

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ
ANABİLİM DALI
Prof. Dr. Alper TÜNGER

EGE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ ve
MERSİN ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
KAN MERKEZLERİNE BAŞVURAN KAN VERİCİLERİNDE
HBsAg NEGATİFLİĞİNDE HBV-DNA’NIN ARAŞTIRILMASI

UZMANLIK TEZİ

Dr. Arzu BAYRAM

TEZ DANIŞMANI

Doç. Dr. Rüçhan YAZAN SERTÖZ

İZMİR 2011

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince yetişmemde emeği geçen Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'ndaki tüm öğretim üyelerine, tez çalışmamda bilgisi ve desteğiyle yanımda olan danışmanım Doç. Dr. Rüçhan YAZAN SERTÖZ'e tezimin kan örneklerini sağlayan Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Kan Merkezi ve Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Sağlık Araştırma Uygulama Hastanesi Kan Merkezi çalışanlarına, teknik yardımlarından dolayı tüm teknisyen arkadaşlarıma, her zaman desteklerini aldığım asistan arkadaşlarıma ve eğitimin sırasında hiçbir gün desteğini benden esirgemeyen sevgili eşim Dr. S. Nuri BAYRAM'a, sevgisiyle beni mutlu eden canım kızım Deniz Elif BAYRAM'a ve tüm aileme içten dileklerimle teşekkür ederim.

Dr. Arzu BAYRAM

İÇİNDEKİLER

KISALTMALAR	V
TABLO DİZİNİ	VI
ŞEKİL DİZİNİ	VI
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Tarihçe	4
2.2. Sınıflandırma	5
2.3. Genel özellikleri.....	5
2.3.1. Genom yapısı	6
2.3.2. Replikasyon	8
2.3.3. Genotip ve subtip	9
2.3.4. Viral proteinler	11
2.3.4.1. Yüzey (kılıf) proteinleri.....	11
2.3.4.2. Kor proteinleri	12
2.3.4.3. P proteini	13
2.3.4.4. X proteini.....	13
2.3.5. Hepatit B virüs mutasyonları.....	14
2.3.5.1. Yüzey (kılıf) mutasyonları	15
2.3.5.2. Prekor/kor mutasyonları	16
2.3.5.3. P geni mutasyonları	16
2.3.5.4. X geni mutasyonları	17
2.4. Epidemiyoloji	17
2.4.1. Bulaşma yolları	18
2.4.2. Dünyada HBV enfeksiyonu prevalansı.....	19
2.4.3. Türkiye’de HBV enfeksiyonu prevalansı	20
2.5. HBV enfeksiyonunun doğal seyri	20
2.6. Mikrobiyolojik tanı	21
2.6.1. Serolojik tanı	21
2.6.2. Moleküler tanı	24
2.6.3. Hücre kültürü ve hayvan modelleri	25

2.7.	Olağan dışı serolojik profiller	25
2.7.1.	Gizli HBV enfeksiyonu.....	25
2.7.2.	İzole anti-HBc pozitifliği	27
2.7.3.	HBsAg ve anti-HBs'nin birlikte pozitifliği	28
2.7.4.	Tek başına HBsAg pozitifliği.....	28
2.7.5.	Tek başına anti-HBs pozitifliği	29
2.8.	Tedavi	29
2.9.	Korunma	30
2.9.1.	Pasif immünizasyon	30
2.9.2.	Aktif immünizasyon	30
3.	GEREÇ VE YÖNTEM	31
3.1.	Gereç.....	31
3.1.1.	Çalışma grubu	31
3.1.2.	Plazma örneklerinin saklanması	31
3.1.3.	Ayırıcılar.....	32
3.1.4.	Kalite kontrol serum örnekleri	32
3.2.	Yöntem	32
3.2.1.	Plazma örneklerinden DNA ekstraksiyonu	32
3.2.2.	HBV-DNA'nın PCR ile çoğaltılması.....	32
4.	BULGULAR.....	34
4.1.	Çalışma grubunun genel özellikleri	34
4.2.	HBV-DNA kalite kontrol test sonuçları	35
4.3.	HBV-DNA test sonuçları.....	36
5.	TARTIŞMA.....	38
6.	SONUÇ	45
7.	ÖZET	46
8.	SUMMARY	48
9.	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	50
10.	KAYNAKLAR.....	54

KISALTMALAR

ALT	: Alanin Aminotransferaz
Anti-HBc	: Hepatit B Virüsü Kor Antijenine Karşı Gelişen Antikor
Anti-HCV	: Hepatit C Virüsüne Karşı Gelişen Antikor
cccDNA	: “Covalently Closed Circular DNA”; Kovalent Olarak Kapalı Sirküler DNA
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
DR	: “Direct Repeats”; Tekrarlayan Bölgeler
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
EIA	: Enzimimmunoassay
EN	: Enhancer
EÜTF	: Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi
HBcAg	: Hepatit B Virüsü Kor Antijeni
HBeAg	: Hepatit B Virüsü Zarf Antijeni
HBİG	: Hepatit B İmmünglobulin
HBsAg	: Hepatit B Yüzey Antijeni
HBV	: Hepatit B Virüsü
HCC	: Hepatoselüler Kanser
HCV	: Hepatit C Virüsü
HIV	: İnsan İmmünyetmezlik Virüsü
IC	: “Internal Control”; İnternal Kontrol
ID-NAT	: Tek Tek Örneklerde Uygulanan Nükleik Asit Testi
MP-NAT	: Küçük Havuzlarda Nükleik Asit Testi
MÜTF	: Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi
NAT	: Nükleik Asit Testi
ORF	: “Open Reading Frame”; Açık Okuma Çerçevesi
PCR	: “Polymerase Chain Reaction”; Polimeraz Zincir Reaksiyonu
pgRNA	: Pregenomik RNA
PKMH	: Periferik Kandaki Mononükleer Hücre
preC	: Prekor
QCMD	: “Quality Control for Molecular Diagnostics”
RNA	: Ribonükleik Asit
RPR	: “Rapid Plasma Reagen”
RT	: Revers Transkriptaz
TP	: Treponema Pallidum
VDRL	: Venerian Disease Research Laboratory

TABLO DİZİNİ

Tablo 1: Kantitasyon standartları değerleri	33
Tablo 2: Kan vericilerinin genel özellikleri	34
Tablo 3: QCMD örnekleri test sonuçları	35
Tablo 4: Şüpheli pozitif bulunan üç örneğin ct değerleri ve viral yükleri	36

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 1: HBV genomik organizasyonu ve sentezlenen RNA'lar	8
Şekil 2: Akut HBV enfeksiyonunda serolojik göstergeler	23
Şekil 3: Kronik HBV enfeksiyonunda serolojik göstergeler	24

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Kan, organların perfüzyonunu sağlayan eritrosit, lökosit, trombosit gibi hücrelerden ve plazmadan oluşan intravasküler alanda tüm vücudu dolaşan sıvıdır. Yaşamsal önemi olan kan ve kan ürünlerinin tıbbi amaçlar ile insanlara verilmesi son yüzyılda mortaliteyi azaltıcı etki yapmıştır. Ancak, kanın tek kaynağı insan olduğu için bu kaynağın güvenli elde edilmesi ve kan alıcılarına uygulanması gerekmektedir. Kan ve kan ürünleri transfüzyonu ile ilişkili çalışmalar birçok evreden geçerek günümüze kadar gelmiştir. Temel amaç her zaman güvenli kan olmuş, hatta Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) “güvenli kan benimle başlar” sloganı ile 2000 yılının konusunu güvenli kan olarak belirlemiştir. Güvenli kan “verildiği kişide herhangi bir tehlike ya da hastalık oluşturmeyen, infeksiyon etkenleri ya da zararlı yabancı maddeleri içermeyen kan” olarak tanımlanır. Kan Bankacılığı’nın en önemli hedefi alıcıya güvenli kan sağlamaktır (1, 2).

Kan yoluyla bulaşan infeksiyon etkenlerinin geçişi sağlıklı görünen kan vericilerinden yapılan infekte transfüzyonlar sonucunda olmaktadır. Kan ve kan ürünlerinde güvenlik, sağlıklı kan verici tespiti ile başlar. Güvenilir kana ulaşmada en önemli ve temel nokta, kan vericilerin dikkatli seçimidir. Bu amaçla, kan merkezlerine başvuran kişiye geniş kapsamlı bir “donör sorgulama formu” uygulanmaktadır (3). Ülkemizde de Sağlık Bakanlığı’nın 03.01.1997 tarihli ve 141 sayılı genelgesiyle kan vericiler için geniş kapsamlı bir donör sorgulama formu uygulaması başlatılmıştır (4). Formun kan verici tarafından doğru olarak doldurulması ve hekim tarafından muayene ve kontrol edilmesiyle daha az risk taşıyan kan verici seçimi mümkündür.

Uygun kan verici seçiminden sonra kan yoluyla bulaşan infeksiyon etkenlerini aramaya yönelik testler uygulanır. İnfeksiyon etkenleri ve uygulanan yöntemler ülkeden ülkeye farklılıklar gösterir. Tüm taramalara rağmen transfüzyonla geçen infeksiyon hastalıkları kan güvenliğinde önemli bir konu olarak kalmaya devam etmektedir (5).

Kan güvenliği için uygulanan ilk test 1945 yılında sifiliz testi olmuştur. İkinci Dünya Savaşı esnasında transfüzyon sonrası tanımlanan hepatit vakaları epidemiyolojik ve laboratuvar çalışmalarının başlangıcı olmuştur. Hepatit B virüsünün (HBV) kan yoluyla geçişini engellemek için 1970’lerin başında hepatit B yüzey antijen (HBsAg) testi uygulanmaya başlanmış, 1980’lerin ortasında ise insan immünyetmezlik virüsünün (HIV)

ortaya çıkmasıyla kan güvenliği çalışmaları hızlanmış ve birçok ülkedeki transfüzyon çalışmalarının gelişmesine katkıda bulunmuştur (6).

Kan yoluyla bulaşan infeksiyon etkenleri arasında görülme sıklığı ve neden olduğu hastalıklar HBV'yi önemli kılmaktadır. HBV, akut infeksiyonun yanında kronik infeksiyona neden olmakta, bunu takiben yıllar sonra da karaciğer sirozu ve hepatoselüler kanser (HCC) gelişebilmektedir (7).

Kan vericilerinde HBsAg seroprevalansı %0,1 ile %25 arasında değişkenlik göstermektedir. Ülkelerin sağlık politikası, alınan önlemler, eğitim, ekonomik koşullar gibi pek çok faktör HBsAg görülme sıklığında farklılıklara neden olur. HBV ile karşılaşma oranı Batı Afrika'da en yüksek, Batı Avrupa ve Kuzey Amerika'da en düşük düzeydedir. Bu oranlar; Batı Afrika'da >%80, Uzak Doğu'da %60 ve İngiltere'de <%0,5 dolaylarındadır (5). Türkiye'deki HBsAg prevalansı, bölgeden bölgeye değişmekle birlikte %1,7–21 olarak belirlenmiştir (8).

Tarama testlerine rağmen kan güvenliğinin geliştirilmesi önemli bir tartışma konusudur (9). HBsAg tarama testleri duyarlılıkları yıllar içinde geliştirilmiş olmakla birlikte HBV infeksiyonunu saptamakta her zaman yeterli olamamaktadır (10).

Kanın güvenliğini arttırmak için bazı ülkelerde HBV kor antijenine karşı gelişen antikorunun (anti-HBc) HBsAg ile birlikte bakılması önerilmektedir. Anti-HBc testinin bakılması HBV bulaşma riskini azaltmakla birlikte, anti-HBc prevalansının >%2–5 olduğu orta ve yüksek endemik bölgelerde testlerin yalancı pozitiflik oranları arttığı için kan teminini gereksiz yere zorlaştırmaktadır. Bu bölgelerde kan güvenliğindeki riskin azaltılmasında için HBV deoksiribonükleik asit (DNA) tarama testleri önerilmektedir (11, 12).

Serolojik testlerin duyarlılığının artırılmasına rağmen “güvenli kan” için 2006 yılından sonra transfüze edilen kan örneğinde HBV nükleik asit testi (NAT) uygulamaları gündeme gelmiştir (5, 13, 14).

HBsAg saptanamayan ve kronik HBV infeksiyonu tanımlanamayan, ancak düşük düzeyde de olsa HBV-DNA testinin pozitif olduğu tabloya gizli HBV infeksiyonu (okült HBV infeksiyonu) denilmektedir. HBV-NAT uygulaması, pencere dönemi dışında HBsAg negatif gizli HBV infeksiyonunun tanısını sağlamaktadır (10). HBV'li popülasyon tarandığında yaklaşık %85'inde HBsAg ve HBV-DNA birlikte pozitif, %5'inde HBsAg pozitif ve HBV-DNA negatif, %5-9'unda ise gizli HBV infeksiyonu ile uyumlu olarak HBV-

DNA pozitif ve HBsAg negatif saptanmaktadır (15). Gizli HBV enfeksiyonunda viral yük ortalaması 25 i/mL oranında iken diğ r tüm vakalarda <1000 i/mL'dir (5).

Günümüzde en önemli sorunlardan biri gizli HBV enfeksiyonu olan kişilerin kan merkezlerinde kan vericisi kapsamına alınmasıdır (16-18). Gizli HBV enfeksiyonunu göstermek için   yöntem mevcuttur. Bu yöntemler; serum veya plazmada anti-HBc bakılması, küçük havuzlarda NAT (MP-NAT) ve her rneğ  bir kez uygulanan (tek tek, ID-NAT) NAT'tır. Türkiye HBV enfeksiyonu açısından orta endemisite bölgesinde olduğu için anti-HBc araştırılması yalancı pozitiflik oranları nedeniyle kan teminini zorlaştırmaktadır. Yapılan çalışmalarda, küçük havuz MP-NAT testinin, kan vericilerinde gizli HBV enfeksiyonunu saptamada duyarlılığının düşük olduğu bildirilmiştir. Her rneğ  bir kez uygulanan NAT'lar ise birçok araştırmada kan merkezlerine güvenli kan sağlanması açısından denenmektedir. Kan merkezlerinde güvenli kan ve kan ürünlerine sahip olabilmek için gizli HBV enfeksiyonu olan kan vericilerinin en iyi yöntemle saptanması son derece önemlidir.

Bu  alışmada, MP-NAT'a göre duyarlılığı daha yüksek olan tek tek NAT (ID-NAT) ile HBsAg negatif kan vericilerinde olası gizli HBV enfeksiyonunun araştırılması planlanmıştır. Bu bağlamda, ülkemizde uygulanmakta olan kan vericisi tarama testlerinin yeterli olup olmadığı, ülkemiz koşullarını da dikkate alarak yeni bir düzenleme getirilip getirilemeyeceği konusunu gündeme getirebilmek ve olası yeni bir algoritma oluşturulmasına katkıda bulunabilmek amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. TARİHÇE

Bulaşıcı sarılığın varlığına ilişkin bilgiler tarihin çok eski dönemlerine; antik çağlara uzanmakta olup ilk olarak M.Ö. 5. yüzyılda tanımlanmıştır. 1883 yılında Almanya Bremen’de çiçek virüsü aşısı yapılan gemi çalışanlarında, kan kaynaklı hepatit salgını, bildirilen ilk salgın olmuştur. Yirminci yüzyılın başlarında hastalık etkeninin virüs olabileceği düşünülmüş; ancak epidemiyolojik araştırmalar farklı kuluçka süresi, bulaşma yolu ve immünolojik özellikleri olan birden fazla etkenin olma olasılığını göstermiştir. MacCallum ve Bauer 1947 yılında, DSÖ ise 1973 yılında enfeksiyöz hepatit için hepatit A ve serum hepatiti için hepatit B teriminin kullanılması önermişlerdir. Blumberg ve arkadaşları, 1965 yılında bir serum proteini olarak Avustralya Antijeni’ni tanımlamışlardır. Avustralya antijeninin; akut/kronik hepatit B enfeksiyonu ile ilişkili HBsAg olduğu belirlenmiştir. Tüm viryonun 1970 yılında elektron mikroskopik görüntüleri elde edilerek “Dane partikülü” ismi verilmiştir. Krugman, 1971 yılında ısı ile inaktive edilen HBsAg pozitif serumların immünojenik olduğunu ve aşı olarak kullanılabileceğini göstermiştir. Magnusius ve Espmark, 1972 yılında HBV zarf antijenini (HBeAg), Kaplan ve arkadaşları 1973 yılında virüsün kor bölgesinde DNA’ya bağımlı DNA polimeraz varlığını göstermişlerdir. Aynı yıllarda immün elektron mikroskobu ile virüsün çeşitli antijenlerinin hepatositlerdeki yerleşim özellikleri belirlenmiş; HBsAg’nin hepatosit sitoplazmasında, HBV çekirdek antijeninin (HBcAg) ise nükleusta depolandığı tespit edilmiştir (7, 19-24).

Kan vericilerinde enfeksiyöz etkenlerin incelenmesi açısından tarihi sıralamaya bakılacak olursa ülkemizde 2857 sayılı Kan Ürünleri Kanunu ile ilişkili yayınlanan yönetmelik, yönerge, genelge ve tebliğler ile;

- Şubat 1987’de kan merkezlerinin HIV taranmasına yönelik enzimimmunoassay (EIA) testi yapacak şekilde donatılması,
- Nisan 1992’de Venerian Disease Research Laboratory (VDRL), HBsAg, HIV ve sıtma taramalarının zorunlu hale getirilmesi,
- Şubat 1996’da hepatit C virüsüne karşı gelişen antikor (anti-HCV) taranması,

- Ağustos 1996'da sadece acil transfüzyonlar için kan merkezlerinde hızlı tarama testlerinin bulundurulmasının zorunlu hale getirilmesi,
- Ekim 1997'de ise risk taşımayan kan vericilerinde rutin sıtma paraziti taranmasının uygulamadan kaldırılması yasalaştırılmıştır.

Sonuç olarak, günümüzde yasal olarak ülkemizde infeksiyon etkenlerine karşı zorunlu tarama testleri EIA yöntemi ile HBsAg, anti-HCV, anti-HIV ve rapid plasma reagen (RPR)/VDRL ile sifilize yönelik taramalardır. Kanuni zorunluk açısından bakılacak olursa HBV bakımından kan vericilerinde sadece HBsAg bakılmaktadır (25).

2.2. SINIFLANDIRMA

HBV kısmen çift sarmallı DNA'sı olan, zarflı virüs olup *Hepadnaviridae* ailesinin prototip üyesidir. *Orthohepadnavirus* genusu içinde yer alır (26). HBV, DNA revers transkriptaz virüslerin bulunduğu Grup VII'nin üyesidir (20). Hepatotropik bir virüstür. İnsanlarda ve doğada bazı şempanze, gibbon ve orangutan gibi hayvanlarda da infeksiyon yaptığı saptanmıştır (27, 28).

Hepadnaviridae ailesi içinde memeli hepatit virüslerinden *orthohepadnavirus* ve kanatlı hepatit virüslerinden *avihepadnavirus* cinsleri bulunmaktadır. *Orthohepadnavirus* içinde HBV, ağaçkakan (woodchuck) hepatit B virüsü (WHBV) ve yer sincabı (ground squirrel) hepatit B virüsü (GSHBV) yer alır. Bu virüsler arasında nükleotit düzeyinde %70 homoloji bulunduğu gösterilmiştir. Ağaçkakan hepatit B virüsü infeksiyonları kronik karaciğer hastalığı ve HCC için model olarak çalışılmaktayken, *avihepadnavirus* cinsinin en iyi bilinen üyesi ördek hepatit B virüsü (DHBV), özellikle replikasyonun incelenmesi amacıyla kullanılmıştır (29-32).

2.3. GENEL ÖZELLİKLERİ

Küçük, zarflı bir DNA virüsü olan HBV diğer DNA virüslerinden farklı bazı özellikler gösterir (7). Viral genomu yaklaşık 3200 nükleotitten oluşan kısmen çift (~%70), kısmen tek iplikli (~%30) çembersel DNA'dan meydana gelir. İkozahedral bir kapsit içerisinde bulunur; kapsitin dışında da üç farklı yüzey antijenini taşıyan lipid yapıları zarfı yer alır. HBV, DNA virüsü olmasına karşın revers transkriptaz (RT) enzimi kodlar ve ribonükleik asit (RNA) aracısı üzerinden replike olur. Zarflı bir virüs olmasına rağmen eter, düşük pH, ısı, donma ve

çözmeye oldukça dirençlidir. Bu özellikler virüsün kişiden kişiye geçişteki etkinliğine katkıda bulunur ve dezenfektan direncini sağlar (7, 33). İnfektif plazmadan elde edilen fibrinojen, protrombin, gama globulin ve plazma proteinlerinde çeşitli miktarlarda HBsAg bulunur ve HBsAg içeren kan ve kan ürünlerinin ultraviyole ışınlarına tabi tutulması infektiviteyi etkilemez (31, 34, 35).

HBV içeren serumdan hazırlanan preparatlar elektron mikroskopunda incelendiğinde; büyüklük, yapı ve miktar gibi özellikler açısından üç tip farklı partikül saptanmıştır (20, 29);

a) Dane partikülü, 42 nm çapında, tam viryon yapısında ve bulan kişinin adıyla anılan infeksiyöz partiküllerdir. Nükleokapsit 28 nm çapındadır ve DNA, HBcAg, HBeAg ve DNA bağımlı polimerazdan meydana gelir. Nükleokapsiti çevreleyen yaklaşık 7 nm kalınlığındaki HBsAg ve lipitten oluşan zarf bulunmaktadır. Zarf büyük (L), orta (M) ve küçük (S) (LHBs, MHBs, SHBs) proteinlerden oluşur. L, M, S proteinleri zarfta sırasıyla 1:1:4 oranında bulunur.

b) Küresel partiküller, yaklaşık 22 nm çapında, içinde nükleik asit bulunmayan, infeksiyöz olmayan partiküllerdir. Kanda en fazla bulunan bu partiküllerde M ve S proteinleri 1:2 oranında bulunurken, L proteini eser miktarda bulunmaktadır.

c) Tübüler partiküller, 22 nm çapında, 50-500 nm uzunluğunda eşit miktarda M ve L proteini içeren infeksiyöz olmayan partiküllerdir.

Virüs replikasyonu sırasında fazla miktarda üretilen ve oldukça immünojenik olan bu partiküller sadece yüzey antijeni taşırlar ve bu partiküllere karşı nötralizan antikorlar sentezlenir. HBV yaşam döngüsündeki rolleri ise bilinmemektedir (20, 30, 36, 37).

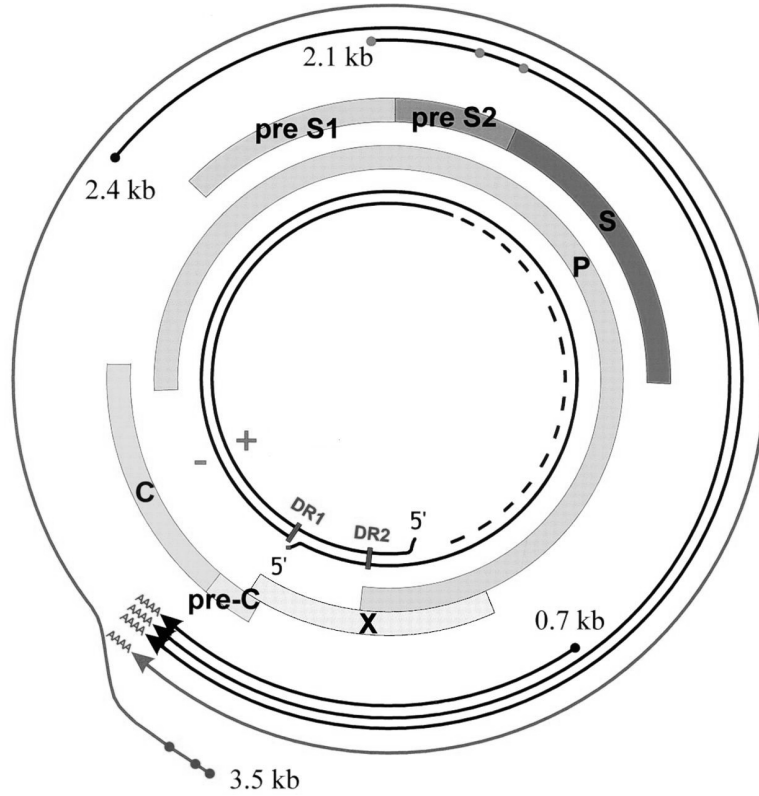
2.3.1. Genom yapısı

HBV, kısmen çift sarmallı, çembersel bir DNA virüsüdür. Molekül ağırlığı $2,3 \times 10^6$ dalton, Guanin + Sitozin (G+C) oranı ise yaklaşık %49'dur (7, 29). Genom uzunluğu genotiplere bağlı olarak 3181 ile 3221 baz arasında değişir (38).

HBV-DNA, yaklaşık 3200 nükleotit taşıyan, negatif polariteli, uzun (L), ve 1800-2700 nükleotit taşıyan uzunluğu değişken pozitif polariteli, kısa (S), zincir olmak üzere iki sarmaldan meydana gelmiştir. Bu zincirler çembersel bir yapıda olmasına rağmen her birinin 3' ve 5' uçları birleşik olmadığından aslında lineer moleküler yapı gösterir. Uzun zincirin 5'

ucu 1826., kısa zincirin 5' ucu ise 1601. nükleotitte bulunur. Her iki zincir üzerinde DR (direct repeats) denen iki adet (DR1 ve DR2) 11 nükleotitlik dizi bulunur. Uzun zincirin 5' ucu DR1, kısa zincirin 5' ucu DR2 içinde bulunur. DR'lerdeki hidrojen bağları zincirleri bir arada tutar ve çembersel yapının korunmasını sağlar (20, 36). Uzun zincir 5' ucundan fosfotirozin bağı ile viral DNA polimeraza kovalent olarak bağlı iken, kısa zincirin 5' ucunda viral DNA sentezi için kalıp görevi gören kısa RNA oligomeri yer alır. Uzun zincirin 3' ucu sekiz-dokuz nükleotitlik artık uç ile sonlanır. Kısa zincirin 3' ucundaki eksik bölge ise replikasyon sırasında viral DNA polimeraz ile sentezlenerek doldurulur (30).

HBV'de genetik bilgi negatif zincir üzerinde taşınır ve bu bölge, dört farklı protein kodlayan bölgeyi[açık okuma çerçevesi: open reading frame (ORF)] içermektedir. Bunlar P, C, S ve X genleridir. ORF'lerin transkripsiyonu promoter (prom=başlatıcı) ve enhancer (enh, güçlendirici) denilen düzenleyici dizinler tarafından kontrol edilmektedir. HBV genomunda tanımlanmış dört promoter (preC/C prom, X prom, preS1 prom ve preS2/S prom) ve transkripsiyonu arttıran iki enhancer (EN1 ve EN2) bölgesi bulunmaktadır. Bu genler arka arkaya dizilmiş ve binişik durumdadırlar. P geni, en büyüğü olup, X ve C genleri ile kısmen S geniyle ise tamamen binişiktir. P geni, viral polimerazı kodlar. C geninde pre-C ve C olmak üzere iki farklı başlangıç kodonu bulunmakta olup kapsit proteinlerini kodlar. S geni, üç yüzey antijenini kodlarken pre-S1, pre-S2 ve S olmak üzere başlangıç kodonlarından oluşur. X geni ise X proteinini kodlar. Böylece HBV'de dört adet ORF olmasına rağmen yedi değişik protein sentezlenir (20, 36, 39, 40). HBV'nin genomik yapısı Şekil 1'de gösterilmiştir.



Şekil 1. HBV genomik organizasyonu ve sentezlenen RNA'lar (7 numaralı kaynaktan alınmıştır).

2.3.2. Replikasyon

HBV'nin replikasyonu kendine özgüdür. En önemli özelliği karaciğere belirgin bir tropizmi olmasıdır (33).

HBV'nin hücreye tutunma ve giriş için kullandığı yüzey molekülleri henüz kesin olarak tanımlanamamıştır. Yapılan araştırmalar hücreye tutunmada en etkin görevi üstlenen bölgenin pre-S1 bölgesindeki 21–47. aminoasitler olduğunu göstermiştir. Bu bölge, virüsün HepG2 hücrelerine tutunması için gerekli ve yeterlidir. Tutunma sonrasında virüs zarfı ve hücre membranı arasında füzyon meydana gelir ve nükleokapsit sitoplazmaya salınır. Kapsitin parçalanması ile viral genomik DNA ve polimeraz çekirdeğe taşınır (7).

Kısmen çift sarmallı, sirküler DNA genomu, kovalent olarak kapalı sirküler DNA (covalently closed circular DNA; cccDNA) kalıbına dönüşür. Bu cccDNA formu; pregenomik RNA (pgRNA) ve mRNA için kalıp görevi görür. Nükleustaki cccDNA'dan transkripte edilen pgRNA infekte hücrenin sitoplazmasına yerleşir. Sitoplazmada pgRNA, HBcAg ve revers transkriptaz enzimi (polimeraz) için kalıp görevi görür. Polimeraz daha sonra pgRNA'yi yeni

sirküler DNA molekülüne çevirir. Enfeksiyonun erken döneminde; yeni sentez edilen genomların bir kısmı cccDNA havuzunu oluşturmak üzere sitoplazmadan yeniden nükleusa geçerler (20).

HBV genomunun açık okuma bölgesindeki her nükleotit aynı zamanda bir kodlama bölgesinde yer alır. HBV genomunun yarısından fazlası, birden fazla açık okuma bölgesini de içine alacak biçimde bir açık okuma bölgesinden oluşur. HBV proteinlerinin sentezinde 4 viral mRNA transkripti rol alır. Bu viral mRNA'lar cccDNA kalıbındaki çeşitli promoter bölgelerden sentezlenir (20). Bunlar;

- 3.5 kb mRNA: En uzun parça olup genom replikasyonunda, prekor/kor ve polimeraz proteinlerinin sentezlenmesinde kullanılır.
- 2.4 kb mRNA : PreS1 , preS2 ve S proteinlerinin sentezlenmesinde rol oynar.
- 2.1 kb mRNA : PreS2 ve S proteinlerinin sentezini sağlar.
- 0.7 kb mRNA : X proteinini sentezletir.

Olgun viryonlar; RNA revers transkripsiyonu ile sirküler DNA molekülüne dönüşmek suretiyle oluşmaktadır. Uzun RNA transkripti ve polimeraz proteini, olgun kor partikülleri içine paketlenir ve revers transkriptaz enzimi yeni viral DNA genomunu sentez eder. Bu partiküller daha sonra endoplazmik retikulumda yüzey proteinleri içerisine paketlenir ve hücreden dışarı salınır. HBsAg gibi yüzey proteinleri; HBV genomu ve kor proteininden yoksun olarak küresel ve tübüler partiküller olarak infekte hücreden salınır (20).

HBV'nin replikasyonunun düzenlenmesinde; promoter (prekor/kor prom, X prom, preS1 prom ve preS2/S prom), enhancer (EN1 ve EN2), glukokortikoide duyarlı eleman, negatif düzenleyici eleman, PreS2 başlama kodonunda bulunan CCAAT motifi rol alır. Ayrıca viral RNA üzerinde bulunan replikasyon kontrolü poliadenilasyon sinyali, post-transkripsiyonel düzenleyici eleman, enkapsidasyon sinyali (ϵ) ile sağlanır (41).

2.3.3. Genotip ve subtip

HBV genotipleri; tüm genom dizisinde %8'i, S geninde ise %4'ü aşan farklılık taşıyan varyantlar olarak tanımlanır. Buna göre HBV genomu A'dan H'ye kadar adlandırılan sekiz genotipten oluşur (7).

S proteinini oluşturan aminoasit dizilerinin belli bölgelerdeki farklılıklarına göre *ayw1*, *ayw2*, *ayw3*, *ayw4*, *ayr*, *adw2*, *adw4*, *adrq-* ve *adrq+* olarak dokuz ayrı subtip tanımlanmıştır (36, 42).

HBsAg subtiplerinin yeryüzünde dağılımları farklıdır. Bu nedenle epidemiyolojik çalışmalarda, enfeksiyonun kaynağının izinin sürülmesi ve HBV'nin bireyler ve toplumlar arasındaki yayılımının izlenmesinde HBsAg subtiplerin saptanması önemli ipuçları verir. *ayw1* subtipi Vietnam'da, *ayw2* subtipi Akdeniz ülkelerinde gözlenirken, *ayw3* Avustralya'da izlenmektedir. *ayw4* subtipi Batı Afrika'da dikkati çekmektedir. *adw2* subtipi Kuzey Avrupa ve Orta Avrupa ile Doğu Asya'da, *adw4* subtipi ise Amerika, Arjantin'de baskındır. Ayrıca, *adrq-* türler sadece okyanus bölgesine ait olup Polinezya, *adrq+* türler ise Vietnam hariç Güneydoğu Asya'da görülür (7).

Ülkemizden 54 kronik hepatit B hastasının dahil edildiği bir çalışmada, 51 hastada genotip D1, 3 hastada genotip D2 saptanmıştır. HBsAg subtipleri değerlendirildiğinde ise, 50 hastada *ayw2*, 2 hastada *ayw3* ve 2 hastada *ayw* subtipleri bulunmuştur (43).

Bazı HBsAg alt tipleri birden fazla genotipte bulunmakla birlikte, alt tipler ve genotipler arasında bir ilişkiden söz edilmektedir. *adw2* alt tipi genelde genotip A, B ve G'de bulunmasına rağmen, genotip C ve D'de de görülmektedir. *adr* ve *ayr* olan bütün kökenler genotip C'de, *adw4q-* alt tipi ise sadece genotip F ve H'de bulunmaktadır. *ayw2* ve *ayw3* alt tipi genotip D ve C'de gözlenirken, *ayw4* alt tipi ise genotip D, E, F ve H'de izlenmektedir (44, 45).

HBV prevalansının düşük olduğu Kuzeybatı Avrupa ve Amerika Birleşik Devletleri'ndeki taşıyıcıların arasında genotip A baskındır. Amazon bölgesi ve Peru gibi yüksek HBV prevalansına sahip ülkelerde ise genotip F'nin sık olduğu saptanmıştır. HBV bulaşında vertikal geçişin ilk sırada olduğu Doğu Asya ülkelerinde genotip B ve C prevalansı yüksektir. Bu durum kısmen, vertikal geçişten sorumlu olan HBeAg pozitif (replikatif) dönemin daha uzun oluşu ile açıklanır. HBV'nin endemik olduğu bölgelerde, yüksek taşıyıcılık oranının devamında en önemli mekanizmanın vertikal geçiş olduğu kabul edilmektedir. Bunun aksine genotip A ve D'nin dominant olduğu Akdeniz ve Sahra altı Afrika ülkelerinde horizontal geçiş daha önemlidir (46, 47).

2.3.4. Viral proteinler

2.3.4.1. Yüzey (kılıf) proteinleri

PreS/S geni ürünleridir ve HBV'nin yüzey proteinlerini oluştururlar. S geni üzerinde başlangıç kodonları farklı ancak ortak 3' ucuna sahip üç ayrı gen bölgesi bulunmakta, bunlar tarafından üç değişik protein molekülü sentezlenmektedir. Okuma işlemi gen üzerindeki ilk kodondan başlarsa preS1+preS2+S gen bölgelerinin tümü okunacağından LHBs, ikinci kodondan başlarsa bu kez preS2+S bölgelerinin ürünü MHBs, üçüncü kodondan başlarsa sadece S bölgesi okunacağından SHBs sentezlenir. PreS1 gen bölgesi 2850-3174. nükleotitler arasında, preS2 gen bölgesi 3174-157. nükleotitler ve S gen bölgesi 157-833. nükleotitler arasında yer alır (7, 19).

LHBs; bu protein en fazla Dane partiküllerinde ve daha az tübüler partiküllerin yüzeyinde bulunurken, küresel partiküllerde az miktarda bulunur. LHBs'de bulunan preS1 bölgesinin 21-47. aminoasitleri arasındaki bölge hepatositlere tutunmayı sağlar ve bu bölgeye karşı oluşan antikorlar bağlanmayı engeller. Dane partiküllerinde daha fazla bulunması ve hepatositlere bağlanabilme özelliği nedeniyle bu partiküller diğer partiküllere göre avantajlıdır. Tutunma özelliği dışında viryonun toparlanmasını ve transportunu sağlar (30, 36, 48).

Hepatosit içinde preS1 birikimi, endoplazmik retikulumda dilatasyona neden olmakta, hücreler balonlaşmakta, buzlu cam görünümü almakta ve sonuçta koagülasyon nekrozu ile hücreler ölmektedir (36).

MHBs; tüm partiküllerde bulunmasına rağmen Dane partikülü ve tübüler partiküllerde LHBs ile eşit miktarda, 22 nm'lik küresel partiküllerde ise LHBs'den biraz daha fazla bulunmaktadır. Replikasyon olmadığı durumlarda HBsAg'nin yapısında bulunmaz. Bundan dolayı pre-S2 proteininin bulunması viral replikasyonun bir göstergesidir. Asemptomatik HBsAg taşıyıcılarında az miktarda bulunur. HBV'nin karaciğer hücrelerine tutunmasında pre-S2 glikan reseptörünün rolü olduğu düşünülmektedir (30, 36, 49).

SHBs; HBsAg'nin büyük kısmını oluşturan ve 226 aminoasitten meydana gelen bir peptittir. Zarfın major proteini olarak bilinmektedir. Bu proteinin 28-51. aminoasitler arasında yer alan bölgesi, T lenfositleri, major hidrofilik bölgede bulunan "a" determinantı ise B lenfositleri için epitop özelliğine sahiptir (30, 36).

HBsAg, değişik oranlarda S, L ve M yüzey proteinlerini içerir. HBV'nin partikül tipleri bu üç proteini içerir fakat oranları eşit değildir. Tüm partiküllerde baskın olan S proteindir (30, 36).

Tüm genotip ve HBsAg alt tiplerinde ortak olarak yer alan özgül "a" determinantı, 124-147. aminoasitler arasında yer alan hidrofilik bir bölgedir. "a" determinantı HBV için özellikle bağışıklıkta önemlidir çünkü buraya karşı oluşan antikorlar HBV'nin hepatositlere bağlanmasını engeller ve tüm alt tiplere karşı etkili bir bağışıklık sağlar. SHBs üzerindeki bu bölge, yapısında yer alan 7 adet sistein arasındaki disülfid köprülerince oluşturulan ve 124 ile 147. aminoasitler arasında yer alan iki ilmik (124-137 aminoasitler arası 1. ilmik, 139-147. aminoasitler arası 2. ilmik) sayesinde oldukça iyi korunmuştur. Viryonun dış yüzünde bulunan "a" determinantı, aşı veya doğal infeksiyon sonrası oluşan anti-HBs'lerin büyük kısmını bağlama özelliğine sahiptir. Nötralizan antikorlar için major determinant 139 ile 147. aminoasitler arasında bulunan ikinci ilmik üzerindedir. S proteinine karşı gelişen sıvısal bağışık yanıtın HBV'den korunmada etkili olması ve tüm HBsAg preparatlarında "a" determinantının bulunması, farklı veya benzer alt tiplerle oluşan reinfeksiyonlardan korunmada "a" determinantına karşı gelişen cevabın önemli olduğunu göstermektedir (36).

2.3.4.2. Kor proteinleri

HBV genomunda C geninde bir ORF bulunur. Gen üzerinde ise okuma işleminin başladığı iki farklı kodon (1816. ve 1903. nükleotit) yer alır. C geni; prekor ve kor olmak üzere iki bölgeye ayrılır. Okuma işlemi C başlangıç kodonundan başladığında HBcAg; preC başlangıç kodonundan başladığında ise HBeAg proteini sentezlenir. Bu iki bölgenin stop kodonu (2452. nükleotit) ortak olduğu için aynı noktada sonlanırlar (36).

HBcAg; 1903 ile 2452. nükleotitler arasında yer alan C bölgesinden genotipe bağlı olarak değişen uzunlukta bir polipeptid (p23c) olan HBcAg'nin öncülü sentezlenir (38). PreC bölgesi, 1816 ve 1903. nükleotitler arasında yer almaktadır. PreC bölgesi 29 aminoasitlik bir peptidin üretiminden sorumlu olup, sentez sırasında oluşan polipeptidin konak hücre endoplazmik retikulumuna yönlendirilmesini sağlar. HBcAg, 29 aminoasitlik ek dizisi olmadığı için endoplazmik retikuluma gidemez, konak hücre sitoplazmasında kalır ve karboksiterminal ucundaki 34 aminoasitlik peptit sayesinde viral DNA'ya sıkıca

bağlanır (32, 36). HBcAg, dolaşımda Dane partiküllerinin içinde bulunur. Karaciğerde hepatositlerin nükleusunda saptanırken, aktif infeksiyon sırasında sitoplazmasında görülmektedir. Akut ve kronik HBV infeksiyonu olan hastaların karaciğer dokularında saptanabilir (36, 50).

HBeAg; öncülü preC bölgesinden başlayan okuma işleminde 25kDa molekül ağırlığında bir polipeptid (p25c) olarak sentezlenir. Bu proteinde, HBcAg'den farklı olarak bulunan ek aminoasit dizisi, sentez sırasında uzamaya başlayan prekor polipeptidini (p25c) endoplazmik retikuluma yönlendirir, burada konak proteazları tarafından C terminal bölgesindeki 34 aminoasitlik bölüm kesilir ve işlenmiş protein haline gelerek ya Golgi cisimciği üzerinden HBeAg olarak sekrete edilir ya da nükleusa yönlendirilir (37, 40). HBeAg'nin HBc proteinini sekrete edilebilen formudur. HBeAg aktif HBV replikasyonunun iyi bir göstergesi olmakla birlikte *in vitro* araştırmalar sonucunda HbeAg'nin viral replikasyon için gerekli olmadığı belirlenmiştir. HBcAg sadece karaciğer dokusunda saptanabilmesine karşın, HBeAg kan dolaşımına verilir. HBeAg ayrıca plasentayı da geçebilir ve fetal immün sistemini HBV antijenlerine karşı özgül bir tolerans oluşturmak için uyardığı düşünülmektedir. Anti-HBs'nin tersine HBcAg'ye karşı oluşan antikorlar koruyucu değildir (38).

2.3.4.3. P proteini

P geni, HBV genomunun yaklaşık 3/4'ünü kaplayan en uzun gendir. Yaklaşık 832 aminoasitten oluşur ve 2309 ile 1623. nükleotitler arasında yer alır. Bu gen, viral DNA polimerazı kodlar ve 835–845. kodonlar arası bölge HIV'e ait RT ile homoloji göstermektedir (40, 51). P proteini; RT, endonükleaz (RNase H) ve hem DNA hem de RNA'ya bağımlı polimeraz aktivitesine sahiptir (36).

2.3.4.4. X proteini

HBV genomunda 17 kDa molekül ağırlığında, 154 aminoasit uzunluğunda 1376 ile 1838. nükleotitler arasında yer alan en küçük gen bölgesidir ve HBxAg'yi kodlar. Küçük, bazik bir protein olan HBxAg; HBV transkripsiyonun transaktivasyonu, sinyal iletimi yoluyla endojen protein kinaz C aktivitesinin artışı ve ribo/deoksi ATPase aktivitesi gibi

biyolojik etkilere sahiptir. In vitro çalışmalar bu proteinin gen ekspresyonu veya HBV replikasyonu için mutlaka gerekli olmadığını ortaya koymuştur (30, 32, 36).

Diğer taraftan X proteini tümör supresör gen ürününün (p53) işlevini bozar. Bu durum HBV ile ilişkili hepatokarsinogenez sürecinin ilk aşamasında etkili olarak, HBxAg'nin HCC gelişiminde rol oynayabileceğini akla getirmektedir (52).

2.3.5. Hepatit B virüs mutasyonları

Kısmen çift sarmallı bir DNA virüsü olup yaşam siklusu sırasında pregenomik RNA'dan revers transkripsiyonla DNA'ya dönüşür. Hızlı replikasyon yeteneğine sahip bir virüs olmasına rağmen revers transkriptaz enziminin sağlama yeteneğindeki zayıflık nedeni ile bu aşamada HBV'de genom yapısında küçük mutasyonlar olmaktadır. HBV'nin diğer DNA virüslerinden en büyük farklarından biri de 10 kat fazla mutasyona sahip olmasıdır. Ortalama nükleotit değişim hızı $1,4-5 \times 10^{-5}$ nükleotit/yıl olarak hesaplanmaktadır.

HBV mutasyonları;

- a) Virüsün replikasyonunu arttırabilir
- b) Virüsün antijenik yapısını değiştirerek bağışık yanıtı kaçırmaya neden olabilir
- c) Virüsün hücreye girişini ve integrasyonunu kolaylaştırabilir
- d) Antiviral ilaçlara direnç gelişimine neden olabilir

Genom üzerindeki herhangi bir yerde (S, pre C/C, X, P, promoter ve enhancer) ortaya çıkabilen bu mutasyonlar;

- a) Tek bir taban bazınının değişimi (nokta mutasyonu)
- b) Bir veya daha fazla sayıda nükleotidin silinmesi
- c) Aynı dizinin düz veya ters biçimde tekrar edilmesi
- d) Nükleotit dizilerinin yeniden düzenlenmesi gibi farklı genetik mekanizmalarla oluşabilir.

Aktif bağışık cevap varlığına rağmen virüste meydana gelen genetik değişiklikler mutant suşun hayatının devam etmesine ve bu durum tanıda karışıklıklara, aşı çalışmalarında başarısızlıklara neden olmaktadır (7, 38, 53, 54, 55).

2.3.5.1. Yüzey (kılıf) mutasyonları

HBV kılıf varyantları ile ilgili olarak tanımlanan ilk önemli mutasyon; allellerdeki subtip determinant çiftlerinde (d/y veya w/r) tespit edilmiştir. Bu immünolojik farklılık olarak 519. nükleotit ve 633. nükleotitteki değişiklikten kaynaklanmaktadır. Sentez sırasında 519. nükleotitteki değişime bağlı olarak HBsAg'nin 122. aminoasitinde bulunan lizinin arginin ile yer değiştirmesi durumunda “d” determinanti “y” determinantına dönüşmektedir. 633. nükleotittin sorumlu olduğu 160. aminoasitteki lizinin yerine arginin konması “w” determinantının “r” ye dönmesine sebep olmaktadır (47, 56).

HBsAg'nin tüm subtiplerinde “a” determinanti ortak olduğundan ve bu bölgeye karşı oluşan antikorlar HBV'nin hepatositlere bağlanmasını engellediğinden aşı veya doğal infeksiyonun geçirilmesi ile herhangi bir subtipo karşı gelişen humoral bağışıklık tüm serotiplere karşı koruyuculuk sağlar. Ancak “a” determinantındaki değişiklik durumunda klasik HBsAg subtiplerine karşı oluşan antikorlar koruyucu değildir (31, 55).

Yüzey mutasyonlarının klinik açıdan önemli sonuçları;

a) **Aşılanmış kişilerde HBV infeksiyonunun oluşabilmesi:** 1988 yılında İtalya'da HBeAg pozitif anneden doğan bir bebeğe pasif ve aktif immünizasyon uygulandıktan sonra yeterli düzeyde anti-HBs'ye sahip olduğu halde bir süre sonra HBsAg ve HBeAg pozitif hale geldiği ve kronik hepatit geliştiği saptanması ile aşı ile ilişkili ilk kaçak mutant vakası saptanmıştır (57). Aynı aşının başka kişilere uygulanması ile anti-HBs varlığına rağmen geçici HBs antijenemisi görülmüş ve bir çocukta da HBeAg pozitifliği ile hastalık ortaya çıkmıştır (58). Dizi analizi yapıldığında anneye ait “a” determinantının 145. pozisyonunda glisin bulunurken çocuğunkinde arginin bulunmuştur. Bu durumda klasik HBsAg subtipleri ile hazırlanan aşılarda koruyuculuğu yeterli olmadığı sonucuna varılmıştır (59).

b) **Hepatit B immünglobulini ile karaciğer transplant alıcılarında HBV infeksiyonu reaktivasyonu:** Korunma amacıyla “monoklonal anti-a” ya da “poliklonal anti-HBs” verilen karaciğer transplantlı bazı hastalarda bir süre sonra HBV-DNA pozitifleşmiştir. Bu olgularda 145. aminoasitte glisin arginin mutasyonu ve S proteininin diğer pozisyonlarında mutasyonel değişiklikler görülmüştür (60-62).

c) **HBsAg tanısında kullanılan EIA testlerinin saptayamayacağı antijenik yapıların varlığı ve olağan dışı serolojik profiller:** S bölgesinde ortaya çıkan mutasyonlar serolojik tepkimeleri de etkilemekte, tek başına HBV-DNA pozitifliği, tek başına HBsAg

pozitifliği, anti-HBs ve HBsAg'nin birlikte pozitifliği gibi alışılmışın dışında serolojik profillerin görülmesine sebep olmaktadır (54).

Sonuç olarak yüzey geni mutasyonları aşının ve Hepatit B immünglobulin (HBIG)'in korumasından kaçabilen HBsAg negatif HBV enfeksiyonlarına neden olabilir (63).

2.3.5.2. Prekor/kor mutasyonları

Viral replikasyon kaybı olmadan anti-HBe serokonversiyonu gösteren bazı hastalardan izole edilen HBV-DNA'lar incelendiğinde prekor/kor geni üzerindeki mutasyonlar saptanmıştır. Eğer prekor bölgesinin 1896. nükleotidindeki guaninin (G) yerine adenin (A) gelirse triptofan kodonu da denilen kodon 28 (TGG), stop kodon (TAG) haline gelir ve HbeAg'nin prekürsör proteini (p250) oluşamaz. Bu mutasyon kor bölgesinin başlama kodonundan önce meydana geldiğinden ve HBeAg ile HBcAg farklı mRNA moleküllerinden sentezlendiği için HBcAg'nin sentezinde bir problem olmadan devam eder, ancak HBeAg sentezlenemez (64-66).

HBeAg translasyonu viral replikasyon için gerekli olmadığından replikasyon yeteneğine sahip HBeAg negatif mutantların ortaya çıkması söz konusudur. HBeAg'nin fonksiyonu konağın HBV'ye karşı gelişen cevabını kontrol etmek olduğu için HBeAg sentezleyemeyen mutant suşlar konak sitotoksik cevabından kaçarlara (54).

2.3.5.3. P geni mutasyonları

P geni HBV'nin en büyük geni olup diğer üç genle de çakışmalar yaptığından gen üzerindeki değişiklik genellikle diğer genlerde de değişikliğe neden olmaktadır. HBV replikasyonunu baskılamak amacı ile nükleozit/nükleotit analogları kullanılmakta, bu ajanlar uzun süre kullanımda replikasyonu baskılamakta fakat ilaca dirençli kökenleri de ortaya çıkarmaktadır (39).

Polimeraz gen mutasyonların büyük kısmı YMDD motifinde oluşur. Şimdiye kadar ilaca bağlı en iyi tanımlanmış HBV mutantları lamivudine dirençli olanlardır ve lamivudin direncinden sorumlu olan rtM204V (YVDD), rtM204I (YIDD) ve rtM204S (YSDD) mutasyonları sayılabilir. Adefovir dipivoksil direncinden, rtN236T ve rtA181T/V

mutasyonları sorumludur. Entakavir direnci ise lamuvudine dirençli olgularda rtT184G, rtS202I ve rtM250V bölgelerinde gözlenmiştir (67-70).

2.3.5.4. X geni mutasyonları

X gen bölgesi 465 nükleotitten oluşmakta olup virüsün replikasyonu ve ekspresyonunun sağlanmasında önemli bir yere sahiptir. X proteini HBV genlerini transaktive etmekte ve kor promoter, enhancer II, DR1 ile DR2 bu bölgede yer almaktadır. Mutasyonlar bu yapıların hepsini etkilemektedir (71).

X geninde meydana gelen değişik mutasyonların fonksiyonel önemi tam olarak bilinmemektedir. Bu varyantların infektiviteleri zayıf, replikasyon seviyeleri düşüktür. Kronik HBV enfeksiyonlu, HCC'li, fulminan hepatitli ve sirozun son döneminde bulunan hastalarda X geni üzerinde bulunan 130. ve 131. kodonlarda nokta mutasyonları bildirilmiştir (52). Bu gen üzerindeki 1770–1777. nükleotitleri arasındaki 8 nükleotitlik delesyonunun DNA ekspresyon ve replikasyonunu baskıladığı ve sonuçta HBsAg'nin negatif hale geldiği bildirilmiştir (71).

Beklenen serolojik profilde sapmalar gösteren hastalarda, anti-HBc negatif yüksek düzeyde viremik hepatitliler, renal diyalize giren kişiler ve çoklu transfüzyon uygulanan hastalarda HBx mutantları gösterilmiştir (72, 73).

2.4. EPİDEMİYOLOJİ

HBV tüm dünyada yaygın olarak görülmekte olup neden olduğu akut hepatit olgularının ortalama %5'i kronikleşmektedir. Bu olguların bir bölümü de siroza dönüşmektedir. Sirozlu olgularda ise HCC gelişme riski oldukça yüksektir. Tüm dünyada yaklaşık 400 milyon kişi HBV ile kronik enfektidir. Bu nedenle her yıl 500.000 ile 1.200.000 arasındaki kişi HBV nedenli hastalıklar sonucunda ölmektedir (8, 50, 74, 75).

2.4.1. Bulaşma yolları

HBV'nin 4 ana bulaşma şekli vardır:

- 1) İnfekte kan ya da vücut salgıları ile parenteral temas (perkütan)
- 2) Cinsel temas
- 3) İnfekte anneden yeni doğana bulaşma (perinatal, vertikal)
- 4) İnfekte kişilerle cinsellik içermeyen yakın temas (horizontal)

HBsAg ve HBV-DNA serum dışında semen, yara eksudası, tükürük, idrar, dışkı, ter, gözyaşı, vajinal salgılar, sinovyal sıvılar, beyin omurilik sıvısı ve kordon kanında da bulunmuştur (76).

Bulaşması mevsim ve yaş faktörleri ile ilişkili değildir. HBV, fekal oral yolla bulaşması söz konusu olmadığından su ve gıdalarla bulaşma olmamaktadır. Ancak infekte kanın hasarlanmış oral mukozaya temas etmesi ile oral bulaşma mevcuttur. Göz ve bütünlüğü bozulmuş deri de virüsün geçişinde önemli rol oynar (76, 77)

Perkütan bulaşma, kan ve kan ürünleri alanlarda, hemodiyaliz hastalarında, endoskopi, yapay solunum cihazı gibi tıbbi aletlerin kullanımında, akupunktur uygulaması, aynı enjektörün farklı bireylerde kullanımı ve dövme yaptıranlarda olmaktadır. Ayrıca infekte kan bulaşmış havlu, jilet, tıraş makinesi, diş fırçası, banyo malzemeleri gibi günlük eşyaların ortak kullanımı da perkütan bulaşmaya neden olabilir (76).

Cinsel temasla bulaşma için en riskli grup homoseksüel kişilerdir. Rektal mukoza travmalarına bağlı olarak infekte kan ya da infekte semen teması riski arttırmaktadır. Genital sekresyonlar kandan daha az konsantrasyonlarda virüs içermelerine karşın bu sekresyonlar heteroseksüel temas sırasında bulaşmaya neden olabilmektedir. Özellikle heteroseksüel yolla bulaşmada, HBV taşıyıcılarının eşleri tehlike altında olması yanında, çoklu heteroseksüel eşi ya da diğer cinsel yolla bulaşan hastalığı olanlarda risk daha fazladır (77, 78).

Perinatal bulaşma, intrauterin dönemde plasenta hasarı sonucu maternal dolaşımın fetal dolaşıma karışmasıyla, doğum sırasında vaginal kanaldan geçişte anne kanının yutulması, sezaryen sırasında anne kanıyla temas gibi durumlarda ve doğum sonrasında olmaktadır (31). İntrauterin bulaşma oranı ise düşüktür (79).

Horizontal (yatay) bulaşma; parenteral, cinsel veya perinatal temasla bulaşmanın olmadığı durumlarda oluşan bulaşma şeklidir. HBV'nin hepatositlerden başka periferik kandaki mononükleer hücrelerde de replike olabilmesi nedeniyle çok küçük miktarlardaki

infekte kanın, yakın temastaki bireylerin hasarlı derileriyle temasının horizontal bulaşmaya yol açabileceği düşünülmektedir (80). Tükürük gibi vücut sıvılarının defektli deriyle teması da bulaşmaya sebep olabilir. Horizontal yol özellikle ev içi bulaşmada önemlidir. HBV'nin toplu yaşamın olduğu zeka özürlü çocuk bakımevleri, anaokulu, kreş, yatılı okul, kışla, yurt, hapisane gibi yerlerde de kolay yayıldığı görülmüştür. Kalabalık yaşam şartları, kötü hijyen ve düşük sosyoekonomik düzey HBV'nin bulaşma oranını arttırmaktadır (76).

2.4.2. Dünyada HBV enfeksiyonu prevalansı

Dünyada HBV enfeksiyonunun dağılımı coğrafi bölgelere göre farklılıklar gösterir. Bu bölgelerdeki HBsAg ve anti-HBs pozitifliği oranları, enfeksiyonun alınma yaşı ve virüsün en sık hangi yolla bulaştığı göz önüne alınarak düşük, orta ve yüksek endemisite bölgeleri olarak sınıflandırılmaktadır. HBsAg pozitifliği dünya genelinde %0,1–20 arasındadır (8).

Düşük endemik bölgelerde prevalans %2'den azdır. Kuzey Amerika, Kuzey ve Batı Avrupa, Avustralya, Yeni Zelanda gibi gelişmiş ülkelerde HBV düşük endemisite göstermektedir. Bu ülkelerde genel popülasyonda HBV insidansı düşük iken eşcinseller, çok eşli heteroseksüeller, damar içi uyuşturucu bağımlıları gibi risk gruplarında ve Eskimolar, Yeni Zelanda Maorileri, Avustralya yerlileri, ABD zencileri gibi bazı etnik gruplarda enfeksiyon endemiktir. Cinsel temas en önemli bulaşma nedenidir. HBV ile çoğunlukla erişkin dönemde karşılaşılır. Perinatal ya da erken çocukluk dönemlerindeki bulaşma önemli ölçüde HBV taşıyıcılığına neden olur (8, 20).

Orta endemik bölgelerdeki toplumda HBsAg pozitifliği %2–7 arasındadır ve erişkinlerin %20–60'ında anti-HBs pozitifliği saptanmaktadır. Güney ve Doğu Avrupa, Güney ve Orta Amerika, Orta Asya ile Türkiye'nin de içinde yer aldığı Ortadoğu orta endemik bölgelerdir. Enfeksiyon çoğunlukla çocukluk, ergenlik veya genç erişkinlik dönemlerinde alınmaktadır. Başlıca bulaşma yolu perkütan veya horizontal olmaktadır (8, 20).

Yüksek endemik bölgeler olan Afrika ve Asya ülkelerinde HBV enfeksiyonunun epidemiyolojik paterni oldukça farklıdır. HBsAg pozitifliği %5–20 oranındadır. Erişkinlerin %70'den fazlasında anti-HBs pozitifdir. Yüksek endemik bölgelerde perinatal veya horizontal bulaşma ana bulaşma yoludur. Asya'da perinatal bulaşma daha önemli iken Afrika'da ise bulaşma bir yaşıdan büyük çocuklarda aile içi horizontal yollardır (8, 20).

2.4.3. Türkiye’de HBV enfeksiyonu prevalansı

Ülkemizde 1972’den beri çeşitli gruplarda HBsAg taranmaktadır (77). Türkiye’deki HBsAg seroprevalansı, bölgeden bölgeye değişmek üzere EIA yöntemi ile %1,7–21 olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlara göre Türkiye orta derecede endemik bir bölgedir (8).

Sağlık Bakanlığı verilerine göre 1998 yılında Türkiye genelinde çalışılan 1.377.688 kanda %1,0 oranında HBsAg pozitifliği bulunmuştur (81). Türkiye’de HBV enfeksiyonu seroprevalansı (HBsAg pozitifliği ve anti-HBs pozitifliği) %25–60 arasındadır. Bu oranlar gelişmiş ülkelere göre oldukça yüksektir. HBV enfeksiyonu seroprevalansının en çok araştırıldığı olgular sağlık personelidir. Bu grupta ortalama %8 (3,5–16,4) HBsAg pozitifliği ve %40 (17,9–52,9) anti-HBs pozitifliği bulunmuştur (81).

Kan verici kaynağının askerden sivil kayması kan vericilerdeki oranlarda değişikliğe neden olmuştur (82). Asker kan vericilerinde HBsAg pozitiflik oranları 2000 yılı öncesi %7,4’dan, 2000 yılı sonrasında %4,2’e inmesine rağmen sivil kan vericileri ile karşılaştırıldığında sivil kan vericilerinde oranın %5,2’den %2,9’a azalması genel olarak bakıldığında tüm yıllar içerisinde sivillerde oranların daha düşük olduğunu göstermektedir (83).

Kan vericisi dışı popülasyondaki 277.627 kişide çeşitli illerden gönderilen HBsAg oranları %7,6 bulunmuştur. Yine bu grupta, HBsAg ve anti-HBs oranlarına bakıldığında toplumumuzun üçte birinden fazlasının HBV ile karşılaştığını göstermiştir (83).

2.5. HBV İNFEKSİYONUNUN DOĞAL SEYRİ

HBV enfeksiyonu halen tüm dünyada en önde gelen sağlık sorunlarından biridir. HBV enfeksiyonu akut, fulminan ya da kronikleşerek siroza ve HCC’ye kadar gidebilen formda hepatit tabloları yapabildiği gibi persistan viremiye rağmen aminotransferazların ve karaciğer histolojisinin normal olduğu “sağlam taşıyıcılık” diyebileceğimiz bir tablo olarak da karşımıza çıkabilir (84).

HBV enfeksiyonunun klinik tabloları hem akut hem de kronik hastalıkta değişkenlikler göstermektedir. Akut fazda, subklinik veya anikterik hepatitten ikterik hepatite, hatta bazı vakalarda fulminan hepatite kadar değişik tablolarda seyredebilmektedir. Kronik faz sırasında ise asemptomatik taşıyıcı durumundan, kronik hepatit, siroz, HCC’e kadar değişen bir seyir çizmektedir (85).

HBV infeksiyonunun inkübasyon dönemi 60–180 gündür. Klinik şekilleri yaş, cinsiyet, virüsün genetik yapısı, diğer hepatotrop virüs varlığı, infekte kişinin immün durumu ve hastalığa tanı konulan evreye göre değişmektedir. Çocuklarda ve gençlerde yetişkinlere göre daha hafif veya asemptomatik seyretmektedir. HBV infeksiyonunun 4 yaşın altındaki çocuklarda %90, 30 yaşın üzerindeki yetişkinlerde ise %60 oranında asemptomatik geçirildiği bildirilmiştir. Akut HBV infeksiyon öyküsü olmayan kişilerde yüksek oranda taşıyıcılık bulunması hastalığın daha çok subklinik geçirildiğinin diğer bir göstergesidir ve semptomsuz olan bu olgularda kronikleşme eğilimi daha fazladır (86). HBV infeksiyonu geçiren yetişkin kişilerin %5'inde infeksiyon kronikleşebilmekte, %0,5'inde de siroza ilerleyebilmektedir. Ayrıca HBV taşıyıcılarında HCC gelişme ihtimalinin infekte olmayan kişilere göre 100 kat daha yüksek olduğu belirtilmektedir (31).

2.6. MİKROBİYOLOJİK TANI

HBV tanısı için geliştirilen serolojik yöntemlere, son yıllarda moleküler tanı teknikleri de eklenmiştir. 1980'lerden sonra daha duyarlı serolojik teknikler ve testlerin gelişmesi ile akut infeksiyonun erken tanısı, akut ve kronik infeksiyonun birbirinden ayırt edilmesi ve vireminin kalıcılığının belirlenmesi mümkün olabilmektedir. Moleküler yöntemlerden; serolojik yöntemlerin yetersiz kaldığı durumlarda, olağan dışı hepatit B serolojilerinde, antiviral tedavi takibinde, mutant suşların araştırılmasında ve HCC oluşum mekanizmalarının aydınlatılmasında yararlanılmaktadır (19).

2.6.1. Serolojik tanı

HBV infeksiyonlarının özgül tanısını koymak amacıyla hasta serumunda virüs antijenlerine karşı gelişen antikorların varlığı araştırılmaktadır (19, 29, 30).

HBsAg: Akut HBV infeksiyonu sırasında HBsAg, virüse ait ilk saptanan antijendir. Akut infeksiyonda semptomların başlamasından 2–8 hafta önce kanda saptanabilir düzeye gelir. İyileşme ile sonlanan hastalık tablosunda, akut dönemde pik düzeye ulaşır ve 2–6 ay içinde kandan kaybolur. HBsAg'nin akut infeksiyonu takiben serumda 6 aydan daha uzun süre pozitif olarak kalması kronikleşme lehinedir (19, 37).

HBeAg: Akut infeksiyon sırasında genellikle HBsAg'nin ortaya çıkmasından kısa bir süre sonra ortaya çıkmakta ve HBsAg'den önce de kaybolmaktadır. Serumda HBeAg'nin

varlığı bulaşıcılık, infektivite ve aktif viral replikasyona ilişkilidir. Ancak bazen hastada HBeAg sentezlenmesine rağmen, serumda aktif viral replikasyonun göstergesi olan HBV-DNA saptanamaz. HBeAg'nin serumdaki varlığının 3–4 aydan uzun sürmesi kronik HBV enfeksiyonuna gidişi göstermektedir. Kronik HBV enfeksiyonunda HBeAg'nin pozitifliğini sürdürmesi ağır karaciğer hastalığı gelişmesi riskini arttırmaktadır (19, 37, 87).

HBeAg: Anti-HBc, HBsAg saptandıktan kısa süre sonra ve anti-HBs ortaya çıkmadan önce görülmektedir. Erken dönemde hızla spesifik antikor ile birleştiğinden serumda saptanması güçtür. Bir çalışmada HBeAg miktarı ile HBV-DNA düzeyi uyumlu bulunmuştur (19, 88).

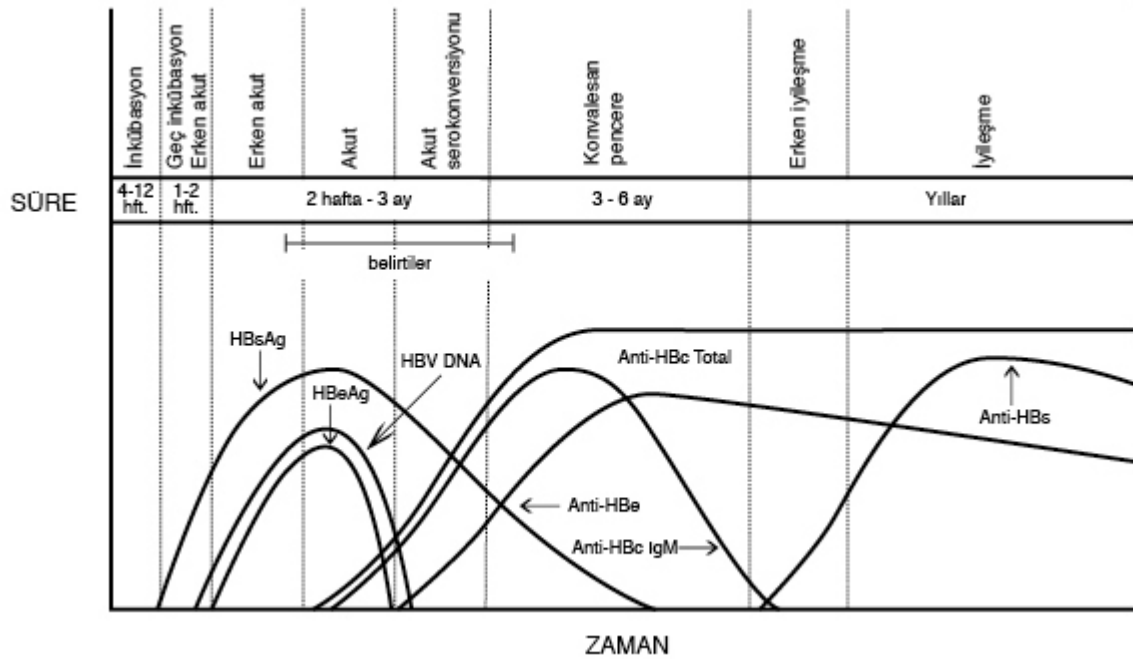
Anti-HBc IgM: Akut HBV enfeksiyonu göstergesi olan anti-HBc IgM enfeksiyon başladıktan birkaç hafta sonra tepe seviyelere ulaşır, bundan sonra titresi azalmaya başlar ve ortaya çıktıktan 4–8 ay (bazı olgularda 12 ay) sonra ortadan kaybolur (HBsAg'den oldukça uzun bir süre kalmaktadır). HBsAg pozitifliğinden 1–4 hafta sonra pozitifleşir ve bazen akut HBV enfeksiyonunun tek göstergesi olarak bulunabilir. “Pencere dönemi” denilen bu dönemde HBsAg ve HBeAg kaybolmuş, fakat antikorlar henüz oluşmamıştır. Bu dönem yaklaşık 2–8 hafta sürer. Pencere döneminin uzadığı olgularda anti-HBc IgM ortadan kaybolur ve sadece anti-HBc IgG antikorları pozitif olarak saptanabilir. Anti-HBc IgM sadece akut dönemde değil kronik HBV enfeksiyonunun akut alevlenmeleri sırasında da pozitifleşebilir. Ancak akut dönemdeki IgM titresi oldukça yüksek düzeyde iken, kronik enfeksiyon sırasında düşük seviyelerde olmaktadır (19, 37).

Anti-HBc IgG: Anti-HBc IgM antikorlarının görülmesinden bir süre sonra IgG sınıfı antikorlar ortaya çıkmakta ve bunlar genellikle hayat boyu saptanabilir düzeylerde kalmaktadırlar. Anti-HBc IgG'nin pozitifliği kişinin HBV ile karşılaştığını göstermektedir ancak akut, kronik ya da geçirilmiş enfeksiyonu birbirinden ayırt edememektedir. Bütün serolojik göstergelerin negatif olmasına karşılık tek başına anti-HBc IgG'nin pozitifliğine “izole anti-HBc pozitifliği” denir (19, 37).

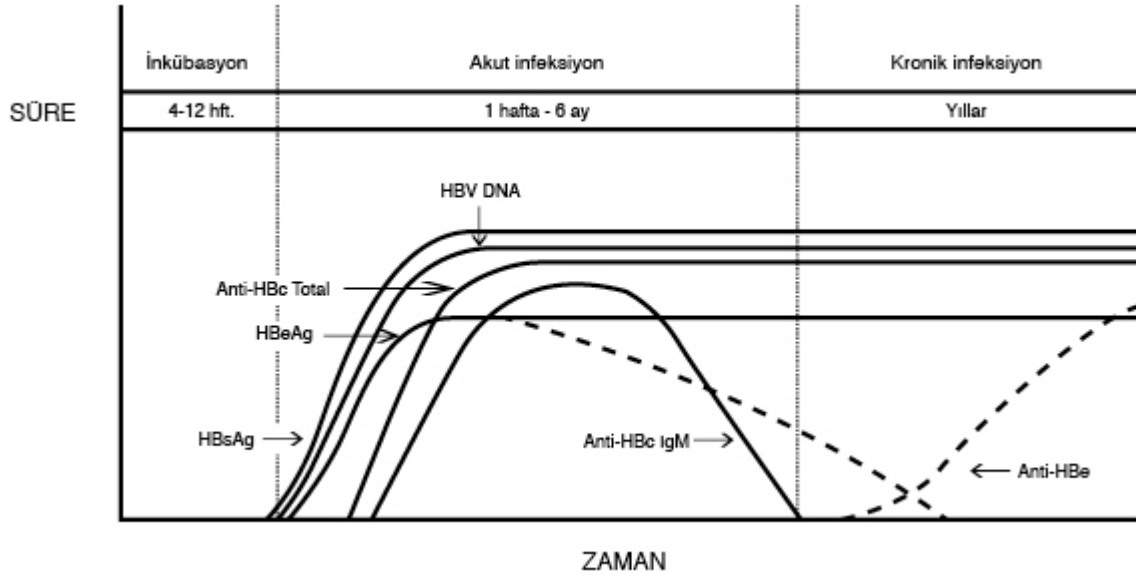
Anti-HBe: HBeAg'nin ortadan kalkmasından (genellikle 12–14 haftada ortadan kaybolur) kısa bir süre sonra anti-HBe antikorları ortaya çıkmaktadır. Bazı olgularda çok kısa bir süre HBeAg ve anti-HBe serumda birlikte pozitif bulunabilmektedir. Anti-HBe antikorlarının ortaya çıkması viral replikasyonun azaldığının ve hastalığın iyileşmeye doğru gittiğinin göstergesidir. Ancak, prekor gen bölgesinde mutasyon olan suşlarla oluşan enfeksiyon sırasında hastada anti-HBe pozitifliğine rağmen HBV-DNA olumlu saptanabilir. Anti-HBe

antikorları hastaların üçte birinde altı ay içinde saptanamayacak düzeylere iner, geri kalanlarda ise 4–6 yıl kadar devam eder. Anti-HBc ve anti-HBs antikorlarıyla birlikte saptanması yakın zamanda geçirilmiş akut HBV infeksiyonunu gösterir. Kronik HBV infeksiyonunda hedeflerden biri HBeAg'nin kaybolması ve anti-HBe'nin oluşmasıdır (19, 37).

Anti-HBs: İyileşme ile sonlanan infeksiyonda, HBsAg ortadan kaybolduktan bir süre sonra serumda buna karşı oluşan koruyucu anti-HBs antikorları ortaya çıkmaktadır. Aslında akut dönemde anti-HBs antikorlarının oluşumu daha erken meydana gelmektedir. Ancak HBsAg fazlalığında oluşan immün komplekslerin bunu maskeleydiği düşünülmektedir. HBV infeksiyonu sonrasında gelişen anti-HBs, anti-HBc antikorları ile birlikte genellikle hayat boyu saptanabilir düzeyde kalmaktadırlar. Ayrıca anti-HBs; hepatit B aşılması ve HBV immünglobulin (HBIG) verilmesinden sonrasında pozitifleşebildiği gibi kan transfüzyonuyla ya da anneden bebeğe pasif olarak da transfer edilebilmektedir (pasif olarak alınan antikorlar birkaç ay içinde ortadan kaybolmaktadırlar). Serumda anti-HBs seviyesinin 10 miü/mL'nin üzerinde olması koruyucu bir bağışıklık seviyesini göstermektedir (19, 37). Akut HBV infeksiyonu sırasında görülen serolojik göstergeler Şekil 2'de, Kronik HBV infeksiyonu sırasında görülen serolojik göstergeler ise Şekil 3'de gösterilmiştir.



Şekil 2. Akut HBV infeksiyonunda serolojik göstergeler (7 numaralı kaynaktan modifiye edilmiştir).



Şekil 3. Kronik HBV enfeksiyonunda serolojik göstergeler (7 numaralı kaynaktan modifiye edilmiştir).

2.6.2. Moleküler tanı

HBV enfeksiyonunun tanısında kullanılan yöntemler uzun yıllar hibridizasyon ve nükleik asit amplifikasyon yöntemleri olarak iki başlık altında toplanmıştır (19, 89).

Hibridizasyon; birbirine uyan nükleotit dizine sahip iki molekülün özgül olarak birleşmesi anlamına gelir. Hibridizasyon yöntemlerinde, DNA veya RNA'dan oluşturulmuş, çeşitli enzimler, antijenler, kemiluminesan bileşikler ya da radyoizotoplarla işaretlenmiş ve aranan hedef nükleik asite özgüllükle bağlanan dizilere sahip probalar kullanılır (90).

Nükleik asit amplifikasyon yöntemi; Kary Mullis'in 1985 yılında tasarladığı "etkene özgü nükleik asitlerin (DNA/RNA) *in vitro* çoğaltılarak saptanması" esasına dayanan polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemi, HBV-DNA'nın belirlenmesinde en özgül ve en duyarlı yöntemidir. Bu yöntemle, çok düşük oranlardaki HBV-DNA tespit edilebilmektedir. Akut, kronik HBV enfeksiyonlarında ve kan bankacılığında serolojik tanı testlerinin yanında moleküler tanı testleri (MP-NAT veya ID-NAT) de kullanılmaktadır (90-93).

2.6.3. Hücre kültürü ve hayvan modelleri

HBV, erişkin ve fetal hepatosit kültürlerinde üretilmektedir. Şempanzeler ve diğer yüksek primatlar deneyler için kullanılabilir. Ancak, bu yöntemler rutin kullanım için uygun değildir (20).

2.7. OLAĞAN DIŞI SEROLOJİK PROFİLLER

2.7.1. Gizli HBV enfeksiyonu

HBV enfeksiyonunun iyileşmesi, HBsAg'nin kaybolması ile birlikte HBV-DNA'nın negatifleşmesi olarak tanımlanır. Bununla birlikte bazı hastaların serum ve/veya karaciğerinde hassas PCR teknikleri ile düşük düzeyde HBV-DNA (genellikle $<10^4$ viral genom/mL) varlığı gösterilmiştir (94-96). Böylece saptanamayan HBsAg ile birlikte kronik HBV enfeksiyonunu tanımlayan bu yeni durum “okült; gizli; sessiz ya da latent” HBV enfeksiyonu olarak adlandırılmaktadır. Gizli HBV enfeksiyonluların bir kısmında anti-HBc ve/veya anti-HBs pozitifdir. Hastaların önemli bir kısmında ise her ikisi de negatiftir. Gizli HBV enfeksiyonu, aşağıda belirtilen bazı hasta gruplarında daha sık görülmektedir (97);

- HCC'li kronik hepatit C virüs (HCV) enfeksiyonu olanlar
- Anti-HBc(+) vericilerden karaciğer nakli yapılanlar
- Anti-HBc(+) kronik hepatit C'li hastalar
- Kriptojenik siroz/fibrozis olguları
- Hemodiyaliz hastaları
- İntravenöz uyuşturucu kullananlar

Gizli HBV enfeksiyonu bilinen bir klinik durum olmasına rağmen, oluş mekanizması tartışmalıdır. Bunun için düşünülen olasılıklar;

1) S bölgesinde mutasyon

Pre-S/S bölgelerindeki herhangi bir mutasyon HBsAg antijenitesini ya da üretimini etkileyebilir. Bazı gizli HBV enfeksiyonlu hastalarda belli pre-S/S mutasyonları (124-147. aminoasitler, 98-156. aminoasitler) gösterilmiştir (98). Tek bir mutasyon tanımlanmamasına rağmen, aynı bölgedeki mutasyonların sıklığının artması en azından bazı hastalarda patogeneze sorumlu olabilir (98, 99).

2) Genoma integrasyon

Gizli HBV enfeksiyonlu hastalarda genoma integre ya da serbest epizomal HBV-DNA molekülleri gösterilmiştir (100). HBV-DNA integrasyonu virüste DNA zincirinin yeniden düzenlenmesine neden olabilir. Sonuçta, HBsAg ekspresyonu azalabilir ya da durabilir. Gizli HBV enfeksiyonu olan HCC'lilerde HBV integrasyon sıklığı fazla bulunmuştur (101).

3) Periferik kandaki mononükleer hücrelerde (PKMH) HBV enfeksiyonu

Akut ve kronik HBV enfeksiyonu sırasında PKMH'de HBV-DNA saptanabilir (102). HBV'ye bağlı karaciğer hastalığı nedeni ile karaciğer nakli olan hastalarda yüksek doz HBIG verilmesi serumda HBsAg'nin ve karaciğerde HBV-DNA'nın negatif kalmasını sağlar; bununla birlikte bu hastalarda da PKMH'de HBV-DNA varlığı gösterilmiştir. Bu durum karaciğer nakli sonrasında nüks HBV enfeksiyonlarından sorumlu olabilir (103).

4) HBV içeren immün kompleksler

Akut HBV enfeksiyonu ardından anti-HBs oluşsa bile, kanda immünkompleks halinde HBV partiküllerinin varlığı devam edebilir (101).

5) Konak immün cevabı

HBV enfeksiyonunun seyri, konak immün cevabı ile viral replikasyon oranının dengesine bağlıdır. Virüs eliminasyonunda hem hücresel, hem de humoral faktörler rol oynar. HBV proteinlerine karşı gelişen yetersiz T hücre cevabı virüsün kalıcı olmasına neden olur. Teorik olarak konak immün yanıtının azalması gizli HBV enfeksiyonu gelişimini kolaylaştırır. Karaciğer nakli sonrasında immünsupresyon ile HBV enfeksiyonunun nüks etmesi buna bir örnektir (99, 104).

6) Ko-enfeksiyon

Kronik C hepatitli hastalarda gizli HBV enfeksiyonu sıktır. Kronik HBV ve HCV ko-enfeksiyonunda HBV DNA düzeyi düşük olma eğilimdedir ve önemli oranda HBsAg klirensi gerçekleşir (105). Ülkemizde Kronik C hepatitli hemodiyaliz hastalarında yüksek oranda gizli HBV enfeksiyonunu (%36,4) gösteren çalışmalar vardır (106).

7) Diğer olası mekanizmalar

Gizli HBV enfeksiyonlu hastaların %61'i genotip D'dir. Buna karşılık HBsAg pozitif hastaların %53'ü genotip A'dır. Bu sonuçlar gizli HBV enfeksiyonu gelişiminde genotipin etkili olabileceğini düşündürmektedir (105).

Gizli HBV enfeksiyonu dünya çapında yayılmıştır. Özellikle HCV enfeksiyonu görülen bireylerde daha fazladır. HBV-DNA, Akdeniz bölgesinde HCV taşıyıcılarında HBsAg negatif olan hastaların 1/3'ünde saptanabilmektedir. Bu prevalans Uzak Doğu Asya lkelerinde daha yüksektir. (97, 107). Kuzey Amerika'nın bazı bölgelerinde ilerlemiş karaciğer hastalığı olan HCV ile enfekte hastalarda gizli HBV enfeksiyonunun daha fazla görülmesi bu duruma bir kanıttır (108). Sağlıklı bireylerde ise gizli HBV enfeksiyonu daha çok kan vericilerinde görülmektedir. İtalya'daki bir çalışmada karaciğer hastalığı olmayan bireylerde karaciğer doku analizi yapılması sonucunda gizli HBV enfeksiyonu prevalansının %17 olduğu gösterilmiştir (109).

Kriptojenik karaciğer hastalıklarında gizli HBV prevalansı coğrafik bölgeye göre değişmektedir. Hindistan'dan yapılan bir çalışmada HBV ve HCV açısından serolojik göstergeleri negatif olan kronik hepatitli hastalarda PCR ile HBV-DNA oranı %10,8 olarak bulunmuştur (110).

HBsAg negatif fulminan karaciğer yetersizliği vakalarının önemli bir kısmında (%0–47) HBV-DNA pozitif bulunmuştur (111, 112).

HCV enfeksiyonu, HCC gelişim riskini artırmaktadır. HBV ve HCV koinfeksiyonu bu riski daha da artırmaktadır. Sadece HCV enfeksiyonu olan hastalarla, HCV ile birlikte gizli HBV enfeksiyonu olanlar, HCC gelişim süresi açısından karşılaştırıldıklarında; gizli HBV enfeksiyonu olanlarda daha erken sürede HCC geliştiği görülmüştür (113).

Sonuç olarak, PCR gibi hassas testlerin gelişmesi ile gizli HBV enfeksiyonu tanımlanmıştır. Bu klinik durumu saptamada anahtar HBV-DNA olduğu için kullanılan teknik ve standardizasyonu çok önemlidir. HBV'nin coğrafik dağılımı ve risk faktörlerinin varlığı prevalansı etkilemektedir. Patogenez ve klinik öneminin belirlenmesi için ise ek çalışmalara gereksinim vardır.

2.7.2. İzole anti-HBc pozitifliği

En sık görülen atipik serolojik profildir. Ülkemizde %2–12 oranında izole anti-HBc pozitifliği görülür (114). İzole anti-HBc pozitifliğinin nedenleri arasında (19, 37, 114, 115):

- 1) Anti-HBc'nin yalancı pozitifliği
- 2) İzole anti-HBc'li olguların %5–15'lik kısmından anti-HBs yanıtı gelişmemesi
- 3) Düşük düzey taşıyıcılık

- 4) Akut B hepatiti doğal seyrinde görülen pencere dönemi
- 5) HBcAg dışındaki antijenlere konağın yanıt verememesi
- 6) Pasif transferle geçen antikorlar (anneden bebeğe ya da kan transfüzyonunu takiben) sayılabilir.

2.7.3. HBsAg ve anti-HBs'nin birlikte pozitifliği

Bu durum birçok farklı nedenlerden kaynaklanabilir (114, 116-118);

- 1) Akut HBV enfeksiyonunun iyileşme döneminde
- 2) Doğal ve aşı ile oluşan anti-HBs varlığına rağmen "a" determinatını kodlayan gen bölgesinde mutasyon olan kökenlerle enfeksiyon
- 3) Farklı HBV subtipleri ile karşılaşmış taşıyıcılarda
- 4) Bağışıklık yanıtı bozulanlarda (özellikle kronik aktif hepatitlilerde, damar içi uyuşturucu kullananlarda, hemodiyaliz uygulananlarda)
- 5) Hepatit B aşısı yapılan, gerçekte kronik HBV enfeksiyonlularda
- 6) Bu iki göstergenin bir arada saptanması deney koşullarında immünkomplekslerin parçalanması ile açığa çıkan antijen ve antikorların ayrı ayrı saptanması durumunda görülebilir.

2.7.4. Tek başına HBsAg pozitifliği [HBsAg(+), anti-HBc total(-), anti-HBs(-)]

Tek başına HBsAg pozitifliği aşağıdaki durumlarda görülebilir (114, 119, 120);

- 1) Akut HBV enfeksiyonun seyri sırasında
- 2) HBcAg'ye selektif immün yanıt defekti
- 3) Prekor/kor gen bölgesinde mutasyon varlığı
- 4) Yüksek doz HBV aşısını takiben kısa süreli
- 5) Aşırı HBcAg sentezi sonucu ortaya çıkan HBcAg/anti-HBc kompleksi nedeniyle anti-HBc'lerin saptanamayacak düzeye inmesi
- 6) Klinik örneğin kontaminasyonu (heparinli kan örneği, hemofili hastaları gibi) sonucunda görülür.

2.7.5. Tek başına anti-HBs pozitifliği

HBV aşılması veya HBIG uygulaması dışında bu durum (114, 121):

- 1) Doğal infeksiyon sonrasında anti-HBc'nin oluşmaması ya da kaybolması
- 2) Hasta kanlarıyla sürekli temas eden laboratuvar personeline infeksiyöz olmayan viryonla tekrarlayan karşılaşmalar sonucu
- 3) Pasif transferle geçen antikorlar (anneden bebeğe veya kan transfüzyonunu takiben)
- 4) Test hatalarına bağlı yanlış pozitiflikten (en çok düşük titrede koruyucu özelliği olmayan, IgM sınıfı, bir süre sonra kaybolan antikorlar nedeniyle) kaynaklanabilir.

2.8. TEDAVİ

Akut hepatit B'nin tedavisi destek tedavidir. Fulminan hepatit gelişmesi durumunda karaciğer transplantasyonu endikasyonu vardır (37, 122, 123).

Kronik hepatit B tedavisinde günümüzde gittikçe antivirallerin sayıları arttırılmakta ve bu antiviral ajanların tedavideki etkinliği araştırılmaktadır. Tedavide amaç viral replikasyonun baskılanmasıdır (124-126). Tedavide kullanılan ilaçlar;

- 1) İmmün modölatörler
 - o İnterferon α
 - o Peginterferon α -2a/b
- 2) Viral polimeraz inhibitörleri (Nükleozit ve nükleotit analogları)
 - o Lamivudin
 - o Adefovir dipivoksil
 - o Entekavir
 - o Telbivudin
- 3) Yeni Antiviraller
 - o Emtrisitabin
 - o Tenofovir isoproksil fumarat
 - o Klevudin
 - o Timozin
- 4) Kombinasyon tedavileri

2.9. KORUNMA

2.9.1. Pasif immünizasyon

HBV ile karşılaşma sonrasında HBV aşısı ile birlikte uygulanan HBIG; HBsAg pozitif annelerin bebeklerinin korunmasında, HBsAg pozitif kan veya vücut sıvılarıyla perkutan veya mukozal temaslının korunmasında ve HBsAg pozitif kişi ile cinsel temaslının korunmasında etkili olmaktadır. HBIG, karaciğer nakli sonrasında HBV enfeksiyonu rekürrensini önlemek için uzun süreli uygulanmaktadır (37, 50).

2.9.2. Aktif immünizasyon

İlk geliştirilen aşılar HBV taşıyıcılarının plazma örneklerinden saflaştırılmış HBsAg içermekteydi. Daha sonra gen teknolojisi kullanılarak, HBsAg kodlayan genin maya ya da memeli hücrelerine transfeksiyonu yoluyla elde edilen saflaştırılmış HBsAg rekombinant aşılar geliştirildi. HBV aşısının etkinliği anti-HBs gelişmesi ile izlenebilmektedir. Temas öncesi aktif bağışıklamada hepatit B aşısı tüm yenidoğan ve infantlara, daha önce aşılanmamış çocuk ve ergenlere, yüksek risk grubunda olan erişkinlere önerilir (127, 128).

Aşılamada, genellikle üç dozlu şema (0., 1. ve 6. aylarda) kullanılmaktadır. Rekombinant aşının, üç doz kas içi uygulanması sonucu %95–99’unda koruyucu düzeyde antikor oluşur. Primer aşılama şemasından sonra 10 miü/mL üzerindeki anti-HBs yanıtı veren kişilerde klinik hastalık ve kronik enfeksiyona karşı tam koruma sağlanmaktadır. Aşı sonrası altıncı ayda 1000 miü/mL üzerindeki antikor yanıtı saptananlar beş yıldan daha uzun süre korunmaktadır. Çocuklar ve ergenlik dönemindekiler daha yüksek antikor yanıtı oluşturdıkları için, uygun antikor düzeyi erişkinlere göre daha uzun süre devam etmektedir. Anti-HBs, yaklaşık 5 yıl sonra koruyucu düzeyin altına inmiş olsa bile, aşılama sonrası immünolojik bellek geliştiğinden HBV ile karşılaşıldığında anamnestic yanıt verilmektedir. Bu dönemde tek doz aşı yapılırsa bu yanıt daha da artmaktadır (37, 129, 130).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. GEREÇ

3.1.1. Çalışma grubu

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi (EÜTF) Kan Merkezi ve Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi (MÜTF) Sağlık Araştırma Uygulama Hastanesi Kan Merkezi'ne Nisan 2010 ile Ocak 2011 tarihleri arasında başvuran 18–65 yaşları arasında toplam 4352 gönüllü kan vericisi çalışmaya alındı. Bu vericilerden 1971 kan örneği EÜTF Kan Merkezi'nden, 2381 kan örneği ise MÜTF Sağlık Araştırma Uygulama Hastanesi Kan Merkezi'nden toplandı. Çalışma için EÜTF Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan onay alındı. Kan örneği alınmadan önce, kan vericilerinin sorgulanması ve fizik incelemesi sırasında çalışma anlatılarak bilgilendirilmiş gönüllü kan verici onam formlarının doldurulması istendi. EÜTF Kan Merkezi'nde HBsAg, anti-HCV, anti-HIV ve TP IgM+IgG EIA (ARCHITECT, Abbott Diagnostic, ABD) ya da sifilize yönelik RPR (OMEGA Diagnostic, İngiltere) test sonuçları negatif olan örnekler çalışmaya dahil edildi. MÜTF Sağlık Araştırma Uygulama Hastanesi Kan Merkezi'nde HBsAg, anti-HCV, anti-HIV EIA (ARCHITECT, Abbott Diagnostic, ABD) ve sifilize yönelik RPR (PLASMATEC, Plasmatec Laboratory Products, İngiltere) testleriyle değerlendirilerek seçildi.

Çalışmaya dahil edilen örneklerinin tümü HBsAg, anti-HCV, anti-HIV, TP IgM+IgG ve sifilize yönelik RPR testleri bakımından negatif olanlardan seçildi.

3.1.2. Plazma örneklerinin saklanması

Çalışma için kan vericilerinden ek bir kan örneği EDTA'lı (Becton Dickinson, Fransa) tüpe alındı. Tarama test sonuçları negatif bulunan verici örnekleri 14000 rpm'de 30 dakika santrifüjlendikten sonra plazma örnekleri filtreli pipet uçları kullanılarak “DNAz” ve “RNAz” içermeyen steril tüplerde –80°C'de saklandı.

3.1.3. Ayıraçlar

- Viral nükleik asit ekstraksiyon için “QIA Symphony Virus/Bacteria Mini Kit” (QIAGEN, Almanya) kiti kullanıldı.
- Gerçek zamanlı (real-time) PCR ile HBV-DNA kantitasyon için “artus HBV QS-RGQ Kit (24)” (QIAGEN, Almanya) kiti kullanıldı.

3.1.4. Kalite kontrol serum örnekleri

Kalite kontrolde, “Quality Control for Molecular Diagnostics” (QCMD, Glasgow, İskoçya) örnekleri ile test içi, testler arası geçerlilik ve güvenilirlik çalışması yapıldı. Test sonuçlarının birbirine uygunluğu, aritma değerlerinin karşılaştırması ile elde edilen regresyon katsayısı analizi ile yapıldı.

3.2. YÖNTEM

3.2.1 Plazma örneklerinden DNA ekstraksiyonu

Plazma örnekleri -80°C ’den çıkartılıp numara sıralarına göre sıralandıktan sonra oda ısısında erimesinin ardından kısaca vortekslenip 14000 rpm’de hızlı bir şekilde santrifüjlendi.

Ekstraksiyon, “QIA Symphony Virus/Bacteria Mini Kit” (QIAGEN, Almanya) otomatik ekstraksiyon kiti kullanılarak QIA Symphony (QIAGEN, Almanya) cihazında üretici firmanın önerileri doğrultusunda gerçekleştirildi.

Yöntemin esası manyetik partiküller ile silika bazlı nükleik asit pürifikasyonudur. Pürifikasyon işlemi dört aşamadan oluşur. Lizis, bağlama, yıkama ve elüt aşamalarından sonra nükleik asit elde edilir.

Üç saat 15 dakikalık çalışma sonrasında nükleik asitler 60µl’lik hacimler halinde plaklarda elde edildi.

3.2.2. HBV-DNA’nın PCR ile çoğaltılması

HBV-DNA’nın 134 bp’lik kor bölgesini hedef alan gerçek zamanlı PCR kitleri (artus HBV QS-RGQ Kit, QIAGEN, Almanya) ile gerçek zamanlı PCR cihazında (ROTOR GENE Q, CORBETT Research Pty Ltd., Avusturya) üretici firma önerilerine uygun olarak HBV-DNA amplifiye edilmiştir.

Artus HBV QS-RGQ Kit, olası PCR inhibisyonunu belirlemek için ikinci bir amplifikasyon sistemini içerir (internal kontrol–IC). IC, Rotor-Gene Q’nun farklı bir floresan kanalı kullanılarak saptanır. Viral DNA’nın kantitasyonunda beş adet değeri bilinen kantitasyon standardı kullanılır (HBV RG/TM QS E1-E5 iü/mL). Kantitasyon standartlarının değerleri Tablo 1’de gösterilmiştir.

Tablo 1. Kantitasyon standartları değerleri

ÖRNEK NO	HBV-DNA İÇERİĞİ (iü/mL)
QS1	15000000
QS2	1500000
QS3	150000
QS4	15000
QS5	1500

Her bir çalışmada plaklarda elde edilen 63 hasta örneği ile birlikte beş standart, bir negatif kontrol, bir adet E2 düzeyinde QCMD örneği miks karışımları ile otomatik olarak PCR tüplerine pipetlendi (QIAgility, QIAGEN, Almanya). PCR tüpleri, ROTOR GENE Q gerçek zamanlı PCR cihazına yerleştirilerek aşağıdaki ısı döngü programı uygulandı.

Isı döngü programı:

- 95°C’de 10 dakika
- 45 Siklus (döngü)
 - o 95°C’de 15 saniye
 - o 55°C’de 30 saniye
 - o 72°C’de 15 saniye

IC pozitif bulunan örneklerin HBV-DNA sonuçları değerlendirilmeye alındı. Kantitasyon, üretici firmanın önerilerine uygun olarak kite ait beş adet standart yardımıyla çizilen eksternal kantitasyon eğrisi ile yapılmaktadır. Yöntemin kantitasyon aralığı 31,6 iü/mL ile 2×10^7 iü/mL arasında ve testin analitik duyarlılığı 10,22 iü/mL’dir.

4. BULGULAR

4.1. ÇALIŞMA GRUBUNUN GENEL ÖZELLİKLERİ

Çalışma grubuna alınan 4352 kan vericisinin 171'ini kadın (%3,9), 4181'ini erkek (%96,1) kan vericileri oluşturmaktadır. Kan vericilerinin yaş ortalaması 35,6 (yaş aralığı, 18–64) yıldır.

Kan merkezlerine göre cinsiyet ve yaş ortalaması ayrı ayrı değerlendirildiğinde; EÜTF Kan Merkezi'nde toplam 1971 kan vericisinin; 139'u kadın (%7) ve 1832'si erkek (%93) kan vericisinden oluşmaktadır. Yaş ortalaması 35,5 (yaş aralığı, 18–56) yıldır.

MÜTF Kan Merkezi'nde toplam 2381 kan vericisinin; 32'si kadın (%1,3) ve 2349'u erkek (%98,7) kan vericisinden oluşmaktadır. Yaş ortalaması 35,7 (yaş aralığı, 18–64) yıldır.

Kan vericilerin cinsiyetleri, yaş ortalamaları, merkezlere göre dağılımları Tablo 2'de verilmiştir.

Tablo 2. Kan vericilerinin genel özellikleri

KAN VERİCİLER	TÜM ÇALIŞMA GRUBU	EÜTF KAN MERKEZİ	MÜTF KAN MERKEZİ
Toplam (n)	4352	1971 (%45,3)	2381 (%54,7)
Kadın	171 (%3,9)	139 (%3,2)	32 (%0,8)
Erkek	4181 (%96,1)	1832 (%42)	2349(%54)
Yaş ortalaması (yıl)	35,6 (18-64)	35,5 (18-56)	35,7(18-64)

4.2. HBV-DNA KALİTE KONTROL TEST SONUÇLARI

QCMD kalite kontrol örnekleri aynı test ve farklı test ile çalışılmıştır. QCMD kalite kontrol örnekleri ile yapılan çalışma sonuçları Tablo 3’de özetlenmiştir.

Tablo 3. QCMD örnekleri test sonuçları.

		1.1*	1.2*	2**
QCMD-02	log 1,81	log 1,10	log 1,01	log 0,56
QCMD-03	log 5,32	log 4,56	log 4,59	log 4,54
QCMD-04	log 3,70	log 2,98	log 2,99	log 2,87
QCMD-05	log 3,37	log 2,56	log 2,52	log 2,34
QCMD-06	log 2,39	log 1,72	log 0,62	log 1,48
QCMD-07	log 4,38	log 3,63	log 3,63	log 3,54
QCMD-08	log 2,72	log 2,20	log 2,63	log 2,04
QCMD-09	log 4,36	log 3,48	log 3,49	log 3,54

* 1.1 ve 1.2: 1. testin 1. ve 2. çalışması

** 2: 2. Test

Testlerin logaritmik aralıkları:

1. 1.1 – 1.2 test içinde; en küçük değer: 0, en büyük değer: 1,1
2. 1.1 – 2 test arasında; en küçük değer: 0,02, en büyük değer: 0,54
3. 1.2 – 2 test arasında; en küçük değer: 0,05, en büyük değer: 0,59

Testlerin logaritmik farklarının en küçük ve en büyük değerleri QCMD’nin önerdiği aralıklar doğrultusunda bulundu.

4.3. HBV-DNA TEST SONUÇLARI

EÜTF Kan Merkezi'nden toplanan 1971 HBsAg negatif kan vericilerinden alınan tüm örneklerde HBV-DNA negatif olarak bulundu.

MÜTF Kan Merkezi'nden toplanan 2381 kan vericisinin sadece ikisinde HBV-DNA pozitif olarak saptanırken, 2379 örnek negatif bulundu.

Tablo 4'de MÜTF Kan Merkezi'nden toplanan kan vericilerinden HBV-DNA'sı şüpheli pozitif saptanan iki örneğin eğrilerinin eşik değeri kestiği siklus (ct) ve viral yük sonuçları gösterilmektedir.

Tablo 4. Şüpheli pozitif bulunan iki örneğin ct değerleri ve viral yükleri

ÖRNEK NO	ct	VİRAL YÜK (iü/mL)
252	41,46	2,08E+00
935	43,86	2,49E+00

Şüpheli pozitif olan 252 ve 935 numaralı hastaların örneklerine aynı yöntemle iki kez ve diğer alternatif yöntemler uygulanarak sağlamaları yapıldı. Bu örneklerden;

1) **252 numaralı örnek:**

- İlk PCR ürünlerinin pozitif kontrol örnekleri ile jelde görüntülenmesi negatif olarak değerlendirildi.
- Yeni kan örneği elde etmek için hastaya ulaşamaması ve hastaya ait plazma örneğinin elimizde kalmaması nedeni ile ilk yapılan ekstraksiyondan;
 - o Tekrar gerçek zamanlı PCR (artus HBV QS-RGQ Kit, QIAGEN, Almanya) uygulandı. Sonuç negatif olarak bulundu.
 - o Rotor Gene Q'da üretici firmanın önerileri doğrultusunda 8 siklus çalıştırıldıktan sonrası kapatılıp tüm protokolün tekrar uygulanması sonucu yapılan test negatif olarak değerlendirildi.

- o Inno-LiPA HBV DR Line Probe assay (Innogenetics N.V., Ghent, Belçika) ilk basamak PCR'ı uygulandı. Testin tanımlanan alt saptama limiti 1000 kopya/mL'dir. Jel elektroforez sonucu negatif olarak değerlendirildi. Tekrar hiper-PCR uygulandı ve jel elektroforezinde görüntülenmedi.

2) **935 numaralı örnek**

- İlk PCR ürün pozitif kontrol örnekleri ile jelde görüntülenmesi negatif olarak değerlendirildi.
- Hastanın plazmasından manüel ekstraksiyon (Viral Gene-Spin Viral DNA/RNA Extraction Kit, INtRON Biotechnoy Inc, Kore) yapıldı. Tekrar gerçek zamanlı PCR (artus HBV QS-RGQ Kit, QIAGEN, Almanya) uygulandı. Sonuç negatif olarak bulundu.
- İlk yapılan ekstraksiyonundan;
 - o Rotor Gene Q'da üretici firmanın önerileri doğrultusunda 8 siklus çalıştırıldıktan sonrası kapatılıp tüm protokolün tekrar uygulanması sonucu yapılan test negatif olarak değerlendirildi.
 - o Inno-LiPA HBV DR Line Probe assay (Innogenetics N.V., Ghent, Belçika) uygulandı. Jel elektroforez sonucu negatif olarak değerlendirildi. Tekrar hiper-PCR uygulandı ve jel elektroforezinde görüntülenmedi.

5. TARTIŞMA

HBV infeksiyonun tanısında serolojik testler yaygın olarak kullanılmaktadır. Son yıllarda NAT'ın gelişmesiyle HBV-DNA miktarının belirlenmesi özellikle vireminin varlığını saptama, tanı, prognoz ve tedavi takibinde tanı testi olarak kullanılmasıyla. HBsAg'nin negatif olduğu kişilerde HBV infeksiyonu tanısına olanak sağlanmıştır (19).

Kan vericilerinin genel özellikleri incelendiğinde, Bali ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada HBsAg negatif 3000 kan vericisinin %92,3'ünü erkek, %7,7'sini kadınlar oluşturmaktadır. Katılımcıların yaşları 18–65 yıl (ortalama: 32,6 yıl) arasındadır (131). Taş ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise 2500 kan vericisinin 117'si kadın (%4,68) ve yaş ortalaması 37,9 yıl olarak bulunmuştur (132).

Bu çalışmada, EÜTF Kan Merkezi'nde toplam 1971 kan vericisinin; 139'u kadın (%7) ve 1832'si erkek (%93) kan vericisinden oluşmaktadır. Kan vericilerinin yaş ortalaması 35,5 (18–56) yıldır. MÜTF Kan Merkezi'nde toplam 2381 kan vericisinin; 32'si kadın (%1,3) ve 2349'u ise erkek (%98,7) vericilerden oluşmaktadır. Bu vericilerin yaş ortalaması 35,7 (18–64) yıldır. Toplamda 4352 kan vericisinin 171'ini kadın (% 3,9), 4181'ini erkek (%96,1) kan vericileri oluşturmakta ve yaş ortalaması 35,6 (18–64) yıldır. EÜTF'de başvuran kadın oranı MÜTF oranından oldukça fazladır. Bali ve arkadaşlarının yaptığı çalışma EÜTF ile benzerlik göstermekte iken, Taş ve arkadaşların yaptığı çalışmadaki cinsiyet oranları MÜTF'deki oranlara yakındır. Bu çalışmada iki üniversitenin ortalaması diğer çalışmalardaki ortalamalar ile uyumludur. Ancak çalışmalardaki veriler tüm sağlıklı kadın vericilerdeki durumu yansıtmamaktadır. Gerek sosyal, gerekse hemoglobin değerlerinin düşük olması nedeniyle sağlıklı kadın vericilerin yüzdesi oldukça düşük oranlardadır. Gönüllü kan bağışı kampanyaları ve eğitim düzeyinin artması ile kadın kan vericisi oranlarının yükseleceği öngörülmektedir. Toplum bilincinin geliştirilmesi, gönüllü ve güvenli kan vericilerinin sayısının artması ile kan güvenliğindeki riskler de azalacaktır. Bu çalışmada ayrıca QCMD örnekleri diğer testlerle paralel çalışılmış ve testin kendi içinde ve testler arasında tekrar edilebilirliği uygun bulunmuştur.

Ülkemizdeki kan merkezlerinin verileri incelendiğinde, asker kan vericilerinde 1985–2000 yılları arasında 94.232 vericinin 6973'ünde (%7,4), 1996–2003 yılları arasında ise 155.999 vericinin 6556'sında (%4,2) HBsAg pozitifliği saptanmıştır. Bu iki veri arasında

2000 yılından sonra HBsAg pozitifliğinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma dikkati çekmektedir ($p<0,05$). Sivil kan vericilerinde ise HBsAg, 1985–1999 yılları arasında 755.271 vericinin 39.274’ünde (%5,2) pozitif olarak saptanırken, 2000–2003 yılları arasında 1.046.135 vericinin 31.119’unda (%2,97) HBsAg pozitif bulunmuştur (50).

Ülkemizde çeşitli illerde yapılan çalışmalarda kan vericilerindeki HBsAg pozitifliklerine bakılacak olursa, Aydın bölgesinde 1993–2000 yılları arasında 22.439 vericinin taranması sonucu %1,85 oranında HBsAg pozitifliği saptanmıştır (133). Isparta bölgesi kan vericilerinde, 1998–2001 yılları arasında 26.335 vericide %3,79 oranında HBsAg pozitifliği bildirilmiştir (134). Kahramanmaraş’ta 2003–2005 yılları arasında yapılan çalışmada, 4107 kan vericisinde HBsAg pozitifliği %1,26 olarak bulunmuştur (135). Malatya Devlet Hastanesi’nde kan vericilerinde yapılan bir çalışmada, HBsAg pozitifliği 2006 yılı verisine göre %1,8 olarak bulunmuştur (136). Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Kan Merkezi ve Diyarbakır Kızılay Kan Merkezi’ne başvuran 137.934 kan vericisinde HBsAg pozitifliği %4,27 olarak saptanmıştır (137). MÜTF Hastanesi Kan Merkezi’nde 1999–2000 yılları arasında 1505 kan vericisinde HBsAg pozitifliği %4,1 olarak saptanmıştır (138). İzmir Tepecik Eğitim ve Araştırma Hastanesi Kan Merkezi’ne 2000–2006 yılları arasında başvuran 61.409 kan vericisinde HBsAg pozitifliği %2 olarak bulunmuştur (139).

Bu çalışmadaki merkezlere, Nisan 2010 ile Ocak 2011 arası EÜTF Kan Merkezi’ne 16.968, MÜTF Kan Merkezi’ne 10.298 kan vericisi başvurmuştur. Başvuranların EÜTF’de 98’i (%0,5), MÜTF’de 200’ünde (%1,94) HBsAg pozitifliği saptandığı için çalışma kapsamına alınmamıştır. Kriterlere uygun HBsAg negatif 4352 gönüllü kan vericisi çalışmaya dahil edilmiştir. HBsAg pozitiflik ortalaması diğer çalışmalar göz önüne alındığında Türkiye’de elde edilmiş diğer çalışma verilerinden düşük bulunmuştur. Ülkemizde HBV aşısı 1998 yılında rutin aşı şeması içinde yerini almıştır. Zorunlu aşı uygulaması ile HBV görülme sıklığının azalması beklenmektedir. 1998’den sonra doğan çocuklar beş yıl içinde kan verici olmaya başlayacaklardır. Bunun da kan vericiler arasındaki HBsAg pozitifliğini olumlu yönde azaltması beklenmektedir.

Sertöz ve arkadaşlarının yaptığı çalışma sonucunda tekrarlayan kan bağışı yapanlarda HBsAg pozitifliği oranlarını bağış sayısı 0–4 olanlarda %2,7, 5–9 olanlarda %1,6 ve 10 ve üzeri olanlarda %0,4 olarak bulunmuştur (140). Chyang’ın ABD’de yaptığı bir çalışmada, 6.137.478 kan vericisinde HBsAg pozitifliği ilk kez kan bağışında bulunanlarda %0,06, tekrarlayan gönüllü kan vericilerinde ise %0,002 olarak bulunmuştur (141). Almanya’da

1997–2002 yılları arasında ilk kez kan bağışı yapanlarda 1997 yılında $175,3/10^5$, 2002 yılında $164,1/10^5$ olan oranlar aynı yıllarda tekrarlayan gönüllü bağışçılarda 1997’de $1,4/10^5$, 2002’de $1,2/10^5$ olarak bildirilmiştir (142). Bu çalışmalar tekrarlayan kan vericilerinin aslında güvenli kan vericisi olduğunun kanıtlarındandır. Gönüllü kan vericisi her zaman güvenli olmadığı düşünülmektedir. Önemli olan, kan vericisinin sorgulama formunu doğru olarak doldurmasıdır. Ancak, bu durum ülkemizde çeşitli baskılar nedeniyle her zaman mümkün olamamaktadır. Güvenli kan için kan vermeye gönüllü bireyler eğitilmeli, düzenli olarak kan vermesi sağlanmalıdır. Böylece yönlendirilmiş kişilerin (kan ihtiyacı olan bir hastanın yakınları tarafından sağlanan bağışçıların) sayısı en aza indirilerek kan güvenliği artırılabilir. Güvenli kan, güvenli bağışçı ile başlamakla beraber, transfüzyon stratejilerinin iyileştirilmesi, transfüzyonların kısa ve uzun vadeli komplikasyonlarının geri bildirim ve izlemi, bu çerçevede kan güvenliğini artırıcı önlemlerin alınması sağlanarak gerçekleştirilebilir.

Tüm taramalara rağmen HBV açısından riskin yüksek olması NAT üzerine çalışmalara neden olmuştur. Ülkemizde de bu konuda çok veri sayıda araştırma mevcuttur.

Türk Kızılay Kan Merkezi Şubat 2007–Eylül 2008 yılında 18.200 kan vericisinin 314’ünde HBsAg pozitif (%1,72) saptamıştır. 17.886 HBsAg negatif vericiye tek tek NAT (Tigris-Chiron) uygulaması sonucunda pozitif örnekler çift olarak tekrar çalışılarak biri pozitif bulunan örnekler pozitif kabul edilmiştir. Bu çalışmanın sonucunda 11 HBV-DNA pozitifliğine ($1/1626$, %0,06) rastlanmıştır (143). Bu çalışmadaki tek tek NAT yönteminin (Tigris-Chiron) duyarlılığı 2,1 iü/mL’dir (144).

Kemahlı ve arkadaşlarının 7372 kan vericisinde yaptığı çalışmada 149 vericide HBsAg pozitif (%2) bulunmuştur. HBsAg negatif vericilere laboratuvar tasarımlı MP-NAT 8’li ile yapılan HBV-DNA testi sonucunda, iki vericide HBV-DNA pozitif (%0,03) örnek tespit etmişlerdir. NAT’ın duyarlılığı 100 genom/mL’dir (145).

Taş ve arkadaşlarının çalışmasında, 2500 HBsAg negatif kan vericisinden 401’inde anti-HBc pozitif olarak tespit edilmiş olup, bunlardan da anti-HBe/anti-HBc pozitif 45 verici (36’sı izole anti-HBc pozitif), anti-HBs/anti-HBe pozitif 116 verici ve anti-HBs/HBeAg pozitif olan 8 verici olmak üzere toplam 169 verici HBV-DNA (Sacace Biotechnologies HBV Real-TM Quant kit, İtalya) araştırılmak üzere çalışmaya alınmıştır. Çalışmaya alınan anti-HBs pozitif 124 vericinin 32’sinde (%25,8), anti-HBe/anti-HBc pozitif 45 vericinin 3’ünde (%6,6), izole anti-HBc pozitif 36 örneğin 2’sinde (%5,5), 161 HBeAg negatif vericinin 32’sinde

(%19,8), 116 HBeAg negatif/anti-HBe pozitif vericinin 29'unda (%25), toplam 125 anti-HBe pozitif vericinin de 30'unda (%24) HBV-DNA pozitif olarak bulunmuştur (132).

Bal ve arkadaşlarının çalışmasında, 9282 HBsAg negatif kan vericisi örneğinde 1679 anti-HBc pozitifliği (%18) ve bunların 218'inde (%2,7) izole anti-HBc saptanmıştır. Anti-HBc pozitif örnekler gerçek zamanlı PCR yöntemi ile tek tek NAT (Qiagen, Artus 3000, Almanya) uygulamasından sonra bir örnekte (%0,45) HBV-DNA saptanmıştır. Bu çalışma kapsamında, 8333 transfüzyonda bir HBV-DNA pozitifliği % 0,012 bulunmuştur (146).

Shang ve arkadaşlarının çalışmasında, HBsAg negatif 41.301 gönüllü vericide başlangıçta 8'li havuzlarda gerçek zamanlı PCR (ABI 7300 Real-Time PCR system, Applied Biosystems, ABD) uygulanmıştır. Kullandıkları testin analitik duyarlılığı 18,8 iü/mL'dir. İki örnek pozitif sonuç vermiştir. Pozitif örnekler doğrulanmak üzere tekrar gerçek zamanlı farklı bir sistemle çalışılarak aynı pozitif sonuç bulunmuştur (Cobas Taqman PCR, Roche Molecular Diagnostics, ABD). Pozitif kan vericileri haftalık olarak tekrar çağrılarak viral yükleri takip edilmiştir. Vericilerden birinin viral yükü (112 iü/mL) belirlenmiştir. Düşük viral yükü nedeniyle genotiplendirilmesi yapılamamıştır. Diğer kan vericinin sorgulanması üzerine kişinin iki yıl önce HBV enfeksiyonu geçirip lamivudin tedavisi aldığı öğrenilmiştir. Kişinin HBsAg'si negatifleşmiş fakat iki takip kanında da HBV viral yük (2750 ve 2860 iü/mL) yüksek saptanıp genotiplendirilmesi yapılmış ve genotip B bulunmuştur. Böylece bu çalışmada 1/20.650 HBV geçişi saptanmıştır (147).

Yang ve arkadaşlarının çalışmasında ise, 10.290 kan vericisinin 49'u (%0,47) HBsAg pozitif bulunmuştur. HBsAg negatif 4179 örneğe tek tek gerçek zamanlı PCR (Chiron Procleix Ultrio Assay, ABD) uygulanmıştır. Testin analitik duyarlılığı 0,31-40 iü/mL'dir. Örneklerin 10 tanesi pozitif bulunmuş, alternatif bir PCR (NGI HBV UltraQual, ABD) ile bunların 9 tanesi pozitif olarak değerlendirilmiştir. HBsAg negatif olan 6044 örneğe ise 4'lü havuzlarda PCR (Chiron Procleix Ultrio Assay, ABD) uygulanmış ve 3 tanesi pozitif saptanmıştır. Bu örnekler de alternatif PCR (NGI HBV UltraQual, ABD) uygulanmasında hepsi pozitif olarak bulunmuştur (148).

Bu çalışmada da HBsAg negatif bulunan 4352 kan vericisinde başlangıçta iki adet pozitiflik saptanmış ancak aynı yöntemle ve alternatif diğer yöntemlerle pozitiflikleri doğrulanamamıştır. Sonuç olarak örneklerde pozitifliğe rastlanmamıştır. Ancak gizli HBV enfeksiyonunda örneklerde düşük DNA pozitiflikleri bulunmaktadır. Bu örneklerde de HBV-DNA düzeyleri düşüktür. Bu durum örneklerin yinelenen testlerde pozitif bulunma olasılığını

da düşürmektedir. Ayrıca bu tip kan vericilerinde düşük düzeyler nedeniyle havuzlama yöntemlerinden de kaçınılmalıdır. Yang ve arkadaşlarının çalışmasında da aynı kan verici popülasyonunda tek tek NAT ve havuz NAT ile DNA pozitifliğinde istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur. Bu nedenle, gizli HBV'de HBV-DNA düzeyi düşük olduğu için duyarlı testler kullanılması gerekmektedir. Gizli HBV enfeksiyonunda HBV-DNA miktarı düşüklüğünden dolayı tekrarlayan PCR pozitifliklerine her zaman rastlanmayabilir. Bu yüzden özellikle kan merkezlerinde gizli HBV saptanmasında NAT uygulanacaksa havuzlama yöntemi yerine duyarlılığı yüksek tek tek uygulanan moleküler testler tercih edilmelidir. Ayrıca moleküler biyolojik yöntemler tamamen kapalı sistemde bile uygulansa, kontaminasyona açık olup bu nedenle PCR çalışma kurallarına tam uyulması gerekmektedir. Ayrıca test sonuçlarının doğruluğunu göstermek için aynı ve farklı yöntemler uygulanarak doğrulaması yapılmalıdır.

Karakoç ve arkadaşlarının çalışmasında, HBsAg negatif 4484 bağışçıya havuzlama yöntemi ile 187 adet havuz (186'sı 24'lük, bir tanesi 20 örnekli havuz) PCR (Robogene Hepatitis B Virus Quantification Kit, Al Roboscreen GmbH, Almanya) uygulanmıştır. Üç havuzda pozitiflik bulunmuş ve bunlardan ikisi tekrarlayan pozitif olarak saptanmıştır. Tekrarlayan iki havuzdan birinde tek, diğerinde iki örnekte pozitif sonuç elde edilmiştir. Bu örneklerle testler tekrar uygulandığında birisi negatif diğer ikisi pozitif bulunmuştur. İki pozitif örnek daha sonra EIA ile negatif bulunurken bağışçılardan alınan yeni örneklerde de negatif bulunmuştur. Pozitif sonuç elde edilmemiştir. PCR'da yalancı pozitiflik oranı %0,04 olarak bildirilmiştir (149).

Bali ve arkadaşlarının çalışmasında HBsAg negatif 3000 kan vericisinde 10'lu havuzlara gerçek zamanlı PCR testi (Fluorion HBV QNP 2.0, Almanya) uygulanmış ve 17 havuzda pozitiflik saptanmıştır. Pozitif havuzlardaki serumların tek tek çalışılması sonucunda beş örnekte pozitif sonuç bulunmuştur. HBV serolojilerinin değerlendirilmesi ve yeni serum örneklerine tekrar gerçek zamanlı PCR uygulanması ile pozitif sonuca rastlanmamıştır. Yalancı pozitiflik ilk çalışmada %5,66, ikinci çalışmada %0,16 olarak bildirilmiştir (131).

Yapılan araştırmalarda havuzlama NAT duyarlılığı tek tek NAT'tan düşük olmasına karşın, tek tek NAT'larda yalancı pozitiflik oranları (%0,13–0,85) daha yüksektir. Bu durum, tek tek NAT testi ile bir kez pozitif bulunan örneklerin başka bir testle doğrulanmamasından kaynaklanmaktadır. Bunun tersine, havuz NAT'lar ile pozitif sonuç elde edildiğinde bu sonucun hangi serumdan kaynaklandığını saptayabilmek için havuzu oluşturan tüm serumlar

yeniden tek tek test edilmektedir. Kan verici kaybını azaltmak üzere günümüzde standart bir algoritma bulunmamaktadır. Farklı ülkelerde, sadece NAT tekrarı, NAT tekrarı ve tanımlayıcı (aynı firma) NAT veya NAT tekrarı ve farklı NAT şeklinde yaklaşımlar mevcuttur (150).

Katsoulidou ve arkadaşlarının teorik olarak pencere dönemi enfeksiyonlu hastaların düşük viral yükünün benzeri olarak düşündüğü deneysel çalışmasında antiviral tedavi alan 121 HIV, 138 HCV ve 190 HBV enfeksiyonlu hasta örneklerini Procleix Ultrio testi ile pozitif saptarken, tanımlayıcı başka bir testle HIV ve HCV'nin ancak %50'si HBV'nin ise %16'sı pozitif bulunmuştur (151).

Sertöz ve arkadaşlarının çalışmasında, 1461 kan vericisinin 983'ünün HBsAg, anti-HBc, anti-HBs testleri negatif (%67,5); 173'ünün sadece anti-HBs testi pozitif (%11,9); 270'sinin HBsAg testi negatif, anti-HBc ve anti-HBs testleri pozitif (%17,8); 24'ünün sadece anti-HBc testi pozitif (%2,2); 11'inin ise hem HBsAg hem de anti-HBc (%0,6) testleri pozitif bulunmuştur. Kan vericileri arasında HBV enfeksiyonuna açık olanların oranı yüksek olduğu ve HBV aşılama oranının %11,9 olduğu saptanmıştır. Anti-HBc kan vericilerin %20,6'sında pozitif olup, bunların % 86,4'ü HBV enfeksiyonuna karşı bağışık olduğu saptanmıştır. Anti-HBc pozitif olanların sadece %2,9'u HBsAg pozitif olarak belirlenmiştir (152).

Kan vericilerinde anti-HBc göstergesinin araştırılması kanın güvenliğini arttırmaktadır. Ancak %2 ve altında HBV enfeksiyonu prevalansı olan bölgelerde bu göstergenin bakılması önerilmektedir. Anti-HBc testinin özgüllüğü yüksek olmadığı için ve mutlaka doğrulanması gerekmektedir. Anti-HBc pozitif örneklerin %79-90'ında anti-HBs pozitif bulunmaktadır. Anti-HBc ile birlikte anti-HBs pozitifliği 100 miü/mL üzerinde ise kanın kullanılması önerilmektedir (153). Japonya'da 1989'dan beri kan vericilerinde HBsAg'si negatif olanlara ayrıca anti-HBc ve anti-HBs titreleri bakılmaktadır. Anti-HBc $>2^5$ hemaglutinasyon inhibisyon (HI) titresinde saptananların anti-HBs <200 miü/mL ise vericinin kanı kabul edilmemektedir. Anti-HBs >200 miü/mL ise MP-NAT ile HBV-DNA sonucuna göre verici kanı transfüzyon için kullanılmaktadır (154).

Transfüzyon biliminin güvenliği için kan merkezlerinde ulusal denetim ve düzen kurulması gerekmektedir. Hemovijilans kan bağışçısı veya alıcısında ciddi yan etki veya beklenmeyen olay veya tepkiler ile ilgili bir dizi organize sürveyans işlemleridir. ABD'de merkezi bir hemovijilans sistemi bulunmamaktadır. Tek zorunluluk Food and Drug Administration (FDA) merkezine transfüzyon sebepli ölümleri bildirmektir. İngiltere, bütün ülkeden gelen gönüllü bildirimleri Transfüzyonun Ciddi Zararları (SHOT) adı verilen bir

enstitüde toplamaktadır. Fransa’da Etablissement Francais du Sang (EFS) enstitüsü zorunlu olarak bildirimleri toplar, Almanya’da Paul-Ehrlich-Institut (PEI) tarafından yetkilendirilmiş merkezler zorunlu olarak farmakovijilans sistemi içinde transfüzyon yan etkilerini bildirirken, komplikasyonları bildirmemektedirler. İtalya’da Ulusal Sağlık Enstitüsü (ISS) viral pozitiflik verilerini toplamaktadır (155).

Transfüzyonda kan güvenliğinde infeksiyon riskini sıfıra indirebilmek için gelecekte yapılacak çeşitli yöntemler arasında duyarlı büyük havuzlar, patojen inaktivasyon yöntemleri, NAT ve patojen inaktivasyonu, mikroyonga, kütle spektrometri ve suni kan gibi alternatif yöntemler ile ilgili çalışmalar devam etmektedir.

Günümüz verileri değerlendirildiğinde HBV ülkemiz kan merkezlerinde öncelikli sağlık sorunu gibi durmamaktadır. Ülkemizde NAT uygulamalarına geçmeden önce transfüzyon biliminin güvenliği açısından Ulusal Sağlık politikamızda öncelikleri belirlememiz önemlidir. Bunun yanında transfüzyon komplikasyonlarını takip sistemlerini (hemovijilans) zorunlu olarak bir merkezde toplamamız gerekmektedir. Toplumu sağlıklı kılmak üzere hastalıkların görülme sıklığını azaltıcı tedbirler alınmalıdır. Vericiden alınan kanların tam olarak laboratuvar koşullarında güvenli olup olmadığına karar verebilmek için laboratuvar hatalarını önleyici tedbirler alınmalıdır. Bu tedbirler laboratuvar da otomasyon, kalite kontrol ve akreditasyonun sağlanması ile gerçekleşir. Özellikle güvenli kan sağlamada düzenli gönüllü kan vericileri önemlidir. Bunun için düzenli kan verici kazanım kampanyaları düzenlenmelidir.

6. SONUÇ

Bu çalışmada, EÜTF ve MÜTF kan merkezlerinden toplanan 4352 HBsAg negatif kan vericisinin plazmalarında gerçek zamanlı PCR yöntemi ile HBV-DNA bakılarak gizli HBV enfeksiyonu araştırılmıştır. Pozitif saptanan iki örneğin aynı ve alternatif yöntemle yapılan testleri sonucunda pozitiflikleri doğrulanamamıştır. Bu nedenle tüm örnekler negatif kabul edilmiştir. Bu çalışmada kullanılan ID-NAT yönteminin duyarlılığı yüksek olmasına karşın maliyet-etkin olmaması, deneyimli personel gerektirmesi gibi nedenlerle kan merkezlerinde rutin olarak uygulanması zordur. Örneklerin toplandığı her iki ilde de Türkiye geneline göre HBsAg taşıyıcılık oranlarının düşük olması DNA pozitiflik oranlarını etkilemiştir. Bunun yanında ülkemizin öncelikleri gözönüne alınarak kan merkezlerinde hepatit B taramalarında HBV-DNA'nın moleküler tekniklerle bakılmasından önce farklı serolojik algoritmalar üzerinde çalışılmasına gerek olduğu sonucuna varılmıştır.

7. ÖZET

Giriş ve Amaç: Kan yoluyla bulaşan infeksiyon etkenlerinin geçişi sağlıklı görünen kan vericilerinden yapılan infekte transfüzyonlar sonucunda olmaktadır. Kan ve kan ürünlerinde güvenlik, sağlıklı kan verici seçimi ile başlar. Uygun kan verici seçiminden sonra kan yoluyla bulaşan infeksiyon etkenlerini aramaya yönelik testler uygulanır. Kan yoluyla bulaşan infeksiyon etkenleri arasında görülme sıklığı ve neden olduğu hastalıklar hepatit B virüsünü (HBV) önemli kılmaktadır. Hepatit B virüsü yüzey antijeni (HBsAg) prevalansı kan vericilerinde %0,1 ile %25 arasında değişmektedir. Kan merkezlerinde kullanılan serolojik testlerin duyarlılığının artırılmasına rağmen “güvenli kan” için 2006 yılından sonra transfüze edilecek kana HBV’yi saptayan nükleik asit testi (NAT) uygulamaları gündeme gelmiştir. Pencere dönemi dışında HBsAg negatif ve kronik HBV tanısı almayan gizli HBV infeksiyonunun tanısını HBV nükleik asit testi (NAT) sağlamaktadır. Ayrıca NAT ile yapılan çalışmalarda küçük havuzlarda NAT (MP-NAT)’ların duyarlılığının düşük olması nedeniyle tek tek örneklerle uygulanan NAT (ID-NAT) uygulamaları ön plana gelmiştir.

Bu çalışmada MP-NAT’a göre duyarlılığı daha yüksek olan ID-NAT ile HBsAg negatif kan vericilerinin araştırması planlanmıştır. Ayrıca ülkemizde uygulanmakta olan kan vericisi tarama testlerinin yeterli olup olmadığı, ülkemiz koşullarını da dikkate alarak yeni bir düzenleme getirilip getirilemeyeceğini irdelemek ve olası yeni bir algoritma oluşturulmasına katkıda bulunabilmek amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi (EÜTF) ve Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi (MÜTF) Sağlık Araştırma Uygulama Hastanesi Kan Merkezi’ne Nisan 2010 ile Ocak 2011 tarihleri arasında başvuran 18-65 yaş arası (ortalama: 35,6 yıl), toplam 4352 HBsAg negatif gönüllü kan vericisi çalışmaya alındı. Kan vericilerinin 1971’i EÜTF Kan Merkezi’nden, 2381’i MÜTF Sağlık Araştırma Uygulama Hastanesi Kan Merkezi’nden toplandı. Kan vericilerinin örneklerinde HBV-DNA’yı saptamak amacıyla gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) testi uygulandı. Çalışmada QCMD kalite kontrol örnekleri aynı test ve farklı test ile çalışıldı.

Bulgular: 4352 kan vericisinin plazmalarına gerçek zamanlı PCR yöntemi ile HBV-DNA araştırılması sonucunda iki pozitif sonuç bulundu. İki pozitif sonuç aynı yöntemle iki kez ve

farklı alternatif yöntemlerle doğrulamak amacıyla tekrarlandı. Tekrarlanan örneklerin negatif bulunması sonucunda örneklerin tümünde HBV-DNA negatif olarak değerlendirildi.

Tartışma: Bu çalışmada HBsAg negatif bulunan 4352 kan vericisinde başlangıçta iki adet pozitiflik saptanmış ancak aynı yöntemle ve alternatif diğer yöntemlerle pozitiflikleri doğrulanamamıştır. Bu yüzden örneklerin tümü negatif olarak kabul edilmiştir. Ancak gizli HBV olgularının çoğunluğunda, örneklerde DNA pozitiflikleri düşük düzeyde bulunmaktadır. Bu çalışmada pozitif bulunan örneklerde de düzeyler düşüktür. Bu örneklerin tekrar pozitif bulunması olasılığı da bu nedenle düşüktür. Günümüz verileri değerlendirildiğinde HBV ülkemiz kan merkezlerinde öncelikli sağlık sorunudur. Ülkemizde NAT uygulamalarına geçmeden önce transfüzyon biliminin güvenliği açısından Ulusal Sağlık politikalarında önceliklerin belirlenmesi önemlidir.

Anahtar kelimeler: Kan vericisi, Hepatit B virüs, HBV-DNA, NAT, gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu, gizli HBV enfeksiyonu

8. SUMMARY

Introduction and aim: Transfusion transmitted infection agents are caused by infected transfusions from apparently healthy blood donors. Safety on blood and blood products starts with the determination of a healthy blood donor. The basic and most important key to attain a safe blood is the careful selection of blood donors. Following the selection of an appropriate donor, tests are conducted to look for blood transmitted infection factors. Diseases and the frequency it is spotted among the agents for blood transmitted infections make hepatitis B virus (HBV) further important. Rates of HBV surface antigen (HBsAg) prevalence may greatly vary from %0,1 to %25 among blood donors. HBV-NAT enables detection of HBsAg negative occult HBV infections outside the window period. It is also apparent that the sensitivity of mini-pool NAT (MP-NAT) is insufficient, so individual NAT (ID-NAT) technics have come into prominence. It is important to acknowledge that HBsAg screening on donors with occult HBV infections do not suffice in terms of safe transfusion

In our study we aimed to explore HBsAg negative blood donors through individual NAT (ID-NAT), which has a higher sensitivity level with respect to MP-NAT. This study also aims to reveal whether donor screenings are sufficient, whether new regulations are viable considering the conditions of our country, and to make contributions for a possible new algorithm.

Material and Method: Study was conducted with a total of 4352 HBsAg negative volunteer-donors between the ages of 18-65 (mean 35,6 years), admitted to the Blood Transfusion Center of Ege University Faculty of Medicine (EUTF) and Mersin University Faculty of Medicine (MUTF) Medical Research and Application Hospital between April 2010 and January 2011. 1971 of the donors were collected from Blood Transfusion Center of EUTF, while 2381 from the latter. Donors were tested with realtime polymerase chain reaction (RT-PCR). QCMD quality control samples were studied with the same test and different test.

Results: Following HBV-DNA screening of the plasmas from 4352 donors through RT-PCR, two positive results were found. The test was repeated on the two positive samples with both

the same method and with an alternative method. Repeated tests resulted negative, therefore all the samples were thought to be negative.

Discussion: In this study, out of 4352 blood donors with HBsAg negative, an early detection of two positivity was achieved, however the repetition of the same test and alternative tests failed to verify positivity. As a result, we detected no positivity in our samples. However, DNA positivities in the majority of cases diagnosed as occult HBV infection have low levels of positivity. In this study, our positive samples also displayed low levels. Therefore, the probability of finding positivity again in these samples is very low.

Recent data show that HBV stand out as a primary health issue in the blood transfusion centers in our country. It is imperative that priorities should be determined in the national health policies in terms of reliability of transfusion as a science before proceeding to NAT applications in our country.

Keywords: Blood donor, Hepatitis B virus, HBV-DNA, NAT, realtime polymerase chain reaction, occult HBV infection.

9. BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

Araştırmanın Adı: Ege Üniversitesi ve Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Kan Merkezlerine başvuran kan vericilerinde HBsAg negatifliğinde HBV-DNA'nın araştırılması

LÜTFEN DİKKATLİCE OKUYUNUZ !!!

Bu çalışmaya katılmak üzere davet edilmiş bulunmaktasınız. Bu çalışmada yer almayı kabul etmeden önce çalışmanın ne amaçla yapılmak istendiğini anlamanız ve kararınızı bu bilgilendirme sonrası özgürce vermeniz gerekmektedir. Size özel hazırlanmış bu bilgilendirmeyi lütfen dikkatlice okuyunuz, sorularınıza açık yanıtlar isteyiniz.

ÇALIŞMANIN AMACI NEDİR?

Kan Bankalarının başlıca görevi güvenli kan ve kan ürünü sağlamaktır. Çalışmamızın konusu olan B tipi sarılık için HBsAg testi zorunlu tarama testidir. Kan vericiler eğer pencere döneminde iseler bu test ile pozitif saptanamayabilirler. Bu nedenle daha güvenli kan verebilmek adına ek testlere ihtiyaç olup olmadığı araştırılacaktır.

KATILMA KOŞULLARI NEDİR?

Gönüllü kan verici olabilme koşullarına uyum

NASIL BİR UYGULAMA YAPILACAKTIR?

Rutin kan alımı sırasında ek bir tüp kan alınacaktır. Ek bir tedavi ya da invaziv girişim yapılmayacaktır.

SORUMLULUKLARIM NEDİR?

Araştırma ile ilgili olarak donör sorgulama formunu eksiksiz ve doğru doldurmak.

Bu koşullara uymadığınız durumlarda araştırmacı sizi uygulama dışı bırakabilme yetkisine sahiptir.

KATILIMCI SAYISI NEDİR?

Araştırmada yer alacak gönüllülerin sayısı 10.000'dir.

KATILIMIM NE KADAR SÜRECEKTİR?

Bu araştırmada kan verdikten sonra herhangi bir başka işlem yapılmayacaktır. Proje süresi 24 aydır. Alınan örnekler başka araştırmada kullanılmayacaktır.

ÇALIŞMAYA KATILMA İLE BEKLENEN OLASI YARAR NEDİR?

Bu araştırmada sizin için beklenen yararlar: B tipi sarılıkla ilgili ayrıntılı testleriniz yapılacaktır. Aşılı, geçirilmiş bağışık, kronik olup olmadığınız anlaşılabilecektir.

ÇALIŞMAYA KATILMA İLE BEKLENEN OLASI RİSKLER NEDİR?

Kan alma işlemi ile ilgili riskler arasında bayılma, ağrı ve/veya morarma sayılabilir. Ender durumlarda iğne deliğinin yerinde enfeksiyon ya da küçük bir kan pıhtısı olabilir. Olası bir

soruna karşı gerekli tedbirler tarafımızdan alınacaktır. Ancak tüm kan vericilerden de kan alındığından kan merkezine gelen çalışma kapsamındaki kişilerde de bu riskler mevcuttur.

ARAŞTIRMA SÜRECİNDE BİRLİKTE KULLANILMASININ SAKINCALI OLDUĞU BİLİNER İLAÇLAR/BESİNLER NELERDİR?

Çalışma süresince birlikte kullanımının sakıncalı olduğu ilaç ve besinler yoktur.

HANGİ KOŞULLARDA ARAŞTIRMA DIŞI BIRAKILABİLİRİM?

Hemolizli, yüksek kolesterolü kanlar testlerin sonucunu yanlış etkileyeceğinden çalışma dışı bırakılır.

DİĞER TEDAVİLER NELERDİR?

Olası B tipi sarılık durumunda kan vericiler tedavi alıp almama kararı açısından tarafımızdan klinisyene yönlendirilecektir.

HERHANGİ BİR ZARARLANMA DURUMUNDA YÜKÜMLÜLÜK/SORUMLULUK KİMDEDİR VE NE YAPILACAKTIR?

Araştırmaya bağlı beklenen bir zarar ya da masraf yoktur.

ARAŞTIRMA SÜRESİNCE ÇIKABİLECEK SORUNLAR İÇİN KİMİ ARAMALIYIM?

Uygulama süresi boyunca, zorunlu olarak araştırma dışı ilaç almak durumunda kaldığınızda Sorumlu Araştırmacıyı önceden bilgilendirmek için, araştırma hakkında ek bilgiler almak için ya da çalışma ile ilgili herhangi bir sorun, istenmeyen etki ya da diğer rahatsızlıklarınız için 3903303 no.lu telefonda Dr.Arzu Bayram’a başvurabilirsiniz.

ÇALIŞMA KAPSAMINDAKİ GİDERLER KARŞILANACAK MIDIR?

Size ve bağlı bulunduğunuz sosyal güvenlik kurumuna ekstra bir yük getirmeyecektir.Destekleyici tarafından araştırma giderleri karşılanacaktır.

ÇALIŞMAYI DESTEKLEYEN KURUM VAR MIDIR ?

Çalışmayı destekleyen kurum Ege Üniversitesi Araştırma projeleri fonsaymanlığıdır (AREL).

ÇALIŞMAYA KATILMAM NEDENİYLE HERHANGİ BİR ÖDEME YAPILACAK MIDIR?

Bu araştırmada yer almanız nedeniyle size hiçbir ödeme yapılmayacaktır.

ARAŞTIRMAYA KATILMAYI KABUL ETMEMEM VEYA ARAŞTIRMADAN AYRILMAM DURUMUNDA NE YAPMAM GEREKİR?

Bu araştırmada yer almak tamamen sizin isteğinize bağlıdır. Araştırmada yer almayı reddedebilirsiniz ya da herhangi bir aşamada araştırmadan ayrılabilirsiniz.

Araştırmanın sonuçları bilimsel amaçla kullanılacaktır.

KATILMAMA İLİŞKİN BİLGİLER KONUSUNDA GİZLİLİK SAĞLANABİLECEK MİDİR?

Size ait tüm tıbbi ve kimlik bilgileriniz gizli tutulacaktır ve araştırma yayınlansa bile kimlik bilgileriniz verilmeyecektir, ancak araştırmanın izleyicileri, yoklama yapanlar, etik kurullar ve resmi makamlar gerektiğinde tıbbi bilgilerinize ulaşabilir. Siz de istediğinizde kendinize ait tıbbi bilgilere ulaşabilirsiniz

Çalışmaya Katılma Onayı:

Yukarıda yer alan ve araştırmaya başlanmadan önce gönüllüye verilmesi gereken bilgileri gösteren iki sayfalık metni okudum ve sözlü olarak dinledim. Aklıma gelen tüm soruları araştırmacıya sordum, yazılı ve sözlü olarak bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Çalışmaya katılmayı isteyip istemediğime karar vermem için bana yeterli zaman tanındı. Bu koşullar altında, bana ait tıbbi bilgilerin gözden geçirilmesi, transfer edilmesi ve işlenmesi konusunda araştırma yürütücüsüne yetki veriyor ve söz konusu araştırmaya ilişkin bana yapılan katılım davetini hiçbir zorlama ve baskı olmaksızın büyük bir gönüllülük içerisinde kabul ediyorum. Bu formu imzalamakla yerel yasaların bana sağladığı hakları kaybetmeyeceğimi biliyorum.

Bu formun imzalı ve tarihli bir kopyası bana verildi.

GÖNÜLLÜNÜN		İMZASI
ADI & SOYADI		
ADRESİ		
TEL. & FAKS		
TARİH		

Velayet veya vesayet altında bulunanlar için veli veya vasiinin		İMZASI
ADI & SOYADI		
ADRESİ		
TEL. & FAKS		
TARİH		

AÇIKLAMALARI YAPAN ARAŞTIRICININ		İMZASI
ADI & SOYADI		
TARİH		

RIZA ALMA İŞLEMİNE BAŞINDAN SONUNA KADAR TANIKLIK EDEN KURULUŞ GÖREVLİSİNİN		İMZASI
ADI & SOYADI		
GÖREVİ		
TARİH		

10. KAYNAKLAR

1. Uluhan R. Güvenli kan. *Ankem Derg* 2007; 21(Ek2):142-145.
2. Kocazeybek B. Kan ve kan ürünleriyle bulaşan infeksiyonlar: Rutin tarama testleri ve moleküler tanı yöntemleri. *Cerrahpaşa Tıp Derg* 2003; 34(3):158-163.
3. Vengelen-Tyler. Technical Manual. 13. baskı. Bethesda. American Association of Blood Banks. 1999).
4. Bayık M. Güvenli Kan. *Damla, KMTD*. 2004; 59:10-12.
5. Allain JP, Stramer SL, Carneiro-Proietti ABF, Martins ML, Lopes da Silva AN, Ribeiro M, Proietti FA, Reesink HW. Transfusion-transmitted infectious diseases. *Biologicals* 2009; 37:71-77.
6. Laperche S, Pillonel J. Influence of epidemiological factors on blood transfusion. *ISBT Science Series* 2007; 2:78-84.
7. Ustaçelebi Ş, Ergünay K. Hepatit B virusun (HBV) moleküler virolojisi. Tabak F, Balık İ, Tekeli E (eds). *Viral Hepatit 2007*. 1. baskı. İstanbul: Viral Hepatitle Savaşım Derneği, 2005; 96-107.
8. Özdemir D, Kurt H. Hepatit B virüsü infeksiyonlarının epidemiyolojisi. Tabak F, Balık İ, Tekeli E. (eds) *Viral Hepatit 2007*. 1. baskı. İstanbul: Viral Hepatitle Savaşım Derneği, 2007; 108-117.
9. Allain JP, Reesink HW, Lucey C. A European perspective on the management of donors and units testing positive for hepatitis B virus DNA. *Transfusion* 2006; 46:1256-1258.
10. Allain JP. Occult hepatitis B virus infection: implications in transfusion. *Vox Sang* 2004; 86: 83-91.
11. Biswas R, Tabor E, Hsia CC, Wright DJ, Laycock ME, Fiebig EW. Comparative sensitivity of HBV NATs and HBsAg assays for detection of acute HBV infection. *Transfusion* 2003; 43:788-798.

12. Brojer E, Grabarczyk P, Liszewski G, Mikulska M, Allain JP, Letowska M. Characterization of HBV DNA positive/HBsAg negative blood donors identified in the Polish NAT screening program. *Hepatology* 2006; 44:1666-1674.
13. Roth WK. Hepatitis B and blood transfusion. *ISBT Science Series* 2007; 2:178-183.
14. Avcı İY, Turhan V, Çınar E. Kan nakli ile bulaşan enfeksiyon hastalıkları. *T Klin J Med Sci* 2000; 20:317-323.
15. Heyns ADP, Swanevelder JP, Lelie PN, Crookes RL, Busch MP. The impact of individual donation NAT screening on blood safety. *Vox Sang* 2006; 93(Suppl.1):203-208.
16. Zahn A, Li C, Danso K, Candotti D, Owusu-Ofori S, Temple J. Molecular characterization of occult hepatitis B in genotype E-infected subjects. *J Gen Virol* 2008; 89:409-418.
17. Satake M, Taira R, Yugi H, Hino S, Kanemitsu K, Ikeda H. Infectivity of blood components with low hepatitis B virus DNA levels identified in a lookback program. *Transfusion* 2007; 47:1197-1205.
18. Gerlich WH. Breakthrough of hepatitis B virus escape mutants after vaccination and virus reactivation. *J Clin Virol* 2006; 36(Suppl. 1):18-22.
19. Özsan M. HBV enfeksiyonunda mikrobiyolojik tanı. Tabak F, Balık İ, Tekeli E. (eds) *Viral Hepatit 2007*. 1. baskı. İstanbul:Viral Hepatitle Savaşım Derneği, 2005; 124-133.
20. Horvat RT, Tegtmeier GE, (Çeviren: İyigün CP, Avcı İY). Hepatit B ve D virüsleri. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA (eds). *Manual of Clinical Microbiology (Klinik Mikrobiyoloji)*, 9. baskı. Ankara, Atlas Kitapçılık, 2009:1641–1659.
21. Değertekin S. Viral hepatitin tarihine bir bakış. *Klinik Gelişim Derg* 1999; 12 Suppl 11-12: 1-4.
22. Vyas GN, Yen TSB. Hepatitis B virus – Biology, pathogenesis, epidemiology, clinical description, and diagnosis. In: Specter S. *Viral Hepatitis –Diagnosis, Therapy, and Prevention*. New Jersey: Humana Pres. 1999;35.
23. Kaplan PM, Greenman RL, Gerin JL, Purcell RH, Robinson WS. DNA polymerase associated with human hepatitis B antigen. *J Virol* 1973; 12:995-997.

24. Robinson WS, Clayton DA, Greenman RL. DNA of a human hepatitis B virus candidate. *J Virol* 1984; 14:384-388.
25. Heper Y. Transfüzyonda mikrobiyolojik tarama testleri. *ANKEM Derg*; 21:146-152.
26. Erensoy S. Hepatit B virüs (HBV) biyolojisi. 3. Ulusal Viroloji Kongresi Kitabı 2007; 156-158.
27. Hu X, Margolis HS, Purcell RH, Ebert J, Robertson BH. Identification of hepatitis B virus indigenous to chimpanzees. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97(4):1661-1664.
28. Takahashi K, Brotman B, Usuda S, Mishiro S, et al. Full genome sequence analysis of hepatitis B virus strains recovered from chimpanzees infected in wild: implications for an origin of HBV. *Virology* 2000; 267:58-64.
29. Robinson WS: Hepadnaviridae: Hepatitis B virus and hepatitis delta virus. In: Mandell GL, Douglas RG, Bennett JE (eds). *Principles and Practice of Infectious Disease*. 5 th ed. New York, Churchill Livingstone, 2000:1652-1685.
30. Seeger C, Zoulim F, Mason WS. Hepadnaviruses. In: Knipe DM, Howley PM. (eds) *Fields Virology*. 5th ed. Lippincott Williams & Wilkins, 2007; 2978-3029.
31. Yenen OŞ: Viral hepatitler. Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M.(eds) *İnfeksiyon Hastalıkları*. İstanbul, Nobel Kitapevleri Ltd. Şti 1996: 641-700.
32. Seeger C, Mason WS, Hepatitis B virus biology. *Microbiol Mol Bio Rev* 2000; 64(1):51-68.
33. Ergon C, Abacıoğlu H (çevirmenler). Hepatit virüsleri. In: PR Murray, KS Rosenthal, MA Pfaller, *Tıbbi Mikrobiyoloji (Medical Microbiology)*, 6. baskı. Ankara, Atlas Kitapçılık, 2010: 648-655.
34. Kıyan M. Viroloji. HBV enfeksiyonu. Kılıçturgay K. (Ed.), *Viral Hepatit* 98. 1998; 66–94.
35. Ustaçelebi Ş. ve ark. Viroloji. *Temel ve klinik mikrobiyoloji*, 1999; 18:871–877.
36. Kıyan M: Hepatit B virüsü. Kılıçturgay K, Badur S. (eds) *Viral Hepatit* 2001. 1. baskı, İstanbul: Viral Hepatitle Savaşım Derneği; 200; 85-120.
37. Bilgiç A, Özacar T Hepatit B virusu. Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M. (eds) *İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi Cilt 2*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 2002; 1350-1370.

38. Locarnini S, McMillan J, Bartholomeusz A. The hepatitis B virus and common mutants. *Semin Liver Dis* 2003; 23(1):5-20.
39. Serter D. Hepatit virusları ve viral hepatitler. *Virus, Riketsiya ve Klamidya Hastalıkları*. İstanbul, Nobel Tıp Kitapevleri. 1997:175-206.
40. Lee WM. Hepatitis B virus infection. *N Engl J Med* 1997; 337:1733-1734.
41. Moola N, Kew M, Abruthnot P. Regulatory elements of hepatitis B virus transcription. *J Viral Hepat* 2002; 9:323-331
42. Kidd-Ljunggren K, Miyakawa Y, Kidd AH. Genetic variability in hepatitis B viruses. *J Gen Virol* 2002; 83(6):1267-1280.
43. Sertozy RY, Erensoy S, Pas S, Ozacar T, Niesters H. Restriction fragment length polymorphism analysis and direct sequencing for determination of HBV genotypes in a Turkish population. *New Microbiol* 2008; 31(2):189-194.
44. Weber B. Genetic variability of the S gene of hepatitis B virus: clinical and diagnostic impact. *J Clin Virol* 2005; 32(2):102-112.
45. Echevarria JM, Avellon A. Hepatitis B virus genetic diversity. *J Med Virol* 2006; 78(Suppl 1):36-42.
46. Norder H, Couroucé AM, Coursaget P, Echevarria JM, Lee SD, Mushahwar IK, Robertson BH, Locarnini S, Magnus LO. Genetic diversity of hepatitis B virus strains derived worldwide: genotypes, subgenotypes, and HBsAg subtypes. *Intervirology* 2004; 47:289-309.
47. Arauz-Ruiz P, Norder H, Visona KA, Magnus LO. Molecular epidemiology of hepatitis B virus in Central America reflected in the genetic variability of the small S gene. *J Infect Dis* 1997; 176:851-858.
48. Ngui SL, Hallet R, Teo CG. Natural and iatrogenic variation in hepatitis B virus. *Rev Med Virol* 1999; 9:183-209.
49. Lau JYN, Wright TL. Molecular virology and pathogenesis of hepatitis B. *Lancet* 1993; 342: 1335-1340.
50. Mahoney FJ. Update on diagnosis, management, and prevention of hepatitis B virus infection. *Clin Microbiol Rev* 1999; 12:351–366.

51. Ganem D, Pollack JR, Tavis J. Hepatitis B virus revers transcriptase and its many roles in hepadnaviral genomic replication. *Infect Agent Dis* 1994; 3:85-93.
52. Hsia CC, Yuwen H, Tahor E. Hotspot mutations in Hepatitis B virus X gene in hepatocellular carcinoma. *Lancet* 1996; 348:625-626.
53. Chen WN, Oon CJ. Human hepatitis B virus mutants: significance of molecular changes. *FEBS Lett* 1999; 453(3):237–242.
54. Kılıçturgay K. Hepatit B virusunda (HBV) mutasyon ve getirdiği sorunlar. *Viral Hepatit Derg*, 1995; 1:1-7.
55. Thomas HC. Carman WF. Envelope and precore/core variants of hepatitis B virus. Martin PM, Friedman LS(Eds). *Viral Hepatitis. Gastroenterol. Clin N Amer.* 1994; 23: 499–514.
56. Moraes MT, Gomes SA, Niel C. Sequence analysis of pre S/S gene of hepatitis B virus strains of genotypes A, D, and F isolated in Brasil. *Arch Virol* 1996; 141:1763–1767.
57. Zanetti AR, Tanzi E, Manzillo G, Maio G, Sbreglia C, Caporaso N, Thomas H, Zuckerman AJ. Hepatitis B variants in Europe. *Lancet* 1988; 12:1132–1133.
58. Carman WF, Zanetti AR, Karayiannis P, Waters J, Manzillo G, Tanzi E, Zuckerman AJ, Thomas HC. Vaccine – induced escape mutant of hepatitis B virus. *Lancet* 1990; 336:325–329.
59. Thomas HC. The emergence of envelope and precore/core variants of Hepatitis B virus: the potential role of antibody selection. *J Hepatol* 1995; 22(Suppl 1):1-8.
60. Arens M. Methods for subtyping and molecular comprison of human viral genomes. *Clinical Microbiology Reviews* 1999; 12(4):612–626.
61. Lok ASF, McMahon BJ. Chronic Hepatitis B. *AASLD Practice Guidelines. Hepatology* 2001; 34:1225–1241.
62. Loeb KR, Jerome KR, Goddard J, Huang M, Cent A, Corey L. High-throughput quantitative analysis of hepatitis B virus DNA in serum using the TaqMan fluorogenic detection system. *Hepatology* 2000; 32:626–629.
63. Viral Hepatitle Şavaşım Derneği- www_vhds_org.htm.

64. Li JS, Tong SP, Wen YM, Vuvitski L, Zhang Q, Trepo C. Hepatitis B virus genotype A rarely circulates as an HBe-minus mutant: possible contribution of a single nucleotide in the precore region. *J Virol* 1993;67: 5402–5410.
65. Rodriguez Prias P, Buli M, Jardi R, et al. Hepatitis B virus infection: precore mutants and its relation to viral genotypes and core mutations. *Hepatology* 1995; 22:1641–1647.
66. Bagci S, Torre F, Stuyver L. Importance of Hepatitis B virus genotypes for the development of precore/core gene mutations and the outcome of interferon treatment. *Hepatology* 1996; 24: 280.
67. McCaughan GW, Spencer J, Koorey D, Bowden S, Bartholomeusz A, Littlejohn M, Verran D, Chui AK, Sheil AG, Jones RM, Locarnini SA, Angus PW. Lamivudine therapy in patients undergoing liver transplantation for hepatitis B virus precore mutant-associated infection: high resistance rates in treatment of recurrence but universal prevention if used as prophylaxis with very low dose hepatitis B immune globulin. *Liver Transpl Surg* 1999; 5:512–519.
68. Torre F, Naoumov NV. Clinical implications of mutations in the hepatitis B virus genome. *Eur J Clin Invest* 1998; 28:604–614.
69. Eyigün CP. Hepatit B virüsü mutasyonlarının klinik önemi ve tedaviye etkileri. Tabak F, Balık İ, Tekeli E. (eds) *Viral Hepatit 2007*. 1. baskı. İstanbul, Viral Hepatitle Savaşım Derneği: 2007; 136-147.
70. Lok ASF, McMahon BJ. Chronic hepatitis B. AASLD practice guidelines. *Hepatology* 2007; 45(2):507-539.
71. Uchida T, Saitoh T, Shinzawa H. Mutations of the X region of hepatitis B virus and their Clinical implications. *Pathol Int* 1997; 47:183–193.
72. Neurath AR, Kent SB, Parker K, Prince AM, Strick N, Brotman B, Sproul P. Antibodies to a synthetic peptide from the preS 120-145 region of the hepatitis B virus envelope are virus neutralizing. *Vaccine* 1986; 4(1):35-37.
73. Tennant BC, Mrosovsky N, McLean K, Cote PJ, Korba BE, Engle RE, Gerin JL, Wright J, Michener GR, Uhl E. Hepatocellular carcinoma in Richardson's ground squirrels (*Spermophilus richardsonii*): evidence for association with hepatitis B-like virus infection. *Hepatology* 1991; 13: 1215–1221.

74. Lei X, Shigeko N, Deng X. GB virus C/hepatitis G virus infection in Chinese patients with hepatocellular carcinoma. *Hepatology Research*. 2000;16: 91–97.
75. Wright TL, Lau JYN. Clinical aspects of hepatitis virus infection. *Lancet* 1993; 342: 1340-1344.
76. Robinson WS. Hepatitis B virus and Hepatitis D virus. Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. (eds) *Principles and Practice of infectious Disease*. 4th edition, Churchill Livingstone, New York: 1995; 1406–1439.
77. Taşyaran MA. HBV infeksiyonu epidemiyolojisi. Kılıçturgay K, Badur S. (eds) *Viral Hepatit 2001*. 1.baskı. İstanbul: Viral Hepatitle Savaşım Derneği, 2001; 121-128.
78. Balık I: Hepatit B epidemiyolojisi. Kılıçturgay K (eds). *Viral Hepatit '94*, 1. Baskı, İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri, 1994: 91–101.
79. Hollinger FB. Hepatitis B virüs. Fields BN, Knipe DM (Eds). *Virology*. 2 nd Ed., New York, Raven Press, 1990: 2171-2238.
80. Lamelin JP, Zaulin F, Trepo C. Lymphotropism of Hepatitis B and C viruses: An update and a newcomer. *Int J Clin Lab Res* 1995; 25: 1–4.
81. Mısıtık R.: *Viral Hepatitle Savaşım Derneği Raporu*, 2000
82. Mısıtık R, Balık İ. Türkiye’de viral hepatitlerin epidemiyolojik analizi. Kılıçturgay K, Badur S (eds.), *Viral Hepatit 2001*, 1. baskı, İstanbul, Deniz Ofset, 2000:10-55.
83. Mısıtık R. Türkiye’de viral hepatit epidemiyolojisi yayınların irdelenmesi. Tabak F, Balık İ, Tekeli E. (eds) *Viral Hepatit 2007*.1. baskı.İstanbul:Viral Hepatitle Savaşım Derneği, 2007; 10-50.
84. Kılıçturgay K. Viral hepatitte immunopatogenez. Kılıçturgay K, Badur S. (eds) *Viral hepatit 2001*. İstanbul. Viral hepatitle savaşım derneği. 2001: 304–310.
85. Kantarçeken B. Kronik hepatit B doğal seyir. Tabak F, Balık İ. (eds) *Viral hepatit 2009*.1.baskı. İstanbul: Viral Hepatitle Savaşım Derneği 2009; 3-22.
86. Kurt H. Klinik bulgular. Kılıçturgay K, Badur S (eds). *Viral hepatit 2001*. 1. Baskı. İstanbul: Viral Hepatitle Savaşım Derneği 2001; 129-134.
87. Hadzakis A, Magiorkinis E, Haida C. HBV virological assesment. *J Hepatol* 2006; 44:71-76.

88. Kimura T, Rokuhara A, Matsumoto A. New enzyme immunoassay for detection of hepatitis B virus core antigen (HBcAg) and relation between levels of HBcAg and HBV DNA. *J Clin Microbiol.* 2003; 41: 1901-6.
89. Badur S. Hepatit B Virüsü. İnfeksiyon hastalıklarının laboratuvar tanısında moleküler yöntemler. Ağaçfıdan A, Badur S, Türkoğlu S. (eds). Türk mikrobiyoloji cemiyeti yayını. İstanbul. 2002:155–160.
90. Aspinall S, Steele AD, Peenze I. Detection and quantitation of hepatitis B virus DNA: Comparison of two commercial hybridization assays with polymerase chain reaction. *J.Viral Hepatitis* 1995; 2:107-111.
91. Karahan AG, Cicioğlu Ardoğan B, Çakmakçı ML. Genel Mikrobiyoloji Uygulama Kılavuzu. 1. Baskı. Süleyman Demirel Üniversitesi Basımevi, Isparta, 2002.
92. Eisenstein BI. The polymerase chain reaction: a new method of using molecular genetics for medical diagnosis. *NEJM* 1990; 332:178–183.
93. Mullis K. Unusual origin of the polymerase chain reaction. *Sci Am* 1990; 262:56–65.
94. Hu K. Occult hepatitis B virus infection and its clinical implications. *J Viral Hepat* 2002; 9:243-257.
95. Cabrerizo M, Bartolome J, Caramelo C, Barril G, Carreno V. Molecular Analysis of Hepatitis B Virus DNA in Serum and Peripheral Blood Mononuclear Cells from Hepatitis B Surface Antigen-Negative Cases. *Hepatology* 2000; 32:116–123.
96. Cacciola I, Pollicino T, Squadrito G, Cerenzia G, Villari D, de Franchis R, Santantonio T, Brancatelli S, Colucci G, Raimondo G. Quantification of İntrahepatic Hepatitis B Virus (HBV) DNA in Patients with Chronic HBV İnfection. *Hepatology* 2000; 31:507-512.
97. Torbenson M, Thomas DL. Occult HBV. *Lancet Infect Dis* 2002; 2:479-486.
98. Carman WF. The clinical significance of surface antigen variants of hepatitis B virus. *J Viral Hepat* 1997; 4 (suppl.1):11-20.
99. Kohno H, Inoue T, Tsuda F, Okamoto H, Akahane Y. Mutations in the envelope gene of hepatitis B virus variants co-occurring with antibody to surface antigen in sera from patients with chronic hepatitis B. *J General Viral* 1996; 77:1825-1831.

100. Chen PM, Fan S, Liu JH, Chiou TJ, Hsieh SR, Liu RS, Tzeng CH. Reactivation of hepatitis B virus infection in two chronic GVHD patients after transplantation. *Int J Hematol* 1993; 58:183-188.
101. Blackberg J, Kidd-Ljunggren K. Occult hepatitis B virus after acute self-limited infection persisting for 30 years without sequence variation. *J Hepatol* 2000; 33:992-997.
102. Bouffard P, Lamelin JP, Zoulim F, Pichoud C, Trepo C. Different forms of hepatitis B virus DNA and expression of HBV antigens in peripheral blood mononuclear cells in chronic hepatitis B. *J Med Virol* 1990; 31:312-317.
103. Féray C, Zignego AL, Samuel D, Bismuth A, Reynes M, Tiollais P, Bismuth H, Brechot C. Persistent hepatitis B virus infection of mononuclear blood cells without concomitant liver infection. The liver transplantation model. *Transplantation* 1990; 49:1155-1158.
104. Weinberger KM, Bauer T, Bohm S, Jilg W. High genetic variability of the group-specific a-determinant of hepatitis B virus surface antigen (HBsAg) and the corresponding fragment of the viral polymerase in chronic virus carriers lacking detectable HBsAg in serum. *J General Virol* 2000; 81:1165-1174.
105. Horosanlı S, Miladi A, Brillet R, Akyuz F, Kaymakoglu S, Pawlotsky JM, Badur S. Genotype determination and evaluation of the response to different treatment protocols in chronic hepatitis B patients in Turkey. *J Clin Virol* (6th Annual Meeting of the European Society for Clinical Virology (ESCV) 2003; (27)supp 1:63.
106. Basisik F, Karaca C, Akyüz F, Horosanli S, Onel D, Badur S, Sever MS, Danalioglu A, Demir K, Kaymakoglu S, Cakaloglu Y, Okten A. Occult HBV infection and YMDD variants in hemodialysis patients with chronic HCV infection. *J Hepatol* 2003; 38:506-510.
107. Raimondo G, Pollicino T, Cacciola I, Squadrito G. Occult hepatitis B virus infection. *J Hepatol* 2007; 46:160-170.
108. Shetty K, Hussain M, Nei L, Reddy KR, Lok AS. Prevalence and significance of occult hepatitis B in a liver transplant population with chronic hepatitis C. *Liver Transpl* 2008; 14:534-540.
109. Raimondo G, Pollicino T, Romano L, Zanetti AR. A 2010 update on occult hepatitis B infection. *Patho Biol* 2010; 2874:1-4.

110. Yotsuyanagi H, Yasuda K, Iino S, Moriya K, Shintani Y, Fujie H, Tsutsumi T, Kimura S, Koike K. Persistent viremia after recovery from selflimited acute hepatitis B. *Hepatology* 1998; 27: 1377-1382.
111. Liaw Y-F. Role of hepatitis C virus in dual and triple hepatitis virus infection. *Hepatology* 1995; 22:1101-1108.
112. Shih CM, Lo SJ, Miyamura T, Chen SY, Lee YH. Supression of hepatitis B virus expression and replication by hepatitis C virus core protein in HuH-7 cells. *J Virol* 1993; 67:5823-5832.
113. Chazouillères O, Mamish D, Kim M, Carey K, Ferrell L, Roberts JP, Ascher NL, Wright TL. 'Occult hepatitis' B virus as source of infection in liver transplant recipients. *Lancet* 1994; 343:1685-1690.
114. Öztürk R. Viral hepatitlerde olağan dışı serolojik profiller ve moleküler tanı göstergesi kalıpları. Tabak F, Balık İ, Tekeli E. (eds) *Viral Hepatit* 2005. 1. baskı. İstanbul: Viral Hepatitle Savaşım Derneği, 2005; 152-158.
115. Alhababi F, Sallam TA, Tong CY. The significance of 'anti-HBc only' in the clinical virology laboratory. *J Clin Virol* 2003; 27:162-169.
116. Badur S. Hepatit B virusu (HBV) infeksiyonlarının virolojik tanısı. *Klinik Gelişim Dergisi (Viral hepatit özel sayısı)* 1999; 12:954-957.
117. Zaaijer HL, Lelie PN, Vandenbroucke-Grauls CM. Koot M. Concurrence of hepatitis B surface antibodies and surface antigen: implications for postvaccination control of health care workers. *J Viral Hepat* 2002; 9(2):146-148.
118. Mısıtık R. Hepatit B virus (HBV) infeksiyonlu olgularda hepatit B yüzey antijeni (HbsAg) ve antikorunun (antiHBs) birlikte olumluluğu. *Viral Hepatit Derg* 1998; 1:66.
119. Leblebicioğlu H. Salt HBsAg olumluluğu. *Viral Hepatit Derg* 1998; 1:65.
120. Badur S. HBV DNA'nın virus özgü antijen/antikorlarla sıradışı birliktelikleri. *Viral Hepatit Derg* 1998; 1: 66-68.
121. Lindh M, Andersson AS, Gusdal A. Genotypes, nt 1858 variants, and geographic origin of hepatitis B virus-large-scale analysis using a new genotyping method. *J Infect Dis* 1997; 175(6):1285-1293.

122. II. Viral Hepatit Tanı ve Tedavi Rehberi (II. Viral Hepatit Tanı ve Tedavi Konsensus Toplantısı Raporu). Viral Hepatitle Savaşım Derneği. 10 Kasım 2007- Antalya. <http://www.vhsd.org/Konsensusson2.pdf>
123. Omata M. Treatment of chronic hepatitis B infection. N Engl J Med 1998; 339:114-115.
124. McMahon BJ. Chronic hepatitis B. AASLD practice guidelines. Hepatology 2007; 45(2):507-539.
125. Öztoprak N. Kronik Hepatit B tedavisi algoritması. Tabak F, Balık İ. (eds) Viral Hepatit 2009. 1.baskı. İstanbul: Viral Hepatitle Savaşım Derneği, 2009; 87-102).
126. Beşışık F. Kronik B hepatiti tedavisinde nukleozid analogları. Tabak F, Balık İ, Tekeli E. (eds) Viral Hepatit 2007. 1.baskı. İstanbul: Viral Hepatitle Savaşım Derneği, 2007; 196-205.
127. Eroğlu Y. Çocukluk çağında akut viral hepatitis A, B, C, D, E. Galenos 1998: 32–41.
128. Halsey NA. Hepatitis B today; new guidelines for pediatrician-discussion. Pediatr Infect Dis J 1993; 12:450–453.
129. Lemon SM, Thomas DL. Vaccines to prevent viral hepatitis. N Engl J Med 1997; 336: 196-204.
130. Tekeli E. Hepatit B virüs enfeksiyonunda korunma. Tabak F, Balık İ, Tekeli E. (eds) Viral Hepatit 2007. 1.baskı. İstanbul: Viral Hepatitle Savaşım Derneği, 2007; 178-182.
131. Bali Karakadioğlu S, Mutlu B, Sayan M. Sağlıklı kan bağışçılarında nükleik asit amplifikasyon teknolojisi yöntemi ile Hepatit B virus DNA'sının araştırılması. Enfeksiyon Derg 2008; 22(3):131-134.
132. Taş T. Salt anti Hepatit B virus core antikoru pozitif kan donörlerinde Hepatit B virus DNA tespiti. Tez çalışması 2009; Süleyman Demirel Üniversitesi, Isparta.
133. Sakarya S, Tuncer G, Yaşa H, Çiçek C, Kadıköylü G, Yükselen V. Aydın bölgesindeki kan donörlerinde HBsAg ve antiHCV seroprevalansı ve yaş ve cinsiyetle ilişkisi. KLİMİK Derg 2001; 14(1):22-24.
134. Kaya S, Aridoğan Cicioğlu B, Adiloğlu AK, Demirci M. Isparta bölgesi kan donörlerinde HBsAg ve antiHCV seroprevalansı. S.D.Ü Tıp Fak Derg 2005; 12(1):36-38.
135. Gül M, Çıragil P, Aral M, Doğramacı. Gönüllü ve gönüllü olmayan kan donörlerinde HBV, HCV, HIV ve sifiliz tarama test sonuçlarının değerlendirilmesi. Türk Mikrobiyol Cem Derg 2006; 36(1):35-39.

136. Köroğlu M, Yakupoğulları Y, Turhan R. Malatya Devlet Hastanesi kan donörlerinin kan grup dağılımı ve donör tarama test sonuçlarının yedi yıllık geriye dönük analizi. *Klimik Derg* 2007; 20(1):47-49.
137. Dursun M, Gül K, Yılmaz Ş, Canoruç F, Ayyıldız O, Değertekin H. Diyarbakır'da kan merkezlerine başvuran gönüllü kan vericilerinin HBsAg ve antiHCV pozitiflik oranları. *Akademik Gastroent Derg* 2003; 2(3):130-133.
138. Öztürk C, Delialioğlu N. Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Kan Merkezi donörlerinin HBsAg, antiHCV, antiHIV ve RPR sonuçları. *Genel Tıp Derg* 2001; 11(1):29-31.
139. Ağuş N, Yılmaz Özkalay N, Cengiz A, Şanal E, Sert H. Kan donörlerinde HBsAg, anti-HCV, anti-HIV seroprevalansı. *Ankem Derg* 2008; 22(1):7-9.
140. Sertöz Yazan R, Pullukçu H, Altuğlu İ, Karadoğan A, Aydınok Y. Sık kan bağışlayan kan vericilerinde infeksiyon göstergeleri. *İnfeksiyon Derg* 2003; 17(1):77-79.
141. Chang TF. Blood screening for HBV DNA. *Journal of Clin Virol* 2006; 36(1):30-32.
142. Surveillance report. Human immunodeficiency virus, hepatitis C and hepatitis B infections among blood donors in Germany 2000-2002: Risk of virus transmission and the impact of nucleic acid amplification testing. *Eurosurveillance* 2005; 10(2).
143. Altunay H, Koşan E, Kocazeybek B, Birinci İ, Aymelek M, Aksoy A, Kırallı K, Yenen OŞ. Kan merkezlerinde nükleik asit amplikasyon testleri çalışılmalı mıdır? XIV KLİMİK Kongresi, Antalya, 2009, poster.
144. Schmidt M, Seifried E. Improving blood screening by nucleic acid technology. *ISBT Science Series* 2010; 5:219-2).
145. Kemahlı S, Solaz NN, Bozdayı M, Cin. NAT screening of HBV in blood donors. *Transfus Clin Biol* 2001; 8(1):18.
146. Bal SH, Heper Y, Kumaş LT, Mıstık R, Töre O. İzole anti-HBc olgularında HBV-DNA varlığının araştırılması ve bu olguların kan bankacılığı açısından önemi. *Microbiyol Bül* 2009; 43:243-250.
147. Shang G, Youqing Y, Baocheng Y, Chaopeng S, Wang F, Li Q, Seed CR. Two HBV DNA+/HBsAg- blood donors identified by HBV NAT in Shenzhen, China. *Transfusion and Apheresis Science* 2009; 41:3-7.

148. Yang MH, Li L, Hung YS, Hung CH, Allain JP, Lin KS, Tsai SJL. The efficacy of individual-donation and minipool testing to detect low-level hepatitis B virus DNA in Taiwan. *Transfusion* 2010; 50:65-74.
149. Karakoç AE, Berkem R, Beyaz E. Sağlıklı kan bağışçılarında Hepatit B virus DNA'nın araştırılması. II. Ulusal Kan merkezleri ve Transfüzyon Tıbbi Kongresi, Antalya, 2007, sözlü bildiri.
150. Kleinman S. Blood donor screening with nucleic acid amplification tests for human immunodeficiency virus, hepatitis C virus and hepatitis B virus. *ISBT Science Series* 2008; 3:191-195.
151. Katsoulidou A, Moschidis Z, Sypsa V, Chini M, Papatheodoridis GV, Tassopoulos NC, Mimidis K, Karafoulidou A, Hatzakis A. Analytical and clinical sensitivity of the Procleix Ultrio HIV-1/HCV/HBV assay in samples with a low viral load. *Vox Sang* 2007; 92:8-14.
152. Sertöz R, Değirmenci A, Orman M, Aydınok Y, Saygın E, Erensoy S. Ege Üniversitesi Kan Merkezine başvuran kan vericilerinde HBsAg, anti-HBc ve anti-HBs görülme sıklıkları. 3. Ulusal Viroloji Kongresi 2007 Bursa, poster.
153. Allain JP. International collaborative study proposal for the characterization of occult hepatitis B virus infection identified by nucleic acid or anti-HBc screening. *Vox Sanguinis* 2007; 92:254-257.
154. Yugi H, Mizui M, Tanaka J, Yoshizawa H. Hepatitis B virus (HBV) screening strategy to ensure the safety of blood for transfusion through a combination of immunological testing and nucleic acid amplification testing - Japanese experience. *J Clin Virol* 2006; 36 (Suppl 1):56-64
155. Prinoth O. Systems for monitoring transfusion risk. *Blood Transfus* 2008; 6:86-92.