

Kantitatif Anti-HBc Ölçümü ile HBV-DNA Varlığının Karşılaştırılması

Mustafa ALTINDIŞ, Orhan C. AKTEPE, Zafer ÇETİNKAYA, Nilay KIYILDI, Raike KALAYCI

Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, AFYON

ÖZET

Düşük oranda da olsa -transfüzyon öncesi donör kanında hepatit B virüs (HBV) saptamada sadece HBsAg araştırıldığı için- posttransfüzyonel hepatit geçişi söz konusu olmaktadır. Anti-HBc'yi de ilave edip pozitif olanları hariç tutmak ise toplumda pozitiflik oranının fazlalığından dolayı donör bulmayı güçleştirebilir. Çalışmada, HBsAg negatif örneklerde kantitatif anti-HBc düzeyi ile HBV-DNA varlığı arasındaki ilişkinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu çalışmada, transfüzyon öncesi mikropartikül ELISA yöntemi (AxSYM, Abbott Laboratories, ABD) ile HBsAg negatif saptanmış 232 donör serumunda üretici firma önerileri doğrultusunda kantitatif total anti-HBc (Hepanostika, anti-HBc Uniform, Biomerieux bv, Hollanda) araştırılmış, absorbans değerlerine göre iki farklı kategoride pozitifliği hesaplanan serumlardan ayrıca diğer serolojik testler ve real time PCR (GeneAmp 5700 Sequence Detection System) yöntemi ile HBV-DNA çalışılmıştır. HBsAg negatif 232 bireyin 22 (%9.5)'inde anti-HBc pozitif bulunmuş, anti-HBc pozitif serumların tamamında HBeAg ve anti-HBc IgM negatif, 3 (%13.6)'ünde anti-HBe, 17 (%77.3)'ünde ise anti-HBs pozitif saptanmıştır. Anti-HBc pozitif 22 serumdan 15 (%68.2)'i düşük, 7 (%31.8)'si ise yüksek düzey pozitif bulunmuş, düşük düzey serumların hiçbirinde HBV-DNA saptanmazken, yüksek düzey anti-HBc pozitif serumlardan birinde HBV-DNA pozitif bulunmuştur. Hastanın (38 yaş, erkek) serolojisi incelendiğinde HBsAg ve anti-HBs'nin negatif, anti-HBc (0.056/0.314) ve HBV-DNA (1.8×10^7 kopya/mL)'nin pozitif bulunduğu anlaşılmıştır. Kantitatif anti-HBc çalışılması ve yüksek düzeylerin ayrılması HBV bulaşında bir korunma yöntemi olabilir.

Anahtar Kelimeler: Hepatit B virüs, HBsAg, anti-HBc, HBV-DNA, kan transfüzyonu.

SUMMARY

Estimation of HBV-DNA Existence By Quantitative Anti-HBc Detection

Although it is a weak possibility, post-transfusional hepatitis B infection is reported due to HBsAg screening only before transfusion. Adding anti-HBc antibody to the screening and excluding anti-HBc positive cases may obscure finding donors enough. The aim of the study, determine of the correlation between quantitative total anti-HBc and HBV-DNA on HBsAg negative samples. 232 HBsAg negative donors screened by microparticule ELISA (AxSYM, Abbott Laboratories, USA) were included into the study and screened for quantitative total anti-HBc (Hepanostika, anti-HBc Uniform, Biomerieux bv, Holland) and positivity was calculated at 2 different categories. The sera were also tested for HBV-DNA by other serological tests and RT PCR (GeneAmp 5700 Sequence Detection System). 22 (9.5%) of 232 HBsAg negative individuals were anti-HBc positive. All anti-HBc positive sera were negative for HBeAg and anti-HBc IgM. Anti-HBe was positive in 3 (13.6%) sera while anti-HBs were positive in 17 (77.3%) cases. Of

total 22 anti-HBc positive sera, 7 (31.8%) were strongly and the resting were weakly positive (68.2%). None of weakly positive sera were HBV-DNA positive while 1 of the strongly positive sera contained HBV-DNA. Serology screening of this patient, 38 years old, male, were HBsAg and anti-HBs negative, and anti-HBc and HBV-DNA positive (0.056/0.314 and 1.8×10^7 copy/mL respectively). Quantitative anti-HBc screening and excluding cases with high titers may prevent HBV transmission.

Key Words: Hepatitis B virus, HBsAg, anti-HBc, HBV-DNA, blood transfusion.

GİRİŞ

Hepatit B virüs (HBV) infeksiyonunda en önemli serolojik belirleyiciler; yüzey antijeni olan HBsAg, erken antijen olan HBeAg ile hem bu antijene hem de kor antijeni olan HBcAg'ye karşı oluşan antikorlardır (1). Bu belirleyicilerden HBsAg taşıyıcılığın, HBeAg aktif infeksiyon ve bulaştırıcılığın, anti-HBc ise HBV ile karşılaşmış olmanın göstergesi olarak değerlendirilmektedir (2). Anti-HBc, HBV infeksiyonu geçiren sağlıklı bireylerin yanı sıra, persistan HBV infeksiyonlu hasta serumlarında da saptanabilir ve bu kişilerin de infeksiyöz olabileceği ifade edilmektedir (1-5). Salt anti-HBc pozitifliği tarama testleri ile saptanamayacak düzeyde HBsAg taşıyıcılığında da görülmektedir (5).

HBV infeksiyonlarının en önemli bulaşma yollarından biri, kan ve kan ürünleridir (6). Bu yolla bulaşın önlenmesinde rutin tarama testi olarak genellikle HBsAg belirleyicisi kullanılmaktadır (2). Transfüzyon öncesi donör kanlarının HBsAg yönünden taranması sayesinde transfüzyon sonucu ortaya çıkabilecek HBV infeksiyonlarının insidansı önemli ölçüde azaltılmıştır (7). Ancak, nadiren de olsa HBsAg negatif bulunan kanlarla da transfüzyon sonrası hepatit B infeksiyonları oluşmaktadır. Bu durum tarama kitlerinin duyarlılığına bağlı olduğu kadar, HBsAg negatif olduğu halde HBV-DNA ve anti-HBc pozitif kişilerin varlığına da bağlı olabilir (1,8).

Bu çalışmada, HBsAg negatif saptanan donör kan serum örneklerinde kantitatif anti-HBc düzeyi saptanmasının önemi ve HBV-DNA pozitifliği arasındaki ilişkinin araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Transfüzyon öncesi mikropartikül ELISA yöntemi ile (AxSYM, Abbott Laboratories, ABD) HBsAg negatif saptanmış 232 donör serumunda üretici firma önerileri doğrultusunda kantitatif total anti-HBc (Hepanostika, anti-HBc Uniform, Biomerieux bv, Hollanda) araştırılmış, absorbans değerlerine göre -düşük ve yüksek olmak üzere- iki farklı kategoride pozitifliği hesaplanan serumlardan diğer

hepatit testleri ELISA (Biomerieux bv, Hollanda) ve HBV-DNA real time PCR (GeneAmp 5700 Sequence Detection System) yöntemi ile çalışılmıştır.

Real time PCR için Spin kolon ekstraksiyon prosedürü izlenmiştir. Örnekler vortekslenildikten sonra 1.5 mL'lik mikrosantrifüj tüpleri içine 200 µL B3 solüsyonu, 25 µL proteinaz K ve 200 µL hasta örneği eklenip tekrar vortekslenmiştir. Tüpler 70°C'de 40-45 dakika inkübe edilip 210 µL %96'lık saf etanol eklenip tekrar vortekslenmiş, sonra tüplerin içeriği Nucleospin Blood kolonlu (Macherey-Nagel, Almanya) özel tüplerine aktarılmış ve 11.000 x g'de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Kolonlar yeni toplama tüplerine yerleştirilmiş ve üzerlerine 500 µL BW solüsyonu konulup tekrar 11.000 x g'de 1 dakika santrifüj edilip üzerlerine 600 µL B5 solüsyonu eklenip 11.000 x g'de 1 dakika santrifüj edilmiş, son olarak kolonlar steril 1.5 mL'lik mikrosantrifüj tüplerine konulup üzerlerine 70°C'de ısıtılmış BE solüsyonundan 100 µL eklenip 11.000 x g'de 1 dakika santrifüj edilerek hazırlanmıştır.

Real time PCR için PCR miksleri hazırlanarak, 22.5 µL miks (miks, Forward Primer, Reverse Primer ve TaqMan Prop) + 2.5 µL hasta ekstraktı RT-PCR termal cyclerinde çoğaltma yapılmıştır. HBV pozitif kontrolü için 2×10^6 kopya/mL, 5×10^5 kopya/mL, 2×10^5 kopya/mL, 5×10^4 kopya/mL, 1×10^4 kopya/mL, 2×10^3 kopya/mL standartlar alınmış, negatif kontrol için distile PCR grade su tercih edilmiş, elde edilen sonuçlar kantitatif olarak değerlendirilmiştir. HBV için kitin saptama alt limiti 100 kopya/mL olup, Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) önerisi doğrultusunda 1000 kopya/mL üzerindeki sonuçlar pozitif kabul edilmiştir (HBV-DNA'da alt sınır 10^3 IU/mL; çevirme faktörü: 1 IU/mL= 2-5.2 kopya/mL).

BULGULAR

HBsAg negatif 232 bireyin 22 (%9.5)'inde anti-HBc pozitif bulunmuş, anti-HBc pozitif serumlarının tamamında HBeAg ve anti-HBc IgM negatif, 3 (%13.6)'ünde anti-HBe, 17 (%77.3)'ünde ise anti-HBs pozitif saptanmıştır.

Anti-HBc pozitif 22 serumdan 15 (%68.2)'i düşük, 7 (%31.8)'si ise yüksek düzey pozitif bulunmuş, düşük düzey serumların hiçbirinde HBV-DNA saptanmazken, yüksek düzey anti-HBc pozitif serumların birinde HBV-DNA pozitif bulunmuştur. Hastanın (38 yaş, erkek) serolojisi incelendiğinde HBsAg ve anti-HBs'nin negatif, anti-HBc (0.056/0.314) ve HBV-DNA'nın (1.8×10^7 kopya/mL) ise pozitif olduğu gözlenmiştir.

TARTIŞMA

HBV serolojik göstergelerinden anti-HBc, virüsle karşılaşmayı gösteren en duyarlı göstergedir. Anti-HBc normalde HBsAg ile birlikte (akut hepatit B geçiren ve taşıyıcılarda) veya anti-HBs ile birlikte (enfeksiyonu doğal yoldan geçirenlerde) bulunur. Ancak HBsAg ve anti-HBs'nin negatif saptandığı olgularda anti-HBc pozitifliğine çok sık rastlanmaktadır (9).

Günümüzde HBV'nin tanımlanması için geliştirilen immünolojik testler sayesinde transfüzyon sonucu ortaya çıkabilecek HBV enfeksiyonlarının insidansı oldukça azaltılmıştır. Donör kanlarının HBsAg yönünden taranması HBV enfeksiyon bulaşımı önemli derecede önlemesine karşın, yine de HBV transfüzyon sonrası gelişen hepatitlerin önemli nedenlerinden biri olmaya devam etmektedir. Yapılan çalışmalar HBsAg negatif, ancak HBV-DNA ve anti-HBc pozitif kişilerin HBV bulaşmasında önemli olduğunu göstermektedir (8). Theris ve arkadaşlarının çalışmasında da, seronegatif üç olguda PCR ile HBV-DNA saptanmış ve bu örneklerle şempanzeler infekte edilerek, seronegatif kişilerin de HBV yönünden bulaştırıcı olabilecekleri gösterilmiştir (10). Sun ve arkadaşları, DNA hibridizasyon metodu ile sağlıklı kan donörlerinde %1.8, Pao ve arkadaşları ise karaciğer fonksiyonları normal seronegatif sağlıklı kişilerde %11 oranında HBV-DNA pozitifliği bildirmişlerdir. Zekri ve arkadaşları, HCV ve HIV negatif 5043 donörün %21.47'sinde yalnızca anti-HBc pozitif bulmuş ve anti-HBc pozitif bu örneklerin %1.25'inde ise HBV-DNA pozitifliği saptamışlardır (11-13). Yine Ren ve arkadaşları ise 297 donörün dördünde yüksek titrede, 75'inde ise düşük titrede izole anti-HBc pozitifliği saptamış ve yüksek titrede olanların 1 (%0.34)'inde RT-PCR yöntemi ile HBV-DNA pozitifliği bulmuşlardır (14). Wachs ve arkadaşları diğer serolojik belirleyicileri negatif, ancak anti-HBc pozitif kişilerin HBV enfeksiyonlarını organ transplantasyonu ile da geçirebileceğini ve özellikle karaciğer alıcılarında hem virüsün bulaşma

riskinin yüksek, hem de enfeksiyonun şiddetli olacağını belirtmişlerdir (15). Ayrıca, yine HBsAg seronegatif kan donörlerinin plazma örneklerinde yapılan bir çalışmada, %3.5 (7/200) oranında HBV-DNA pozitifliği saptanmıştır (16).

İzole anti-HBc pozitifliği özel hasta gruplarında daha dikkatli değerlendirilmelidir. Yapılan çalışmalarda inflamatuvar hepatitli hastalar, hemodiyalizli veya organ transplantasyonu yapılan hastalar, homoseksüeller ve intravenöz (IV) uyuşturucu kullanımı öyküsü bulunan izole anti-HBc'li hastaların ortalama %40'ında HBV-DNA pozitif olarak bulunmuştur (17,18). Diğer bir çalışmada da karaciğer transplantasyonu adaylarında HBsAg ve anti-HBs negatif, anti-HBc total pozitif hastaların karaciğer iğne biyopsilerinin %8.2'sinde HBV-DNA pozitif bulunmuş ve anti-HBc pozitifliğinin red sebebi olması gerektiği bildirilmiştir (19). Diğer çalışmalarda da olduğu gibi düşük oranda da olsa HBsAg negatif, anti-HBc pozitif donör kanlarının enfeksiyöz olabileceği gösterilmiştir. Donörlerde anti-HBc içeren kanlar ile enfeksiyonun bulaşma oranının %14 olduğu bildirilmiştir (20).

HBV-DNA pozitif kan donörlerinde HBsAg'nin saptanamamasının nedenleri arasında; DNA saptama yöntemlerinin immünolojik yöntemlerden daha duyarlı olması, HBsAg seronegatif kişilerde kısmen ya da tamamen HBV genlerinin ekspresyonunun olmaması ve buna bağlı olarak hümmoral immün yanıtın gelişmemesi veya enfeksiyonun farklı HBV subtipleri ile oluşması gibi faktörler sayılabilir (21,22).

Sonuç olarak, HBsAg ELISA tarama testlerinin transfüzyonla ilişkili HBV enfeksiyonlarını tamamen önleyemediği düşünüldüğünde, HBV taşıyıcılık oranı yüksek olan ülkemizde donör kanlarının taranmasında HBsAg testlerinin yanı sıra, kantitatif anti-HBc antikor testlerinin de uygulanması ve sonrasında yüksek düzeylerin ayrılması HBV bulaşında bir korunma yöntemi olabilir.

KAYNAKLAR

1. Hoofnagle JH. Serologic markers of hepatitis B virus infection. *Annu Rev Med* 1981; 32: 1-11.
2. Gerlich WH, Caspari G. Hepatitis viruses and the safety of blood donations. *J Viral Hepatit* 1999; 6(Suppl 1): 6-15.
3. Mosley JW, Stevens CE, Aach RD, et al. Donor screening for antibody to hepatitis B core antigen and hepatitis B virus infection in transfusion recipients. *Transfusion* 1995; 35: 5-12.

4. Shikata T, Karasasa T, Abe K, et al. Hepatitis B e antigen and infectivity of hepatitis B virus. *J Infect Dis* 1977; 136: 571-6.
5. Silva AEB, Mc Mahon BJ, Parkinson AJ, Hoofnagle JH, Di Bisceglie AM. HBV-DNA by PCR in individuals with anti-HBc as the only marker for hepatitis B infection. *Hepatology* 1992; 16: 65A.
6. Taştıyan AM. *Epidemioloji. Kılıçturgay K (editör). Viral Hepatit 98. 1. Baskı. İstanbul: Viral Hepatitle Savaşım Derneği, 1998: 94-100.*
7. Kitchen A. Hepatitis B and blood safety. *Vaccine* 1998; 16(Suppl): 34-7.
8. Gutierrez C, Leon G, Loureiro CL, Uzcategui N, Liprandi F, Pujol FH. Hepatitis B virus DNA in blood samples positive for antibodies to core antigen and negative for surface antigen. *Clin Diagn Lab Immunol* 1999; 6: 768-70.
9. Mert A, Şentürk H, Aktuğlu Y. Sağlıklı kişilerde HBsAg (-), anti-HBs (-) ve anti-HBc (+)'liği ne anlama gelmektedir? *Klinik Gelişim* 1999; 12: 974-8.
10. Theirs V, Nakajima E, Kremendorf D, et al. Transmission of hepatitis B from hepatitis B seronegative subject. *Lancet* 1988; 2: 1273-5.
11. Sun CF, Pao CC, Wu SY, Liaw YF. Screening of hepatitis B virus in healthy blood donors by molecular DNA hybridization analysis. *J Clin Microbiol* 1988; 26: 1848-52.
12. Zekri Ar, Awlia AA, El Mahalawi H, Ismail EF, Mabrouk GM. Evaluation of blood units with isolated anti-HBc for the presence of HBV-DNA. *Dis Markers* 2002; 18: 107-10.
13. Pao CC, Yao DS, Lin CY, et al. Serum hepatitis B virus DNA in hepatitis seropositive and seronegative patients with normal liver function. *Am J Pathol* 1991; 95: 591-6.
14. Ren F, Li H, Zhao H. Studies on hepatitis B virus infection in blood donors with positive anti-HBc and negative HBsAg. *Zhonghua yu Fang Yi Xue Za Zhi* 1998; 32: 7-9.
15. Wachs ME, Amend WJ, Ascher NL, et al. The risk of transmission of hepatitis B from HBsAg negative, HBcAg positive. HBc-IgM negative organ donors. *Transplantation* 1995; 59: 230-4.
16. Bodhiphala P, Chaturachumroenchai S, Chiewsilp P, Pruksananonda P. Deletion of HBV genome by gene amplification method in HBsAg negative blood donors (abstract). *J Med Assoc Thai* 1999; 82: 491-5.
17. Joller-Jamelka HI, Wicki AN, Grob PJ. Detection of HBs antigen in "anti-HBc alone" positive sera. *J Hepatol* 1994; 21: 269-72.
18. Sanchez-Quijano A, Jauregui JI, Leal M, et al. Hepatitis B virus occult infection in subjects with persistent isolated anti-HBc reactivity. *J Hepatol* 1993; 17: 288-93.
19. Van Theil DH, De Maria N, Colantoni A, Friedlander L. Can hepatitis B core antibody positive livers be used safely for transplantation: Hepatitis B virus detection in the liver of individuals who are hepatitis B core antibody positive. *Transplantation* 1999; 68: 519-22.
20. Badur S. Posttransfüzyonel hepatit sorunu. *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 1991; 21: 234-42.
21. 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.
22. Larzul D, Guigue F, Sninsky JJ, et al. Detection of hepatitis B virus sequences in serum by using in-vitro enzyme amplification. *J Virol Methods* 1988; 20: 227-37.

YAZIŞMA ADRESİ

Dr. Mustafa ALTINDIŞ

Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesi

Mikrobiyoloji ve

Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

AFYON

e-mail: maltindis@hotmail.com