



## Araştırma

# Hepatit B Virus (HBV) İnfeksiyonunda Serolojik Belirteçler, Transaminaz Düzeyleri Ve HBV DNA'nın Birlikte Değerlendirilmesi<sup>#</sup>

Canan KÜLAH<sup>1</sup>, Füsun CÖMERT<sup>1</sup>, Nagihan ÖZLÜ<sup>1</sup>, Özlem EROĞLU<sup>1</sup>, İshak Ö. TEKİN<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Zonguldak Karaelmas Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı,  
<sup>2</sup>Zonguldak Karaelmas Üniversitesi Tıp Fakültesi, İmmunoloji Anabilim Dalı, ZONGULDAK

### ÖZET

*Bu çalışmada hepatit B virus (HBV) enfeksiyonu olan hastalarda serolojik belirteçler ve ALT düzeylerinin HBV DNA durumu ile karşılaştırılması amaçlanmıştır. Rutin HBV DNA testi istemi ile laboratuvara gönderilen toplam 618 serum örneği retrospektif olarak çalışmaya dahil edilmiştir. HBsAg serolojik belirteci kemiluminesan immunoassay yöntemi ile, HBeAg ve anti-HBe serolojik belirteçleri ise makro-ELISA yöntemi ile saptanmıştır. Kantitatif HBV DNA tespiti, gerçek zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) yöntemi ile yapılmıştır. Toplam 305 örnekte HBV DNA pozitif olarak saptanmıştır. HBsAg (+) olanların %53'ünde, HBeAg (+) olanların %84'ünde, anti-HBe (+) olanların %31'inde, anti-HBc IgM (+) olanların ise %92'sinde HBV DNA (+) olarak belirlenmiştir. HBsAg (-) olanların %12'sinde, HBeAg (-) olanların ise %27'sinde HBV DNA (+) saptanmıştır. HBV-DNA pozitif hasta örnekleri içinde; kopya sayısı 10<sup>3</sup> kopya/mL ve altında olan örneklerin %52'sinde, 10<sup>4</sup>-10<sup>6</sup> kopya /mL arasında olanların %26'sında, 10<sup>7</sup> kopya/mL ve üzerinde olanların ise %11'inde ALT düzeyleri 25 IU/mL altında saptanmıştır. 10<sup>7</sup> kopya/mL üzerinde olanların %62'sinde ALT düzeyleri 50 IU/mL üzerinde tespit edilmiştir. Yüksek kopyalarda HBV DNA pozitifliği saptanan örneklerin çoğunda ALT düzeylerinin normalin üzerinde seyrettiği gözlenmiş olmakla birlikte kopya sayısı ve enzim düzeyleri arasında birebir ilişki kurulamamıştır. Sonuç olarak HBV enfeksiyonlarının tanısında yaygın olarak kullanılan serolojik ve biyokimyasal testlerin kantitatif HBV DNA tespiti ile birlikte yürütülmesi uygun görülmektedir.*

**Anahtar Kelimeler:** Hepatit B virusu, HBV DNA, ALT, belirteç.

### SUMMARY

#### Evaluation of Serological Markers, Transaminase Levels and HBV DNA in Hepatitis B Virus Infections

*In this study we aimed to compare the serological markers and ALT levels of patients with hepatitis B infections with HBV DNA levels. A total of 618 serum samples submitted to the laboratory for routine HBV DNA testing were retrospectively included in the study. HBsAg was detected by chemiluminescent method while HbeAg and anti-HBe were detected by macro ELISA method. Quantitative serum HBV DNA levels were detected by Real-Time Polymerase Chain Reaction (PCR) method. In total 305 samples were*

identified as HBV DNA positive. HBV DNA was determined in 53% of the HBsAg (+) samples, in 84% of the HBeAg (+) samples, in 31% of anti-HBe (+) samples and in 92% of anti-HBc IgM (+) samples. HBV DNA was positive in 12% of the HBsAg (-) and 27% of the HBeAg (-) samples. For the HBV-DNA positive patients, ALT levels were lower than 25 IU/mL in 52% of the patients with HBV DNA  $\leq 10^3$  copies / mL, in 26% of the patients with  $10^4$ - $10^6$  copies/mL and in 11% of those with HBV DNA  $\geq 10^7$  copies/mL. ALT levels higher than 50 IU/mL in 62% of the patients with HBV DNA  $\geq 10^7$  copies/mL. ALT levels higher than normal limits have been observed in most of the patients with high HBV DNA copy numbers, however, no correlation was observed between number of copies and enzyme levels. As a result, widely used serological and biochemical tests, conducted with quantitative HBV DNA detection seems appropriate for the diagnosis of HBV infections.

**Key Words:** Hepatitis B virus, HBV DNA, ALT, marker.

#Bu çalışma VIII. Ulusal Viral Hepatit Kongresi'nde poster olarak sunulmuştur.

## GİRİŞ

Hepatit B virusu (HBV) akut ve kronik hepatit, siroz, hepatosellüler karsinoma gibi ciddi sağlık sorunlarına yol açan ve yılda bir milyondan fazla kişinin ölümüne neden olan önemli bir etkindir (1). HBV enfeksiyonlarının rutin tanısında ilk olarak ve en sık kullanılan yöntemler HBV serolojik belirteçlerinin ve transaminaz düzeylerinin belirlenmesidir.

Yüzey antijeni olan HBsAg, erken antijen olan HBeAg ile kor antijeni olan HBcAg'ye karşı oluşan antikörler HBV enfeksiyonunda en çok başvurulan serolojik belirleyicilerdir (2, 3). Bunlardan HBsAg taşıyıcılığın ve HBV enfeksiyonunun, HBeAg aktif enfeksiyon ve bulaştıncılığın, anti-HBc ise HBV ile karşılaşmış olmanın göstergesi olarak değerlendirilmektedir (3). Buna karşın viral replikasyonu göstermede serolojik testlerin zaman zaman yetersiz kaldığı bildirilmekte, testlerin duyarlılık ve özgüllüğüne bağlı olarak olağan dışı tablolar ortaya çıkabilmektedir (4, 5). Bu nedenle günümüzde, bu hastalarda olanaklar el verdiği ölçüde, moleküler yöntemler ile HBV DNA araştırılmaktadır (6). Kronik enfeksiyonların değerlendirilmesinde, tedavi yanıtının izlenmesinde dolaşımdaki HBV DNA miktarının kantitatif olarak değerlendirilmesi özellikle önem taşımaktadır (7). Viral hepatitlerde aminotransferaz düzeyleri karaciğer hücre harabiyetinin duyarlı göstergeleridir ve normalde serumda düşük düzeylerde bulunurlar (30-40 U/L'nin altında). Bu enzimler hepatik hasar ile ilişkilidir ve viral hepatitlerde nadiren normalin 100 katını geçerler (8, 9). Bu çalışmada HBV enfeksiyonlarında serolojik belirteçler ve aminotransferaz düzeyleri ile HBV DNA ile ilişkisinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

## MATERYAL VE METOT

Ekim 2002-Mayıs 2006 tarihleri arasında HBV DNA istemi ile Zonguldak Karaelmas Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na rutin olarak gönderilen toplam 618 serum örneği retrospektif olarak incelendi. Hastaların serolojik belirteçlerinin değerlendirilmesinde, farklı zamanlarda çalışılarak sonuçlandırılmış serolojik test sonuçları kabul edilmedi. Yalnızca HBV serolojik belirteçleri ile HBV DNA testi eş zamanlı olarak istenmiş olan hasta serum örnekleri seçilerek değerlendirmeye dahil edildi. HBsAg serolojik belirteci kemiluminesan Enzim Immün Assay (EIA) yöntemi (Access, Beckman Coulter, Fransa), HBeAg ve anti-HBe serolojik belirteçleri ise makro-ELISA (EIA II, Cobas Cor, Roche, USA) yöntemi ile saptandı. Hasta serumlarından HBV DNA eldesi, NucleoSpin Blood (Macherey-Nagel, Almanya) ekstraksiyon kiti ile üretici önerilerine uygun olarak gerçekleştirildi. Kantitatif HBV DNA tespiti, gerçek zamanlı PZR yöntemi (ABI Prism 7700, Perkin Elmer) ile RoboGene (Roboscreen, Almanya) kiti kullanılarak üretici talimatlarına uyularak yapıldı. Hastaların HBV DNA testi istemleri ile eş zamanlı belirlenmiş olan serum alanin aminotransferaz (ALT) düzeyleri hasta dosyaları retrospektif incelenerek kaydedildi.

## BULGULAR

Toplam 618 örneğin 305'inde HBV DNA pozitif olarak saptandı. Çalışılan örneklerin 528'inin serolojik belirleyicileri HBV DNA PZR testi ile eş zamanlı olarak istenmişti. Bu 528 örnek içinde HBsAg (+) olanların %53'ünde (229/430), HBeAg (+) olanların %84'ünde (26/31), anti-HBe (+)



olanların %31'inde (60/193), anti-HBc IgM (+) olanların ise %92'sinde (11/12) HBV DNA pozitif olarak belirlendi. Diğer yandan HBsAg (-) olanların %12'sinde (9/76), HBeAg (-) olanların %27'sinde (38/71) HBV DNA pozitifliği bulundu

(Tablo1). HBsAg (-) olup HBV DNA pozitifliği saptanan 9 örneğin 6'sında anti-HBc pozitifliği saptanırken, 3 örneğin tüm serolojik belirteçleri negatif olarak belirlendi.

**Tablo 1.** Serolojik belirteçlere göre HBV DNA pozitifliği oranları.

		Toplam [n]	HBV DNA (+) [n (%)]	HBV DNA (-) [n (%)]
HBsAg	(+)	430	229 (53)	201 (47)
	(-)	76	9 (12)	67 (88)
HBeAg	(+)	31	26 (84)	5 (16)
	(-)	272	74 (27)	198 (73)
Anti-HBe	(+)	193	60 (31)	133 (69)
	(-)	71	44 (62)	27 (38)
Anti-HBc IgM	(+)	12	11 (92)	1 (8)
	(-)	296	151 (51)	145 (49)

HBV DNA pozitif olarak belirlenen hasta örnekleri ALT düzeyleri açısından değerlendirildiğinde; kopya sayısı  $10^3$  kopya/mL ve altında olan örneklerin %51.6'sında (63/122),  $10^4$ - $10^6$  kopya/mL arasında olanların %25.6'sında (21/82),  $10^7$  kopya/mL ve üzerinde olanların ise %10.9'unda (11/101)

ALT düzeyleri 25 IU/mL altında saptandı. Bunun yanında  $10^7$  kopya/mL ve üzerinde HBV DNA'sı olanların %61.4'ünde (62/101) ALT düzeyleri 50 IU/mL üzerinde belirlenirken, %25.8'inde (26/101) 40 IU/mL altında tespit edildi (Tablo 2).

**Tablo 2.** HBV DNA kopya sayılarının ALT enzim düzeylerine göre dağılımı.

Kopya Sayısı (kopya/mL)	Örnek Sayısı (n)	ALT (IU/mL)						
		<25 [n (%)]	25-39 [n (%)]	40-49 [n (%)]	50-99 [n (%)]	100-199 [n (%)]	200-399 [n (%)]	>399 [n (%)]
$\geq 10^7$	101	11 (10.9)	15 (14.9)	13 (12.9)	27 (26.7)	19 (18.8)	11 (10.9)	5 (5.0)
$10^4$ - $10^6$	82	21 (25.6)	23 (28.0)	6 (7.3)	15 (18.3)	7 (8.5)	8 (9.8)	2 (2.4)
$\leq 10^3$	122	63 (51.6)	24 (19.7)	10 (8.2)	18 (14.8)	5 (4.1)	2 (1.6)	0 (0.0)
Toplam	305	95 (31.1)	62 (20.3)	29 (9.5)	60 (19.7)	31 (10.2)	21 (6.9)	7 (2.3)

## TARTIŞMA

HBV-DNA'nın saptanmasına olanak sağlayan moleküler yöntemler, hem viral replikasyonun ve infektivitenin belirlenmesinde, hem de tedaviye yanıtın ve prognozun değerlendirilmesinde serolojik testlerden daha değerlidir (6, 7).

Hepatit B virus enfeksiyonu olan hastaların serumlarında HBsAg ile birlikte serumda HBeAg'nin saptanması aktif replikasyonun ve infektivitenin kanıtı olarak ele alınmakta ve bu tip örneklerde genelde HBV DNA varlığına rastlanmaktadır (10).

Çalışmamızda HBeAg pozitif olarak belirlenen örneklerin büyük çoğunluğunda (%84) HBV DNA pozitif olarak saptanmıştır. HBeAg pozitifliği ile HBV DNA pozitifliği arasında paralellik literatürdeki diğer çalışmaların sonuçları ile uyumludur (10-12). HBeAg serokonversiyonunu takiben olguların büyük bölümünde virus replikasyonunun bittiği kabul edilmektedir (10, 13). Bununla birlikte çalışmamızda anti-HBe pozitif örneklerin %31'inde HBV DNA saptanmıştır. Anti-HBe'nin nispeten düşük infektivitenin ve hastalığın tamamen iyileşeceğinin bir göstergesi

olarak kabul edilmesine rağmen, diğer çalışmalarda da PZR tekniği ile anti-HBe ve HBV DNA'nın birlikte bulunabileceği gösterilmiştir (11-14). Anti-HBe pozitif olgularda hiç de azımsanmayacak oranlarda HBV DNA saptanmış olması, HBV-DNA ile HBeAg ve anti-HBe arasındaki çelişkili sonuçlar genellikle prekor bölgesinde stop kodon oluşturan nokta mutasyonu (glisin arjinin değişimi) bulunan suşların infeksiyonu ile açıklanmaktadır (15). Nokta mutasyonu sonucu viral replikasyon etkilenmemekte, HBeAg negatif mutantlar ortaya çıkmaktadır. Bizim çalışmamızda HBeAg (-) olanların %27'sinde HBV DNA saptanmıştır. HBeAg negatif mutant suşlarla infeksiyon durumunda viral replikasyonun en önemli göstergesi HBV-DNA'nın saptanması olarak kabul edilmektedir. HBeAg pozitif bazı olgularda ise HBV DNA'ya rastlanılmamaktadır (11, 16). Bizim çalışmamızda HBeAg pozitif örneklerin %16'sında HBV DNA saptanamamıştır. Aynı durum benzer çalışmalarda da bildirilmiştir (11, 12).

Seronegatif kişilerde mutant suşlara bağlı olarak HBV DNA pozitifliği bulunabileceği bildirilmektedir (17). Ayrıca serumda bulunan inaktif, degrade DNA parçacıklarının da amplifiye edilerek PZR ile HBV DNA testlerinin pozitif sonuç verebileceği bildirilmiştir (2, 17). Bu nedenle saptanan HBV DNA molekülü mutlaka aktif replikasyon göstergesi olmak zorunda değildir (2, 11, 17, 18). Bu çalışmada da HBsAg (-) olanların %12'sinde, HBV-DNA pozitif olarak bulunmuştur.

Bu çalışmada serum ALT düzeyleri ile ve serum HBV-DNA düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamıştır. Yüksek düzeyde HBV DNA saptanan örneklerin çoğunda beklenildiği şekilde ALT düzeylerinin normalin üzerinde seyrettiği gözlenmiş olmakla birlikte kopya sayısı ve enzim düzeyleri arasında birebir ilişki kurulamamıştır. Bunun yanında  $10^4$  kopya/mL ve altında HBV DNA saptanan örneklerin %71'inde ALT düzeyleri normalin altında belirlenmiştir. Literatürde yer alan çalışmalarda da benzer sonuçlar alındığı gözlenmiştir (19-21). Yalçın ve ark., çalışmalarında benzer şekilde serum HBV-DNA düzeyleri ile enzimatik aktivite arasında anlamlı bir ilişki bildirmemişlerdir. Diğer bir çalışmada ise serum HBV-DNA düzeyleri ile ALT arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulmadıklarını fakat HBV-DNA düzeylerinin karaciğer fonksiyonlarının düzelmesini etkileyebileceğini belirtmişlerdir (21).

HBV infeksiyonunun değerlendirilmesinde serolojik belirteçler ve transaminaz düzeylerinin

araştırılması her zaman yeterli olmamaktadır. Hepatit B infeksiyonunda infeksiyöziteyi saptamada, antiviral tedavi endikasyonu koymada, tedaviyi izlemede ve hastalığın prognozunu değerlendirmede serum örneklerinden HBV DNA tespiti en uygun yol olarak gözükmektedir. Sonuç olarak HBV infeksiyonlarının tanısında yaygın olarak kullanılan serolojik ve biyokimyasal testlerin kantitatif HBV DNA testleri ile birlikte yürütülmesi uygun görülmektedir.

#### KAYNAKLAR

1. Lee WM. Hepatitis B virus infection. *N Engl J Med* 1997; 337: 1733-45.
2. Badur S. Hepatit B virusu (HBV)- viroloji ve serolojik tanı. K Kılıçturgay (ed). *Viral Hepatit 94. 1. Baskı. İstanbul: Viral Hepatit Savaşım Derneği, 1994: 76-7.*
3. Gerlich WH, Caspari G. Hepatitis viruses and the safety of blood donations. *J Viral Hepatit* 1999; 6: 6-15.
4. Leblebicioğlu H. Hepatit B virusu mikrobiyolojisi, patogenezi, epidemiyoloji, klinik, tedavi ve korunma. A'dan Z'ye Akut Viral Hepatitler. Ankara: Güneş Kitabevi, 2002: 16.
5. 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: 1930-3.
6. Tasopoulos NC, Kuhns MC, Koutelov MG, McNamara AI, Todoulos A. Quantitative detection of hepatitis B virus DNA in sera from patients with acute hepatitis B. *Dig Dis Sci* 1993; 38: 2156-62.
7. Nitsuma H, Ishii M, Mivra M, Kabayasi K, Toyota T. Low level hepatitis B viremi by PCR accompanies the absence of HBe antigenemia and hepatitis in hepatitis B virus carriers. *Am J Gastroenterol* 1997; 92: 119-23.
8. Dufour DR, Lott JA, Nolte FS, Gretch DR, Koff RS, Seeff LB. Diagnosis and monitoring of hepatic injury. II. Recommendations for use of laboratory tests in screening, diagnosis, and monitoring. *Clin Chem* 2000; 46: 2050-68.
9. Pratt DS, Kaplan MM. Evaluation of abnormal liver-enzyme results in asymptomatic patients. *N Engl J Med* 2000; 342: 1266-71.
10. Bayram A, Balci İ. Seropozitif ve seronegatif kişilerde hepatit B virüs DNA'sının polimeraz zincir



- reaksiyonu ile araştırılması. *Viral Hepatit Dergisi* 2001; 3: 206-8.
11. Pekbay A, Günaydın M, Eroğlu C, Bedir A, Esen Ş, Leblebicioğlu H. Hepatit B virusu (HBV) serolojik göstergeleri ile HBV DNA arasındaki korelasyon. *Viral Hepatit Dergisi* 200; 2: 302-4.
  12. Yücesoy M, Bahar İH, Yuluğ N. Hepatit B virüs (HBV) serolojik belirleyicileri ile HBV DNA'nın karşılaştırılması. *İnfeksiyon Dergisi* 1999; 4: 581-4.
  13. Kurt H. HBV enfeksiyonu; klinik bulgular. Kılıçturgay K (ed). *Viral Hepatit* 98. 1. Baskı. İstanbul: Viral Hepatitle Savaşım Derneği, 1998: 101-6.
  14. Heper Y, Mıstık R, Özakın C, Töre O. Hepatit B virüs (HBV) markerleri ile HBV DNA ilişkisi: Bursa bölgesi sonuçları. *Viral Hepatit Dergisi*, 1999, 5: 137-9.
  15. Brunetto MR, Oliveri F, Bonino F. Hepatitis B virus infection. Crivelli O (ed). *Progress in hepatitis research: hepatitis B virus hepatitis C virus hepatitis Delta virus*. Saluggia: Sorin Biomedica, 1991: 9-30.
  16. Ökten A. B tipi viral hepatit (klinik gidişi ve tedavi). Kılıçturgay K (ed). *Viral Hepatit* 94. 1. Baskı. İstanbul: Viral Hepatitle Savaşım Derneği, 1994; 107-9.
  17. Kılıçturgay K. Hepatit B virusunda (HBV) mutasyon ve getirdiği sorular. *Viral Hepatit dergisi* 1995; 1: 1-7.
  18. Kuştimur S, Çırak MY, Külah C, Aydın A, Rota S, Türet S. HBsAg pozitif serum örneklerinde hepatit B virus DNA'sının saptanmasında polimeraz zincir reaksiyonu ve hibridizasyon yöntemlerinin değerlendirilmesi. *Mikrobiyoloji Bülteni* 2001, 35: 581-7.
  19. Kaya S, Yönm Ö, Özdemir L, Sümer Z. Hepatit B virus (HBV) miktarı ile serum alanin aminotransferaz düzeyleri ve HBV serolojik göstergeleri arasındaki ilişki. *İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi* 2006; 13(1): 21-24.
  20. Yalcin K, Degertekin H, Yıldız F, Celik Y. Markers of disease activity in chronic hepatitis B virus. *Clin Invest Med* 2003; 26: 27-34.
  21. Xie Y, Zhao H, Dai WS, Xu DZ. HBV DNA level and antigen concentration in evaluating liver damage of patients with chronic hepatitis B. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*. 2003; 2: 418-22.
- YAZIŞMA ADRESİ**  
Dr. Canan KÜLAH  
Zonguldak Karaelmas Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı  
ZONGULDAK  
e-mail: canankulah@yahoo.com