T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ENFEKSİYON HASTALIKLARI VE KLİNİK
MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

KRONİK HEPATİT B'YE BAĞLI KARACİĞER HASARI VE HBV DNA DÜZEYİ İLE HBsAg EKSPRESYONU ARASINDAKİ İLİŞKİ

MADİNA ABDULLAYEVA

UZMANLIK TEZİ

İZMİR-2017

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ENFEKSİYON HASTALIKLARI VE KLİNİK
MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

KRONİK HEPATİT B'YE BAĞLI KARACİĞER HASARI VE HBV DNA DÜZEYİ İLE HBsAg EKSPRESYONU ARASINDAKİ İLİŞKİ

UZMANLIK TEZİ

Dr. MADİNA ABDULLAYEVA

TEZ DANIŞMANI

Doç. Dr. ZİYA KURUÜZÜM

Bu araştırma DEÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından 2017.KB.SAG.018 sayı ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

TABLO DİZİNİ III

ŞEKİL DİZİNİ IV

KISALTMALAR V

TEŞEKKÜR VII

ÖZET 1

ABSTRACT 2

1. GİRİŞ VE AMAÇ 3

2. GENEL BİLGİLER 5

2.1. Hepatit B virüsu 5

2.1.1. Virololojik özellikleri 5

2.1.2 Epidemiyoloji 11

2.1.2.1 Türkiyede Hepatit B'nin durumu 14

2.1.3. Bulaş Yolları 15

2.1.4. Patogenez 16

2.1.5. Kronik Hepatit B enfeksiyonunun doğal seyri 17

2.1.6. HBV enfeksiyonunda tanı yöntemleri 19

2.1.6.1. Serolojik tanı 19

2.1.6.2. HBsAg Kantitasyonu 20

2.1.6.3. HBV DNA testleri 22

2.1.6.4. Histopatolojik tanı-karaciğer biyopsisi 23

3. GEREÇ VE YÖNTEM 26

3.1 Çalışma yeri ve zamanı 26

3.2. Etik kurul onayı 26

3.3. Aydınlatılmış onam 26
3.4. Hasta alımı 26
3.4.1. Kronik Hepatit B Tanı Kriterleri 26
3.4.2. Dışlama kriterleri 27
3.4.3.Kayıt edilen veriler 27
3.5.Örnek toplanması ve saklanması 28
3.6.İstatiksel analiz 28
3.7. Gerekli malzemeler 29
3.7.1 Hasta örneklerinin toplanması ve depolanması aşamasında kullanılanlar 29
3.7.2 Serum örneklerinin çalışılması için gerekli laboratuvar malzemeler 29
3.8. HBsAg kantitasyonu 30
3.8.1. Kitin içindekiler: Reaktifler - çalışma solüsyonları 30
3.8.2. Testin çalışma prensibi 31
3.8.3. Testin Sınırları ve aralıkları 32
3.8.4. Serum HBsAg düzeylerinin elektrokemilüminesans yöntemi ile çalışılması 33
4. BULGULAR 37
5. TARTIŞMA 46
6. SONUÇ 53
7. KAYNAKLAR 54

TABLO DİZİNİ

Tablo 1: Hepatit B'nin global endemisite bölgeleri ve bulaş yolları.....13

Tablo 2: Kronik HBV enfeksiyonunun doğal seyri 19

Tablo 3: Modifiye Histolojik Aktivite İndeksi.....25

Tablo 4: Hastaların cinsiyetine göre ortalama serum HBsAg düzeyi……..37

Tablo 5: Yaş gruplarına göre ortalama HBsAg düzeylerinin dağılımı 38

Tablo 6: Kronik hepatit B evrelerine göre hasta sayısı ve yaş ortalaması 38

Tablo 7: Hastaların demografik verileri ve laboratuvar değerlerinin HBeAg sonucuna göre karşılaştırılması 39

Tablo 8: HAİ düzeyine göre kişi sayı dağılımı ve HBsAg düzeyleri 40

Tablo 9: HAİ gruplarına göre hasta sayısı ve ortalama HBsAg düzeylerinin dağılımı 41

Tablo 10: Fibrozis skoruna göre kişi sayı dağılımı ve HBsAg düzeyleri 41

Tablo 11: Fibrozis gruplarına göre hasta sayısı ve ortalama HBsAg düzeylerinin dağılımı 42

Tablo 12: HBV DNA gruplarına göre hasta sayısı ve ortalama serum HBsAg düzeyleri 42

Tablo 13: Kronik hepatit B evrelerine göre hasta sayısı ve ortalama serum HBsAg düzeyleri 44

Tablo 14: Kronik Hepatit B evrelerinde serum HBsAg ve HBV DNA arasındakı korelasyon.....45

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 1: Hepatit B virüsünün (HBV) yapısı ve hepatit B yüzey antijeni partikülleri.....6

Şekil 2: Hepatit B Virüsünün genomunun organizasyonu, viral transkriptlerin ve proteinlerin haritası.....7

Şekil 3: HBV replikasyon döngüsü 10

Şekil 4: Global HBsAg seroprevelansı 11

Şekil 5: Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) bölgelerinde genel populasyonda HBV enfeksiyonu (HBsAg) prevelansı, 2015.....12

Şekil 6: Hepatit B'nin tipik seyri. 20

Şekil 7: HBsAg kantitatif ölçümü için kit (Elecsys HBsAg II quant assay, Roche Diagnostic).....29

Şekil 8: HBsAg kantitatif test kitinin kontrol serumu (PreciControl HBsAg II quant II).....31

Şekil 9: Numuneler için test algoritması 32

Şekil 10: Cihaza verilmeden önce serumların kapaklı mikrosantrifüj tüplerinden test tüplerine aktarılması.....33

Şekil 11: Cobas e411 immünolojik test analizörü (Roche Diagnostic, Almanya)..34

Şekil 12: Serum konulan test tüpünün rack'a yerleştirilmesi.....35

Şekil13: HBSAG-QN Dil HepB ile manuel dilüsyon yapılması.....36

KISALTMALAR

1. **HBV:** Hepatit B virüsü
2. **DSÖ:** Dünya Sağlık Örgütü
3. **KHB:** Kronik Hepatit B
4. **HAİ:** Histolojik aktivite indeksi
5. **HBV DNA:** Hepatit B virüs deoksiribonükleik asit
6. **HBsAg:** Hepatit B yüzey antijeni
7. **anti-HBs:** Hepatit B yüzey antijeni antikoru
8. **HBeAg**: Hepatit B zarf antijeni
9. **nm:** Nanometre
10. **DNA:** Deoksiribonükleik asit
11. **HBcAg:** Hepatit B kor antijeni
12. **bp:** Base pair (Baz çifti)
13. **DR1:** Direct repeats 1
14. **DR2:** Direct repeats 2
15. **nt:** Nükleotit
16. **rcDNA:** Gevşek sirküler DNA
17. **cccDNA:** Covalently closed circular DNA
18. **pgRNA:** Pregenom ribonükleik asit
19. **ORF:** Open reading frame
20. **mRNA:** Messenger RNA
21. **kD:** Kilodalton
22. **kb:** kilobaz
23. **S-HBsAg:** Küçük hepatit B yüzey antijeni
24. **M-HBsAg:** Orta hepatit B yüzey antijeni
25. **L-HBsAg:** Büyük hepatit B yüzey antijeni
26. **HBx:** Hepatit B X proteini
27. **MHC:** Major histocompatibility complex
28. **HİV:** İnsan yetmezlik virüsü
29. **HCV:** Hepatit C virüsü
30. **ECDC:** European Center for Disease Control and Prevention
31. **anti HBc:** Hepatit B kor antijeni antikoru

32. **anti HBe:** Hepatit B zarf antijeni antikoru
33. **ABD:** Amerikan Birleşik Devletleri
34. **CDC:** Center for Disease Control and Prevention
35. **CD4:** Cluster of differentiation 4
36. **CD8:** Cluster of differentiation 8
37. **STH:** Sitotoksik T hücresi
38. **TNF-alfa:** Tümör nekrozis faktör alfa
39. **IFN-gamma:** İnterferon gamma
40. **AST:** Aspartat aminotransferaz
41. **ALT:** Alanin aminotransferaz
42. **HSK:** Hepatosellüler karsinom
43. **IU/ml:** International unit/ ml
44. **IgM:** İmmunglobulin M
45. **NA:** Nükleozid/nükleotid analogları
46. **IFN:** İnterferon
47. **qHBsAg:** Kantitatif hepatit B yüzey antijeni
48. **ng/ml:** Nanogram/mililitre
49. **PZR:** Polimeraz zincir reaksiyonu
50. **PEG-IFN:** Pegile interferon
51. **KCİB:** Karaciğer iğne biyopsisi
52. **mm:** Milimetre
53. **DEÜTF:** Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakultesi
54. **AD:** Anabilim Dalı
55. **HDV:** Hepatit D virüsü
56. **HAV:** Hepatit A virüsü
57. **EASL:** European Association fort he Study of the Liver
58. **SPSS:** Statistical Package for the Social Sciences
59. **r_s:** Korelasyon katsayısı
60. **cc:** Cubic centimeter
61. **µl:** Mikrolitre
62. **mL:** Mililitre
63. **mg/mL:** miligram/mililitre

TEŞEKKÜR

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Gastroenteroloji Bilim Dalı öğretim üyeleri, uzmanları ve asistanlarına,

Araştırmanın planlanması ve sonuçlarının değerlendirilmesi aşamasında yardımlarını esirgemeyen Halk Sağlığı Anabilim Dalı'ndan Prof. Dr. Reyhan UÇKU'ya,

Tezime çok değerli katkılarından dolayı Prof. Dr. Hüsnü PULLUKÇU, Prof. Dr. Tansu YAMAZHAN, Dr. Hatice KÖSE, Dr. Gülhan SAMSA ve Dr. Zeynep KARLIBAŞ'a

Tezin başlangıcından beri tüm aşamalarında bilgisiyle beni yönlendiren, sakinliği ve hoşgörüsüyle tüm sıkıntılarımda yanımda olan tez danışman hocam Doç. Dr. Ziya KURUÜZÜM'e,

Her türlü sorun ve sıkıntımda başvurduğum ve benden yardımlarını esirgemeyen Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Nur YAPAR'a,

Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri Prof. Dr. Vildan AVKAN-OĞUZ, Yard. Doç. Dr. Sema ALP ÇAVUŞ, Uzm. Dr. Oya Özlem EREN-KUTSOYLU'ya,

Anabilim Dalına girdiğim günden bu yana, yetişmemde bana emeği geçen ve emekli olan Prof. Dr. Ayşe YÜCE, Prof. Dr. Nedim ÇAKIR hocalarıma,

Bana tezimin her aşamasında yardım eden, en zor anımda benim yanımda olan ve onunla çalışma fırsatına sahip olduğum için kendimi çok şanslı hissettiğim canım arkadaşım, dostum Dr. Muammer ÇELİK'e,

Çalışma arkadaşlarım Dr. Hande HAZIR KONYA, Dr. Selcen BİLGİN, Dr. Nejla GÖCEN, Dr. Birsen ÇERÇİ, Dr. İlkay Nur CAN, Dr. Hacer ÇİMENDAĞ, Dr. Medine FARACOVA'ya ve uzman olan arkadaşlarıma,

Beş yıldır uyum içinde severek çalıştığım bölüm hemşireleri Dilek KILCAN, Sebihe DEMİRCİ, Şule COŞKUN, Ebru KOÇ, Sema YILMAZ, Birgül ÇETİN, Selda PAÇAL, sekreterlerimiz ve tüm personellerimize,

Bugüne kadar yetişmemi sağlayan, maddi ve manevi hep yanımda olan canım anneme, kardeşlerime ve yeğenlerime,

Sonsuz sevgi, saygı ve teşekkürlerimle…

Dr. Madina ABDULLAYEVA

ÖZET

Kronik hepatit B'ye bağlı karaciğer hasarı ve HBV DNA düzeyi ile HBsAg ekspresyonu arasındaki ilişki

Dr. Madina Abdullayeva (abdullayeva_m@yahoo.com)
Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Mithatpaşa Caddesi, No:1606, İnciraltı Mahallesi, 35340, Balçova/İZMİR

Amaç: Kronik Hepatit B (KHB) tüm dünyada önemli bir sağlık sorunudur. Son yıllarda serum HBsAg kantitasyonunun hepatit B virüsü enfeksiyonunun monitorizasyonunda kullanılabileceğine dair veriler artmıştır. Bu çalışmada KHB'nin doğal seyrinde HBsAg düzey değişikliklerini değerlendirmek ve HBsAg düzeyi ile HBV DNA düzeyi ve karaciğer histopatolojisi arasındaki korelasyonu belirlemek amaçlandı.

Yöntem: Çalışmaya 06 Ağustos 2016-07 Haziran 2017 tarihleri arasında hastanemizin Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı polikliniği ve İç Hastalıkları AD Gastroenteroloji Dal polikliniğine başvuran, kronik hepatit B tanı kriterlerine uyan, takip ile tedavi kararı açısından başvuru tarihinden önceki son 1 yıl içinde ve başvuru sonrasında karaciğer biyopsisi yapılmış ancak tedavi almamış gönüllü ve 18 yaşından büyük hastalar dahil edildi. Hastalardan alınan serum örneklerinde HBsAg düzeyleri Elektrokemilüminesans yöntemi ile araştırıldı. Bulunan sonuçlarının, serum HBV DNA düzeyi ve karaciğer biyopsisi ile saptanan HAI ve fibrozis skoru ile korelasyonu analiz edildi.

Bulgular: Çalışmaya dahil edilen 66 hastada serum HBsAg düzeyi ile cinsiyet, serum ALT düzeyi, HAİ düzeyi arasında istatistiksel anlamlı bir ilişki saptanmadı (p=351, p=365, p=0.062). Hastalarda serum HBsAg düzeyleri ile yaş arasında negatif, orta güçte, anlamlı olmayan ilişki saptandı (r=-286, p=0.02). Hastaların HBsAg düzeyi ile fibrozis skorları arasında pozitif, orta güçte, anlamlı bir ilişki (r=0.386, p=0.001) saptanırken, HBV DNA düzeyi ile pozitif, güçlü düzeyde ilişki (r=0.740, p<0.001) saptandı.

Tartışma: Bu çalışmada serum HbsAg düzeyi ile HBV DNA düzeyi ve fibrozis ağırlığı arasında korelasyon olduğu saptandı. Bu sonuçlar, serum HbsAg kantitasyonunun fibrozis ağırlığını öngörmede ve HBV reaksivasyonunu gösteren tanısal belirteç olarak kullanılabilirliğini göstermektedir.

Anahtar kelimeler: Hepatit B virüsü, kantitatif HBsAg, fibrozis, HBV DNA

ABSTRACT

Relationships of chronic hepatitis B related liver injury and HBV DNA level with HBsAg expression

Madina Abdullayeva, MD (abdullayeva_m@yahoo.com)
Dokuz Eylul University Medical Faculty, Department of İnfectious Diseases and Clinical Microbiology, İzmir, Turkey

Aim: Chronic hepatitis B (CHB) is an impotant health problem in the world. In recent years, evidences indicating that serum HBsAg quantification can be used for monitorization of HBV infection have been increased. This study aimed to evaluate HBsAg titers during the natural course of CHB and identify correlations between HBsAg titers and HBV DNA concentrations and liver histopatology.

Method: From August 6, 2016 to June 7, 2017 in Infections Diseases and Clinical Microbiology outpatient clinic and Gastroenterology outpatient clinic of our hospital, untreated, ≥ 18 years old volunteers that fulfilled criteria for diagnosis of chronic hepatitis B, had undergone liver biopsy in the last 1 year preceding the date of application and after application, were included. HBsAg levels in serum samples were investigated by electrochemiluminescence immunoassay. Results were correlated by serum HBV DNA levels and HAI, fibrosis scores determined by liver biopsy.

Results: In the 66 patients included in the study, relationship between serum HBsAg levels and gender, serum ALT and HAI levels were no statistically significant ($p=0.351$, $p=0.365$, $p=0.062$). Negative, moderate, corelation between serum HBsAg levels and age was found no statistically significant ($r=0.286$, $p=0.02$). The corelation between serum HBsAg levels and fibrosis scores were positive, moderate, statistically significant ($r=0.386$, $p=0.001$). Serum HBsAg titers showed a positive, strong, statistically significant ($r=0.740$, $p<0.001$) correlation with HBV DNA levels.

Conclusion: We found positive correlation between serum HBsAg levels and severity of fibrosis scores, serum HBV DNA levels. These findings show that, a serum HBsAg quantification might be useful for prediction of fibrosis severity and as a diagnostic tool for predicting HBV-reactivation.

Keywords: Hepatitis B virus, quantitative HBsAg, fibrosis, HBV DNA

1. GİRİŞ VE AMAÇ:

Hepatit B virüsü (HBV) kronik karaciğer hastalıklarının dünyadaki en yaygın nedenlerinden birisidir. Dünya Sağlık Örgütünün (DSÖ) 2017 yıl raporuna göre global olarak 2015 yılında yaklaşık 257 milyon kronik Hepatit B (KHB) enfeksiyonu taşıyan kişi olduğu tahmin edilmektedir (1). Avrupa Hastalık Kontrol ve Koruma Merkezi'nin (ECDC) hepatit B'ye ilişkin teknik raporunda Türkiye'de genel populasyonda Hepatit B prevalansı %2-8 arasında bildirilmektedir (2). Etkili bir aşısı olan HBV enfeksiyonu yüksek morbidite ve mortaliteye neden olması nedeniyle önemli bir halk sağlığı problemi olmaya devam etmektedir (3-5). DSÖ'nün raporuna göre 2015 yılında viral hepatitlere bağlı 1.34 milyon ölüm saptanmıştır. Bu ölümlerin çoğu kronik karaciğer hastalığı (720000 siroz ilişkili) ve primer karaciğer kanserine (470000 hepatoselüler karsinom ilişkili) bağlı olmuştur (1). HBV enfeksiyonu %15-40 oranında siroz, karaciğer yetmezliği ya da hepatosellüler karsinom ile sonuçlanmaktadır. HBV'ye ikincil gelişen terminal dönem karaciğer hastalığı ülkemizde karaciğer transplantasyonunun en sık nedenidir (3).

Karaciğerde meydana gelen hasarın seviyesini belirlemek ve diğer karaciğer hastalığı etyolojilerini dışlamak için karaciğer biyopsisi yapılmaktadır ve tanıda altın standarttır (6). Aynı zamanda KHB tanısı almış hastalarda, hastalık progresyonunu belirlemek amaçlı ultrasonografi, karaciğer fonksiyon testleri, koagülasyon testleri ve karaciğer fibrozisini gösteren serum belirteçleri de kullanılmaktadır. Karaciğer biyopsisinde kullanılan skorlama sistemlerinden biri de, ilk kez Knodell tarafından 1981'de yayınlanmış olan hepatik aktivite indeksidir. Bu indeks karaciğer biyopsisinde daha objektif sonuçlar verilebilmesi amacıyla düzenlenmiş sayısal bir sistemdir. Bu sisteme göre periportal köprüleşme nekrozu, intralobüler dejenerasyon ile fokal nekroz, portal inflamasyon ve fibrozis ayrı ayrı değerlendirilmektedir. İlk üçünün değerlendirilmesinden elde edilen sayısal değerlerin toplamı histolojik aktivite indeksi (HAİ)'ni oluşturmaktadır ve karaciğerdeki enflamasyonun şiddetini göstermektedir. Bu indeksin maksimum puanı 18'dir. Fibrozis ayrıca hesaplanmakta ve düzeyleri 0 ile 6 arasında değerlendirilmektedir. Buna göre fibrozisin ≥5 olması siroz oluşumunu göstermektedir (7). Ancak karaciğer biyopsisi invaziv bir işlem olup, 1/4000-1/10.000 arasında sıklıkta komplikasyon riski taşımaktadır (8). Klinik uygulamada hastaların bu işlemi kabul etmede zorlandıkları gözlenmiş olup karaciğer

biyopsisi gibi invaziv bir işlem yerine uygulanabilecek invaziv olmayan göstergelerin kullanılması fikri gündeme gelmiştir.

HBV DNA bilindiği gibi aktif viral replikasyonun en iyi belirtecidir ve viral replikasyona karşı gelişen immun yanıt, karaciğerdeki nekroinflamasyonun temel mekanizmasını oluşturmaktadır. Fakat bu yöntem pahalıdır, eğitimli çalışan ve ekipman gerektirmektedir. Hepatit B yüzey antijeninin (HBsAg) serumda saptanması HBV enfeksiyonunun tanısında en önemli tanısal belirteçtir (9). KHB'nin doğal seyrinde ve antiviral tedavi sırasında HBsAg düzeyi her zaman aynı değildir ve zamana bağlı değişim göstermektedir. Kimi hastalarda ileri yaşlarda doğal serokonversiyon gelişebilir (HBsAg negatifleşir, anti-HBs pozitifleşir) (10). KHB enfeksiyonunda serum HBsAg kantitasyonu hastalık aktivitesini göstermesi açısından önemli bir belirteçtir (11, 12). HBsAg düzeyindeki dalgalanmaların HBV DNA düzeyindeki değişikliklerle uyumlu olduğu gösterilmiştir. HBV DNA ve HBsAg düzeyleri arasında gerek enfeksiyonun erken evresinde, gerek akut enfeksiyon esnasında, gerek de immun reaktif evresinde ve HBeAg(+) persistan hepatit B enfeksiyonunda yüksek korelasyon olduğu saptanmıştır (13, 14). Nguyen T. ve ark.'nin çalışmasında KHB enfeksiyonu olan Asya kökenli hastalarda immun reaktif fazında HBsAg ve HBV DNA düzeyi arasında güçlü korelasyon olduğu gösterilmiştir (15). HBsAg kantitatif testleri kronik Hepatit B hastalarında karaciğer harabiyeti ve klinik sonuçların değerlendirilmesi için kullanılmaktadır (16, 17).

Bu amaçla, bu çalışmada kronik Hepatit B'li hastalarda karaciğer hasarını gösterebilen noninvaziv ve kolay uygulanabilir bir yöntem geliştirebilmek için, serum kantitatif HBsAg değerinin, invaziv ve komplikasyon riski yüksek olan karaciğer biyopsisi ve pahalı bir yöntem olan HBV DNA düzeyi ile karşılaştırılması ve korelasyonlarının değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Hepatit B virüsü

2.1.1. Virololojik özellikleri

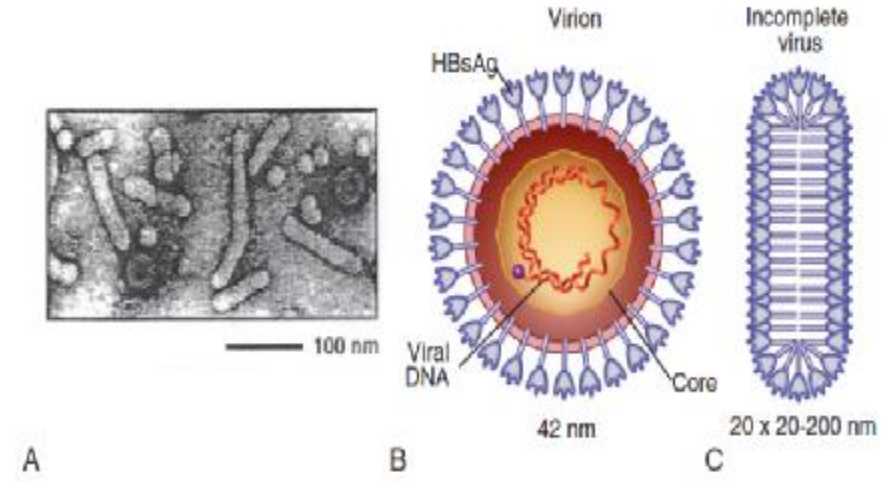
Virüsün yapısı: HBV *Hepadnaviridae* ailesinin *Orthohepadnavirus* genusunun bir üyesidir. HBV insan ve şempanzeleri enfekte etmektedir ve büyüklüğü 42 nm olan zarflı bir virüstür. Hepatotrop bir virüs olmasından dolayı replikasyonun çoğunluğu karaciğerde gerçekleşmektedir. Kısmen çift sarmallı halkasal DNA genomu mevcut olup, lipid zarf üzerinde bulunan viral yüzey antijeninin üç komponenti bulunmaktadır: büyük (L), orta (M), ve küçük (S) yüzey antijenleri. Virüsün kapsidi simetrik ikozahedral yapıda olup üç önemli komponenti vardır: Kor antijeni (HBcAg), viral genom ve polimeraz enzimi. HBV ile enfekte hastaların kanında üç farklı viral partikül saptanmıştır (Şekil 1):

1. 42-47 nm çapında enfeksiyöz yuvarlak partiküller (Dane partikülleri)
2. 17-25 nm çapında enfeksiyöz olmayan filamentöz yapılar
3. 17-25 nm çapında enfeksiyöz olmayan yuvarlak partiküller

Virüs replikasyonu sırasında yüzey antijenlerine karşı nötralizan antikorlar (anti-HBs) sentezlenir (18-20).

Genomun Yapısı: HBV'nin genomu, genotiplere göre farklılıklar göstermesine karşın yaklaşık 3200 bp uzunluğundadır. Halka biçimindeki bu genom kısmen çift sarmaldır. Pozitif polariteli iplik, negatif iplikten daha kısadır. Negatif ve pozitif iplikler 5' uçundaki hidrojen bağları ile bir arada tutulmaktadır. İpçiklerin 5' uçları arasındaki 244 bp.'lik bölgede her iki iplik üzerinde ''Direct repeats1'' (DR1) ve ''Direct repeats 2'' (DR2) olarak tanımlanan, 10-12 nükleotidlik benzer diziler bulunur. Negatif ipliğin 5' uçunda DR1 ve 3' uçunda DR2 dizileri yer alır. Pozitif iplik sentezinin DR2'den başlaması nedeniyle DR1 ve DR2 dizileri, ipliğin 5' uçunda bulunmaktadır. Negatif ipliğin 5' ve 3' uçları arasında kısa bir aralık vardır ve iplik pozitif ipçik sayesinde halka şeklinde tutulur. Bu ara bölgede negatif ipliğin 5' ucunda 8 nt uzunluğunda fazlalık bir dizi (redundancy=r) ve N-terminalinden kovalen bağlarla bağlanmış viral polimeraz enzimi yeralır. Pozitif ipliğin 5' ucunda da kovalen bağlanmış 18 nt uzunluğunda, pregenomik RNA'dan köken alan oligonükleotid RNA yer almaktadır. Viral genomun bu yapısı, gevşek sirküler DNA (rcDNA) olarak adlandırılır (21). Viral

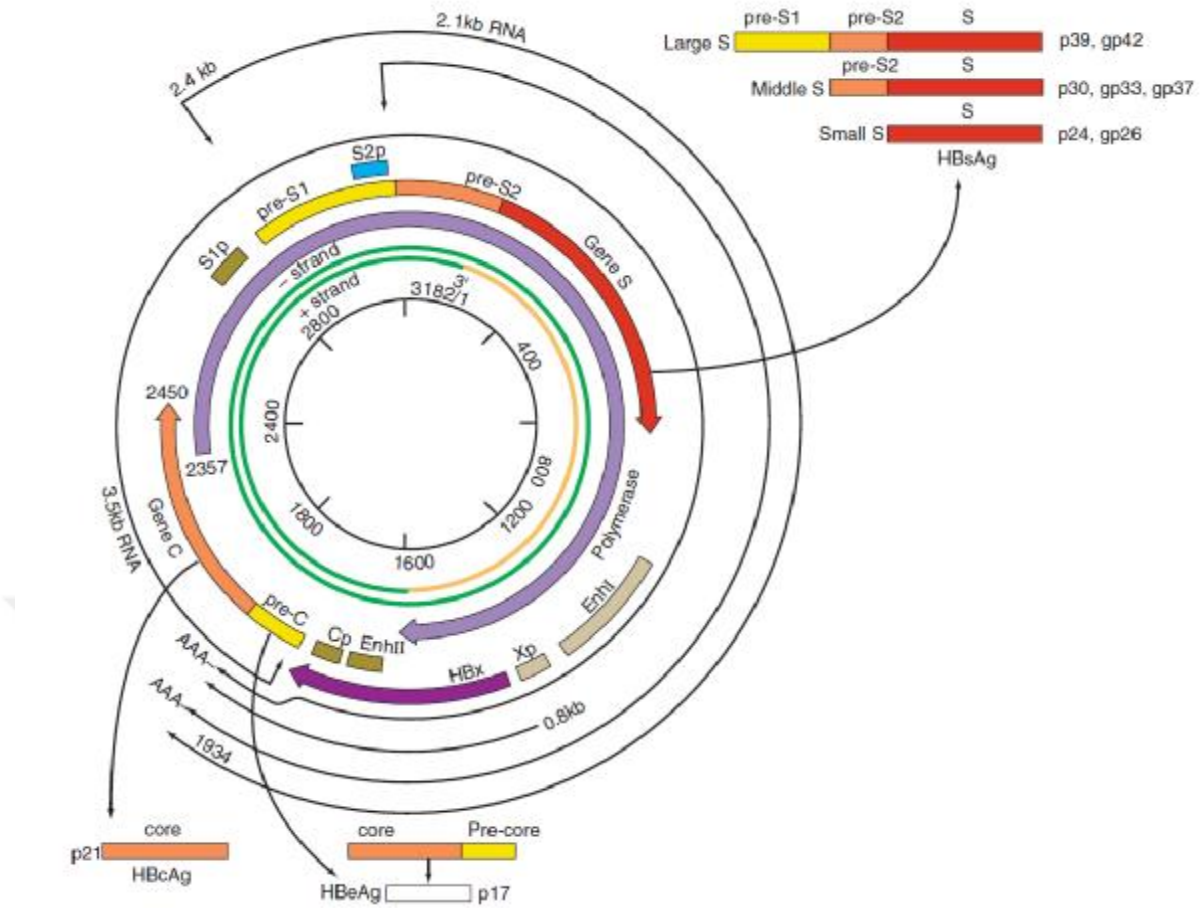
genom, olgun viriyon içinde bulunan rcDNA formu dışında , replikasyon sırasında cccDNA ve yeni oluşan kapsidlerin içinde polimeraz enzimi ile beraber bulunan pgRNA formu halinde yeralır (22). (Şekil 2)



Şekil 1: Hepatit B virüsünün (HBV) yapısı ve hepatit B yüzey antijeni partikülleri. A; Negatif boyanan HBV elektron mikroskopi. B; Tam virion, 42 nm Dane partikülü, 5' ucunda proteine bağlanmış kısmen çift sarmal DNA genomu. C; Tam olmayan virion, 22 nm HBsAg filament (23)

HBV, proteinlerini sentezlerken aynı genomik dizileri, kayan çerçeveler esasına göre farklı açık okuma bölgeleri (Open Reading Frame=ORF) olarak kullanır. Genomdaki nükleotid dizilerinin yarısı, birden fazla mRNA sentezi için kullanılır. Ayrıca aynı ORF içerisinde birden fazla başlangıç kodonu bulunabilir. Bu şekilde birbiri ile ilişkili, birden fazla proteinin sentezlenmesi olanaklı hale gelmektedir (24). Genom içerisinde bu proteinleri kodlayan genler şunlardır:

1. S geni: Büyük (39kD), orta (31 kD) ve küçük (24 kD) yüzey proteinlerini kodlar
2. C geni: İki ayrı protein sentezler. Bunlar, 21 kD'luk çekirdek proteini (HBcAg) ve 30 aminoasitlik preC ürününü taşıyan 16 kD'luk enfektivite proteini (HBeAg)'dir.
3. P geni: DNA polimeraz, revers transkriptaz ve RNaz H aktivitesine sahip olan viral polimeraz enzimini kodlar.
4. X geni: X proteinini kodlar



Şekil 2: Hepatit B Virüsünün genomunun organizasyonu, viral transkriptlerin ve proteinlerin haritası (25)

Virüsün replikasyonu (şekil 3): HBV'nin replikasyon kapasitesi yüksektir ve günde 10^{11}-10^{13} virüs üretilmektedir. Virüsün plazma yarı ömrü 4 saattir ve hepatosite girdikten sonra replikasyon 17 saat-1.5 gün kadar sürmektedir (26). Dolayısıyla kronik HBV enfeksiyonunda her gün vücutta bulunan virüsların %50'si yeniden oluşmaktadır. HBV'nin tek kanıtlanmış replikasyon bölgesi hepatositler olup, virüs sitopatik değildir. Safra kanalı epitel hücreleri, pankreasın bazı endokrin ve ekzokrin hücreleri, böbrek ve lenfoid doku da enfeksiyon hedefi olabilir. Lenfositlerdeki replikasyon virüs persistansı için ikincil bir rezervuar olabilir (27).

HBV replikasyonu hepatosite tutunma ile başlamakta, serbest virüs salınımına kadar çeşitli aşamalar göstermektedir. Genom replikasyonu pregenom olarak adlandırılan RNA (pgRNA) aracısından revers transkripsiyonla rcDNA sentezlenmesi ile olmaktadır.

1. Virüsun hücre içine girmesi ve çekirdekte çift ipçikli DNA'nın tamamlanması
2. Pregenomik ve subgenomik RNA'ların sentezi
3. Viral kapsidin sentezi ve genomun replikasyonu (pgRNA önce 200-300 molekül HBcAg sentezletir, sonra polimeraz sentezine izin verir)
4. Diğer proteinlerin sentezi

   Zarf ya da yüzey proteinleri (HBsAg): 2.1 kb ve 2.4 kb'lik subgenomik mRNA'lardan sentezlenir. Yüzey proteinleri, nukleokapsidin zarf kazanması için gereklidir. Her üç yüzey proteini de glikozillenmiştir ve Dane partikülünde yer alırlar. Büyük (L-HBsAg) ve orta (M-HBsAg) yüzey proteinleri Dane partikülünde eşit miktarda bulunur ve tüm yüzey proteinlerinin %30'unu oluşturur. Küçük yüzey proteini (S-HBsAg), Dane partikülünde en fazla bulunan yüzey proteinidir. S-HBsAg, viriyon için gerekenden 100 kat fazla miktarda sentezlenir ve enfekte hücreden salınır. M-HBsAg ile birlikte filamentöz partikülleri, yalnız başına ise sferik partikülleri oluşturur. Enfekte kişilerde kana salınan ve fazla miktarda bulunan sferik ve filamentöz partiküller antikorlarla kompleks oluşturabilir ve hastalık sırasında görülen immünkompleks sendromlarına neden olur. L-HBsAg, çekirdek proteini ile etkileşerek pgRNA ve polimeraz enziminin paketlenmesini ve sitozol membranından tomurcuklanmayı sağlar. Hücreden dışarı salınamayan L-HBsAg, fazla miktarda sentezlendiğinde, birikerek toksik etki yapabilir. Böyle hücreler, patoloji kesitlerinde, özellikle özgül tanı yöntemleri gelişmeden önce kronik hepatitin erken belirtisi olarak kabul edilen, ''buzlu cam hücresi'' görünümünü oluşturmaktadır. Buzlu cam hücrelerinde endoplazmik retikulum vezikülleri içinde filamentöz formda L-HBsAg birikimi olduğu ultrastrüktürel çalışmalarda gösterilmiştir (18).

   HBV enfeksiyonu sırasında S-HBsAg'ye karşı oluşan antikorlar enfeksiyonu kontrol altına almada ve önlemede yeterlidir. Bununla birlikte, preS1 domaininin bir kısmına karşı da nötralizan antikorlar oluşur.

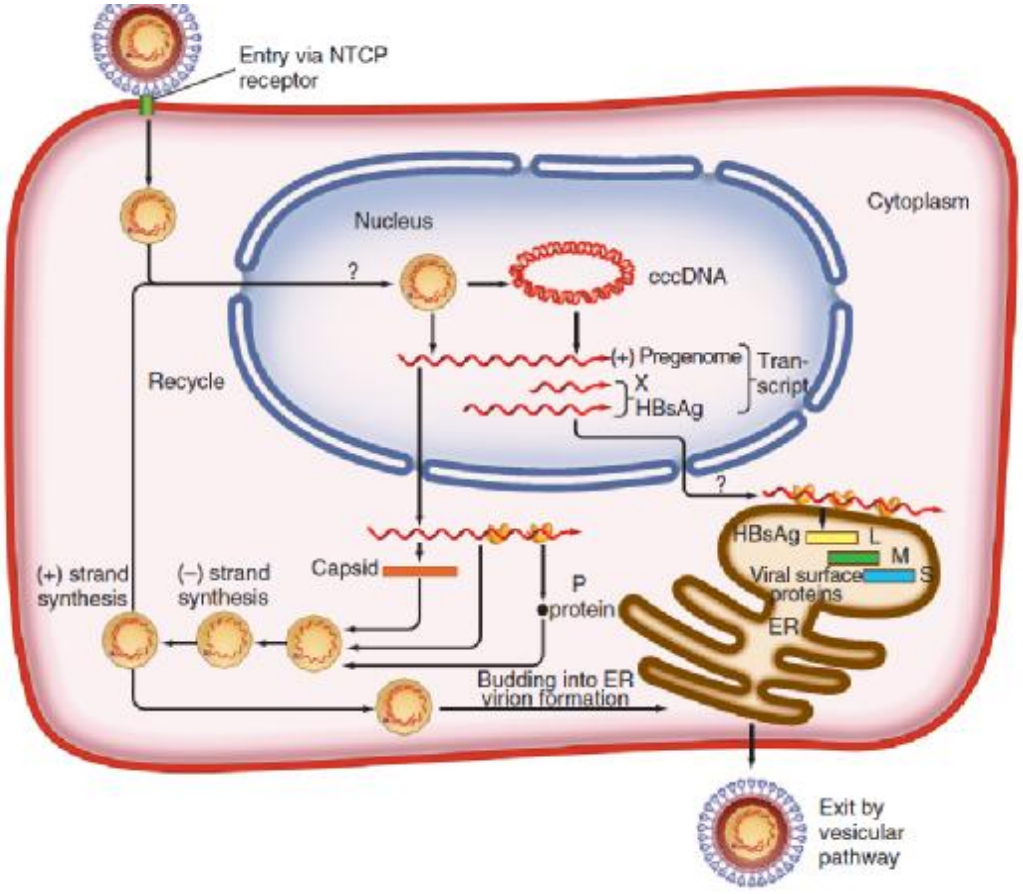
   Enfektivite proteini (HBeAg): Konakta immün tolerans gelişmesine neden olarak kronikleşmeyi destekler. HBeAg sentezleyemeyen mutant virüslerle oluşan enfeksiyonlarda daha ağır hepatik hasar görülmesi de bu şekilde açıklanmaktadır (28). HBeAg, viral DNA sentezi için kalıp olarak kullanılan

pgRNA'dan sentezlendiği için HBeAg'nin yüksek miktarda olması fazla miktarda pgRNA sentezlendiğini, yani aktif viral replikasyonu gösterir.

X proteini (HBx): Doğal enfeksiyondakı rolü tam bilinmemesine karşın virüs replikasyonu için gereklidir. İnvitro olarak viral genleri ve konak MHC genlerini aktive ettiği gösterilmiştir. Viral genom transkripsiyonu için gerekli olan X proteini, hepatosellüler karsinom gelişmesinden de sorumlu tutulmaktadır. HBx, birçok promotor bölgeyi aktive etmekte, viral RNA'nın stabilitesini sağlamakta, hücre büyümesini ve apoptotik hücre ölümünü etkilemektedir (29).

5. Zarfın kazanılması ve hücreden salınma: İçinde DNA sentezi süren viral kapsid endoplazmik retikulumdan geçerken yüzey proteinlerini taşıyan zarfla kaplanır. Zarfın kazanılması için L-HBsAg gereklidir. L-HBsAg endoplazmik retikulum zarına yerleşir, iç kısımda kalan bölümleri çekirdek proteinleri ile bağlanarak virüs tomurcuklanır.

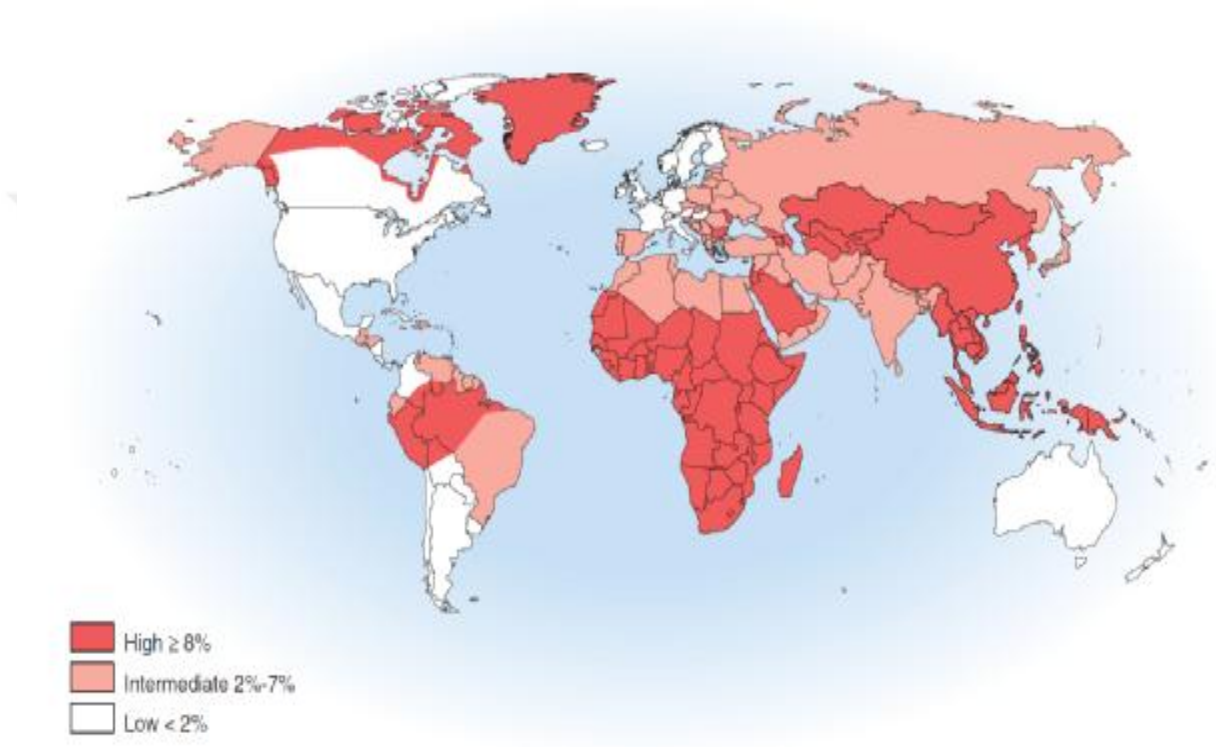
Hepadnavirüs replikasyonunda en önemli rolü cccDNA sentezinin düzenlenmesi oynamaktadır. Enfeksiyonun erken döneminde yeni oluşan nükleokapsidler, tercihen hücre çekirdeğine geri taşınırlar. Burada pozitif ipliğin sentezi tamamlanır ve cccDNA oluşur. Bu yolla çekirdekte oluşturulan cccDNA rezervuarı, enfeksiyonun persistansını sağlar. Enfeksiyon, hepatosit bölünmesiyle de yavru hücrelere aktarılabilir. Ancak, hepatosit ömrünün uzun olması nedeniyle, virüsun yayılımında önem taşımaz. Enfeksiyon yerleştikten sonra ise hücreden salınan viriyonlar horizontal yayılımı sağlar (30).



Şekil 3: HBV replikasyon döngüsü (23).

2.1.2 Epidemiyoloji

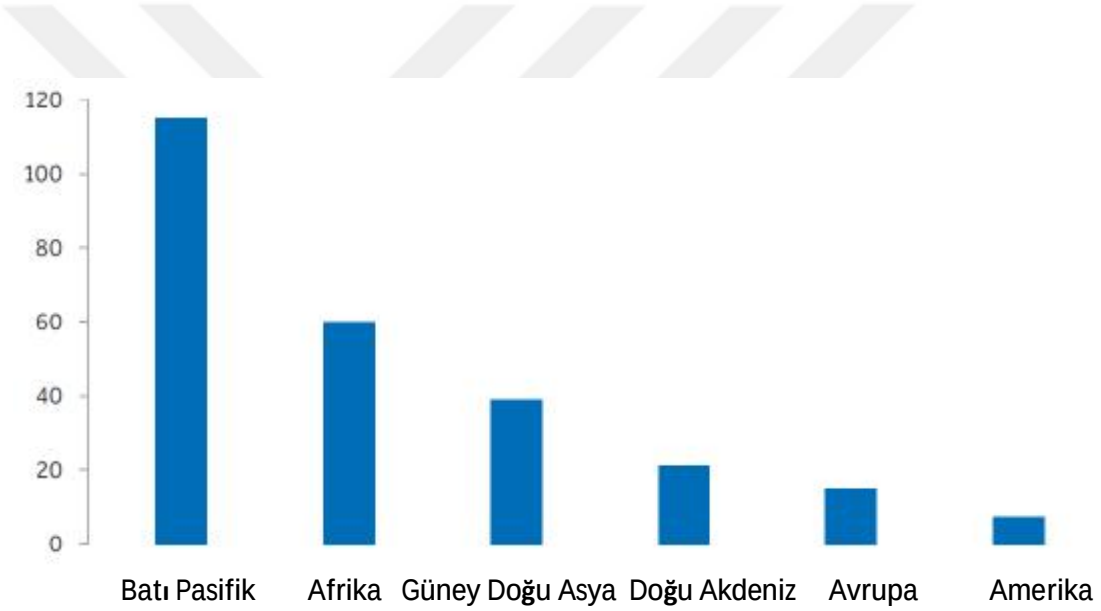
Global olarak 2015 yılında tahminen 257 milyon (dünya nüfusunun %3.5'i) kronik Hepatit B (KHB) enfeksiyonu olan kişi yaşadığı düşünülmektedir. 2.7 milyon kişi HBV ve HİV ile koenfektedir. (Şekil 4)



Şekil 4: Global HBsAg seroprevalansı (From Centers for Disease Control and Prevention. Infectious Diseases Related to Travel: Hepatitis B.)

Bu enfekte kişilerin %68'i Afrika ve Batı Asya bölgesindedir.(Şekil 5)

	HBV enfeksiyonu prevalansı(%)			Yaşayan HBV'li kişi sayısı (milyon)		
	Belirsiz interval (%95)			Belirsiz interval (%95)		
DSÖ bölgeleri	En iyi	Düşük	Yüksek	En iyi	Düşük	Yüksek
Afrika	6.1	4.6	8.5	60	45	84
Amerika	0.7	0.4	1.6	7	4	16
Doğu Akdeniz	3.3	2.6	4.3	21	17	28
Avrupa	1.6	1.2	2.6	15	11	23
Güney Doğu Asya	2.0	1.5	4.0	39	29	77
Batı Pasifik	6.2	5.1	7.6	115	93	140
Toplam	3.5	2.7	5.0	257	199	368



Şekil 5: Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) bölgelerinde genel populasyonda HBV enfeksiyonu (HBsAg) prevalansı, 2015

HBsAg pozitifliği geniş bölgesel farklılık göstermektedir. Düşük (<%2) ve yüksek (>%8) endemik bölgeler bulunmaktadır. Sosyoekonomik gelişim, toplu bağışıklama programı ve etkili antiviral tedavi bölgelerde prevalansı düşürürken, insan göçü, göçmenlerde HBsAg prevalansının yüksek olmasına bağlı Avrupanın bazı düşük endemik ülkelerinde (İtalya, Almanya) ise prevalans ve insidansı artırmaktadır (4). (Tablo 1)

Tablo 1: Hepatit B'nin global endemisite bölgeleri ve bulaş yolları

ÖZELLİKLER	Düşük	ORTA	Yüksek
Taşıyıcılık oranı (%)	<2	2-7	>8
Dağılım	ABD, Kanada, Batı Avrupa, Avustralya, Yeni Zelanda	Doğu ve Güney Avrupa, Akdeniz Ülkeleri, Orta Asya, Latin ve Güney Amerika, İsrail	Güneydoğu Asya, Çin, Alaska Eskimoları, Sahralatı Afrika, Orta Doğu (İsrail dışı), Haiti,Dominik Cumhuriyeti
Enfeksiyon yaşı	Erişkin	Çocukluk	Perinatal ve erken çocukluk
Bulaş yolu	Cinsel, perkütan	Perkütan	Anneden ve perinatal

Enfekte hastaların az bir kısmı tanı almıştır (HBV'li hastaların %9'u (22 milyon) ve HCV'li hastaların %20'si (14 milyon)). Bu hastaların da az bir kısmı tedaviye ulaşmıştır. 2015 yılına kadar tanı almış tüm kronik hepatit B'li hastaların %8'i (1.7 milyon kişi) tedavi almaktadır. Tedavi edilmeyen HBV ve HCV enfeksiyonu siroza (720000 ölüm) ve hepatoselüler karsinoma (470000 ölüm) neden olmaktadır. Bu uzun dönem komplikasyonları yaşamı tehdit etmektedirler ve viral hepatitlere bağlı ölümlerin %96'sının nedenidir. 2000'den beri viral hepatitlere bağlı ölümler %22 artmıştır. 2015 yılında 1.34 milyon viral hepatite bağlı ölüm bildirilmiştir. Bu rakam tüberküloza bağlı ölüm sayısıyla aynı, HİV'e bağlı ölüm sayısından daha yüksektir. Eğer tanı koymadaki yetersizlikler ve tedaviye erişimdeki zorluklar önlenmezse viral hepatitlere bağlı ölüm artmaya devam edecek gibi durmaktadır (1).

Hepatit B aşısının yeni doğanlarda yaygın kullanıma girmesiyle birlikte yeni HBV enfeksiyonu insidansı azalmıştır. Aşıdan önceki dönem (aşının kullanıma girmesi farklı bölgelerde 1980-2000 arası) ile ve aşıdan sonrakı dönem arasında

(2015'e kadar) 5 yaşından küçük çocuklarda kronik HBV enfeksiyonu insidansı %4.7'den %1.3'e gerilemiştir (1).

2.1.2.1 Türkiyede Hepatit B'nin durumu

Ülkemiz HBV sıklığı açısından orta derecede endemik bölgeler arasındadır ve yaklaşık 3 milyon kişinin HBV ile enfekte olduğu tahmin edilmektedir. Endemisitenin derecesi ile HBV enfeksiyonunun bulaş yolları arasında yakın ilişki olduğu bilinmektedir.

Orta Doğu ve Akdeniz ülkelerinde horizontal geçişin en sık rastlanan geçiş yolu olduğu kabul edilmektedir. HBV enfeksiyonunun vertikal geçiş durumunda daha fazla kronikleşme eğilimi gösterdiği de bilinmektedir. Ülkemizde de horizontal geçişin başlıca bulaş yolu olduğu, gebelerde HBsAg ve özellikle de HBeAg prevalansının düşük olması nedeniyle vertikal geçişin muhtemelen daha az görüldüğü bildirilmektedir (31).

HBV bulaşı aile içinde başlıca çocukluk ve adolesan dönemde gerçekleşmektedir. Türkiye'de kronik karaciğer hastalıklarının demografik profili de bu kanıyı desteklemektedir. Bu durum yenidoğan ve çocukların aşılanmasının ve ailelerin bulaş yolları hakkında bilgilendirilmesinin önemini de vurgulamaktadır.

ECDC'nin Eylül 2010'da hepatit B'ye ilişkin teknik raporunda Türkiye'de genel popülasyonda hepatit B prevalansı bölgelere göre %2-8 arasında bildirilmiştir. Siroz hastalarında %64, hepatoselüler karsinom vakalarında HBsAg prevalansı ise %54 olarak bildirilmiştir. Bu rapora göre Avrupa ülkeleri ile kıyaslandığında, genel popülasyonda hepatit B prevalansının en yüksek olduğu ülkelerden biri Türkiye'dir (32).

Ülkemizde yapılan çalışmalarda hepatit B prevalansının batıdan doğuya doğru gidildikçe arttığı, Eskişehir, Antalya, Adana, Elazığ, Sivas ve Erzurum'da yüksek oranlarda bulunduğu, Diyarbakır'da HBsAg pozitiflik oranının %10'lara ulaştığı bildirilmektedir. Kan donör çalışmalarına göre HBsAg pozitifliği ülkemizde yıllar içinde azalma göstermektedir (%5.2'den %2.97'ye). HBV'nin 8 genotipi içinde, Türkiye'de genotip D'nin birçok çalışmada %100 oranında bulunduğu bildirilmektedir (33, 34).

Türkiye'de ilk kez hepatit B prevalansının topluma dayalı olarak araştırılması Türk Karaciğer Araştırmaları Derneği tarafından gerçekleştirilmiştir. 5471 kişinin

tarandığı çalışmada HBsAg pozitifliği %4, anti HBs pozitifliği %32, anti HBc total pozitifliği %30.6 olarak bulunmuştur. HBsAg pozitif olan hastalarda anti HBe pozitiflik oranı da %92.1 olarak saptanmıştır. Etkili aşılama çalışmalarına rağmen gelecek yıllarda da hepatit B'nin önemini koruyacağı düşünülmektedir (31).

2.1.3. Bulaş Yolları

HBV, temel olarak parenteral yolla; enfeksiyöz kan ve vücut sıvılarının deri ve mukoza ile teması sonucu bulaşır (35, 36). ABD (Amerika Birleşik Devletleri)'de HBV bulaşı sıklıkla kontamine iğne ve şırınga yolu ile kişilerin kan teması ve çoklu cinsel partnerler nedeni ile olmaktadır. CDC (Center for Disease Control and Prevention) verileri, en yüksek risk faktörünün damar içi madde bağımlılığının ardından cinsel temas olduğuna işaret etmektedir (37).

Sağlık çalışanları, özellikle cerrahlar, patoloji uzmanları ve hemodiyaliz çalışanları bulaş açısından daha yüksek riske sahiptirler. Bu grupta HBV aşısının yaygın kullanımı enfeksiyon insidansını düşürmüştür. 1985 yılında %9 olarak bildirilen enfeksiyon insidansı, 1994-1995'te %0.8 olarak belirlenmiştir. Kontamine iğne batmasına bağlı HBV enfeksiyon riski, kaynağın HBeAg belirtecinin durumuna bağlıdır (38). HBeAg pozitif kişilerin serumunda ml'de 10^8-10^{10} virion, anti HBe pozitif olanların serumlarında ise ml'de 10^1-10^7 virion bulunduğu saptanmıştır (39).

Enfekte annenin bebeğine bulaş oranı %40-50'dir. HBeAg pozitif bir anneden bulaş daha yüksektir. Anneden bebeğe bulaşma, doğum sırasında veya doğumdan sonra oluşabilen deri ve mukoza sıyrıklarının enfekte maternal sıvılarla teması, vajinal kanaldan geçiş sırasında anne kanının yutulması, sezeryan sırasında anne kanı ile temas veya plasenta hasarı sonucu maternal dolaşımın fetal dolaşıma karışması gibi nedenler ile oluşmaktadır. İntrauterin bulaş oranı %5-10 gibi düşüktür (39).

Mevcut kan donörü tarama yöntemleri olan, donör havuzundan yüksek riskli davranışları olanların elimine edilmesi, HBsAg ve anti HBc taranması ve viral inaktivasyon prosedürleri ile posttransfüzyon hepatit B riskinin, her transfüzyon alıcısı başına 0.0002 olduğu tahmin edilmektedir (35).

Test edilen çeşitli vücut sıvılarında HBsAg pozitifliği saptanmıştır ve bunların içinde semen ve tükrük enfeksiyöz virionu taşıdıkları kanıtlanmış sıvılardır (40).

Semen ve tükrükteki virion yükü serumdakinden 10^3 kez daha azdır (39). Buna rağmen, HBV'nin oral yolla bulaşının net bir kanıtı yoktur. Benzer şekilde HBsAg ve HBV DNA, kronik hepatit enfeksiyonlu annelerin sütünde bulunmuştur. Bağışıklanmış çocuklarda, anne sütü ile beslenmeye bağlı HBV bulaşında artmış risk mevcut değildir (41, 42).

Erkeklerle seks yapan erkekler arası cinsel temas, HBV için en riskli seksüel bulaş yoludur. Genital sekresyonlar kandan daha az konsantrasyonlarda virüs içermelerine rağmen bu sekresyonlar heteroseksüel temas sırasında bulaşmaya neden olmaktadırlar. Çok sayıda heteroseksüel partneri veya başka cinsel yolla bulaşan hastalığı olanlarda risk daha fazladır (39).

HBV vücut dışında haftalarca yaşayabilmekte ve tıraş bıçağı, diş fırçası gibi cansız yüzeylerde bulunabilmektedir (43).

2.1.4. Patogenez

Hepatit B virüs enfeksiyonunda karaciğer hasarının oluşmasında viral faktörlerden çok konak immun yanıtının rolü vardır. Virüsün temizlenmesi ve karaciğer hasarı, özgül immun yanıtlara bağlıdır. Akut HBV enfeksiyonunda CD4+ ve CD8+ T hücre yanıtları görülmektedir. CD4+T hücre yanıtı viral proteinlere karşı gelişmektedir (44). HBV spesifik CD4+ T hücreler aynı zamanda HBV spesifik sitotoksik T hücrelerini (STH) aktive etmekte ve bu STH'ler hem enfeksiyon kontrolünden hem de karaciğerde oluşan doku hasarından sorumlu olmaktadır. Virüsün karaciğerden temizlenemediği kronik enfeksiyonlarda ise hastaların periferik kanında zayıf CD4+ T hücre yanıtı ve beraberinde zayıf STH yanıtı bulunmaktadır (45, 46).

Virüse karşı gelişen immun yanıtta sitotoksik hücrelerin yanında enflamatuvar sitokinlerin de rol aldığı bilinmektedir. Özellikle TNF-alfa ve İFN-gamma, HBV'ye karşı immun yanıtta etkili olmaktadırlar. Sitokinler, konak savunmasında viral replikasyonu baskılayarak doğrudan ve hangi tip immun yanıtın baskın olacağını belirleyerek dolaylı yoldan rol almaktadır (45). Akut HBV enfeksiyonunda güçlü poliklonal hücresel yanıt hastalık seyrini etkilemede önemlidir. Etkin bir immün yanıtın başlatılması için tip 1 İFN salınımı gereklidir. İmmun yanıt gelişimi ile HBV DNA düzeyleri düştükten sonra doğal ve özgül immun yanıt hücreleri karaciğerde hepatit gelişimine yol açmaktadır. CD8+T lenfositlerinin enfekte hepatositleri ortadan

kaldırması, aspartat aminotransferaz (AST) ve alanin aminotransferaz (ALT) yükselmesi ile beraber görülmektedir. Bunu izleyen dönemde antikor yanıtı gelişmekte, bellek hücreleri oluşarak reenfeksiyon ve reaktivasyon önlenmektedir. Akut yanıtta yetersizlik olursa enfeksiyon kronikleşmektedir (47).

Akut HBV enfeksiyonunu takiben kronikleşme erişkinlerin %4.6'sında görülmektedir (48). HBsAg pozitif anneden doğan bebeklerde HBV'nin ortadan kaldırılması güçtür ve kronikleşme oranı %95'i bulmaktadır. Yenidoğan dönemi sonrası, altı yaş altı çocuklarda kronikleşme oranı %30'lar civarında olup, uzun dönemde siroz , karaciğer yetmezliği ve HSK gibi ciddi sonuçlar izlenebilmektedir (49).

2.1.5. Kronik Hepatit B enfeksiyonunun doğal seyri

Kronik HBV enfeksiyonu HBV replikasyonu ve konak immun yanıtı arasında dinamik bir süreçtir. Kronik HBV enfeksiyonu olan hastada her zaman kronik hepatit gelişmez. Kronik HBV enfeksiyonun doğal seyri 5 evreye bölünür (Tablo 2). Bunların değerlendirilmesi için HBeAg, HBV DNA, ALT, karaciğerde inflamasyonun varlığına bakılır (4).

Evre 1: HBeAg pozitif kronik HBV enfeksiyonu (önceki ismi immun tolerant faz)

HBeAg pozitif, HBV DNA düzeyi çok yüksek, ALT(normalin üst sınırı ≤ 40 IU/ml) sürekli normal sınırlardadır (50). Karaciğerde nekroinflamasyon veya fibrozis yoktur veya minimaldır (51). Bu fazda HBeAg'nin spontan kaybı çok düşüktür. Bu hastalar çok bulaştırıcıdır.

Evre 2: HBeAg pozitif kronik hepatit B (önceki ismi immun reaktif faz)

HBeAg pozitif, HBV DNA düzeyi yüksek, ALT düzeyi yüksekliği mevcut. Karaciğerde orta veya ağır nekroinflamasyon ve fibroziste hızlı progresyon vardır (50). Faz 1'den bir kaç yıl sonra gelişir. Fakat yetişkin dönemde enfekte olan kişilerde hızlı gelişir. Bu fazın sonuçları farklı olabilir. Çoğu hastada HBeAg serokonversiyonu ve HBV DNA supresyonu gelişir, HBeAg negatif enfeksiyon fazına geçer. Bir grup hasta ise HBV kontrolunde başarısız olur ve HBeAg negatif KHB fazına geçiş uzun yıllar alabilir.

Evre 3: HBeAg negatif kronik HBV enfeksiyonu (önceki ismi inaktif taşıyıcı)

HBeAg negatif, anti-HBe pozitif, HBV DNA saptanamayacak veya düşük düzeyde (<2000 IU/ml), ALT normal sınırlarda olur. Bazı hastalarda bu fazda HBV DNA >2000 IU/ml (genellikle < 20000 IU/ml), ALT sürekli normal sınırlarda ve minimal hepatik nekroinflamasyon, düşük düzey fibrozis saptanır. Eğer hastalar bu fazda kalırsa siroz ve HSK'a progresyon riski düşüktür. Spontan HBsAg kaybı ve/veya serokonversiyon %1-3 vaka/yıl olarak saptanmıştır (50). Bu hastaların serum HBsAg düzeyi düşük saptanmıştır (<1000 IU/ml) (52).

Evre 4: HBeAg negatif kronik hepatit B

HBeAg negatif, anti HBe pozitif, sürekli veya dalgalanan orta veya yüksek düzey HBV DNA (sıklıkla HBeAg pozitif hastalardakinden düşük düzeyde), ALT düzeyleri sürekli veya aralıklı yüksek saptanır. Karaciğer histolojisinde nekroinflamasyon ve fibrozis görülmektedir. Bu fazda spontan hastalık remisyon oranı düşüktür (50).

Evre 5: HBsAg negatif faz

Serumda HBsAg negatif, anti HBc pozitif, anti HBs pozitif veya negatif olabilir. Bu faz aynı zamanda okült HBV enfeksiyonu olarak da isimlendirilir. Bu fazda genelllikle ALT düzeyleri normal sınırlarda, HBV DNA saptanamaz düzeyde olur. HBV DNA (ccc DNA) sıklıkla karaciğerde saptanır. Siroz gelişiminden önce HBsAg kaybı olmuşsa siroz, dekompansasiyon ve HSK gelişimi için risk düşüktür. Sağkalım yüksek olur. Eğer siroz HBsAg kaybından önce gelişmişse HSK gelişme riski aynı kalmaktadır. Bu hastalarda immunsupresyon HBV reaktivasyonuna neden olabilmektedir (50).

Tablo 2: Kronik HBV enfeksiyonunun doğal seyri.

	HBeAg pozitif		HBeAg negatif	
	Kronik enfeksiyon	Kronik hepatit	Kronik enfeksiyon	Kronik hepatit
HBsAg	Yüksek	Yüksek/orta	Düşük	Orta
HBeAg	Pozitif	Pozitif	Negatif	Negatif
HBV DNA	$>10^7$ IU/ml	10^4-10^7 IU/ml	<2000 IU/ml**	>2000 IU/ml
ALT	Normal	Artmış	Normal	Artmış*
Karaciğer hasarı	Yok/minimal	Orta/ağır	Yok	Orta/ağır
Eski terminoloji	İmmun tolerant	İmmun reaktif	İnaktif taşıyıcı	HBeAg negatif kronik hepatit

*Sürekli veya aralıklı.** HBV DNA düzeyi 2000-20000 IU/ml arasında olabilir.

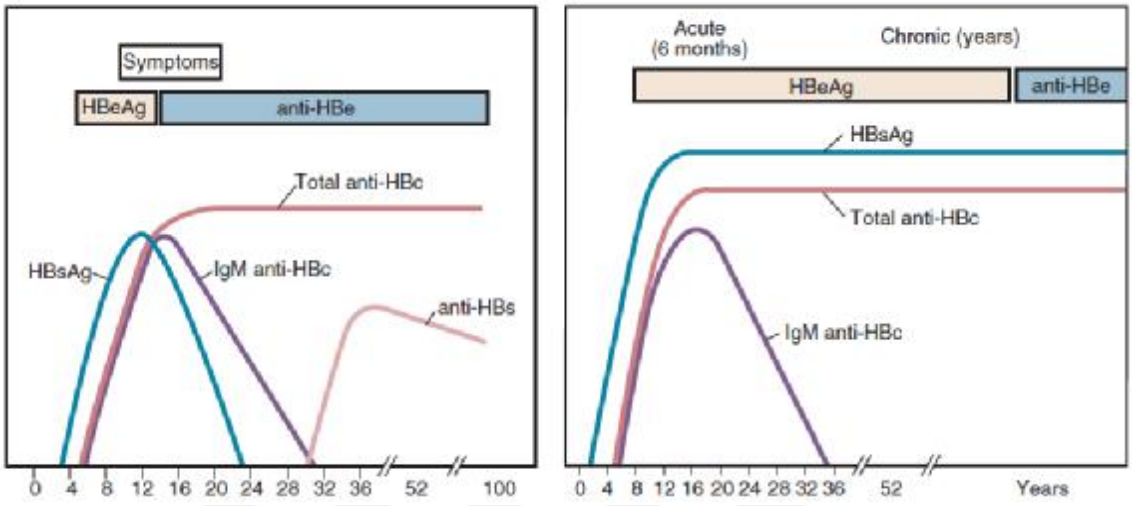
2.1.6. HBV enfeksiyonunda tanı yöntemleri

2.1.6.1. Serolojik tanı

HBV'nin özgül tanısında kullanılan serolojik testler HBsAg, HBeAg, anti HBs, anti HBc, anti HBe'dir. Tipik bir akut HBV enfeksiyonunda ilk antikor yanıtı anti HBc İgM oluşmasıdır. Anti HBc İgM 6 ay civarında oluşur, nadiren hiç gelişmez ya da geç dönemde oluşur. HBV ile temastan bir kaç hafta sonra serumda HBsAg ortaya çıkar. Ardından anti HBc total yükselir. Klinik ise HBsAg'nin serumda ortaya çıkışından ortalama 4-10 hafta sonra belirginleşir. Viral replikasyonun en iyi göstergesi HBV DNA'dır. HBsAg'in ortaya çıkmasından önceki üç haftaya kadar olan dönemde saptanabilmektedir.

HBeAg replikasyonun varlığı hakkında sınırlı bilgi verir. Akut olgularda HBeAg, serumda HBsAg ile yaklaşık olarak hemen hemen aynı dönemde ortaya çıkar ve HBsAg'den önce kaybolur. Bu antijenin varlığı, viral partiküllerin, serumda HBV DNA ve DNA polimeraz enziminin bulunduğunu gösterir. Yani HBeAg aktif replikasyon ve enfektivitenin önemli bir işaretidir. Bu antijen kaybolurken yerini iyileşmeye doğru gidişi gösteren özgül antikoru olan anti HBe'ye bırakır (53-55). Altı aydan daha uzun

HBsAg pozitifliği ’’HBsAg taşıyıcılığı’’ olarak değerlendirilmektedir. HBeAg’nin 10 haftada kaybolmaması da kronikleşmeye işarettir. HBV enfeksiyonunun seyri şekil 6’da gösterilmiştir.



Şekil 6: Hepatit B’nin tipik seyri. Solda Akut hepatit B’nin seyri. Sağda kronik hepatit B. HBc,hepatitis B core; HBe, hepatitis B envelope; HBsAg, hepatitis B surface antigen; İgM, immunoglobulin M

2.1.6.2. HBsAg Kantitasyonu

HBV enfeksiyonunun tedaviye yanıtını izlemek için uzun yıllar boyunca serum HBV DNA düzeyleri, HBeAg pozitif hastalarda serokonversiyonun takibi; ALT düzeylerinin normalleşmesi gibi belirteçlere bakılmıştır. Fakat bazı durumlarda, bu değerlerin tedavi başarısını değerlendirmede yetersiz kaldığı görülmüştür. Örneğin, nükleozid/nükleotid analogları (NA) tedavisi alan hastalarda, HBV DNA düzeyi hızlıca düşer ve saptanamayacak seviyelere gelir. Fakat yalnızca %50 hastada HBeAg kaybı gelişir. Bu hastaların çoğunda ise tedavi kesildiğinde relaps görülür (56). HBeAg serokonversiyonunun takibi ise sadece antijen pozitif hasta grubunda yardımcı olur.

HBsAg, 40 yıl önce tanımlanmıştır ve HBV enfeksiyonunun tanısını koymada başrolü üstlenmiştir. 90’lı yıllarda, HBsAg kantitasyonu güvenilir, basit ve ucuz bir yöntem olarak IFN tedavisi alan hastalarda, viral replikasyonun takibi amacıyla kullanılmaya başlanmıştır. Yapılan çalışmalar, HBsAg’nin kantitatif serum düzeylerinin (qHBsAg), cccDNA’nın karaciğerdeki düzeyi ve transkripsyonel aktivitesi hakkında bilgi verebileceğini göstermiştir. Buna bağlı olarak HBsAg titresi, tedavinin

etkinliğini de gözler önüne seren bir belirteç olarak kabul görmektedir (57) . Günümüzde, HBV DNA düzeyleri ile birlikte değerlendirildiğinde, hastalığın doğal seyrinin takibinde ve tedavi başarısını değerlendirmede önemli rol oynamaktadır.

HBsAg kantitasyonu akut ve kronik enfeksiyonun ayırımında, antiviral yanıtın değerlendirilmesinde anlamlıdır. Viral genomu serum HBV DNA'dan daha iyi monitorize edebilir. Akut HBV enfeksiyonunda ilk 4 haftada HBsAg'de %50'den fazla düşme iyileşme göstergesidir. HBsAg'nin 30000 ng/ml'den daha yüksek konsantrasyonlarda varlığında ise İFN-α'ya karşı yanıtsızlık söz konusudur. Kantitatif HBsAg, HBV DNA düzeyi ile doğrudan ilişkilidir (58).

HBsAg serum düzeyinin, cccDNA miktarıyla korele olduğunu araştıran birçok yayın mevcuttur. Bu çalışmalardan bir tanesinde, bir kısmı adefovir tedavisi alan farklı fazlarda olan HBV enfeksiyonlu hastalarda, PZR metodu ile intrahepatik cccDNA düzeyi serum HBsAg titresi ile karşılaştırılmıştır. Tedavi öncesi cccDNA düzeyleri, diğer hasta gruplarına göre (taşıyıcılar, HBeAg negatif kronik hastalar) HBeAg pozitif grupta belirgin yüksek bulunmuştur. Tedavi alan hastalarda ise, intrahepatik cccDNA nın düşüş gösterdiği saptanmış. cccDNA miktarındaki değişimler ile serum HBsAg titrelerinin azalması arasında doğru orantı bulunmuştur. ALT seviyelerindeki düşüş ile ise belirgin bir korelasyon gözlenmemiştir. cccDNA'daki değişimlerin, intraselüler HBV DNA ve serum HBV DNA değişimi ile güçlü korelasyon gösterdiği saptanmıştır (59).

Bir başka çalışmada; 28 KHB hastasına, 48 hafta süre ile adefovir ve pegile interferon (PEG-IFN) alfa 2b kombinasyon tedavisi verilmiş. Tedavi öncesi ve sonrasında cccDNA seviyeleri araştırılmıştır. Tedavi sonunda, serum HBsAg titreleri ile intrahepatik viral DNA miktarının, tedavi öncesine oranla uyumlu bir şekilde bir azalma gösterdiği saptanmıştır ($P < 0.001$). Bu azalma cccDNA için de benzerlik gösterse de istatiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Çalışmada, kombinasyon tedavisi sonunda, intrahepatik cccDNA miktarında belirgin bir azalma olduğu ve karaciğerdeki HBV DNA düzeyi ile serum HBsAg seviyesinin korelasyon gösterdiği saptanmıştır (60).

Bazı çalışmalarda HBeAg negatif KHB hastalarında serum HBsAg düzeyi ile intrahepatik cccDNA düzeyi arasında yetersiz ilişki saptanmıştır (13, 61, 62). İlginç olarak HBeAg pozitif KHB hastalarında serum HBsAg titresi ve HBV DNA ile

karaciğerdeki cccDNA arasında pozitif korelasyon olduğu bir çok çalışmada gösterilmiştir (13).

cccDNA seviyesi ve HBsAg düzeylerinin arasında anlamlı bir ilişki olduğunun gösterilmesi ile qHBsAg'nin, tedavi öncesindeki başlangıç, tedavi sırasındaki ya da bitimindeki düzeylerinin tedavi sonunda alınacak yanıtı tahmin etmede prekürsör görevi görebileceği çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir (60).

Son birkaç yılda HBsAg düzeyini tayin eden ölçüm yöntemlerinde gelişme kaydedilmiştir. HBsAg kantitasyonu için önerilen üç ticari kit mevcut:

1. Architect QT assay (Abbott Laboratories)

2. Elecsys HBsAg II Quant assay (Roche Diagnostics)

3. DiaSorin Liaison XL(10, 52)

Bu yöntemlerle viral minikromozomdan sentezlenen sirküle HBsAg'nin tüm 3 formu (sferil ve filamentoz subviral partiküller) da saptanmaktadır (52).

2.1.6.3. HBV DNA testleri

HBV enfeksiyonunun faklı dönemlerinin tanısında moleküler tanı yöntemleri kullanılmaktadır. Bu amacla polimeraz zincir reaksiyonu (PZR), real time PZR, DNA dizi analizi gibi yöntemlere başvurulur. HBV DNA'nın HBsAg'den yaklaşık 3 hafta kadar önce saptanabilir olması, özellikle sağlık personelindeki kan bulaşlarını içeren riskli temaslar başta olmak üzere enfeksiyon bulaşının erken tanısında HBV DNA saptanması son derece yardımcıdır. Ayrıca serolojik tanıda atlanabilen mutant enfeksiyonların gösterilmesi, virüsun genotiplendirilmesi, kronik hepatitte tedavi endikasyonu konulan hastalarda viral yük ölçümü ve tedaviye yanıtın takipinde viral yük monitorizasyonu, yanıtsızlık durumunda antiviral ilaç direncinin saptanmasında moleküler yöntemlere başvurulmaktadır (53). Moleküler testler yüksek analitik duyarlılık, geniş dinamik aralık, yüksek tekrarlanabilirlik ve genotipler arası test ölçüm farklılığının olmaması özelliklerine sahip olmalıdır. Tedavide ana hedef HBsAg'nin kandan temizlenmesidir. Bu temizlenme sonrası HBV DNA pozitifliği giderek azalır. Anti HBs pozitifleşmesi giderek artar. Serokonversiyon sonrası 4 yıla kadar karaciğer dokusunda cccDNA varlığını sürdürebilmektedir. Viral yük takibi günümüzde pahalı

ve her yerde yapılamayan bir yöntem olan PZR tekniği ile yapılmaktadır. Bununla beraber HBV DNA negatif olsa bile viral aktivite devam edebilir. Bu durum HBsAg ve HBcAg titrelerinin ölçümü ile ortaya konulabilmektedir. HBV'de moleküler testlere gereksinim:

- HBsAg negatif HBV enfeksiyonlarının tanısı (donörlerde)
- HBV enfeksiyonunun evrelendirilmesi
- HBeAg(-), anti HBe(+) enfeksiyonun takibinde
- Pre-cor mutantlarda replikasyonun gösterilmesi
- Antikor pozitif hastalarda replikasyonun gösterilmesi (anti HBs pozitif olduğunda da replikasyon devam edebilir; pre S1'de escape mutasyon)
- Tedaviye yanıtın değerlendirilmesi
- Mutant suş, direnç ve genotip belirlenmesi
- Viral yük (replikasyon aktivitesi)
- Okült HBV tanısı

2.1.6.4. Histopatolojik tanı-karaciğer biyopsisi

Histopatolojik inceleme karaciğerin yapısal bütünlüğü, hasar düzeyi ve tipi konusunda bilgi vermektedir. Karaciğerdeki inflamasyonun kantitatif değerlendirilmesi, fibrozisin evrelenmesi, doku mimarisinin değerlendirilmesi karaciğer iğne biyopsisi (KCİB) işleminde esas amaçlardır (63). KCİB ile 7.5±3.4 portal alana sahip, 17.7±5.8 mm uzunluğunda dokular alınabilmektedir (64). KCİB sonrası komplikasyonlar, ciddi ya da önemsiz sorunlar olarak iki başlık altında toplanabilir. Önemsiz kabul edilen sorunlar uygulama bölgesinde rahatsızlık hissi ve ağrı, geçici hipotansiyon (vazovagal) olarak tanımlanabilir. Ciddi sorunlar: ağrı (65), kanama (66, 67), safra yollarına kanama (hemobiliya) (68), safra peritoniti (69, 70), geçici bakteriyemi (71), perforasyon (72).

Knodell ve arkadaşlarının 1981'de yayınladığı çalışmayı temel alarak 1990'lı yıllarda kronik hepatitlerde sayısal değerlendirmeler yapılmaya başlandı. Günümüzde bütün

dünyada ve ülkemizde en fazla kullanılan, İshak ve arkadaşlarının 1995 yılında yayınladıkları ‘’Modifiye Knodell Sistemi’’ olarak da bilinen skorlama sistemidir. Bu sisteme göre periportal köprüleşme nekrozu, intralobüler dejenerasyon ile fokal nekroz, portal inflamasyonun değerlendirilmesinden elde edilen sayısal değerlerin toplamı histolojik aktivite indeksi (HAİ) olarak belirlenmiştir ve karaciğerdeki enflamasyonun şiddetini göstermektedir. Maksimum puanı 18’dir. Bağ dokusu boyaları ile gözlenen bağ dokusu artışı da portal genişlenmenin, fibröz köprüleşmelerin ve nodüllerin varlığı, yaygınlığına göre derecelendirilerek fibrozis-evre skoru olarak bildirilmektedir. Fibrozis düzeyleri 0, 1, 2, 3, 4, 5 ve 6 olarak değerlendirilir. Modifiye HAİ tablo 3’de verilmiştir.

Tablo 3: Modifiye Histolojik Aktivite İndeksi

Modifiye HAİ derecelendirilmesi Nekroenflamatuvar skorlar	
A. Periportal veya periseptal interface hepatiti (piecemal nekroz)	
Yok	0
Hafif (Fokal, birkaç portal alanda)	1
Hafif/Orta (Fokal, portal alanların çoğunda)	2
Orta (Trakt veya septaların %50'sinden azında, çevresinde devamlılık gösteren)	3
Şiddetli (Trakt ve septaların %50'sinden fazlasında, çevresinde devamlılık gösteren)	4
B. Konfluent nekroz	
Yok	0
Fokal konfluent nekroz	1
Zon 3 nekroz (bazı alanlarda)	2
Zon 3 nekroz (çoğu alanlarda)	3
Zon 3 nekroz + seyrek portal-santral köprüleşme	4
Zon 3 nekroz + çok sayıda portal-santral köprüleşme	5
Panasiner veya multiasiner nekroz	6
C. Fokal (spotty) litik lezyon, apoptozis ve fokal enflamasyon	
Yok	0
1 veya daha az odak (x100'lük her büyütmede)	1
2-4 odak (x100'lük her büyütmede)	2
5-10 odak (x100'lük her büyütmede)	3
10'dan fazla odak (x100'lük her büyütmede)	4
D. Portal enflamasyon	
Yok	0
Hafif (bazı ve tüm portal alanlarda)	1
Orta (bazı ve tüm portal alanlarda)	2
Orta/belirgin(tüm portal alanlarda)	3
Belirgin(tüm portal alanlarda)	4
Modifiye HAİ evrelendirmesi Yapısal değişiklikler, fibrozis, siroz	
Fibrozis yok	0
Birkaç portal alanda fibröz genişleme ± kısa fibröz septa	1
Çoğu portal alanda fibröz genişleme ± kısa fibröz septa	2
Çoğu portal alanda fibröz genişleme ve seyrek portal-portal köprüleşme	3
Portal alanlarda fibröz genişleme ve belirgin köprüleşme	4
Belirgin köprüleşme ile seyrek nodül (inkomplet siroz)	5
Siroz (olası ve kesin)	6

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Çalışma yeri ve zamanı

Bu çalışma Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakultesi (DEÜTF) Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalında 06 Ağustos 2016-07 Haziran 2017 tarihleri arasında yapıldı. Çalışmanın laboratuar işlemleri İNVİTRO laboratuvarında yapıldı.

3.2. Etik kurul onayı

Çalışmayla ilgili olarak Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik kurulundan 04.08.2016 tarihinde 2016/22-06 karar numarası ile etik kurul onayı alındı.

3.3. Aydınlatılmış onam

Hastalar, çalışma düzeni hakkında bilgilendirildi ve çalışmaya dahil edilmeden önce her hastaya aydınlatılmış onam formu okutularak imzalatıldı.

3.4. Hasta alımı

Literatür taraması sonucu önceki çalışmalar baz alınarak %90 güçte 0,05 hata payıyla korelasyon kat sayısı 0,40 alınarak çalışmaya alınacak örnek büyüklüğü en az 62 hasta (iki yönlü hipotez) olarak hesaplandı. Çalışmaya 06 Ağustos 2016-07 Haziran 2017 tarihleri arasında DEÜTF Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı polikliniği ve İç hastalıkları AD Gastroenteroloji Dal polikliniğine başvuran KHB tanılı hastalar alındı. Kronik Hepatit B tanı kriterilerine uyan, başvuru tarihinden önceki son 1 yıl içinde veya başvuru sonrasında karaciğer biyopsisi yapılmış, ancak tedavi almamış hastalar, gönüllü ve 18 yaşından büyük olması koşuluyla dahil edildi.

3.4.1. Kronik Hepatit B Tanı Kriterleri

- HBsAg'nin en az 6 ay süreyle pozitif olması
- Aktif viral replikasyon olması veya olmaması
- Karaciğer hasarı ve inflamasyon kanıtının olması

3.4.2. Dışlama kriterleri

- 18 yaşından küçük olmak
- Altta yatan ek bir kronik karaciğer hastalığı (HBV dışı nedene bağlı siroz, alkolik karaciğer hastalığı, otoimmun hepatit)
- Diabetes mellitus, tiroid hastalığı, tüberküloz, herhangi bir malignite varlığı
- HCV, HDV, HİV, HAV koinfeksiyonu
- Daha önceden veya çalışma anında kronik hepatit B tanısıyla antiviral tedavi kullanım öyküsü
- İmmunsupresyon (ilaç kullanımı vb.)
- Gebelik
- Otoimmun hastalık

Çalışmaya dahil edilen hastaların poliklinik ziyareti sırasında demografik verileri, ek hastalıkları, kullanmakta olduğu ilaçlar, karaciğer enzim düzeyleri, HBV DNA düzeyleri, HBV seroloji sonucları, karaciğer biyopsisi ile saptanmış olan hepatik aktivite indeksi ve fibrozis skoru önceden hazırlanmış olan olgu kayıt formlarına kaydedildi.

3.4.3.Kayıt edilen veriler

- Demografik veriler

Hastanın adı ve soyadı, cinsiyeti, yaş, boy, ağırlık

- Ek hastalıklar
- Kullanmakta olduğu ilaçlar
- Kronik Hepatit B tanı süresi
- Biyokimyasal ölçümler

AST, ALT, albümin, total bilirubin

- Serolojik veriler

HBeAg, anti HBeAg

- HBV DNA (IU/ml)
- Histolojik Aktivite İndeksi (HAİ)
- Fibrozis skoru

Hastalar kronik hepatit B'nin doğal seyrine göre klinik evrelere ayrıldı. Evrelendirme için HBeAg, HBV DNA, ALT değerlerine ve karaciğerde inflamasyonun varlığına bakıldı. Evrelendirme için kaynak olarak en güncel 'EASL 2017 Hepatit B virüs enfeksiyonu yönetimi' klavuzu kullanıldı (4).

- İmmuntolerant evre (yeni ismi HBeAg pozitif kronik HBV enfeksiyonu)
- İmmunreaktif evre (yeni ismi HBeAg pozitif kronik hepatit B)
- İnaktif taşıyıcı (yeni ismi HBeAg negatif kronik HBV enfeksiyonu)
- HBeAg negatif kronik hepatit B

3.5.Örnek toplanması ve saklanması

Başvuran ve çalışma kriterilerini karşılayan hastalardan rutin kontrol amaçlı istenen biyokimyasal ve hematolojik testler için kan alımı sırasında ayrıca 10 cc'lik biyokimya tüplerine kan alındı. Alınan kan örnekleri 5000 devirde 10 dakika santrifüj edildi. Tüpün üst kısmında toplanan serum, DNAaz/RNAaz dan arındırılmış 2 ml hacimli steril şeffaf mikrosantrifüj tüplerine alındı. Söz konusu serum örnekleri, çalışmanın yapılacağı güne kadar güneş ışığından korunarak ve -20˚C'de saklandı.

3.6.İstatiksel analiz

Veriler İBM Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) 22.0 programına kaydedildi. Tanımlayıcı istatistiklerde sayı, yüzde, ortalama ± standart sapma (minimum- maksimum değerleri); gruplar arası ortamaların karşılaştırılmasında 'Bağımsız iki örnek T testi' kullanıldı. Verilerin normal dağılıma uygun olup olmadığı 'Kolmogorov-Smirnov' testi ile değerlendirildi. Korelasyonların değerlendirilmesinde 'Pearson veya Spearman korelasyon analizi' kullanıldı. Korelasyon değerlendirilirken korelasyon gücü, korelasyon katsayısı (correlation coefficient=r_s) ile değerlendirilirken, $r_s<0.25$ ise zayıf ilişki, $0.25\leq r_s\leq 0.50$ orta güçlü ilişki, $0.50< r_s < 0.75$ güclü ilişki, $0.75\geq$ çok güçlü ilişki olarak değerlendirildi. Çalışmada HBeAg pozitif olan hastaların sayısı 30'dan küçük olduğu için nonparametrik veriler, Kruskal Wallis testi ve Mann Whitney U testi ile analiz edildi. $p<0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

3.7. Gerekli malzemeler

3.7.1 Hasta örneklerinin toplanması ve depolanması aşamasında kullanılanlar

- ü 10 cc hacminde steril plastik enjektör
- ü 10 cc hacminde kırmızı kapaklı seroloji tüpü
- ü 2 cc hacimde steril, şeffaf, DNAaz/RNAaz'dan arındırılmış mikrosantrifüj tüpü
- ü NF 815 santrifüj cihazı (Nüve)
- ü Derin dondurucu (-20°C ile -40°C derece aralığında)

3.7.2 Serum örneklerinin çalışılması için gerekli laboratuvar malzemeler

- ü 1-10, 10-100, 100-1000 µl'lik pipet ucu uyumlu otomatik pipetler
- ü Tek kullanımlık pipet uçları
- ü Örnek dilüsyonu için tek kullanımlık tüp
- ü HBsAg kantitatif ölçümü için kit (Elecsys HBsAg II quant assay, Roche Diagnostic) (Şekil 7)
- ü Cobas e411 immünolojik test analizörü (Roche Diagnostic, Almanya) (Şekil 8)



Şekil 7: HBsAg kantitatif ölçümü için kit (Elecsys HBsAg II quant assay, Roche Diagnostic)

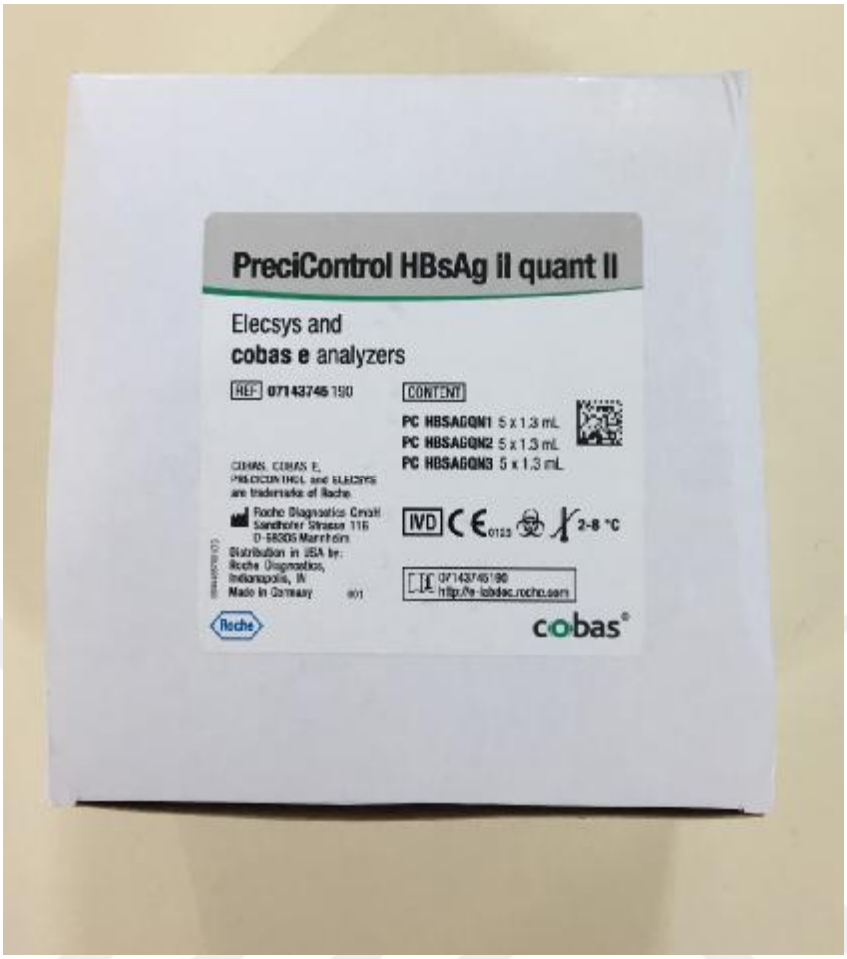
3.8. HBsAg kantitasyonu

Kitin ismi HBsAg II quant. Bu test elektrokemilüminesans immünolojik testidir.

3.8.1. Kitin içindekiler: Reaktifler - çalışma solüsyonları

Reaktif paketi (M, R1, R2), HBSAG-QN olarak etiketlenmiştir.

- M-Streptavidin kaplı mikropartiküller (saydam kapaklı), 1 şişe, 6,5 ml (içeriği: Streptavidin kaplı mikropartiküller 0,72 mg/ml; koruyucu madde)
- R1-Anti-HBsAg-Ab-biotin (gri kapaklı), 1 şişe, 8 ml (iki biotinlenmiş monoklonal anti-HBsAg antikorları (fare) >0,5 mg/l; fosfat tamponu 100 mmol/l, pH 7,5; koruyucu madde)
- R2-Anti-HBsAg-Ab-Ru(bpy) (siyah kapaklı), 1 şişe, 7 ml (Rutenyum kompleksi ile işaretlenmiş poliklonal anti-HBsAg antikoru (koyun) monokolonal anti-HBs antikoru (fare) kompleksi >1,5 mg/l; fosfat tamponu 100 mmol/l, pH 8,0; koruyucu madde)
- HBSAG-QN Cal1: Negatif kalibratör 1 (beyaz kapaklı), her birinde aşağıdakilerden 1.3 ml bulunan 2 şişe: insan serumu; koruyucu madde.
- HBSAG-QN Cal2: Pozitif kalibratör 2 (siyah kapaklı), her birinde aşağıdakilerden 1.3 ml bulunan 2 şişe: insan serumunda HBsAg yaklaşık 0,5 IU/ml; koruyucu madde.
- HBSAG-QN DilHepB: Her birinde aşağıdakilerden 36 ml bulunan beyaz kapaklı 2 şişe (HBsAg ve anti-HBs için negatif insan serumu, tamponlu, pH 6,5; koruyucu madde)



Şekil 8: HBsAg kantitatif test kitinin kontrol serumu (PreciControl HBsAg II quant II)

3.8.2. Testin çalışma prensibi

Testin Sandviç prensibi. Toplam test süresi: 18 dakika.

1. inkübasyon: 50 µL numune, iki biotinlenmiş monoklonal anti-HBsAg antikoru ve rutenyum kompleksiyle işaretlenmiş monoklonal anti-HBsAg antikoru ile poliklonal anti-HBs antikorlarının karışımı bir sandviç kompleksi oluşturur.

2. inkübasyon: Streptavidin-kaplı mikropartiküller eklendikten sonra biyotin ile streptavidinin etkileşimi aracılığıyla kompleks katı faza bağlanmış hale gelir.

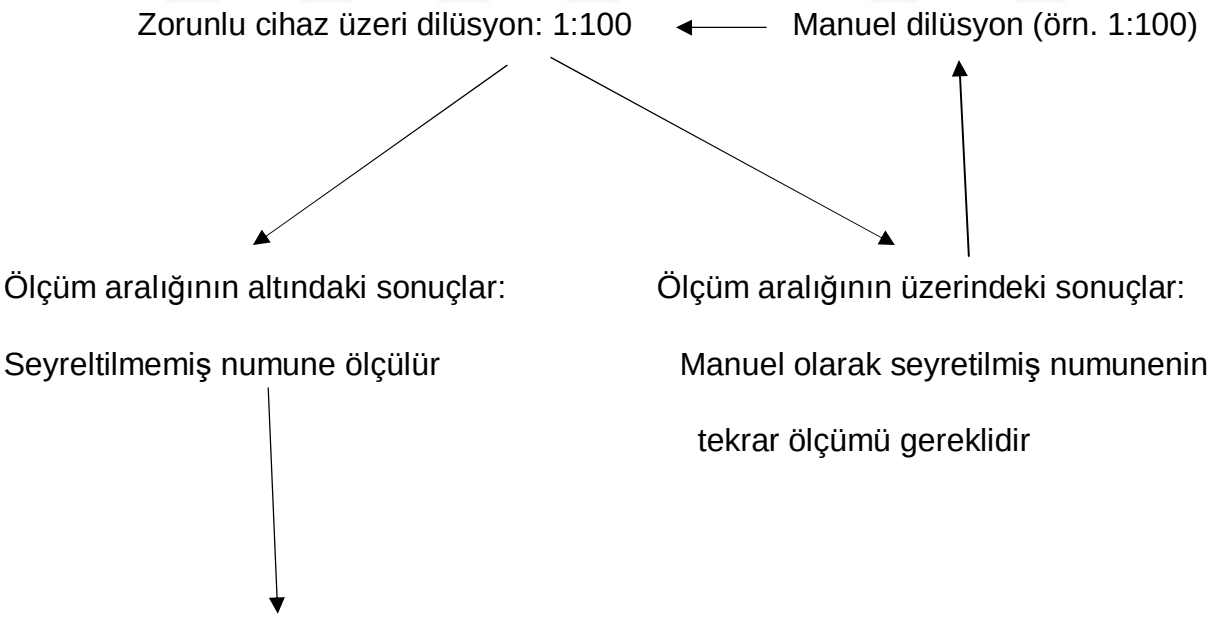
Reaksiyon karışımı, mikropartiküllerin elektrodun yüzeyine manyetik olarak yakalandıkları ölçüm hücresi içine aspire edilir. Bundan sonra bağlanmamış maddeler ProCell/ProCell M ile uzaklaştırılır. Elektrot üzerine voltaj uygulanması kemilüminesans emisyonunu indükler, bu da bir fotoçoğaltıcı ile ölçülür.

Sonuçlar, 2 noktalı kalibrasyon ile cihaza özel olarak oluşturulmuş bir kalibrasyon eğrisi ve reaktif barkodu aracılığıyla edinilen bir ana eğri (master) ile tayin edilir.

3.8.3. Testin Sınırları ve aralıkları

Önceden seyreltilmiş numuneler için ölçüm aralığı:

- 100 kat seyreltilmiş numuneler için 5-13000 IU/ml. Ölçüm aralığı altındaki değerler <5 IU/ml şeklinde rapor edilir.
- Ölçüm aralığının üzerindeki değerler >13000 IU/ml şeklinde rapor edilir.
- Dilüsyon: her numunenin başlangıçta HBSAG-QN DilHepB ile seyreltilmesi gerekir.
- Bizim çalıştığımız cobas e 411 analizörüyle dilüsyon için dilüsyon faktörü 1:100'dir. Yüksek konsantrasyondaki hasta numunelerinde önceden seyreltilmiş numuneler için ölçüm aralığı dahilinde sonuçlar alabilmek için daha fazla manuel dilüsyon adımı yapıldı. Manuel dilüsyondan sonra, alınan sonuc ilgili dilüsyon adımı için seçilen dilüsyon faktörüyle çarpıldı.



Şekil 9: Numuneler için test algoritması

3.8.4. Serum HBsAg düzeylerinin elektrokemilüminesans yöntemi ile çalışılması

1. Öncelikle -20°C'de saklanan hasta serumları ile +4°C'de saklanan reaktifler yaklaşık 20 °C'ye getirildi.
2. Hasta serumları kapaklı mikrosantrifüj tüplerinden test tüplerine aktarıldı (şekil 10).



Şekil 10: Cihaza verilmeden önce serumların kapaklı mikrosantrifüj tüplerinden test tüplerine aktarılması

3. Cihaza kit yerleştirmek için cihaz ''STANDBY'' konumuna getirildi.
4. ''SYSTEM OVERVIEW'' sayfasında ''REAGENT SCAN'' tuşuna basılarak cihazın koyduğumuz kiti tanıması sağlandı.
5. Liyofilize halde olan kontrol ve kalibrasyonlar uygun şekilde sulandırıldıktan sonra LOT numarası ile cihaza tanıtıldı.



1. hasta, kontrol ve kalibrasyon racklarının verildiği ve cihazdan çıktığı bölüm, 2.kitlerin konduğu bölüm, 3. pipet uçlarının ve çalışma küvetlerinin olduğu bölüm,4. yıkama sıvıları (proCell ve cleanCell) , 5. 3 litre distile suya 30 cc system wash konulan yıkama sıvısı, 6. sıvı atık bidonu, 7. pipet ve küvet atığı bölümü, 8. acil hasta verme bölümü

Şekil 11: Cobas e411 immünolojik test analizörü (Roche Diagnostic, Almanya)

6. Kitin kapağı cihaza yerleştirmeden önce gevşeterilerek açıldı.
7. Dairesel kapak açıldı ve kitler uygun şekilde (kit'in siyah kapağı dairenin iç kısmına gelecek şeklilde) yerleştirildi. Dairesel kapak kapatıldı (şekil 11).
8. Kalibratörler numune alanına yerleştirildi.
9. Kalibrasyon yapıldıktan sonra PreciControl HBsAg II kullanılarak kalite kontrol yapıldı (şekil 8).
10. Çalışılacak hasta serum örnekleri için her bir hastaya barkod okutuldu
11. Her bir tüp fotoğrafta görüldüğü gibi barkod kısmı rack'ın boşluk olan kısmına gelecek şekilde yerleştirildi (şekil 12).



Şekil 12: Serum konulan test tüpünün rack'a yerleştirilmesi

12. Cihazın sol kısmının ön tarafından çentiğe takılarak hazır hale getirildi .
13. Sonra cihaz ekranının sağ alt köşesinde ''START'' tuşuna basıldı. Karşımıza çıkan büyük ''START'' tuşuda tıklandı ve cihaz çalışmaya başladı.
14. Analizör, analit konsatrasyonunu HBSAG-QN Cal1 ve HBSAG-QN Cal2'nin ölçümüne dayanarak otomatik olarak hesaplandı (IU/ml)
15. Değerleri >13000 IU/ml olan hasta serumlarının tekrar çalışılması için ek olarak 1:100 oranında manuel dilisyon yapıldı (şekil 13).
16. Bu hastalar için, nihai sonuç dilüsyon faktörü hesaba katılarak manuel hesaplandı.



Şekil 13: HBSAG-QN Dil HepB ile manüel dilüsyon yapılması

4. BULGULAR

Çalışmamıza toplam 66 hasta dahil edildi. Hastaların 35'i (%53) erkek, 31'i (%47) kadındı. Hastaların yaşlarının 18 ile 76 arasında değiştiği ve ortalama 43.8 ± 13.7 olduğu saptandı. Hastaların serum HBV DNA düzeylerinin 32 IU/ml ile 971466909 IU/ml arasında değiştiği ve ortalama serum HBV DNA düzeylerinin 48449094 ± 184814242 IU/ml olduğu görüldü.

Çalışmaya alınan 66 hastanın en düşük HAİ skoru 2 olarak saptanırken, en yüksek HAİ skoru 10 olarak saptandı. Ortalama HAİ skoru 4.9 ± 1.9 olarak bulundu.

Hastalar fibrozis skoru açısından değerlendirildiğinde en düşük fibrozis skoru 0 saptanırken, en yüksek fibrozis skoru 5 olarak saptandı ve ortalama fibrozis skoru 0.9 ± 1.3 olarak bulundu.

Hastaların ALT düzeylerine bakıldığında en düşük 2 U/ml, en yüksek 328 U/ml ve ortalama ALT değeri 40 ± 48.01 U/ml saptandı.

Çalışmaya alınan hastaların 10'unun (%15.2) HBeAg pozitif, 56'sının (%84.8) HBeAg negatif olduğu görüldü. Kronik hepatit B'nin evrelerine göre sınıflandırıldığında, 7 (%10.6) kişinin immuntolerant, 3 (%4.5) kişinin immunreaktif, 40 (%60.6) kişinin inaktif taşıyıcı, 16 (%24.2) kişinin ise HBeAg negatif kronik hepatit B evresinde olduğu belirlendi.

Hastaların serum HBsAg düzeylerinin 36.62 IU/ml ile 779000 IU/ml arasında değiştiği ve ortalama serum HBsAg düzeylerinin 37917.67 ± 113005.53 IU/ml olduğu saptandı.

HBsAg düzeyleri ile cinsiyet arasındakı ilişkiye bakıldığında, kadın ve erkek cinsiyet arasında istatistiksel anlamlı fark saptanmadı (p=531) (Tablo 4).

Tablo 4: Hastaların cinsiyetine göre ortalama serum HBsAg düzeyi

Cinsiyet	Hasta sayısı (%)	HBsAg düzeyi (ortalama)	p değeri
Erkek	35 (53)	39865 ± 140021	0.531
Kadın	31 (47)	35719 ± 73752	
Toplam	66 (100)	37918 ± 113006	

Çalışmamızda yaş ile HBsAg düzeyleri arasındakı ilişkiye bakıldığında olumsuz yönde, orta güçte ve istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptandı (r=-0.286, p=0.02). Hastalar, yirmişer yıllık yaş gruplarına ayrıldığında, ortalama HBsAg düzeyleri ve yaş grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptandı (p=0.02) (Tablo 5).

Tablo 5: Yaş gruplarına göre ortalama HBsAg düzeylerinin dağılımı

Yaş grupları	Hasta sayısı (%)	HBsAg düzeyi (ortalama)	p değeri
18-37	18 (27.3)	98811 ± 189065	0.02
38-57	38 (57.6)	18426 ± 58931	
58-76	10 (15.2)	2379 ± 3034	
Toplam	66 (100)	37918 ± 113006	

Hastaların KHB evrelerine göre yaş dağılımına bakıldığında immuntoleran ve immunreaktif evrede inaktif taşıyıcı ve HBeAg negatif kronik hepatit evrelerine göre yaş ortalaması anlamlı olarak daha düşük saptanmıştır (p=0.017) (Tablo 6).

Tablo 6: Kronik hepatit B evrelerine göre hasta sayısı ve yaş ortalaması

Kronik hepatit B evreleri	Hasta sayısı (%)	Yaş ortalaması	p değeri
İmmuntolerant	7 (10.6)	30 ± 18	0.017
İmmunreaktif	3 (4.5)	29 ± 14	
İnaktif taşıyıcı	40 (60.6)	46 ± 12	
HBeAg negatif kronik hepatit	16 (24.2)	47 ± 12	
Toplam	66 (100)	43.8 ± 13.7	

Hastaların demografik verileri ve laboratuvar değerlerinin HBeAg sonucuna göre karşılaştırıldığında, HBV DNA anlamlı olarak HBeAg pozitif hastalarda daha yüksek saptandı (p<0.001) (Tablo 7).

Tablo 7: Hastaların demografik verileri ve laboratuvar değerlerinin HBeAg sonucuna göre karşılaştırılması

		Total	HBeAg(+)	HBeAg (-)	p değeri
Cinsiyet Sayı (%)	Kadın	31 (47.0*)	6 (19.4**)	25 (80.6**)	0.496
	Erkek	35 (53.0*)	4 (11.4**)	31 (88.6**)	
Yaş	Ortalama ±SD	43.8 ± 13.7	30.0 ±16.1	46.3 ± 11.8	0.189
ALT (U/ml)		40 ± 48.0	44.7 ± 26.3	39.2 ± 51.1	0.589
HAİ		4.9 ± 1.9	5.6 ± 2.2	4.7 ± 1.8	0.854
Fibrozis		0.9 ± 1.3	1.1 ± 1.9	0.8 ± 1.2	0.123
HBV DNA (IU/ml)		48449094 ± 184814242	216425619 ± 354227309	18452964 ± 117420806	**<0.001**
HBsAg düzeyi (IU/ml)		37918 ± 113006	144592 ± 108304	18869 ± 103606	0.053
*** Sütun yüzdesi, ** Satır yüzdesi**					

Çalışmaya dahil edilen kişilerin ALT düzeyleri ile serum HBsAg düzeyleri arasındakı ilişkiye bakıldığında, olumlu yönde, zayıf güçte, istatistiksel olarak anlamlı olmayan korelasyon saptandı (r=0.113, p=0.365).

HAİ düzeyleri ile HBsAg düzeyleri arasındakı ilişkiye bakıldığında pozitif yönde, zayıf, anlamlı olmayan korelasyon saptandı (r=0.23, p=0.062). Hastaların HAİ düzeyine göre kişi sayı dağılımı ve HBsAg düzeyleri Tablo 8'de verilmiştir.

Tablo 8: HAİ düzeyine göre kişi sayı dağılımı ve HBsAg düzeyleri

Histolojik aktivite Indeksi	Hasta sayısı (%)	HBsAg düzeyi (ortalama)	p değeri
2	4 (6.1)	4620 ± 6329	0.062
3	17 (25.8)	20913 ± 68453	
4	10 (15.2)	15570 ± 34375	
5	9 (13.6)	47619 ± 93546	
6	16 (24.2)	15407 ± 26789	
7	4 (6.1)	199966 ± 386121	
8	4 (6.1)	75089 ± 139675	
10	2 (3)	98780 ± 128439	
Toplam	66 (100)	37918 ± 113006	

Çalışmaya dahil edilen hastaların HAİ düzeyleri 1-5, 6-10 olarak 2 gruba ayrılarak incelendiğinde, gruplar arasında HBsAg düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı (Tablo 9). HAİ skoru ≥6 olan grupta, ≤5 olan gruba göre ortalama serum HBsAg düzeyi anlamlı olarak yüksek bulundu (p=0.037).

Tablo 9: HAİ gruplarına göre hasta sayısı ve ortalama HBsAg düzeylerinin dağılımı

Histolojik aktivite Indeksi grupları	Hasta sayısı (%)	HBsAg düzeyi (ortalama)	p değeri
1-5	40 (60.6)	23957 ± 64675	**0.037**
6-10	26 (39.4)	59396 ± 160891	
Toplam	66 (100)	37918 ± 113006	

Hastaların fibrozis skoru ile serum HBsAg düzeyleri arasındakı ilişkiye bakıldığında pozitif yönde, orta güçte ve istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptandı (r=0.386, p=0.001). Hastaların fibrozis skoruna göre kişi sayı dağılımı ve HBsAg düzeyleri Tablo 10'da verilmiştir

Tablo 10: Fibrozis skoruna göre kişi sayı dağılımı ve HBsAg düzeyleri

Fibrozis	Hasta sayısı (%)	HBsAg düzeyi (ortalama)	p değeri
0	36 (54.5)	20921 ± 56567	0.001
1	18 (27.3)	23626 ± 60392	
2	5 (7.6)	9985 ± 13587	
3	2 (3)	4086 ± 5478	
4	2 (3)	484300 ± 416769	
5	3 (4.3)	99148 ± 160590	
Toplam	66 (100)	37918 ± 113006	

Hastaların fibrozis skoru 0-2 ve 3-5 olarak 2 grup halinde incelendiğinde, 2 grup arasında serum HBsAg düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($p<0.001$) (Tablo 11). Fibrozis skoru ≥3 olan grupta, ≤2 olan gruba göre ortalama serum HBsAg düzeyi anlamlı olarak yüksek bulundu ($p<0.001$).

Tablo 11: Fibrozis gruplarına göre hasta sayısı ve ortalama HBsAg düzeylerinin dağılımı

Fibrozis grupları	Hasta sayısı (%)	HBsAg düzeyi (ortalama)	p değeri
0-2	59 (89.4)	20819 ± 55002	<0.001
3-5	7 (10.6)	182031 ± 286349	
Toplam	66 (100)	37918 ± 113006	

Hastaların HBV DNA düzeyleri ile serum ortalama HBsAg düzeyleri arasındakı ilişkiye bakıldığında pozitif yönde, güçlü düzeyde, istatistiksel anlamlı bir ilişki olduğu görüldü ($r=0.740$, $p<0.001$). Hastaların HBV DNA düzeyleri <2000 IU/ml, 2000 - 20000 IU/ml, >20000 IU/ml olarak 3 grup halinde incelendiğinde, 3 grup arasında oratalama HBsAg düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu saptandı (Tablo 12).

Tablo 12: HBV DNA gruplarına göre hasta sayısı ve ortalama serum HBsAg düzeyleri

HBV DNA grupları	Hasta sayısı (%)	HBsAg düzeyleri (ortalama)	p değeri
<2000 IU/ml	7 (10.6)	682 ± 478	<0.001
2000 - 20000 IU/ml	31 (47)	4010 ± 4418	
>20000 IU/ml	28 (42.4)	84767 ± 163603	
Toplam	66 (100)	37918 ± 113006	

HBeAg pozitif hastalarda serum HBsAg düzeyleri ve korelasyon analizi sonuçları

- Serum ortalama HBsAg düzeyi 144592 ± 108304 IU/ml saptanmış olup, HBeAg negatif hastalardan yüksek bulunmuştur. Ancak aradakı fark istatistiksel olarak anlamlı değildir (p=0.053).
- HBsAg düzeyi ile HBV DNA düzeyi arasında olumlu yönde, orta güçte, istatistiksel anlamlı olmayan bir korelasyon saptandı (r=0.309, p=0.385).
- HBsAg düzeyi ile HAİ düzeyi arasında olumlu yönde, zayıf güçte, istatistiksel anlamlı olmayan bir korelasyon saptandı (r=0.074, p=0.839).
- HBsAg düzeyi ile fibrozis skoru arasında olumlu yönde, güçlü düzeyde, istatistiksel anlamlı olmayan bir korelasyon saptandı (r=0.535, p=0.111).
- HBsAg düzeyi ile ALT düzeyi arasında olumlu yönde, güçlü düzeyde, istatistiksel anlamlı bir korelasyon saptandı (r=0.711, p=0.021).

HBeAg negatif hastalarda serum HBsAg düzeyleri ve korelasyon analizi sonuçları

- Serum ortalama HBsAg düzeyi 18869 ± 103606 saptandı.
- HBsAg düzeyi ile HBV DNA düzeyi arasında olumlu yönde, çok güçlü düzeyde, istatistiksel anlamlı bir korelasyon saptandı (r=0.992, p<0.001).
- HBsAg düzeyi ile HAİ düzeyi arasında olumlu yönde, zayıf güçte, istatistiksel anlamlı olmayan bir korelasyon saptandı (r=0.178, p=0.188).
- HBsAg düzeyi ile fibrozis skoru arasında olumlu yönde, orta güçte, istatistiksel anlamlı bir korelasyon saptandı (r=0.360, p=0.006).
- HBsAg düzeyi ile ALT düzeyi arasında olumlu yönde, zayıf güçte, istatistiksel anlamlı olmayan bir korelasyon saptandı (r=0.072, p=0.598).

Kronik hepatit B'nin evreleri ile ortalama HBsAg düzeyleri arasındakı ilişkiye bakıldığında HBsAg düzeyi immuntolerant ve immunreaktif evrede, inaktif taşıyıcı ve HBeAg negatif kronik hepatit B evrelerine göre daha yüksek saptanmıştır (Tablo 13).

Tablo 13: Kronik hepatit B evrelerine göre hasta sayısı ve ortalama serum HBsAg düzeyleri

Kronik hepatit B evreleri	Hasta sayısı (%)	HBsAg düzeyi (ortalama)	p değeri
İmmuntolerant	3 (4.3)	97993 ± 90192	<0.001
İmmunreaktif	7 (10.6)	253323 ± 55191	
İnaktif taşıyıcı	35 (53)	3762 ± 4670	
HBeAg negatif kronik hepatit B	21 (31.8)	56635 ± 192 801	
Toplam	66 (100)	37918 ± 113006	

KHB'nin evrelerinde serum HBsAg düzeyi ile HBV DNA düzeyi arasındakı ilişkiye bakıldığında, immuntoleran (r=0.643, p=0.119) ve immunreaktif evrede (r=0.500, p=0.667) pozitif yönde, güçlü düzeyde, istatistiksel anlamlı olmayan korelasyon saptandı. İnaktif taşıyıcı evresinde negatif yönde, zayıf güçte, istatistiksel olarak anlamlı olmayan korelasyon saptandı (r=-0.021, p=0.896). HBeAg negatif KHB evresinde ise pozitif yönde, çok güçlü düzeyde, istatistiksel anlamlı ilişki bulundu (r=0.992, p<0.001) (Tablo 14).

Tablo 14: Kronik Hepatit B evrelerinde serum HBsAg ve HBV DNA arasındakı korelasyon

Kronik hepatit B evreleri	r değeri	p değeri
İmmuntolerant	0.643	0.119
İmmunreaktif	0.500	0.667
İnaktif taşıyıcı	-0.021	0.896
HBeAg negatif kronik hepatit B	0.992	<0.001

5. TARTIŞMA

Hepatit B virüsü kronik karaciğer hastalıklarının dünyadaki en yaygın nedenlerinden birisidir. Dünya Sağlık Örgütünün (DSÖ) 2017 yıl raporuna göre global olarak 2015 yılında yaklaşık 257 milyon kronik Hepatit B (KHB) enfeksiyonu taşıyan kişi olduğu tahmin edilmektedir (1). Avrupa Hastalık Kontrol ve Koruma Merkezi'nin hepatit B'ye ilişkin teknik raporunda Türkiye'de genel populasyonda Hepatit B prevalansı %2-8 arasında bildirilmektedir (2). Etkili bir aşısı olan HBV enfeksiyonu yüksek morbidite ve mortaliteye neden olması nedeniyle önemli bir halk sağlığı problemi olmaya devam etmektedir (3-5).

Hepatit B virüs (HBV) enfeksiyonunun tanısı, virüsün yüzey antijeni (HBsAg)"nin saptanması ile başlar. Serumda HBV DNA, HBeAg, anti-HBe ve alanin aminotransferaz (ALT) testleri, radyolojik ve histopatolojik çalışmalarla kesin tanı konur.

Son yıllarda HBV alanındaki çalışmalarda, HBV DNA negatif olsa bile viral aktivite ve replikasyonun devam edebildiği ve bu aktivasyonun HBsAg'nin kantitatif olarak ölçümü ile gösterilebileceği gerçeği ortaya çıkmıştır. HBsAg konak genomuna entegre olmuş HBV DNA molekülünden konak enzimleri kullanılarak ya da transkripsiyonel aktif cccDNA molekülünün translasyonu sonucu üretilmektedir. Dolayısıyla teorik olarak kantitatif HBsAg düzeyinin intrahepatik HBV DNA, cccDNA miktarını ve cccDNA'nın transkrispsiyonel aktivitesini yansıttığı düşüncesine varılmıştır. cccDNA; enfekte hepatosit sayısını tam olarak yansıtmasına rağmen, cccDNA'nın dokuda değerlendirilmesi için kompleks tetkikler ve inzaviv girişim gerektiğinden kullanımı kısıtlıdır. HBV DNA ise viral replikasyonu gösteren bir parametre olup, pahalı bir tetkik olması sebebiyle her merkezde çalışılamamaktadır. Bu nedenle kantitatif HBsAg düzeyinin HBV DNA ve cccDNA yerine kullanılıp kullanılmayacağına ilişkin çalışmaların sayısı artmıştır.

Bu çalışmada önceki çalışmalaradan yola çıkarak kantitatif HBsAg düzeyi ile serum HBV DNA düzeyi ve karaciğer hasarını gösteren histolojik aktivite indeksi, fibrozis arasındaki ilişkiye bakıldı. Bu çalışmada kronik hepatit B tanısı olup, son 1 yılda karaciğer biyopsisi yapılmış 66 naiv hastada serum HBsAg düzeyi belirlendi.

Çalışmaya alınan hastaların %53 erkek, %47 kadındı. HBsAg düzeyleri ile cinsiyet arasındakı ilişkiye bakıldığında, kadın ve erkek cinsiyet arasında istatistiksel anlamlı fark saptanmadı. Zeng ve ark.'nın Çin'de 623 hastada yaptığı çalışmada, erkek cinsiyet oranı %73.2 , kadın cinsiyet oranı %26.8 olarak verilmiştir (73). Jaroszewicz ve ark.'nın Avrupa'da yaptığı çalışmada, 214 kronik hepatit B hastasının %65'i erkek, %35'i kadın saptanmıştır (74). Her İki çalışmada da, bizim çalışmamızla uyumlu olarak cinsiyet ile serum HBsAg düzeyi arasında ilişki saptanmamıştır.

Bu çalışmada yaş ile HBsAg düzeyleri arasındaki ilişkiye bakıldığında olumsuz yönde, orta güçte ve istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptandı (r=-0.286, p=0.02). Yaş arttıkça ortalama serum HBsAg düzeyinin azaldığı belirlenmiştir. Bunun nedeninin yaş ile kronik hepatit B enfeksiyonunun evresinin arasındaki ilişkiye bağlı olduğu düşünülmektedir. Yaş dağılımına bakıldığında immuntoleran ve immunreaktif evrede, inaktif taşıyıcı ve HBeAg negatif kronik hepatit B evrelerine göre yaş ortalaması anlamlı olarak daha düşük saptanmıştır (p=0.017). Jaroszewicz ve ark.'nın yaptığı çalışmada da bizim sonuçlarla uyumlu olarak serum HBsAg düzeyi ile yaş arasında negatif korelasyon olduğu saptanmıştır (r=-0.48, p<0.001). Bu çalışmada da bizim sonuçlarla uyumlu olarak immuntoleran ve immunreaktif evrede, inaktif taşıyıcı ve HBeAg negatif kronik hepatit B evrelerine göre yaş ortalamasının anlamlı olarak daha düşük olduğu görülmüştür (74). Chung ve ark.'nın yaptıkları çalışmada da bizim çalışmamızda olduğu gibi genç hastalarda daha ileri yaş hastalara göre serum HBsAg düzeyi anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (75). Zeng ve ark.'nın yaptığı çalışmada ise HBsAg kantitasyonunun yaşla ilişkili olmadığı görülmüştür (73).

Yapılan çalışmalarda serum HBsAg düzeyi ile hepatoselüler hasarın göstergesi olan ALT düzeyi arasında ilişki saptanmamıştır (10, 75). Nguyen ve ark.'nın 220 naiv hastada yatıkları çalışmada da HBsAg düzeyi ile ALT düzeyi arasında KHB'nin hiç bir evresinde korelasyon saptanmamıştır (15). Bizim çalışmamıza dahil edilen kişilerin ALT düzeyleri ile serum HBsAg düzeyleri arasında olumlu yönde, zayıf güçte, istatistiksel olarak anlamlı olmayan korelasyon saptandı (r=0.113, p=0.365). HBeAg pozitif hastalarda HBsAg düzeyi ile ALT düzeyi arasında olumlu yönde, güçlü düzeyde, istatistiksel anlamlı bir korelasyon (r=0.711, p=0.021) saptanırken, HBeAg negatif hastalarda olumlu yönde, zayıf güçte, istatistiksel anlamlı olmayan bir korelasyon saptandı (r=0.072, p=0.598). HBeAg pozitif hastalarda

HBsAg düzeyi ile ALT düzeyi arasındakı korelasyonun bu grupta hasta sayısının az olmasına bağlı olduğu düşünülmüştür. Jaroszewicz ve ark.'nın yaptığı çalışmada da bizim sonuçlarla uyumlu olarak serum HBsAg düzeyi ile ALT düzeyi arasında kronik hepatit B'nin hiç bir evresinde ilişki saptanmamıştır (74).

Bu çalışmada HAİ düzeyleri ile HBsAg düzeyleri arasında pozitif yönde, zayıf güçte, anlamlı olmayan korelasyon saptandı (r=0.23, p=0.062). HAİ skoru ≥6 olan grupta, ≤5 olan gruba göre ortalama serum HBsAg düzeyi anlamlı olarak yüksek bulundu (p=0.037). Cheng ve ark.'nin yaptıkları çalışmada HAİ skoru ≥5 olan grupta HBsAg ekspresiyonunun yüksek olduğu saptanmıştır (76). Türkiyeden, Başoda'nın yaptığı tez çalışmasında hastalar HAİ indeksine göre 0-4, 5-9, 10-18' lik gruplara ayrılarak incelendiğinde gruplar arasında HBsAg düzeyi açısından fark saptanmamıştır (77). Çalışmamızda HBeAg pozitif hastalarda HBsAg düzeyi ile HAİ düzeyi arasında pozitif yönde, zayıf güçte, istatistiksel anlamlı olmayan bir korelasyon saptandı (r=0.074, p=0.839). HBeAg negatif hastalarda ise HBsAg düzeyi ile HAİ düzeyi arasında olumlu yönde, zayıf güçte, istatistiksel anlamlı olmayan bir korelasyon saptandı (r=0.178, p=0.188).

Çalışmamızda hastaların fibrozis skoru ile serum HBsAg düzeyleri arasında pozitif yönde, orta güçte ve istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptandı (r=0.386, p=0.001). Fibrozis skoru ≥3 olan grupta, ≤2 olan gruba göre ortalama serum HBsAg düzeyi anlamlı olarak yüksek bulundu (p<0.001). Cheng ve ark.'nin 181 HBeAg pozitif kronik hepatit B'li hastalarda yaptıkları çalışmada fibrozis skoru ≥1 olan grupta HBsAg ekspresyonunun yüksek olduğu saptanmıştır (76). Çalışmamızda HBeAg pozitif hastalarda HBsAg düzeyi ile fibrozis skoru arasında olumlu yönde, güçlü düzeyde, istatistiksel anlamlı olmayan bir korelasyon saptandı (r=0.535, p=0.111). HBeAg negatif hastalarda ise HBsAg düzeyi ile fibrozis skoru arasında olumlu yönde, orta güçte, istatistiksel anlamlı bir korelasyon saptandı (r=0.360, p=0.006). Martinot-Peignoux ve ark.'larının yaptıkları 101 HBeAg pozitif ve 305 HBeAg negatif hastanın dahil olduğu çalışmada HBeAg pozitif hastalarda serum HBsAg düzeyi ile fibrozis arasında olumsuz yönde, güçlü korelasyon olduğu (r=-0.43, p<0.001), HBeAg negatif hastalarda ise korelasyon olmadığı saptanmıştır (78). Bu çalışamanın sonuçlarının bizim çalışmamızda alınan sonuçlara zıt olmasının, bu çalışmada HBeAg pozitif hasta sayısının çok olması, HBeAg pozitif grupta ortalama fibrozis skorunun yüksek bulunmasına bağlı olduğu düşünülmektedir.

Yapılan çalışmalarda HBsAg düzeyi HBeAg pozitif hastalarda daha yüksek bulunmuştur (10, 76). Bizim çalışmamızda serum ortalama HBsAg düzeyi 144592 ± 108304 IU/ml saptanmış olup, HBeAg negatif hastalardan yüksek bulunmuştur. Ancak aradakı fark istatistiksel olarak anlamlı değildir (p=0.053). Nguyen ve ark.'nın yaptıkları çalışmada da benzer olarak HBeAg pozitif hastalarda HBsAg düzeyi HBeAg negatif hastalardan yüksek bulunmuştur (15). Fransız çalışmasında da HBsAg düzeyi HBeAg pozitif hastalarda HBeAg negatif hastalardan yüksek saptanmıştır (57).

HBV DNA, aktif viral replikasyonun en iyi belirtecidir. Literatürde HBsAg düzeyi ile serum HBV DNA düzeyi arasındakı ilişkiyi gösteren çoklu sayıda çalışma mevcuttur (57, 74). Bizim çalışmada hastaların HBV DNA düzeyleri ile serum ortalama HBsAg düzeyleri arasında pozitif yönde, güçlü düzeyde , istatistiksel anlamlı bir ilişki olduğu saptandı (r=0.740, p<0.0001). Hastaların HBV DNA düzeyleri <2000 IU/ml, 2000 - 20000 IU/ml, >20000 IU/ml olarak 3 grup halinde incelendiğinde, 3 grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu saptandı (p<0.001). Thompson ve ark.'nin yaptıkları çalışmada bizim sonuçlarla uyumlu olarak serum HBsAg düzeyi ile serum HBV DNA arasında pozitif korelasyon saptanmıştır (r=0.58, p<0.001). Aynı çalışmada HBeAg pozitif hastalarda serum HBsAg düzeyi ile HBV DNA arasında güçlü korelasyon (r=0.69, p<0.0001) saptanırken, HBeAg negatif hastalarda zayıf korelasyon (r=0.28, p=0.012) saptanmıştır (79). Bizim çalışmamızda HBeAg pozitif hastalarda HBsAg düzeyi ile HBV DNA düzeyi arasında olumlu yönde, orta güçte, istatistiksel anlamlı olmayan bir korelasyon (r=0.309, p=0.385) saptanırken, HBeAg negatif hastalarda HBsAg düzeyi ile HBV DNA düzeyi arasında olumlu yönde, çok güçlü düzeyde, istatistiksel anlamlı bir korelasyon saptandı (r=0.992, p<0.001). Alghamdi ve ark.'nın yaptıkları 106 HBV-genotip D HBeAg negatif hastanın katıldığı çalışmada bizim sonuçlarla uyumlu olarak HBeAg negatif hastalarda HBsAg düzeyi ile HBV DNA düzeyi arasında pozitif yönde, orta güçte, anlamlı ilişki saptanmıştır (r=0.402, p<0.0001) (80). Jaroszewicz ve ark.'nın yaptıkları çalışmada da benzer sonuçlar bulunmuştur. Bu çalışmaya dahil olan hastaların % 59,8'i HBV-genotip D ve % 25.3'ü HBV-genotip A'dır. Tüm hastalar değerlendirildikten sonra genotipler alt grup olarak ayrı değerlendirilmiştir. Hastaların tümünde HBsAg düzeyi ile HBV DNA düzeyi arasında güçlü, istatistiksel anlamlı korelasyon saptanmıştır (r=0.75, p<0.001). HBV-genotip D'de HBs Ag düzeyi ile HBV DNA düzeyi arasında çok güçlü düzeyde

anlamlı korelasyon ((r=0.82, p<0.001) saptanırken, HBV-genotip A'da zayıf güçte, istatistiksel anlamlı olmayan korelasyon (r=0.28, p=0.13) saptanmıştır (74). Liu ve ark.'nın yaptıkları çalışmada da genel hasta grubunda HBsAg düzeyi ile HBV DNA düzeyi arasında zayıf korelasyon saptanmıştır (r=0.172, p<0.001). Ancak HBeAg pozitif hastalarda önemli derecede pozitif korelasyon saptanmıştır (r=0.321, p<0.001) (81). Martinot-Peignoux ve ark.'larının yaptıkları çalışmada da, HBsAg düzeyi ile HBV DNA düzeyi arasındakı ilişkiye bakıldığında, HBeAg pozitif hastalarda güçlü korelasyon (r=0.44, p<0.0001) saptanırken, HBeAg negatif hastalarda korelasyonun olmadığı görülmüştür (57). Çalışmamızda HBeAg pozitif hasta oranı HBeAg negatif hasta oranına göre çok düşük olduğu için bu farkın olduğu düşünülmektedir. Türkiyeden yapılan çalışmalara bakıldığında Başoda'nın yaptığı tez çalışmasında ise HBeAg pozitif grupta HBsAg seviyesi ile HBV DNA arasında negatif yönde, orta güçte korelasyon saptanırken, HBeAg negatif grupta yine negatif yönde fakat zayıf güçte korelasyon saptanmıştır. Bizim çalışmamızın sonuçları ile uyumlu olmayan bu durumun açıklaması olarak; bazı vakalarda HBsAg (-) iken, HBV DNA'nın pozitif olması durumunda HBsAg sentezleyen gende mutasyon olduğu düşünülür ki, HBsAg düşük iken HBV DNA seviyesinin yüksek olması durumunun da benzer mutasyonlara (özelikle de HBsAg'e karşı gelişen antikorların bağlantı bölgesi olan 'a determinantında' gelişen mutasyonlar) bağlı olduğu düşünülmüştür (77).

Bizim çalışmada kronik hepatit B'nin evreleri ile ortalama HBsAg düzeyleri arasında ilişkiye bakıldığında HBsAg düzeyleri immuntolerant ve immunreaktif evrede, inaktif taşıyıcı ve HBeAg negatif kronik hepatit B evrelerine göre daha yüksek saptanmıştır. KHB'nin evrelerinde serum HBsAg düzeyi ile HBV DNA düzeyi arasındakı ilişkiye bakıldığında, immuntoleran (r=0.643, p=0.119) ve immunreaktif evrede (r=0.500, p=0.667) pozitif yönde, güçlü düzeyde, istatistiksel anlamlı olmayan korelasyon saptandı. İnaktif taşıyıcı evresinde negatif yönde, zayıf güçte, istatistiksel olarak anlamlı olmayan korelasyon saptandı (r=-0.021, p=0.896). HBeAg negatif kronik hepatit evresinde ise pozitif yönde, çok güçlü düzeyde, istatistiksel anlamlı ilişki bulundu (r=0.992, p<0.001) . Zeng ve ark.'nın yaptıları çalışmada ise HBsAg düzeyi ile HBV DNA arasında immunreaktif evresinde güçlü (r=0.683, p<0.001), HBeAg negatif kronik hepatit B (r=0.342, p=0.001) ve immuntolerant evrede (r=0.287, p=0.003) orta, inaktif taşıyıcı evrede (r=0.156, p=0.071) ise zayıf düzeyde korelasyon saptanmıştır (73). Chung ve ark.'larının yaptıkları çalışmada ise immuntolerant

(r=0.804, p<0.001) ve immunreaktif (r=0.773, p<0.001) evrede çok güçlü, inaktif taşıyıcı (r=0.289, p=0.002) evrede orta düzeyde korelasyon saptanmışken, HBeAg negatif kronik hepatit B evresinde ise anlamlı korelasyon saptanmamıştır (r=0.146, p=0.237) (75). Nguyen ve ark.'ının yaptıkları 220 naiv kronik hepatit B hastasının dahil olduğu Asya kohortunda serum HBsAg düzeyi ile HBV DNA düzeyi arasında immunreaktif evrede pozitif yönde, çok güçlü, istatistiksel anlamlı (r=0.77, p=0.0001), immuntolerant evrede pozitif yönde, orta güçte, istatistiksel anlamlı olmayan, inaktif taşıyıcı evresinde pozitif yönde, zayıf güçte, anlamlı olmayan, HBeAg negatif kronik hepatit evresinde pozitif yönde, orta güçte, anlamlı korelasyon saptanmıştır (15). Avrupa kohortunda ise HBsAg düzeyi ile HBV DNA düzeyi arasında immuntolerant (r=0.34, p=0.07) ve HBeAg negatif kronik hepatit B evresinde (r=0.26, p=0.05) orta güçte, inaktif taşıyıcı (r=0.22, p=0.07) ve immunreaktif (r=0.11, p=0.48) evrelerinde ise olumlu yönde, zayıf güçte istatistiksel anlamlı olmayan ilişki saptanmıştır. Aynı çalışmada genotiplere göre incelendiğinde genotip A'da immunreaktif evrede HBsAg düzeyi ile HBV DNA arasında korelasyon saptanmazken (r=-0.24, p=0.44) , genotip D'de orta güçte korelasyon (r=0.46, p=0.05) olduğu görülmüştür. Aynı zamanda immunreaktif evresindeki sonuca benzer şekilde HBeAg negatif hepatit B evresinde genotip A'da HBsAg düzeyi ile HBV DNA arasında korelasyon saptanmazken (r=-0.07, p=0.81) , genotip D'de orta güçte korelasyon (r=0.47, p=0.02) olduğu görülmüştür (74). HBV-genotip A ve HBV-genotip D arasında HBsAg sentezinin farklı olduğu daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir. HBV-genotip A olan hastalarda HBV DNA düzeyinden daha yüksek düzey HBsAg sentezi preS/S mRNA'nın transkripsiyonunun daha yüksek olmasına bağlı olarak açıklanabilir (82). Genotipler arasındakı farkı açıklayan bir başka neden HBV-genotip D'nin pre-core veya bazal core promotor varyant mutasyonlara daha duyarlı olmasıdır. Bu varyant mutasyonu olanlarda HBsAg sentezi daha düşük olmaktadır (83). HBV-genotip A ile diğer genotipler arasındakı bu farkı açıklayacak bir başka neden doğal ve edinilmiş immun yanıtların farklı olmasıdır. HBV-genotip A ile enfekte kişilerde interferon bazlı tedavilere iyi yanıtın nedeni olarak güçlü bir immun yanıt oluşturmasıdır (84). Bu da HBV-genotip A'da HBsAg düzeylerinin faklılığını ve HBV DNA düzeyi ile arasında korelasyon olmamasını açıklayabilir. HBV-genotip D olan hastalarda bu durumlar olmadığı için genel olarak çalışmalarda HBsAg düzeyi ile HBV DNA düzeyi arasında korelasyon olduğu gösterilmiştir. Sonuçların çalışmalar arası farklı olması toplumlar arası genotip dağılımının farklı olmasına bağlı olabileceği düşünülmektedir.

Türkiye HBV için orta endemisite bölgesi olup, toplumun %2-8'i HBV ile enfektedir Türkiyede HBV-genotip D hakimdir (31).Türkiye'den KHB hastalarında HBsAg düzeyi ile HBV DNA ve karaciğer hasarını gösteren HAİ, fibrozis arasındakı korelasyonu gösteren az sayıda çalışma mevcuttur. Bu konuda bizim toplumumuzu yansıtan az sayıda çalışma olması nedeniyle bu çalışma yapıldı. Yabancı literatürle uyumlu olarak serum HBsAg düzeyi ile HBV DNA düzeyi arasında güçlü düzeyde, anlamlı korelasyon saptandı. Serum HBsAg düzeyi ile karaciğer hasarını gösteren HAİ skoru arasında zayıf düzeyde, anlamlı olmayan, fibrozisle ise orta güçte anlamlı korelasyon saptandı. Bu sonuça göre, serum HBsAg düzeyinin KHB'li hastalarda fibrozis derecesi hakkında fikir edinilebileceği düşünülmüştür.

Çalışmaya dahil edilen hasta sayımızın az olması, hastalarımızın HAİ düzeyinin en yüksek 10 olması, fibrozis skoru yüksek olan hasta sayısının az olması, HBe Ag pozitif hasta oranının düşük olması çalışmamızın kısıtlılıklarıdır. Daha geniş hasta serilerinde yapılacak ileri çalışmalar yapılması gerektiği düşünülmektedir.

6. SONUÇ

Sonuç olarak, bizim çalışmamızda serum HBsAg kantitasyonu ile HBV DNA arasında güçlü ve istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon saptanmıştır. Kronik hepatitin evrelerinde ortalama HBsAg düzeyleri farklılık göstermesine karşın, üç evrede (immuntolerant, immunreaktif, HBeAg negatif kronik hepatit B) HBV DNA düzeyi ile HBsAg düzeyi arasında pozitif korelasyon saptanmıştır. HBsAg düzeyinin karaciğer hasarını gösteren HAİ ve fibrozis ile karşılaştırıldığında, HAİ ile zayıf güçte, anlamlı olmayan bir ilişki saptanırken, fibrozis ile orta güçte, anlamlı bir ilişki saptanmıştır. HBV DNA, kronik hepatit B enfeksiyonunun evrelendirilmesi, tedavi kararı ve izleminde önemli bir parametredir. Ancak testin pahalı olması ve uygulanması için eğitimli personel ve ekipman gerektirmesi nedeniyle her merkezde bakılamamaktadır. HBsAg kantitasyonunun KHB enfeksiyonunun doğal seyrinin ve hastalık aktivasyonunun takibinde HBV DNA'ya alternatif olabilecek potansiyel bir belirteç olduğu düşünülmektedir.Testin maliyetinin düşük olması ve uygulama kolaylığı daha yaygın kullanımı için avantajdır. Özellikle, HBV'nin endemik olduğu bölgelerde aktif HBV enfeksiyonunun taranmasında kalitatif HBsAg ve kantitatif HBV DNA testlerinin kombine kullanımından ziyade, kantitatif HBsAg testinin ilk sıra test olarak kullanımının maliyet etkin olacağı düşünülmektedir. Bu bulguların daha ileri çalışmalarla desteklenmesi gerekmektedir. KHB tanılı hastalarda serum HBsAg düzeyinin hastalığın doğal seyri boyunca uzun süreli düzenli takip edildiği ve antiviral tedavi yanıtının öngörülmesindeki önemi değerlendirilen geniş katılımlı prospektif çalışmalara ihtiyaç vardır.

7. KAYNAKLAR

1. World Health Organization. Global Hepatitis Report. 2017.
2. Türkiye Hepatit B Yol Haritası. Türkiye Karaciğer Araştırmaları Derneği Yayını 2012: 1-38
3. Ustaçelebi Ş, Ergünay K. Hepatit B virüsünün Moleküler Virolojisi. In: Tabak F, Balık İ, Tekeli E, editors. Viral Hepatit 2007. 1 ed: Viral Hepatitle Savaşım Derneği 2007. p. 96-107
4. European Association fort he Study of the Liver.EASL clinical practice guidelines:management of chronic hepatitis B. . J Hepatol 2017.
5. Dienstag J. Hepatitis B virüs infection. New England Journal of Medicine 2008;359:1486-500
6. Terrault NA, Bzowej NH, Chang KM, Hwang JP, et al. AASLD Guidelines for Treatment of Chronic Hepatitis B. J Hepatology. 2016;63(1):261-83.
7. Elizabeth MB. Grading and Staging the Histopathological Lesions of Chronic Hepatitis:The Knodell Histology Activity İndex and Beyond. Hepatology 2000;31:1.
8. Bedossa P, Dargere D, Paradis V. Sampling variability of liver fibrosis in chronic hepatitis B. Hepatology. 2003;38:1449-57.
9. Nguyen DH, Ludgate L, Hu J. Hepatitis B virüs-cell interactions and pathogenesis. J Cell Physiol 2008;216:289-94
10. Martinot-Peignoux M, Lapalus M, Asselah T, Marcellin P. The role of HBsAg quantification for monitoring natural history and treatment outcome. Liver İnt 2013;33(1):125-32.
11. Xun YH, Zang GQ, Guo JC, Yu XL, et al. Serum hepatitis B surface antigen quantification as a useful assessment for significant fibrosis in hepatitis B e-antigen-positive hepatitis B virüs carriers. J Gastroenterol Hepatol 2013;28:1746-55
12. Kuo A, Gish R. Chronic hepatitis B infection. Clin Liver Dis 2012;16:347-69
13. Thompson AJ, Nquyen T, İser D, Ayres A, et al. Serum hepatitis B surface antigen and hepatitis B e antigen titers:disease phase influences correlation with viral load and intrahepatic hepatitis B virüs markers. Heaptology 2010;51:1933-44.
14. Bommel FV, Man Rd, Wedemeyer H, Deterding K, et al. Long-term efficacy of tenofovir monotherapy for hepatitis B virüs-monoinfected patients after failure of nucleoside/nucleotide analogues. Hepatology 2010;51:73-80.

15. Nguyen T, Thompson AJ, Bowden S, Croagh C, et al. Hepatitis B surface antigen levels during the natural history of chronic hepatitis B: a perspective on Asia. J Hepatol 2010;52:508-13

16. Tseng TC, Liu CJ, Xang HC, Su TH, et al. Serum hepatitis B surface antigen levels help predict disease progression in patients with low HBV Loads. Hepatology 2013;57:441-50.

17. Su TH, Liu CJ, Tseng TC, Liu CH, et al. Longitudianl change of HBsAg in HBeAg-negative patients with genotype B or C infection. PLoS One 2013;8:e55916.

18. Vyas GN, Yen TSB. Hepatitis B virus - Biology, pathogenesis, epidemiology, clinical description, and diagnosis. In: Specter S, editor. Viral Hepatitis- Diagnosis, Therapy, and Prevention. New Jersey: Humana Press; 1999. p. 35.

19. Hollinger FB. Hepatitis B virus. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, editors. Fields Virology. Philadelphia: Lippincott- Raven Publishers; 1996. p. 2738.

20. Ganem D. Hepadnaviridae and their replication. In: Fields BN, Knipe DM, Hawley PM, editors. Fields Virology. Philadelphia: Lippincott- Raven Publishers; 1996. p. 2703.

21. Kann M. Structural and Molecular Virology. In: Lai CL, Locarnini S, editors. Hepatitis B virus. London: İnternational Medical 2002. p. 9-22.

22. Jilbert AR, Burrel CJ, Triatni M, Kann M. Hepatitis B Virus Replication. In: Lai CL, Locarnini S, editors. Hepatitis B Virus. London: İnternational Medical Press; 2002. p. 43-53.

23. Flint SJ, Enquist LW, Racaniello VR, et al. Principles of Virology. 2nd ed. Washington DC: ASM Press; 2004. p. 808.

24. Terrault NA, Wright TL. Viral Hepatitis A through G. In: Feldman M, Scharschmidt BF, Sleisenger MH, editors. Sleisenger & Fordtran's Gastrointestinal and Liver Disease: Phatophysiology, Diagnosis, Management. New York: W.B. Saunders Company; 1998. p. 1123-55.

25. Murray PR, Rosenthal KS, Kobayashi GS, Pfaller MA. Hepatitis viruses. In: Murray PR, Rosenthal KS, Kobayashi GS, et al, editors. Medical Microbiology. 4th ed. St. Louis: Mosby; 2002. p. 591-605.

26. Murray JM, Purcell RH, Wieland SF. The half-life of hepatitis B virions. Hepatology. 2006;44:1117-21.

27. Seeger C, Mason WS. Hepatitis B virus biology. Microbiol Mol Biol Rev. 2000;64(1):51-68.

28. Milich D, Liang TJ. Exploring the biological basis of hepatitis B e antigen in hepatitis B virus infection. Hepatology. 2003;38:1075-86.
29. Andrisani OM, Barnabas S. The transcriptional function of the hepatitis B virus X protein and its role in hepatocarcinogenesis. İnt J Oncol. 1999;15(2):373-9.
30. Zoulim F. New insights on hepatitis B virus persistence from the study of intrahepatic viral cccDNA. J Hepatol. 2005;42:302-8.
31. Türkiye Hepatit B Yol Haritası. Türkiye Karaciğer Araştırmaları Derneği Yayını. 2015:1-36.
32. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Hepatitis B and C in the EU neighbourhood: prevalence burden of disease a. September 2010
33. Mıstık R. Ülkemizde kronik viral hepatitlerin epidemiyolojisi. Klimik Dergisi. 2007;20 (özel sayı 1):61-3.
34. Tözün N, Özdoğan OC, Çakaloğlu Y, İdilman R, Karasu Z, Akarca US, et al. A nationwide prevalence study and risk factors for hepatitis A, B, C and D infections i n Turkey. The 61st Annual meeting of the American Association for the study of liver diseases (AASLD). Oct29-Nov2 2010, Boston: (Poster presentation, No.789)
35. Dodd RY. The risk of transfusion-transmitted infection. N Engl J Med. 1992;327:419-21.
36. Alter MJ, Hadler SC, Margolis HS. The changing epidemiology of hepatitis B in the United States:need for alternative vaccination strategies. JAMA. 1990;263:1218-22.
37. Wasley A, Grytdal S, Gallagher K. Surveillance for Acute Viral Hepatitis - United States 2006. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 2008;57:1-24.
38. Gerberding JL. The infected health care provider. N Engl J Med. 1996;334:594-5.
39. Taşyaran MA. HBV İnfeksiyonu Epidemiyolojisi. In: Tekeli E, Balık İ, editors. Viral Hepatit 2003: Viral Hepatit Savaşım Derneği; 2003. p. 121-8.

40. Karayiannis P, Novick DM, Lok AS. Hepatitis B virus DNA in saliva, urine and seminal fluid of carriers of hepatitis B e antigen. Br Med J. 1985;290:1853-5.
41. Martino Md, Appendino C, Resti M. Should hepatitis B surface antigen positive mothers breast feed? Arch Dis Child. 1985;60:972-4.
42. Hill JB, Sheffield JS, Kim MJ. Risk of hepatitis B transmission in breast -fed infants of chronic hepatitis B carriers. Obstet Gynecol. 2002;99:1049-52.
43. Bond WW, Favero MS, Petersen NJ, Gravelle JR, et al. Survival of hepatitis B virus after drying and storage for one week. The Lanset. 1981;1(8219):550-1.
44. Hecke EV, Paradijs J, Molitor C, al. e. Hepatitis B virus-specific cytotoxic T lymphocyte responses in patients with acute and chronic hepatitis B virus infection. J Hepatol. 1994;20 514-23.
45. Koziel MJ. Immunology of viral hepatitis. Am J Med. 1996;100:98-109.
46. Chang JJ, Lewin. SR, . Immunopathogenesis of hepatitis B virus infection. Immunology and Cell Biology. 2007;85:16-23.
47. Guidotti LG, Chisari FV. Cytokine-mediated control of viral infections. Virology. 2000;273:221-27.
48. Kuruüzüm Z, Ozgenç O, Havuk A, Coşkuner A, et al. Rate of chronicity and time of disappearance of HBsAg following acute hepatitis B. Hepatogastroenterology. 2009;56(90):466-9.
49. Milich DR, Sallberg M, Maruyama T. The humoral immune response in acute and chronic hepatitis B virus infection. Springer Senim İmmuno-pathol. 1995;17:149-66.
50. European Association for the Study of the Liver. EASL clinical practice guidelines: Management of chronic hepatitis B virus infection. J Hepatol. 2012;57:167-85.
51. Mason WC, Gill US, Litwin S, Zhou Y, et al. HBV DNA integration and clonal hepatocyte expansion in chronic hepatitis B patients considered immune tolerant. Gastroenterology. 2016;151:986-98.
52. Cornberg M, Wong VW-S, Locarnini S, Brunetto M, et al. The role of quantitative hepatitis B surface antigen revisited. Hepatology. 2017;66:398-411.
53. Uz T. Hepatitlerde tanı. 35TMC Kongresi Kongre kitabi. 2012.
54. Mıstık R. Viral Hepatitler. In: Altındiş M, editor. Hemşireler için mikrobiyoloji. İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri; 2010. p. 268-9.

55. Sonsuz A. Kronik Hepatit B ve C. İÜ Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri. 2007:77-9.
56. Fung J, Lai C-L, Tanaka Y, Mizokami M, Yuen J, et al. The duration of lamivudine therapy for chronic hepatitis B: cessation vs. continuation of treatment after HBeAg seroconversion. J Gastroenterol. 2009;104(8):1940–6

57. Martinot-Peignoux M, Asselah T, Marcellin P. HBsAg quantification to optimize treatment monitoring in chronic hepatitis B patients. Liver İnt. 2015;35(1):82–90.
58. Rodella A, Galli C, Terlenghi L, Perandin F, et al. Quantitative analysis of HBsAg, İgM anti-HBc and anti-HBc avidity in acute and chronic hepatitis B. J Clin Virol. 2006, Nov;37(3):206-12.
59. Werle–Lapostolle B, Bowden S, Locarnini S, Wursthorn K, et al. Persistence of cccDNA during the natural history of chronic hepatitis B and decline during adefovir dipivoxil therapy. Gastroenterology. 2004;126(7):1750–8.
60. Wursthorn K, Lutgehetmann M, Dandri M, Volz T, et al. Peginterferon alpha-2b plus adefovir induce strong cccDNA decline and HBsAg reduction in patients with chronic hepatitis B. Hepatology. 2006;44(3):675–84.
61. Lin LY, Wong VW, Zhou HJ, Chan HY, et al. Relationship between serum hepatitis B virus DNA and surface antigen with covalently closed circular DNA in HBeAg-negative patients. J Med Virol. 2010;82:1494-500.
62. Manesis EK, Papatheodoridis GV, Tiniakos DG, Hadziyannis ES, et al. Hepatitis B surface antigen: relation to hepatitis B replication parameters in HBeAg-negative chronic hepatitis B. J Hepatol. 2011;55:61-8.
63. Theise ND. Liver biopsy assessment in chronic viral hepatitis: a personal, practical approach. Mod Pathol. 2007;20(1):S3-14.
64. Cholongitas F, Senzolo M, Standish R. A systematic review of the quality of liver biopsy specimens. American Journal of clinical pathology. 2006;125(5):710-21.
65. Castera L, Negre İ, Samii K, Buffet C. Pain experienced during percutaneous liver biopsy. Heaptology. 1999;30(6):1529-30.
66. Janes CH, Lindor KD. Outcome of patients hospitalized for complications after outpatient liver biopsy. Ann İntern Med. 1993;118(2):96-8.

67. Piccinino F, Sagnelli E, Pasquale G, Giusti G. Complications following percutaneus liver biopsy. A multicentre retrospective study on 68276 biopsies. J Hepatol. 1986;2(2):165-73.
68. Lichtenstein DR, Kim D, Chopra S. Delayed massive hemobilia following percutaneous liver biopsy: treatment by embolotherapy. Gastroenterology. 1992;87(12):1833-8.
69. Terry R. Risks of needle biopsy of the liver. Br Med J. 1952;1(4768):1102-5.
70. Ruben RA, Chopra S. Bile peritonitis after liver biopsy: nonsurgical management of a patient with an acute abdomen:a case report with review of the literature. Gastroenterology. 1987;82(3):265-8.
71. Reddy KR, Schiff ER. Complications in liver biopsy. In: Taylor G, editor. Gastrointestinal emergencies. 2. Baltimore: Williams and Wilkins; 1997. p. 959-63.
72. Thiel DHV, Gavaler JS, Wright H, Tzakis A. Liver biopsy. İts safety and complications as seen at a liver transplant center. Transplantation. 1993;55(5):1087-90.
73. Zeng LY, Lian JS, Chen JY, Jia HY, et al. Hepatitis B surface antigen levels during natural history of chronic hepatitis B: a Chinese perspective study. World journal of gastroenterology. 2014;20(27):9178-84.
74. Jaroszewicz J, Calle Serrano B, Wursthorn K, Deterding K, et al. Hepatitis B surface antigen (HBsAg) levels in the natural history of hepatitis B virus (HBV)-infection: a European perspective. J Hepatol. 2010;52(4):514-22.
75. Chung KH, Kim W, Kim BG, Lee HY, et al. Hepatitis B Surface Antigen Quantification across Different Phases of Chronic Hepatitis B Virus Infection Using an Immunoradiometric Assay. Gut and liver. 2015;9(5):657-64.
76. Cheng PN, Chiu YC, Tsai HW, Wang RH, et al. HBsAg expression of liver correlates with histological activities and viral replication in chronic hepatitis B. Annals of hepatology. 2014;13(6):771-80.
77. Başoda H. Kronik hepatit B enfeksiyonlu hastalarda HBsAg kantitatif düzeyinin HBV DNA düzeyi ve karaciğer histopatolojisi ile ilişkisinin değerlendirilmesi. Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi, İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, uzmanlik tezi, Konya, 2013.
78. Martinot-Peignoux M, Carvalho-Filho R, Lapalus M, Netto-Cardoso AC, et al. Hepatitis B surface antigen serum level is associated with fibrosis severity in treatment-naive, e antigen-positive patients. J Hepatol. 2013;58(6):1089-95.

79. Thompson AJ, Nguyen T, Iser D, Ayres A, et al. Serum hepatitis B surface antigen and hepatitis B e antigen titers: disease phase influences correlation with viral load and intrahepatic hepatitis B virus markers. Hepatology. 2010;51(6):1933-44.
80. Alghamdi A, Aref N, El-Hazmi M, Al-Hamoudi W, et al. Correlation between hepatitis B surface antigen titers and HBV DNA levels. Saudi journal of gastroenterology : official journal of the Saudi Gastroenterology Association. 2013;19(6):252-7.
81. Liu X, Chen JM, Lou JL, Huang YX, et al. Correlation between hepatitis B virus DNA levels and diagnostic tests for HBsAg, HBeAg, and PreS1-Ag in chronic hepatitis B. Genetics and molecular research : GMR. 2016;15(2).
82. Sugiyama M, Tanaka Y, Kato T, Orito E, et al. Influence of hepatitis B virus genotypes on the intra- and extracellular expression of viral DNA and antigens. Hepatology. 2006;44(4):915-24.
83. Grandjacques C, Pradat P, Stuyver L, Chevallier M, et al. Rapid detection of genotypes and mutations in the pre-core promoter and the pre-core region of hepatitis B virus genome: correlation with viral persistence and disease severity. J Hepatol. 2000;33(3):430-9.
84. Buster EH, Hansen BE, Buti M, Delwaide J, et al. Peginterferon alpha-2b is safe and effective in HBeAg-positive chronic hepatitis B patients with advanced fibrosis. Hepatology. 2007;46(2):388-94.