



HBV DNA Düzeyleri ile HBV Serolojik Göstergeleri Arasındaki İlişkinin Araştırılması

Investigating the Relationship Between HBV DNA Levels and HBV Serological Markers

Esra KOÇOĞLU, Tekin TAŞ, Fırat Zafer MENGELOĞLU, Şeyda KARABÖRK, Kübra CEYLAN

Abant İzzet Baysal Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Bolu, Türkiye

ÖZET

Amaç: Bu çalışmada akut veya kronik hepatit ön tanılı hastalarda HBV DNA pozitifliği ile HBsAg, HBeAg ve Anti-HBe arasındaki ilişkinin araştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntemler: Mart 2010 ile Temmuz 2012 arasında mikrobiyoloji laboratuvarına serum örnekleri gönderilen 574 hastaya ait veriler geriye dönük olarak incelenmiştir.

Bulgular: Çalışmamızda HBsAg pozitif hastaların %44,8'inde, HBeAg pozitif hastaların %67,1'inde, anti-HBe pozitif hastaların %35,9'unda HBV DNA saptanmıştır. HBsAg ve HBeAg birlikte pozitif olan olguların %61,2'sinde HBV DNA saptanırken; her iki belirtecin negatif sonuçlandığı 29 hastanın birinde (%3,4) HBV DNA tespit edilmiştir. HBV DNA pozitifliği, HBsAg negatif hastalarda %6,3; HBeAg negatif hastalarda ise %37,7 olmuştur. Çalışmamızda HBV DNA saptanan hastaların %79,4'ünde HBeAg negatif olarak belirlenmiştir; HBV DNA pozitif hastaların %17,7'sinde Anti-HBe saptanmamıştır. HBeAg pozitifliğinde HBV DNA miktarı anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p<0,001$). Anti-HBe negatif bulunan hastalardaki HBV DNA miktarı anlamlı oranda yüksek saptanmıştır ($p<0,001$).

Sonuç: Sonuç olarak, serolojik göstergeler tek başına hepatit B enfeksiyonu tanısında ve HBV replikasyonunu belirlemede yetersiz kalabilmektedir. Bu çalışmada hepatit B enfeksiyonunun laboratuvar tanısında, HBV DNA'nın kantitatif saptanmasının faydalı olduğu görülmüştür. (*Viral Hepatit Dergisi* 2013; 19(2): 54-7)

Anahtar Kelimeler: HBV DNA, HBsAg, HBeAg, Anti-HBe, Hepatit B

ABSTRACT

Objective: In this study, it is aimed to investigate the relationship between the HBV DNA positivity and serological markers such as HBsAg, HBeAg and anti-HBe in patients with acute or chronic hepatitis.

Materials and Methods: Data of 574 patients whose serum specimens were processed in microbiology laboratory between march 2010 and july 2012 were retrospectively analysed.

Results: In the study, HBV DNA was detected in 44.8% of HBsAg-positive, in 67.1% of HBeAg-positive and in 35.9% of anti-HBe-positive patients. HBV DNA was detected in 61.2% of the patients both of whose HBsAg and HBeAg were positive. However, HBV DNA was positive in one of 29 patients (3.4%) who had negativity of both HBsAg and HBeAg. DNA positivity was 6.3% in HBsAg-negative patients and 37.7% in HBeAg-negative ones. In the study, HBeAg was negative in 79.4% of HBV DNA-positive patients; anti-HBeAg was negative in 17.7% of DNA-positive patients. DNA levels were found significantly high in HBeAg-positive patients ($p<0.001$) as well as DNA levels were significantly high in anti-HBe-negative ones ($p<0.001$).

Conclusion: In conclusion, serological markers may be insufficient either in diagnosis of HBV infection or in determining the viral replication. In this study, it is observed that evaluating those tests together is useful in laboratory diagnosis. (*Viral Hepatitis Journal* 2013; 19(2): 54-7)

Key words: HBV DNA, HBsAg, HBeAg, Anti-HBe, Hepatitis B

Giriş

Akut ve kronik hepatit, siroz ve hepatoselüler karsinom gibi ciddi hastalık ve komplikasyonlara yol açan hepatit B virusu (HBV) dünyada yüz milyonlarca insanı etkilemekte olan önemli bir toplum sağlığı sorunudur (1). Dünyada her yıl yaklaşık bir milyon kişinin HBV enfeksiyonu nedeniyle öldüğü, ülkemizde üç buçuk milyon HBV ile enfekte insanın bulunduğu bildirilmektedir (1,2). Bu yüzden HBV enfeksiyon tanısının konması ve viral replikasyonun saptanması ile tedavinin düzenlenmesi önemlidir. HBV DNA'nın polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemi ile saptanarak viral replikasyonun

gösterilmesi, serolojik göstergelerle birlikte değerlendirildiğinde tanı ve tedavinin takibi açısından yararlı olmaktadır (1-4).

Bu çalışmada akut veya kronik hepatit ön tanılı hastaların HBV DNA pozitifliği ile serolojik göstergelerden HBsAg, HBeAg ve Anti-HBe arasındaki ilişkinin araştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem

Mart 2010 ile Temmuz 2012 arasında üçüncü basamak sağlık merkezi olan hastanemiz mikrobiyoloji laboratuvarına gönderilen ve serum örneklerinde HBV DNA araştırılan 574 hastaya ait HBsAg,

HBeAg ve anti-HBe sonuçları geriye dönük olarak incelenmiştir. Çalışmaya dahil edilen hastaların bir kısmında serum göstergelerinin tümü çalışılmamıştır, tüm hastalar için yalnızca HBeAg sonuçlarına ulaşılmış, HBsAg ve anti-HBe verileri sırasıyla 483 ve 508 hasta için mevcuttur. HBsAg sonuçları ulaşılamayan hastaların testlerinin başka bir merkezde çalışılmış olabileceğini düşünmekteyiz, anti-HBe verileri eksik olan hastalar için testler klinisyen tarafından istenmediğinden dolayı çalışılmamıştır.

Serolojik testler makro ELISA yöntemiyle (Architect i2000SR, Abbott Diagnostics, Chicago, IL, ABD) çalışılmıştır. Hasta serumlarından HBV DNA ekstraksiyonu QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Almanya) kitiyle ve kantitatif HBV DNA tespiti Rotor Gene (Qiagen, Hilden, Almanya) sistemiyle ve analitik duyarlılığı 3,8 IU/mL, lineer saptama aralığı 1,1- >4x10⁹ IU/mL olan Artus HBV RG PCR kitiyle (Qiagen, Hilden, Almanya) üretici önerileri doğrultusunda yapılmıştır. Çalışmaya HBV DNA çalışılan tüm hastalar dahil edilmiştir. Aynı hastaya ait birden fazla kez çalışılmış olan test sonuçlarından diğer göstergelerle birlikte değerlendirilen sonuç çalışmaya dahil edilmiş, mükerrer test sonuçları çalışmaya alınmamıştır.

İstatistiksel değerlendirme SPSS (Versiyon 15.0) yazılımı kullanılarak yapılmıştır. Tanımlayıcı istatistikler sayı ve yüzde olarak ifade edilmiştir. Kategorik yapıdaki değişkenler bakımından gruplar arası farklılıklar ve değişkenler arası ilişkiler Ki-kare ve Fisher Kesin Ki-kare testi ile incelenmiştir. Sonuçlar %95 güven aralığında değerlendirilmiş ve p<0,05 değeri anlamlı kabul edilmiştir.

Bulgular

Çalışmamıza dahil olan hastaların 345'i (%60,1) erkek, 229'u (%39,9) kadın olup genel yaş ortalaması 42,37±14,51 ve yaş aralığı 12-82 olarak bulunmuştur. HBsAg pozitif olan hastaların %44,8'inde (202/451) HBV DNA saptanmıştır. HBsAg negatif hastalarda HBV DNA pozitifliği %6,3 (2/32) olmuştur; bu iki hastanın HBV DNA sonuçları 67 kopya/ml ve 75 kopya/ml gibi çok düşük düzeyde pozitif çıkmıştır ve hastaların diğer göstergelerine ulaşıldığında

anti-HBc IgM sonuçlarının negatif, anti-HBc total sonuçlarının pozitif olduğu ve bu hastaların geçirilmiş enfeksiyon tanısı olduğu öğrenilmiştir (Tablo 1).

HBeAg pozitif hastaların %67,1'inde (49/73) HBV DNA tespit edilmiştir. HBeAg negatif hastaların %37,7'sinde (189/501) HBV DNA saptanmıştır. HBeAg negatif olup HBV DNA pozitif bulunan hastaların %32,9'unda (51/155) HBV DNA ilerleyen zaman içinde negatifleşmiştir. Bu hastaların 30'unda anti-HBe bakılmış, 29'unda pozitif bulunmuştur. HBV DNA saptanan hastaların %79,4'ünde (189/238) HBeAg negatif bulunmuştur (Tablo 1).

Anti-HBe pozitif hastaların %35,9'unda (153/426) HBV DNA saptanmıştır. HBV DNA pozitif hastaların %17,7'sinde (33/186) anti-HBe negatif bulunmuştur (Tablo 1).

HBsAg ve HBeAg birlikte pozitif olan olguların %61,2'sinde HBV DNA saptanırken; her iki belirtecin negatif sonuçlandığı 29 hastanın birinde (%3,4) HBV DNA tespit edilmiştir.

HBV DNA kantitatif düzeyleri 10⁴ kopya/mL ve 105 kopya/mL sınır değerlerine göre gruplara ayrılıp analiz edilmiştir; buna göre HBeAg pozitifliğinde HBV DNA kopya miktarı anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (p<0,001). Aynı yöntemle yapılan analizde anti-HBe negatif bulunan hastalardaki HBV DNA kopya miktarı anlamlı oranda yüksek saptanmıştır (p<0,001) (Tablo 2).

Tartışma

Moleküler tanı yöntemlerinin kullanılmaya başlanması ile HBV enfeksiyonlarında tanının netleşmesi ve tedavinin takibinde büyük kolaylık sağlanmıştır (1,2). Viral replikasyonun ve enfektivitenin belirlenmesinde kullanılan HBV DNA tespiti, özellikle serolojik göstergelerin yetersiz kaldığı olgularda HBV enfeksiyonunun saptanmasında, tedavi ve prognoz değerlendirilmesinde yardımcı olmaktadır (1-3).

Çalışmamızda HBsAg pozitif hastaların %44,8'inde HBV DNA saptanmıştır. Bu oranı Altındış ve ark. (5) %20; Külâh ve ark. (6) %53, Us ve ark. (7) %27,3; Yücesoy ve ark. (8) %14,3; Özasan ve ark. (9) %30,3; Odaibo ve ark. (10) %81,9; Rabbi ve ark. (11) %92,9 olarak bildirmişlerdir.

HBsAg negatif olan kişilerde mutant suşlar nedeniyle HBV DNA pozitifliği bulunabilmektedir (3,4,12). Bunun yanısıra serumda bulunması olası inaktif veya degrade DNA parçacıkları PCR ile amplifiye edilerek yanlış pozitifliğe neden olabilmektedir (3,4,12). Altındış ve ark. (5) ile Külâh ve ark. (6) bu oranı %12 olarak bulmuşlardır. Çalışmamızda HBsAg negatif hastaların %6,3'ünde (2/32) HBV DNA saptanmıştır, bu hastalardaki HBV DNA düzeyinin çok düşük değerde olduğu ve anti-HBcIgG pozitifliği gibi geçirilmiş enfeksiyon lehine bulguları bulunduğu öğrenilmiştir.

HBsAg ve HBeAg'nin birlikte saptandığı örneklerin büyük oranında HBV DNA bulunması beklenmektedir (6). Çalışmamızda %61,2 olarak bulunan bu oranı Altındış ve ark. (5) %62,5 düzeyinde bildirmişlerdir. HBeAg aktif replikasyonun ve enfektivitenin göstergesi olarak kabul edilmektedir HBeAg pozitif örneklerde HBV DNA saptanma oranını Külâh ve ark. (6) %84; Özbilge ve ark. (13) %80,5, Heper ve ark. (14) %61, Odaibo ve ark. (10) %88,2, Gupta ve ark. (15) %100, Chen ve ark. (16) %91,0 olarak bildirmişlerdir. Çalışmamızda HBeAg pozitif serumların %67,1'inde HBV DNA saptanmıştır. Enfektiviteyi işaret eden bu göstergelerin birlikte pozitifliğinde HBV DNA saptanma oranı yeterli yükseklikte değildir. Buna HBV DNA'nın hepatosit genomunda entegre olduğu durumlarda replikasyonun devam etmemesine rağmen HBsAg ve

Tablo 1. Hasta sayılarının serolojik göstergeler ve HBV DNA sonuçlarına göre dağılımı

Serolojik göstergeler	HBV DNA (n)	
	Negatif	Pozitif
HBsAg	Negatif (n=32)	30
	Pozitif (n=451)	249
	Toplam	279
HBeAg	Negatif (n=501)	312
	Pozitif (n=73)	24
	Toplam	336
Anti-HBe	Negatif (n=82)	49
	Pozitif (n=426)	273
	Toplam	322

Tablo 2. Serumunda HBV DNA saptanan hastaların 10⁴ kopya/mL miktarı baz alınarak yapılan grupların serolojik göstergelere göre dağılımı*

Serolojik göstergeler**	HBV DNA		P***	HBV DNA		P***
	<10 ⁴ kopya/mL	≥10 ⁴ kopya/mL		<10 ⁵ kopya/mL	≥10 ⁵ kopya/mL	
HBeAg (-) (n=501)	83,4	16,6	<0,001	92,6	7,4	<0,001
HBeAg (+) (n=73)	43,8	56,2		49,3	50,7	
Anti-HBe (-) (n=84)	65,5	34,5	<0,001	70,2	29,8	<0,001
Anti-HBe (+) (n=424)	84,2	15,8		92,5	7,5	

*Değerler yüzde olarak verilmiştir. **Tabloya HBV DNA negatif hastalar dahil edilmemiştir. ***p değeri HBV DNA negatif hastalar tabloya dahil edildiğinde değişmemiştir.

HBeAg'nin sentezinin sürebileceği veya replikasyonun durmasına rağmen HBeAg'nin serumdan tamamen temizlenmemiş olması neden gösterilebilir (3,4). Ayrıca HBeAg pozitif hastalarda HBV DNA saptanma oranının beklendiği kadar yüksek bulunmamasının nedeninin bölgesel olarak mutant HBV suşlarının yayılım farklılığından veya hastanın almakta olduğu antiviral tedaviden kaynaklanabileceği belirtilmiştir (12-13). Bunun dışında laboratuvarlarda kullanılan ELISA cihazları ve PCR sistemlerinin eşik değerlerinin farklı oluşunun hem çalışmalar arasındaki, hem de yöntemler arasındaki saptama oranlarında farklılıklara yol açabileceği düşünülmekle birlikte çalışmamızda kullanılan PCR kitinin analitik eşik değerinin düşüklüğü ve bu kitin yüksek duyarlılığa sahip olması bu görüşü ekarte etmektedir.

HBeAg'nin negatif olduğu durumlarda viral replikasyonun en önemli göstergesinin HBV DNA saptanması olduğu belirtilmektedir (3,4,12). Çalışmamızda HBeAg negatifliğinde DNA saptanma oranı %37,7 olarak bulunmuştur. Bununla birlikte çalışmamızda DNA saptanan olguların sadece %20,6'sında HBeAg'nin pozitif bulunması dikkate değerdir. Bu oranı Külâh ve ark. (6) %26; Gökahmetoğlu ve ark. (17) %80,4; Gündüçoğlu ve ark. (18) %65; Odaibo ve ark. (10) %78,4; Chen ve ark. (16) %45,4 bulmuşlardır. Bu veriler doğrultusunda HBeAg pozitifliğinin DNA saptanması açısından pozitif prediktif değerinin ve özgüllüğünün yüksek olmasına rağmen duyarlılığının oldukça düşük olduğu görülmektedir. Ancak bu düşük oranı daha net değerlendirmek için hastanın tüm serolojik göstergelerinin birlikte değerlendirilmesi ve enfeksiyonun hangi döneminde olduğunun belirlenmesi gerekmektedir (3,4).

HBeAg'nin anti-HBe'ye serokonversiyonun genelde viral replikasyonun sonlanması anlamına geldiği kabul edilmektedir. Fakat HBV'nin pre-kor bölgesinde bazı mutasyonların meydana gelmesi ile mutant suşların neden olduğu enfeksiyon sırasında HBeAg üretimi kesintiye uğramakta ve anti-HBe bulunmasına rağmen viremi devam etmektedir; bunun sonucunda serumda HBV DNA saptanmaktadır (3,4).

Çalışmamızda anti-HBe pozitif örneklerin %35,9'unda HBV DNA saptanmıştır. Bu oranı Altındış ve ark. (5) 20,7; Külâh ve ark. (6) %31, Odaibo ve ark. (10) %78,8, Gupta ve ark. (15) %60,9 olarak bildirmişlerdir. Anti-HBe'nin pozitifleşmesi, enfektivitenin azaldığının ve iyileşmenin başladığının göstergesi olarak kabul edilmekle birlikte çalışmalarda HBV DNA ve Anti-HBe pozitifliğinin birlikte bulunabildiği bildirilmiştir (4,12). Bunun nedeni HBV'nin prekor bölgesindeki stop kodon oluşturan nokta mutasyonu bulunan suşlarla enfeksiyonu, sonuçta da replikasyon devam ederken HBeAg negatif mutantların ortaya çıkması olarak belirtilmektedir (3,4,12).

Tedavide DNA kantitatif düzeyleri için Centers for Disease Control and Prevention ve American Association for the Study of Liver Diseases gibi bazı uluslararası kuruluşlar tarafından 10⁴ kopya/mL veya 10⁵ kopya/mL gibi farklı sınır değerler kabul edilmektedir (18). Çalışmamızda viral yük miktarları her iki sınır değer için gruplara ayrılıp analiz edildiğinde HBeAg ve anti-HBe ile anlamlı ilişki bulunmuştur. Buna göre HBeAg pozitif olan grupta yüksek viral yük saptanan hasta sayısı HBeAg negatif gruptakinden istatistiksel olarak daha fazla olarak bulunmuştur. Anti-HBe negatif hastalarda da yüksek viral yük saptanan hasta sayısı Anti-HBe pozitif gruptan anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (Her iki analiz için p<0,001). HBeAg pozitif kişilerin serumunda genelde 10⁵'ten fazla miktarda HBV DNA bulunduğu bildirilmiştir (5) Benzer şekilde, Köse ve ark. (20) HBeAg pozitif hastalarda 10⁷ kopya/ml üzeri HBV DNA bulunma oranının HBeAg negatif olanlardan daha fazla olduğunu bildirmişti.

Sonuç olarak serolojik göstergeler tek başına hepatit B enfeksiyonu tanısında ve HBV replikasyonunu belirlemede yetersiz kalabilmektedir. Bu çalışmada hepatit B enfeksiyonunun laboratuvar tanısında, HBV DNA'nın kantitatif saptanmasının faydalı olduğu görülmüştür.

Çıkar Çatışması: Bildirilmemiştir.

Kaynaklar

1. Birengel E, Tekeli E. Kronik Hepatitlerin epidemiyolojisi. In Kronik Hepatitlerin Tanı ve Tedavisinde Güncel Yaklaşımlar, 1 ed. Köksal İ, Leblebicioğlu H, Eds. Ankara, Bilimsel Tıp Yayınevi, 2009; p. 11-25.
2. Çaylan R, Keske Ş. Hepatit B Epidemiyolojisi ve Tanımlar. In Kronik Hepatit B Ankara, 2009; p. 9-17.
3. Saab S, Martin P. Tests for acute and chronic viral hepatitis. Finding your way through the alphabet soup of infection and superinfection. Postgrad Med. 2000; 107(2): 123-26, 129-30.
4. Özsan M. HBV Enfeksiyonunda Mikrobiyolojik Tanı. In Viral Hepatit 2007, 1 ed. Tabak F, Balık İ, Tekeli E, Eds. İstanbul, Viral Hepatit Savaşım Derneği, 2007; p. 124-34.
5. Altındış M.: Hepatit B Virus (HBV) Serolojik Belirleyicileri ile HBV DNA'nın Varlığının Karşılaştırılması. Enfeksiyon Derg. 2002; 16: 141-45.
6. Külâh C, Cömert F, Özlü N, Eroğlu Ö, Tekin İÖ. Hepatit B Virus (HBV) Enfeksiyonunda Serolojik Belirteçler, Transaminaz Düzeyleri Ve HBV DNA'nın Birlikte Değerlendirilmesi Viral Hepatit Derg. 2007; 12: 111-15.
7. Us T, Akgün Y, Kanan B. HBV DNA PCR Sonuçlarının HBV Serolojik Göstergeleri ile Karşılaştırılması. Viral Hepatit Derg. 2000; 3: 175-78.

8. Yücesoy M, Taşlı H, Bahar İ, Yuluğ N. Değişik Serolojik Belirleyicilerin Değerlendirilmesinde HBVDNA Saptanmasının Önemi. *Viral Hepatit Derg.* 2000; 2: 109-12.
9. Ozaslan M, Barsgan A, Can C, Bas B, Aytekin T, Kilic İH. Prevalence of HBV-DNA among HBsAg positive patients in southeastern region of Turkey by PCR. *Biotechnol. & Biotechnol. Eq.* 2005; 19(3): 124-27.
10. Odaibo GN, Ola SO, Olaleye OD. Hepatitis B virus DNA in patients with HBsAg in south western Nigeria. *J Med Virol.* 201; 85(2): 214-8.
11. Rabbi FJ, Rezwan MK, Shirin T. HBeAg/anti-HBe, alanine aminotransferase and HBV DNA levels in HBsAg positive chronic carriers. *Bangladesh Med Res Counc Bull.* 2008; 34(2): 39-43.
12. Kılıçturgay K. Hepatit B Virusunda (HBV) Mutasyon ve Getirdiği Sorunlar. *Viral Hepatit Derg.* 1995; 1: 1-7.
13. Özbilge H, Zeyrek Fy, Uzala Mızraklı A, Tümkiye B. Hepatit B Virus DNA Pozitifliği ve Serolojik Testler. *Erciyes Tıp Dergisi.* 2005; 27: 17-21.
14. Heper Y, Mıstık R, Özakin C, Töre O. Hepatit B Virus (HBV) Markerleri ile HBV-DNA İlişkisi: Bursa Bölgesi Sonuçları. *Viral Hepatit Derg.* 1999: 137-39.
15. Gupta BP, Jayasuryan N, Jameel S. Direct detection of hepatitis B virus from dried blood spots by polymerase chain reaction amplification. *J Clin Microbiol.* 1992; 30(8): 1913-1916.
16. Chen P, Yu C, Wu W, Wang J, Ruan B, Ren J, Yang S, Xu K, Yu L, Li L. Serological Profile Among HBsAg-Positive Infections in Southeast China: A Community-Based Study. *Hepat Mon.* 2013; 13(1): 7604.
17. Gökahmetoğlu S, Yıldırım A, Karaca N, Artan C, Özbal Y. Hepatit B Yüzey Antijeni (HBsAg) Pozitif Askerlerin HBV-DNA Düzeylerinin Değerlendirilmesi. *İnfeksiyon Derg.* 2002; 16: 415-17.
18. Güdücüoğlu H, Bozkurt H, Yaman G, Kutluay N, Berkeş M. Değişik Serolojik Belirleyicilere Sahip Hastalarda HBV DNA'nın Değerlendirilmesi. *Viral Hepatit Derg.* 2005; 10: 158-63.
19. Lok AS, McMahon BJ. Chronic hepatitis B. *Hepatology.* 2007; 45: 507-39.
20. Köse Ş, Oğuz-Gülcü F, Topaloğlu S, İyi T. Hepatit B Virus (HBV) DNA Düzeyleri ile Serum Alanin Aminotransferaz Düzeyleri ve HBV Serolojik Göstergeleri Arasındaki İlişki. *Viral Hepatit Dergisi.* 2011; 17(2): 57-61.