapılabilir ve herhangi bir enterferans göstermez (43,63). Hepatit A ile birlikte bivalent ve difteri, tetanoz, asellüler boğmaca, inaktif polio, hemofilöz influenza tip B ile kombine polivalent aşılardan da mevcuttur, bu aşılardan sayesinde de enjeksiyon sayısı azaltılabilmektedir. HBV aşısı yeni doğan döneminde hiperimmün gammaglobülin (HBIG) ile birlikte ayrı bölgelere yapılabilir, taşıyıcı olan annelerin çocuklarına doğum sonrası aşı ve HBIG (glütal bölgeye İM 0.5 ml) yapılmalıdır. HBe Ag ve HBV DNA'nın negatif olduğu bilinen şahısların yenidoğanlarına ekonomik nedenlerden dolayı tek başına aşı yapılabilirse de en güvenlisi her ikisinin de uygulanmasıdır.

PreS2 içeren aşılardan hayvan deneylerinde daha kısa sürede bağışıklık sağlamışlarsa da insanlarda bu fark tespit edilmemiştir (146).

Aşı kolda deltoit kasa veya bebeklerde uyluğa IM olarak yapılmalıdır, ID aşılardan antikor titrasyonu daha düşük olarak tespit edilmiştir (46). Bazı şahıslarda aşı cevabı alınmamaktadır (49). Kırk yaşın üzerindeki kişilerde, kadınlarda, şişmanlarda, malnütrisyonu olanlarda, sigara kullananlarda aşılara cevap daha azdır; genetik olarak bazı doku gruplarında da aşılara cevap az olarak alınmıştır (HLA-DR3, DR 7, Taiwan'da HLA DR14 DR 52, Japonya' da HLA BW 54, DR4, DR W 53) (181,81,41,8). Preterm bebeklerde terimdekilere göre aşı cevabı düşüktür. Yenidoğan döneminde anneleri taşıyıcı olan, aşılara cevap vermeyen bebeklerin lenfositlerinde HBV genomu tespit edilmiştir (108). Kronik böbrek hastaları, hemodializ, Down sendromlu çocuklar, onkoloji hastaları, homoseksüeller, HIV enfeksiyonu olanlar,

alkolikler, immünoşüpressif alanlarda da aşıya cevap düşüktür. Bu gibi durumlarda aşı dozu arttırılabilir, takvim tekrarlanır, interleukin 2, g IFN (özellikle hemodializ hastalarında) ile birlikte yapılabilir. İmmünkompetan olup cevap vermeyen olguların % 40'ının 4. dozdan sonra, % 70'inin de aşı takviminin tekrarlanmasından sonra cevap verdiği görülmüştür. Kronik böbrek hastalıklı çocuklarda aşıya cevap % 40-80 arasında bulunmuş, bu çocuklarda aşının dialize başlanmadan önce yapılması, nütrisyonel durumun, üre, kreatinin düzeyinin antikor titrasyonunu etkilediği gösterilmiştir (56,185).

Aşıya cevapsız şahıslarda PKM hücrelerinin HBs Ag stimülasyonu sonrası sitokin salgılamasının az olduğu ve T hücrelerinin defektif olduğu saptanmıştır. Aşıya cevabın olmamasında soğuk zincirde defekt, inokülasyonun yeri, adjuvan gibi aşıya ait faktörler de etkili olabilir

Aşının koruyuculuk süresi uzundur, Taiwan, Senegal, Gambia gibi ülkelerde yapılan çalışmalar birinci aşı takviminden yıllarca sonra koruyuculuğun devam ettiğini, anti HBs düzeyi düştüğü zaman yapılan rapelin anamnestic reaksiyon verdiğini göstermiştir (48,44,189,87). Bu da şahıs aşılandıktan sonra anti HBs düzeyi düşse dahi enfeksiyonun anamnestic cevap uyandırarak koruyuculuk yaratacağını düşündürmektedir. Hepatit B aşılması öncesinde serolojik testlerin yapılmamasında şahsın o anki durumunun bilinmemesinden başka bir zararı yoktur. Anti-HBs oranı % 40'ın üzerinde olan ülkelerde aşı öncesi tarama yapılması cost efektif bulunmuştur. HBs Ag ve anti HBs negatif, anti-HBc IgG pozitif olan çocuklara bir doz aşı yapılmalı ve sonra göstergeler tekrar değerlendirilmelidir.

Lokal ağrı, ateş, irritabilite, baş ağrısı, halsizlik gibi minor komplikasyonlar bildirilmiştir. Ciddi yan etkiler çocuk yaş grubunda belirtilmemiştir (123,68). Nadir olarak trombositopeni, glomerülo nefrit, artrit gibi immünkompleks reaksiyonları bildirilmiştir. Fransa'da erişkinlerde aşı sonrası geliştiği bildirilen Multiple skleroz olgularının aşıya bağlı olup olmadıkları ortaya konmamıştır, bu hastalığın insidansının da aşılarında normal popülasyondaki insidansdan daha fazla olmadığı gösterilmiştir (160). Son yıllarda İtalya'da % 2.8 oranında mütant suşların ortaya çıktığı bildirilmiştir (39,85). B hepatitinin neden olduğu kronik karaciğer hastalıkları ve HCC gözönüne alındığında tüm yenidoğanlar aşılanmalıdır.

Sonuç olarak koruyuculuğu ve güvenliliği kanıtlanmış olan HBV aşısı ile aşılama kronik B hepatitini ve bunun sonucu olarak gelişebilen siroz ve hepatosellüler karsinoma gibi riskleri önlemekte ve global olarak düşünüldüğünde bu komplikasyonların tedavisi için gerekecek sağlık harcamalarından daha az bir bütçeyi gereksindirmektedir. Taşıyıcılık oranına göre orta endemi olarak tespit edilen ülkemizde de HBV aşısı aşı takvimine konulmuştur, ancak aşılamanın yenidoğan döneminde başlaması gereklidir (50).

HBV Enfeksiyonunda İmmün Yanıttan Kaçma Mekanizmaları:

HBV enfeksiyonunda immün sistemin etkilerinden virusun kaçmasını sağlayacak pek çok karşı mekanizma geliştiği görülmüştür. HBV enfeksiyonunda HBc, HBpol ve HBx proteinleri sitokin genlerinin ekspresyonunu etkilemektedir. HBx proteini viral mRNA ekspresyonunu artırırken IL-6'yı inhibe ederek immün yanıtı etkilemektedir; ayrıca IL-8 ekspresyonunda arttırmakta, bunun aracılığı ile IFN-alfa'yı inhibe etmektedir. HBx ayrıca hücrel transformasyonda rol oynayan TGF- β 1'in büyüme inhibisyonu etkisine yanıtı da azaltmaktadır. HBV nin immün yanıttan kaçmak için kullandığı mekanizmalardan biri de lenfositlerde replike olabilmesidir (186). Bu hücrelerde apoptozisin indüklenmesi ile HBV ye karşı immün yanıtta klonal anerji gelişebilmektedir (144).

HBV'nin immün yanıttan kaçmakta kullandığı mekanizmalar şöyle özetlenebilir (154):

1-Görünmeyen virus (Gizli bölgeler ve antijenik özelliğin kaybı): HBV'nin enfekte ettiği hücreler immün yanıtın güçlkle ulaşabildiği vücut bölgelerinde olup CTL saldırısından kaçabilmektedir. Karaciğerin sıkışık parankim yapısı, pankreas ve böbrek dokuları; enfekte hücrelerin CTL yanıtından korunmasını sağlamakta ve böylece viral perzistans gerçekleşmektedir. Ayrıca virusun precore/core genlerinde olan mutasyonlarla HBeAg sentezi durmakta, immün tanıma için oldukça önemli olan bu antijenin yokluğunda virusa karşı yanıtlar zayıflamaktadır. HBeAg sentezlemeyen viruslar ise replikasyonunu sürdürmekte ve enfeksiyon devam etmektedir.

2-Antikorlardan kaçma: Akut HBV enfeksiyonunda virusun temizlenmesinde etkin olan antikorlar; yüzey antijenlerine karşı oluşan nötralizan özellikteki antikorlardır.

Yüzey antijenlerinde 'a' determinantında değişikliğe neden olan mutasyonlar, virusun bu antikorların nötralizan etkisinden kaçmasını sağlamaktadır.

3-Antijen işlenmesi ve T lenfosit sunumunun etkilenmesi: Viral antijenlerde değişikliğe yol açan mutasyonlar bu antijenlerin MHC antijenlerine bağlanmasını ve TCR ile bağlanma özgülüğünü etkiler. HBc proteininde olan bazı mutasyonların, T hücre tanınmasını engellediği ve hatta farklı bağlanma bölgeleri nedeniyle değişik T hücre klonlarını aktive ederek immün yanıtı antagonize ettiği gösterilmiştir. Gene HBc proteini belli HLA epitoplarına bağlanabilen bölgeler içerebilmektedir. Bu durumda kişinin HLA tipine bağlı olarak immün yanıt değişmektedir.

4-Aktive T hücre yanıtlarının değiştirilmesi: Virus yükünün çok fazla olduğu durumlar gibi immunodominant epitopların uzun süreli ya da maksimal T hücre uyarısı, T hücrelerde yanıtsızlığa ya da apoptosis sinyaline neden olabilir. Bu durumda subdominant epitoplarca aktive edilen T hücre yanıtları enfeksiyonu kontrol etmeye çalışır. Fakat bu yanıtlar enfeksiyonun eliminasyonu için yeterli olmadığından kronik enfeksiyon meydana gelir. T hücre yanıtını değiştiren bir başka mekanizma da HBsAg spesifik CD8+ T hücrelerin CD4+ T hücre yanıtlarını baskılamasıdır. Ekzojen HBsAg birçok hücre tipinde MHC I antijenleriyle işlenmekte ve ardından HBsAg spesifik CTL tarafından hücre öldürülmektedir.

5-İmmün yanıtı değiştiren viral proteinler: Daha çok sitokinler üzerinden immün yanıtları değiştirmektedirler. HBcAg, IFN-beta transkripsiyonunu inhibe etmekte; terminal kısmı IFN-alfa ve IFN-beta'ya hücresel yanıtları inhibe etmektedir.

HBV’NİN GENETİK YAPISI:

HBV, bir DNA virusu olup sirküler yapıda bir genetik elemana sahiptir. Bu sirküler DNA olgun virus içinde tam olarak tamamlanmamış çift sarmal yapıdadır. DNA'nın negatif zinciri tam olarak kapalı sirküler yapıda olmakla birlikte pozitif zincir negatif zinciri tam olarak karşılamamaktadır. Genetik eleman ve DNA polimeraz enzimi core antijeninin polimerleşmesi ile oluşan nükleokapsid tarafından çevrelenmiştir. Kapsidin etrafını da çoğunlukla S ve az miktarda da preS1 ve preS2 moleküllerinden meydana gelen zarf çevreler. Virus muhtemelen preS1 bölgesindeki bazı moleküler motifler aracılığı ile hepatositlerin yüzeyindeki reseptör benzeri bölgelere bağlanarak endositoz ile hücre içine alınır. Bu reseptör veya benzeri moleküllerin yapısı da bilinmemektedir. Asialoglikoprotein reseptörleri, IgA reseptörleri, prealbumin reseptörleri ve diğer birçok molekülün HBV için reseptör olabileceği belirtilmiştir. Son yıllarda annexin V üzerinde kuvvetle durulmaktadır. Hücre içine giren HBV, sitoplazmada zarf ve kapsidini kaybederek genomik yapısı çekirdek içine girer ve burada replike olur. HBV bir DNA virusu olmasına rağmen replikasyon için reverse transcriptase sürecini kullanır. Replikasyon için kısmi çift sarmal, yapı tam çift sarmal hale gelir. HBV DNA'sından pregenomik RNA meydana gelir ve reverse transcriptase enzimi C ucundan bu RNA molekülüne bağlanarak molekülün precore bölgesine uyan kısmındaki sinyal dizisi aracılığı ile kapsid proteinleri ile bağlanır. Kapsidle çevrelenen RNA molekülü ve reverse transcriptase enzimi aracılığı ile HBV DNA'sı sentez edilmiş ve replikasyon tamamlanmış olur. Yukarıda virusa ait çeşitli elemanlardan bahsedilmiştir. Bunlardan nükleokapsid proteinini kodlayan genetik bölgeye "core" açık okuma alanı (open reading frame (ORF)), zarf (yüzey (surface)) proteinlerini kodlayan bölgeye "S" ORF, reverse transcriptase'ı kodlayan bölgeye P ORF denir (Şekil 6). Virusun diğer bir ORF'i X bölgesidir. Bu bölgeden kodlanan X proteininin fonksiyonu tam olarak bilinmemekle beraber virusa ve konakçıya ait bazı genler için düzenleyici ve aktive edici özelliklere sahip olduğuna dair deliller vardır. HBV genomik yapısı çok özel olup bahsedilen bu genetik elemanlar arasında büyük oranda overlap (üst üste binmeler) vardır. Ancak okuma alanları birbirinden farklı olduğu için farklı amino asit dizilerinin sentezini sağlarlar. Virusa ait genetik düzenleyiciler de bahsedilen genetik elemanların üzerinde

bulunmaktadır. Bu nedenlerle bir genetik elemanda meydana gelen mutasyon birden fazla bölgede değişikliğe neden olurlar. Bir okuma alanı için avantaj teşkil edebilen bir mutasyon diğeri için fatal olabilir. Bu özellik nedeniyle aslında diğeri RNA virüsleri gibi yüksek oranda mutasyon sıklığına sahip olan HBV, doğal olarak çok az mutasyon geliştirir.

Mutasyonların doğal olarak bulunmaları meydana gelme hızlarına ve virusa sağladığı avantaja bağlıdır. HBV reverse transcriptase'ı da diğeri virüslarda olduğu gibi proof reading fonksiyonuna sahip değildir. Yani replikasyon sırasında yanlış giren nükleotidlerin düzeltilmesi mümkün olmamaktadır. Bunun için yüksek oranda mutasyon gelişme ihtimali vardır. Ancak yukarıda söz edilen nedenden dolayı ancak yılda baz başına 2×10^4 değişiklik söz konusu olmaktadır. Bu oran retrovirüslardan 10-100 misli daha azdır.

Mutasyonlar başlıca 3 tür olabilir:

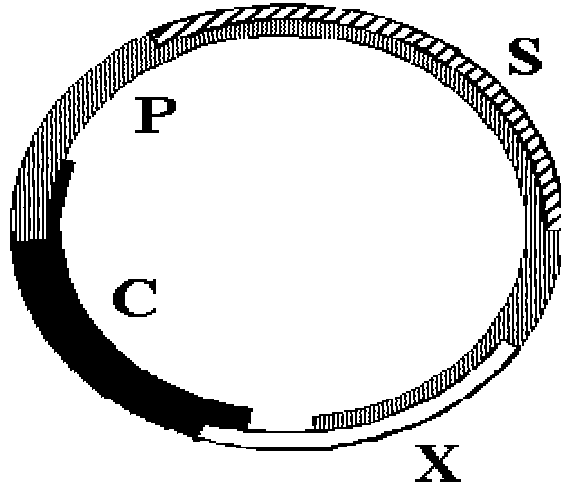
1-Nokta mutasyonları: Bir nükleotidin yerine diğeri bir nükleotid geçmektedir.

a) Transition: Bir pürin yerine diğeri pürinin veya pirimidin yerine pirimidinin geçtiği en sık rastlanan mutasyonlardır.

b) Transversion: Pürinin pirimidin ile değiştiği veya tersinin görüldüğü nokta mutasyonlarıdır.

2-Yeniden düzenlenme mutasyonları (rearrangements): Büyük bölgeleri ilgilendirir. Insertion veya deletion şeklinde olabilir. Translokasyonlar ve inversion'lar da bu grupta incelenir.

3-Frameshift mutasyonlar: Tek bir nükleotidin insertion veya deletion'u ile okuma alanında değişiklik meydana gelmesidir (4).



Şekil-6: Hepatit B virusu genomunun şematik gösterimi.

HEPATİT B VİRUSU MUTASYONLARI

Hepatiti B virusu (HBV), dünyada 350 milyonu aşkın kişiyi enfekte etmesi, karaciğer sirozu ve karaciğer kanserine yol açabilmesi nedeniyle çok ciddi bir sağlık problemidir. HBV'nun hangi mekanizmayla karaciğerde hasar yaptığı bilinmemektedir. Virusun sitopatik olmadığı, enfekte hepatositlere karşı gelişen immün yanıtın karaciğer hasarından sorumlu olduğu sanılmaktadır. Bu durumda konakçının immün cevabının etkinliği yanı sıra virusun antijenik yapısındaki, antijen ekspresyonu ve replikasyon kapasitesindeki değişiklikler de karaciğer hasarının farklı görünümüne neden olabilir. Virusa ait bu faktörler doğal olarak virusun genomik yapısındaki değişikliklerle yakından ilişkilidir. Bu nedenle HBV enfeksiyonlarının akut kendi kendini sınırlayan hepatitten, asemptomatik taşıyıcılığa, fulminan hepatite, kronik hepatit ve karaciğer kanserine kadar değişen farklı klinik görünümünden virusun genomik değişikliklerinin sorumlu olup olmadığı hep merak edilmiştir. Moleküler biyolojik yöntemlerin gelişmesi virusun genomundaki değişikliklerin daha kolay ve daha geniş incelenmesini sağlamıştır. Son on yılda HBV genetik değişiklikleri ve bunların hastalığın kliniği ile ilişkileri çok sayıda araştırmaya konu olmuştur.

1- Precore-core bölgesi mutasyonları:

HBV'nin ilk tespit edilen ve üzerinde en çok durulan mutasyonları bu bölgede yerleşen mutasyonlardır.

Kronik B hepatitinin aktif dönemlerinde virus replikasyonunun devam ettiği bilinmektedir. Serumda HBV DNA'sının tespiti ve HBeAg varlığı HBV'nin replike olduğunu gösteren parametrelerdir. Bu nedenle kronik aktif karaciğer hastalığı olan HBV enfeksiyonlarında HBV DNA ve HBeAg pozitif olarak saptanır. Bazı karaciğer hastalarında, karaciğerde aktif nekroinflamatuvar süreç ve serumda HBV DNA pozitifliğine rağmen HBeAg'nin negatif olduğu saptanmıştır. Bu hastaların serumlarından izole edilen HBV DNA'sının incelenmesinde HBeAg'nin kodlandığı precore bölgesinde 28'inci kodonda TGG kodonunun TAG dönüşümü gösterdiği yani triptofan kodonu yerine stop kodon meydana geldiği tesbit edilmiştir.

Core geninin bir stop kodonu olduğu halde iki başlatma kodonu vardır. Translasyon ikinci başlatma kodonundan başladığında ortaya çıkan polipeptid, core proteini denilen ve nükleokapsidi oluşturan proteindir. Eğer translasyon birinci başlama kodonundan başlarsa meydana gelen polipeptid hücre içinde bazı süreçlerden geçip karboksil ve amino bölgelerinden kırılmalar göstererek sonuçta HBeAg'ini oluşturur (Şekil 7). Yukarıda bahsedilen precore bölgesindeki 28inci kodon ikinci başlama kodonundan iki önceki kodon olduğu için HBeAg translasyonu dudurulduğu halde virusun en önemli strüktürel proteinlerinden olan core proteini (HBcAg) sentezi eksiksiz gerçekleşir.

HBeAg sentezi olmadığı halde virus canlılığını, patojenitesini ve büyük ihtimalle enfektivitesini kaybetmemektedir. Bu durumda HBeAg'nin virus için fonksiyonunun ne olduğu sorgulanmakta, ancak kesin bir cevap verilememektedir. Büyük ihtimalle virusa karşı oluşan immün toleransta, dolayısıyla enfeksiyonun devamlılığında HBeAg'nin rolü olduğu düşünülmektedir. HBeAg'nin bebeklikte transplasental bulaştan dolayı immün tolerans yapacağı düşünülmüş, erişkinlerde Th hücrelerinde apoptozisi indüklediği gösterilmiştir. Enfeksiyonun erken evrelerinde gerekli olduğu halde ileri evrelerde önemini kaybettiği düşünülmektedir.

Precore stop kodon mutasyonu ilk önce ağır karaciğer hastalığı olanlarda ve fulminan hepatitli hastalarda tespit edildiği için araştırmacılar fulminan B hepatitinin

etken ve etiyolojisini bulduklarını düşünmüşlerdir (140). HBeAg immün tolerojen olarak düşünüldüğü için, bu proteinin kaybının agresif bir immün saldırıya ve dolayısıyla fulminan veya ağır seyirli bir karaciğer hastalığına neden olduğu iddia edilmiştir. Ancak hemen arkasından yapılan geniş araştırmalar stop kodon mutantının asemptomatik taşıyıcılarda da tespit edildiğini göstermiştir (136). Amerika Birleşik Devletleri'nden yapılan yayınlarda fulminan B hepatitli hastalarda precore stop kodon mutantlarının seyrek olarak bulunduğu bildirilmiştir (107,112). Bu durumda hastalığın klinik görünümü ile precore mutantının ilişkili olduğu görüşü tehlikeye girmiştir. Çeşitli araştırmalar bu mutasyonun hastalığın immün temizlenme dönemlerinde seçildiğini ve muhtemelen bu nedenle aktif hastalığı olanlarda daha fazla tespit edildiğini göstermiştir (98). "Precore stop kodon mutasyonu ağır klinik tablonun sebebi değil sonucudur." görüşü ağırlık kazanmıştır. Hatta mutantlarla enfekte hastalarda akut alevlenmeler geliştiğinde, yükselen HBV DNA titresinden çoğunlukla wild tip sorumlu tutulmuştur (117). HBeAg hepatositlerin yüzeyinde sitotoksik T hücrelerinin cevap geliştirdiği en önemli antijenik yapılardandır. Bu antijenin olmaması virusun immün sistemden kaçmasına ve enfeksiyonun devamlılığına neden olmaktadır. Wild tip virusa karşı gelişen immün saldırı, wild tipin temizlenip HBeAg (-) suşun (precore stop kodon mutantının) seçilmesini sağlamaktadır. Bunun için aktif inflamasyon ve nekrozun olduğu dönemlerde mutant viruslar artmaktadır. Fulminan hepatitlerde de büyük oranda mutantların saptanması da çok süratle wild tipin temizlenmesi ile izah edilmiştir (17). Bunlara rağmen, bugün için henüz hastalığın kliniği ile HBeAg (-) mutantların ilişkisi tam olarak anlaşılamamıştır. Muhtemelen HBeAg'nin immün hedef antijen olma özelliği ile immün tolerojen olma özelliği arasındaki denge hastalığın aktivitesini belirlemektedir (Şekil 8). Hastalığın erken evrelerinde tamamen HBeAg (+) suşların varlığında immün toleranstan dolayı genellikle hastalık aktivitesi az ve transaminaz düzeyleri düşük olmaktadır. Halbuki wild tipin temizlendiği ve HBeAg (-) mutantların hakim olduğu dönemde HBeAg (+) virustaki replikasyon artışları dönemlerinde, zeminde immün tolerojen bu maddenin bulunmaması, fakat HBeAg'nin hepatositlerin yüzeyinde eksprese olması yeni bir immün saldırıya, dolayısı ile alevlenmelere neden olmaktadır. Bu saldırının arkasından HBeAg (-) virüsler var olmaya devam etmektedirler. Tamamiyle HBeAg

(-) virusların tüm popülasyona hakim olduğunda gene hastalık genellikle inaktif veya hafif transaminaz yüksekliği ile seyretmeye devam etmektedir (35).

Mutantların hastalığın tedavi cevabıyla ilişkisi de çeşitli araştırmalara konu olmuştur. İlk araştırmalar mutantların interferona cevabının daha kötü olduğunu telkin etmiştir (34). Ancak sonraki araştırmaların vardığı ortak sonuç, tedavi sonu cevap açısından mutantlarla wild tip enfeksiyonları arasında fark olmadığı yönündedir. Fakat mutant virus enfeksiyonlarında nüks oranı çok daha yüksek bulunmaktadır. Bunlara karşın hem ülkemizde, hem Uzak Doğu'da mutant virus enfeksiyonlarında kalıcı cevap oranının yüksek olduğuna dair yayınlar vardır. Bu yayınlarda mutant virusla olan enfeksiyonlarda tedavi sonu cevabın wild tiple olan enfeksiyonlardan çok daha iyi olduğu vurgulanmaktadır (1). Nüks oranı yüksek bile olsa kalıcı cevap daha iyi olmaktadır. Bütün bu veriler bir araya toplandığında muhtemelen virusun stop kodon mutasyonuna sahip olup olmamasından çok araya giren diğer faktörler (confounding factors) hastalığın kliniği ve tedavi cevabı üzerinde etkili gibi görünmektedir. Örneğin stop kodon mutantları hastalığın seyri esnasında seçilmeleri nedeniyle daha ileri yaşlarda ve daha uzun sürmüş enfeksiyonlarda tespit edilmektedir. Bunlar hastalığın prognozu ve tedavi cevabı açısından olumsuz faktörlerdir. Bunun yanında HBeAg(-) hastaların HBV DNA titresinin düşük olması ise tedavi cevabı açısından olumlu prediktif bir faktördür. Bütün bu faktörler muhtemelen mutant virus enfeksiyonları ile klinik ve tedavi cevabı arasındaki ilişkilerde rol oynayan, belki de belirleyici olan değişkenlerdir.

Precore stop kodon mutantlarıyla enfekte sirozlu hastalarda karaciğer transplantasyonu sonrası B hepatiti rekürrensi ve buna bağlı graft kaybı wild tiple enfekte olanlara göre daha fazla görülmektedir (11,125). Transplante karaciğerde görülen komplikasyonlardan biri olan fibrosing cholestatic hepatitis gelişimi, hatta bu histolojik bulgunun renal transplant alıcılarında görülmesi ile precore mutantlar arasında ilişkiler rapor edilmiştir (29).

Kronik B hepatiti seyri esnasında görülen ekstrahepatik belirtiler, örneğin cryoglobulinemia gibi, ile precore mutantları arasında ilişki olduğu da bildirilmiştir (115).

İlk tespit edildikleri zamandan itibaren, precore stop kodon mutasyonlarının Akdeniz çevresi ülkelerde ve Uzak Doğu'da daha fazla rastlandıkları dikkati çekmiştir. Bunun

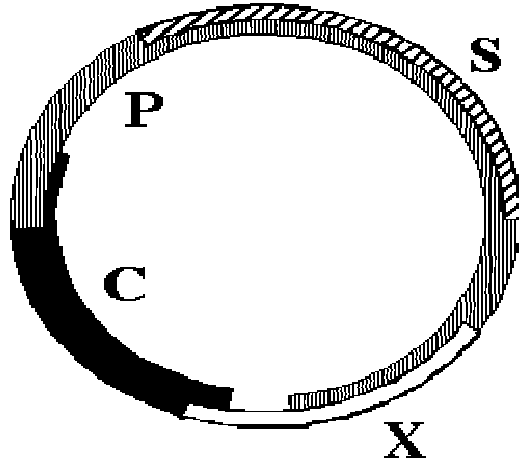
nedeni HBV'nun genotiplerinin farklı coğrafi dağılımıdır. Precore stop kodon mutasyonu ancak virus genomunun 1858inci nükleotidinde thymine bulunan genotiplerde (genotip C ve D) meydana gelebilmektedir. Halbuki aynı numaralı nükleotidde cytosine bulunduran genotip A'da C1858T mutasyonu olmadıkça hiçbir zaman stop kodon mutasyonu meydana gelmemektedir (111,153). Bunun nedeni precore bölgesinde yerleşen ve regülatör bir bölge olan epsilon encapsidation signal sequence'in sekonder yapısıdır. Epsilon encapsidation signal sequence'in sekonder yapısı çeşitli baz eşleşmeleri ile stabil hale gelmektedir. Bu sekonder yapıda 1858 ve 1896 numaralı nükleotidler karşılıklı gelmektedirler. Genotip A'da eğer stop kodon mutasyonu meydana gelirse C1858 ile G1896 arasındaki mevcut baz eşleşmesinin kırılması gerekmektedir. Bu da sekonder yapının stabilitesini bozar ve virus için avantaj kaybına neden olur. Halbuki 1858'de T bulunduran genotip C ve D'de G1896A mutasyonu iki nükleotid arasındaki baz eşleşmesini sağlayıp yapıyı daha stabil hale getirmektedir (116). Belki de virusun replikasyon kabiliyeti artmaktadır. Bu moleküler yapısal özellik dünyanın bazı bölgelerinde stop kodon mutantlarının daha sık görülmesini açıklamaktadır. Ülkemizde kronik B hepatitli replikatif hastaların %60-70'inde HBeAg negatiftir, yani büyük oranda mutant virus enfeksiyonu vardır. İsveç'ten yapılan bir yayında HBeAg(-) olduğu halde stop kodon mutasyonu bulundurmayan viruslarla olan enfeksiyonların, stop kodon mutasyonu bulunduranlardan daha ağır seyrettiği iddia edilmiştir (114). Belki de antiHBe(+) enfeksiyonların daha ağır seyrettiğine dair Batı ülkelerinden yapılan ilk yayınlarda bu gerçeğin de katkısı olmuş olabilir.

Son yıllarda kronik B hepatiti tedavisine nükleozid analoglarının, özellikle lamivudine'in girmesiyle mutant virusların lamivudine tedavisine cevaplarının farklı olup olmadığı incelenmiştir (166). Tassopoulos'un çalışmasında lamivudine ile tedavi edilen 60 HBeAg (-) hastanın %63'ünde 24 haftada tam cevap elde edilmiştir. Bir yılda hastaların %60'ında Knodell skoruna göre en az 2 puan histolojik iyileşme sağlanmıştır. Bu çalışmada, mukayese edilen HBeAg (+) grup olmamasına rağmen, elde edilen sonuçlar diğer çalışmalardaki sonuçlara benzer görünmektedir. Yani, HBeAg (-) hastaların lamivudine cevabı HBeAg(+)'lerle aynıdır.

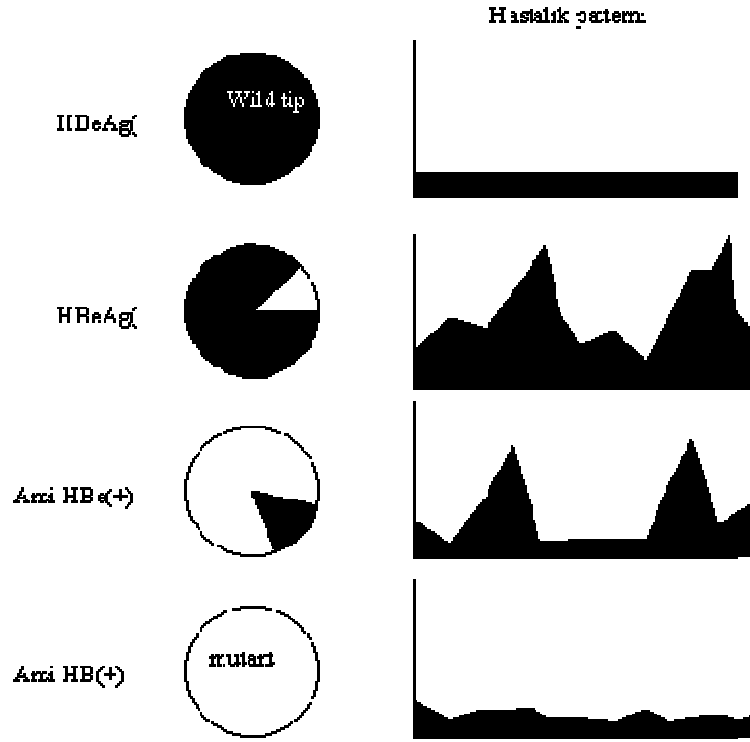
Sonuç olarak HBeAg (-) precore mutantlarının klinik açıdan asemptomatik taşıyıcılıktan fulminan hepatite kadar farklı klinik tablolarda enfeksiyonlarla birlikte

olduğu görülmektedir. Siroza ilerleme ve kanser gelişimi açısından da HBeAg(-) ve HBeAg(+) enfeksiyonlar arasında fark görünmemektedir. HBeAg(-) hastaların interferon tedavisi sonrası daha yüksek oranda nüks oldukları anlaşılmaktadır. Kısa süreli takiplere göre lamivudine tedavisine cevap açısından da HBeAg(-) ve HBeAg(+) hastalar arasında fark yoktur.

Precore/ core mutantları özellikle Akdeniz Avrupası ve Asya'da olmak üzere dünyada yaygındır. Bu mutantların dünyadaki oranı tam bilinmemektedir. Ancak Akdeniz ve Asya'da bu oranın %40-80 olduğu tahmin edilmektedir (134). Ülkemizde Yarkin ve Hafta tarafından yapılan bir çalışmada 26 hastanın 4'ünde (%15,3) precore mutant virusu bulunmuştur (194).



Şekil-7: Precore / core geni ve precore stop kodon mutasyonunun şematik görünümü.



Şekil-8: Kronik HBV taşıyıcılarında precore mutant ile klinik ilişkisi. Wild tipin veya mutantın tamamen hakim olduğu durumda stabil, inaktif hastalık söz konusu iken, mikst virus popülasyonu olduğunda alevlenmelerle giden aktif bir karaciğer hastalığı olmaktadır

2- Precore bölgesindeki diğer mutasyonlar:

Precore bölgesinde 1896ncı nükleotiddeki G®A değişimi dışında da bazı mutasyonlar rapor edilmiştir. Bunlardan en sık rastlanana 1899uncu nükleotiddeki G®A değişimidir. Bu mutasyon sıklıkla 1896 mutasyonu ile birlikte görünmektedir. İki mutasyonun bir arada bulunmasının hastalığın kliniğini ağırlaştırdığı iddia edilmişse de bu veri başka araştırmalarla desteklenmemiştir (170). Precore bölgesinde başlama kodonunda veya diğer kodonlarda çeşitli ender mutasyonlar görülmüş olmasına karşın bunların bilinen bir klinik önemi yoktur (150).

3- Core bölgesi mutasyonları:

Core geni, 183 kodondan müteşekkil olup HBcAg'nin sentezinden sorumlu bölgedir. İmmün sistem için en önemli hedef antijenlerden biridir. Bu nedenle hastalığın aktivitesi ve tedavi cevabında bu antijene ait değişikliklerin önemli olabileceği belirtilmiştir. Nitekim yapılan bazı çalışmalarda core geninde mutasyon sayısı fazla olanlarda tedavi cevabı daha kötü bulunmuştur (133). Sonraki daha geniş kapsamlı çalışmalar bu mutasyonların hastalığın prognozu veya tedavi cevabıyla ilişkisinin olmadığını ortaya koymuştur (156). Core geni mutasyonları HBeAg serokonversiyonu döneminde ve sonrasında daha fazla tespit edilmektedir (2,31). Muhtemelen immün klerens esnasında seçilmektedirler. Core geni mutasyonlarının ağır veya fulminan seyirli karaciğer hastalıkları ile korele olması da muhtemelen immün seçilme ile ilişkilidir (57). Nitekim immün tolerans fazında kalan hastalarda enfeksiyon süresi uzun olsa da core geni mutantlarının hemen hemen saptanmadığı görülmektedir (30). Bu mutasyonların CD4(+) ve sitotoksik T hücrelerinin tanıdığı epitoplarda yerleşmeleri de bu hipotezi desteklemektedir (58,110,37). Doğrudan dizi analizi yerine, cloning yöntemi ile yapılan çalışmalar hastalığın seyrinin erken dönemlerinde az oranda bulunan mutantların ileri dönemlerde, özellikle akut alevlenmeleri takiben oransal olarak arttığını göstermektedir (5).

Core geninde delesyona sahip olan viruslar defektif viruslar olup mutlaka wild tipin varlığına ve yardımına ihtiyaç gösterirler (3). Genellikle HBeAg/AntiHBe serokonversiyonundan sonra ortamdan uzaklaştırıldıkları görülmüştür. Delesyona sahip mutantların tedavi cevabıyla da ilişkisi bulunmamıştır (119).

Nadir görülen atipik serolojilerden olan anti-HBc negatif kronik B hepatitlerinden core genindeki mutasyonların sorumlu olup olamayacağı araştırılmış ancak bu tür hastalarda core proteininin immün epitoplarında önemli değişikliklere neden olacak mutasyonlara rastlanmamıştır (66).

Sonuç olarak core geninde belirgin ve hep aynı özellikte tanımlanmış bir mutasyon yoktur. Daha çok hastalığın seyri ilerledikçe ve alevlenmeler geliştikçe sayıca artan mutasyonlardan bahsedilmektedir. Mutasyonların B hücresi, CD4(+) T hücreleri ve sitotoksik T hücrelerinin tanıdığı epitoplarda yoğunlaşmaları bu mutasyonların immün sistemin tanımasından kaçmayı sağladığı (escape mutants) ve bu nedenle immün ataklar sonrasında seçildiklerini düşündürmektedir. Mutasyonların

hastalığın kliniği veya tedavi cevabı ile doğrudan bir ilişkisi yoktur. Belli bir mutasyonun olmaması ve hastalığın seyriyle ilişkileri olmaması nedeniyle core geni mutasyonlarının saptanmasının pratik bir önemi yoktur.

4- Surface geni mutasyonları:

Zarf proteinleri humoral ve hücresele immün cevap için hedef teşkil eden antijenler içerirler. Anti-HBs cevabı nötralizan bir aktiviteye sahiptir. Bu nedenle zarf proteinleri HBV profilaksisinde kullanılırlar.

Bazı zarf mutantları yüzyıllar boyunca HLA baskısıyla seçilerek HBV'nun farklı fenotiplerini meydana getirmektedirler. 122. ve 160. amino asitlerde lizin veya arjinin bulunmasına göre d/y veya w/r subtipleri ayırt edilmektedir (Şekil 9).

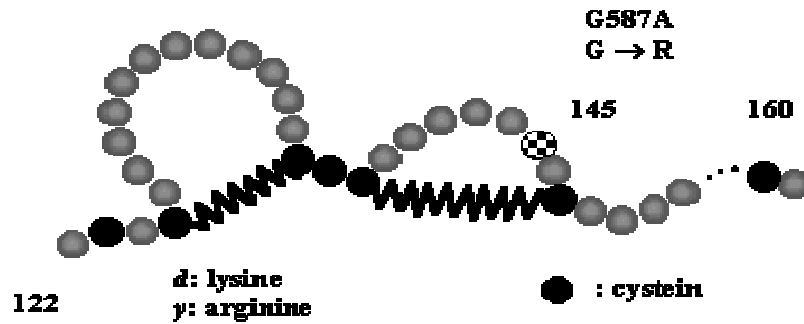
Son yıllarda bunların dışında da yüzey (zarf) proteinlerinde mutasyonlar tanımlanmaktadır. Özellikle aşılammış çocuklarda HBsAg pozitifliğinin saptanması üzerine yapılan araştırmalarda HBsAg a determinantında öncelikle 145inci amino asitte glisin@arjinin yer değiştirmesi saptanmıştır. Yani aşının geliştirdiği anti-HBs antikorunun tanınmasından kaçan bir mutasyon söz konusudur. Yüzey geni mutasyonlarının klinik açıdan önemleri şunlar olabilir.

1. Aşılammış kişilerde HBV enfeksiyonu meydana gelebilmesi: İlk olarak İtalya'da HBV profilaksisi yapılmış 44 bebekte HBV enfeksiyonu görülmesi ve bunlardan birinin kliniğinin ağır seyretmesi üzerine yapılan araştırmada bu bebekte HBsAg a determinantında 145inci amino asitte glisin@arjinin değişimi görülmüştür (40). Bu mutantın anti-HBs ile de bağlanmadığı anlaşılmıştır (187). Bu ve benzeri veriler toplandıkça ve özellikle mutant virusların infeksiyöz ve patojenik olduğu anlaşıldıkça yakın gelecekte yaygın HBV aşılamasından sonra mutant virusların sorun teşkil etmesinden korkulmuştur (138). Bu nedenle aşılara preS1, preS2 antijenlerinin de ilave edilmesi gerektiğini savunanlar olmuştur. Ya da mutant antijenlerin gelecekteki aşılara eklenmesi tartışılmıştır. Ancak günümüzde çok geniş aşılamalara rağmen toplumsal sorun teşkil edecek mutant virus enfeksiyonlarıyla karşılaşılmamıştır. Yalnız HBsAg bulduran aşılarda, preS1 ve/veya preS2 bulduran aşılarda koruyuculukları arasında da fark saptanmamaktadır.

2. Hepatit B immün globulini ile korunan karaciğer transplant alıcılarında HBV enfeksiyonu reaktivasyonu: Karaciğer transplantasyonu sonrası HBIG almasına rağmen HBV rekürrensi görülenlerde, aynı immünosupresif rejimi alan fakat HBIG almayan HBV ile enfekte renal transplant alıcılarına göre çok daha fazla HBsAg a determinantı mutasyonu görülmektedir (38). Muhtemelen koruyucu antikörlerin tamamının bağlanabildiği bölge olan a determinantı üzerinde immün bir baskı ve bu baskıdan kaçış söz konusudur. HBIG profilaksisinde B hepatiti rekürrensi görülenlerde meydana gelen mutantların HBIG ile zayıf bir bağlanma gösterdiği de saptanmıştır (151). Mutant suşlarla olan enfeksiyonlarda graft yaşam süresinin azaldığı da görülmüştür.
3. HBsAg tayini için kullanılan ELISA kitlerinin tanıyamayacağı antijenik yapıların teşekkülü ve atipik serolojik profiller: Hiçbir serolojik göstergesi pozitif olmayan kronik HBV enfeksiyonlu bir hastada yapılan HBV dizi analizi çalışmasında 22 farklı nükleotid değişikliği görülmüştür. Bunların bir kısmı S geninde toplanmıştır. Ökaryotik hücrelerde bu virusa ait preS ve S genlerinin ekspresyonunda normal antijeniteye sahip ve anti-preS ve anti-HBs ile tanımlanabilen proteinlerin sentezlendiği tespit edilmiştir. Yani, atipik serolojiden S geni mutasyonları sorumlu bulunmamıştır (104). Buna karşın HBsAg(-) HBV enfeksiyonlu bir hastada 5 çeşit ELISA kitinden yalnızca birinde HBsAg saptanabilmiştir (93). Bu hastada kodon 129'da Q (Gln) ® R (Arg) ve kodon 133'te M (Met) ® T (Thr) değişiklikleri saptanmıştır. Surface geni mutantlarının atipik serolojiden sorumlu olabileceğini, ancak her atipik serolojiden mutantların sorumlu olmadığını söylemek mümkündür. Muhtemelen virus replikasyonundaki, konakçının spesifik immün yanıtındaki değişiklikler de atipik serolojiye neden olabilmektedir. Bugün için surface genindeki mutasyonların ELISA kitleriyle tanıma sorununun ne ölçüde pratik bir sorun yaratacağı bilinmemektedir.
4. Hastalığın kliniğinde farklılıklar, örneğin fulminan seyir gibi. Pollicino ve arkadaşları her ikisi de fulminan B hepatiti gelişen anne ve oğul iki hastada izole ettikleri HBV DNA'nın tam genomik olarak dizi analizini yapmışlardır (148). Genomik yapı itibariyle aynı yapıda olan bu izolatlarda precore sekansının wild tip olmasına karşılık, preS2 başlama kodonundaki iki nükleotid

insertion'u görülmüştür. PreS2 sentezinin olmadığı bu viral suşların fulminan seyirden sorumlu olabileceği düşünülmüştür. Aynı araştırmacılar daha sonra farklı klinik görünümdeki hastalarda HBV genomunun analizini yapmışlar ve 5 fulminan hepatitli hastanın üçünde aynı mutasyonları saptamışlardır. Her hastada hastalığın başlangıcında wild tip precore dizi hakimiyeti varken daha sonra precore mutantlarda artış görülmüştür. Bu durumda precore mutantların fulminan seyrin sebebi değil sonucu olduğu görüşü desteklenirken, preS2 ekspresyonunun olmamasına neden olan mutasyonların fulminan seyirden sorumlu olabileceği kanaatine varılmıştır. Başka araştırmacılar neonatal fulminan hepatitli bir bebek ve annesinde benzeri preS2 başlama kodonu mutanı (precore'a ilaveten) saptamışlardır (161).

Sonuç olarak surface geni mutantlarının aşının ve HBIG'in korumasından kaçabilen, HBsAg negatif HBV enfeksiyonlarına yol açabilen, fulminan seyirle ilişkisi olabilen viruslar meydana getirebildiği gösterilmiş olmasına rağmen halen günlük pratikte önemleri olduğu kuşkuludur.



Şekil-9: HBsAg'nin 'a' determinanı. İmmün baskı ile bazı mutasyonların seçildiği görülmektedir.

5- Polimeraz geni mutasyonları:

Polimeraz geni HBV'nin en büyük geni olup diğer 3 genle de overlap'lar yapmaktadır. Bu nedenle gen üzerindeki değişiklik hemen hemen daima diğer genlerde de değişikliğe neden olmaktadır. Bunun için doğal olarak polimeraz mutasyonlarına çok az rastlanır. Geçmiş yıllarda polimeraz geninde bazı delesyonlar tanımlanmışsa da önemleri anlaşılmamıştır. Bugün için polimeraz geni mutasyonları dendiğinde akla nükleozid analoglarına karşı direnç sağlayan mutasyonlar gelmektedir.

Polimeraz geni içinde A'dan E'ye 5 domain ayırt edilmektedir (147). Bunlar diğer RNA'ya bağımlı polimerazlarda da mevcuttur. Her bir domain nükleotidlerin veya şablon RNA'nın bağlandığı alanlar veya katalitik alanlar olabilir. Nükleozid analoglarının viral enfeksiyonlarda yaygın kullanılmasıyla bu alanlardaki mutasyonlar daha fazla dikkati çekmektedir (13,172). Bu mutasyonların fonksiyonel önemi çoğunlukla bilinmemektedir ve in vitro çalışmalarla ilaç direncinin çalışılması gerekmektedir. Enzimin katalitik bölgesinde yer alan C domain'inde yer alan YMDD motifindeki mutasyonların lamivudine direnciyle ilişkili olduğu anlaşılmıştır. Tirozin, metionin, aspartat, aspartat dizisinden meydana gelen bu motifte ikinci amino asit olan metioninin izolösin veya valine dönüşmesi lamivudine'e karşı direnç oluşumuna neden olur. Bu mutasyonlar grup1 (M550V + L526M), grup 2 (M550I) ve grup 3 (M550I + L526M) olarak incelenmektedir (7). Bunlardan en sık rastlanana (%80) grup 1 mutasyonlar olup L526M mutasyonunun famciclovir'e direnç teşekkülünden sorumlu olması dolayısıyla famciclovire çapraz dirence neden olur. YMDD mutasyonlarının tedavinin birinci yılında %14-32, ikinci yılında (%40 oranında görüldüğü bilinmektedir. Tedavi süresi ilerledikçe dirençli mutantların görülme oranı da artmaktadır. Bu mutantların lamivudine 200-10000 kat daha dirençli olduğu in vitro çalışmalarda gösterilmiştir. Ayrıca lamivudine dirençli mutantların replikasyon kapasitesi de wild tipe nazaran yaklaşık 200 misli daha azdır (126). Mutant virusların patojenitesinin wild tipten az olup olmadığı veya bu virusların interferon tedavisine cevapları konusunda henüz bilgi yoktur.

6- X geni mutantları:

HBV X proteininin fonksiyonunun ne olduğu tam olarak bilinmemektedir. Diğer bir hepadnavirus olan duck hepatitis virus'ta X geni bulunmamaktadır. Bugün için en yaygın inanış X proteininin virusa ve konakçıya ait diğer genlerin transcription'unu etkileyebildiği yönündedir. DNA'ya bağlanma özelliği olmadığı için de bu etkisini muhtemelen diğer proteinlerle etkileşerek veya bazı sinyal iletim sistemleri ile etkileşerek yapmaktadır. HBV serolojik göstergeleri negatif olan bazı diyaliz hastaların serumlarında HBV DNA polimerazın bulunması sonucunda yapılan araştırmalarda X geninde delesyonlarla giden bazı mutasyonlara rastlanmıştır. X proteinin viral replikasyonda rolü olabileceğini gösteren deliller vardır. Bu nedenle bu gendeki mutasyonların virusun replikasyonunda ve diğer bazı genlerin ekspresyonunda değişiklikler yapması ve atipik serolojilere neden olması beklenebilir. Mesela HBsAg(-) bazı HBV enfeksiyonlarında X geni delesyonlarının bulunması atipik serolojilerle X geni mutasyonları arasında ilişki kurulmasına neden olmuştur (60). Ayrıca X geninin polimeraz ve precore genleri ile overlap yapması, HBV enhancer II'nin ve precore ve core promoterlarının X geni içerisinde yer almaları X geni bölgesindeki mutasyonların çok yönlü etkileri olabileceğini düşündürmektedir. Örneğin core promoter bölgesi mutasyonları geniş olarak ele alınmış mutasyonlardandır. HBeAg(-) bütün hastalarda precore stop kodon mutasyonunun olmaması üzerine yapılan açıklamalardan biri de bu hastalarda HBeAg ekspresyonunun azalmasına yol açan core promoter mutasyonlarıdır (139). Core promoter bölgesindeki AT tekrarlamalarından zengin bölgede yer alan iki mutasyon üzerinde durulmuştur (A1762T ve G1764A). Bu mutasyona sahip viruslarda HBeAg ekspresyonu azalırken HBcAg ekspresyonunda artma olduğu bildirilmiştir. Bu iki mutasyonun fulminan hepatitle ilişkili olduğu iddia edilmişse de (21) sonraki çalışmalar bu iddiayı doğrulamamıştır. Bu iki mutasyonun interferon tedavisine cevapla da bir ilişkisi bulunmamıştır (94).

X geni ürününün hepatokarsinogeneziste rolü olduğu kabul edilmektedir. Bazı karaciğer kanseri hücrelerinde X geni delesyonlu HBV mutantları tespit edilmiştir (82). Bunlar genellikle 128-132 kodonlar civarında frameshift'e neden olan ve 20 amino asit kısa X proteinlerinin meydana gelmesine sebep olan mutasyonlardır. HBx

proteinin apoptozisi p53'ten bağımsız bir yolla indüklediği ve hücrelerin klonal aşırı çoğalmasını azalttığı gösterilmiştir (159). Ayrıca HBe ekspresyonunun hücre siklusunun geç G1 fazını bloke edip apoptozise gidiş öncesinde de hücre bölünmesini durdurduğu gösterilmiştir. HBV X geni mutantlarının HBx'in apoptozisi indükleyici ve G1 arresti yapıcı tesirini ortadan kaldırdığı, bu şekilde hepatosellüler kanser gelişmesinin kolaylaştığı iddia edilmektedir.

HBX mutasyonlarının hepatosellüler kanserle ilişkisine dair birçok hipotezler ortaya atılmıştır. Bunlardan biri de HBx proteininin hücrenin hasarlı DNA'sına bağlanma özelliğinde olduğu, böylece DNA tamirini engellediği şeklindedir (36). Aynı çalışmada hasarlı DNA'ya bağlanan HBx'in bu DNA'yı ultraviyole ışığının kırılma yapıcı tesirine hassas hale getirdiği de iddia edilmiştir. Hepatokarsinogenezisin engellenmesi için ilerde X genini hedefleyen gen tedavilerinin gündeme gelmesi sürpriz değildir.

Sonuç olarak HBV'nun tüm genomu üzerinde pek çok mutasyon tanımlanmış ve tanımlanmaktadır. Bunlardan precore mutantları ile lamivudine dirençli mutantlar klinik olarak önem atfedilen mutantlardır. Diğer mutasyonlar hepatokarsinogenezisten fulminan hepatite kadar pek çok farklı klinik seyirden sorumlu tutulmasına rağmen, pratikte bir anlam taşıyıp taşımadıkları bilinmemektedir.

HBV TANI YÖNTEMLERİ

A) SEROLOJİK TANI:

HBV ye ait antijenlerin ve antikorların hasta serumunda saptanması enfeksiyonun özgül tanısı için yaygın kullanılan yöntemlerdir. Virusa ait HBs Ag ve HBe Ag ticari olarak bulunan birçok 'enzyme immunoassay' (EIA) ve 'radio immunoassay' kiti aracılığıyla saptanabilir. Viral HBc Ag dolaşıma dolaşıma katılmadığı ve sadece hepatositler içinde bulunduğu için serolojik olarak saptanamamaktadır. Bu antijenlere karşı gelişen antikorlar (anti-HBc IgM, total anti-HBc veya anti-HBc IgG, total anti-HBs ve anti-HBe IgG) yine ticari kitler kullanılarak saptanabilir. Bu testler; HBV enfeksiyonunun akut ve kronik dönemlerinin ayrılmasında, enfektivitenin değerlendirilmesinde, immüntenin araştırılmasında, kan ve organ vericilerinin taranmasında rutin olarak kullanılmaktadır (184,80,101,79).

HBsAg:

Akut enfeksiyonda semptomların başlamasından 3-5 hafta önce kanda saptanabilir düzeye ulaşır. İyileşmeyle sonlanan hastalık tablosunda, akut dönemde tepe düzeye ulaşır ve sonra 4-6 ay içinde yavaş yavaş azalarak saptanamayacak düzeye iner. Günümüzde HBsAg saptamak için kullanılan EIA ticari kitleri ile 0,25-0,5 ng/ml düzeyindeki HBsAg saptanabilmektedir. HBsAg nin saptanması HBV enfeksiyonu olduğunu gösterir; fakat akut ve kronik enfeksiyonu ayırt edemez. Akut enfeksiyondan sonra HBsAg nin altı aydan fazla pozitif kalması kronik enfeksiyon gelişebileceğini düşündürür. Bu hastalarda genellikle HBeAg de pozitifdir. Fulminan seyreden akut hepatitlere HBsAg kandan hızla temizlenir ve virusun üreyebileceği hepatosit kalmamış olması nedeniyle kanda saptanamayabilir. HCV ve HDV enfeksiyonlarında da HBsAg sekresyonu baskılanır ve saptanamayacak düzeylere inebilir (45). Çocuklarda HBV aşılmasını izleyerek kanda geçici olarak HBsAg pozitifliği saptanabilir. Bu durum olgunun izleminde diğer HBV göstergelerinin ortaya çıkmaması ve antijeneminin geçici olması ile ayırt edilebilir (53). Bir yayında aşya bağlı geçici antijenemi süresinin 18 güne kadar uzadığı bildirilmiştir (118).

HBeAg:

Akut enfeksiyonda HBsAg yi izleyerek pozitifleşir, genellikle akut hastalık sırasında HBsAg den önce kaybolur. HBeAg nin pozitif olması kanda virusun fazla miktarda olduğunu, aktif viral replikasyonu gösterir. HBeAg pozitif olan hastaların bulaştırıcılığı fazladır. HBeAg, HBsAg negatif iken saptanamaz. Kronikleşen HBV enfeksiyonunda HBeAg pozitifliği 8-10 haftadan uzun süre saptanır ve HBsAg ile birlikte yıllarca sürer. HBeAg nin pozitif olması kronik enfeksiyonda ağır karaciğer hastalığı gelişme riskini artırır. Enfeksiyon eskidikçe hastaların %50 sinde aktif viral replikasyon azalır ve HBeAg kaybolup, anti-HBe antikorları saptanabilir.

Anti-HBc IgM:

Akut HBV enfeksiyonu göstergesidir. Akut enfeksiyonda hastalık belirtileri ile birlikte pozitif bulunur, erken nekahat dönemde tepe düzeyine ulaşır ve 3-12 ay içinde azalarak saptanamayacak düzeye iner. Anti-HBcIgM; HBsAg pozitifliğinden 1-4 hafta sonra pozitifleşir ve bazen akut HBV enfeksiyonunun tek göstergesi olarak bulunabilir. ‘Pencere dönemi’ olarak adlandırılan bu dönemde HBsAg ve HBeAg kaybolmuş, fakat bu antijenlere karşı antikorlar henüz saptanabilir düzeye ulaşmamıştır. Bu dönemde HBV enfeksiyonunun tek göstergesi anti-HBc IgM veya onunla birlikte anti-HBc IgG antikorları olarak saptanır. Pencere dönemi ortalama 2-8 hafta kadar sürer. Bazen bir hafta kadar kısa olduğu, yada bir yıla kadar uzayabileceğide bildirilmektedir. Pencere döneminin uzadığı olgularda anti-HBc IgM antikorları kaybolarak sadece anti-HBc IgG antikorları pozitif olarak bulunabilir (53). Kronik HBV enfeksiyonunun akut alevlenme dönemlerinde ve HBeAg serokonversiyonu sırasında anti-HBc IgM antikorları tekrar saptanabilir düzeye ulaşabilirler. Kronik enfeksiyon boyunca anti-HBc IgM antikorları düşük düzeyde salgılanmaya devam etmektedir. Fakat bugün anti-HBc IgM antikorlarını saptamak için kullanılan ticari kitler, akut enfeksiyondaki yüksek düzey anti-HBc IgM antikorlarını saptayabilecek şekilde düzenlenmiştir. Daha duyarlı kitlerle kronik enfeksiyonlarda anti-HBc IgM düzeylerinde dalgalanmaların olduğu ve bununda virüse karşı immün yanıtın tetiklenmesine bağlı olduğu gösterilmiştir (47).

Anti-HBc IgG ve anti-HBc IgM :

Anti-HBc IgG, anti-HBc IgM'i izleyerek pozitifleşir ve erken nekahat döneminde tepe düzeyine ulaşır; hayat boyunca saptanabilir düzeyde kalır. Anti-HBc IgG akut enfeksiyon döneminde pozitifleştiği ve hayat boyu saptanabildiği için akut, kronik veya önceden geçirilmiş HBV enfeksiyonunun göstergesidir ve kişinin HBV ile karşılaşmış olduğunu gösterir. Bazı hastalarda HBV enfeksiyonunun kanıtı olarak sadece anti-HBc IgG saptanabilir. Diğer serolojik göstergeler olmaksızın saptanan salt anti-HBc IgG antikoru; uzamış pencere dönemini, HBsAg nin saptanamayacak kadar düşük olduğu kronik enfeksiyonları, mutant viruslarla oluşmuş ve bu nedenle ticari kitlerle HBsAg saptanamayan kronik enfeksiyonları gösterebileceği gibi pasif antikor aktarımına yada serolojik çapraz reaksiyonlara bağlı olabilir (120). Çok eskiden geçirilmiş ve iyileşmiş HBV enfeksiyonlarından sonra anti-HBs antikoru saptanamayacak düzeye inmesi sonucu da salt anti-HBc pozitif olarak bulunabilir. Böyle olgularda tek doz yapılan HBV aşısına karşı 7-10 gün içinde yüksek titrede anti-HBs yanıtın alınması, eski enfeksiyonun anımsanmasının kanıtı olarak kabul edilir (122,124). HIV enfeksiyonu gibi bağışıklık sisteminin etkilendiği hastalıklarda da anti-HBs kaybolarak tek enfeksiyon göstergesi olarak anti-HBc pozitifliği bulunabilir (25). Ayrıca HDV süperenfeksiyonunda; HBsAg yapımının baskılanması sonucu anti-HBc IgG pozitifliği, HBV enfeksiyonunun tek serolojik göstergesi olarak saptanabilir.

Anti-HBe:

HBeAg ye karşı antikorlar; erken nekahat döneminde, HBeAg nin kaybolmasını takiben hemen veya 1-2 hafta sonra ortaya çıkar. Bazı olgularda çok kısa bir dönem HBeAg ile birlikte pozitif bulunabilir (53). Anti-HBe'nin saptanması, viral replikasyonun azaldığının göstergesidir ve hastalığın iyileşmeye yöneldiğinin habercisi olarak kabul edilir. Anti-HBe antikoru hastaların üçte birinde altı ay içinde saptanamayacak düzeylere iner; diğerlerinde ise 4-6 yıl kadar devam eder. Anti-HBc ve anti-HBs antikoruyla birlikte saptanması, yakında geçirilmiş akut HBV enfeksiyonunu gösterir. Kronik HBV enfeksiyonunda anti-HBe antikoru oluşması enfektivitenin ve viral replikasyonun azaldığını gösterir. Kronik HBV

enfeksiyonunda tedavi ile HBeAg'nin kaybolması, anti-HBe antikorlarının oluşması hedeflenmektedir. Bu nedenle anti-HBe, tedavi izleminde önemli bir göstergedir.

Anti-HBs:

İyileşmeyle sonlanan akut enfeksiyon sırasında HBsAg kaybolduktan sonra kanda saptanabilir düzeye ulaşır. Virüsü nötralize edebilme yeteneğinde olan antikorlardır. Akut HBV enfeksiyonundan sonra anti-HBs antikorlarının oluşması, hastalığın iyileşme ile sonlandığını ve bağışıklığı gösterir. Akut HBV enfeksiyonu sonrası oluşan anti-HBs, anti-HBc antikorlarıyla birlikte genellikle hayat boyunca saptanabilir düzeyde kalır. Bununla birlikte % 15 olguda altı yıl içinde kaybolduğunu bildiren yayınlarda vardır (53). HBV aşılmasından sonrada anti-HBs antikorları gelişir; bu durumda anti-HBc antikorları negatiftir ve bağışıklığın izlemi için anti-HBs titrelerinin izlenmesi gerekir. Aşılamadan sonra saptanan 10 IU/L'nin üzerindeki anti-HBs düzeyleri koruyucudur. Kronik HBV enfeksiyonunda ise genellikle anti-HBs antikorları saptanamaz. Bazı olgularda HBsAg ile birlikte düşük düzeyde anti-HBs antikorları saptanabilir.

HBV enfeksiyonunun tanısında kullanılan serolojik göstergeler birlikte yorumlanarak hastanın bulunduğu dönem, enfektivite durumu ve bağışıklığı değerlendirilebilir. Tüm serolojik testlerin yorumlanmasında olduğu gibi HBV testleri yorumlanırken testlerde kullanılan antijen ve antikorların özgüllüğü, test yöntemi gibi özellikler dikkate alınmalıdır. Uyumsuz test sonuçlarında HBsAg ve HBeAg nötralizasyonuna dayanan doğrulama testleri veya direkt tanı yöntemlerine başvurulmalıdır.

Tablo-1: Serolojik testlerin yorumlanması

HBsAg	HBeAg	Anti-HBe	Anti-HBc IgM	Anti-HBc IgG	Anti-HBs	Yorum
+	-	-	-	-	-	Erken enfeksiyon dönemi
+	+	-	+	+	-	Akut enfeksiyon
-	-	-	+	+/-	-	Erken nekahat dönemi akut enfeksiyon (pencere dönemi)
-	-	+	+	+	-	Akut hastalığın nekahat dönemi
-	-	+/-	-	+	+	Geçirilmiş enfeksiyon
+	+	-	-	+	-	Kronik enfeksiyon (enfektivitesi yüksek)
+	-	+	-	+	-	Kronik enfeksiyon (enfektivitesi düşük)
-	-	+	-	+	-	Kronik enfeksiyon
-	-	-	-	+	-	Düşük düzey enfeksiyon Eski geçirilmiş enfeksiyon
-	-	-	-	-	+	Aşılama ile kazanılan bağışıklık

B) DİREKT TANI**1-Hücre kültürü:**

HBV, erişkin ve fetal hepatosit kültürlerinde üretilmektedir. Fakat rutin kullanım için uygun bir yöntem değildir, daha çok viral patogenezin araştırılması amacıyla kullanılmaktadır (79).

2-Viral antijenlerin gösterilmesi:

Serumda saptanan HBsAg ve HBeAg dışında doku örneklerinde immünoperoksidaz ve immünofloresan boyalarla HBV antijenleri gösterilebilir. Hepatositlerde HBsAg sitoplazmada, HBcAg ise genellikle çekirdekte saptanır.

Virüsün aktif replike olduğu dönemlerde HBcAg sitoplazmada da gösterilebilir. Klinik laboratuarlarda çok sayıda örneğe uygulanması ve hızlı sonuç alınması zor olan, daha çok araştırma amacıyla kullanılan yöntemlerdir.

3-Viral nükleik asitlerin gösterilmesi:

İnsitu hibridizasyon:

Biyopsi örneklerinde digoksinin ile işaretlenmiş DNA problemleri kullanılarak uygulanmaktadır.

İnsitu PCR:

Kopya sayısının az olduğu durumlarda HBV enfeksiyonunun gösterilmesi amacıyla karaciğer biyopsi örneklerinde uygulanabilir.

Serum örneklerinde sıvı hibridizasyon:

Tüm HBV genomuna komplementer DNA veya RNA problemleri kullanılarak serumda bulunan viral nükleik asitler saptanmakta ve miktarı belirlenebilmektedir. Tüm genomu komplementer olan problemler kullanıldığından mutant virüslerle oluşan enfeksiyonların tanısında ve atipik serolojik profillerin değerlendirilmesinde yararlı testlerdir. Ticari olarak bulunan kitlerle 5 pg/ml (1.5×10^6 genom/ml) - 2000 pg/ml arasındaki HBV DNA saptanabilmektedir. Yeni geliştirilen kitlerle test duyarlılığının artırıldığı ve 0.9 pg/ml düzeyine kadar indiği bildirilmektedir (78,42). Hibridizasyon yöntemi ile HBV DNA saptanmasında farklı kitlerle elde edilen sonuçlar arasında korelasyon bulunmamaktadır. Kitler arasındaki bu farklı sonuçlar hasta izleminde karmaşaya neden olmaktadır. Bu nedenle referans örnek geliştirme çalışmaları yapılmakta ve Eurohep tarafından geliştirilen iki referans plazmaya göre kitlerin kalibre edilmesi planlanmaktadır (74,135). Hibridizasyon yöntemi ile saptanan HBV DNA, aktif viral replikasyonun göstergesidir ve HBeAg pozitifliği gibi aktif karaciğer hastalığı olasılığının yüksek olduğunu gösterir. Bunun dışında antiviral tedaviye yanıtın izlenmesi amacıyla kullanılır.

Serum örneklerinde PCR:

Bu yöntemle serumdaki HBV DNA'nın amplifiye edilerek saptanması ve kantitasyonu mümkün olmuştur. Serumdaki 10 kopya/ml miktarındaki HBV DNA'yı saptayabilen bu testler; aşırı duyarlı olması nedeniyle düşük düzey HBV enfeksiyonunun tanısında ve erken tanıda yararlı olmaktadır. Serumda PCR yöntemi ile HBV DNA'nın saptanması HBsAg pozitifliğine benzer şekilde HBV enfeksiyonunun kanıtı olarak değerlendirilir. Ticari olarak bulunan kitler ile internal kantitasyon standardı kullanılarak 10^2 kopya/ml ile 10^5 kopya/ml arasındaki HBV DNA kantite edilebilmektedir. Bu yöntemin avantajı; antiviral tedavi altındaki HBeAg negatif ve hibridizasyonla HBV DNA negatif bulunan hastalarda yanıtın izlenmesine ve antiviral direncin erken saptanmasına olanak sağlamasıdır (137,99). HBsAg negatif kan donörlerinden HBV bulaşmasını engellemek amacıyla kan bankalarında da PCR yöntemi kullanılmaya başlamıştır. Havuzlanmış plazma örneklerinde PCR ile HBV DNA araştırılarak bu yolla HBV bulaşması engellenebilmektedir (141).

Mutant virüs enfeksiyonlarında tanı:

HBV DNA'nın sekans analizi ile ilgili gen bölgelerindeki mutasyonlar saptanabilmektedir. Ayrıca serolojik göstergelerde mutant virüs enfeksiyonu düşündürülebilir. Precore mutantlarında HBeAg sentezi olmadığı için bu virüsle enfekte olan kişilerde HBeAg ve anti-HBe negatif olarak bulunacaktır. Precore mutantlarının seçildiği eski HBV enfeksiyonlarında ise anti-HBe varlığına rağmen aktif viral replikasyon vardır ve serumda HBV DNA yüksek olarak bulunur. Yüzey proteini mutantlarında ise aşılama ile gelişen anti-HBs varlığına rağmen aktif viral replikasyon görülür. Bu olgularda HBsAg, 'a' determinantındaki değişiklik nedeniyle ticari kitlerle saptanamayabilir (90). Hastalarda serumda HBV DNA pozitif olarak bulunur.

Antiviral direncin saptanması:

'Line probe assay' yöntemi ile geliştirilen kitlerle özellikle tedavi sırasında hızlı mutasyon gelişen pol genindeki 528, 552, 555. kodonları etkileyen mutasyonlar hızlı olarak saptanabilmektedir (164).

SEROLOJİK TESTLER VE PCR

Hepatit B virus enfeksiyonları, korunma ve daha hassas moleküler biyolojik tanı yöntemleri geliştirilmesine rağmen halen önemini korumaktadır. Hepatit B'ye bağlı kronik enfeksiyonluların, taşıyıcılardan ayrılması ve mümkünse tedavi edilmesi gerekmektedir. (171,81). Zira kronik hepatit B enfeksiyonu sonrası hepatosellüler karsinoma ve siroz gibi öldürücü komplikasyonlar ortaya çıkabilmektedir (132)

Genellikle akut ve kronik hepatit B virüs (HBV) enfeksiyonlarında tanı ve prognoz açısından rutin olarak serolojik belirleyiciler incelenmektedir. Ancak günümüzde mutant suş enfeksiyonlarına bağlı olarak klasik serolojik tabloların görüntüsü bir hayli değişmiştir (197). Kronik hepatit B hastalarının tanısında, bu hastalardaki viral replikasyonun belirlenmesinde ve bu hastaların tedaviye yanıtlarının izlenmesinde hepatit markerleri bazen yetersiz kalabilmektedir. Bu durum özellikle mutant virüslerle oluşan enfeksiyonlarda görülmektedir. Mutant virüs enfeksiyonları klinik seyir ve tedavi dışında, hepatit enfeksiyonlarından korunmada da sorunlara neden olmaktadır. Hepatit B virüs mutantları tahmin edildiğinden daha sık görülmektedir. Enfekte bireylerde her yıl HBV'nin tek lokusunda $1,4-3,2 \times 10^5$ mutasyon olabileceği hesaplanmıştır (100). Bu nedenle HBV DNA'nın tespiti; viral replikasyonun en doğru olarak gösterilmesi, serolojik göstergelerin doğrulanması, tanı ve tedavinin takibi ve mutant virüs enfeksiyonlarının neden olduğu karışıklıkların aydınlatılması için önemlidir.

Bu noktada HBV replikasyonunun en önemli ve güvenilir belirleyicisi olduğu bildirilen HBV DNA'nın araştırılması gündeme gelmektedir (32,190,105,12).

HBV'ye ait antijenlerin veya antikorların hasta serumunda saptanmasını sağlayan serolojik testler enfeksiyonun hangi evrede olduğunu belirlemede ve enfektivitenin değerlendirilmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır (154). Atipik serolojik vakalarda tanıya gitmede, antiviral tedavinin izlenmesinde, çeşitli mutasyonların tespitinde moleküler biyoloji tekniklerinin kullanıldığı görülmektedir. Kantitatif PCR metodları yüksek sensitivitelelerinden dolayı HBV DNA seviyelerini ölçmek için de kullanılmaktadır (154,14,26,27,158,121). Özellikle kronik hepatitli

olgularda vireminin değerlendirilmesi ve farklı serolojik profillerin yorumlanmasında HBV DNA'nın yol gösterici olduğu sonucuna varılmıştır.(196)

Son zamanlarda kullanımı gittikçe yaygınlaşan real-time PCR (RT-PCR) tekniği HBV DNA'nın kantitasyonuna imkan sağlayan hızlı ve basit bir testtir. Bu metod, termocycle süresince oluşan PCR ürünün vermiş olduğu fluoresansın belirli zaman aralıklarında ölçülmesi temeline dayanır. Sonuçta, HBV yüzey geni için düzenlenmiş bir prob ve bilinen konsantrasyonları içeren referans standartlarla HBV DNA kantitasyonuna ulaşılır. Bu teknikle serumda çok az miktarda HBV DNA genom kopyası varsa bile tespit edilebilir (158,121). Tedavi sırasında HBV DNA konsantrasyonundaki artmalar ilaç dirençli varyantları akla getirir, bu nedenle tedaviyi izlemek açısından HBV DNA'nın kantitasyonu önemlidir (106). Ayrıca HBV DNA kantitasyonu invaziv cerrahi girişim yapılacak HBV taşıyıcısı kişilerde enfeksiyon riskini saptamada da kullanılabilir (33). HBV DNA'sının gösterilmesi için birçok metod geliştirilmesine rağmen günümüzde rutin olarak en sık prob hibridizasyon ve hedef çoğaltma yöntemleri kullanılmaktadır (96,169,78).

PCR YÖNTEMİ:

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemi DNA zincirinin önceden belirlenen bir bölgesini çoğaltmak için kullanılan, moleküler genetik alanında devrim niteliği taşıyan bir tekniktir. PCR, DNA içerisinde yer alan, dizisi bilinen iki segment arasındaki özgün bir bölgeyi in vitro koşullarda çoğaltmak için uygulanan tepkimelere verilen ortak bir isimdir. PCR uygulamaları için ilgili gen bölgesine ait baz dizisinin bilinmesi gereklidir. Metod basitçe tüpte nükleik asitlerin uygun koşullarda çoğaltılması esasına dayanır. Bir anlamda PCR, DNA'nın çoğaltılma yöntemidir denilebilir, çünkü bu yöntemle RNA çoğaltılmak istenirse bunun önce reverse transkriptase kullanılarak DNA kopyası çıkarılır ve PCR ile bu DNA molekülü çoğaltılır (131).

PCR üç değişik sıcaklıkta çalışan basamakların bir döngü halinde tekrarlanması ile gerçekleştirilir. İlk basamak denatürasyondur. 94 dereceye dek ısıtılan DNA'nın iki zinciri birbirinden ayrılır. İkinci basamak birleşmedir (annealing).

Sıcaklığın düşürülmesi ile, primerler çoğaltılacak bölgenin uçlarında yer alan kendilerine özgül dizileri tanıyarak hidrojen bağları kurarak bağlanırlar. Üçüncü basamak primerlerin uzamasıdır. Karışım DNA polimerazın çalıştığı optimum sıcaklığa getirildiğinde primerlere bağlanmış olan enzim molekülleri, bunların 3' ucuna, kalıp DNA ya uygun nükleotidleri ekleyerek DNA sentezi yaparlar. Bu üç basamak bir döngüyü oluşturur ve her tekrarlanışında iki primer arasında kalan özgül DNA parçasının her iki zincirinin birer kopyası çıkarılmış olur (145,23,69,155).

Çoğaltılan DNA parçaları birçok değişik yöntemle belirlenebilir. Bunlardan en yaygın olarak kullanılanı agaroz jel elektroforezidir. PCR ile elde edilen ürünler agaroz jel kullanılarak elektroforezle ayrıştırılır ve DNA zincirleri etidyum bromür ile boyanarak ultraviyole ışık kaynağında floresans vererek görünür hale getirilir. Elektroforez de PCR ürünlerinin büyüklüğü daha önceden bilinen DNA molekülleri ile karşılaştırılarak belirlenir.

REAL TIME PCR

Son yıllarda PCR reaksiyonlarında sıcaklık döngüleri sağlamak için kullanılan cihazların (thermocycler) hassas ölçüm aletleriyle birleştirilmesi, real time PCR olarak adlandırılan yeni bir yöntemin gelişmesine neden olmuştur. DNA ve RNA örnekleri bu yöntemle kalitatif ve kantitatif olarak kısa sürede analiz edilebilmekte ve çok sayıda örnek son derece az kontaminasyon riskiyle güvenle çalışılabilmektedir.

Real time PCR'da ürünlerin analizi reaksiyon sırasında yapılmaktadır. Bu yüzden, agaroz jel elektroforezi, DNA bantlarının mor ötesi ışık altında görüntülenmesi gibi işlemlerin uygulanmasına gerek kalmamaktadır. Real time PCR ürünlerinin kalitatif ve kantitatif analizlerinde, diziye özgün olmayan floresan boyalardan yada diziye özgün problemlerden yararlanılmaktadır. Böylece sonuçlar çok çabuk sürede alınmakta ve kontaminasyon riski azalarak tüm işlemler sıcaklık döngüleri başlayınca otomatik olarak devam etmektedir.

Real time PCR çoğaltılan ürünü görünür hale getirir. Görüntüleme de floresan işaretli problemler veya interkalatör boyalar kullanılır. Oluşan DNA (amplikon) ile doğru

orantılı floresan meydana gelir. Real time PCR on-line izlenebilen bir çoğaltma yöntemidir.

Real time PCR da 3 metot mevcuttur.

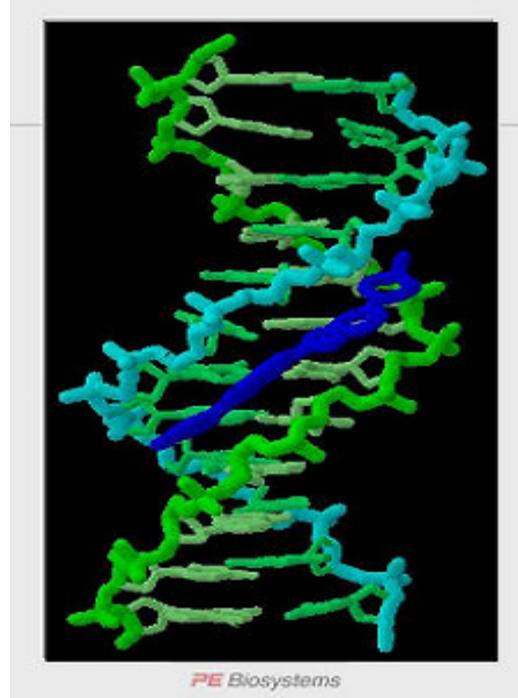
İnterkalatör boya metodu

Hidroliz prob metodu

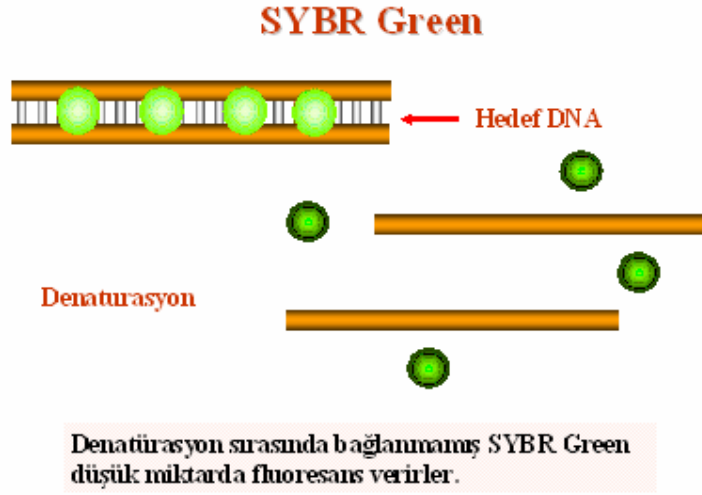
Hibridizasyon prob metodu

İnterkalatör boya metodu:

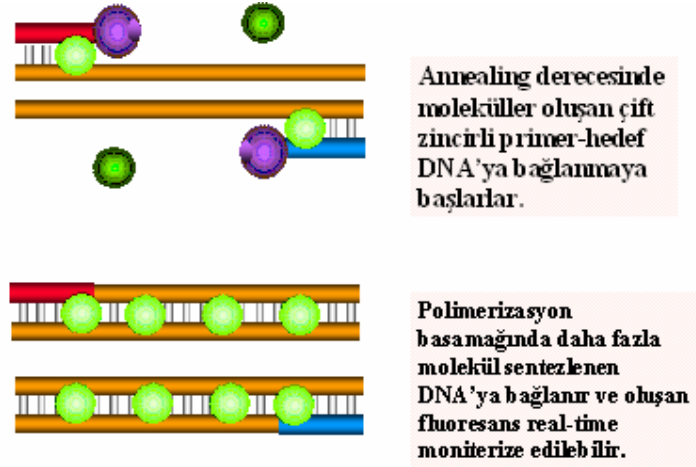
İnterkalatör boya metodunda SYBR green kullanılır. SYBR green çift zincirli DNA'nın minor oluğuna bağlanır. Spesifik değildir, maliyeti düşüktür.



Şekil-10-a



Şekil-10-b

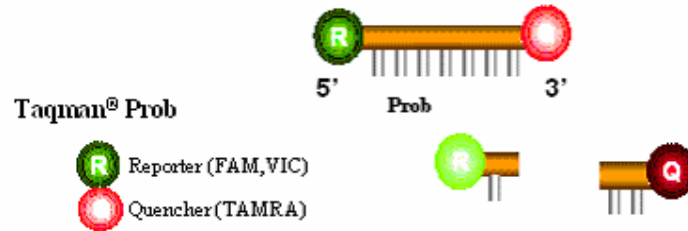


Şekil-10-c

Hidroliz prob metodu:

Bu metotta TaqMan problemleri kullanılır

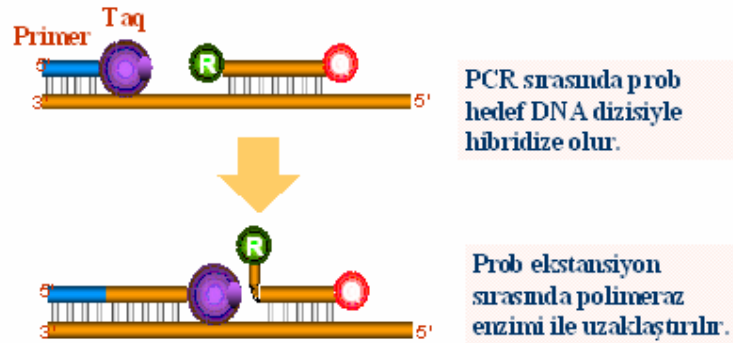
TaqMan Probun Yapısı



TaqMan Problemleri DNA polimeraz enziminin 5' nükleaz aktivitesini hidroliz için kullanılan problemlerdir. DNA polimerazın 5' nükleaz aktivitesi çift zincire spesifiktir.

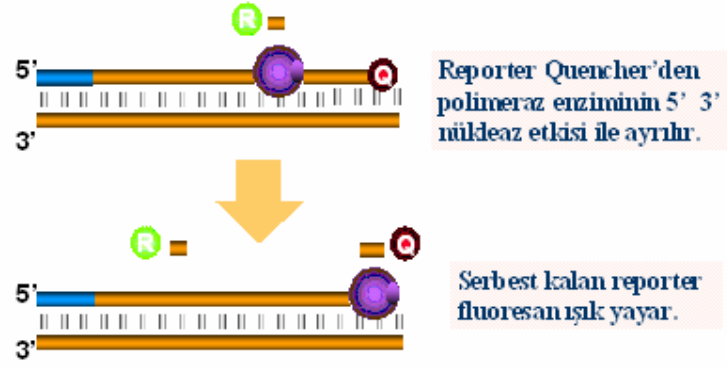
Şekil-11-a

TaqMan



Şekil-11-b

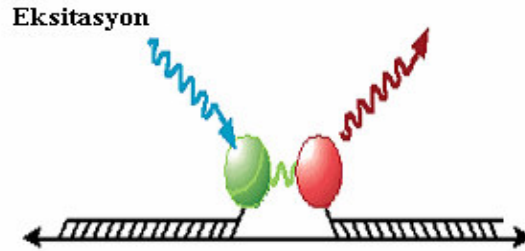
TaqMan



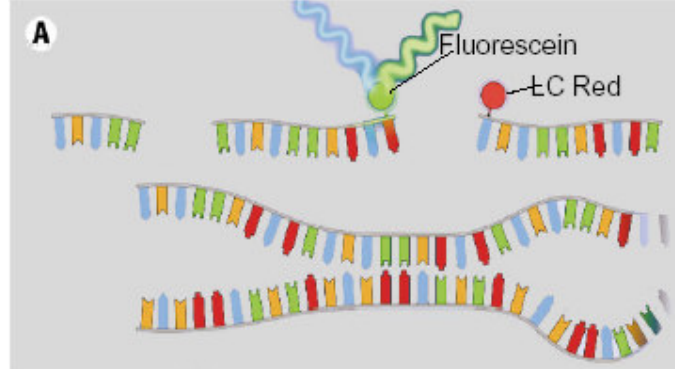
Şekil-11-c

Hibridizasyon prob metodu:

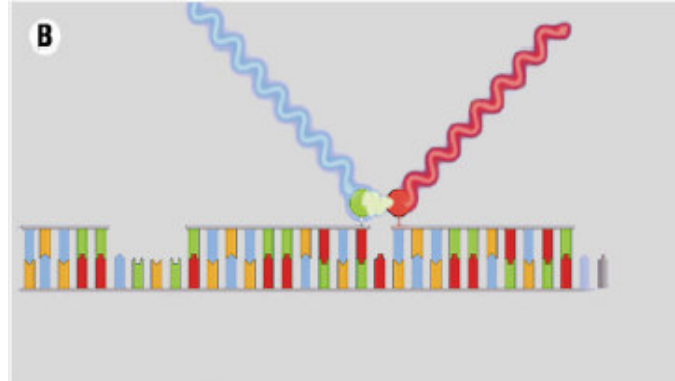
Hibridizasyon prob metodunda [FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer)] Donör fluorofor uygun dalgaboyu ile eksite edilir. Donör enerjisi akseptör fluorofora aktarılır. Akseptör fluorofor daha uzun dalga boyunda emisyon yapar.



Şekil-12-a



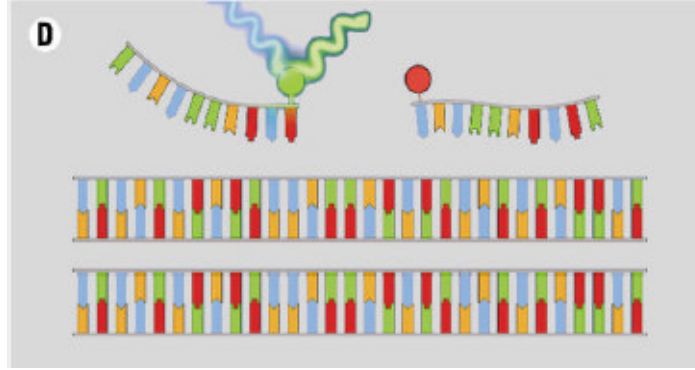
Denatürasyon basamağında hibridizasyon problemleri solüsyon içerisinde ayrı ayrı durmaktadırlar. Şekil-12-b



Annealing basamağında, problemler hedef DNA dizisine yan yana bağlanır. Birinci boyanın emisyon enerjisi ikinci boyayı eksite eder. Eksite olan ikinci boyada emisyon enerjisi yayar. Şekil-12-c



Ekstansiyon basamağında her iki prob tekrar hedef DNA dizisinden ayrılmaya başlar. Şekil-12-d



Şekil-12-e Polimerizasyon bitiminde problemler serbest hale dönerler (178).

GEREÇ ve YÖNTEM:

2002-2005 yılları arasında hastanemizin mikrobiyoloji laboratuvarına HBV DNA istemiyle 2355 hasta başvurdu. (1950'sinin hepatit markerleri var , 405'inin yok idi.) Gelen hastaların HBV DNA'ları rutin olarak çalışıldı ve sonuçları kaydedildi. Hastaların HBV DNA sonuçları verilirken, hepatit markerları ve AST-ALT değerleride kaydedildi. HBV DNA sonuçları; hepatit markerları ve AST-ALT değerleriyle birlikte kontrol edilerek yorumlandı.

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 ve Biorad I Cycler, QIAGEN) yöntemiyle çalışılmıştır. Hastalardan alınan kan serumları ayrıldıktan sonra test zamanına kadar -20 °C' de saklanmıştır. DNA ekstraksiyonu Nucleospine DNA izolasyon kiti ve QIAamp® MinElute Virus Spin kit ile hazırlanmıştır. HBV DNA kantitasyon aralığı 1×10^2 ile 3×10^8 kopya/ml serum olarak alınmıştır. 1000 kopya/ml üzeri HBV DNA seviyeleri pozitif olarak kabul edilmiştir.

İstatistiksel analiz: Veriler SPSS® 12.0 for Windows programı ile analiz edildi. Verilerin analizi için istatistiksel parametrik metot kullanıldı. Gruplar arasındaki karşılaştırmalar için Independent-Samples T test kullanıldı.

BULGULAR

Hastaları serolojik markerlarıyla incelediğimizde; 1950 vakadan 1923'ünde HBsAg sonuçları ile HBV DNA sonuçlarının birbiri ile uyumlu olduğu görüldü. 1690 HBsAg pozitif vakada HBV DNA da pozitif idi. HBsAg negatif toplam 260 hasta vardı ve vakaları incelediğimizde ise 233 HBsAg negatif vakada HBV DNA nında negatif bulunduğu görüldü. HBsAg negatif bu 260 vakanın 27' sinde (% 10,4) ise HBV DNA nın pozitif olduğu görüldü.

27 HBV DNA pozitif olgunun viral yük miktarlarına bakıldığında 1 hastada 10^8 , 1 hastada 10^7 , 1 hastada 10^5 , 8 hastada 10^4 ve 16 hastada $<10^4$ kopya/ml viral yük bulunmuştur.

HBV DNA pozitif bu 27 olgunun hepatit markerları incelendiğinde 19'unda (%70,3) anti-HBc IgG pozitifliği, 15'inde (% 55,5) anti-HBs pozitifliği, 14'ünde (%51,8) anti-HBe pozitifliği bulunmuştur. Bu 27 vakanın hiçbirinde HBeAg ve anti-HBcIgM pozitifliği saptanmamıştır.

19 anti-HBc pozitif vakanın 13'ünde anti-HBs'de pozitif, 14'ünde ise anti-HBe pozitifliği bulunmuştur. Bu 19 vaka içerisinde anti-HBc, anti-HBs ve anti-HBe'nin üçününde pozitif olduğu 10 olgu (% 52,6) bulunmuştur. 2 hastada ise sadece anti-HBc pozitifliği olup diğer tüm serolojik göstergeleri negatifti.

Anti-HBc pozitif 19 olgunun HBV DNA viral yük miktarı ortalaması alındığında elde edilen değer 4×10^4 di. Anti-HBc negatif 8 olgunun HBV DNA viral yük ortalamasının ise 9×10^6 olduğu görüldü. HBV DNA viral yük miktarı ile anti-HBc pozitifliği arasındaki ilişki istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($P < 0,0001$).

Anti-HBs pozitif 15 olgunun 10'unda anti-HBs ve anti-HBe pozitifliği birlikte bulundu. Tek başına anti-HBs pozitifliği 2 hastada görüldü.

Anti-HBs pozitif 15 olgunun HBV DNA viral yük miktarlarının ortalaması 4×10^4 iken anti-HBs negatif 12 olgunun HBV DNA viral yük miktarı ortalaması 6×10^6 bulundu. HBV DNA viral yük miktarı ile anti-HBs pozitifliği arasındaki ilişki istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($P < 0,05$).

Anti-HBe pozitif 14 olgunun HBV DNA viral yük miktarları ortalaması 5×10^4 bulunurken anti-HBe negatif 13 olgunun HBV DNA viral yük miktarı ortalaması 6×10^6 bulundu. HBV DNA viral yük miktarı ile anti-HBe arasındaki ilişkide istatistiksel olarak anlamlıydı ($P: 0,009$).

27 olgunun transaminazlarına bakıldığında 15 olgunun (%55,5) transaminazlarının yüksek, 12 olgununda normal olduğu görüldü. Transaminazları yüksek 8 olguda (%53,3) AST ve ALT'nin birlikte yüksek olduğu, 7 olguda da (%46,6) sadece ALT'nin yüksek olduğu görüldü. 15 olgunun 4'ünde (%26,6) transaminazlar hafif artmıştı (45-60 IU arasında). Bu 15 olgudan 5'inde (%33,3) transaminazlar orta derecede artmıştı (60-100) ve 15 olgunun 6'sında (%40) ise transaminazların yüksek (>100) olduğu görüldü.

Transaminazları yüksek olan bu 15 hastanın taşıdıkları viral yük miktarlarına bakıldığında HBV DNA'nın, bir hastada 10^5 , 5 hastada 10^4 ve 9 hastada 10^3 kopya/ml olduğu görüldü. Transaminazları normal 12 olgunun viral yük miktarlarına bakıldığında ise, HBV DNA'nın bir hastada 10^8 , bir hastada 10^7 , 3 hastada 10^4 , ve 7 hastada da 10^3 kopya/ml olduğu görüldü. AST ve ALT miktarlarıyla HBV DNA viral yük miktarı karşılaştırıldığında; viral yük miktarı ortalaması arttıkça transaminazların düştüğü görüldü. Transaminazlarla HBV DNA viral yük miktarları arasındaki ilişki istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($P < 0,005$).

HBsAg negatif HBV DNA pozitif 27 hasta içerisinde 6'sının tüm serolojik göstergeleri (Anti-HBs, Anti-HBe, Anti-HBc, HBeAg, HBcIgM) negatifti. Bu 6

hastada HBV DNA viral yük miktarlarına bakıldığında 1 hastanın 10^8 kopya/ml, 1 hastanın 10^7 kopya/ml, 1 hastanın 10^4 kopya/ml ve 3 hastanın da 10000 kopya/ml nin altında olduğu görüldü. Tüm serolojik göstergeleri negatif 6 hastanın transaminazları incelendiğinde, viral yük miktarı 10000 kopya/ml'nin altında olan 2 hastanın AST ve ALT değerlerinin yüksek olduğu görüldü. Diğer 10^8 , 10^7 , 10^4 , ve 10^3 kopya/ml viral yüke sahip hastaların ise AST ve ALT değerlerinin normal olduğu görüldü.

İsim	Cins	Yaş	Anti HBs	HBe Ag	Anti HBe	HBe Total	HBe IgM	HBV DNA (kopya/ml)	AST	ALT
H.K	E	34	-	-	-	+	-	2832	15	12
R.S	K	58	+	-	+	+	-	5.3×10^4	52	114
M.S	E	37	-	-	-	-	-	2079	43	68
R.D	E	38	-	-	-	-	-	6347	55	110
İ.M	E	41	+	-	-	+	-	6461	28	48
Z.M	K	39	+	-	+	+	-	1763	37	42
S.I	E	53	-	-	-	+	-	$1,0 \times 10^4$	15	33
A.Y	E	8	+	-	-	-	-	1038	26	12
T.İ	K	23	-	-	-	-	-	$6,69 \times 10^4$	15	35
F.B	K	35	-	-	-	-	-	2974	16	20
B.D	E	60	+	-	+	+	-	4136	40	75
R.S	K	30	+	-	+	+	-	$2,4 \times 10^4$	38	64
N.D	K	25	-	-	-	-	-	$1,64 \times 10^7$	25	35
B.G	E	27	+	-	-	+	-	1555	22	77
İ.Y	E	18	+	-	-	-	-	5700	23	19
E.G	E	43	+	-	+	+	-	$1,13 \times 10^5$	119	80
A.A	E	51	-	-	+	+	-	7469	18	15
Y.A	E	10	-	-	-	-	-	$5,54 \times 10^8$	16	13
M.Ç	E	31	+	-	-	+	-	1735	25	51
İ.A	E	40	-	-	+	+	-	$1,15 \times 10^4$	47	91
F.V	K	43	+	-	+	+	-	6210	15	15
H.K	E	52	-	-	+	+	-	$7,52 \times 10^4$	20	32
M.S	E	65	+	-	+	+	-	1840	738	393
M.K	E	30	+	-	+	+	-	1360	32	45
Y.K	E	20	+	-	+	+	-	$1,50 \times 10^4$	102	134
S.T	E	24	+	-	+	+	-	9950	24	40
M.M	E	66	-	-	+	+	-	$1,68 \times 10^4$	56	118

Tablo-2: HBsAg negatif HBV DNA pozitif 27 hasta

TARTIŞMA

HBV' ye ait antijenlerin veya antikörlerin hasta serumunda saptanmasını sağlayan serolojik testler enfeksiyonun değerlendirilmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Viral replikasyonun belirlenmesinde ve hastaların tedaviye yanıtlarının izlenmesinde, mutant virüslerin oluşturdukları enfeksiyonlar, pencere dönemindeki hastalar, yada kullanılan kit veya cihazla ilgili problemlerden dolayı hepatit markerları bazen yetersiz kalabilmektedir.

Hepatit markerlarının yetersiz kalması özellikle kan donörlerinde önem kazanmaktadır. Kan ve kan ürünlerinin transfüzyonu ile çok sayıda enfeksiyon etkeninin bulaşması olasıdır. Ülkemizde bağışlanan kanlar Hepatit B yüzey antijeni (HBs Ag), Hepatit C virüs antikoru (Anti HCV), Anti HIV ve sifiliz açısından taramaya tabi tutulmaktadır (24). Bugün transfüzyonu izleyen dönemde gelişen hepatitlerin %5-10'undan taramalar sırasında negatif bulunan, ancak hepatit B virüsü (HBV) içeren kanlar sorumlu tutulmaktadır (15). Donör kanlarında HBs Ag taranması için tercih edilen yöntem de enzim bağımlı immünosorbent assaydir (EIA veya ELISA). Bu yöntemlere göre daha duyarlı olan PCR yöntemi kullanılarak HBV DNA'nın saptanması burada önem kazanmaktadır.

Planlanan bu tez çalışmasının amacı; serolojik olarak HBsAg negatif olgularda da HBV DNA'nın pozitif olabileceğinin gösterilmesidir. Bu çalışmada HBsAg negatif olduğu durumlarda HBV DNA'nın pozitif olabileceği ve gizli HBV enfeksiyonuna (occult HBV) yol açabileceği gösterilmeye çalışılmıştır.

Yaptığımız çalışmada 260 HBsAg negatif vakadan 27 (%10,4) sinde HBV DNA pozitifliği saptadık. Bu hastaların 19'u erkek, 8'i ise kadındı. Yaş ortalamaları ise 37 idi. 27 HBV DNA pozitif olgunun viral yük miktarlarına bakıldığında 1 hastada 10^8 , 1 hastada 10^7 , 1 hastada 10^5 , 8 hastada 10^4 ve 16 hastada $<10^4$ kopya/ml viral yük bulunduğu görüldü. Bizim bulgularımız yine Harran üniversitesinde benzer hasta popülasyonunda çalışmış bulunan Özbilge ve ark. (142) yapmış olduğu çalışma sonuçları ile farklı çıkmıştır. Özbilge ve ark. çalışmalarında HBsAg negatif toplam 63 vakanın 12 (%19)'sinde HBV DNA pozitifliği saptamışlardır. Bu Occult DNA

insidansındaki değişiklik bizim irdelediğimiz hasta popülasyonunun (260 HBsAg negatif hasta) Özbilge ve ark.'nın çalışmış oldukları hasta grubundan (63 HBsAg negatif örnek) daha büyük ölçekte olmasına veya çalışma metodunun farklılığına bağlı olabilir. Altıdış ve ark. (9) alışmasında ise toplam 155 hasta serum örneğinde HBV DNA Hybrid Capture yöntemi ile, hepatit markerleri ise mikroelisa kitleri ile tam otomatize sistemlerde araştırılmıştır. HBV DNA testinde 10 pg/ml ve üzeri olumlu, 1-10 pg/ml arasındaki değerler ise +/- olarak değerlendirilmiştir. HBsAg negatif örneklerin yedisinde HBV DNA değerleri sınırdaki (%15.6) +/- ve yine HBsAg negatif 45 örneğin ikisinde (%4.4) HBV DNA pozitif değerlerde saptanmıştır. Bizim çalışmamızla aradaki fark, örnek sayısının az olması, ve çalışma metodlarının (bizim alışmamızda Real-time PCR ve makroelisa kullanılmasına karşın bu çalışmada Hybrid Capture ve mikroelisa kullanılması) birbirinden farklı olmasına bağlanabilir. Ancak kesin pozitiflere bakacak olursak HBV DNA pozitifliği bu çalışmaya göre (%4.4) bizim çalışmamızda daha yüksek yüzdeye (%10,4) sahiptir. Güneydoğudaki hepatit insidansının batı Anadolu'dakinden farklı olması sonuçlardaki dalgalanmanın nedeni olabilir. Minuk ve ark. (128) Kuzey Amerika'da HBsAg negatif 239 hastanın 9'unda (%3,8) HBV DNA pozitifliği saptamışlardır. Minuk ve ark. (129) Kuzey Amerika'da yaptıkları başka bir çalışmada yine occult HBV enfeksiyonunu araştırmışlar ve HBV serolojisi negatif 407 örnekten 33'ünde (%8.1) HBV DNA pozitif bulmuşlardır. Ancak Amerika'da yapılmış çalışmalarda birbirinden farklı sonuçların elde edilmesi farklı hasta gruplarında çalışılmasına bağlı olabilir. Bu çalışmalardaki gizli HBV DNA pozitifliğinin düşüklüğü zaten bu ülkelerde genel HBV enfeksiyonları sıklığının düşük olması (%2), kan ve donör kontrol sistemlerinin daha iyi çalışması olarak gösterilebilir.

Transfüzyonla ilişkili hepatit B virus (HBV) enfeksiyonlarının önlenmesi için kan vericilerinin HBV yüzey antijeni (HBsAg) açısından taranması zorunludur. Bu amaçla kan bankalarında genellikle enzim immunoassay (ELISA) yöntemi kullanılmaktadır. Ancak, bugün için %100 duyarlılığa sahip bir HBsAg-ELISA testi mevcut değildir. Dolayısıyla, düşük oranda da olsa transfüzyon sonrası HBV enfeksiyonlarına rastlanabilmektedir. HBsAg negatif donörler üzerinde yapılan değerlik çalışmalarda % 3-19 şeklinde değerlik oranlarda HBV DNA pozitifliği bildirilmiştir

(14,142). Silva ve ark. (157) Brezilya’da yaptıkları çalışmada HBsAg negatif 150 kan donörü adayından HBV DNA pozitif olan 5 (%3,3) örnek saptamışlardır. Garcia ve ark. (62) ise Meksika’da HBsAg negatif 158 gönüllü kan donörününün 13’ünde (%8,23) HBV DNA pozitifliği saptamışlardır. Güney ve ark. (70) çalışmalarında, 198 sağlıklı erkek vericiden alınıp kan bankasında ELISA ile HBsAg negatif bulunan ve hastaya verilmeye hazır durumdaki kan örneklerinde negatif sonuçların doğrulanması için, farklı bir ELISA kiti ile HBsAg ve anti-HBc parametreleri ve polimeraz zincirleme reaksiyonu (PCR) ile de HBV DNA araştırmışlardır. Tüm vericilerin kan serum örneklerinde ikinci kez yapılan ELISA testi ile de HBsAg negatif bulunmuş, buna karşın 20 vericide (%10) anti-HBc pozitifliği saptanmıştır. Anti-HBc antikoru pozitif 20 vericiden birinde ise PCR ile HBV DNA varlığı belirlenmiştir. Behzad ve ark. (22) HBsAg negatif Anti-HBc pozitif 131 kan donöründen 16’sında (%12.2) HBV DNA pozitifliği saptamışlardır. Allain JP. (6) yaptığı çalışmada transfüzyonla gerçekleşen occult HBV enfeksiyonunu (OBI) araştırmıştır ve HBsAg negatif donörlerde hepatit B core antijen (anti-HBc) yada hepatit B surface antijen antikoru (anti-HBs) varlığında yada yokluğunda HBV DNA pozitif olabildiğini göstermiştir. HBsAg negatifliğinin kaçak mutantların HBsAg testlerinde görülememesiyle olabileceğini bildirmişlerdir. Karaciğer fonksiyon testleri normal olan kişilerde de OBI bulunabileceği eklenmiştir.

Tranfözyon gibi, organ nakli, kemik iliği nakli gibi durumlarda da occult HBV enfeksiyonunun büyük risk teşkil ettiği belirtilmiştir. Hui ve ark. (88) hematopoietic stem cell (HSC) donörlerinde yaptıkları araştırmada transplantasyonu takiben oluşan HBV enfeksiyonunda occult HBV nin önemini vurgulamışlardır. 124 HBsAg negatif HSC donöründe 19 (%15,3) occult HBV enfeksiyonuna rastlanmıştır. Bunların 16 sının anti-HBc’sinin pozitif olduğu bildirilmiştir. Kannangai ve ark. (95) 19 hepatocellüler carsinoma (HCC) hastasından aldıkları örnekleri incelemişler ve HBsAg negatif 19 örneğin 3’ünde (%16) HBV DNA pozitif olarak bulmuşlardır.

Çeşitli kaynaklarda verici kanlarında anti-HBc antikolarının araştırılmasının HBsAg negatif HBV taşıyıcısı vericileri belirlemede ve HBV ye bağlı post transfüzyon hepatitinin önlenmesinde yararlı olabileceği belirtilmiştir (16,20,52). Diğer serolojik göstergeler olmaksızın saptanan salt anti-HBc IgG antikoları; uzamış

pencere dönemini, HBsAg nin saptanamayacak kadar düşük olduğu kronik enfeksiyonları, anti-HBs'nin düşük miktarlarda olması dolayısı ile saptanamadığı immünite durumlarında, mutant viruslarla oluşmuş ve bu nedenle ticari kitlerle HBsAg saptanamayan kronik enfeksiyonları gösterebileceği gibi pasif antikor aktarımına yada serolojik çapraz reaksiyonlara bağlı olabilir (120). Bizim çalışmamızda HBsAg negatif HBV DNA pozitif 27 olgunun 19'unda (%70,3) Anti-HBc antikorları pozitif bulundu. Bizim bu bulgularımız Hui ve ark. (88) yapmış oldukları çalışmada HBV DNA pozitif buldukları 19 (%15,3) örnekten 16'sının anti-HBc'sinin (%84,2) pozitif olduğu bulguları ile desteklenmektedir. Silva ve ark. (157) yaptıkları çalışmada bulunan 5 HBV DNA pozitif örnekte de anti HBc total pozitif bulunmuştur. Bütün bu çalışmalar sadece anti-HBc olumlu olgulara da dikkatle yaklaşılmasını ve HBV DNA'nın izlenmesi gerektiğini ortaya koymaktadır.

HBsAg negatif olup diğer bazı antikorları pozitif olan tablolarda daha öncede HBV DNA olumluluğu bildirilmiştir. Anti-HBs pozitif olgularda gizli HBV enfeksiyonlarına rastlanılması anti-HBs antikorlarının HBsAg-anti-HBs kompleksleri ile maskelenmesi ile açıklanmaktadır (165). Ayrıca bu tabloların immun yetmezlikli olgularda da görülebildiği bildirilmiştir (143). Çalışmamızda HBV DNA pozitif 27 olgunun 15'inde anti-HBs pozitifliği, 14'ünde anti-HBe pozitifliği bulunduğunu gördük. Hui ve ark. (88) 19 (%15,3) HBV DNA pozitif örneğin 14'ünün anti-HBs'sinin pozitif olduğunu bildirilmişlerdir. Özbilge ve ark. (142) HBsAg negatif HBV DNA pozitif 12 olgunun serolojik testlerini incelemişler ve sadece 3'ünde anti-HBe pozitifliği bulmuşlardır ve bunların ikisinde anti-HBs pozitifliği ve birinde anti-HBs negatifliği tespit etmişlerdir. Silva ve ark. (157) saptadıkları HBV DNA pozitif 5 örneğin 2'sinde anti-HBs negatif, 3'ünde ise anti-HBs nin pozitif olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmalarda da görülen anti-HBs pozitifliğinin, enfeksiyon sürecinde oluşan anti-HBs titresinin düşük olması ve yeterli koruyuculuğu sağlayamamasından kaynaklanabileceği belirtilmiştir. Behzad ve ark. (22) saptadıkları 16 (%12,2) HBV DNA pozitif örneğin 6'sında (%37,5) anti-HBs pozitif, 2'sinde de (%12,5) anti-HBe pozitifliği saptadıklarını belirtmişlerdir. Anti-HBs varlığındaki enfeksiyonu HBsAg 'a' determinantında mutasyon olabileceği ve bu mutantın anti-HBs ile bağlanamayacağı şeklinde yorumlamışlardır.

'Pencere dönemi' olarak adlandırılan dönemde HBsAg ve HBeAg kaybolmuş, fakat bu antijenlere karşı antikorlar henüz saptanabilir düzeye ulaşmamıştır. Bu dönemde HBV enfeksiyonunun tek göstergesi anti-HBc IgM veya onunla birlikte anti-HBc IgG antikorları olarak saptanır. Pencere dönemi ortalama 2-8 hafta kadar sürer. Bazen bir hafta kadar kısa olduğu, yada bir yıla kadar uzayabileceği de bildirilmektedir. Pencere döneminin uzadığı olgularda anti-HBc IgM antikorları kaybolarak sadece anti-HBc IgG antikorları pozitif olarak bulunabilir. Çalışmamızda 27 vakanın hiçbirinde HBcIgM pozitifliği bulunmadığını saptadık. Özbilge ve ark. (142) 12 olgunun hiçbirinde HBcIgM pozitifliği saptamamışlardır. Silva ve ark. (157) HBV DNA pozitif buldukları örneklerin hiçbirinde HBc IgM pozitifliğine rastlamadıklarını belirtmişlerdir. Behzad ve ark. da (22) aynı şekilde HBV DNA pozitif örneklerin hiçbirinde HBcIgM pozitif saptamamışlardır

Serumda HBV DNA'sının tespiti ve HBeAg varlığı HBV'nin replike olduğunu gösteren parametrelerdir. Bazı hastalarda HBV DNA pozitifliğine rağmen HBeAg'nin negatif olduğu saptanmıştır. Bu hastaların serumlarından izole edilen HBV DNA'sının incelenmesinde HBeAg'inin kodlandığı precore bölgesinde 28inci kodonda TGG kodonunun TAG dönüşümü gösterdiği yani triptofan kodonu yerine stop kodon meydana geldiği tespit edilmiştir. HBeAg translasyonu dudurulduğu halde virusun en önemli strüktürel proteinlerinden olan core proteini (HBcAg) sentezi eksiksiz gerçekleşir. HBeAg sentezi olmadığı halde virus canlılığını, patojenitesini ve büyük ihtimalle enfektivitesini kaybetmemektedir. Bu durumda HBeAg'nin virus için fonksiyonunun ne olduğu sorgulanmakta, ancak kesin bir cevap verilememektedir. Çalışmamızda 27 vakanın hiçbirinde HBeAg pozitifliği bulunmadığını saptadık. Yapılan diğer çalışmalara baktığımızda onların bizim çalışmamızla uyumlu olduğunu gördük. Özbilge ve ark. (142) çalışmasında HBV DNA pozitif 12 olgunun hiçbirinde HBeAg pozitifliği saptanmamıştır. Silva ve ark. da (157) HBV DNA pozitif buldukları 5 örneğin hiçbirinde HBeAg pozitifliğine rastlamadıklarını belirtmişlerdir. Yine aynı şekilde Behzad ve ark. (22) da 16 HBV DNA pozitif örneğin hiçbirinde HBeAg pozitif saptamamışlardır

Tüm markerları yönünden seronegatif ancak HBV DNA'sı pozitif bulunan kişilerin serumlarının deney hayvanlarına verilmesiyle HBV enfeksiyonu ortaya çıkmasıyla bu seronegatif kişilerde HBV DNA pozitifliğinin mutant suşlara bağlı olabileceği bildirilmiştir (168). Uchida ve ark. (176) tüm hepatit B,C,Delta belirleyicilerinin negatif olduğu ancak HBV DNA'nın saptandığı akut ve kronik hepatit B olguları bildirmişlerdir. Bu durum virusdaki X geni kodlayan bölgedeki mutasyonlar ile açıklanmıştır. Öte yandan sessiz HBV enfeksiyonları olarak adlandırılan bu durumun, pre-C defektif mutasyonları ve core geni mutasyonları ile de ortaya çıkabildiği bildirilmiştir (175). Surface geni mutantlarının atipik serolojiden sorumlu olabileceğini, ancak her atipik serolojiden mutantların sorumlu olmadığını söylemek mümkündür. Muhtemelen virus replikasyonundaki, konakçının spesifik immün yanıtındaki değişiklikler de atipik serolojiye neden olabilmektedir.

Çalışmamızda HBsAg negatif HBV DNA pozitif 27 hasta içerisinde 6'sının tüm serolojik göstergelerinin (Anti-HBs, Anti-HBe, Anti-HBc, HBeAg, HBcIgM) negatif olduğunu gördük. Tüm serolojik testleri negatif HBV DNA pozitif 6 olgunun viral yüklerine baktığımızda 2 olgunun viral yük miktarlarının düşük (1000 - 3000), 2 olgunun yüksek (3000 - 1×10^6), 2 olgununda çok yüksek ($1 \times 10^6 <$) olduğunu gördük. Bu olguların transaminazlarına bakıldığında ise 1 olgunun orta derecede yüksek (60-100), 1 olgunun çok yüksek ($100 <$) ve 4 olgunun da transaminazlarının normal olduğu görüldü. Bizim bu bulgularımıza karşılık Özbilge ve ark. yapmış olduğu çalışmada ise 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. Tüm serolojik markerları negatif olan örneklerde HBV DNA saptanması, moleküler biyoloji tekniklerinin HBV konusundaki önemini göstermiştir (14).

Hastalığın erken evrelerinde tamamen HBeAg (+) suşların varlığında immün toleranstan dolayı genellikle hastalık aktivitesi az ve transaminaz düzeyleri düşük olmaktadır. Halbuki wild tipin temizlendiği ve HBeAg (-) mutantların hakim olduğu dönemde HBeAg (+) viruslardaki replikasyon artışları dönemlerinde, zeminde immün tolerojen bu maddenin bulunmaması, fakat HBeAg'nin hepatositlerin yüzeyinde eksprese olması yeni bir immün saldırıya, dolayısı ile alevlenmelere neden olmaktadır.

Bu saldırının arkasından HBeAg (-) viruslar var olmaya devam etmektedirler. Tamamıyla HBeAg (-) virusların tüm popülasyona hakim olduğu durumda hastalık genellikle inaktif veya hafif transaminaz yüksekliği ile seyretmeye devam etmektedir. Mutantlarla enfekte hastalarda akut alevlenmeler geliştiğinde, yükselen HBV DNA titresinden çoğunlukla wild tip sorumlu tutulmuştur (117). HBeAg hepatositlerin yüzeyinde sitotoksik T hücrelerinin cevap geliştirdiği en önemli antijenik yapılarıdır. Bu antijenin olmaması virusun immün sistemden kaçmasına ve enfeksiyonun devamlılığına neden olmaktadır. Çalışmamızda incelediğimiz 27 HBV DNA pozitif vakanın viral yük miktarlarına baktığımızda 9 olgunun viral yük miktarlarının düşük (1000 - 3000), 16 olgunun yüksek (3000 - 1×10^6), 2 olgununda çok yüksek ($1 \times 10^6 <$) olduğu görüldü. Özbilge ve ark. (142) çalışmasında HBsAg negatif HBV DNA pozitif 12 olgunun 11' inin düşük viral yüke sahip olduğu belirlenmiştir. Silva ve ark. (157) çalışmasında buldukları HBV DNA pozitif olan 5 (%3,3) örneğin viral yük miktarlarının 1000 copy/ml altında olduğu belirtilmiştir. Minuk ve ark. nın (128) hemodiyaliz hastalarında HBV DNA pozitif buldukları 9 örneğin viral yük miktarlarının ise 10^2 - 10^4 kopya/ml arasında olduğu bildirilmiştir. Minuk ve ark. nın (129) başka bir çalışmada saptadıkları 33 HBV DNA pozitif örneğin viral yük ortalaması 10^5 kopya/ml'nin altında bulunmuştur. Bizim çalışmamızda HBV DNA pozitif örneklerin içinde viral yük miktarları yüksek olanların bulunması diğer çalışmalara göre örnek sayımızın daha fazla olmasından kaynaklanıyor olabilir. Daha önce belirttiğimiz gibi örneklerin alındığı zaman eğer HBeAg (-) mutantların hakim olduğu ve HBeAg (+) virüslerdeki replikasyon artışlarının başladığı döneme rastlanmışsa buda alevlenmelere ve HBV DNA titresindeki artışa neden olmuş olabilir.

Bu bulgular eşliğinde bizce HBsAg negatif olgularda da HBV enfeksiyonu oluşabilmesi özellikle transfüzyon sırasında büyük önem taşımaktadır. Yapılan çalışmalardaki %3-19 oranında bulunan ve bizim çalışmamızda elde ettiğimiz %10,4 HBV DNA pozitifliğine dikkat çekerek bu konudaki önlemlerin ve tarama metodlarının artırılması gerektiğini düşünüyoruz. HBsAg ELISA tarama testlerinin transfüzyonla ilişkili HBV enfeksiyonlarını tamamen önleyemediği, bu nedenle vericilerin taranmasında HBsAg'nin yanı sıra HBV ile karşılaşmayı saptayabilen

anti-HBc antikor testleri ve HBV DNA testlerinin uygulanmasının transfüzyon sonrası hepatit B gelişme riskini en aza indireceğini düşünmekteyiz.

Kan ünitelerinde güvenliği artırmak için nükleik asit amplifikasyon tekniği (NAT) birçok gelişmiş ülke tarafından, havuzlanmış plazma örnekleri ve tek tek donörlerde HCV ve HIV taranması için kullanılmaya başlanmıştır. HCV ve HIV için NAT uygulamasına dair uluslar arası bir konsey mevcut olmasına karşın bazı Avrupa ülkelerinde HBV NAT taranması, maliyetin yüksekliği nedeniyle uygulanması hala tartışmalıdır (188). Bazı kan bankalarında da HBsAg negatif kan donörlerinden HBV bulaşmasını engellemek amacıyla PCR yöntemi kullanılmaya başlanmıştır. Havuzlanmış plazma örneklerinde PCR ile HBV DNA araştırılarak bu yolla HBV'nin bulaşması engellenebilmektedir (141).

Sonuç olarak moleküler yöntemlerin ilerlemesiyle birlikte özellikle mutant virüslere bağlı olarak oluşan karışık serolojik profiller nedeniyle, hepatit B'nin kesin göstergesi HBV DNA'dır. Bu yüzden hepatit B'li hastalarda tanı ve tedavinin izlenmesinde serolojik markerlerle birlikte yüksek sensitiviteye sahip olan HBV DNA'nın kullanılması ile kesin sonuç elde edileceği ve transfüzyon sonrası hepatitlerinin de en aza indirileceği kanısındayız.

KAYNAKLAR:

1. Aikawa T, Kanai K, Kako M, Kawasaki T, Hino K, Iwabuchi S, Tsubouchi H, Takehira Y, Tsuda F, Okamoto H, et al. Interferon-alpha 2a for chronic hepatitis B with e antigen or antibody:comparable antiviral effects on wild-type virus and precore mutant. *J Viral Hepat* 1995; 2: 243-250.
2. Akarca US, Lok AS. Naturally occurring hepatitis B virus core gene mutations. *Hepatology* 1995; 22: 50-60.
3. Akarca US, Lok AS. Naturally occurring core-gene-defective hepatitis B viruses. *J Gen Virol* 1995; 76: 1821765-770. -1826.
4. Akarca US. Viral Hepatitle Savaşım Derneği. http://www.vhsd.org/slayt_seti/hepatit_b_05.htm
5. Alexopoulou A, Karayiannis P, Hadziyannis SJ, Aiba N, Thomas HC. Emergence and selection of HBV variants in an anti-HBe positive patient persistently infected with quasi-species. *J Hepatol* 1997; 26: 748-753.
6. Allain J P. Occult Hepatitis B virus infection: implications in transfusion. *Vox Sanguinis*, February 2004; 86(2):83-91.
7. Allen MI, Deslauriers M, Andrews CW, Tipples GA, Walters KA, Tyrrell DL, Brown N, Condreay LD. Identification and characterisation of mutations in hepatitis B virus resistant to lamivudine. *Hepatology* 1998; 27: 1670-1677.
8. Alper CA, Kruskall MS, Marcus Bagley D et al. Genetic prediction of non response to hepatitis B vaccine. *New England J Med* 1989 14;7708-12.
9. Altıdış M. Hepatit B virus (HBV) serolojik belirleyicileri ile HBV DNA'nın varlığının karşılaştırılması. *İnfeksiyon Dergisi*. 2002; 16(2): 141-145
10. André FE, Path FRC. Summary of safety and efficacy on a yeast derived hepatitis B vaccine. *Am J Med* 1989;17:172-80.
11. Angus PW, Locarnini SA, McCaughan GW, Jones RM, McMillan JS, Bowden DS. Hepatitis B virus precore mutant infection is associated with severe recurrent disease after liver transplantation. *Hepatology* 1995; 21: 14-18.

12. Aspinall S, Steele AD, Peenze I, Mphahlele MJ. Detection and quantitation of hepatitis B virus DNA : Comparison of two commercial hybridization assays with polymerase chain reaction. *J Viral Hepatitis* 1995; 2, 107-11
13. Aye TT, Bartholomeusz A, Shaw T, Bowden S, Breschkin A, McMillan J, Angus P, Locarnini S. Hepatitis B virus polymerase mutations during antiviral therapy in a patient following liver transplantation. *J Hepatol* 1997;26:1148-1153.
14. Badur S. Hepatit B virusu. In: Aafidan A, Badur S, Turkoğlu S. İnfeksiyon hastalıklarının laboratuvar tanısında moleküler yntemler. M. G. G. AS matbaası. İstanbul, 2002, ss155-160
15. Badur S. Non-A, Non-B hepatiti virusları, *Klimik derg* 1988;1: 20 .
16. Badur S. Posttransfüzyon hepatit sorunu. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi* 1991; 21: 234.
17. Bahn A, Hilbert K, Martine U, Westedt J, von Weizsacker F, Wirth S. Selection 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.
18. Balık İ: Hepatit B Epidemiyolojisi. ‘Kılıçturgay K (ark), *Viral Hepatit ’94, I. Baskı’ Kitabında Viral Hepatitle Savaşım Derneği, İstanbul, 1994, s 91*
19. Balık İ. Akut Viral Hepatitler, Hepatit B. *Türk İnfeksiyon Web Sitesi* [http://www.infeksiyon.org/detail.asp?ctg= 12&Article=197](http://www.infeksiyon.org/detail.asp?ctg=12&Article=197)
20. Barbara JAJ. Hepatitis B: Old Virus, new problems. The congress of international Society of Blood Transfusion.1994; 3-8 July, Amsterdam.
21. Baumert TF, Rogers SA, Hasegawa K, Liang TJ. Two core promotor mutations identified in a hepatitis B virus strain associated with fulminant hepatitis result in enhanced viral replication. *J Clin Invest* 1996; 98: 2268-2276.
22. Behzad-Behbahani A, Mafi-Nejad A, Tabei SZ, Lankarani KB, Rashidi M, Rasouli M, Pourabbas B, Torab A, Salah AR. Indication of Anti-HBc Antibody Screening and HBV-DNA Detection in Diagnosing Latent Hepatitis B Virus Infection. *Iran J Med Sci* March 2005; Vol 30, No 1
23. Bej AK, Mahbubani MH, Atlas RM. Amplification of nucleic acids by polymerase chain reaction (PCR) and other methods and their applications. 1991, *Crit Rev Biochem Mol Biol* 26: 301-334.

24. Benzoni NA, Damla, Metodoloji, Kan merkezleri ve transfüzyon derneği 2000; 35: 13-15.
25. Biggar RJ, Goedert JJ, Hoofnagle J. Accelerated loss of antibody to hepatitis B surface antigen among immunodeficient homosexual men infected with HIV. *N Engl J Med* 1987; 316:630-1.
26. Bilgiç A, Özacar T. Hepatit B ve D virüsleri. Ustaçelebi Ş. Temel ve klinik mikrobiyoloji. Güneş kitabevi, Ankara, 1999,ss 871-878
27. 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
28. Boag F. Hepatitis B: heterosexual transmission and vaccination strategies. *Int J STD & AIDS* 1991; 2: 318-324.
29. Booth JC, Goldin RD, Brown JL, Karayiannis P, Thomas HC. Fibrosing cholestatic hepatitis in a renal transplant recipient associated with the hepatitis B virus precore mutant. *J Hepatol* 1995; 22: 500-503.
30. Bozkaya H, Akarca US, Ayola B, Lok AS. High degree of conservation in the hepatitis B virus core gene during the immune tolerant phase in perinatally acquired chronic hepatitis B virus infection. *J Hepatol* 1997; 26: 508-516.
31. Bozkaya H, Ayola B, Lok AS. High rate of mutations in the hepatitis B core gene during the immune clearance phase of chronic hepatitis B virus infection. *Hepatology* 1996; 24: 32-37.
32. Brechot C, Scotto J, Charnay P, et al. Detection of hepatitis B virus DNA in liver and serum a direct appraisal of chronic carrier state. *Lancet* 1981, 10:765-7.
33. Brechtbuehl K, Whalle SA, Dusheiko GM, Saunders NA. A rapid real time quantitative polymerase chain reaction for hepatitis B virus *Journal of Virol Methods* 2001; 93: 105-113 .
34. Brunetto MR, Giarin M, Saracco G, Oliveri F, Calvo P, Capra G, Randone A, Abate ML, Manzini P, Capalbo M, et al. Hepatitis B virus unable to secrete e antigen and response to interferon in chronic hepatitis B. *Gastroenterology* 1993; 105: 845-850.
35. Brunetto MR, Rodriguez UA, Bonino F. Hepatitis B virus mutants. *Intervirology* 1999; 42: 69-80.

36. Capovilla A, Carmona S, Arbuthnot P. Hepatitis B virus X-protein binds damaged DNA and sensitizes liver cells to ultraviolet irradiation. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 232: 255-260.
37. Carman WF, Boner W, Fattovich G, Colman K, Dornan ES, Thursz M, Hadziyannis S. Hepatitis B virus core protein mutations are concentrated in B cell epitopes in progressive disease and in T helper cell epitopes during clinical remission. *J Infect Dis* 1997; 175: 1093-1100.
38. Carman WF, Trautwein C, van Deursen FJ, Colman K, Dornan E, McIntyre G, Waters J, Kliem V, Muller R, Thomas HC, Manns MP. Hepatitis B virus envelope variation after transplantation with and without hepatitis B immune globulin prophylaxis. *Hepatology* 1996; 24: 489-493.
39. Carman WF, Zanetti AR, Karayiannis P et al. Vaccine induced escape mutant of hepatitis B virus. *Lancet* 1990;336:325-9.
40. Carman WF, Zanetti AR, Karayiannis P, Waters J, Manzillo G, Tanzi E, Zuckerman AJ, Thomas HC. Vaccine-induced escape mutant of hepatitis B virus. *Lancet* 1990; 336: 325-329.
41. Chedid MG, Deulofeu H, Yunis DE et al. Defect in Th1-like cells of nonresponders to hepatitis B vaccine. *Hum Immunol* 1997;58:422-51.
42. Chen T, Luk JM, Cheung ST, Yu WC, Fan ST. Evaluation of quantitative PCR and branched-chain DNA assay for detection of hepatitis B virus DNA in sera from hepatocellular carcinoma and liver transplant patients. *J Clin Microbiol* 2000; 38(5): 1977-80.
43. Chiron JP, Coursaget P, Yvonnet B et al. Simultaneous administration of hepatitis B and diphtheria/tetanus/polio vaccines. *Lancet* 1984;1:623-4.
44. Chotard J, Inskip HM, Hall AJ et al. The Gambia intervention study: Follow up of a cohort of children vaccinated against hepatitis B. *J Infect Dis* 1992;166:764-8.
45. Chu CM, Yeh CT, Liaw YF. Low-level viremia and intracellular expression of hepatitis B surface antigen (HBsAg) in HBsAg carriers with concurrent hepatitis C virus infection. *J Clin Microbiol* 1998; 36(7):2084-6.
46. Coberly JS, Townsend T, Repke J et al. Suboptimal response following intradermal hepatitis B vaccine in infants. *Vaccine* 1994;12:984-7.

47. Colloredo G, Bellati G, Sonzogni A, et al. Semiquantitative assessment of IgM antibody to hepatitis B core antigen and prediction of the severity of chronic hepatitis B. *J Viral Hepatit* 1999; 6: 429-34.
48. Coursaget P, Yvonnet B, Chotard J et al. Seven year study of hepatitis B vaccine efficacy in infants from an endemic area (Senegal) *Lancet* 1986; 2: 1143-45.
49. Craven De, Awdeh ZL, Kunches LM et al. Non responsiveness to hepatitis B vaccine in health care workers: Results of revaccination and genetic typings. *Ann Intern Med* 1986; 105: 356-60.
50. Çullu F. Çocukluk çağında A, B, C Hepatitleri B8-1
51. Davison F, Alexandre GJM, Trowbridge R et al. Detection of hepatitis B virus DNA in spermatozoa urine, saliva and leucocytes of chronic HBs Ag carriers: lack of relationship with serum markers of replication. *J Hepatol* 1987; 4: 37-44.
52. Dawson GJ, Lesniewski RR, Stewart JL, Boardway KM, Guitierrez RA, Pandy L et al. Detection of antibodies to hepatitis C virus in U.S blood donors. *J. Clin Microbiol* 1991; 29: 551.
53. Decker RH. Diagnosis .In: Zuckerman AJ, Thomas HC (eds). *Viral Hepatitis- scientific basis and clinical management*. London: Churchill Livingstone; 1993: 165-84.
54. Di Bisceglie A, Hoofnagle JH, ACG Committe. Antiviral therapy of chronic viral hepatitis. *Am J Gastroenterology*, 1990; 85: 650-4.
55. Dolar M.E. Hepatit B Enfeksiyonu ve korunma. Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları ve Gastroenteroloji Bilim Dalı -BURSA
56. Dumann H, Meuer SC, Kohler H. Uremic serum inhibits monocyte dependent, but not interleukin 2 dependent steps of T cell proliferation. *Nephron* 1990; 56: 162-5.
57. Ehata T, Omata M, Chuang WL, Yokosuka O, Ito Y, Hosoda K, Ohto M. Mutations in core nucleotide sequence of hepatitis B virus correlate with fulminant and severe hepatitis. *J Clin Invest* 1993; 91: 1206-1213.
58. Ehata T, Omata M, Yokosuka O, Hosoda K, Ohto M. Variations in codons 84-101 in the core nucleotide sequence correlate with hepatocellular injury in chronic hepatitis B virus infection. *J Clin Invest* 1992; 89: 332-338.
59. Erlich HA, Gelfand D, H.Sninsky JJ. Recent advances in the polymerase chain reaction. *Science* 1991; 252: 1643-1645.

60. Feitelson MA, Duan LX, Guo J, Sun B, Woo J, Steensma K, Horiike N, Blumberg BS. X region deletion variants of hepatitis B virus in surface antigen-negative infections and non-A, non-B hepatitis. *J Infect Dis* 1995; 172: 713-722.
61. Friedt M, Gerner P, Lausch E et al. Mutations in the basic core promoter and the precore region of hepatitis B virus and their selection in children with fulminant and chronic hepatitis B. *Hepatology* 1999; 29:1252-8.
62. Garcia BM -Montalvo , Farfan JA -Ale , Acosta KY -Viana , Puerto FI -Manzano . Hepatitis B virus DNA in blood donors with anti-HBc as a possible indicator of active hepatitis B virus infection in Yucatan, Mexico. *Transfus Med.* 2005 Oct;15(5):371-8.
63. Giammanco G, Li Volti S, Mauro L et al. Immune response to simultaneous administration of recombinant DNA hepatitis B vaccine and multiple compulsory vaccines in infancy. *Vaccine* 1991;9:747-50
64. Gianotti F. Papular acrodermatitis of childhood:an Australia antigen disease. *Arch Dis Child* 1973;48:794.
65. Gomes SA, Yoshida CP, Niel C. Detection of hepatitis B virus DNA in hepatitis B surface antigen-negative serum by polymerase chain reaction: evaluation of different primer pairs and conditions. *Acta Virol* 1996; 40:133-8.
66. Gotoh K, Mima S, Uchida T, Shikata T, Yoshizawa K, Irie M, Mizui M. Nucleotide sequence of hepatitis B virus isolated from subjects without serum anti-hepatitis B core antibody. *J Med Virol* 1995; 46: 201-206.
67. Greenberg DP. Pediatric experience with recombinant hepatitis B vaccines and relevant safety and immunogenicity studies. *Pediatr Infect Dis J* 1993;12:438-45.
68. Grotto I, Mandel Y, Ephros M et al. Major adverse reactions to yeast derived hepatitis B vaccines. *Vaccine* 1998; 16:329-44.
69. Gust ID. Epidemiology of hepatitis B infection in the Western Pacific and South East Asia. *Gut.* 1996;38(suppl 2):S18-S23. [PubMed]
70. Güney Ç, Avcı İY, Yapar M, Başustaoglu AC, Kubar A. Kan vericilerin serumlarında saptanan HBsAg negatifliğinin doğrulanması *Mikrobiyoloji Bült.* 2001; 35(3): 459-463
71. Hadler SC, Alcalá de Monson M, Lugo DR et al. Effect of timing of hepatitis B vaccine in Yuopa Indians. *Vaccine* 1989;7:106-110.

72. Hallauer J. VHPB: summary of strategies and recommendations. *Vaccine* 1995;13:S61-63.
73. Hatashi N, Mita E. Involvement of Fas system-mediated apoptosis in pathogenesis of viral hepatitis. *J Viral Hepat* 1999; 6: 357-65.
74. Heermann K-H, Gerlich WH, Chudy M, Schaefer S, Thomssen R, The Eurohep Pathobiology Group. Quantitative detection of hepatitis B virus DNA in two international reference plasma preparations. *J Clin Microbiology* 1999; 37(1): 68-73.
75. Hepatit B hastalarının sayısı: <http://www.hepatit.gen.tr/>
76. Hepatit B : [http://www.hepatit.gen.tr/-sorulan.\(GSK\)](http://www.hepatit.gen.tr/-sorulan.(GSK))
77. Hepatitis B: World Health Organization Fact Sheet 204. : World Health Organization; [2000]. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204/en/>
78. Ho SKN, Chan TM, Cheng IKP, Lai KN. Comparison of the second-generation Digene Hybrid Capture Assay with the Branched-DNA Assay for measurement of hepatitis B virus DNA in serum. *J Clin Microbiol* 1999; 37(8): 2461-2465.
79. Hodinka RL. Laboratory diagnosis of viral hepatitis. In: Specter S *Viral Hepatitis-Diagnosis, Therapy, and prevention*. New Jersey: Humana Pres; 1999:193.
80. Hollinger FB. Hepatitis B virus. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM (eds). *Fields Virology*. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers; 1996:2738.
81. Hoofnagle JH. α -Interferon therapy of chronic hepatitis B. *J Hepatol* 1990; 11:5100-5107.
82. Hsia CC, Nakashima Y, Tabor E. Deletion mutants of the hepatitis B virus X gene in human hepatocellular carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 241: 726-729.
83. Hsu HY, Chang MH, Ho HN et al. Association of HLA -DR-14-DR52 with low responsiveness to hepatitis B vaccine in Chinese residents in Taiwan. *Vaccine* 1993;11:1437-40.
84. Hsu HY, Chang MH, Hsieh KH et al. Cellular immune response to HBc Ag in mother-to-infant transmission of hepatitis B virus. *Hepatology* 1992;15:770-6.
85. Hsu HY, Chang MH, Liaw SH et al. Changes of hepatitis B surface antigen variants in carrier children before and after universal vaccination in Taiwan. *Hepatology* 1999;30: 1312-7.

86. Hsu SC, Chang MH, Ni YS et al. Horizontal transmission of hepatitis B in children. *J Ped Gastroenterol Nutr* 1993;16:66-9.
87. Huang LM, Chiang MH, Hsu HY et al. Long-term immune response to hepatitis B vaccination and response to booster in children born to mothers with hepatitis B e antigen. *Hepatology* 1999; 29:954-9.
88. Hui CK, Sun J, Au WY, Lie AK, Yueng YH, Zhang HY, Lee NP, Hou JL, Liang R, Lau GK. Occult hepatitis B virus infection in hematopoietic stem cell donors in a hepatitis B virus endemic area. *Hepatology*. Jun 2005, 42 (6): 813-9.
89. Ip H MH, Lelie PN, Wong VCW et al. Prevention of hepatitis B virus carrier state according to maternal serum levels of HBV DNA *Lancet* 1989;1:406-10.
90. Ireland JH, O'Donnell B, Basuni AA, et al. Reactivity of 13 in vitro expressed hepatitis B surface antigen variants in 7 commercial diagnostic assay. *Hepatology* 2000; 31(5): 1176-82
91. Jenison SA, Lemon SM, Baker LN et al. Quantitative analysis of hepatitis B virus infection DNA in saliva and semen of chronically infected homosexual men. *J Infect Dis* 1987;156: 299-307.
92. Jilg WJ, Schmidt M, Deinhardt F. Vaccination against hepatitis B: Comparison of three different vaccination schedules. *J Infect Dis* 1989;7:106-10.
93. Jongerius JM, Wester M, Cuypers HT, van Oostendorp WR, Lelie PN, van der Poel CL, van Leeuwen EF. New hepatitis B virus mutant form in a blood donor that is undetectable in several hepatitis B surface antigen screening assays. *Transfusion* 1998; 38: 56-59.
94. Kanai K, Kako M, Aikawa T, Hino K, Tsubouchi H, Takehira Y, Iwabuchi S, Kawasaki T, Tsuda F, Okamoto H, Miyakawa Y, Mayumi M. Core promoter mutations of hepatitis B virus for the response to interferon in e antigen-positive chronic hepatitis B. *Am J Gastroenterol* 1996; 91: 2150-2156.
95. Kannangai R, Molmenti E, Arrazola L, Klein A, Choti M, Thomas DL and Torbenson M. Occult hepatitis B viral DNA in liver carcinomas from a region with a low prevalence of chronic hepatitis B infection. *Journal of Viral Hepatitis*. July 2004; 11 :297.

96. Kaneko S, Feinstone SM, Miller RH. Rapid and Sensitive Method for the Detection of Serum Hepatitis B Virus DNA Using the Polymerase Chain Reaction Technique. *J Clin Microbiol* 1989; 27: 1930-1933.
97. Karaciğer ve Hepatit Hastalığı www.gercek.biz/forum/forum_posts.asp?TID=496&PN=1
98. Karasawa T, Aizawa Y, Zeniya M, Kuramoto A, Shirasawa T, Toda G. Genetic heterogeneity in the precore region of hepatitis B virus in hepatitis B e antigen-negative chronic hepatitis B patients: spontaneous seroconversion and interferon-induced seroconversion. *J Med Virol* 1995; 45: 373-380.
99. Kessler HH, Preininger S, Stelzl E, et al. Identification of different states of hepatitis B virus infection with a quantitative PCR assay. *Clin Diagn Lab Immunol* 2000; 7(2): 298-300.
100. Kıyan M. HBV İnfeksiyonu, Viroloji, Viral Hepatit 98 (Ed: Kılıçturgay K), *Viral Hepatit Savaşım Derneği*, 1998: 66-93.
101. Kidd-Ljunggren K. Variability in hepatitis B virus DNA: Phylogenetic, epidemiological and clinical implications. *Scand J Infect Dis* 1996; 28: 111-6.
102. Koziel MJ. Cytokines in viral hepatitis. *Sem Liver Disease* 1999; 19(2): 157-69.
103. Koziel MJ, Immunology of viral hepatitis. *Am J Med* 1996; 100: 98-109.
104. Kremsdorf D, Garreau F, Duclos H, Thiers V, Schellekens H, Petit MA, Brechot C. Complete nucleotide sequence and viral envelope protein expression of a hepatitis B virus DNA derived from a hepatitis B surface antigen-seronegative patient. *J Hepatol* 1993; 18: 244-250.
105. Kuhns MC, McNamara AL, Perillo R, Caball CM, Campbell CR. Quantitation of hepatitis B viral DNA by solution hybridization: Comparison with DNA polymerase and hepatitis B e antigen during antiviral therapy. *J Med Virol* 1989; 27: 274-81
106. 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.
107. Laskus T, Persing DH, Nowicki MJ, Mosley JW, Rakela J. Nucleotide sequence analysis of the precore region in patients with fulminant hepatitis B in the United States. *Gastroenterology* 1993; 105: 1173-1178.

108. Lazizi Y, Badur S, Perk Y et al. Selective unresponsiveness to HBs Ag vaccine in newborn related with an utero passage of hepatitis B virus DNA. *Vaccine* 1997;15:1095-1100.
109. Lee WM. Hepatitis B virus infection. *NEJM* 1997; 337:1733-1745.
110. Lee YI, Hur GM, Suh DJ, Kim SH. Novel pre-C/C gene mutants of hepatitis B virus in chronic active hepatitis: naturally occurring escape mutants. *J Gen Virol* 1996; 77: 1129-1138.
111. Li JS, Tong SP, Wen YM, Vitvitski L, Zhang Q, Trepo C. Hepatitis B virus genotype A rarely circulates as an HBe-minus mutant: possible contribution of a single nucleotide in the precore region. *J Virol* 1993; 67: 5402-5410.
112. Liang TJ, Hasegawa K, Munoz SJ, Shapiro CN, Yoffe B, McMahon BJ, Feng C, Bei H, Alter MJ, Dienstag JL. Hepatitis B virus precore mutation and fulminant hepatitis in the United States. A polymerase chain reaction-based assay for the detection of specific mutation. *J Clin Invest* 1994; 93: 550-555.
113. Lin HH, Hsu HY, Chang MH et al. Hepatitis B virus in the colostrum of HBe Ag positive carrier mothers. *J Ped Gastro Nutr* 1993;17:207-10.
114. Lindh M, Horal P, Dhillon AP, Furuta Y, Norkrans G. Hepatitis B virus carriers without precore mutations in hepatitis B e antigen-negative stage show more severe liver damage. *Hepatology* 1996; 24: 494-501.
115. Lohr H, Goergen B, Weber W, Godderz W, Meyer zum Buschenfelde KH, Gerken G. Mixed cryoglobulinemia type II in chronic hepatitis B associated with HBe-minus HBV mutant: cellular immune reactions and response to interferon treatment. *J Med Virol* 1994; 44: 330-335.
116. Lok AS, Akarca U, Greene S. Mutations in the pre-core region of hepatitis B virus serve to enhance the stability of the secondary structure of the pre-genome encapsidation signal. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91: 4077-4081.
117. Lorient MA, Marcellin P, Talbodec N, Guignon V, Gigou M, Boyer N, Bezeaud A, Erlinger S, Benhamou JP. Low frequency of precore hepatitis B virus mutants in anti-hepatitis B e-positive reactivation after loss of hepatitis B e antigen in patients with chronic hepatitis B. *Hepatology* 1995; 21: 627-631.
118. Lunn ER, Hoggarth BJ, Cook WJ. Prolonged hepatitis B surface antigenemia after vaccination. *Pediatrics* 2000; 105(6): E81.

119. Marinos G, Torre F, Gunther S, Thomas MG, Will H, Williams R, Naoumov NV. Hepatitis B virus variants with core gene deletions in the evolution of chronic hepatitis B infection. *Gastroenterology* 1996; 111: 183-192.
120. Marusawa H, Uemoto S, Hijikata M, et al. Latent hepatitis B virus infection in healthy individuals with antibodies to hepatitis B core antigen. *Hepatology* 2000; 31(2): 488-95.
121. Matsumoto C, Nishioka K, Oguchi T ve ark. 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.
122. McIntyre A, Tinniswood RD, Nimmo GR, Kerlin P, Wood GM. Isolated hepatitis B core antibody-can response to hepatitis B vaccine help elucidate the cause? *Aust NZ J Med* 1992; 22:19-22.
123. McMahon BJ, Helminiak C, Wainwright RB et al. Frequency of adverse reactions to hepatitis B vaccine in 43, 618 persons. *Am J Med* 1992; 92: 254-256.
124. McMahon BJ, Parkinson AJ, Helminiak C, Wainwright RB, Bulkow L, Kellerman-Douglas A, et al. Response to hepatitis B vaccine of persons positive for antibody to hepatitis B core antigen. *Gastroenterology* 1992; 103: 590-4.
125. McMillan JS, Bowden DS, Angus PW, McCaughan GW, Locarnini SA. Mutations in the hepatitis B virus precore/core gene and core promoter in patients with severe recurrent disease following liver transplantation. *Hepatology* 1996; 24: 1371-1378.
126. Melegari M, Scaglioni PP, Wands JR. Hepatitis B virus mutants associated with 3TC and famciclovir administration are replication defective. *Hepatology* 1998; 27: 628-633.
127. Mıstık R, Balık İ. Türkiye’de viral hepatitlerin epidemiyolojisi. Bir meta analiz, ‘K Kılıçturgay (ed), Viral Hepatit 98, 1. baskı’ kitabı s.10-39,1998, Viral Hepatitle Savaşım Derneği, İstanbul
128. Minuk G Y , Sun DF , Greenberg R , Zhang M , Hawkins K , Uhanova J , Gutkin A , Bernstein K, Giulivi A , Osiowy C. Occult hepatitis B virus infection in a North American adult hemodialysis patient population. *Hepatology* 2004 Oct; 40(5): 1072 - 1077

129. Sun DF, Uhanova J, Zhang M, Caouette S, Nicolle LE, Gutkin A, Doucette K, Martin B, Giulivi A. Occult hepatitis B virus infection in a North American community-based population. *J Hepatol*. 2005 Apr;42(4):438-40.
130. Mishra L, Seef LB. Viral hepatitis, A through E, complicating pregnancy. *Gastroenterology Clin North Am* 1992; 21: 873-87.
131. Mullis K B, Faloona F A. Specific synthesis of DNA in vitro via polymerase catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol*, 1987; 155: 335-350.
132. Müller R, Baumgarten R, Markus R, et al. Treatment of chronic hepatitis B with interferon alfa-2b. *J Hepatol* 1990, 11: 137-140.
133. Naoumov NV, Thomas MG, Mason AL, Chokshi S, Bodicky CJ, Farzaneh F, Williams R, Perrillo RP. Genomic variations in the hepatitis B core gene: a possible factor influencing response to interferon alfa treatment. *Gastroenterology* 1995; 108: 505-514.
134. Nicolas C, Tassopoulos et all. Efficacy of Lamivudine in Patients with Hepatitis Be Ag Negative/HBV DNA Positive (Precor Mutant) Chronic Hepatitis B, *Hepatology* 1999; 29: 889-896.
135. Niesters HGM, Kraijden M, Cork L, de Medina M, Hill M, Fries E, et al. A multicenter study evaluation of the Digene Hybrid Capture II signal amplification technique for detection of hepatitis B virus DNA in serum samples and testing of EUROHEP standards. *Clin Microbiol* 2000; 38(6): 2150-5.
136. Niitsuma H, Ishii M, Saito Y, Miura M, Kobayashi K, Ohori H, Toyota T. Prevalence of precore-defective mutant of hepatitis B virus in HBV carriers. *J Med Virol* 1995; 46: 397-402.
137. Noborg U, Gusdal A, Pisa EK, Hedrum A, Lindh M. Automated quantitative analysis of hepatitis B virus DNA by using the COBAS Amplicor HBV Monitor Test. *J Clin Microbiol* 1999; 37(9): 2793-7.
138. Ogata N, Zanetti AR, Yu M, Miller RH, Purcell RH. Infectivity and pathogenicity in chimpanzees of a surface gene mutant of hepatitis B virus that emerged in a vaccinated infant. *J Infect Dis* 1997; 175: 511-523.

139. Okamoto H, Tsuda F, Akahane Y, Sugai Y, Yoshida M, Moriyama K, Tanaka T, Miyakawa Y, Mayumi M. Hepatitis B virus with mutations in the core promoter for an e antigen-negative phenotype in carriers with antibody to e antigen. *J Virol* 1994; 68: 8102-8110.
140. Omata M, Ehata T, Yokosuka O, Hosoda K, Ohto M. Mutations in the precore region of hepatitis B virus DNA in patients with fulminant and severe hepatitis. *N Engl J Med* 1991; 324: 1699-1704.
141. Otake K, Nishioka K. Nucleic acid amplification of hepatitis B virus. *Lancet* 2000;355:1460.
142. Özbilge H, Zeyrek FY, Mızraklı AU, Tümkaya B. Hepatit B Virüs DNA Pozitifliği ve Serolojik Testler. *Klimik 2003 XI. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Kongresi. Nisan2003, İstanbul s: 296*
143. Pao C, Yang W, Wu S, et al. Presence of hepatitis B virus DNA in serum of surface antigen negative immunocompromised patients. *Clin Microbiol* 1987; 25: 449-51.
144. Penna A, Artini M, Cavalli A, et al. Long lasting memory T-cell responses following self-limited acute hepatitis B. *J Clin Invest* 1996; 98(5): 1185-94.
145. Persing D H. *In vitro nucleic acid amplification techniques*. Persing, D H, Smith T F, Tenover F C, White T J 1993 (ed) *Diagnostic Molecular Biology, Principles and Applications*. American Society for Microbiology . Washington.D.C. 51-87.
146. Pillot J, Poynard T, Alias A et al. Weak immunogenicity of the preS2 sequence and lack of circumventing effect on the unresponsiveness to the hepatitis B virus vaccine. *Vaccine* 1995; 13:889-93.
147. Poch O, Sauvaget I, Delarue M, Tordo N. Identification of four conserved motifs among the RNA dependent polymerase en-coding elements. *EMBO J* 1989; 8: 3867-3874.
148. Pollicino T, Zanetti AR, Cacciola I, Petit MA, Smedile A, Campo S, Sagliocca L, Pasquali M, Tanzi E, Longo G, Raimondo G. Pre-S2 defective hepatitis B virus infection in patients with fulminant hepatitis. *Hepatology* 1997; 26: 495-499.
149. *Prevention of Specific Infectious Diseases Hepatitis, Viral, Type B, Health Information for International Travel, 2005-2006.*

150. Protzer U, Trippler M, Ohl J, Knolle P, Duchmann R, Meyer zum Buschenfelde KH, Gerken G. Rare pre-core stop-codon mutant nt. 1897 predominates over wide-spread mutant nt. 1896 in an unusual course of chronic hepatitis B. *J Viral Hepat* 1996; 3: 155-162.
151. Protzer-Knolle U, Naumann U, Bartenschlager R, Berg T, Hopf U, Meyer zum Buschenfelde KH, Neuhaus P, Gerken G. Hepatitis B virus with antigenically altered hepatitis B surface antigen is selected by high-dose hepatitis B immune globulin after liver transplantation. *Hepatology* 1998; 27: 254-263.
152. 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, s 1652- 1684
153. Rodriguez-Frias F, Buti M, Jardi R, Cotrina M, Viladomiu L, Esteban R, Guardia J. Hepatitis B virus infection: precore mutants and its relation to viral genotypes and core mutations. *Hepatology* 1995; 22: 1641-1647.
154. Rosenberg W. Mechanisms of immune escape in viral hepatitis. *Gut* 1999; 44: 759-64.
155. Saiki R K, Gelfand D H, Stoffel S, Scharf S J, Higuchi R, Horn G T, Mullis K B Erlich H A. Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase . *Science*.1998; 239: 487-491.
156. Schepis F, Verucchi G, Pollicino T, Attard L, Brancatelli S, Longo G, Raimondo G. Outcome of liver disease and response to interferon treatment are not influenced by hepatitis B virus core gene variability in children with chronic type B hepatitis. *J Hepatology* 1997; 26(4): 765-70.
157. Silva CMD, Costi C, Costa C, Michelon C, Oravec R, Ramos AB, Niel C and Rossetti ML. Low rate of occult hepatitis B virus infection among anti-HBc positive blood donors living in a low prevalence region in Brazil. *Journal of Infection*, July 2005; 51(1):24-29
158. 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.

159. Sirma H, Giannini C, Poussin K, Paterlini P, Kremendorf D, Brechot C. Hepatitis B virus X mutants, present in hepatocellular carcinoma tissue abrogate both the antiproliferative and transactivation effects of HBx. *Oncogene* 1999; 18: 4848-4859.
160. Soubeyrand B, Boissard F, Bruel M et al. Central nervous system demyelinating disease following hepatitis B vaccination with Gen Hevac B. Review of ten years of spontaneous notifications. 1989-1998. *Presse Med* 2000;15:775-80.
161. Sterneck M, Kalinina T, Otto S, Gunther S, Fischer L, Burdelski M, Greten H, Broelsch CE, Will H. Neonatal fulminant hepatitis B: structural and functional analysis of complete hepatitis B virus genomes from mother and infant. *J Infect Dis* 1998; 177: 1378-1381.
162. Stevens CE, Neurath RA, Beasley RP et al. HBe Ag and anti HBe detection by radioimmunoassay correction with vertical transmission of hepatitis B in Taiwan. *J Med Virol* 1979;3:237-41
163. Stevens CE, Toy PT, Tong MJ et al. Perinatal hepatitis B virus transmission in the United States: Prevention by passive-active immunisation. *J Am Med Assoc* 1985;253:1740-5.
164. Stuyver L, Van Geyt C, De Gent S, et al. Line probe assay for monitoring drug resistance in hepatitis B virus-infected patient during antiviral therapy. *J Clin Microbiol* 2000; 38(2): 702-7
165. Sun C, Pao CC, Wu S, Liaw Y. Screening for hepatitis B virus in healthy blood donors by molecular DNA hybridization analysis. *J Clin Microbiol* 1988; 26: 1848-52.
166. Tassopoulos NC, Volpes R, Pastore G, Heathcote J, Buti M, Goldin RD, Hawley S, Barber J, Condreay L, Gray DF. Efficacy of lamivudine in patients with hepatitis B e antigen-negative/hepatitis B virus DNA-positive (precore mutant) chronic hepatitis B. Lamivudine Precore Mutant Study Group. *Hepatology* 1999; 29: 889-896.
167. Taşyaran MA: HBV enfeksiyonu epidemiyolojisi, 'K.Kılıçturgay (ed), *Viral Hepatit*' 98, Viral Hepatitle Savaşım Derneği, İstanbul, 1. baskı, 1998 s 94-100..
168. Thiers V, Nakajima E, Kremendorf D ve ark. Transmission of Hepatitis B from Hepatitis B seronegative subject. *Lancet* 1998; 2: 1273-1276.
169. Thon EV. Evaluation of SHARP Signal System for Enzymatic Detection of Amplified Hepatitis B Virus DNA. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 477-480.

170. Tillmann H, Trautwein C, Walker D, Michitaka K, Kubicka S, Boker K, Manns M. Clinical relevance of mutations in the precore genome of the hepatitis B virus. *Gut* 1995; 37: 568-573.
171. Tiollais P, Pourcel C, Dejean A. The hepatitis B virus. *Nature* 1985; 317:489-495.
172. Tipples GA, Ma MM, Fischer KP, Bain VG, Kneteman NM, Tyrrell LJ: Mutation in HBV RNA-dependent DNA polymerase confers re-sistance to lamivudine in vivo. *Hepatology* 1996; 24: 714-717.
173. Topçu AW, Bilgiç A, Özacar T. *İnfeksiyon Hastalıkları Mikrobiyolojisi. Hepatit B Virusu*, Nobel Tıp Kitabevi, 2002, s:1350-60
174. Topçu AW, Bilgiç A, Özacar T. *İnfeksiyon Hastalıkları Mikrobiyolojisi. Hepatit B Virusu*, Nobel Tıp Kitabevi, 2002, s:1360-1370
175. Uchida T, Aye TT, Becker SO, et al. Detection of the precore/core-mutant hepatitis B virus genome in patients with acute or fulminant hepatitis without serological markers for recent HBV infection. *J Hepatol* 1993; 18: 369-72.
176. Uchida T, Gotoh K, Shikata T. Complete nucleotide sequences and the characteristics of two hepatitis B virus mutants causing serologically negative acute or chronic hepatitis B. *J Med Virol* 1995; 45: 247-52.
177. Ustaçelebi Ş, Bilgiç A, Özacar T. *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Güneş Kitabevi* Ankara, 1999, s: 871.
178. Uysal M. *Klinikbiyokimya.com.seminer. Real Time PCR*
179. Van Hecke E, Paradijs J, Molitor C, et al. Hepatitis B virus specific cytotoxic T lymphocyte responses in patients with acute and chronic hepatitis B virus infection. *J Hepatol* 1994; 20: 514-23.
180. Vanclair J, Cornu CH, Sokal EM et al. Fulminant hepatitis B in an infant born to a hepatitis Be antibody positive DNA negative carrier. *Arch Dis Child* 1991;8: 983-5.
181. Vingerhoest J, Vandam G, Kestens L et al. Deficient T cell responses in non responders to hepatitis B vaccination: absence of Th1 Cytokine production. *Immunol Lett* 1994;39:163-9.
182. *Viral Hepatit Savaşım Derneği (VHSD), Viral Hepatit Tanı ve Tedavi Konsensus Toplantısı Ön Raporu* www.vhsd.org/tani_ted_rehberi.htm
183. Von Weizsacker F, Pult I, Geiss K et al. Selective transmission of variant genomes from mother to infant in neonatal fulminant hepatitis B. *Hepatology* 1995; 21: 8-13.

184. Vyas GN, Yen TSB. Hepatitis B virus-Biology, pathogenesis, epidemiology, clinical description, and diagnosis. In: Specter S. *Viral Hepatitis-Diagnosis, Therapy, and Prevention*. New Jersey: Humana press; 1999:35.
185. Wallz G, Kunzendorf U, Haller H et al. Factors influencing the response to hepatitis B vaccination of hemodialysis patients. *Nephron* 1989;51: 474-7.
186. Wang L, Nowicki M, Rakela J. Detection and sequence analysis of hepatitis B virus integration in peripheral blood mononuclear cells. *J Virol* 1999; 73(2): 1235-8.
187. Waters JA, Kennedy M, Voet P, Hauser P, Petre J, Carman W, Thomas HC. Loss of the common "A" determinant of hepatitis B surface antigen by a vaccine-induced escape mutant. *J Clin Invest* 1992; 90: 2543-2547.
188. Weber B, Mühlbacher A, 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*, January 2005; 32(1): 67-70.
189. West DJ, Watson B, Lichtman J et al. Persistence of immunologic memory for twelve years in children given hepatitis B vaccines in infancy. *Pediatr Infect Dis* 1994;13:745-7.
190. Wieth S, Keller KM, Bauman W, Zabel B. Hepatitis B virus DNA Current diagnosis in children with chronic hepatitis B. *Monatsschr-Kinderheilkd* 1991; 139:202-7.
191. William SR: Hepatitis B virus and Hepatitis D virus. Mandell GL, Bennet JE, Dolin R (ed), *Principles and Practice of Infectious Diseases* 5th ed., Churchill Livingstone, New York 2000; 1672-1685.
192. Wilson RA. Extrahepatic immunological manifestations of chronic hepatitis. *Am J Gastroenterol* 1996; 94:2-16.
193. Wong VCW, Ip HMH, Reesink HW et al. Prevention of perinatally transmitted hepatitis B virus infections with hepatitis B immunoglobulin and hepatitis B vaccine. *Lancet* 1984;1:921-6.
194. Yarkin F, Hafta A. Hepatit B Virusu Prekor TAG Mutantının ARMS (Amplification Refractory Mutation System) ve ACRS (Amplification-Created Restriction Site) Metodları ile tesbiti. *The Turkish Journal Of Gastroenterology*, September 2000;1: 104.
195. Yenen OŞ: Viral hepatitler, "Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M (ed), *İnfeksiyon Hastalıkları*", Nobel Tıp Kitabevi, Ankara.1996; s 641-701.

196. Yücesoy M, Bahar İH, Yuluğ N. Hepatit B virus (HBV) serolojik belirleyicileri ile HBV DNA'nın karşılaştırılması. Turkish Journal of Infection 1999; 13 (4): 581-584.
197. Zaaijer HL, Borg FT, Cuypers HTM, Hermus MCAH, Leleie PN. Comparison of methods for detection of hepatitis B virus DNA. J Clin Microbiol,1994; 32: 2088-91.