

T 1773



T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
İNFEKSİYON HASTALIKLARI VE KLİNİK
MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
MERKEZ KÜTÜPHANESİ

İNAKTİF HBsAg TAŞIYICILARI İLE HB^eAg
NEGATİF KRONİK HEPATİTLİ HASTALARIN
AYRIMINDA SERUM ALT, HBV DNA DÜZEYLERİ
VE KARACİĞER HİSTOPATOLOJİSİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ

Uzmanlık Tezi

Dr. Derya SEYMAN

Tez Danışmanı : Yrd.Doç.Dr. Dilara İNAN

“Tezinden Kaynakça Gösterilerek Faydalanılabilir”

Antalya, 2005

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim boyunca bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım Anabilim Dalı Başkanımız değerli hocam Prof.Dr. Latife Mamikoğlu başta olmak üzere, tezimin planlanmasında, gerçekleşmesinde ve her aşamasında emeği geçen ve yardımını, tecrübesini esirgmeden bana destek olan tez danışmanım sayın Yrd. Doç. Dr. Dilara İnan'a, yine uzmanlık eğitimimde önemli katkıları olan yardım ve desteklerini her zaman gördüğüm sayın hocalarım Prof. Dr. Ata Nevzat Yalçın, Doç. Dr. Filiz Günseren, Doç. Dr. Rabin Saba'ya teşekkür ederim.

Çalışmaya alınacak hastaların toplanması aşamasında ellerindeki bütün verileri esirgmeden bana sunan ve en büyük desteği gördüğüm Atatürk Devlet Hastanesi İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Uzmanları Dr. Ayçin Özdemir ve Dr. Kaya Süer'e, Antalya Devlet Hastanesi İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Uzmanları Dr. Figen Sarıgül, Dr. Şenay Dodanlı ve Dr. Tülin Temizkan'a içtenlikle teşekkür ederim.

Tezimin laboratuvar aşamasında büyük katkıları olan Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalından sayın hocam Prof. Dr. Dilek Çolak, Uzm.Dr. Ayla Özcan ve diğer tüm çalışanlarına yardım ve desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

Tezimde KC örneklerinin histopatolojik olarak incelenmesi aşamasında yardımcı olan Patoloji Ana Bilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Tekinalp Gelen ve Doç. Dr. Özlem Elpek'e teşekkür ederim.

Ayrıca kronik hepatit konusunda bilgi ve görgümün artmasında büyük emekleri olan Gülhane Askeri Tıp Akademisi İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Alaaddin Pahsa'ya, öğretim üyelerinden Prof. Dr. Can Polat Eyigün ve Doç. Dr. Levent Görenek ve diğer tüm çalışanlarına teşekkür ederim.

Uzmanlık eğitimim boyunca birlikte sırt sırta çalıştığım tüm asistan arkadaşlarıma, hemşire ve diğer hastane personeline teşekkür ederim.

Beni yetiştiren ve her zaman manen yanımda olduğunu hissettiğim rahmetli anneme, bana verdikleri destek ve duydukları güven ile yanımda olan babam ve kız kardeşlerime ve hayatımı paylaştığım sevgili eşime sabrı, sevgisi ve desteği için çok teşekkür ederim.

*Dr. Derya SEYMAN
Antalya, 2005*

İÇİNDEKİLER

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	v
ÇİZELGELER DİZİNİ	vi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Tarihçe	4
2.2. Sınıflandırma	5
2.3. Hepatit B Virusunun Genel Özellikleri	6
2.4. Genom Yapısı	7
2.5. Virusun Replikasyonu	10
2.6. Viral Proteinler	12
2.6.1. Kılıf Yüzey Proteinleri	12
2.6.2. Kor Proteinleri	15
2.6.3. P Proteini	16
2.6.4. X Proteini	16
2.7. Duyarlılık-Dirençlilik	17
2.8. HBV Genotipleri	17
2.9. HBV Mutasyonları	17
2.9.1. Prekor, Kor Promoter ve Kor Gen Mutasyonları	18
2.9.2. Yüzey Gen Mutasyonları	21
2.9.3. Polimeraz Gen Mutasyonları	22
2.10. HBV Bulaşma Yolları ve Epidemiyoloji	22
2.11. HBV Seroprevalansı	23
2.12. Klinik	24
2.12.1. Akut Hepatit B	24
2.12.2. Kronik Hepatit B	27
2.13. Serolojik Tam	34
2.14. Kronik Hepatit Histopatolojisi	37

3. GEREÇ VE YÖNTEM	47
3.1. Çalışmaya Alınacak Hastaların Seçimi	47
3.2. Karaciğer Biyopsisinin Yapılması ve Değerlendirilmesi	48
3.3. Serum HBV DNA	48
3.3.1. Serum Örneklerinden HBV DNA'nın Ekstraksiyonu	48
3.3.2. Viral Yük Miktarı Tayini	49
3.4. İstatistiksel Değerlendirme	49
4. BULGULAR	50
5. TARTIŞMA	55
SONUÇLAR	62
ÖZET	63
KAYNAKLAR	65

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

A	Adenin
A.B.D	Amerika Birleşik Devletlerinde
ALP	Alkalen Fosfataz
ALT	Alanin Aminotransferaz
APC	Antijen Sunan Hücreler
AST	Aspartat Aminotransferaz
C	Sitozin
cccDNA	covalently closed circular DNA
CTL	Sitotoksik T Lenfosit
DHBV	Duck Hepatitis B Virus
DR	Direct Repeats
G	Guaninin
GGT	Gama Glutamil Transferaz
GSHV	Ground squirrel hepatitis virus
HAI	Histolojik Aktivite İndeksi
HBV	Hepatit B Virus
HSK	Hepatosellüler karsinoma
KC	Karaciğer
L protein	Büyük protein
MHC	Major Histokompatibilite Kompleksi
M protein	Orta protein
NIH	National Institutes of Health
NÜS	Normal Üst Sınır
ORF	Open Reading Frame
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
pgRNA	pregenomik RNA
S protein	Küçük protein
T	Timin
YMDD	Tirozin-Methionin-Aspartat-Aspartat
WHV	Woodchuck hepatitis virus

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1. Hepatit B Virusu	7
Şekil 2.2. Hepatit B Virüsünün Genom Yapısı	10
Şekil 2.3. HBV İnfeksiyonunun Kronikleşmesi	28
Şekil 4.1. Serum HBV DNA düzeyi 10^4 - 10^5 kopya/ml arasında olan hastalarda ALT ve HAI'nın ROC eğri analizi	53

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 2.1. Hepadnaviridae ailesi	6
Çizelge 2.2. HBV genotip ve subtiplerinin coğrafi dağılımları	17
Çizelge 2.3. HBV'nin Endemisitesi	24
Çizelge 2.4. HBV İnfeksiyonunda Tanı Kriterleri	31
Çizelge 2.5. Kronik Hepatit Etiyolojik Sınıflama (1994)	40
Çizelge 2.6. Knodell Histolojik Aktivite İndeksi	44
Çizelge 2.7. Modifiye Ishak Histolojik Aktivite İndeksi	45
Çizelge 2.8. Kronik Hepatit Evreleme Şemaları	46
Çizelge 4.1. Hastaların merkezlere göre dağılımı	51
Çizelge 4.2. Serum HBV DNA 10^4 - 10^5 kopya/ml olan hastaların ALT düzeylerine ve KC biyopsisi yapılıp yapılmamasına göre dağılımı	51
Çizelge 4.3. Serum HBV DNA düzeylerine göre ALT dağılımı	52
Çizelge 4.4. HAI değerlerine göre ALT düzeylerinin dağılımı.	53

1. GİRİŞ

Hepatit B, dünyada en yaygın infeksiyon hastalıklarından biridir ve bu nedenle bir toplum sağlığı problemidir. Dünyada 2 milyar insanın bu virus ile karşılaştığı ve 400 milyon kişinin ise kronik infekte olduğu yani HBsAg'yi 6 aydan uzun süredir taşıdığı tahmin edilmektedir. Bunların çoğunluğunu inaktif HBsAg taşıyıcıları oluştururken, %15-40 kadarında siroz, karaciğer (KC) yetmezliği ve hepatosellüler karsinoma (HSK) gibi ciddi hepatik komplikasyonlar gelişebilmektedir (1). Önceleri "asemptomatik HBsAg taşıyıcısı" veya "sağlıklı HBsAg taşıyıcısı" olarak kullanılan "inaktif HBsAg taşıyıcısı" terimi ilk kez 2000 yılındaki NIH (National Institutes of Health) toplantısında önerilmiştir. Ülkemizde de nüfusun üçte birinden fazlasının Hepatit B virüsü (HBV) ile karşılaştığı ve yaklaşık 4 milyon insanın kronik taşıyıcı olduğu tahmin edilmektedir (1, 2)

HBV infeksiyonu akut düzelen hepatitten fulminan hepatite, inaktif taşıyıcılıktan kronik hepatite, KC sirozuna ve HSK'ya kadar uzanan çok farklı klinik tablolara neden olabilir. Akut HBV infeksiyonundan sonra çocukların %95'inde, erişkinlerin %5'inde infeksiyonu ortadan kaldırmaya yeterli immun yanıt oluşmaz. Bu kişilerde kronik infeksiyon gelişir. Kronik hepatit daima aktif HBV replikasyonu ile ilişkilidir (3). Kronik hepatitin doğal seyrinde üç klinik tablo söz konusudur.

- 1- HBeAg pozitif kronik hepatit
- 2- HBeAg negatif kronik hepatit
- 3- İnaktif HBsAg taşıyıcılığı

HBeAg pozitif kronik hepatit, kronik HBV infeksiyonunun erken dönemini temsil eder. Aşırı yüksek viral replikasyon hızı ve persistan veya aralıklı ALT artışı ile karakterizedir. Serumdaki virus yükü HBeAg negatiflere göre daha fazladır. Viral popülasyona doğal (wild) virus yani mutasyona uğramamış virus türü hakimdir. HBeAg pozitif hastaların her yıl ortalama %10-20'sinde spontan serokonversiyon olmakta, yani HBeAg kaybolarak anti-HBe pozitifleşmekte, serum HBV DNA titresi PCR ile negatif veya çok düşük düzeylere inmekte ve eğer başlangıçta ALT düzeyi yüksekse normalleşmektedir. Yani hasta inaktif HBsAg taşıyıcısı durumuna geçer. İnaktif HBsAg taşıyıcılarının her yıl %1-

2'sinde HBsAg spontan kaybolmakta ve anti-HBs pozitifleşmektedir. Ancak hastaların bir kısmında HBeAg negatifleşmesine rağmen viral replikasyon devam etmektedir. Bu hastalar HBeAg negatif kronik hepatit B olarak adlandırılmakta ve kronik HBV infeksiyonunun oldukça geç fazını oluşturmaktadır. HBeAg negatif kronik hepatitte prekor veya kor promoter bölgesindeki gen mutasyonuna bağlı olarak HBeAg sentezi yapamayan ve mutant tip denilen virus popülasyonu baskındır. Mutant virus HBeAg üretememekte ancak viral replikasyon devam ettiği için serum HBV DNA titresi yüksek kalmaktadır (3, 4, 5). HBeAg negatif kronik hepatit ülkemizde içinde olduğu Asya ve Akdeniz ülkelerinde daha sıktır. Çünkü mutant tipe, ülkemizdeki hastaların hemen tümünde saptanan genotip D'de daha sık rastlanmaktadır (6). Ülkemizde kronik hepatit B tanılı hastaların, %60'ını HBeAg negatif kronik hepatitli hastalar oluşturur (4).

İnaktif HBsAg taşıyıcılığı en sık HBeAg negatif kronik hepatit ile karıştırılır. Çünkü HBeAg negatif kronik hepatitli hastaların yaklaşık %45-65'inde serum aminotransferaz düzeyleri normal gidişler arasında tekrar eden alevlenmeler şeklinde seyretmektedir. ALT düzeyi alevlenmeler göstermesine rağmen çok uzun süreler normal sınırlarda seyredebilir. Serum aminotransferaz düzeylerine çok sık bakılsa dahi, çok kısa bir süre yükselme gösteren değerler yakalanamayıp, yanlışlıkla hastalara inaktif HBsAg taşıyıcısı tanısı konulabilir (7).

Bu iki grubun ayrılmasında kullanılan ikinci parametre HBV DNA düzeyidir. HBV DNA'nın kantitatif yöntemlerle 10^5 kopya/ml bulunmasının ayırıcı önemi olduğu belirtilmekle birlikte izlenen HBeAg negatif kronik hepatitli hastaların önemli bir kısmında HBV DNA 10^5 kopya/ml altında saptanmıştır (8).

Kronik hepatitlerin kesin tanısında biyokimyasal ve serolojik değerler yeterince güven verici değildir; en önemli verileri KC biyopsisi sağlar. Bundan dolayı inaktif HBsAg taşıyıcılığı ile kronik hepatit arasındaki ayırım, KC'deki kronik nekroinflamatuvar hastalığın histolojik olarak ortaya konması ile mümkündür (9). Hepatit B infeksiyonlu hastalarda progresif KC hasarı yüksek düzeyde HBV replikasyonu ile ilişkilidir (3).

Bu çalışmada amaç; HBeAg negatif kronik hepatit B'li hastaların inaktif HBsAg taşıyıcılarından ayılmasına yardımcı olacak eşik serum HBV DNA düzeyinin saptanması ve bunun histopatolojik inceleme ile doğrulanmasıdır.

2. GENEL BİLGİLER

Bütün dünyada olduğu gibi ülkemizde de HBV'nin neden olduğu infeksiyonların önemi giderek artmaktadır. Akut dönemde veya akut alevlenme dönemlerinde fulminan hepatite yol açabilmesi, kronik hepatit formuna dönebilmesi, kronik hepatit oluştuğunda ise KC sirozuna ve HSK yol açabilmesinden dolayı tüm ülkelerin olduğu gibi, ülkemizin de en önemli sağlık sorunlarından biridir.

Dünya nüfusunun üçte birinde, yaklaşık 2 milyar insanda HBV infeksiyonunun geçirildiğini gösteren serolojik göstergeler mevcuttur (1). Yine dünyada 400 milyondan daha fazla insan HBV ile kronik infektidir (10). Kronik hepatit B'li hastaların dörtte birinden fazlası HBV ile ilgili kronik karaciğer hastalıklarından ölmektedir. Ülkemizde de yaklaşık 4 milyon kişinin kronik taşıyıcı olduğu tahmin edilmektedir. Yüz binleri bulan kronik hepatit ve KC sirozu vakaları dışında çok büyük bir grubun ise tanınmadığı veya tedavi şansı bulamadığı kabul edilmektedir (11).

2.1. Tarihçe

HBV uzun kuluçka süreli hepatit, serum hepatiti, MS-2 hepatiti ve viral hepatit B diye adlandırılan infeksiyon hastalığının etkenidir (12).

İlk serum hepatiti olguları 1883 yılında Bremen'de tersane işçileri arasında çiçek aşısını takiben görülmüştür. 20. yüzyılın ilk yarısında kızamık ve kabakulak immunprofilaksisi amacıyla plazma verilen kişiler ile insan serumu içeren sarı humma aşısı yapılanlarda ve kontamine iğnelerin kullanıldığı cinsel yolla bulaşan hastalıklar kliniklerinde tedavi gören hastalar arasında yaygın olarak görülmeye başlamıştır. II. Dünya Savaşı sırasında kan transfüzyonu yapılan askerlerde ciddi sorunlara neden olmuştur (13).

Çeşitli çalışmalardan sonra, 1947 yılında Mc Callum, infeksiyöz hepatit için "hepatit A", serum hepatiti için ise "hepatit B" deyimlerini kullanmıştır. 1965 yılında Blumberg ve arkadaşları ise Avusturyalı bir yerlinin serumunda, çok sayıda kan transfüzyonu yapılmış bir hastanın serumu ile agar jelde presipitasyon veren bir antijen olduğunu göstermişler ve günümüzde "hepatit B yüzey antijeni-HBsAg" olarak bilinen bu proteine "Avustralya antijeni-Au antijeni" adını

vermişlerdir. 1970’de Dane ve arkadaşları HBV’nun kısmen saflaştırılmış preparasyonlarının elektron mikroskopik incelemesinde üç değişik partiküle rastlamışlardır. Bunlardan infektif özelliğe sahip, 42 nm çapında olanlara “Dane partikülü” adı verilmiş ve sonraki yıllarda kor antijeni, DNA polimeraz ile viral DNA tanımlanmıştır (13). Bunu takip eden yıllarda hastalığın serolojisi, virolojisi ve immunolojisi hakkında önemli gelişmeler olmuştur

2.2. Sınıflandırma

HBV; *Hepadnaviridae* ailesinin Orthohepadnavirus cinsinde yer alan hepatotropik, zarflı ve kısmen çift sarmallı bir DNA virüsüdür. HBV’nin keşfinden sonra bazı memeli hayvanlar ile kuşlarda hepatite neden olan değişik yeni virusler bulunmuştur. 1978 yılında kronik aktif hepatit ve hepatomalı bir cins dağ sıçanı olan *Marmota monax* otopsislerinde sık bulunan ve *Woodchuck hepatitis virus* (WHV) adı verilen yeni bir virus keşfedilmiştir. 1980 yılında Kuzey California’da yaşayan ve *Spermophilus beecheyi* denilen vahşi yer sincaplarından *Ground squirrel hepatitis virus* (GSHV) izole edilmiştir. Yapılan nükleotid sekans analizleri; HBV ile GSHV ve morfolojik olarak insan HBV’sinden ayrılması çok zor olan WHV arasında yaklaşık % 70 benzerlik bulunduğu ortaya konmuştur. Sonraki yıllarda ise Amerika Birleşik Devletlerinde (A.B.D) ticari amaçla yetiştirilen HSK’li Pekin ördeklerinde Duck hepatitis B virus (DHBV) bulunmuştur (12)

WHV ve GSHV kendilerine özgü türler dışındaki diğer türlerde infeksiyon oluşturmadıkları halde HBV insanları ve şempanzeleri infekte etmektedir. WHV infeksiyonları kronik KC hastalığına ve HCC neden olurken, DHBV’nin hastalık yapıcı özelliği yoktur. Bu virusler, HBV’nun replikasyonu ve süregenliğinin nasıl olduğunu karakterize etmek amacı ile kullanılmaktadır (14)

Hepadnaviridae ailesinde bulunan viruslerin, konak farklılığı, viryon ince yapısı, polipeptid büyüklüğü, gen sayısı, genom nükleotid sekans homolojisi ve antijenik çapraz reaksiyonlar gibi birçok bakımdan; içinde memeli viruslerin bulunduğu orthohepadnavirus (HBV, WHV, GSHV) ve kanatlı viruslerin bulunduğu avihepadnavirus (DHBV) olmak üzere iki cins altında sınıflandırılması önerilmektedir.

Çizelge 2.1. Hepadnaviridae ailesi

	Orthohepadnavirus			Avihepadnavirus
	HBV	WHV	GSHV	DBHV
Büyüklik	42 nm	40-42 nm	40-42 nm	46-48 nm
Genom	3.2 kb	3.3 kb	3.3 kb	3.0 kb
Viral DNA	Tamamlanmamış	Tamamlanmamış	Tamamlanmamış	Tam
Zarf	L, M, S	L, M, S	L, M, S	L, S
Proteinleri				
Gen	S, C, P, X	S, C, P, X	S, C, P, X	S, C, P
Konak	İnsan, Şempanze	Dağsıçanı	Yer sincabı, Dağ sincabı, Amerika sincabı, Karaciğer	Ördek, Kaz, Balıkçıl
Replikasyon	Karaciğer, Böbrek, Pankreas, beyaz küreler	Karaciğer Böbrek, Pankreas, beyaz küreler, diğer	Karaciğer	Karaciğer, Böbrek, Pankreas, dalak, diğer
Hastalık	Asemptomatik taşıyıcılık, Hepatit, Siroz, HCC	Asemptomatik taşıyıcılık, Hepatit, HCC	Asemptomatik taşıyıcılık, Hepatit, HCC	Asemptomatik taşıyıcılık, Hepatit
Dağılım	Tüm dünya	Doğu A B D	Kaliforniya	Çin, A B D

(Kaynak 12'den alınmıştır)

2.3. Hepatit B Virusunun Genel Özellikleri

HBV, *Hepadnaviridae* ailesinin orthohepadnavirus cinsinde yer alan hepatotrofik, zarflı ve kısmen çift sarmallı bir DNA virusudur. Sadece 3200 nükleotidden oluşan genomik yapısı nedeniyle, bilinen tüm hayvan DNA virusleri içinde en küçük olanıdır. *Hepadnaviridae* ailesinin içinde insanlarda infeksiyon oluşturan tek virustur. HBV'nin kısmen saflaştırılmış preparasyonlarının elektron mikroskobu incelemesinde büyüklük, yapı ve miktar gibi değişik özellikleri bakımından birbirine benzemeyen üç tip viral partikül görülür (12, 14, 15).

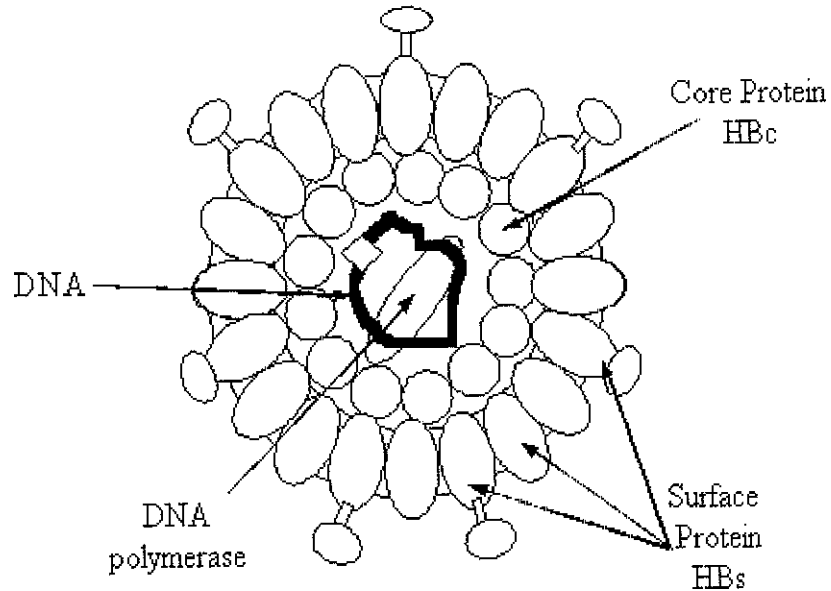
a-) Yaklaşık 42 nm çapında, infektif özellikte, tam bir viryon yapısında, küresel şekilli, Dane partikülleri.

Dane partikülleri elektron mikroskobunda 25-27 nm çapında elektron yoğun bir çekirdek ve yaklaşık 7 nm kalınlığında lipid zarf yapısı nedeniyle çift katmanlı olarak görünür.

b-)Yaklaşık 22 nm çapında, içinde nükleik asit bulunmayan, non infektif, küresel partiküller

c-)Özellikle replikasyonun söz konusu olduğu kişilerin serumunda bulunan, 22 nm çapında, 50-500 nm uzunluğunda nükleik asit ihtiva etmeyen, non infektif, tübüler partiküller.

Her üç tip partikülde immunojeniktir ve HBs antikorları ile reaksiyon verirler. İnfekte konak serumunda yüksek miktarda (200-500 mg/ml) saptanabilen HBsAg adı verilen ortak yüzey antijeni içerirler. İnfeksiyon oluşturma özelliği olmayan formlar daha fazla miktarda üretilir. Kanda dolaşan HBsAg'nin büyük kısmını 22nm'lik küresel partiküller oluşturur. Dane partiküllerinin sayısı 10^4 - 10^9 ml arasında iken, non-infektif küresel partiküllerin miktarı 10^{13} ml veya daha fazladır (16, 17, 14).



Şekil 2.1. Hepatit B Virusu

2.4. Genom Yapısı

HBV, kısmen çift sarmallı olan 3,2 kb uzunluğunda, sirküler DNA genomu içerir. DNA'nın molekül ağırlığı 2.3×10^6 dalton, G+C oranı ise %49'tur. HBV DNA; 3200 nükleotid taşıyan uzun (L veya negatif) ve 1800-2700 nükleotid içeren kısa (S veya pozitif) zincir olmak üzere iki sarmaldan meydana gelmiştir. Negatif zincir tam bir halka oluştururken, pozitif zincir daha kısa olup değişken uzunlukta bulunur. Bu zincirler ortak baz çiftlerine sahip olup, sirküler bir yapı

halinde bulunmakla beraber her birinin 3' ve 5' uçları birleşik olmadığından aslında lineer moleküllerdir. Negatif zincirin 5' ucunda, sentez sırasında "primer" olarak görev yapan kovalen bağlı terminal bir protein olan viral polimeraz , pozitif zincirin 5' ucunda ise aynı işlevi yerine getiren bir RNA oligomeri bulunur. Viral genomu bu yapısı gevşek sirküler DNA (rcDNA) olarak adlandırılır. Negatif zincirin 3' ucundaki 9-10 nükleotidlik artık uç viral replikasyon sırasında pozitif DNA zincirinin sentezindeki "template switching" işleminde DNA polimerazın da etkisi ile kısa zincirin tamamlanmasında ve sonuçta süper kıvrımlı, tamamen çift sarmallı, çember şeklindeki DNA molekülünün oluşumunda rol oynar (12, 13).

Viral DNA'nın yapısal bütünlüğü her iki zincirin 5' uçlarında bulunan koheziv bölgelerden birbirine tutunmalarıyla sağlanır. Bu bölgeler 10-12 nükleotidlik tekrarlanan dizinlerden meydana gelmiş sabit bölgeler olup, DR (direct repeats) olarak adlandırılırlar. HBV'de iki adet DR vardır. Uzun zincirin 5' ucu 1826. nükleotidde DR1 içinde, kısa olanın 5' ucu ise 1592. nükleotidde DR2 içinde yer alır. DR2 uzun zincirin 3' ucuna yakın bir yerde bulunur (14)

HBV'de genetik bilginin tamamı uzun zincir üzerinde kodlanmıştır. Bu zincir üzerinde S, C, X ve P kısaltmaları ile gösterilen farklı açık okuma çerçevelerine (open reading frame: ORF) sahip dört gen bölgesi vardır. ORF'lerin transkripsiyonu promoter ve enhancer denilen düzenleyici dizinler tarafından kontrol edilmektedir. HBV genomunda fonksiyonel olarak tanımlanmış en az dört promoter (pre-S1 prom, S prom, X prom ve pre-C prom) ve iki enhancer (Enh1 ve Enh2) bölgesi bulunmaktadır (12, 18). Promoter yapıları, RNA polimeraz ve transkripsiyon faktörlerinin doğru pozisyonlara bağlanmasını başlatan temel yapılarıdır. Memeli promoter yapıları TATA kutuları diye adlandırılan transkripsiyon faktörlerinin bağlanmasını sağlayan dizileri içerir. Bazı promoter yapıları üzerinde de TATA dizisinin görevine benzer görevler üstlenen minimal promoter yapıları vardır ve bu yapıları başlatıcı (initiator) denir. Bu yapıların, transkripsiyon başlama bölgelerinde yer aldığı düşünülmekte ve RNA sentezinin başlatılması işlevi gören çok sayıda protein bu yapıları bağlanmaktadır (19).

HBV DNA'daki genler arka arkaya dizilmiş ve birbirinden tamamen ayrı bölgelerde bulunmazlar. Aksine kayan çerçeveler esasına göre bazı bölgelerde iç içe geçmiş diğer bir deyişle birbiriyle çakışmış durumdadır. Genomun en uzun

geni olan P geni; X ve C genleri ile kısmen, S geni ile tamamen çakışmış halde bulunmakta, sonuçta uzun zincir 1,5 defa okunmaktadır. Bu özellik nedeniyle HBV en küçük genoma sahip olmakla birlikte, kendini kodlama kapasitesi en fazla olan virüstür (13, 17, 20).

Genom içerisinde proteinleri kodlayan genler:

1-S geni: Büyük (39 kD), orta (31 kD) ve küçük (24 kD) yüzey proteinlerini kodlar.

2-C geni: İki ayrı protein sentezlenir. Bunlar 21 kD'lık çekirdek proteini (HBcAg) ve 30 aminoasitlik preC ürününü taşıyan 16 kD'luk infektivite proteini (HBeAg)'dir.

3-P geni: DNA polimeraz, revers transkriptaz ve RNase H aktivitesine sahip olan viral polimeraz enzimini kodlar.

4-X geni: X proteinini kodlar.

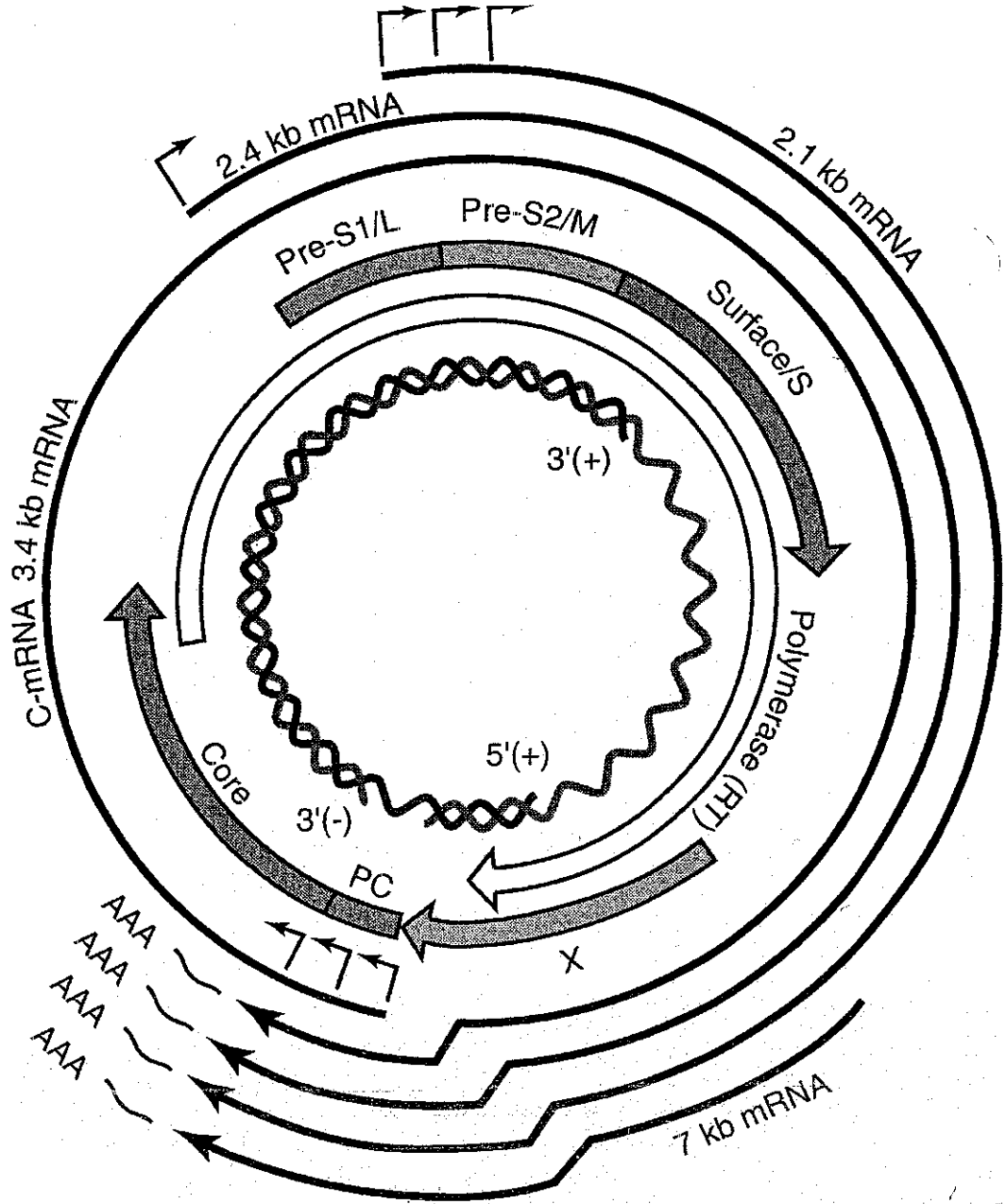
Aynı ORF içerisinde birden fazla başlangıç kodonu bulunmaktadır. S geni üzerinde pre-S1, pre-S2 ve S olmak üzere üç, C geni üzerinde ise pre-C ve C olmak üzere iki bölge bulunmakta; dolayısıyla farklı başlangıç kodonlarından sentezlenen proteinler de farklı olmaktadır. Bu nedenle HBV 4 adet ORF'e sahip olmasına rağmen yedi değişik polipeptid sentezlemektedir (10). Bu gen bölgelerinden viral komponentlerin sentezi 4 ayrı mRNA aracılığı ile olur (13, 14, 21).

1) 3,5 kb'lık mRNA: Negatif zincirden sentezlenen bu mRNA, hem genom replikasyonu için kalıp görevi görür, hem de precore/core ve polimeraz proteinlerini sentezletir.

2) 2,4 kb'lık mRNA: Üç ayrı başlangıç kodonu aracılığı ile küçük, orta ve büyük yüzey proteinlerini sentezletir. Okuma işlemi mRNA'nın amino terminalindeki ilk (başlangıç) kodondan başlarsa pre-S1 + pre-S2 + S bölgelerinin tümü okunacağından kılıfın büyük proteini (L protein: LHBs), S geni üzerindeki ikinci kodondan başlarsa pre-S2 + S bölgelerinin ürünü olan orta protein (M protein: MHBs) ve okuma işlemi sadece S bölgesini içerir ise kılıfın küçük proteini (S protein: SHBs) sentezlenir.

3) 2,1 kb'lık mRNA: Sadece preS2 ve S proteinlerini sentezletir.

4) 0,7 kb'lık mRNA: X proteinini sentezletir.



Şekil 2.2. Hepatit B Virüsünün Genom Yapısı

2.5. Virusun Replikasyonu

HBV'nin plazma yarı ömrü 24 saattir. Her gün vücutta bulunan viruslerin %50'si yeniden oluşur ve günlük virus üretimi 1011 virion kadardır (14). HBV'nin tek kanıtlanmış infeksiyon bölgesi hepatositlerdir. Safra kanalı epitel hücreleri, pankreasın bazı endokrin ve ekzokrin hücreleri, böbreğin proksimal tüp epitel hücreleri ve lenfoid doku da replikasyon bölgesi olabilir. Fakat hepatosit dışı replikasyon bölgelerinin viral patogeneizde rolü olmadığı düşünülmektedir.

Lenfositteki replikasyon virus persistansı için ikincil bir rezervuar olabilir (14, 21).

HBV'nin konak hücreye bağlanmasında fibronektin, transferin reseptörü, apolipoprotein H, polimerize insan serum albumini, pre S2 glikan, HBV bağlayan faktör gibi birçok reseptör tanımlanmıştır. Son yıllarda her ne kadar, S proteinine özgü bazı reseptörlerin (endonexin II, siyaloglikoprotein gibi) varlığı gösterilmiş olsa da, HBV'nin hepatositlere tutunmasında L ve M proteinlerinde önemli olduğu saptanmıştır. Pre-S1 ürünü olan L proteini KC plazma membranına ve mononükleer hücrelere bağlanırken, Pre-S2 ürünü olan M proteini ise serum albüminine bağlanarak hepatositlere tutunur. Viral tutunmayı takiben reseptör bağımlı endositoz yoluyla ile virus hücre içine girer ve nükleokapsid pasif difüzyon veya tübuler taşınım ile işlenmeden konak hücre çekirdeğine taşınır. Kısmen çift sarmallı ve her iki ucu serbest halde bulunan DNA'nın kısa sarmalının eksik olan bölümü endojen DNA polimeraz tarafından tamamlanır. Negatif zincirin 5' ucuna tutunmuş olan viral polimeraz, pozitif zincirin 5' ucuna tutunmuş olan kısa RNA dizisinden başlayarak pozitif zinciri tamamlar ve sonuçta tam uzunlukta gevşek sirküler (relaxed circular rc) DNA meydana getirilmektedir. Bu sırada uzun zincirin 5' ve 3' uçları arasındaki açıklıkta onarılmış ve sonuçta tümüyle çift sarmallı, süper kıvrımlı, uçları kovalen bağlarla kapanmış sirküler yapıda bir HBV DNA (covalently closed circular DNA: cccDNA) meydana gelir. Virus infeksiyonundan 24 saat sonra KC'de cccDNA oluşumu gösterilmiştir. Replikasyonun normal seyrinde HBV DNA'nın konak genomuna integrasyonu görülmez (12, 18, 19).

Kalıp olarak cccDNA'dan konak hücre RNA polimerazın (RNA polimeraz II) yardımı ve viral düzenleyicilerin (4 adet promoter, 2 adet enhancer) etkisiyle mRNA'lar sentezlenir. HBV'nde fonksiyonu bilinen 4 adet mRNA transkripti mevcuttur. "Core promoter" bölgesi viral replikasyonun merkezidir ve negatif zincirden 2.1, 2.4 ve 3.5 kb uzunluğunda mRNA'lar kopyalanır. Genomdan daha uzun olan 3.5kb'lık transkript pregenomik RNA (pgRNA) olarak adlandırılmakta ve hem viral replikasyondan hem de preC/C ve polimeraz proteinlerinin ekspresyonundan sorumludur.

Sentezlenen mRNA'lar sitoplazmaya taşınır ve viral proteinleri üretmek için translasyona uğrar. pgRNA önce 200-300 molekül çekirdek proteini sentezletir, sonra polimeraz sentezine izin verir. Bu sırada 2.4 ve 2.1 kb'lık mRNA'lar üç farklı başlangıç kodonundan translasyona uğrayarak, S (surface) antijeninin üç formunu meydana getirirler. Polimeraz sentezi pgRNA'nın kor bölgesi içinde kalan bir başlangıç kodonundan başlar. Sentezlenen polimeraz kendi mRNA'sının 5' ucuna bağlanarak revers transkripsiyonu başlatır ve aynı anda çekirdek içine yerleşir. Polimerazın sentezlenmesi pgRNA sentezini durdurur. pgRNA'nın 5' ucunda bulunan enkapsidasyon dizisi (e-dizisi) adı verilen nükleotid dizileri viral polimeraz enzimini bağlar ve viral korun yapımı başlar (22). Çekirdek proteinleri ikişer ikişer bir araya gelir, disülfid bağları ile stabilize olur. Bu birimlerden 120 tanesi biraraya gelerek ikozahedral kapsidi oluşturur. En kapsidasyon dizisi taşıyan pgRNA'lar kapsid içine yerleşir ve pgRNA'dan revers transkripsiyon ile negatif DNA zincirinin sentezi; viral çekirdek içinde sitoplazmada gerçekleşir. Bu olayda enkapsidasyon dizisi çekirdek içine bir kopya nükleik asit yerleşmesini sağladığı gibi viral DNA sentezini başlatmada da rol oynar. Negatif DNA sentezlendikten sonra viral polimerazın RNase H aktivitesi ile pgRNA yıkılır ancak bu sindirme tamamlanmaz ve 5' uçta kısa bir oligoribonükleotid, primer olarak bırakılır ve DNA polimeraz aktivitesi ile 5' ucundaki RNA primeri kullanılarak pozitif zincir sentezlenir. Pozitif zincir sentezi için negatif zincirin 5' ucundaki DR1 bölgesindeki primer DR2 bölgesine taşınır ve pozitif zincir sentezi buradan başlar. Her iki zincirin 5' uçları bu nedenle farklıdır. Genomun sirkülasyonu negatif zincirin 3' ucundaki 9-10 nükleotidlik terminal artık sayesinde olur. Kısmen çift sarmallı sirküler yapıdaki kor kısmının kılıf proteinleri tarafından çevrelenmesi ve aynı zamanda polimerazında tükenmesi nedeniyle pozitif zincirin sentezi tamamlanamaz ve eksik olarak kalır. Her iki zincir 5' uçlarından bağlanarak 1cDNA sentezi tamamlanmış olur (12, 14, 17, 20, 23).

2.6. Viral Proteinler

2.6.1. Kılıf Yüzey Proteinleri

2.1 ve 2.4 kb'lık mRNA'lardan sentezlenen kılıf (yüzey) proteinleri hem dane partiküllerinin hem de infekte hastaların KC ve serumunda saptanan 22nm

çapındaki küresel ve tübüler partiküllerin yapısında bulunmaktadır. Yüzey proteinleri değişik molekül ağırlıklarında (24000-42000 dalton) glikolize ve nonglikolize altı farklı polipeptidin değişik oranlarda biraraya gelmesi ile oluşur. Bu proteinlerdeki farklılıklar sentezin aynı gen üzerindeki farklı başlangıç kodonlarından başlaması nedeniyle olmaktadır (12).

Üç ayı başlangıç kodonu aracılığı ile küçük, orta ve büyük yüzey proteinleri sentezlenir. Okuma işlemi gen üzerindeki ilk kodondan başlarsa pre-S1 + pre-S2 + S bölgelerinin tümü okunacağından kılıfın büyük proteini (L protein: LHBs) sentezlenir. 389 aminoasitten oluşmuş olup glikolize edilmiş formu 42 kDa ağırlığındadır. LHBs, Dane partiküllerinin yüzeyinde en fazla, tübüler partikül kılıfında orta miktarda, küçük küresel partiküllerde ise çok az miktarda bulunur. Virusun konak hücreye tutunmasında L proteininin rolü olduğuna inanılmaktadır. 22 nm'lik küresel partiküllerden 1000-1000000 kat daha az sayıda olan viryonlarda diğer partiküllerden farklı olarak daha fazla miktarda L proteinin yer alması konak hücre reseptörlerine bağlanmada Dane partiküllerini avantajlı hale getirir. Yapılan çalışmalarda LHBs'nin 21-47 aminoasitleri arasındaki bölgenin hepatositlere tutunma özelliğine sahip olduğu ve bu bölgeye karşı oluşan antikorların bağlanmayı engellediği gösterilmiştir.(12).

Aseptomatik HBsAg taşıyıcılarında düşük düzeyde ama devamlı üretilen LHBs'nin hepatositlerde lezyon oluşumuna ve HSK gelişimine neden olabileceği düşünülmektedir. Hücreden dışarı salınmayan ve hepatosit içinde biriken L proteini endoplazmik retikulumda dilatasyona neden olmakta, hücreler balonlaşmakta, hidropik ve eozinofilik özellik kazanarak buzlu cam (ground glass) görünümü almakta, sonuçta koagülasyon nekrozu ile hücreler ölmektedir. HBV replikasyonu sırasında endoplazmik retikulum zarına transmembranöz olarak yerleşen L proteininin iç kısmında kalan dizileri, nükleokapsidin zarının kazanmasını sağlarken; membran dışına yerleşen dizileri, virusun infekte edeceği hücre için reseptör görevini üstlenir (14).

Okuma işlemi S geni üzerindeki ikinci kodondan başlarsa pre-S2 + S bölgelerinin ürünü olan orta protein (M protein: MHBs) sentezlenir. Bu protein 281 aminoasitten oluşmuş olup, glikolize formu 36 kDa ağırlığındadır. MHBs'nin miktarı viryon ve tübüler partiküllerde en az, 22 nm'lik küresel partiküllerde ise

LHBs'den biraz daha fazladır. Replikasyonun olmadığı durumlarda HBsAg içinde yer almaz. Bu nedenle pre-S2 antijeninin varlığı viral replikasyonun bir göstergesidir (12)

M proteininin 120 ile 153 aminoasitleri arasındaki bölgeye karşı oluşan antikorların enfeksiyona karşı koruyucu özellikte olduğu gösterilmiştir. Bundan dolayı; enfeksiyonun erken döneminde ortaya çıkan L ve M proteinlerine karşı gelişen antikorların gösterilmesi iyileşmenin haberci olarak kabul edilmektedir (20).

Okuma işlemi sadece S bölgesini içerir ise kılıfın küçük proteini (S protein: SHBs) sentezlenir. 226 aminoasitten oluşmuş, glikolize edilmiş formu 27 kDa ağırlığındadır. HBsAg'nin büyük kısmını oluşturan SHBs kılıfın major proteini olarak bilinir ve B lenfositleri için epitopik bölgeye sahiptir. Kanda dolaşan S geni ürünlerinin yaklaşık %5-15'i M, %1-2'si L ve geri kalanı S proteininden oluşmaktadır. Her üç partikül tipinde de predominant olan SHBs proteindir (12).

S proteinini oluşturan aminoasitlerin belli bölgelerdeki diziliş farklılıklarına göre HBsAg üzerinde 5 antijenik determinant (a, d, y, w, i) saptanmıştır. Bütün subtiplerde ortak olan a determinantına karşı oluşan antikorlar HBV'nin hepatositlere bağlanmasını engeller ve tüm subtiplere karşı etkili bir bağışıklık sağlar. S proteininin 120-147. aminoasitleri arasında yer alan a determinantı virus yüzeyinde iki ilmik oluşturur. Nötralizan antikorlar için hedef majör determinantlar 139-147. aminoasitler arasındaki ikinci ilmiktir. Yapılan çalışmalar da; içinde sadece S proteini bulunan plazma aşılarının HBV'ne karşı etkili bir bağışıklama oluşturduğunu göstermiştir (24). HBsAg'nin diğer iki determinantından biri 122. aminoasitte olup lizin varsa "d" arjinin varsa "y" özgülüğünde, diğeri ise 160. aminoasitte olup lizin varsa "w" arjinin varsa "i" özgülüğündedir. Bu beş determinantın kombinasyonları ile 4 ana serotip oluşmaktadır: adw, ayw, adr, ayr "w" determinantının 4 ayrı antijenik çeşitliliği nedeniyle subtipler sekize ulaşmıştır. Daha sonra "q" determinantının saptanmasıyla bugün için dokuz ayrı HBV subtipi bilinmektedir. Bunlar, ayw1, ayw2, ayw3, ayw4, ayr, adw2, adw4, adrq+, adrq- subtipleridir. Subtiplerin saptanması epidemiyolojik çalışmalarda enfeksiyon kaynağının belirlenmesi ve

bireyler veya toplumlar arasındaki yayılımının izlenmesi açısından önem taşır (13, 14, 17).

2.6.2. Kor Proteinleri

Pre-C (nükleotid 1816) ve C (nükleotid 1903) olmak üzere 2 bölgeye ayrılan C geni, antijenik özellikleri farklı HBeAg ile HBcAg'ı sentezleme yeteneğine sahiptir. Her iki bölgeye ait stop kodon aynı nükleotidde (nükleotid 2452) bulunur. Böylece protein sentezi sırasında okuma işlemi hangi başlangıç kodonundan başlarsa başlasın aynı ortak noktada sonlanır. Pre-C'den başlayan okuma işleminde her iki bölgede okunarak 212 aminoasitten oluşan, 25 kDa molekül ağırlığında bir polipeptid sentezlenir. İşlenmemiş haldeki bu proteinin aminoasit sekansı: N terminal ucunda yer alan 29 aminoasitlik ek parça dışında, HBcAg sekansı ile tamamen benzerdir. Bu ek sekans, pre-C polipeptidini endoplazmik retikuluma yönlendiren sinyali oluşturur. Burada konak proteazları tarafından karboksi terminal bölgesindeki 34 aminoasitlik bölüm kesintiye uğrar ve işlenmiş protein haline gelerek ya golgi cisimciği üzerinden HBeAg olarak salgıya ya da nukleusa yönlendirilir (12)

HBeAg ile HBcAg ortak determinantlar içerir. Kanda dolaşan HBeAg spesifik olarak serum albumini, immunglobulin ve α antitripsine bağlanma özelliğine sahip olduğundan yapısındaki HBcAg ile ilgili determinantlar maskelenir ve özgül olarak anti HBe'ye bağlanabilirken, anti HBc ile reaksiyona girmez. HBcAg, viral DNA'ya sıkıca bağlı bir molekül olduğundan anti HBc ile reaksiyona girebilmesi ancak kor partiküllerinin parçalanması ve serbest polipeptid zincirlerinin açığa çıkması ile mümkün olabilmektedir. HBeAg'nin tam fonksiyonu bilinmemekle birlikte replikasyon için gerekli olmadığı ispatlanmıştır (10).

C geninin 1903 ile 2452 nükleotidleri arasında yer alan C bölgesi ise 183 aminoasitten oluşan bir polipeptid sentezler. Bu polipeptidin ön kısmı 29 aminoasitlik ek sekanstan mahrum olduğu için endoplazmik retikuluma gidemez ve konak hücre sitoplazmasında kalır. Burada modifikasyona uğrayan polipeptid HBcAg olarak bilinen yapı haline gelir ve karboksi terminal ucundaki argininden zengin 34 aminoasitlik kısım sayesinde viral DNA'ya sıkıca bağlanır. Yüksek derecede saflaştırılmış viryon korlarında ve HBV ile infekte hasta hepatositlerinde

gösterilen HBcAg sıklıkla intranükleer yerleşimlidir. Ancak aktif hastalık döneminde ve aşırı viral replikasyon durumunda sitoplazmada da saptanabilir (17).

HBeAg seruma salındığı halde, HBcAg için böyle bir durum söz konusu olmadığı için dolaşımında serbest HBcAg'ye rastlanmaz. Fakat kanda sadece Dane partiküllerinin içinde bulunur. Eğer viryon parçalanır ise HBcAg serbestleşir. Serolojik tanıda HBcAg'nin saptanmaya çalışılması uygun değildir. Çünkü yapılan çalışmalar; infeksiyonun doğal seyri sırasında çok kısa bir sürede olsa, serumda serbest halde bulunan HBcAg'nin hızla Anti HBc ile birleşip kompleks oluşturup serumdan uzaklaştırıldığını göstermiştir (18).

2.6.3. P Proteini

HBV genomunun yaklaşık $\frac{3}{4}$ 'ünü kaplayan en uzun genidir. 2309 ile 1623 nükleotidleri arasında yer alan P geni; 832 aminoasitten oluşmuş, 92 kDa molekül ağırlığında olan bir protein sentezler.

P proteini; revers transkriptaz, endonükleaz aktivitesi olan RNase H ve hem DNA hem de RNA'ya bağımlı polimeraz aktivitesine sahiptir. P proteininin immunojenik özelliği vardır (14)

2.6.4. X Proteini

HBV genomunda 1376 ile 1838 nükleotidler arasında yer alan en küçük gen bölgesidir X geni tarafından sentezlenen HBxAg 154 aminoasitten oluşur ve 16 kDa molekül ağırlığındadır. Doğal infeksiyondaki rolü tam bilinmemesine karşın virus replikasyonu için gereklidir (21). İn vitro olarak viral genleri ve konak MHC genlerini aktive ettiği gösterilmiştir. Viral genom transkripsiyonu için gerekli olan bu protein aynı zamanda kronik infeksiyonda HSK gelişmesinde sorumludur. HBxAg, birçok promoter bölgeyi aktive etmekte, viral RNA'nın stabilitesini sağlamakta, hücre büyümesini ve apoptotik hücre ölümünü etkilemektedir. Sitoplazmada mitojenik sinyal yolunu aktive ederek, çekirdekte transkripsiyon faktörlerini etkileyerek ve tümör supressör gen ürününün işlevini bozarak hepatokarsinogenez sürecini desteklemektedir (25). HBxAg'e ait sentetik peptidler, hasta serumlarında anti HBx antikorlarının saptanmasında kullanılmıştır ve bu markerin HCC'nin erken saptanmasında yararlı olabileceği bildirilmiştir (26).

2.7. Duyarlılık-Dirençlilik

HBV, serum içinde 30-32°C'de 6 ay, -20°C'de ise 15 yıl canlılığını korur. Serum içinde 60°C'ye 4 saat, albumin içinde ise aynı ısıya 10 saat dayanır. Kuru sıcak hava ile 180°C'de 1 saatte, otoklavda 121°C'de ve 0.5 atm basınç altında 20 dakikada, kaynatma ile 10-20 dakikada inaktive olur. Kimyasal ajanlardan; %0.1-0.2 glutaraldehid, %0.1-0.5'lik sodyum hipoklorid (veya 500 ppm serbest klor), %70 izopropil veya %80 etil alkol virüsü 2 dakikada inaktive eder (14, 27).

2.8. HBV Genotipleri

Birbirine benzerlik oranı %92 ve daha fazla olan HBV suşları aynı grupta toplanarak A'dan G'ye kadar 7 farklı genotip belirlenmiştir. Genotipler, birbirlerinden en az %8'lik bir nükleotid farklılığı göstermektedir (28). Bu genotipler belli coğrafi dağılımlar göstermektedir.

Çizelge 2.2. HBV genotip ve subtiplerinin coğrafi dağılımları

GENOTİP	SUBTİP	COĞRAFİ DAĞILIM
A	adw2, ayw1	Kuzeybatı Avrupa, A B D., Sahra altı Afrika
B	adw2, ayw1	Tayvan, Japonya, Endonezya, Çin, Vietnam
C	adw2, adrq+, adrq-, ayı	Doğu Asya, Tayvan, Kore, Çin, Japonya, Polenezya, Vietnam
D	ayw2, ayw3	Akdeniz bölgesi, Hindistan, Batı Afrika
E	ayw4	Batı Afrika
F	ayw4q-, adw2, ayw4	Orta ve Güney Amerika
G	adw2	Fransa, A B D

(Kaynak 19'dan alınmıştır)

2.9. HBV Mutasyonları

HBV ile infekte kişilerde infeksiyon yaşı büyüdükçe viral popülasyonda mutant viruslerin ortaya çıkışı artmaktadır. HBV'nin mutasyon hızı diğer DNA viruslerinden 10-100 kat daha fazladır. Her yıl için, her genom bölgesinde 10^4 ile 10^5 nükleotid yer değişimi olduğu tahmin edilmektedir. Bu yüksek mutasyon oranı HBV'nin RNA aracısı kullanarak revers transkripsiyonla replike olmasına

bağlıdır. Revers transkriptaz enziminin ilk okuma yeteneğindeki zayıflık nedeni ile, bu aşamada nükleotid yerleşiminde yanlışlıklar meydana gelmekte ve viral polimerazın düzeltme mekanizması olmadığından replikasyon sırasında oluşan hatalar düzeltilememektedir (29).

Doğal olarak oluşan mutasyonlar dışındaki çoğu mutasyon konakçının immun sisteminin baskısı sonucu ortaya çıkar. Bunlar konakçı spesifik antijen içeren aşılarda ile aşılandığında veya direkt olarak monoklonal veya poliklonal immun tedavi alındığında ortaya çıkmaktadır (12).

HBV mutasyon türleri;

1-Prekor, kor promoter ve kor gen mutasyonları,

2-Yüzey gen mutasyonları,

3-Polimeraz gen mutasyonları,

4-X geni mutasyonlarıdır

2.9.1. Prekor, Kor Promoter ve Kor Gen Mutasyonları

Prekor bölgesinde viral replikasyon için kritik olan enkapsidasyon sinyali taşıyan epsilon bölgesinin stem loop yapısı vardır. Bu bölge, aynı zincir üzerinde oluşan baz çiftleşmelerine bağlı olarak oluşan sekonder yapıya sahiptir. Epsilon bölgesinde çeşitli mutasyonlar tanımlanmış olmakla beraber en sık görüleni 1896 nolu nükleotiddeki guaninin (G) yerine adenin (A) gelmesidir (N). Bu mutasyon sonucu triptofan kodonu (TGG) yerine bir stop kodon (TAG) kodlanmış olduğundan HBeAg sentezlenemez ve yerine güdük bir protein oluşur. Bu nokta mutasyonu kor bölgesinin start kodonundan önce meydana geldiğinden ve HBeAg ile HBcAg farklı mRNA moleküllerinden sentezlendiğinden HBeAg üretilmez ancak HBcAg'nin sentezi devam eder. Prekor mutantın ortaya çıkması daha çok enkapsidasyon sinyalinde stabilizasyonu artırmak amaçlı görünmektedir. Böylece virus, viral replikasyon için avantaj sağlar. Çünkü prekor mutasyonu viral replikasyonu etkilemez aksine replikasyon yeteneğine sahip HBeAg negatif mutantların ortaya çıkmasına neden olur. HBeAg'nin gerçek fonksiyonu tam olarak bilinmemektedir. 1896 nolu nükleotidin baz çiftleşmesi oluşturduğu nükleotid 1858 nolu nükleotiddir. Burada timin (T) veya sitozin (C) olması, 1896 nolu nükleotidde G'den A'ya değişim olup olmayacağını belirler. T ve A daha iyi bir baz çiftleşmesi oluşturduğundan, 1858 nolu nükleotidde T içeren genotiplerde

bu mutasyon virus stabilitesini artırıp virusa yarar sağlayacaktır. Oysa 1858 nolu nükleotidde C içeren genotiplerde bu mutasyonun ortaya çıkması, stem loop'un stabilitesini bozacaktır (30) Prekor stop kodon mutasyonu 1858. nükleotidde T içeren genotip D, B ve C'nin bazı varyantlarında ortaya çıkabilirken, 1858 nükleotidde C içeren genotip A da nadiren ortaya çıkar. Bundan dolayı genotip D'nin dominant olduğu Akdeniz bölgesinde prekor mutant daha sık görülmektedir (31)

HBV'na bağlı KC hasarı infekte hepatositlere karşı oluşan immun yanıt sonucu oluşmaktadır. Viral invazyon konakçıda kompleks immun cevapları uyarır. Doğal immun cevap fagositleri, doğal öldürücü hücreleri (NK) ve kompleman sistemini içerir. Kazanılmış immun sistem ise antikor oluşturan B lenfositleri, T yardımcı hücreleri (CD4+ lenfositler), sitotoksik T hücreleri (CD8+ lenfositler) ve makrofaj veya dendritik hücreleri içeren antijen sunan hücreleri (APC) içerir. Antikorlar zarf proteini ile birlikte viral proteinlere tutunur ve dolaşımdaki viral partiküllerin atılmasını sağlarlar. CD4 T lenfositleri, APC'lerin yüzeyindeki MHC sınıf 2 molekülleri ile birlikte sunulan viral antijenleri tanır, çoğalır ve antiviral humoral ve hücresele cevapları uyaran sitokinleri üretir. CD8 T lenfositleri MHC sınıf 1 moleküllerine bağlı viral antijenleri tanır ve uyarılarak APC'leri parçalar veya sitokinler oluşturur. Kronik hepatit B'li hastalarda konakçının normal savunma stratejisi başarısızlığa uğramıştır. İnfekte hepatositlere karşı oluşan yetersiz immun reaksiyon ya immun sistemin yetersiz fonksiyon görmesine ya da mutantların oluşumuna da dahil olmak üzere HBV'nin yaşama stratejilerine bağlı olabilir. Virus konakçı için erken dönemde bir tehdit oluşturmaz çünkü sitopatik değildir. Tersine hepatosit yüzeyindeki HBV antijenlerine karşı yetersiz immun cevap uzun dönemde konakçı için potansiyel tehdittir. Sonuç olarak kronikleşme hem virusun hem de konakçının yaşamını sürdürdüğü dinamik bir denge durumudur. Böylece HBV infeksiyonunun sonuçlandığı tüm klinik durumlar içerisinde kronikleşme virus için en iyi durumdur (32).

Aynı gen bölgesinden sentezlendiği için HBeAg ile HBcAg arasında yüksek oranda homoloji vardır ve ortak immunolojik determinantlara sahiptirler. Her iki molekülde hem sitotoksik T lenfosit (CTL) hem de antikor bağımlı

hücrel sitotoksiste (ADCC) için hedefdir HBeAg'nın antijenitesi düşüktür ve transgenik fareler HBeAg'e karşı antikor oluşturamaz. Anti HBe serokonversiyonu geç gelişir ve HBeAg'nin kaybolmasını takiben ortaya çıkar. HBeAg karşı tercihan anti-viral mekanizmayı inhibe eden Th2 tipi bir immun yanıt gelişir. Bunun sonucunda viral replikasyon devam eder bu da neonatal infeksiyonlardaki toleransı açıklar (33).

HBeAg'nın ise immunojenisitesi çok yüksektir. Hem T hücrelerini hem de virus spesifik B hücrelerini indükleyerek HBc Ab'larını oluşturur. Yüksek titrede Anti HBc yanıtı olur. Anti HBc erkenden ortaya çıkar, titresi uzun zamanda yavaş yavaş azalır. HBeAg, antiviral mekanizma tetikleyen Th1 benzeri bir immun yanıtı indükler Bu nedenle HBeAg/HBeAg spesifik Th1/Th2 hücre dengesi, KC hasarını ve viral klirensi regüle etmektedir (32, 33)

Akut viral hepatit B infeksiyonunun doğal seyri sırasında HBeAg pozitif hepatositlerin eliminasyonu devam ederken düşük oranda HBeAg negatif mutant suşlar ortaya çıkabilir ancak bunlar HBV epitoplarına karşı oluşan sitotoksik T lenfositler (CTL) tarafından elimine edilir. Bundan dolayı akut viral hepatit B'de bu mutantların dominant hale gelmesi olağan değildir. Ancak bulaş sırasında HBeAg negatif/ HBeAg pozitif virus oranı yüksekse ve/veya prekor stop kodon mutantlarının ortaya çıkışını engelleyen CTL etkinliğinde bozukluk var ise prekor stop kodon mutantlarına bağlı akut viral hepatit B gelişebilir "e minus" olarak adlandırılan prekor stop kodon mutantları inaktif HBV taşıyıcılarında, kronik viral hepatit B'li olgularda, ciddi KC hastalığı olanlarda ve fulminan hepatitli hastalarda gösterilmiştir. Bu mutant virusların fulminan hepatit ve hızlı progresyon gösteren kronik hepatit gibi ağır klinik tablolara neden olmasındaki başlıca mekanizmalar şunlardır (14, 32, 33):

1-Serumda HBeAg'nin olmaması nedeniyle hepatosit yüzeyine eksprese edilen HBeAg'e karşı oluşan artmış immünolojik yanıt,

2-Mutasyon sonucu HBeAg yerine güdük bir peptidin sentezlenmesi ve bu eksik peptidin direkt sitopatik etkisi,

3-Mutant virusun viral paketlenmeyi sağlayan enkapsidasyon sinyalini kodlayan bölgesinde oluşan daha stabil yapı nedeniyle wild tip virusa göre

replikasyon üstünlüğü kazanması ve daha fazla HBcAg sentezleyerek sitopatik etki göstermesi.

Kor promoter mutasyonları: HBV'nin replikasyonu ve morfogenezinde en önemli rolü üstlenen gen bölgesi kor promoter bölgesidir. X geninin 3' terminalinde yer alır ve pgRNA ile prekor mRNA'nın transkripsiyonunu kontrol eder. Kor proteininin ekspresyonunu posttranskripsiyonel olarak düzenler (34). Bu bölgede oluşan mutasyonlar HBeAg sentezini baskılayıp bloke etmektedir. Bu bölgede A1762T ve G1764A olmak üzere iki önemli nokta mutasyonu vardır. Böylece HBeAg sentezlenen mRNA'nın transkripsiyonu azalmaktadır.

HBV mutasyonlarının genotipler ile ilişkisi olduğu gösterilmiştir. Prekor 1896 mutasyonu genotip A'da nadirdir. Dolayısıyla genotip A'nın prevalans olduğu yerlerde (Fransa, İngiltere, A.B.D) fulminan Hepatit B'ye, sıklıkla kor promoter bölge mutasyonu olan HBV suşları neden olmaktadır. Kor promoter 1762 mutasyonu ise 1858 nolu nükleotidde C içeren genotip C'de T içeren genotip B'e göre daha fazladır ve daha ağır inflamasyona neden olmaktadır. Böylece prekor ve kor promoter mutasyonları sıklıkları coğrafi bölgeden bölgeye değişmek üzere HBeAg negatif infeksiyondan sorumlu majör mutasyonlar olarak kabul edilir (31).

2.9.2. Yüzey Gen Mutasyonları

HBV'ye karşı nötralizan antikor yanıtına neden olan "a" determinantındaki 124-147. aminoasitler arası bölge tüm subtiplerde oldukça iyi korunmuştur. "a" determinantına karşı oluşan antikorlar HBV'nin hepatositlere bağlanmasını engeller. Özellikle 145. pozisyonda bulunan glisin yerine arjinin gelmesi viruste büyük antijenik değişikliklere neden olur. Böylece virus HBsAb'nın nötralizan etkisinden kurtulur ve replikasyonuna devam eder. Rekombinant HBsAg içeren aşılarda immünize edilen çocuklarda HBsAg ve HBsAb birlikteliği ile görülen bu mutant kökenler aşı ile indüklenmiş "kaçak mutantlar" olarak adlandırılır. Bu mutasyonların majör önemi aşya dirençli varyantların ve HBIG tedavisi altında pasif profilaksiden kaçabilen varyantların ortaya çıkışıdır. Özellikle KC transplant hastalarında HBV nüksünü önlemek amacıyla uygulanan HBIG tedavisini sırasında da mutasyon geliştiği ve HBV nüksüne yol açabildiği çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir (29).

2.9.3. Polimeraz Gen Mutasyonları

Polimeraz gen mutasyonları lamivudin, famsiklovir gibi viral revers transkriptaz inhibitörü olan ilaçlarla tedavi sonrasında görülmeye başlanmıştır. Lamuvidin HBV replikasyonunu etkin bir şekilde baskılayarak HBV DNA seviyesini düşürür. Polimeraz geninin revers transkriptaz bölgesinin C katlantısındaki tirozin-methionin-aspartat-aspartat (YMDD) motifi, lamuvidinin etki bölgesidir ve lamuvidine esas direnç sağlayan mutasyonlar bu bölgede ortaya çıkar. En sık görülen mutasyon 552. kodondaki methionin yerine izolösin (M552I) veya valin (M552V) gelmesidir. Bunun yanında B katlantısında lösin yerine methionin (L528M), valin yerine lösin (V521L) gelmesi görülen diğer mutasyonlardır. Tüm bu mutasyonlar revers transkriptaz enziminin nükleotid bağlayan katalitik bölgesini etkilemekte ve lamuvidin dışında diğer revers transkriptaz inhibitörlerine de direnç gelişmesine neden olmaktadır (31, 12).

YMDD mutantları 6 aydan kısa süreli lamivudin tedavisi alanlarda veya hiç tedavi almayanlarda gösterilememiştir. Tedavi süresi uzadıkça mutasyon oranı artmakta ve mutant virus popülasyona hakim olmaktadır (14).

2.10. HBV Bulaşma Yolları ve Epidemiyolojisi

HBV'e bağlı akut hepatitin ortalama %5'inin kronikleştiği ve bunların önemli bir bölümünün siroza dönüştüğü; sirozlu olgularda da HCC gelişme riskinin oldukça yüksek olduğu bilinen bir gerçektir (35).

Tek önemli rezervuarı insan olan HBV'nin yayılmasında taşıyıcılık kavramı oldukça önemlidir. Bütün dünyada 400-500 milyon taşıyıcı olduğu sanılmaktadır. Taşıyıcılar dışında kronik hastalar ve akut infeksiyon geçiren bireyler de bulaşma açısından önemlidir.

HBV'nin 4 ana bulaş yolu vardır:

1-Parenteral yol: En önemli bulaş yoludur. Virusun perkutan yolla bulaşı, kan ve kan ürünlerinin transfüzyonu, hemodiyaliz, endoskopi, mekanik ventilasyon gibi tıbbi aletlerin kullanımı, akupunktur, dövme, kulak delme ve ortak enjektör kullanımı ile olmaktadır (36).

2-Cinsel yolla bulaşma: Kan ve kan ürünleri dışında semen, tükürük, idrar, feçes, ter, gözyaşı, vajinal salgılar, sinoviyal sıvılar, beyin omurilik sıvısı ve kordon kanında da virus varlığı gösterilmiştir. Tükürük ve semen bulaşmada

önemli iken diğer salgılarda virus konsantrasyonu çok daha düşük olduğundan bulaşmada önemli rol oynamaz. Bundan dolayı HBV taşıyıcılarının cinsel partnerleri en çok tehlike altında olanlardır. Homoseksüeller arası cinsel temas en riskli seksüel bulaş yoludur. Travmatik ilişkiler, multipl partner veya başka bir cinsel hastalığın bulunması riski daha da arttırır (35).

3-Perinatal bulaş: Taşıyıcı anneden bebeğe bulaş transplasental (%5-10), perinatal veya postnatal olmaktadır. Bulaşma en sık doğum esnasında veya doğum sonrasında oluşan deri veya mukoza sıyrıklarının infekte anne sıvılarıyla teması, vajinal kanaldan geçerken anne kanının yutulması, sezaryen sırasında anne kanıyla temas veya plasenta hasarı sonucu maternal dolaşımın fötal dolaşıma karışması gibi nedenlerle olur. HBeAg pozitif annelerden bulaşma daha yüksek orandadır (14, 35).

4-Horizontal bulaş: İnfekte kişilerle cinsellik içermeyen yakın temas sonucu görülen bulaştır. Mekanizması tam açıklanamamakla birlikte HBV hepatositler dışında mononükleer hücreler içinde de replike olabilmektedir bundan dolayı çok küçük miktardaki kanın veya tükürük gibi vücut sıvılarının defektli deriyle teması bulaşmada rol oynar. Horizontal yol özellikle ev içi bulaşta önemlidir. Özellikle kanla bulaşmışlığa bağlı olarak havlu, jilet, traş makinesi, diş fırçası, banyo malzemesi gibi günlük eşyaların ortak kullanımı horizontal bulaşmaya neden olur (12).

Ülkemizde gebelerde HBsAg pozitifliğine rağmen HBeAg pozitifliğinin düşük olması vertikal bulaşma oranını düşürmektedir. Buna karşılık aile içi, okul içi ve kapalı topluluklar içi yakın temasa bağlı horizontal geçiş temel bulaşım yoludur. Bundan dolayı ülkemizde bulaşmanın önemli kısmı çocukluk ve genç erişkinlik dönemlerinde olmaktadır (11).

2.11. HBV Seroprevalansı

HBV infeksiyonunun dünyadaki dağılımı coğrafi bölgelere göre farklılıklar göstermektedir. Bu farklılıklara göre dünya; düşük, orta ve yüksek endemisite bölgelerine ayrılmıştır (14). Ülkemizde yapılan çeşitli çalışmalarda HBsAg seroprevalansı bölgeden bölgeye değişmek üzere %3.9-12.5 arasında bulunmuştur. Buna göre Türkiye %6 taşıyıcılık oranı ile orta endemisite bölgesinde yer almakta ve yaklaşık 4 milyon kişiyi ilgilendirmektedir (11).

Çizelge 2.3. HBV'nin Endemisitesi

Endemisite Bölgeleri			
	Düşük	Orta	Yüksek
HBsAg Pozitifliği	<%2	%2-10	<%10
Anti-HBs pozitifliği	%5-10	%20-60	%70-90
İnfeksiyonun alındığı yaş	Erişkin	Yenidoğan, çocuk, erişkin	Erken çocukluk
Başlıca bulaşma yolu	Cinsel, perkutan	Horizontal	Perinatal, horizontal,
Coğrafi bölgeler	Kuzey Avrupa, Batı Avrupa, Kuzey Amerika, Avustralya, Yeni Zelanda	Güney Avrupa, Doğu Avrupa, Güney Amerika, Orta Amerika, Ortadoğu, Asya, Japonya	Afrika, Güneydoğu Asya, Çin, Pasifik adaları, Alaska, Amazon

(Kaynak 35'den alınmıştır)

2.12. Klinik

HBV enfeksiyonu akut hepatit ve kronik hepatit olmak üzere başlıca iki klinik seyir gösterir.

2.12.1. Akut Hepatit B

Akut hepatit B'nin (AHB) kliniği asemptomatik hastalıktan mortalitesi oldukça yüksek olan fulminan seyre kadar değişkenlik gösterebilir. Hastalık semptomatik olduğu gibi asemptomatik olarak da seyredebilir (37) Genel olarak HBV enfeksiyonlarının %70'i asemptomatik geçirilir Çocuklarda ve gençlerde hastalığın asemptomatik geçirilme olasılığı daha yüksektir. İnfeksiyon 4 yaşın altındaki çocuklarda %90 oranında, 30 yaş üzerindeki erişkinlerin 2/3'ünde asemptomatik geçirilmektedir. Hastalığı asemptomatik olarak geçirenlerde kronikleşme riski semptomatik geçirenlere göre daha fazladır (38, 39).

a-Semptomatik hepatit B (%30)

Semptomatik hepatit B ikterik, anikterik, kolestatik, fulminan ve uzamış olarak seyreder. Tipik ikterik AHB dört klinik evreye ayrılır. Genel olarak her evre ortalama 1-2 hafta sürer.

1. İnkübasyon periyodu

Virusun hastaya bulaştıktan sonra çoğalması için geçen süredir. Ortalama 60-180 gündür. Bu dönemde herhangi bir semptom yoktur fakat hastaların bulaştırıcılık özelliği vardır (40).

2. Prodromal evre

İnkübasyon süresinin sonundan koyu renkte idrar veya sarılığın ortaya çıkışına kadar geçen ve non-spesifik başlangıç belirtilerinin gözlemlendiği evredir. Genellikle 3-10 gün, bazen 2-3 hafta sürer. Bu evre gribal infeksiyon veya üst solunum yolu infeksiyonu ile karışabilir. Hastalarda halsizlik, iştahsızlık, çabuk yorulma, bulantı, bazen kusma, baş ağrısı, karın sağ üst kadranda ağrı, ishal veya kabızlık olabilir. Gıdalara karşı tat alma duyusunda azalma, sigaraya karşı tiksinti olabilir. Bu dönemin sonlarına doğru çok yükselmeyen ateş ortaya çıkabilir (38).

Bu dönemde hastaların %10-20'sinde eritematöz makülopapüler raş, ürtiker, artralji nadiren artrit ile ortaya çıkan "serum hastalığına benzer sendrom" olarak adlandırılan bir tablo görülebilir. Bu klinik tablo HBV infeksiyonu sonucu meydana gelen immun komplekslere bağlı oluşmaktadır. Genellikle 2-10 gün sürer, sarılığın ortaya çıkması ile kaybolur ve kronikleşmez. Çocuklarda ise liken planusa benzer cilt lezyonları ile karakterize Gianotti-Crosti sendromu görülebilir. Ayrıca yine immun komplekslere sekonder olarak ortaya çıkan ekstrahepatik sendromlar tanımlanmıştır. Bunlar poliarteritis nodosa, glomerülonefrit, mikst kriyoglobulinemi, raynoud fenomeni, eritema nodosum, ciddi depresyon, Jacob-Creutzfeld benzeri hastalık, Guillain-Barre sendromu gibi nöropsikiyatrik sendromlar; agranülositoz, trombositopeni, aplastik anemi gibi hematolojik bozukluklar; aritmi, myokardit ve polimyaljia romatika gibi hastalıklardır (39, 40)

3- İkterik evre

Sarılığın ortaya çıkışı ve idrar renginde koyulaşmanın başlaması ile ikterik

dönem başlar. Serum bilirubin düzeyi 2,5-3 mg/dl'yi aştığında skleralar, dil mukozası ve ciltte sarılık gözlenir. Sarılık 5-10 günde üst sınıra çıkar, genellikle 1-3 hafta sürer, nadiren 4 haftaya uzar. Sarılığın yoğunluğuna göre dışkı rengi açık, gri veya sarı olabilir. Sarılığın ortaya çıkmasıyla birlikte ateş, artralji ve baş ağrısı kaybolur. Ateşin devam etmesi alkolik karaciğer hastalığı, ilaca bağlı hepatit veya infeksiyöz mononükleozisi düşündürmelidir. İştahsızlık, ishal, genellikle kısa süreli kaşıntı, sağ üst kadranda hafif, künt bir ağrı azalmakla birlikte devam edebilir. Hasta kendini daha iyi hisseder. Bulantı ve kusma kaybolur. İştah düzelir. Halsizlik ise en son kaybolan bulgudur (38, 40)

Fizik muayenede KC hassas, ağırlı ve büyüktür. %20 hastada splenomegali, bazı hastalarda posterior servikal lenf düğümlerinde büyüme, reversibl spider anjiomalar ve eksüdatif veya transüdatif vasıfta asit olabilir. Çocuklar genelde 2 haftada, erişkinler ise 4-6 haftada iyileşir (39).

4. Nekahat evresi

Sarılıktan sonraki hastalığın iyileşme dönemidir. Halsizlik bir süre daha devam eder. Efor kapasitesi giderek artar

Kolestatik seyreden AHB'de ise tablo aylarca sürebilir. Sarılık 8-29 hafta sürebilir. Hepatositlerdeki ödeme sekonder gelişen intrahepatik kolestaz, sarılığın uzama nedenidir. Kanda total bilirubin düzeyi 20 mg/dl'ye kadar yükselebildiğinden hastalarda devamlı kaşıntı şikayeti vardır. ALP enzimi çok yüksek seviyelere çıkabilir (38).

AHB'li hastaların sadece %3-5'inde uzamış akut hepatit B tablosu gözlenir. Bunlarda anormal fizik muayene ve laboratuvar bulguları, hafif klinik semptomlar 3-12 ay veya daha uzun süre devam edebilir. Bu kliniğin önemi kronik tablodan ayırımının zor olmasıdır (38)

AHB'li hastaların %0.1-0.5'sinde fulminan hepatit görülür. Hastalarda koagülopati, ensefalopati ve beyin ödemi ile seyreden akut KC yetmezliği söz konusudur. Mortalitesi çok yüksektir ve hastaların %80'i kaybedilir. Huzursuzluk ve dalgınlıktan komaya kadar değişen bilinç düzeyi, KC'de küçülme, serum transaminaz düzeylerinde ani düşme, protrombin zamanında uzama, oligüri, azotemi, yaygın ödem ve asit görülebilir. Virusa karşı geliştirilen yoğun immün cevap, akut KC yetmezliğinin nedenidir (41).

b-Asemptomatik hepatit B (%70)

AHB semptomatik olduğu gibi asemptomatik olarak da seyredebilir. *Subklinik infeksiyonda* sarılık ve diğer semptomlar yoktur. İnfeksiyon ve karaciğer hasarının göstergesi olarak sadece serum transaminaz değerleri yükselir. *Belirtisiz infeksiyonda* semptom yokluğu yanında, transaminaz değerlerinde yükselme görülmez. İnfeksiyonun varlığı sadece serolojik olarak gösterilebilir (38).

Akut hepatit B'nin esas laboratuvar göstergesi transaminaz düzeylerindeki hızlı yükseliştir. Transaminazlardaki yükselme semptomlar başlamadan önce başlayıp semptomların 1 haftasında pik yapar ve genellikle 1000 U/L'nin üzerine çıkar. Alanin aminotransferaz (ALT) genellikle aspartat aminotransferaz (AST)'den daha yüksektir. Bilirubin düzeyleri ise genellikle 10 mg/dl'ı geçmez ve 10-14 gün yüksek seyrederek. Alkalen fosfataz (ALP) seviyeleri normal veya hafif yükselmiştir. Orta derecede hemolize bağlı olarak hemoglobin ve hematokrit düzeylerinde hafif düşme nadiren granülositopeni ve relatif lenfositoz olabilir. Serolojik olarak da HBsAg ve anti HBc IgM pozitifliği akut infeksiyon tanısını koydurur (39).

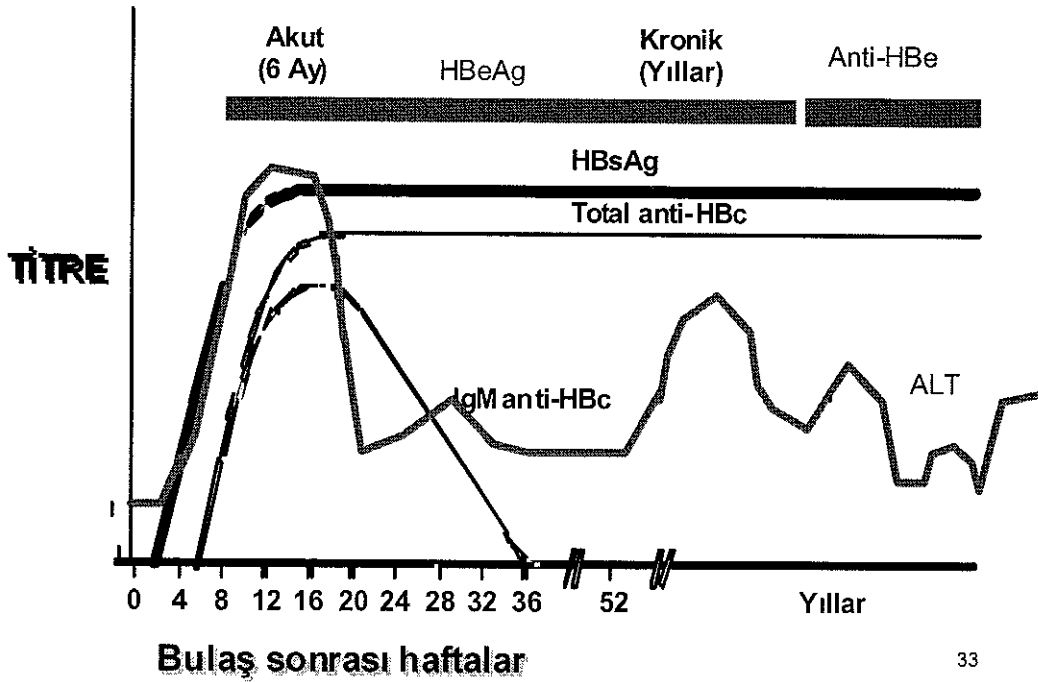
2.12.2. Kronik Hepatit B

Semptomatik veya subklinik seyreden akut infeksiyonu takiben serumda HBsAg pozitifliğinin 6 aydan daha uzun süre tespit edilmesi kronik infeksiyon olarak tanımlanır. İnfeksiyon yenidoğan döneminde geçirildiğinde %90, çocuklukta %29-40, erişkin çağda ise %5-10 oranında kronikleşir (38). Hastalığın kronikleşmesi KC'de viral replikasyonun devam etmesine ve hastanın immunolojik durumuna bağlıdır. Eğer konağın immun cevabı zayıf ise KC hasarı oluşmaksızın normal KC fonksiyonu ile virus çoğalmaya devam eder. Hücrel immun cevabı biraz daha iyi olan hastalarda hepatosellüler nekroz devam eder, fakat hücrel cevap virüsü temizlemek için yetersiz olduğundan hastalık kronik hepatitle sonuçlanır (14).

Kronik hepatit B sıklıkla sessiz bir hastalıktır. Çoğu hasta akut bir hastalık dönemi geçirdiğini hatırlamaz. Tanı genellikle kan verirken veya rutin taramalar sırasında HBsAg pozitifliği veya serum transaminazlarda yükseklik saptandığı zaman konur. Semptomlar KC hastalığının ciddiyeti ile korele değildir. En sık görülen semptom yorgunluktur. Bunun dışında halsizlik, sağ hipokondriumda

ağrı, iştahsızlık, koyu renkli idrar, kaşıntı ve karın şişliği olabilir. Fizik muayenede hepatomegali, splenomegali, sarılık ve özellikle sirotik dönemdeki hastalarda asit ve endoskopide özefagus varisleri olabilir. Genel olarak transaminazlar orta derecede yükselmektedir. ALT genellikle AST'den yüksek olur. Siroz geliştiğinde AST daha yüksek olma eğilimindedir. Kronik B hepatitli hastaların yaklaşık %40'ında transaminazlar bir süre normale yakın seyrederken daha sonra yükselmeler gösterecek şekilde seyredebilir (Şekil 2.3.). İmmünolojik cevabın bir göstergesi olarak hipergammaglobulinemi mevcuttur (38, 40).

Dünyada yılda 1 milyon kişinin HBV ile ilgili siroz komplikasyonları ve HSK nedeniyle öldüğü bilinmektedir. Kronik infeksiyon gelişen hastaların %60'ında kronik aktif hepatit, bunların %50'sinde siroz ve sirozluların %10'unda HSK gelişmektedir. HBsAg taşıyıcılarında HSK gelişme olasılığı %0.2-%0.7'dir (38, 42).



Şekil 2.3. HBV İnfeksiyonunun Kronikleşmesi

Kronik HBV infeksiyonunun doğal seyri infeksiyonun alındığı yaşa göre değişmekle birlikte 2 dönem ve 4 fazdan oluşmaktadır (43).

1-Replikatif Dönem

a- immun tolerans faz

b-immun temizlenme fazı

2- Nonreplikatif Dönem

a-inaktif taşıyıcılık (integrasyon fazı)

b-immun faz

İmmun tolerans fazı: Hastalığın endemik bulunduğu bölgelerde çoğunlukla vertikal yolla perinatal dönemde alınan infeksiyonun yüksek oranda kronikleşmesinden immun tolerans sorumludur. Bu dönemde bebeğin immun sistemi olgunlaşmadığından ve vücut tarafından HBV ve antijenleri yabancı kabul edilmediğinden (immün tolerans) virusa karşı yeterli immun yanıt oluşamaz (14, 40, 44)

İmmun tolerans fazı denilen bu dönemde virus ile infekte hepatositlere karşı yetersiz immun yanıt oluştuğu için virus alabildiğine çoğalmakta , fakat KC hücre harabiyeti olmadığından ALT düzeyleri normal bulunmaktadır. Bu faz genellikle 10-30 yıl sürer ve bu süre boyunca infeksiyona karşı immun yanıt olmadığı için HBeAg serokonversiyon ihtimali çok düşüktür. 20 yılda % 15 kadardır. İmmun tolerans döneminde: HBeAg pozitif, HBV DNA düzeyi yüksek, ALT normal ve KC biyopsisinde normal veya nonspesifik değişiklikler vardır. Bu dönem sağlıklı erişkindeki inkübasyon dönemine karşılık gelir (14, 42, 43).

İmmun temizlenme fazı: İmmun tolerans dönemi genellikle 10-30 yıl devam ettikten sonra bilinmeyen bir sebeple immun tolerans kırılmakta ve immun sistem HBV ile infekte hepatositlere yanıt oluşturmaya başlamaktadır. Virusun antijenik yapısındaki bazı değişikliklerin bundan sorumlu olduğu düşünülmektedir. HBV infeksiyonunun ilerlemiş yaşına bağlı olarak zaman içinde virusun prekor ve kor promoter bölgelerinde stop kodon mutasyonları meydana gelir. Bunun sonucunda HBeAg sentezlenemez fakat viral replikasyon devam ettiği için HBcAg sentezi de devam eder. Mutant suş denilen bu viruslar zamanla viral popülasyona hakim olmaya başlar. Mutantların belirmesiyle giderek azalan HBeAg sentezi, artan HBcAg sentezi sonucu hepatositteki HBcAg'nın nukleustan sitoplazmaya geçişi ve HBV replikasyonu sırasında ortaya çıkan yeni toleran olmayan HBeAg/HBcAg epitoplara oluşumu immun toleransın kırılmasına neden

olur (14, 43, 45). Bunun sonucunda infekte hepatosit parçalanmakta, nekroz ve inflamasyon ve bunun sonucunda fibrozis gelişebilmektedir. İnfekte hepatosit kitlesinde de azalma olmaktadır. Bir yandan da Th1 lenfositlerin salgıladığı TNF α ve IF γ gibi sitokinlerle hücre içi virus baskılanmaktadır. Bunların sonucu olarak hücre harabiyetinden dolayı ALI yükselir. HBV DNA düzeyi düşer. KC biyopsisinde (histolojisinde) kronik hepatitin tipik bulguları vardır. Bu dönem hastalarda kronik hepatit saptadığımız dönemdir. Bundan dolayı bu fazdaki hastalar yakın takip edilmeli eğer 6 ay içerisinde spontan HBeAg serokonversiyonu olmazsa tedavi başlanmalıdır. Sağlıklı erişkindeki akut hepatit tablosu bu döneme denk gelir. Kronik olgularda bu dönem 10 yıl veya daha fazla sürebilir (14, 42, 45).

İmmun temizlenme fazında ALI düzeylerinde zaman zaman aşırı yükselmeler görülebilir. Bu dönemlerde HBeAg serokonversiyon olasılığı artar. ALI düzeyi >5 x normal üst sınırın (NÜS) olduğu zaman bir yılda HBeAg serokonversiyon oranı %50'yi aşmaktadır. ALI <5 x NÜS olduğunda bu oran <10 'dur. Çoğunlukla immün temizleme dönemlerinde hastalar asemptomatiktir. Ancak alevlenme dönemlerinde hastalarda akut hepatite benzeyen sarılık, halsizlik, dekompanzasyon belirtileri görülebilir. Hastanın daha önceden HBV infeksiyonuna sahip olduğu bilinmiyorsa ve anti HBc IgM pozitifliğinin olması yanlışlıkla akut hepatit B tanısı konmasına neden olur. Akut alevlenme erkeklerde kadınlardan daha çok ve sık görülür. İmmun temizlenme dönemi ne kadar aktif ve ne kadar uzun sürerse hastanın siroz olma ihtimali o kadar artar. Eğer bu dönem kısa sürer ve aşırı alevlenmeler olmaz ise immün temizlenme dönemi sonrası hastalar inaktif taşıyıcı dönemine girer. Yani HBV genomu hepatosit genomuna entegre olmuş ve infektivite azalmıştır. HBeAg negatifleşmiş, anti HBe oluşmuştur. HBV DNA titresi düşüktür (14, 43, 45).

İnaktif HBsAg Taşıyıcılığı: İmmun temizlenme fazı sonunda hepatositlerin büyük oranda temizlenmesi ve hücre içi virusun baskılanması sonucunda kalıcı bir HBeAg serokonversiyonu ile anti HBe'nin pozitifleştiği ve HBV DNA'nın hibridizasyon yöntemi ile tesbit edilemediği "inaktif HBsAg taşıyıcılığı" fazına geçilir. Bu dönemde aminotransferazlar normal ve KC'deki nekroinflamatuvar aktivite ise normal veya minimaldir. HBV DNA serumda hibridizasyonla negatif

bulunmasına rağmen, polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile düşük düzeyde pozitifdir. Bu konağın immun yanıtı ile baskılanan fakat tamamen silinmemiş, çok düşük düzey replikasyonun varlığını gösterir. Bunlarda KC hastalığı genellikle inaktiftir. Hastalarda hiçbir klinik bulguya rastlanmaz. Bu dönem hayat boyu devam edebileceği gibi spontan veya immunsupresyon ile yüksek HBV DNA ve aminotransferaz düzeylerinin görüldüğü ve hatta HBeAg'nin tekrar pozitifleştiği ancak genellikle negatifliğinin devam ettiği replikasyon dönemine geçebilir (2, 43). Böylesi bir alevlenme ihtimalinin %20-30 olduğu tahmin edilmektedir. Bu tür alevlenmelerin diğer virus infeksiyonlarının süperinfeksiyonlarından ayırılması gerekir. İnaktif taşıyıcılık sırasında görülen alevlenmelerin yaklaşık %20-30'u bu tür süperinfeksiyonlara bağlıdır (7, 45). Reaktivasyon asemptomatikten fulminan hepatik yetmezliğe kadar uzanan çeşitli klinik tablolarda karşımıza çıkabilir (2, 7, 43, 45).

"İnaktif HBsAg taşıyıcılığı" tanı kriterleri 2000 NIH toplantısında tekrar düzenlendi, bunlar şuydu; HBsAg pozitifliğinin en az 6 ay bulunması, HBeAg negatif, anti HBe pozitif, serum HBV DNA $<10^5$ kopya/ml, aminotransferazların devamlı olarak normal sınırlarda olması (bir yıl içinde en az 4 kez bakılıp), anti-HDV negatif olması ve KC biyopsisi yapıldığında (rutin gerekli değildir) ise nekroinflamatuvar aktivitenin <4 yani normal veya minimal olması gereklidir (46, 47, 48). (Çizelge 2.4.)

Çizelge 2.4. HBV İnfeksiyonunda Tanı Kriterleri

İnaktif HBsAg taşıyıcısı	HBeAg negatif Kronik Hepatit B
1- HBsAg pozitif > 6 ay	1- HBsAg pozitif > 6 ay
2- HBeAg negatif,	2- HBeAg negatif,
3- Anti HBe pozitif	3- Anti HBe pozitif
4- Serum HBV DNA $<10^5$ kopya/ml	4- Serum HBV DNA $>10^5$ kopya/ml
5- Sürekli normal ALT/AST düzeyleri	5- ALT/AST düzeylerinde sürekli veya
6- Belirgin hepatit olmadığını gösteren	intermitan yükselmeler
KC biyopsisi	6- Kronik hepatiti gösteren KC
(nekroinflamatuvar skor <4)	biyopsisi
	(nekroinflamatuvar skoru ≥ 4)

Hastalara inaktif HBsAg taşıyıcısı tanısı koymadan KC sirozunun ekarte edilmesi gerekmektedir. Çünkü hasta KC sirozu olup, anti HBe pozitif, HBeAg negatif, HBV DNA negatif veya düşük düzeyde ve aminotransferaz düzeyleri normal olabilir. Özellikle HBeAg negatif hastalarda muhtemelen hastalığın ileri evrelerinde ve yaşlı olmalarından dolayı siroz gelişme oranı daha yüksektir (45). Bu hastalara yanlışlıkla inaktif HBsAg taşıyıcısı tanısı konabilir. Bunun için ilk olarak fizik muayene ile KC sirozunun periferik bulguları, hipersplenizm ve laboratuvar bulgularında anemi, lökopeni, trombositopeni, koagülasyon bozukluğu, bilirubin ve gammaglobulinde artma, albuminde azalma araştırılmalıdır (2). Laboratuvar bulgularından siroz için en çok tanı koydurucu olan albuminde azalma ve protrombin zamanında uzamadır. Ancak burada unutulmaması gereken bir hastada laboratuvar bulgularının normal olmasıyla siroz varlığının ekarte edilemeyeceğidir. Çünkü bütün bu bulgular KC yetmezliğinin ileri dönemlerinde karşımıza çıkmaktadır. Kompense sirozlu hastaların yaklaşık %30-40'ı asemptomatiktir (49). KC biyopsisi bu iki grubu birbirinden ayırt etmek için kullanılabilir en iyi tanı yöntemidir. Çünkü böylece klinik olarak siroz bulguları olmayan fakat histolojik olarak sirozlu hastaların erken tanı ve tedavi edilme şansı olur.

Erişkin çağda infeksiyonu alan inaktif HBsAg taşıyıcılarının yıllık HBsAg klirensi %1-2 iken, perinatal veya erken çocukluk döneminde infeksiyona yakalanan endemik bölgelerdeki inaktif HBsAg taşıyıcılarında yıllık HBsAg klirensi %0.05-%0.8'dir. HBsAg klirensi iyi prognozu göstermekle beraber bazı hastalarda HBsAg klirensine rağmen KC hastalığı kalıcı olup dekompanse siroz veya HSK gibi komplikasyonlar gelişebilmektedir. Özellikle kadınlarda, yaşlılarda, kronik aktif hepatit ve sirozlu hastalarda HBsAg klirens oranı daha yüksektir (2, 7).

İnaktif HBsAg taşıyıcılığı tanısının en çok karıştığı grup precore veya core promoter bölgesindeki stop kodon mutasyonuna bağlı HBeAg oluşumunun görülmediği ama anti HBe pozitifliğinin ve virus replikasyonunun devam ettiği mutant tip hepatit B infeksiyonlarıdır. Mutant tip infeksiyon ülkemizde dahil olduğu Akdeniz, Ortadoğu ve Asya ülkelerindeki kronik B hepatiti hastalarının

%30-80'ninde görülmektedir. Bununla birlikte precore veya core promoter mutantları inaktif HBsAg taşıyıcılarında da tespit edilebilir. HBeAg negatif kronik B hepatiti denilen bu grupta replikatif fazda infeksiyon devam ettiği için HBV DNA pozitif, HBsAg pozitif, HBeAg negatif, anti HBe pozitifdir. Bu hastaların ortalama yaşı 40 olup, HBeAg pozitif olanlara göre daha yüksektir ve erkek/kadın oranı 3.9 ile 17 arasında değişmektedir. İnfeksiyonun ileri dönemlerini temsil ettikleri ve immun tolerojen sayılan HBeAg'den mahrum oldukları için KC'deki hastalık daha ileri evrelerde olup, aktiftir ve tedaviye yanıt oranı düşüktür. Teşhis edildiklerinde hastaların %50'sinden fazlasında orta-ağır nekroinflamasyon, %29-38'inde siroz bulunmaktadır. Spontan kalıcı remisyona girme olasılığı çok düşüktür (%6-15) (7)

HBeAg negatif kronik B hepatit tanısı için; HBsAg'nin pozitif (en az 6 ay), HBeAg'nin negatif (en az 6 ay), anti HBe pozitif (genellikle), HBV DNA >10⁵ kopya/ml, anti-HDV negatif, bir ay ara ile en az 2 kez bakılan serum ALT düzeyinin NÜS'in 1.5 katından fazla veya AST değerinin NÜS'in 1.2 katından fazla ve KC biyopsisinde nekroinflamatuvar aktivitenin olup, KC hasarı yapabilecek başka neden olmaması gerekir (2, 7) (Çizelge 2.4.). Hastalık 3 farklı şekilde seyredebilir:

- 1-Zaman zaman alevlenmeler ve ALT normalleşmeleri (%44.5)
- 2-Zaman zaman alevlenmeler, ALT her zaman normalden yüksek (%19.5)
- 3-Sürekli yüksek ALT (%35.9)

Bu hastaların inaktif HBsAg taşıyıcıları ile karışmasının nedeni; mutant grupta viremi ve aminotransferaz düzeyleri dalgalanmalar gösterdiğinden; aminotransferaz düzeyi normal olan durumlarda hastalığı inaktif taşıyıcılıktan ayırt etmek mümkün olmayabilir. Bu nedenle HBsAg pozitif, anti HBe pozitif olan bir kişide sadece bir kez bakılan serum aminotransferaz düzeyinin normal ve HBV DNA'nın hibridizasyon yöntemi ile negatif, kalitatif PCR yöntemi ile 10⁵ kopya/ml'den düşük olması ile inaktif HBsAg taşıyıcısı tanısı konulmamalıdır (2). HBeAg negatif kronik B hepatiti ile inaktif HBsAg taşıyıcılarını birbirinden ayırmada yardımcı olacak 2 parametre vardır: Bunlar serum aminotransferaz ve HBV DNA düzeyidir. Serum aminotransferaz düzeylerine aralıklı bakmak en pratik yöntem olarak durmaktadır. Fakat halen hangi aralıklarla aminotransferaz

takibinin yapılması gerektiği çok netlik kazanmamıştır. Bununla birlikte birçok klinisyen, ilk bir yıl boyunca 3 ayda bir aminotransferaz takibi sonunda aminotransferaz düzeylerinde yükselme olmazsa bu hastaların inaktif HBsAg taşıyıcısı olarak kabul edilmesini ve daha sonra hastaların 6 ayda bir aminotransferaz düzeylerine bakmayı maliyet etkinliği ortaya konmamakla birlikte önermektedir. Hastalığın doğal seyri ve serolojik tetkiklerin uygulama zorluğu göz önüne alındığında bu şemanın en uygun yöntem olduğu belirtilmektedir (2). HBeAg negatif kronik B hepatitli hastaların yaklaşık %45-65'nin serum aminotransferaz düzeyleri dalgalanma göstermesine rağmen çok uzun süreler normal sınırlarda seyredebilir. Serum aminotransferaz düzeylerine çok sık bakılsa da çok kısa bir süre yükselme gösteren değerler yakalanamayıp, yanlışlıkla hastalara inaktif HBsAg taşıyıcısı tanısı konulabilir (7).

HBV DNA düzeyi bu iki grubun ayrılmasında kullanılan ikinci parametredir. HBV DNA eşik değerinin 10^5 kopya /ml olması bu iki grubu ayırmada yetersizdir. Amerika Birleşik Devletlerinde en son düzenlenen kronik B hepatiti tedavi algoritmasında; HBeAg negatif kronik B hepatitinin inaktif HBsAg taşıyıcılarından ayrılmasında 10^4 kopya/ml HBV DNA düzeyi eşik değer olarak kabul edilmiştir (8).

2.13. Serolojik Tanı

HBV'ye ait antijenlerin ve antikorların hasta serumunda saptanması enfeksiyonun özgül tanısı için yaygın kullanılan yöntemlerdir. Özgül serolojik tanıda genel olarak HBV'nin 2 antijeni (HBsAg, HBeAg) ve 3 antijenine karşı gelişmiş antikorlar (anti-HBs, anti-HBc, anti-HBe) araştırılır. Viral HBcAg dolaşıma katılmadığı ve sadece hepatositler içinde bulunduğu için serolojik olarak saptanamamaktadır. Serolojik testler HBV enfeksiyonunun akut ve kronik dönemlerinin ayrılmasında, infektivitenin değerlendirilmesinde, immünitenin araştırılmasında, kan ve organ vericilerinin taranmasında rutin olarak kullanılmaktadır (14, 50)

HBsAg: HBV ile temastan 1-12 hafta sonra serumda ortaya çıkar. Hepatit semptomları başlamadan 3-5 hafta önce kanda saptanabilir düzeye ulaşır. İyileşmeyle sonlanan hastalık tablosunda, akut dönemde tepe düzeye ulaşır ve 4-6

ay içinde saptanamayacak düzeye iner HBsAg'nin 6 aydan daha uzun süre pozitif kalması kronik infeksiyonu destekler

HBeAg: İnkübasyon döneminde HBV DNA ve DNA polimerazdan hemen sonra HBsAg'yi izleyerek pozitifleşir ve HBsAg'den önce negatifleşir. 10 haftadan daha uzun sürmesi kronikleşmeyi işaret eder. Kronikleşen hastalarda HBsAg ile birlikte yıllarca serumda bulunur.

Anti-HBc IgM: Akut HBV infeksiyon göstergesidir. HBsAg pozitifliğinden 1-4 hafta sonra pozitifleşir, akut dönemde hastalık belirtileri ile birlikte tepe düzeyine ulaşır ve 3-12 ay içinde azalarak saptanamayacak düzeye iner. HbsAg ve HBeAg'nin serumdan kaybolup anti-HBs gelişinceye kadar geçen pencere döneminde anti-HBc IgM'in varlığı akut infeksiyonu gösteren en önemli markerdir. Anti-HBc IgM sebat etmesi hastalığın kronikleşeceğinin işaretidir. Kronik HBV infeksiyonunun akut alevlenme dönemlerinde ve serokonversiyon sırasında da anti-HBc IgM antikoru tekrar saptanabilir düzeye ulaşabilir.

Anti-HBc IgG ve total anti-HBc: Anti-HBc IgG, anti-HBc IgM'i izleyerek pozitifleşir. HBsAg'nin ortaya çıkmasından hemen sonra, ancak ALT yükselmesinden önce serumda gözlenmektedir. Hayat boyu serumda saptanabilir düzeyde kalır. Bundan dolayı, kişinin HBV ile karşılaştığına ilişkin en güvenilir göstergedir.

Anti-HBe: HBeAg'nin kaybolmasını takiben hemen veya 1-2 hafta sonra ortaya çıkar. Viral replikasyonun azaldığının ve hastalığın iyileşmeye yöneldiğinin habercisidir. HBeAg pozitif kronik hepatit B tedavisinde HBeAg'nin kaybolup, anti HBe oluşması hedeflendiğinden, tedavi izleminde önemli bir göstergedir.

Anti-HBs: Akut infeksiyonda HBsAg kaybolduktan sonra kanda saptanabilir düzeye ulaşır. HBV infeksiyonundan sonra oluşması, hastalığın iyileşme ile sonlandığını ve bağışıklığı ifade eder. Hepatit B aşısı sonrası da bağışıklığı gösteren tek antikordur.

HBV DNA: HBV infeksiyonunun virolojik tanısı ve izlenmesi, özgül antikörlerin, antijenlerin ve nükleik asidin saptanması ve kantitasyonu ile yapılmaktadır. HBV DNA inkübasyon döneminde HBsAg'den 3-5 hafta önce serumda saptanabilmektedir. Aktif HBV replikasyonunun en sensitif göstergesi

olup infeksiyonun tanısında, evrelendirilmesinde, tedavi kararının verilmesinde ve tedavi başarısının izlenmesinde önemli rol oynamaktadır (51). HBV DNA testleri 2 grupta toplanmaktadır:

1-Hibridizasyon temelli testler (sinyal amplifikasyonu)

Tüm HBV genomuna komplementer DNA veya RNA problemleri kullanılarak serumda bulunan viral nükleik asitler saptanmakta ve miktarı belirlenebilmektedir. Nitroselüloz veya naylon membran gibi katı fazda (Dot-blot) veya sıvı ortamda gerçekleştirilen klasik hibridizasyon teknikleri kullanılır. Bu yöntemlerle 0.1-1 pg HBV DNA saptamak mümkündür. Dinamik aralığı geniş, duyarlılıkları 10^{5-6} kopya/ml civarındadır (52). Hibridizasyon esaslı testlerin duyarlılıkları düşük olduğundan, gizli (occult) HBV infeksiyonunun tanı ve tedavi izlemi gibi yüksek duyarlılık istenen durumlarda kullanılmamalıdır (51). Çünkü gizli HBV infeksiyonu HBsAg'nin negatif, akut fazın pencere dışı dönemde HBV ilişkili antikorların pozitif veya negatif olduğu ve HBV DNA'nın düşük titrede ($<10^4$ kopya/ml) pozitif olduğu bir klinik tablodur.

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 Patobiyoloji Grubu tarafından oluşturulan standardın klonlanmış DNA yerine plazma kökenli DNA olması ve kitlerin genotip A için 2.7×10^9 HBV DNA molekülü, genotip D için ise 2.6×10^9 HBV DNA molekülü içeren referans plazmaya göre kalibre edilmesi önerilmektedir (53).

Kantitasyonda kullanılan birimler arasında standardizasyon olmaması, klinik anlamı olan serum HBV DNA düzeylerinin belirlenmesinde, tedavi alan hastaların takiplerinde sorunlara yol açmaktadır. Bundan dolayı en son 1pg/ml HBV DNA'nın 283,000 kopya'ya denk geldiği kabul edilmiştir (53).

2-Nükleik asid amplifikasyon temelli testler (PCR):

HBV DNA'nın belirlenmesinde en özgül ve duyarlı yöntem PCR yöntemidir (50). Testin esası; ortamda eser miktarda bulunan HBV DNA'nın amplifikasyon işlemiyle çoğaltılarak saptanması ve kantitasyonunun yapılmasıdır. Kuramsal olarak ortamdaki tek bir genomun bile belirlenmesini sağlama

özelliğine sahiptir. Hibridizasyona göre en az 10^4 kez daha duyarlıdır (h). Dinamik aralıkları dar, duyarlılıkları 50-1000 kopya/ml civarındadır. HBV genomu içindeki prekori/kor geni içinde biotinle işaretli oligonükleotid primerler kullanılarak test gerçekleştirilir (53).

PCR serumdaki 10 kopya /ml miktarındaki HBV DNA düzeylerini gösterebildiğinden; hibridizasyon yöntemleri ile saptanamayan HBV DNA düzeyleri PCR ile belirlenebilmektedir. Bundan dolayı HBsAg pozitif vakalarda viral replikasyonun varlığını göstermesi bakımından özellikle PCR ile HBV DNA bakılması zorunlu hale gelmiştir (14, 39).

Kronik hepatit B tedavisinin optimal tedavisinde başlangıç HBV DNA düzeyinin doğru olarak saptanabilmesi ve daha sonra da antiviral tedavi sırasında yanıtın ve viral dirence bağlı viral aktivitenin doğru olarak ölçülebilmesi için PCR testinin kullanılması gerekir. PCR dışındaki testlerin kullanılması tedavi öncesinde ve tedavi sırasında klinik sonuçlar üzerinde zararlı etkilere yol açabilecek düzeydeki belirgin viral replikasyonun saptanamamasına neden olabilir (8).

HBV DNA testlerinin uygulama alanları: (50, 53)

a-Serolojik testlerin yetersiz kaldığı durumlarda tanıya gidilmesinde;

1-HBsAg negatif bulunan örnekler,

2-HBeAg negatif / Anti HBe pozitif örnekler

b-Antiviral tedavinin izlenmesi,

c-Mutant suşlar ve ilaç direncinin belirlenmesi,

d-Genotip tayinidir

2.14. Kronik Hepatit Histopatolojisi

Kronik viral hepatit, hepatotrofik viruslerin neden olduğu, tüm KC'de iltihabi hücre infiltrasyonu, hepatosit ölümü, atrofisi, rejenerasyonu ve fibrozis gelişmesi ile karakterize bir hastalıktır. KC biyopsisi ister tedavi öncesi ister tedavi sonrası yapılsın, hastanın o andaki durumunu biyokimyasal bulgulardan daha doğru şekilde ortaya koyar. Biyopsinin sağladığı avantajlar;

a-Hastanın o andaki durumunu göstermesi açısından önemlidir, çünkü her zaman klinik ve laboratuvar bulguları hastanın içinde bulunduğu durumu yansıtmayabilir.

- b-Prognostik bulguların elde edilmesi,
- c-Tedavi zamanı ve stratejisinin saptanması,
- d-Diğer KC hastalıklarının ekarte edilebilmesi,
- e-Hastanın antiviral tedaviye yanıt verip vermediğini, verdi ise ne denli verdiğinin anlaşılması,
- f-Daha sonra yapılacak biyopsilerle karşılaştırmalı kontrolünün yapılması için gereklidir (54).

Kronik viral hepatitte ortaya çıkan klinik, serolojik ve morfolojik tabloların daha iyi anlaşılması için KC'in morfolojisi ile fizyolojisinin bilinmesi gereklidir. KC, lobul veya asinüs denilen ünitelerden oluşur. Lobül, köşelerinde portal mesafelerin, santralde santral venin yer aldığı poligonal ünitelerdir. Her portal alan, hepatik ven ve arter ile safra kanalı ve lenfatik içerir. Lobül dokusu, santral venden itibaren periferde devam etmek üzere, hepatositlerin bol oksijenli kandan yararlanma derecelerine göre eşit kalınlıkta 3 zona ayrılır. En iyi kanlanan periportal kısım "alan 1", en az kanlanan perivenüler kısım "alan 3" olarak adlandırılır. KC parankimini oluşturan hepatositler, biri diğerinin üzerinde olacak şekilde kordon denilen duvarlar yaparak portal mesafeden santral vene doğru uzanır. Kan hepatosit kordonlarını ayıran ve birbiri ile anastomoz yapan sinüzoid kanalları içinden portal mesafeden santral vene doğru akarken, safra, santral venden portal mesafeye hepatositler arasından akmaktadır. Sinüzoid ile hepatositler arasında absorpsiyon kapasitesi 6 kat daha yüksek olan disse mesafesi vardır. Birçok hepatosit villusunun yüzdüğü bu mesafe, sadece endotelin filtre ettiği plazmaya sahiptir, kan hücresi içermez. Başlıca tip I ve IV olmak üzere değişik kollajenler ve proteoglikanlar içerir. Disse mesafesinin kollajen fibrilleri hepatositlere destek çatı oluşturur. Bu çatı KC'in rejenerasyonu ve bütünlüğü için gereklidir (55).

Kronik hepatitler ilk olarak 1968 yılında Uluslararası Çalışma Grubu tarafından morfolojik temele dayanılarak sınıflandırılmış ve 1977'de revize edilmiştir. Morfolojik sınıflamada, hastalığın etkeni ve etiyolojisi belirlenmeden sadece iltihap ve fibrozisin yani lezyonun lokalizasyonu temel kriter alınarak 3 grupta incelenmektedir:

a-Kronik persistan hepatit (KPH): Lezyon portal alanda sınırlı , piece-meal nekroz yok

b-Kronik aktif hepatit (KAH): Lezyon portal alanda sınırlı değil, piece-meal nekroz var yani portal mesafedeki iltihap ve/veya fibrozis sınırlayıcı membranı harap edip lobül içerisine doğru ilerlemiştir.

c-Kronik lobüler hepatit: Lezyon temel olarak lobül içerisindedir. Portal mesafede iltihap veya fibrozis minimal veya yoktur.

Kronik hepatitlerde etiyojinin net bir şekilde ortaya konabilmesinden sonra, morfolojik sınıflamanın nekroinflamasyonun ve fibrozisin şiddeti ve hastalığın prognozu hakkında yeterli bilgi verememesinden dolayı 1994 yılında Uluslararası Çalışma Grubu, Dünya Gastroenteroloji Kongresi'nde kronik hepatitleri tekrar sınıflandırmış ve etiyojiye dayanan yeni bir sınıflama sistemi getirmişlerdir. Etiyolojik sınıflama, mikroskopik inceleme ile etiyojiye ait özelliklerin aranmasını ve bulguların diğer klinik ve laboratuvar verileri ile birleştirilerek patolojik tanının konmasını amaçlamıştır (9, 56).

Etiyolojik sınıflamada kronik hepatitin 3 komponenti bulunmaktadır.

1-Etiyoloji

2-Grade

3-Evre (Stage)

Kronik hepatitte etiyoji, histolojik, klinik ve laboratuvar verilerinin hepsini içermektedir. Grade; lenfoplazmositer infiltrasyon ve KC parankimindeki nekroinflamasyon ve nekrozu ifade eder. Bu aktivite portal bölgelerdeki inflamasyonu, periportal bölgelerdeki interface hepatiti ve lobüler bölgelerdeki hepatosit nekroz alanlarını ve köprüleşme nekrozlarını içerir. Evre ise fibrozisin derecesini belirler (56).

İltihabi infiltrasyon ön planda lenfositlerden oluşur. Bunlara plazma hücreleri, eosinofil ve nötrofiller de eşlik edebilir. Bu hücreler portal bölgede, periportal bölgede ve lobüllerin içinde yer alır. Kronik hepatitlerde çok değişik histolojik bulgular saptanabilmektedir. Ancak bulguları gruplayacak olursak bütün gradelemelerde temelde üç primer değişikliğin olduğu izlenmektedir. Bunlar portal iltihap, lobüler iltihap ve hasar, piecemeal nekrozudur. Fibrozis ise KC'deki

hasarın komplikasyonu olarak meydana gelir, hasarın ve komplikasyonun ilerlemesi ile siroz gelişebilmektedir.

Çizelge 2.5. Kronik Hepatit Etiyolojik Sınıflama (1994)

Kronik (nonbiliyer) hepatit Otoimmün hepatit Kronik B hepatiti Kronik C hepatiti Kronik B+D hepatiti Kronik ilaç hepatiti Kronik kriptojenik hepatiti
Kronik biliyer hastalıklar Primer biliyer siroz Primer sklerozan kolanjit Otoimmün kolanjit

1-Portal İltihap: İltihabi hücre infiltrasyonu her portal bölgede değişik yoğunlukta olabilir. İltihabi infiltrasyon predominant olarak lenfositlerden oluşmaktadır, plazma hücreleri ve makrofajlar eşlik etmektedir. Bazen nötrofil ve eozinofiller de iltihaba katılmaktadır. Makrofajlar demir pigmenti içerebilir. Lenfositler genellikle CD4 helper I lenfositleridir. Lenfositler agregat veya germinal merkezleri belirgin lenfoid folliküller oluşturabilir. Kronik hepatitlerde az veya çok hemen tüm portal alanlarda iltihap izlenmektedir ancak bazı olgularda tutulmamış portal alan bulunabilir. Genişleyen portal bölgelerde zamanla fibrozis gelişir. İltihaba hafif şiddette safra duktus proliferasyonu eşlik edebilir. Duktal epitel hasarı gözlenebilir (55, 56).

Portal yangı tipi ve miktarı prognozu direkt olarak etkileyen faktör olmamakla birlikte tedavide ortadan kalkması grade'in düşmesine neden olan bir bulgudur (54).

2-Periportal İltihap-Interface hepatiti (Piecemeal nekroz) (Sınırlayıcı membran hasarı): Hepatositler ile portal alan arasında düzgün bir sınırlanma bulunmaktadır. Buraya sınırlayıcı membran denmektedir. Sınırlayıcı membran

gerçek bir membran olmayıp hayali bir ayırım noktasıdır. Bu membranın portal alandaki iltihap ve/veya fibrozis ile parçalanmasına sınırlayıcı membran hasarı veya piecemeal nekrozu denilmektedir (9). Yani periportal bölgenin mezenkimal dokusunun bittiği (limiting plate-sınır çizgisi) ve parankimdeki hepatositlerin başladığı bölgedeki (parankim-mezanşim sınırı) tek veya grup halindeki hepatositlerin kronik, tedrici bir tahribi ve beraberinde lenfohistiositik infiltrasyonuna piecemeal nekrozu denmektedir. Bu infiltrat, portal alan sınırını (*limiting plate*) aşarak, yer yer parankim içine yayılır ve bu alanlardaki hepatositleri nekroza uğratar. Yalnızca kronik ve ilerleyici nitelikteki karaciğer hastalıklarında görülen bu nekroz türünde portal alanlar genişler, bağ dokusu artar. Piecemeal nekrozu, kronik hepatitlerin tanısında ve aktivite derecelerinin değerlendirilmesinde ve prognozda çok önemli yer tutar (55).

Piecemeal nekrozunun en karakteristik yönü hepatositlerle mononükleer hücreler özellikle lenfositlerle olan ilişkiyi, dolayısıyla süregelen sellüler immunitiyi yansımasıdır. Piecemeal nekrozları lenfositlerden çok zengindir ama arada az sayıda plazma hücreleri, makrofajlar ve dendritik hücreler de bulunur. Bu lezyonun gelişiminde buradaki lenfositler (tamamı T lenfositleri) önce hepatositleri çepeçevre sararak bir yandan lenfosit rozetlerini oluştururken, diğer yandan da hepatositin sitoplazma membranına penetre olur. Buna emperipolezis denir. Daha sonra ise hepatositlerde şişme, büzüşme veya sitoplazmik parçalanmayla ortaya çıkan, bütünlük kaybı gibi gelişmelerin olduğu ve apoptozis denilen dejeneratif değişiklikler ortaya çıkar ve hepatositler yıkılır. Asidofil cisimcikler (councilman body-cisimciği) rutin boyalı kesitlerde normal bir hepatositten daha küçük, koyu eozinofilik bir topakçık olarak izlenir, bu görünüm aslında apoptozis ile eşanlamlıdır. Dolayısıyla bir nekroz türü olmaktan çok, KC'de programlı hücre ölümünün bir yansıması olarak da kabul edilebilir. Topakçığın içinde piknotik bir çekirdek seçilebilir. Asidofil cisimcik, fagosit edilmiş olarak da saptanabilir. Karaciğerde hücre yıkımını artıran hemen her sürece councilman cisimciklerinin sayıca artışı eşlik edebilir (j).

3-Lobuler İltihap: Hepatik lobülüsler içerisinde mononükleer iltihabi hücre infiltrasyonu görülür. İltihaba genellikle hepatosit hasarı da eşlik

etmektedir, bu ya apoptozis bir başka deyişle asidofilik cisim veya councilman cisimciği ya da hepatositlerde şişme tarzında izlenir. Bu infiltrasyonda küçük, düzensiz yama tarzında fokal (spotty) nekrozlar saptanır. Fokal nekroz birkaç hepatositten oluşan bir kümenin nekrozudur. Litik tiptedir ve büzüşme ve fragmantasyon ile karakterlidir. Nekrotik hepatositler hızla ortadan kaldırıldıkları için, nekroz alanında genellikle seçilemezler. Fakat yıkılan hepatositlerin yerinde önce lenfositler daha sonra ise pigmentli makrofaj kümeleri izlenir. Fokal nekroz hücrel immünite ile hücre hasarını gösteren bir bulgudur (54).

Mütipl alanda ve hepatosit grubunda şiddetli litik hasar sonucu genellikle periventüler olarak gelişen nekroz multifokal (konfluent) nekrozdur. Lobulun belirli bölümlerini (3 lobuler zon) ilgilendirecek şekilde (zonal) veya portal ve santral lobül bölümleriyle ilişkili olarak gelişen bu birleşmiş geniş konfluent nekrozlar, portal ve santral yapılar arasında birleşmeler yapacak derecede olduğunda, vasküler yapıları bağlayan köprüleşme (bridging) nekrozu ismini alır. Köprüleşme nekrozu lobül içindeki anatomik yapılar arasında izlenir. Ya bir portal alandan diğerine yani portal-portal, ya santral venden portal alana yani santral-portal veya bir santral alandan diğer santral alana uzanır ki bu da santral-santral köprüleşme nekrozlarıdır. Portal-portal olanın prognostik değeri piecemeal nekrozu kadardır. Ama santral-portal ve santral-santral olanların prognozu çok daha kötüdür. Çünkü bu iki tip köprüleşme nekrozu ve daha sonra aynı anatomik yapılar arasında gelişecek olan köprüleşme fibrozislerine, KC lobüllerinde mikrosirkülasyonu bozarak portal sirkülasyonla sistemik sirkülasyon arasında şantların ortaya çıkmasına ve hastalığın hızla ilerlemesine ve komplikasyonların ortaya çıkmasına neden olur. Yani köprüleşme nekrozunun varlığında KC dolaşım sistemi etkilendiğinden hasar daha ağır olur ve köprüleşen nekrozlar yerinde fibrozis gelişmesi nedeniyle siroz oluşma olasılığı artar. Bundan dolayı kronik hepatitlerde, köprüleşme nekrozunun bulunuşu, hastalığın ağır seyrettiğini ve iyileşme olasılığının azaldığını düşündürür. Biyopsi tanımlarında köprüleşme nekrozu kararına varılması için, biyopsilerin 2 cm uzunlukta olması ve en az 2 nekrotik köprüünün görülmesi gerekmektedir. Zonal nekrozları fokal nekrozların biraz daha belirgin biçimleri olarak görmek mümkündür. Bazen aktivasyonun

şiddetine bağlı olarak panlobüler nekroz gelişir ve portal ve lobüler yapı iyice bozular (54, 55).

Kronik hepatitlerde etiyolojik ajana özgü ve buna sıklıkla eşlik eden morfolojik değişiklikler de bulunmaktadır. HBsAg hepatosit sitoplazmasında ve sitoplazma zarında birikir. HBsAg varlığına bağlı hepatosit sitoplazması hematoksilin-eozin boyası ile pembe renkte ve ince granüllü buzlu cam görünümünde izlenir. Genellikle hücre sitoplazması hücre zarından ayrılır ve buzlu cam görüntüsünün periferinde halo izlenir. Bu hastalığın etiyolojisi ile ilişkili en önemli histolojik bulgudur. Yoğun HBsAg içeren ve ileri derecede proliferasyon olarak diğer organelleri ve nükleusu bir tarafa iten endoplazmik retikulum infekte hepatositlere buzlu cam görünümünü verir. Buzlu cam tarzında sitoplazma varlığı ile hastalığın aktivitesi arasında ters korelasyon bulunmaktadır. Yani inaktif HBsAg taşıyıcılarında çok sayıda bu çeşit hücre saptanırken, kronik hepatit B'de ise çok az veya hiç görülmeyebilir (9).

Kronik B hepatitinde ayrıca HBcAg varlığına bağlı olarak nükleus soluk eozinofilik görülebilir. Bu görüntüye kumsu nükleus ismi verilmektedir. Serokonversiyondan sonra genellikle kumsu nükleus izlenmez. Kronik B hepatitlerin tümünde kumsu nükleus ve buzlu cam saptanması mümkün olmamaktadır. HBV'ye bağlı kronik hepatitlerde sitoplazmik HBsAg varlığı ve nükleer HBcAg varlığı immunohistokimyasal yöntemler ile gösterilebilir. HBcAg virusun aktif olduğu dönemlerde sitoplazmada izlenebilir (9).

Kronik hepatitlerde yalnız tanının konması yeterli değildir. Hastalığın şiddetinin, tedaviye cevabının varlığının veya kurumlar arasında karşılaştırmanın yapılabilmesi için hastalığın şiddetinin ve yaygınlığının belirtilmesi gerekmektedir. Bu amaç için hasarın nümerik olarak verilmesi gerekmektedir. Bu değerlendirmeleri yapabilmek için kronik viral hepatitlerin histopatolojik olarak derecelendirilmesi (inflamasyonun aktivitesi-Histolojik Aktivite İndeksi; HAI) ve evrelemesi (fibrozis) için çeşitli skorlama sistemleri önerilmiştir. Bu konuda Knodell, Desmet, METAVİR, Scheuer, Bianchi, Ishak gibi çalışmacılar farklı derecelendirme ve evreleme sistemleri önermiştir. Bunlar içinde en yaygın kullanılan Knodell'in Histolojik Aktivite İndeksi (HAI) skorudur (Çizelge 2.6.)

Çizelge 2.6. Knodell Histolojik Aktivite İndeksi

Periportal ± Köprüleşme Nekrozu	Skor	İntralobüler Dejenerasyon ve Fokal Nekroz	Skor	Portal İltihap	Skor	Fibrozis	Skor
Yok	0	Yok	0	Yok	0	Yok	0
Hafif Piecemeal nekroz	1	Hafif (asidofil c. ler, balon dejen. Ve/veya lobül veya nodüllerin 1/3 ünde dağınık hepatosellüler nekroz	1	Hafif (<1/3 portal trakta dağılmış iltihabi infiltrasyon	1	Fibröz Portal Ekspansiyon	1
Orta piecemeal nekroz (çoğu portal alanın <%50 çevresinde	3	Orta (Lobül veya nodüllerin 1/3 tutulumu)	3	Orta (1/3-2/3 portal alanda artmış iltihabi infiltrasyon	3	Köprüleşme nekrozu (porto portal veya porto-santral birleşme)	3
Belirgin piecemeal nekroz (çoğu portal alanın >%50 çevresinde	4	Belirgin (Lobül veya nodüllerin >2/3 tutulumu)	4	Belirgin (>2/3 portal trakta sıkıca bir araya gelmiş iltihabi hücreler)	4	Siroz	4
Orta piecemeal nekroz + köprüleşme nekrozu	5						
Belirgin piecemeal nekroz + köprüleşme nekrozu	6						
Multilobüler nekroz	10						
Total HAI (Knodell Skoru=22)							

(Kaynak 55'den alınmıştır)

1995 yılında Ishak ve arkadaşlarından oluşan 16 patolog tarafından kronik hepatit skorlama sistemi yeniden modifiye edilmiştir. Bizim çalışmamızda da KC biyopsilerinde HAI Ishak sistemine göre değerlendirilmiştir (Çizelge 2.7.)

Çizelge 2.7. Modifiye Ishak Histolojik Aktivite İndeksi

Periportal veya Periseptal İnterfaz hepatit (Piecemeal nekroz) (A)	Skor	Konfluent nekroz (B)	Skor	Fokal (Spotty) Litik Nekroz, Apoptoz ve Fokal İltihap (C)	Skor	Portal İltihap (D)	Skor
Yok	0	Yok	0	Yok	0	Yok	0
Hafif (fokal birkaç portal alan)	1	Fokal konfluent nekroz	1	Her 10x objektifte 1 veya az fokus	1	Hafif, bazı veya tüm portal alanlarda	1
Hafif/orta (fokal çoğu portal alan)	2	Bazı alanlarda zon 3 nekroz	2	Her 10x objektifte 2-4 fokus	2	Orta, bazı veya tüm portal alanlarda	2
Orta (<%50 portal alan veya septumda devamlı)	3	Çoğu alanda zon 3 nekroz	4	Her 10x objektifte 5-10 fokus	3	Orta/belirgin, tüm portal alanlarda	3
Şiddetli (>%50 portal alan veya septumda devamlı)	4	Zon 3 nekroz + nadir porto-portal köprüleşme	4	Her 10x objektifte ondan fazla fokus	4	Belirgin, tüm portal	4
		Zon 3 nekroz + multipl P-C köprüleşme	5				
		Panasiner veya mültiasinenekroz					
Total Modifiye HAI= 18							

(Kaynak 55'den alınmıştır)

Kronik hepatitin evresi, nekroinflamatuvar hasar sonucu oluşan fibrozisin derecesidir. Fibrozis önce portal alanda ve çevresinde birikmektedir. Buna

genellikle periportal nekroinflamatuvar reaksiyon da eşlik etmektedir. Daha sonra sınırlayıcı membran harabiyetine neden olarak ilerleyen safhalarda fibrozisle oluşan köprüleşme nekrozları gelişir. Son dönemde ise fibrozis hepatositleri kümeler halinde sararak psödolobul gelişir ve siroz oluşur. Siroz kronik KC parankim hastalığının en ileri ve irreversibl evresidir. Fibrozisin varlığı ve yaygınlığını belirtmek amacıyla çeşitli evreleme şemaları oluşturulmuştur. Bunlar içinde en yaygın kullanılan Knodell ve Scheuer evreleme şemasıdır (Çizelge 2.8.)

Çizelge 2.8. Kronik Herpatit Evreleme Şemaları

Fibrozis	Knodell	Scheuer	Metavir	Batts	Ishak
Yok	0	0	0	0	0
Portal (az)	1	1	1	1	1
Portal (çok)	1	1	1	1	2
Periportal	1	2	1	2	2
Köprü (seyrek)	3	3	2	3	3
Köprü (sık)	3	3	3	3	4
Siroz inkomplet	4	4	4	4	5
Siroz komple	4	4	4	4	6

Bizim çalışmamız da KC biyopsileri fibrozis açısından Ishak ve Metavir evreleme sistemine göre değerlendirilmiştir

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Çalışmaya Alınacak Hastaların Seçimi

Çalışmaya Ocak 2004-Nisan 2005 tarihleri arasında Antalya il merkezindeki 3 büyük bölge hastanesi olan Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi, Atatürk Devlet Hastanesi ve Antalya Devlet Hastanesi İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji polikliniklerine rutin kontrol için başvuran ve en az 6 aydır HBsAg pozitif ve HBeAg negatif olan hastalar alındı. Rutin kontrolde hastaların tam bir sistem sorgulaması ve fizik muayenesi yapıp, tam kan sayımı, serum alanin aminotransferaz (ALT), aspartat aminotransferaz (AST), gama glutamil transferaz (GGT), alkalen fosfataz (ALP), total bilirubin, direkt bilirubin, total protein, albumin, protrombin zamanı, HBsAg, HBsAb, HBeAg, HBeAb, HBc Ab total, Anti-HDV, HCV Ab, Human Immundeficiency Virus (HIV) Ab ve HBV DNA düzeyleri bakıldı.

Çalışmada hedef grubumuz inaktif HBsAg taşıyıcısı ve HBeAg negatif kronik hepatitli hastalar olduğundan, HBeAg pozitif, hepatit C, hepatit D ve HIV gibi eşlik eden infeksiyonu, kronik alkol alımı ve hepatotoksik ilaç alımı öyküsü, önceden antiviral tedavi alan, dekompanse KC yetmezliği ve alfa-1 antitripsin eksikliği, Wilson hastalığı, hemakromatozis, otoimmün hepatit gibi diğer kronik KC hastalığı tanısı olan hastalar çalışmaya alınmadı.

Her üç bölge hastanesinde de ALT için, kendi laboratuvarlarının kullandığı kitlerin, normal üst sınırının altında olan değerler normal ALT olarak kabul edildi. Hastaların 6 aylık periyot boyunca en az 3 defa serum ALT düzeyleri test edildi. ALT düzeylerinin takipleri sırasında en az bir kere normal üst sınırından yüksek olan değerler ALT yüksek olarak kabul edildi. (Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde erkek ALT: 0-41 U/L, kadın ALT: 0-31 U/L, Atatürk Devlet Hastanesi'nde 0-42 U/L, Antalya Devlet Hastanesi'nde 5-45 U/L)

Bu çalışmada; inaktif HBsAg taşıyıcılarının HBeAg negatif kronik hepatitli hastalardan ayırt edilmesine yardımcı olacak HBV DNA eşik değerinin saptanması ve bunun histopatolojik inceleme ile teyit edilmesi amaçlanmıştır. Çalışmamızda her iki grubun ayrılması için eşik HBV DNA düzeyi 10^4 kopya/ml kabul edilmiş olup, ALT düzeyine bakılmaksızın HBV DNA düzeyi 10^4 - 10^5 kopya/ml olan hastalar çalışmaya alınmıştır.

3.2. Karaciğer Biyopsisinin Yapılması ve Değerlendirilmesi

KC biyopsisini kabul eden hastaların hepsinin biyopsi öncesi tam kan sayımı, protrombin zamanı, parsiyel tromboplastin zamanı ve batin veya KC-safia yolları ultrasonografisi yapıldı. Trombosit sayısı $60000/\text{mm}^3$, hemoglobin $10\text{gr}/\text{dl}$ 'nin altında, protrombin zamanı 3 sn'den uzun ve ultrasonografik incelemede KC'de kitle, hemanjiom olan hastalara KC biyopsisi yapılmadı. Bu nedenlerle biyopsi yapılamayan hiçbir hasta olmadı. Hastalara KC biyopsisi orta koltuk altı çizgisi üzerinden matitenin en iyi alındığı interkostal aralıktan Menghini tekniği ile tek kullanımlık 16 veya 17 gauge numaralı Hepafix biyopsi iğne seti (Braun AG, Melsungen Germany) kullanılarak yapıldı. Tüm hastalar biyopsi sonrası nabız ve tansiyon arteriyel ölçümleri ile takip edildi ve biyopsiye bağlı komplikasyonlar açısından en az 24 saat gözlem altında tutuldu.

Alınan biyopsi materyalleri hematoksilin eozin, PAS, D-PAS, demir, retikulum, mason trikrom boyaları uygulanarak incelendi. Histopatolojik değerlendirmede; portal alan ve santral ven sayısı, lobul yapısı, buzlu cam görüntüsü, Piecemeal nekrozu, konflüen nekrozu, portal inflamasyon, lobül içi dejenerasyon ve fibrozis durumu esas alındı. Çalışmada KC biyopsi materyallerinin Histolojik Aktivite İndeksi (HAI) Ishak grade'leme sistemine, fibrozis ise Ishak ve Metavir evreleme sistemlerine göre yapıldı. Ishak grade sistemi HAI'sını 0-18 arasında skorlamakta ve $\text{HAI} \geq 4$ olan değerler kronik hepatit B, $\text{HAI} \leq 3$ olan değerler ise normal olarak kabul edildi.

3.3. Serum HBV DNA

3.3.1. Serum Örneklerinden HBV DNA'nın Ekstraksiyonu

Ekstraksiyon "High Pure Viral Nucleic Acid Kit" (Roche Diagnostics, Germany) kullanılarak üretici firmanın önerileri doğrultusunda gerçekleştirildi. Yöntemde kısaca, hedef nükleik asidi ortaya çıkarmak için internal kontrol eklenmiş serum örneği, proteinaz K içeren tampon ile inkube edilir. Kolon santrifüjleme yöntemi kullanılarak, nükleik asit kaotropik tuz varlığında silika membranlar üzerindeki "fiber glass" yüzeye bağlanır. Yıkama basamaklarından sonra, nükleik asit, su içerisine süzülür. Sonuçta $200 \mu\text{L}$ serum örneğinden $50 \mu\text{L}$ 'lik ürün elde edilir.

3.3.2. Viral Yük Miktarı Tayini

Olguların viral yük miktarı, HBV'nin zgn gen bölgesinin oaltılmasını esas alan "TaqMan" real-time PCR metodu olan COBAS TaqMan HBV Test (Roche Diagnostics, Germany) sistemi ile üretici firmanın nerileri doğrultusunda gerçekleştirildi. Testin saptama aralığı $35-64 \times 10^7$ kopya/ml dir. Testin amplifikasyon ve deteksiyon basamakları kısaca şunlardır:

- 1- Kitin içerisindeki "COBAS TaqMan HBV Master Mix" solusyonu "K-carrier" adı verilen amplifikasyon tüplerine uygun olarak dağıtılır
- 2- Ekstrakte edilen örnekler ve kontroller de bu tüplere dağıtılır.
- 3- "K-carrier"lar COBAS TaqMan 48 analizörüne yerleştirilerek termal cycleler çalıştırılır.
- 4- Dual işaretli floresans probları amplifikasyon sırasında PCR rnlerinin gerçek zamanlı olarak saptanmasına olanak salar. Problar HBV'ye ve internal kontrole özgü oligonkleotidlerdir.
- 5- Amplifikasyon sırasında real-time PCR cihazından elde edilen floresans verilerine göre pozitif örneklerin kantitatif sonuçları analizörün software'i yardımıyla hesaplanır.

3.4. İstatistiksel Değerlendirme

Çalışmada hastaların ALT düzeyleri ile HAI değerleri Fisher Kesin ki-kare testi ve ROC eğrisi analizi ile değerlendirildi. Güvenlik aralığı %95 olarak kabul edildi. İstatistiksel olarak; $p \leq 0.05$ olan sonuçlar anlamlı olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

Bu çalışma Antalya il merkezindeki 3 büyük bölge hastanesinde yürütüldü. Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi, Atatürk Devlet Hastanesi ve Antalya Devlet Hastanesi Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji polikliniklerine rutin kontrol için başvuran ve en az 6 aydır HBsAg pozitif ve HBeAg negatif olan hastalar çalışmaya alındı.

Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Polikliniği'nde takip edilen ve en az 6 aydır HBsAg pozitif, HBeAg negatif olan 167 hasta çalışmaya kabul edildi. ALT düzeyine bakılmaksızın 24 hastanın HBV DNA'sı 10^4 - 10^5 kopya/ml arasındaydı. Bu gruptaki 21 hastaya KC biyopsisi önerildi ve biyopsiyi kabul eden 14 hastaya KC biyopsisi yapıldı. Üç hastaya ise rutin kontrollerine gelmedikleri için biyopsi önerilemedi.

Atatürk Devlet Hastanesi Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Polikliniği'nde takip edilen ve en az 6 aydır HBsAg pozitif, HBeAg negatif olan 161 hasta çalışmaya kabul edildi. ALT düzeyine bakılmaksızın 33 hastanın HBV DNA'sı 10^4 - 10^5 kopya/ml arasındaydı. Bu gruptaki bir hasta eşlik eden hepatit C enfeksiyonu nedeniyle çalışmadan çıkartıldı. Hastaların yedisi rutin takiplerine gelmedikleri için, bir hasta üriner tüberküloz tanısıyla halen tedavi aldığı için ve bir hasta da ileri yaşta (64 yaşında) olmasından dolayı 9 hastaya KC biyopsisi önerilmedi. Toplam 23 hastaya KC biyopsisi önerildi, biyopsiyi kabul eden 12 hastaya KC biyopsisi yapıldı. Üç hastanın KC biyopsi materyali histopatolojik inceleme için yetersiz kabul edildi. Çalışmaya 9 hastanın sonuçları dahil edildi.

Antalya Devlet Hastanesi Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Polikliniği'nde takip edilen ve en az 6 aydır HBsAg pozitif, HBeAg negatif olan 32 hasta çalışmaya kabul edildi. ALT düzeyine bakılmaksızın dört hastanın HBV DNA'sı 10^4 - 10^5 kopya/ml arasındaydı. Bu gruptaki hastaların hepsine KC biyopsisi önerildi ve biyopsiyi kabul eden 4 hastaya da KC biyopsisi yapıldı.

Sonuç olarak, bu çalışmada en az 6 aydır HBsAg pozitif, HBeAg negatif olan toplam 359 hastanın serum HBV DNA ve ALT düzeyleri değerlendirildi ve serum HBV DNA düzeyi 10^4 - 10^5 kopya/ml olan 60 hasta saptandı. Bu hastalardan biyopsiyi kabul eden 30'una KC biyopsisi yapıp 27'sinin biyopsi sonucu değerlendirilmeye alındı. 3 hastanın KC biyopsi materyali yetersizdi kabul

edildiği için histopatolojik değerlendirme yapılamadı. Yirmi yedi hastanın 20'sinin ALT'si normal iken 7'sinin ALT'si yüksekti (Çizelge 4.1.).

Çizelge 4.1. Hastaların merkezlere göre dağılımı

	Toplam Hasta (n)	HBV DNA 10^4 - 10^5 kopya/ml hasta grubu			
		Hasta sayısı (n)	Çalışmaya alınan hasta sayısı** (n)	ALT normal (n)	ALT yüksek (n)
AÜTF*	167	24	14	11	3
Atatürk D.H.	160	32	9	6	3
Antalya D.H.	32	4	4	3	1
Toplam	359	60	27	20	7

* Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi

** Çalışmaya alınan hasta sayısı: Biyopsi yapıp çalışmaya alınan hasta sayısı

Serum HBV DNA düzeyi 10^4 - 10^5 kopya/ml olan hastaların ALT düzeylerine ve KC biyopsisi yapıp yapılmamasına göre dağılımları çizelge 4.2'te verilmiştir.

Çizelge 4.2. Serum HBV DNA 10^4 - 10^5 kopya/ml olan hastaların ALT düzeylerine ve KC biyopsisi yapıp yapılmamasına göre dağılımı

	KC biyopsisi yapılmayan (n)	KC biyopsisi yapılan (n)	Çalışmaya alınan* (n)	Toplam
ALT Normal	26	23	20	49
ALT Yüksek	4	7	7	11
Toplam	30	30	27	60

* Çalışmaya alınan hasta sayısı: Biyopsi yapıp çalışmaya alınan hasta sayısı

Takip edilen grupta 242 (%67.4) erkek, 117 (%32.6) kadın hasta varken, çalışmaya alınan 27 hastanın 20 (%74)'sı erkek, 7 (%26)'si kadındı. Takip edilen

grubun yaşları 12-76 arasında olup yaş ortalaması 36.36'di. Çalışma grubunun ise yaşları 20-52 arasında ve yaş ortalaması 33.85'di.

Takip edilen hastaların serum HBV DNA düzeyi dağılımları; 106 (%29.5) hastanın 10^5 kopya/ml ve üzerinde, 193 hastanın (%53.76) 10^4 kopya/ml ve altında, 60 (%16.71) hastanın ise 10^4 - 10^5 kopya/ml arasındaydı. Yani takip edilen HBsAg pozitif, HBeAg negatif hastaların yarısında HBV DNA düzeyi 10^4 kopya/ml'nin aşağısındaydı. Takip hastalarının serum HBV DNA düzeylerine göre ALT dağılımı Çizelge 4.3'de verilmiştir. Çizelge 2.4'de belirtildiği gibi inaktif HBsAg taşıyıcı kriterlerine uyan yani serum HBV DNA'sı 10^5 kopya/ml aşağısında olan ve ALT'si normal olan hasta sayısı 221'di (%61.5). Eğer inaktif HBsAg taşıyıcı ile HBeAg negatif kronik hepatitli hastaları ayırt etmek için eşik HBV DNA düzeyi 10^4 kopya/ml kabul edilirse 172 (%47.9) hasta inaktif HBsAg taşıyıcısı grubuna girmektedir.

Çizelge 4.3. Serum HBV DNA düzeylerine göre ALT dağılımı

HBV DNA kopya/ml	ALT Normal (n)	ALT Yüksek (n)	Toplam (n)
$\leq 10^4$	172	21	193
10^4 - 10^5	49	11	60
$\geq 10^5$	43	63	106
Toplam	264	95	359

İnaktif HBsAg taşıyıcısı olan hastaların serum HBV DNA için eşik değeri 10^5 kopya/ml kabul edildiğinde ortalama HBV DNA düzeyi 9570 kopya/ml'di.

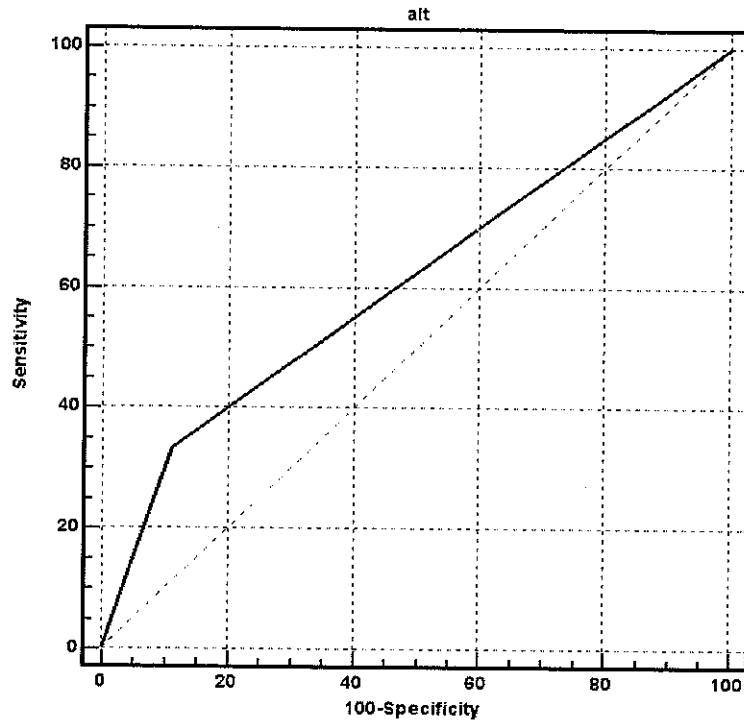
Çalışmamızda inaktif HBsAg taşıyıcı ile HBeAg negatif kronik hepatitli hastaların ayırt edilmesi için eşik HBV DNA düzeyi 10^4 kopya/ml kabul edildi. Serum HBV DNA düzeyi 10^4 - 10^5 kopya/ml olan 60 hastanın ALT düzeyine bakılmaksızın 30'una biyopsi yapıldı ve 27'si değerlendirmeye alındı. Biyopsi yapılan 27 hastanın 18'inde HAI ≥ 4 bulundu, yani hastalar kronik hepatit B tanısı aldı. Bu hastaların 12'sinin ALT'si normal, 6'sının yüksekti. HAI ≤ 3 olan 9 hastanın 8'inin ALT'si normal 1'inin ALT'si yüksekti. Serum HBV DNA düzeyleri 10^4 - 10^5 kopya/ml arasında olan hastaların HAI'lerine göre ALT dağılımı Çizelge 4.4'te gösterilmiştir.

Çizelge 4.4. HAI değerlerine göre ALT düzeylerinin dağılımı.

	ALT Normal	ALT Yüksek
HAI ≤ 3	8	1
HAI ≥ 4	12	6

$p=0.36$ (Fisher Kesin ki-kare testi)

Serum HBV DNA düzeyi 10^4 - 10^5 kopya/ml arasında ve HAI ≥ 4 olan hastalarda, ALT düzeyinin yüksek veya normal olması istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. (Çizelge 4 4)



Şekil 4.1. Serum HBV DNA düzeyi 10^4 - 10^5 kopya/ml arasında olan hastalarda ALT ve HAI'nın ROC eğri analizi

Yapılan diğer bir istatistik çalışma ile; ROC eğri analizinde, eğri altında kalan alan 0.61 (%95 güvenlik aralığı 0.41-0.79) idi. İstatistiksel olarak bu değer yorumlandığında; serum HBV DNA düzeyi 10^4 - 10^5 kopya/ml arasında ve HAI ≥ 4 olan hastalarda ALT düzeyinin ayırt edici bir parametre olmadığı saptandı. (Şekil 4.1.)

Ayrıca çalışmaya alınma kriterlerine uymamakla birlikte hastaların takibi sırasındaki gözlemlerimize göre; ALT'si yüksek, serum HBV DNA düzeyi 10^4 kopya/ml'den düşük olan ve ALT yüksekliğini açıklayacak kronik KC hastalığı

veya diğer sistemik hastalığı olmayan 3 hastaya kendi istekleri zerine KC biyopsisi yapıldı ve 3 hastada kronik hepatit (HAI \geq 4) tesbit edildi.

5. TARTIŞMA

1965 yılında ilk olarak ortaya konulan Hepatit B virüsü akut dönemde veya akut alevlenme dönemlerinde fulminan hepatite yol açabilmesi, kronik hepatit formuna dönebilmesi, kronik hepatit oluştuğunda ise KC sirozuna ve HSK'e yol açabilmesinden dolayı tüm dünyanın olduğu gibi, ülkemizin de en önemli sağlık problemlerinden biridir. Tüm dünyada yaklaşık 2 milyar kişinin HBV ile infekte olduğu ve 400 milyon kişinin de kronik taşıyıcı olduğu tahmin edilmektedir. Taşıyıcıların %15-40 kadarında siroz, KC yetmezliği, HSK gibi ciddi hepatik komplikasyonlar gelişebilmekte ve her yıl bir milyondan fazla insan HBV ile ilgili kronik KC hastalıklarından ölmektedir (3, 29).

Ülkemizde de yaklaşık 4 milyon kişinin kronik taşıyıcı olduğu tahmin edilmektedir. Yüz binleri bulan kronik hepatit ve KC sirozu vakaları dışında çok büyük bir grubun ise tanınmadığı veya tedavi şansı bulamadığı kabul edilmektedir (11).

Kronik B hepatitinin doğal seyrinde; HBeAg pozitif kronik hepatit, HBeAg negatif kronik hepatit ve inaktif HBsAg taşıyıcısı olmak üzere üç klinik tablo söz konusudur (7).

HBeAg pozitif olan hastaların her yıl ortalama % 5-15'inde spontan serokonversiyon olmakta yani HBeAg kaybolarak HBeAb pozitifleşmekte ve hasta inaktif HBsAg taşıyıcısı konumuna geçmektedir. Bu dönemde aminotransferazlar normal, nekroinflamatuvar aktivite ise normal veya minimaldir. Serum HBV DNA düzeyleri ise hibridizasyon yöntemi ile tesbit edilemeyen ancak sensitif PCR yöntemleri ile tesbit edilebilir olan 10^5 kopya/ml'nin altındadır. Ancak hastaların bir kısmında HBeAg negatifleşmesine rağmen viral replikasyon devam eder ve serum HBV DNA düzeyi 10^5 kopya/ml üzerine çıkar. HBeAg negatif kronik hepatit grubuna giren bu hastalarda mutant virus baskındır. Mutant tipteki virus infeksiyonu ülkemizde de baskın olan genotip D'de daha sık görülmektedir. HBeAg negatif kronik hepatitli hastaların KC biyopsilerinde nekroinflamatuvar aktivite olup, ALI düzeyleri persistan veya aralıklı yükselmeler gösterir.

HBeAg negatif kronik hepatitli hastalar en sık inaktif HBsAg taşıyıcısı hastalar ile karışmaktadır. Bu durum, özellikle sürekli biyokimyasal ya da

virolojik aktivitesi olandan ziyade uzun süreli ALT'si normal olan HBeAg negatif kronik hepatitli hastalar için geçerlidir. Çünkü HBeAg negatif kronik hepatitli hastaların %45-65'inde ALT düzeyleri normal gidişler sırasında zaman zaman alevlenmeler gösterip çok kısa sürede tekrar normal seviyelere inmektedir. Serum ALT düzeyleri çok sık takip edilse bile, çok kısa bir süre yükselme gösteren değerler yakalanamayabilir (2, 3). Her iki grubun ayırımı için hangi aralıklarla aminotransferaz takibinin yapılması konusunda halen fikir birliği yoktur. Manesis (57) ilk 2 yıl boyunca 3 ayda bir, daha sonra 6 ayda bir; Martinot-Peignoux (58) ilk 6 ay boyunca 2 ayda bir, daha sonra 6 ayda bir; Papatheodoridis (59) ilk bir yıl boyunca en az 4 defa ALT takibini önermektedir. Serum HBV DNA için 10^5 kopya/ml her iki grubun ayrılması için eşik değer kabul edilmesine rağmen HBeAg negatif kronik hepatitli hastaların önemli bir kısmında serum HBV DNA düzeyi 10^5 kopya/ml'nin altında saptanmıştır (8).

HBeAg negatif kronik hepatitli hastalar infeksiyonun ileri dönemlerini temsil ettikleri ve immun tolerojen sayılan HBeAg'den mahrum oldukları için KC'deki nekroinflamasyon ileri evrelerde ve aktiftir. Bu hastalarda siroza geçiş sık ve HSK riski artmıştır. HBeAg negatif kronik hepatitli hastalarla ilgili İtalya'da yapılan bir çalışmada, 6 yıllık takip sonunda hastaların üçte birinde siroz geliştiği ve 322 hastayı içeren diğer bir çalışmada ise, 4 yıllık takipte mortalite ve HCC gelişiminin sıra ile %29 ve %14 olduğu ve bu oranın HBeAg pozitif kronik hepatitli hastalar ile kıyaslandığında yüksek olduğu rapor edilmiştir (60). Bu nedenle, bu grup hastaların inaktif HBsAg taşıyıcısı hastalardan ayırt edilip, tedavi edilmesi gerektiği vurgulanmaktadır (3, 45).

Çalışmamızda HBeAg negatif kronik hepatitli hastaların inaktif HBsAg taşıyıcılarından ayırt edilmesine yardımcı olacak eşik HBV DNA değerinin saptanması ve bunun histopatolojik inceleme ile doğrulanması amaçlanmıştır. İlk olarak 2000 yılındaki NIH toplantısında "inaktif HBsAg taşıyıcısı" terimi önerilmiş ve bu grup hastaların serum HBV DNA düzeylerinin 10^5 kopya/ml'den düşük olması gerektiği belirtilmiştir (58, 61). Fakat 2000 yılındaki NIH toplantısında alınan kararlardan sonra birkaç yeni araştırmada HBeAg negatif kronik hepatitli hastaların serum HBV DNA düzeylerinin 10^5 kopya/ml'den düşük, inaktif HBsAg taşıyıcıların ise serum HBV DNA düzeylerinin 10^5

kopya/ml'den çok daha düşük olduğu rapor edilmiştir (57, 58, 62, 63, 64). Biz bu araştırmalardan yola çıkarak her iki grubun ayrılması için serum eşik HBV DNA düzeyini 10^4 kopya/ml kabul ettik. Çalışmamızda, Antalya il merkezindeki üç hastanede takip edilen HBsAg pozitif, HBeAg negatif 359 hasta NIH önerilerine göre değerlendirildiğinde 221 (%61.5)'i inaktif HBsAg taşıyıcısı kriterlerine uymaktaydı ve bu grup hastaların ortalama serum HBV DNA düzeyi 9.5×10^3 kopya/ml saptandı. Bizim önerdiğimiz 10^4 kopya/ml düzeyi, eşik değer olarak alındığında ise 172 hasta (%47.9) inaktif HBsAg taşıyıcısı kriterlerine girmektedir. Sonuç olarak NIH kriterlerine göre inaktif HBsAg taşıyıcısı olan 49 hasta, bizim belirlediğimiz çalışma kriterlerine göre HBeAg negatif kronik hepatit yönünden karaciğer histopatolojisi ile değerlendirildi. Ancak hastaların 23'üne biyopsi yapıldı bunların 20'si değerlendirmeye alınabildi. HBeAg negatif kronik hepatitli hastaların %45-65'inde ALT düzeyleri çok kısa süre içinde alevlenme ve sonrasında normalleşme gösterdiği için ALT normal olan hastalara da biyopsi yapıldı (2, 3). ALT'si de normal olan bu 20 hastanın 12'sinde HAI ≥ 4 yani kronik hepatit tesbit edildi. Eğer bu 12 hasta NIH kararlarına göre inaktif HBsAg taşıyıcısı kabul edilmiş olsaydı, baştan erken tanı ve tedavi şansını kaybetmiş olacaktı. Ayrıca ALT'si yüksek ve HBV DNA düzeyi 10^4 - 10^5 kopya/ml olan 11 hastadan biyopsi yapılan 7 hastanın 6'sında HAI ≥ 4 idi. HAI'i 4 ve üzerinde olan hastalarda, ALT'nin normal veya yüksek olması istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ve ALT'nin KC'deki hasarı belirleyici bir parametre olmadığı saptandı.

Jeong Heo et al (63) çalışmalarında inaktif HBsAg taşıyıcılarından HBeAg negatif kronik hepatit B'li hastaların ayrılmasına yardımcı olacak serum HBV DNA düzeyinin saptanmasını amaçlamışlardır. Serum HBV DNA düzeyinin hibrid capture, branched DNA sinyal amplifikasyon ve spot hibridizasyon gibi PCR dışı kantitatif yöntemlerle saptanmasının uygun olmadığını çünkü bu testlerin 10^5 - 10^6 kopya/ml üzerindeki değerleri ölçebildiği için sınırda bilgi vereceğini ve her iki grubun ayrılması için PCR gibi kantitatif testlerin kullanılması gerektiğini belirtmişlerdir. Çalışmalarında PCR ile inaktif HBsAg taşıyıcısı olarak tanımlanan hastaların %89.2'sinde serum HBV DNA'yi saptayabilmişler ve ortalama HBV DNA düzeyinin 3.2×10^3 kopya/ml olduğunu ve her iki grubun ayırt edilmesi için optimal eşik değerinin 2.0×10^4 kopya/ml olması

gerektiğini bildirmişlerdir. Manesis et al. (57); HBsAg pozitif, HBeAg negatif 196 hasta üzerinde yaptıkları çalışmada NIH kriterlerine göre inaktif HBsAg taşıyıcısı grubundaki 62 hastanın hepsinde serum HBV DNA düzeyini 3×10^4 kopya/ml'den düşük, 10 hastada ise saptanamadığını belirtmiş ve PCR tekniği ile serum HBV DNA düzeyinin HBeAg negatif kronik hepatit B ile inaktif HBsAg taşıyıcılarının birbirinden ayrılmasına yardımcı olabileceğini ve bilhassa 3×10^4 kopya/ml'nin inaktif HBsAg taşıyıcılar için üst sınır olduğunu belirtmişlerdir. Kessler et al. da (64) inaktif HBsAg taşıyıcılarında ortalama serum HBV DNA düzeyini 5.6×10^3 kopya/ml rapor etmiştir. Bizim çalışmamızda ise NIH önerilerine göre inaktif HBsAg taşıyıcılarının ortalama serum HBV DNA düzeyi 9.5×10^3 kopya/ml olup sadece 9 hastada HBV DNA düzeyi saptanamamıştır. Her üç çalışmada da inaktif HBsAg taşıyıcılarında ortalama serum HBV DNA düzeyleri bizim saptadığımız ortalama değere benzerdi ve iki grubun ayırımı için önerilen eşik değer bizim önerdiğimiz değere yakındı.

Chu et al. (62) farklı evrelerdeki 165 kronik hepatitli hastanın serum HBV DNA düzeylerini PCR ile test etmişlerdir. HBeAg negatif kronik hepatitli hastaların yaklaşık üçte ikisinin serum HBV DNA düzeylerini 10^5 kopya/ml altında, 2 hasta hariç diğer tüm inaktif HBsAg taşıyıcılarının ise serum HBV DNA düzeylerini 10^4 kopya/ml altında bulmuşlardır. Bu değerler bizim çalışmamızda belirlenen 10^4 - 10^5 kopya/ml değerleri ile aynıdır. Takiplerde serum HBV DNA düzeyi $\geq 10^4$ kopya/ml olan HBeAg negatif kronik hepatitli hastaların tedavisini önermektedir. Tedavi için belirlenen bu eşik HBV DNA düzeyi Amerika Birleşik Devletleri'nde yayınlanan tedavi algoritmasında (8) ve ülkemizde hazırlanan "Viral Hepatit Tanı ve Tedavi Konsensus Toplantısı Ön Raporu"nda kabul edilmiştir (65).

Martinot-Peignoux et al. (58) 85 inaktif HBsAg taşıyıcısından oluşan homojen bir grubun serum HBV DNA düzeylerini sensitif PCR ile ölçmüşler, ondört (%16) hastanın HBV DNA düzeyleri saptanamazken, 2 hastanın 10^5 kopya/ml'den yüksek, 55 hastanın 10^4 kopya/ml'den düşük ve 14 hastanın 10^4 - 10^5 kopya/ml arasında bulunmuştur. Ortalama 3 yıllık takip periyodu boyunca hastaların çoğunda serum HBV DNA düzeyleri sabit kalmış ve ortalama serum

HBV DNA düzeyi 1300 kopya/ml ($200-179 \times 10^3$) olarak saptanmıştır. Ellisekiz hastaya biyopsi yapılmıştır ve KC histopatolojik bulguları 8 hastada normal iken, 50 hastada orta şiddette nekroinflamasyon gözlenmiştir. Bu çalışmada dikkati çeken en önemli noktalar biyopsi yapılan 58 hastanın en az 42'sinin serum HBV DNA düzeyinin 10^4 kopya/ml'nin altında yani inaktif HBsAg taşıyıcısı statüsünde olması ve serum HBV DNA'sı 10^5 kopya/ml'den düşük olan 56 hastanın 50 (%85.7)'sinde orta şiddette nekroinflamasyon saptanmasıdır. Çalışma grubumuza dahil olmasa da serum HBV DNA düzeyi 10^4 kopya/ml'den düşük ve ALT'si yüksek olan ve yapılan araştırmalarla ALT yüksekliğini açıklayacak kronik KC hastalığı veya diğer sistemik hastalığı olmayan 3 hastaya kendi istekleri üzerine KC biyopsisi yapıldı ve 3 hastada kronik hepatit (HAI ≥ 4) tesbit edildi. Bu sonuçlar; serum HBV DNA eşik değerinin 10^4 kopya/ml'den daha aşağıya çekilmesi mi gerekiyor sorusunu akla getirmekle birlikte bizim kanaatimiz eşik değerinin 10^4 kopya/ml olması ve daha düşük serum HBV DNA düzeyi ve ALT yüksekliği olanlara hasta özelinde karar verilmesi yönündedir.

Özellikle HBeAg negatif kronik hepatitte serum HBV DNA düzeyi arttıkça histolojik aktivite indeks skoru artmaktadır. Peng Jie et al (66) serum HBV DNA düzeyi yüksek (100 pg/ml) olan hastaların %91.9'unda, düşük (20 pg/ml) olanların ise %8.2'sinde HAI skorunun 9 olduğunu belirtmiştir. Lindh (67) ve Manesis (57) de benzer sonuçlar rapor etmiştir. Peng Jie et al (66), sadece hastaların küçük bir kısmında serum HBV DNA düzeyinin histolojik aktiviteyi yansıtmadığını, serum HBV DNA düzeyinin HBeAg negatif kronik hepatitli hastalarda sıklıkla düşük veya geniş aralıklarla fluktuasyonlar gösterdiğini, bundan dolayı doğru tanı için tek biyokimyasal, serolojik veya serum HBV DNA saptanmasının her zaman yararlı olmadığını belirtmişlerdir. Halbuki Manesis et al (57) HBeAg negatif kronik hepatitli hastaların bazal ALT düzeyine kıyasla tek bazal serum HBV DNA düzeyi ile daha doğru sınıflandırıldığını rapor etmiştir.

F ter Borg et al (68) 1998 yılında yaptıkları çalışmada HBsAg pozitif, HBeAg negatif olan 123 hastanın KC biyopsisini incelemiş ve 42 hastada kronik aktif hepatit saptamışlardır. Hastaların hem branched DNA hibridizasyon hem de PCR yöntemi ile serum HBV DNA düzeyleri ölçülmüştür. PCR'i pozitif bulunan

ve biyopsisinde kronik aktif hepatit saptanan 23 hastanın 10'unun ALT'sinin normal olduğu belirlenmiş ve bundan dolayı normal aminotransferaz aktivitesinin kronik aktif hepatit varlığını ekarte ettiremeyeceğini vurgulamışlardır. Aynı araştırmacıların yaptığı diğer bir çalışmada (69) ise HBsAg pozitif, HBeAg negatif olan 174 hastanın KC biyopsisi incelenmiş ve ALT'si normal olan 104 hastanın %20 (20)'sında piecemeal nekrozu, %10'unda (10) evre 3-4 fibrozis yani siroz saptanmıştır. Bizim çalışmamızda da benzer şekilde ALT'nin normal olmasının HBeAg negatif kronik hepatiti ekarte ettirmediği saptandı.

Turhan vd (70) ALT düzeyi normal olan 374 hastaya KC biyopsisi yapmış ve 68 (%18) hastada kronik hepatit saptamıştır. Görenek vd (71) da HBsAg pozitif, HBeAg negatif 70 hastanın 18 (%25.7)'inde kronik hepatit bulmuş ve bu hastaların 12 (%66.6)'sinin ALT düzeyinin normal olduğunu belirtmiş, ayrıca ALT değerinin normal veya yüksek olarak saptanma oranlarının birbirinden istatistiksel olarak farklı olmadığını, bu yüzden ALT değerinin normal veya yüksek sınırlarda olması ile olguların histopatolojik tanılarının tahmin edilmesinin olanaksız olduğunu bildirmişlerdir. Ancak bu son iki çalışmada da hastaların serum HBV DNA düzeyleri araştırılmamıştır. Çalışmamızda da benzer sonuç bulunmuş olup HBeAg negatif kronik hepatitli hastaların histopatolojik tanısında, ALT düzeyinin normal veya yüksek olması istatistiksel olarak anlamlı değildi.

Bu çalışmanın sonucunda; HBeAg negatif kronik hepatitli hastaların inaktif HBsAg taşıyıcılarından ayırt edilmesi için eşik serum HBV DNA düzeyi 10^4 kopya/ml kabul edilmelidir. Ayrıca serum HBV DNA düzeyi 10^4 - 10^5 kopya/ml arasında ve HAI yüksek olan hastalarda ALT düzeyinin normal veya yüksek olmasının istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptandı. Buna göre HBeAg negatif kronik hepatitli hastaların inaktif HBsAg taşıyıcılarından ayırt edilmesi için ALT düzeyi belirleyici bir faktör değildir. Birbiri üzerine bu kadar örtüşen bu iki grubun ayırımında, altın standardın KC'in histopatolojik incelenmesi olduğu kanaatindeyiz.

KC biyopsisi; invaziv bir işlem olduğundan, kronik hepatitli hastalarda halsizlik dışında semptom olmamasından ve takiplerde ALT düzeyilerindeki alevlenmelerin yakalanamamasından dolayı çoğu hasta tarafından kabul

edilmemektedir. Biyopsiyi kabul etmeyen hastaların takiplerinin nasıl yapılması konusunda literatür bilgisine rastlanmamakla birlikte bizce serum HBV DNA düzeyi 10^4 kopya/ml'den yüksek olan HBsAg pozitif, HBeAg negatif hastaların ALT düzeyleri daha sıkı takip edilmeli ve ALT seviyesinde alevlenme fark edildiğinde hasta KC biyopsisine ikna edilmelidir.

Sonuç olarak; kronik hepatit B sessiz bir hastalıktır, semptomlar KC hasarının şiddeti ile orantısızdır. HBeAg negatif kronik hepatitli hastalarda sirozunda dahil olduğu şiddetli KC hasarı gelişmektedir. Bazı vakalarda ara ara olan ALT yükselmeleri fark edilememektedir. Bundan dolayı ALT düzeyi normal olan HBeAg negatif hastalar her zaman inaktif HBsAg taşıyıcısı değildir. Birbiri ile çok karışan HBeAg negatif kronik hepatitli hastaların inaktif HBsAg taşıyıcılarından ayırt edilmesi için eşik HBV DNA düzeyi 10^4 kopya/ml olmalıdır. Her iki grubun ayırımında serum ALT düzeyi belirleyici bir faktör olarak saptanmamıştır. HBeAg negatif kronik hepatitli hastaların inaktif HBsAg taşıyıcılarından ayırt edilmesinde KC'in histopatolojik olarak incelenmesinin yarar oranına göre altın standart olduğu kanaatindeyiz. Bununla birlikte; sonuçlarımızın daha net ortaya konulabilmesi için daha uzun süreli ve daha fazla sayıda hastayı kapsayan çalışmalarla desteklenmesi uygun olacaktır.

SONUÇLAR

Çalışmamızda en az 6 aydır HBsAg pozitif, HBeAg negatif ve serum HBV DNA düzeyi 10^4 - 10^5 kopya/ml arasında olan ve yapılan KC biyopsisinde HAI ≥ 4 olan yani kronik hepatit saptanan hastalarda ALT düzeyinin normal veya yüksek olmasının istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptandı. Bundan dolayı HBeAg negatif kronik hepatitin inaktif HBsAg taşıyıcılarından ayırt edilmesinde, serum ALT düzeyinin belirleyici bir parametre olmadığı kararına varıldı.

Çalışmamızdan elde edilen veriler, HBeAg negatif kronik hepatitin inaktif HBsAg taşıyıcılarından ayırt edilmesi için eşik serum HBV DNA düzeyinin 10^4 kopya/ml kabul edilmesi yönündedir.

Ayrıca KC biyopsisi invaziv bir işlem olmasına rağmen halen her iki grubun ayırımında, kronik hepatit tanısının konmasında ve doğrulanmasında vazgeçilmez bir yöntemdir. Bundan dolayı her iki grubun ayırımında altın standardın KC biyopsisi olduğu kanaatindeyiz

ÖZET

HBV infeksiyonu kronik hepatite, siroza ve HSK'ya neden olmasından dolayı insanlığı etkileyen en önemli infeksiyon hastalıklarından biridir. Dünyada 350 milyon kişinin, ülkemizde ise yaklaşık 4 milyon insanın kronik taşıyıcı olduğu tahmin edilmektedir.

İnaktif HBsAg taşıyıcılığı en çok prekor veya kor promoter bölgesindeki mutasyona bağlı HBeAg oluşumunun görülmediği fakat replikasyonun devam ettiği mutant tip hepatit B infeksiyonu olan HBeAg negatif kronik hepatit B ile karışmaktadır. Ülkemizdeki kronik hepatit B'li hastaların %60'ını HBeAg negatif kronik hepatit B'li hastalar (mutant tip infeksiyon) oluşturur. Bu hastalar da siroza gidiş sık ve HSK riski artmış olduğundan erken tanı konulup tedavi edilmelidir. HBeAg negatif kronik hepatitli hastalarla inaktif HBsAg taşıyıcıları arasındaki ayırıcı tanı serum aminotransferaz ve HBV DNA düzeyi ve KC'deki kronik nekroinflamatuvar hastalığın histopatolojik olarak ortaya konması ile yapılabilmektedir. HBeAg negatif kronik hepatitli hastaların % 45-65'inde serum aminotransferaz düzeyleri normal sınırlar içinde seyrederken zaman zaman çok kısa süre içinde dalgalanmalar gösterip tekrar normal seviyelere hızla inmektedir. ALI seviyesindeki bu kısa süren dalgalanmalar yakalanamazsa, hastalığı inaktif HBsAg taşıyıcılığından ayırtetmek mümkün değildir. 2000 yılındaki NIH toplantısında her iki grubun ayırımı için eşik serum HBV DNA düzeyinin 10^5 kopya/ml olması önerilmiştir. Fakat sonraki yıllarda yapılan çalışmalarda HBeAg negatif kronik hepatitli hastaların önemli bir kısmında serum HBV DNA düzeyinin 10^5 kopya/ml altında olduğu saptanmıştır. İnvaziv bir girişim olmasına rağmen KC biyopsisi her iki grubun ayırımında, kronik hepatit tanısının konmasında ve doğrulanmasında hala en önemli vazgeçilmez yöntemdir.

Bu çalışmanın amacı; HBeAg negatif kronik hepatit B'li hastaların inaktif HBsAg taşıyıcılarından ayırımına yardımcı olacak eşik serum HBV DNA düzeyinin saptanması ve bunun histopatolojik inceleme ile gösterilmesidir. Çalışma Antalya il merkezindeki 3 büyük bölge hastanesinde yürütüldü. En az 6 aydır HBsAg pozitif, HBeAg negatif olan 359 hastanın serum HBV DNA ve ALI düzeyleri değerlendirildi. Her iki grubun ayırımı için eşik serum HBV DNA

düzeyi 10^4 kopya/ml kabul edildi. Serum HBV DNA düzeyi 10^4 - 10^5 kopya/ml arasında olan 60 hasta çalışmaya alındı ve 30'una KC biyopsisi yapıp 27'sinin biyopsi sonucu değerlendirilmeye alındı. Üç hastanın KC biyopsi materyali yetersizdi). Yirmi yedi hastanın 20'sinin ALT'si normal iken 7'sinin ALT'si yüksekti. KC biyopsisi yapılan 27 hastanın 18'inde HAI ≥ 4 bulundu ve bu hastaların 12'sinin ALT'si normal, 6'sının yüksekti. HAI ≤ 3 olan 9 hastanın 8'inin ALT'si normal, 1'inin ALT'si yüksekti.

Serum HBV DNA düzeyi 10^4 - 10^5 kopya/ml arasında ve HAI ≥ 4 olan yani kronik hepatit saptanan hastalarda, ALT düzeyinin yüksek veya normal olması istatistiksel olarak anlamlı değildi.

Sonuç olarak; birbiri ile çok karışan HBeAg negatif kronik hepatitli hastaların inaktif HBsAg taşıyıcılarından ayırt edilmesi için eşik serum HBV DNA düzeyi 10^4 kopya/ml kabul edilmelidir. Çünkü serum HBV DNA düzeyi 10^4 - 10^5 kopya/ml arasında ve HAI yüksek olan hastalarda ALT düzeyinin normal veya yüksek olmasının istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptandı. Buna göre HBeAg negatif kronik hepatitli hastaların inaktif HBsAg taşıyıcılarından ayırt edilmesi için ALT düzeyi belirleyici bir faktör değildir. Birbiri üzerine bu kadar örtüşen bu iki grubun ayırımında, kar zarar oranına göre altın standardın KC'in histopatolojik incelenmesi olduğu kanaatindeyiz. Bununla birlikte; sonuçlarımızın daha net ortaya konulabilmesi için daha uzun süreli ve daha fazla sayıda hastayı kapsayan çalışmalarla desteklenmesi uygun olacaktır.

KAYNAKLAR

- 1- Lai CL, Ratziu V, Yuen MF, Poynard T. Viral hepatitis B. *Lancet* 2003;362: 2089-94.
- 2- Dinçer D. "İnaktif HBsAg Taşıyıcılığı; tanı ve izleme nasıl olmalı?" Çakaloğlu Y, Ökten A (eds). *Hepatit B ulusal uzlaşma toplantı metinleri*. 1.Baskı İstanbul: Medikal Yayıncılık, 2003:127-137.
- 3- Saltoğlu N. B tipi kronik hepatitin güncel tedavisi. Tabak F, Balık İ, Tekeli E (eds) *Viral Hepatit 2005*. 1.Baskı, İstanbul: Viral Hepatitle Savaşım Derneği Yayını, 2005:214-232.
- 4- Şentürk H. Tedaviye dirençli kronik hepatit B. Tabak F, Balık İ, Tekeli E (eds). *Viral Hepatit 2005*. 1 Baskı, İstanbul: Viral Hepatitle Savaşım Derneği Yayını, 2005:234-239.
- 5- Sarın SK, Kumar M and Iyagi P. HBV carrier or chronic HBV infection: Need for change in terminology. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 2004;19:103-107
- 6- Eroğlu C, Leblebicioğlu H, Günaydın M, Turan D, Sünbül M, Esen Ş, Saniç A. Farklı HBV genotiplerine bağlı koinfeksiyonların simple PCR metodu ile saptanması. VII. Ulusal Viral Hepatit Kongresi 2004, Ankara.
- 7- Fattovich G. Natural history of hepatitis B. EASL International consensus conference on hepatitis B. *J Hepatol* 2003;39:S50-S58.
- 8- Keeffe EB, Dieterich DT, Han S-H, et al. A treatment algorithm for the management of chronic hepatitis B virus infection in the United States. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2004;2(2):87-106.
- 9- Erden E. Kronik Hepatit'de Patoloji. Balık İ (eds) *Modern Tıp seminerleri:12 Kronik Hepatitler ve Tedavide Yenilikler*.1. Baskı. Ankara: Güneş Kitabevi Ltd Şti, 2001:1-18
- 10- Lee WM. Hepatitis B virus infection. *N Engl J Med* 1997;337: 1733-45.
- 11- Değertekin H. Türkiyede HBV epidemiyoloji ve bulaşım yolları. Çakaloğlu Y, Ökten A (eds). *Hepatit B ulusal uzlaşma toplantı metinleri*. 1.Baskı. İstanbul: İstanbul Medikal Yayıncılık, 2003: 99-109.
- 12- Kıyan M. Hepatit B Virusü. Tekeli M, Balık İ (eds). *Viral Hepatit 2003*. 1. Baskı. İstanbul: Viral Hepatitle Savaşım Derneği Yayını, 2003:86-120.

- 13- Mahoney FJ. Update on diagnosis, management and prevention of hepatitis B virus infection. *Clin Microbiol Rev* 1999;12:351-66.
- 14- Bilgiç A, Özacar I. Hepatit B virusu. Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M (eds). *İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi 2. Baskı* İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 2002:1350-1370
- 15- Murray PR, Rosenthal KS, Kobayashi GS, Pfaller MA. *Hepatitis Viruses. Medical Microbiology*. 4 th ed. St. Louis, Mosby Inc, 2002:591-605.
- 16- Hollinger FB, Dienstag JL. Hepatitis B and D Viruses. Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH (eds). *Manuel of Clinical Microbiology*. 7 th ed. Washington, ASM pres, 1999:1025-1042.
- 17- Robinson WS. Hepadnaviridae: Hepatitis B Virus and Hepatitis D Virus. Mandell GL, Douglas RG, Bennett JE (eds). *Principles and Practice of Infectious Disease* 5th ed. New York, Churchill Livingstone, 2000:1652-1685.
- 18- Serter D. *Virus, Riketsiya ve Klamidya Hastalıkları*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 1997:175-206.
- 19- Bozdayı A.M. Hepatit B Virüsü: virolojik özellikler-genotipler-klinik önemi. Çakaloğlu Y, Ökten A (eds). *Hepatit β ulusal uzlaşma toplantı metinleri 1.Baskı*. İstanbul: İstanbul Medikal Yayıncılık, 2003:11-27.
- 20- Doymaz MZ. *Medikal Viroloji*. 1. Baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri Ltd Şti, 2000:358-380
- 21- Seeger C, Mason WS. Hepatitis B virus biology. *Microbiol Mol Bio Rev* 2000;64:51-68.
- 22- Jeong JK, Yoon GS, Ryu WS. Evidence that 5'-end cap structure is essential for encapsidation of hepatitis B virus pregenomic RNA. *J Virol* 2000; 74(12):5502-8.
- 23- Warner EK, Hewlett MJ. Hepadnaviruses: Variations on the Retrovirus Theme. *Basic Virology*. 2nd ed. Victoria, Blackwell Science Ltd, 2004:377-382.
- 24- Lemon SM, Thomas DL. Vaccines to prevent viral hepatitis. *N Engl J Med* 1997;336:196-204
- 25- Szabo E, Paksa C, Kaposi Novak P, Schaff Z, Kiss A. Similarities and differences in hepatitis B and C virus induced hepatocarcinogenesis. *Pathology Oncology Research* 2004;10(1):5-11

- 26- Hie-Won L. Hann. Prevention of Hepatocellular Carcinoma: antiviral therapy, preneoplastic markers and iron nutrition. Liver Disease Prevention Center 2002:105-109.
- 27- Hollinger FB, Dienstag JL. Hepatitis B and D viruses. Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH (eds) Manual of Clinical Microbiology. Washington: ASM Press;1999:1025-1042.
- 28- Kidd-Lunggren K, Miyakawa Y, Kidd AH. Genetic variability in hepatitis viruses J Gen Virol. 2002;83 (Pt 6): 1267-80.
- 29- Tekeli A Hepatit B virüsünde mutasyon ve önemi Tabak F, Balık İ, Tekeli E (eds) Viral Hepatit 2005. 1.Baskı, İstanbul: Viral Hepatitle Savaşım Derneği Yayını, 2005:159-168
- 30- Imamura T, Yokosuka O, Kurihara T, Kanda T, Fukai K, Imazeki F, Saisho H. Distribution of hepatitis B viral genotypes and mutations in the core promoter and precore regions in acute forms of liver disease in patients from Chiba, Japan Gut. 2003 Nov;52(11):1630-7.
- 31- Bozkaya H. Hepatit B virus mutasyonlarının klinik ve tedavi açısından önemleri Çakaloğlu Y, Ökten A (eds). Hepatit B ulusal uzlaşma toplantı metinleri 1 Baskı İstanbul: İstanbul Medikal Yayıncılık, 2003: 29-41.
- 32- - Çınar K. Hepatit B virusunun immunopatogenezi Çakaloğlu Y, Ökten A (eds). Hepatit B ulusal uzlaşma toplantı metinleri 1.Baskı. İstanbul: Medikal Yayıncılık, 2003:57-64.
- 33- Kılıçturgay K. Viral hepatitte İmmunopatogenezi Tekeli M, Balık İ (eds). Viral Hepatit 2003. 1.Baskı. İstanbul: Viral Hepatitle Savaşım Derneği Yayını, 2003:315-328.
- 34- Baumert TF, Marrone A, Vergalla J, Liang TJ. Naturally occurring mutations define a novel function of the hepatitis B virus core promoter in core protein expression. J Virol. 1998 Aug;72(8):6785-95.
- 35- Taşyaran MA. HBV infeksiyonu epidemiyolojisi. Tekeli M, Balık İ (eds). Viral Hepatit 2003 1.Baskı. İstanbul: Viral Hepatitle Savaşım Derneği Yayını, 2003:121-128.
- 36- Ellidokuz H. Viral hepatit epidemiyolojisi Dilek ON (eds) Karaciğer. 1.Baskı. Ankara: Uyum ajans, 2003:453-466.

- 37- Kawai H, Feinstone SM. Acute Viral Hepatitis. Mandell GL, Douglas RG, Bennett JE (eds) Principles and Practice of Infectious Disease. 5th ed. New York, Churchill Livingstone, 2000:1279-1297.
- 38- Demirtürk N. Viral hepatitlerde klinik Dilek ON (eds). Karaciğer. 1.Baskı. Ankara: Uyum ajans, 2003:467-487.
- 39- Kurt H. Hepatit B virus infeksiyonu. Tekeli M, Balık İ (eds). Viral Hepatit 2003. 1. Baskı. İstanbul: Viral Hepatitle Savaşım Derneği Yayını, 2003:129-134.
- 40- Yalçın K, Değertekin H. Akut viral hepatitler. Özden A, Şahin B, Yılmaz U, Soykan İ (eds). Gastroenteroloji. 2. Baskı. Ankara: TGV, 2003:467-477.
- 41- Akpınar H. Akut viral hepatit. İliçin G, Biberöglü K, Süleymanlar G, Ünal S (eds). İç Hastalıkları. 2. Baskı. Ankara: Güneş Kitabevi Ltd Şti, 2003:1704-1711
- 42- Sünbül M. Kronik hepatit B'nin tedavisinde son gelişmeler. Ege İnfeksiyon Günleri 2003;50-60.
- 43- Balık İ. Kronik hepatit B'nin seyri ve interferon tedavisi. Tekeli M, Balık İ (eds) Viral Hepatit 2003. 1.Baskı. İstanbul: Viral Hepatitle Savaşım Derneği Yayını, 2003:135-155
- 44- Akarca US. Kronik hepatitler İliçin G, Biberöglü K, Süleymanlar G, Ünal S (eds). İç Hastalıkları. 2. Baskı. Ankara: Güneş Kitabevi Ltd Şti, 2003:1721-1731.
- 45- Akarca US. Hepatit B virusu infeksiyonu doğal seyri. Çakaloğlu Y, Ökten A (eds). Hepatit B ulusal uzlaşma toplantı metinleri. 1.Baskı İstanbul: Medikal Yayıncılık, 2003: 65-75.
- 46- Raimondo G, Pollicino I, Squadrito. Clinical virology of hepatitis B virus infection. J Hepatol 2003; 39:S26-S30.(EASL)
- 47- Lin KW and Kirchner JT. Hepatitis B. American Family Physician 2004;69:75-82.
- 48- Lok ASF and McMahon BJ. AASLD practice guidelines Chronic Hepatitis B. Hepatology 2001;34:1225-1241
- 49- Tankurt E. Karaciğer sirozu ve komplikasyonları. İliçin G, Biberöglü K, Süleymanlar G, Ünal S (eds). İç Hastalıkları. 2. Baskı. Ankara: Güneş Kitabevi Ltd Şti, 2003:1745-1755.
- 50- Altındış M. Viral hepatit etkenlerinin serolojik ve moleküler tanısı. Dilek ON (eds). Karaciğer. 1.Baskı. Ankara: Uyum ajans, 2003:489-509.

- 51- Sayiner A. Tanı ve tedavide kullanılan testler ve standardizasyon (HBV DNA) Çakaloğlu Y, Ökten A (eds). Hepatit B ulusal uzlaşma toplantı metinleri 1.Baskı. İstanbul: Medikal Yayıncılık, 2003:43-55.
- 52- Badur S. Viral hepatitlerin tanısında moleküler biyoloji teknikleri. Tekeli M, Balık İ (eds). Viral Hepatit 2003. 1.Baskı. İstanbul: Viral Hepatitle Savaşım Derneği Yayını, 2003:460-475.
- 53- Etiz N, Türkoğlu S. Viral hepatitlerin tanısında kullanılan testler ve standardizasyon. Tabak F, Balık İ, Tekeli E (eds). Viral Hepatit 2005. 1.Baskı, İstanbul: Viral Hepatitle Savaşım Derneği Yayını, 2005:127-150.
- 54- Yüce G. Kronik hepatitlerde histopatoloji ve tanı-tedavi ilişkisi Ege İnfeksiyon Günleri 2003;41-49.
- 55- Tulunay Ö. Kronik viral hepatit patolojisi Tekeli M, Balık İ (eds). Viral Hepatit 2003 1.Baskı İstanbul: Viral Hepatitle Savaşım Derneği Yayını, 2003:330-345.
- 56- Çevikbaş U, Güllüoğlu MG. Kronik B hepatitinin morfolojik özellikleri. Çakaloğlu Y, Ökten A (eds). Hepatit B ulusal uzlaşma toplantı metinleri. 1.Baskı İstanbul: Medikal Yayıncılık, 2003:91-97.
- 57- Manesis E, Papatheodoridis GV, Sevastianos V, Cholongitas E, Papaioannou C, Hadziyannis SJ. Significance of hepatitis B viremia levels determined by a quantitative polymerase chain reaction assay in patients with hepatitis B eantijen negative chronic hepatitis B virus infection. The American Journal of Gastroenterology 2003; 98:2261-2267.
- 58- Martinot-Peignoux M, Boyer N, Colombat M, Akremi R, Pham B-N, Ollivier S, Castelnau C, Valla D, Degott C, Marcellin P. Serum hepatitis B virus DNA levels and liver histology in inactive HBsAg carriers. Journal of Hepatology 2002;36:543-546.
- 59- Papatheodoridis GV, Hadziyannis SJ. Diagnosis and management of pre-core mutant chronic hepatitis B. J Viral Hepat. 2001 Sep;8(5):311-21
- 60- Hadziyannis SJ and Vassilopoulos D. Hepatitis B eantigen-negative chronic hepatitis B Hepatology 2001;34(4):617-624
- 61- Lok A, Heatcote J, Hoofnagie J. Management of hepatitis B 2000: summary of a workshop. Gastroenterology 2001; 1828-1853

- 62- Chu CJ, Hussain M and Lok ASF. Quantitative serum HBV DNA levels during different stages of chronic hepatitis B infection. *Hepatology* 2002;36:1408-1415.
- 63- Jeong Heo, TaeHyun Baik, Hyung Hoi Kim, Gwang Ha Kim, Dae Hwan Kang, Geun Am Song, Mong Cho, Ung Suk Yang. Serum Hepatitis B virus (HBV) DNA levels at different stages of clinical course in patients with chronic HBV infection in an endemic area. *J Korean Med Sci* 2003; 18:686-90
- 64- Kessler HH, Preiminger S, Stelzl E, Daghofer E, Santner BI, Marth E, Lackner H and Stauber RE. Identification of different states of hepatitis B virus infection with a quantitative PCR assay. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2000;7:298-300.
- 65- Viral Hepatit Savaşım Derneği Viral Hepatit Tanı ve Tedavi Konsensus toplantısı Ön Raporu. Viral Hepatit Savaşım Derneği Viral Hepatit Tanı ve Tedavi Konsensus (Rehber) alışma Grubu 2004, Antalya.
- 66- PENG Jie, LUO Kangxian, ZHU Youfu, GUO Yabing, ZHANG Lian and HOU Jinlin. Clinical and histological characteristics of chronic hepatitis B with negative hepatitis B e-antigen. *Chin Med J* 2003;116(9):1312-1317.
- 67- Lindh M, Horal P, Dhillon AP, Norkrans G. Hepatitis B virus DNA levels, precore mutations, genotypes and histological activity in chronic hepatitis B. *J Viral Hepat*. 2000 Jul;7(4):258-67.
- 68- Borg F, Kate FJW, Cuypers HTM, Leentvaar Kuijpers A, Oosting J et al. Relation between laboratory test results and histological hepatitis activity in individuals positive for hepatitis B surface antigen and antibodies to hepatitis B e antigen. *Lancet* 1998;351:1914-1918.
- 69- Borg F, Kate FJW, Cuypers HTM, Leentvaar Kuijpers A, Oosting J et al. A survey of liver pathology in needle biopsies from HBsAg and anti-HBe positive individuals. *Clin Pathol* 2000;53:541-548.
- 70- Turhan V, oşkun , Can M, Eyigün CP, Beşirbellioğlu B, zgüven V. Tesadüfen HBsAg pozitifliği saptanan olgularda serum ALT ve Karaciğer histolojisinin değerlendirilmesi. *T Klin Gastroenterohepatol* 2000; 11:164-166
- 71- Görenek L, Beşirbellioğlu AB, Gül C, Hacıbektasoğlu A. Asemptomatik HBsAg taşıyıcılarında Karaciğer histopatolojisinin değerlendirilmesi *Türkiye Tıp Dergisi* 1998; 2:11-16.