



**HEPATİT B HASTALARINDA HBV RNA' NIN TANI VE
TEDAVİDEKİ ÖNEMİ**

Hatice YILDIZ BEYTEKİN

TEMEL ECZACILIK BİLİMLERİ ANABİLİM DALI

**Tez Danışmanı
Doç. Dr. Selami GÜNAL**

Doktora Tezi – 2022

**T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**HEPATİT B HASTALARINDA HBV RNA' NIN
TANI VE TEDAVİDEKİ ÖNEMİ**

Hatice YILDIZ BEYTEKİN

**Temel Eczacılık Bilimleri Anabilim Dalı
Doktora Tezi**

**Tez Danışmanı
Doç. Dr. Selami GÜNAL**

Bu araştırma İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi
tarafından TDK-2019-1926 Proje numarası ile desteklenmiştir

MALATYA

2022

İÇİNDEKİLER

ÖZET	vii
ABSTRACT.....	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
TABLolar DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Tarihçe	5
2.2. Epidemiyoloji.....	5
2.3. HBV Bulaşma Yolları.....	9
2.4. Hepatit B Kliniği.....	10
2.5. Prognoz	11
2.6. Hepatit B Tanısı	14
2.6.1. Laboratuvar Tanı.....	14
2.6.2. Moleküler Tanı	15
2.7. Tedavi	18
2.7.1. Farmakolojik Tedavi.....	19
2.7.2. Cerrahi Tedavi	23
2.8. Aşılama ve Korunma	23
2.9. Serumda HBV RNA	24
3. MATERYAL VE METOD.....	26
3.1. Hasta Grubu ve Yöntem	26
3.2. Demirbaş Malzemeler.....	27
3.3. Sarf Malzemeler.....	28
3.4. Serum Örneklerinden RNA izolasyonu	29
3.5. RNA'dan Komplementer DNA (cDNA) Elde Edilmesi.....	38
3.6. HBV RNA Amplifikasyonu.....	41
3.7. cDNA'nın AgaroZ Jel Elektforezi	44
3.8. İstatistiksel Analiz.....	47
4. BULGULAR.....	48
5. TARTIŞMA	57

6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	65
KAYNAKLAR	66
EKLER.....	77
EK 1. ÖZGEÇMİŞ.....	77
EK 2. ETİK KURUL ONAYI	78
EK 3. HASTA TANIMA FORMU.....	79



TEŞEKKÜR



ÖZET

Hepatit B Hastalarında HBV RNA'nın Tanı ve Tedavideki Önemi

Amaç: Hepatit B tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de önemli bir sağlık sorunudur. Ciddi sağlık sorunlarına, işgücü kayıplarına ve ekonomik yüke neden olduğundan, erken tanı ve tedavi önemlidir. Son zamanlarda yeni markerlar kullanılmaya başlanmıştır. Bunlardan biride serum HBV RNA'dır. Çalışmada hepatit hastalarının HBV RNA düzeyleri ölçülerek hastalığın seyri, antiviral tedavi etkinliğinin ölçülmesi ve reaktivasyonların erken tesbiti amaçlanmıştır.

Materyal ve Metod: Bu çalışma Sakarya Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'ne başvuran 86 hepatit hastası ile yapılmıştır. Hastalardan alınan kan örnekleri serumlarından ayrıştırılmış, çalışmanın yapılacağı zamana kadar -20°C'de saklanmıştır. Toplanan hasta örneklerinde ticari kit kullanılarak nükleik asit izolasyonu yapılmış, ardından iki aşamalı real-time PCR yöntemi ile HBV RNA araştırılmıştır.

Bulgular: İn house Real time PCR tekniği kullanarak dizayn ettiğimiz çalışmamızın sonucunda daha önce ticari kit kullanılarak HBsAg ve HBV DNA pozitif olan hastaların 22'si (% 25) pozitif, 10'u (% 12) negatif; HBsAg pozitif HBV DNA negatif olan hastaların 4'ü (% 5) pozitif, 28'i (% 33) negatif bulunmuştur. HBsAg ve HBV DNA negatif grupta 2 (% 2) hasta pozitif, 20 (% 23) negatif tespit edilmiştir. Pozitif sonuçlar tekrar edilmiştir. Sonuçların değerlendirilmesinde treshould değeri 0.02 olarak belirlenmiştir.

Sonuçlar: İki aşamalı olarak yapmış olduğumuz çalışmamızda standart tanı testlerine yakın sonuçlar elde edilmesi, HBV DNA'sı negatif gruptan 6 hastayı pozitif olarak belirlemesi yöntemimizin Hepatit B'nin tanı ve tedavisinde kullanılmak üzere geliştirilmesi yönünde ümit verici olarak değerlendirilmiştir. Rutin kullanımlar için yöntemimizin tek basamaklı dizaynı için ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar Kelimeler: cccDNA, Hepatit B, HBV RNA, real time PCR

ABSTRACT

Importance of HBV RNA in Diagnosis and Treatment in Hepatitis B Patients

Aim: Hepatitis B is an important health problem in our country as well as all over the world. Early diagnosis and treatment is important because it causes serious health problems, workforce losses and economic burden. Recently, new markers have been used. One of them is HBV RNA. In this study, it was aimed to measure the course of the disease, to measure the effectiveness of antiviral treatment and to detect reactivations early by measuring the HBV RNA levels of hepatitis patients.

Material and Method: This study was conducted with 86 hepatitis patients who applied to Sakarya University Medical Faculty Hospital. The blood samples taken from the patients were separated from their serums and stored at -20°C until the time of the study. Nucleic acid isolation was performed in the collected patient samples using a commercial kit, and then HBV RNA was investigated by real-time PCR method.

Results: As a result of our study, which we designed using the in house Real time PCR technique, 22 (25%) of the patients who were positive for HBsAg and HBV DNA using a commercial kit, were positive and 10 (12%) were negative; Of the patients with HBsAg positive and HBV DNA negative, 4 (5%) were positive and 28 (33%) were negative. In the HBsAg and HBV DNA negative group, 2 (2%) patients were positive and 20 (23%) were negative. Positive results were repeated. Our results, using the Qiagen Rotor gene program, the threshold value was determined as 0.02 on average and calculated according to this value.

Conclusion: Obtaining results close to the standard diagnostic tests in our study, which we conducted in two stages, and the positive determination of 6 patients from the HBV DNA negative group were evaluated as promising for the development of our method to be used in the diagnosis and treatment of Hepatitis B. Further studies are needed for a one-step design of our method for routine uses.

Keywords: cccDNA, Hepatitis B, HBV RNA, real time PCR

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

3TC	: Lamivudin
AASLD	: American Association for the Study of Liver Diseases
AHB	: Akut Hepatit B
ALT	: Alanin Aminotransferaz
Anti-HBc	: Hepatit B Çekirdek Antikoru
Anti-Hbe	: Hepatit B e Aantikoru
Anti-HBs	: Hepatit B Yüzey Antikoru
APASL	: Asian Pacific Association for the Study of the Liver
AuAg	: Australya Antijeni
cccDNA	: Covalentlyclosedcircular DNA
cDNA	: Complementary DNA
DNA	: Deoksiribonükleikasit
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
EASL	: The European Association for the Study of the Liver
ELİSA	: Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay
ETV	: Entekavir
flRNA	: Full-length polyadenylated HBV RNA
FTC	: Emtrisitabin
HBcAg	: Hepatit B Çekirdek Antijeni
HBeAg	: Hepatit B Enfektivite Antijeni
HBIG	: Hepatit B Immunoglobulin
HBsAg	: Hepatit B yüzey Antijeni
HBV DNA	: Hepatit B Virüs DNA'sı
HBV RNA	: Hepatit B virüsü RNA'sı
HBV	: Hepatit B Virüsü
HCC	: Hepatocellularcarcinoma
HCV	: Hepatit C virüsü
HDV	: Hepatit D virüsü
HIV	: Human İmmunodeficiency Virus
IFN- α	: İnterferon alfa
IU/ ml	: Uluslararası ünite/ mililitre

KHB	: Kronik Hepatit B
mRNA	: Messenger Ribonükleik asit
NA	: nükleoz(t)id Analogları
NIH	: National Institutes of Health
OLT	: Orthotopic Liver Transplantation
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonları
Peg-IFN	: Pegile İnterferon
pgRNA	: Pregenomik RNA
qHBsAg	: Kantitatif Hepatit B Yüzey Antijeni
RACE	: Rapid Amplification of Complementary DNA Ends
rcDNA	: Relaxed circular
RNA	: Ribonükleik asit
RNase H	: Ribonükleaz H
RT enzim	: Revers Transkriptaz enzimi
RT-PCR	: Real Time PCR
TBE	: Tris Borik Asit
TDF	: Tenofovir Disoproksil Fumarat
TLR-7	: Toll Like Receptor 7
VR	: Virolojik Yanıt

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No	Sayfa No
Şekil 2.1. Global HBsAg Seroprevalansı	6
Şekil 2.2. Dünyada HBV Prevalansı	7
Şekil 2.3. Türkiye’de Hepatit B Prevelansı	8
Şekil 2.4. Dünyada HBV Genotip Dağılımı	9
Şekil 2.5. HBV Enfeksiyonu Serolojik Seyri	11
Şekil 2.6. Real-Time PCR amplifikasyon grafiği	17
Şekil 3.1. Hasta Numuneleri	27
Şekil 3.2. PCR Cihazı	28
Şekil 3.3. Nükleik Asit İzolasyon Kiti	29
Şekil 3.4. Serum Örneklerinden Nükleik Asit İzolasyonu	31
Şekil 3.5. Numunelerden Nükleik Asit Ekstraksiyonu	32
Şekil 3.6. Lizatın Kolona Yüklenmesi	32
Şekil 3.7. Su Banyosunda İnkübasyon	33
Şekil 3.8. Elde edilen RNA’ların Çalışma Zamanına Kadar Muhafazası	33
Şekil 3.9. Primerlerin Analiz Sertifikası	35
Şekil 3.10. Primer Analiz Sertifikası	36
Şekil 3.11. Prob Analiz Sertifikası	37
Şekil 3.12. Primer ve Prob Sulandırımı	38
Şekil 3.13. cDNA Elde Edilmesi Hazırlık Aşaması	39
Şekil 3.14. cDNA Reaktanları	40
Şekil 3.15. cDNA Eldesi İçin PCR Cihazına Yerleştirilmesi	40
Şekil 3.16. PCR Sonucu Elde Edilen cDNA Havuzu	41
Şekil 3.17. HBV RNA Amplifikasyonu Hazırlık Aşaması	42
Şekil 3.18. HBV RNA Reaktanları	43
Şekil 3.19. HBV RNA Amplifikasyonu	44
Şekil 3.20. Elektroforez Aşaması	45
Şekil 3.21. HBsAg ve HBV DNA (+) Hasta Grubu	46
Şekil 3.22. HBsAg (+), HBV DNA (-) Hasta Grubu	46
Şekil 3.23. HBsAg ve HBV DNA (-) Hasta Grubu	47
Şekil 4.1. cDNA Jel Elektroforezi	49

Şekil 4.2. cDNA Jel Elektroforezi	50
Şekil 4.3. cDNA Jel Elektroforezi	51
Şekil 4.4. HBV RNA PCR sonuçları	52
Şekil 4.5. HBV RNA PCR Sonuçları	53
Şekil 4.6. HBV RNA PCR Sonuçları	54
Şekil 4.7. HBV RNA PCR Sonuçları	55
Şekil 4.8. HBV RNA PCR sonuçları	56



TABLÖLAR DİZİNİ

<u>Tablo No</u>	<u>Sayfa No</u>
Tablo 3.1. cDNA RT-PCR Bileşenleri.....	39
Tablo 3.2. cDNA RT-PCR Döngüleri.....	41
Tablo 3.3. HBV RNA RT-PCR Bileşenleri	42
Tablo 3.4. HBV RNA RT-PCR Döngüleri	44
Tablo 4.1. HBsAg ve HBV DNA pozitif hasta grubu.....	48
Tablo 4.2. HBsAg pozitif HBV DNA negatif hasta grubu	48
Tablo 4.3. HBsAg ve HBV DNA negatif hasta grubu.....	49

1. GİRİŞ

Hepatit B, özellikle gelişmekte olan bölgelerde dünya çapında bir sağlık sorunudur. Dünya nüfusunun tahminen üçte biri Hepatit B Virüsü (HBV) ile enfektidir. Bir hepatotropik virüs partikülü olan hepatit B virionunun epidemiyolojisi, virolojisi, doğal seyri ve tedavisi ile ilgili bilgiler konusunda, 1970'lerden bu yana önemli ilerlemeler kaydedilmiştir (1).

HBV, kısmi çift sarmal, sirküler deoksiribonükleik asit (DNA)'i olan zarflı bir virüstür. Sadece insanda ve hepatositlerde enfeksiyon yapabilir. Hücre içine girdikten sonra zarf ve kapsidinden soyunup genomunu çekirdeğin içine sokar. Burada kısmi çift sarmal olan genetik eleman kapalı, kovalent, sirküler hale gelir. Bu yapıdan virüsün antijenlerini sentez ettiren messenger ribonükleik asit (mRNA)'lar yapılır. Bu RNA'lardan biri HBV DNA sentezi için şablon rolü görür ve revers transkriptaz (RT) enzimi aracılığıyla virüsün DNA'sı sentez edilir (2).

HBV, hematojen ve cinsel yolla bulaşır. Karmaşık bir mekanizmaya sahip viral-konak etkileşimi sonucunda, kişide ya akut semptomatik bir hastalık ya da asemptomatik bir hastalık gelişir. Hastalar enfeksiyonu atlattıktan sonra hepatit B yüzey antikoru (anti-HBs) geliştirir; ancak kişi hepatit B çekirdek antijenine (HBcAg) karşı antikora sahip olduğu sürece reaktivasyon riski devam etmektedir. Çünkü HBV enfeksiyonu, Epstein-Barr virüsü, Sitomegalovirüs ve Herpes simpleks virüs enfeksiyonlarına benzer şekilde tedavi edilemez bir hastalık olmaya devam etmektedir. Alternatif olarak hasta, hepatit B yüzey antijeni (HBsAg) pozitifliği olan kronik bir enfeksiyon durumu geliştirebilir. Enfeksiyonun geç döneminde siroz ve hastaların % 15-30'unda ise hepatosellüler karsinom (Hepatocellular carcinoma=HCC) gelişebilmektedir (3-6).

Bağıışıklığı normal olan erişkinlerde, HBV enfeksiyonlarının yaklaşık % 4'ünden daha azı kronikleşirken, perinatal olarak enfekte olmuş bebeklerin % 90'ına yakını kronikleşir (7). Bir - 5 yaş arasında HBV enfeksiyonuna yakalanan çocukların % 30-50'si kronik olarak enfekte olmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü'ne (DSÖ) göre, 2010 yılı sonunda % 75'lik bir küresel kapsama oranıyla, HBV aşısı 179 ülkede rutin olarak uygulanmaya başlanmıştır. Bu kapsama oranı Amerika Kıtası'nda % 89; Avrupa'da % 78; Afrika'da % 76 iken, Güneydoğu Asya'da % 52'dir (8).

HBV, tüm dünyada olduğu gibi, ülkemizde de ciddi ve önemli sağlık problemidir. Yaklaşık üç milyon kişinin HBV enfekte olduğu bilinmektedir. Ülkemiz hepatit B enfeksiyonu bakımından endemik bir bölgedir. Bölgesel farklılık göstermekle beraber, Avrupa hastalık kontrol-önleme merkezinin (European Centre for Disease Prevention and Control) HBV'ye ilişkin raporunda belirttiği üzere; Türkiye'deki genel popülasyonda, HBsAg (+) seroprevelansı % 2-8, HBV'yle karşılaşma prevelansı % 20-60 seviyesindedir. Türkiye'nin batısında % 3-4.5 gibi düşük oranda HBsAg pozitiflik bildirilirken, güneydoğu ve doğu anadoludaki şehirlerde % 8-14.3 düzeyinde yüksek oranlar bildirilmiştir. Yine aynı rapora göre; Avrupa'ya kıyasla genel popülasyonda HBV prevelansı en yüksek ülkelerden biri Türkiye'dir. Tedavi edilmediğinde siroz ve karaciğer kanserine neden olabilen HBV, İnsan immünyetmezlik virüsü (HIV)'den, yüz kat daha bulaşıcıdır. Hastalığın asemptomatik de seyredebiliyor olması dolayısıyla bazen uzun süre fark edilememesine sebep olabilmektedir. Ciddi sağlık problemleri, işgücü kayıpları ve ekonomik külfete sebep olan bu hastalıkla mücadelede, erken tanı-tedavinin yanında hastalıktan korunmaya yönelik alınacak tedbirlerin artırılması ve yaygınlaştırılması gerekmektedir (9-11).

HBV enfeksiyonu, dünya genelindeki ülkelerin çoğunluğunda olan rutin aşılama çalışmaları sayesinde yeni vaka insidansında düşüş sağlanmasına rağmen, halen ciddi morbidite ve mortalite etkeni olarak yerini korumaya devam etmektedir. Hastalığın morbidite ve mortalitesi; hastanın viral replikasyonu sürekliliğine, karaciğer kanseri ve siroz gelişimi ile yakından ilişkilidir. Her yıl bir milyona yakın kişi, HBV ile bağlantılı son evre karaciğer hastalıkları ve HCC nedeniyle yaşamını yitirmektedir (11).

Hastalık akut olarak başlar ve ilerleyen zamanda kronik hastalığa sebep olabilmektedir. Akut hepatit B (AHB) enfeksiyonu birkaç hafta ve/veya ay sürer; bu süre zarfında hastalar iyileşebildiği gibi, fulminan yetmezlik veya kronik taşıyıcılığa da sebep olabilmektedir. Kronik hepatit B (KHB) ise çok değişken bir spektruma sahip olup, inaktif taşıyıcılık da dahil olmak üzere siroz ve HCC'ye kadar bir dizi klinik tabloya neden olabilir. HBV enfeksiyonunun doğal seyrini virüs ve konağa ait faktörlerin yanında, hepatit C ile D virüslerinin varlığı, alkol tüketimi ve antiviral tedavi etkinliği gibi birçok faktör etkilemektedir. Yapılan çalışmalarda tedavi edilmeyen KHB'li hastalarda tanı sonrası beş yıl içindeki dönemde; siroz gelişme ihtimali % 8-20, kompanse sirozdan dekompanseye geçiş % 20 olarak bulunmuş olup, dekompanse sirozlularda beş yıllık sağ kalım % 14-35 olarak tespit edilmiştir (11).

Hepatit B tedavisinde; esas amaç HBV enfeksiyonunu tamamen eradike etmek olmasına rağmen, virüsün hepatosit nükleusunda yerleşmesi vecovalently closed circular DNA(cccDNA)oluşturması sebebiyle günümüz koşullarında tedavide kullanılan ilaçlarla bu hedefe varmak mümkün görünmemektedir. Bu yüzden tedaviden beklenen başarılı sonuç, HBsAg serokonversiyonunun sağlanması ve hastalığın ortadan kaldırılmasıdır. Fakat bu sonuca ulaşmak ne yazıkki az sayıda hastada mümkün olmaktadır (12).

Kronik HBV enfeksiyonunun mevcut tedavi stratejileri, serumdaki HBV DNA'nın baskılanmasıyla viral replikasyonu büyük ölçüde inhibe ettiğini gösterir. Halen araştırılmakta olan terapötik ajanlar cccDNA üzerinde daha güçlü bir etkiye sahiptir ve potansiyel olarak daha efektiftir ve bu nedenle cccDNA aktivitesini gösteren serum biyobelirteçlerine ihtiyaç vardır. Bu belirteçler ideal olarak tedaviye başlamadan önce veya tedavi sırasında erken dönemde güvenilir bir yanıt tahmini ve ayrıca hali hazırda mevcut olan tedavilerin kişiselleştirilmesine yardımcı olur (13).

HBV enfeksiyonunun biyomarkerları hastalığın önlenmesinde, tanı ve tedavi yönetiminde önemlidir. Çoğunlukla HBV enfeksiyonunun uygulanabilir biyobelirteçleri arasında serum HBsAg, hepatit e antijeni (HBeAg), farklı HBV antijenlerine karşı oluşan çeşitli antikorlar ve HBV DNA seviyeleri yer alır. Ek olarak, son The European Association for the Study of the Liver (EASL) klinikleri kurallarında yeni bir biyobelirteç olarak dolaşımdaki HBV RNA önerilmiştir. Kronik HBV enfeksiyonu olan hastalarda serum HBV RNA'sının saptanabileceği rapor edilmiştir. Klinikte serum HBV RNA seviyeleri, nükleozid analogu (NA) veya peginterferon (PegIFN) ile tedavi edilen hastalardaki HBeAg kaybı ile güçlü bir korelasyona sahip olduğu gösterilmiştir. Ayrıca serum HBV RNA seviyesi, antiviral dirençli mutasyonların oluşumu ve KHB hastalarında antiviral tedavi kesilmesinden sonraki reaktivasyonların belirlenmesi için değerli bir erken belirleyicidir. Serum HBV RNA, HBV enfeksiyonunun yeni bir biyolojik işareti olmakla birlikte antiviral tedavileri optimize etmek için faydalıdır ve Polimeraz Zincir Reaksiyonları (PCR) teknikleri kullanılarak serumda tespit edilebilir ve nicelendirilebilir (11,14-17).

1996'da Kock ve arkadaşları, HBV RNA'nın serbest virüste bulunduğunu ilk kez gösterdiler ve sonraki bir dizi çalışma, serumdaki HBV RNA düzeylerinin virolojik yanıt (VR) ve prognozla ilişkili olduğunu göstermiştir. Bununla birlikte, farklı KHB hastalarında serum HBV RNA değişikliklerinin özellikleri hala tam olarak

açıklanamamaktadır. HBV RNA'nın HBeAg serokonversiyonunu gösterip göstermeyeceği hala tartışmalıdır (18).

Biz bu çalışmamızda, bir yıl süreyle Sakarya Üniversitesi Hastanesi'ne başvuran Hepatit B hastalarının, HBV RNA düzeylerini Real Time PCR yöntemi ile ölçerek hastalığın seyri, antiviral tedavi etkinliğinin ölçülmesi ve reaktivasyonların erken tesbit edilmesini amaçlıyoruz. Böylece tedavi sürecinin yeniden gözden geçirilmesi mümkün olacaktır.

Son yıllarda hedefe yönelik monoklonal antikor içeren akıllı ilaçların kullanıma girmesi hepatositlerde latent formda kalan hepatit B'ye ait cccDNA'nın tekrar aktif hale gelmesini sitümleri ettiğinin anlaşılması, reaktivasyonu erken dönemde tespit edecek yeni yöntemlerin bulunmasını zorunlu hale getirmiştir.

Hepatit B hastalarında antiviral tedavinin etkinliği çeşitli yöntemlerle takip edilmektedir. HBV RNA, erken dönemde sentez edildiğinden tedavi etkinliği ve reaktivasyonların daha erken fark edilmesine imkan sağlamaktadır. Dolayısıyla küresel çaptaki hasta sayısı ve tedavide kullanılan ilaç maliyeti göz önünde bulundurulduğunda, Hepatit B hastalarında HBV RNA'yı ölçerek, tanı ve tedavideki gidişatı erken tespit etmeyi ve bunun sonucunda dünya ekonomisine katkı sunmayı hedeflemekteyiz.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tarihçe

Viral hepatit farklı zaman ve coğrafyalarda değişik şekillerde isimlendirilmiştir. Başlıcaları şunlardır: Bulaşıcı sarılık, kamp veya asker sarılığı, kataral sarılık, infektif sarılık, epidemik sarılık, post vaksinal sarılık, transfüzyon sarılığı, kısa inkübasyonlu sarılık, uzun inkübasyonlu sarılık, Hepatit Tip A-Tip B, Akut Viral Hepatit A ve B (19). Sarılık, Roma ve Yunanlılarca kötü olarak tanımlanmış, muhtemelen leptospiroz ve sıtma gibi salgınlarla karıştırılmıştır. Tanınması orta çağları bulmuştur (20).

1942’de Amerika ordusundaki askerlere, insan plazmasıyla kontamine sarı humma aşısı uygulandıktan sonra, 56 bin kişinin hepatit olduğu büyük bir salgın meydana gelmiştir. Buna dayanarak 1947’de Mac Callum iki hepatit arasındaki ayrımı ilk defa önermiştir. Hepatit A, çocuklara dışkıyla kontamine su, yiyecek ve içeceklerle bulaşıp kronikleşmezken; Hepatit B, genelde kan veya serum nakli ya da kişiden kişiye inokülasyonla bulaşır ve kronikleşir (21).

1963’te Blumberg ve ark. Avustralyalı yerlinin serumunda, şimdilerde HBsAg diye bilinen Australia antijenini (AuAg) tespitiyle, virüs hepatitleri tarihinde yepyeni bir döneme girilmiştir. 1970’de Dane ve ark. HBV’yi elektron mikroskobu ile incelemiş, 3 farklı partikül bulmuşlardır. Enfeksiyöz partiküllere ‘Dane partikülü’ismi verilmiştir (22).

1971’de Shalom Hirschman, saflaştırılmış AuAg preparatlarında, tıpkı DNA polimeraz ve retrovirüsler gibi RT enziminin bulunduğunu tespit etmesiyle, HBV genomunun teşhisi mümkün olmuştur. 1973’te William S. Robinson, HBV’nin endojen polimeraz aktiviteye sahip olduğunu ve 1974’te de bu aktivitenin viral DNA kaynaklı olduğunu göstermiştir (20,21).

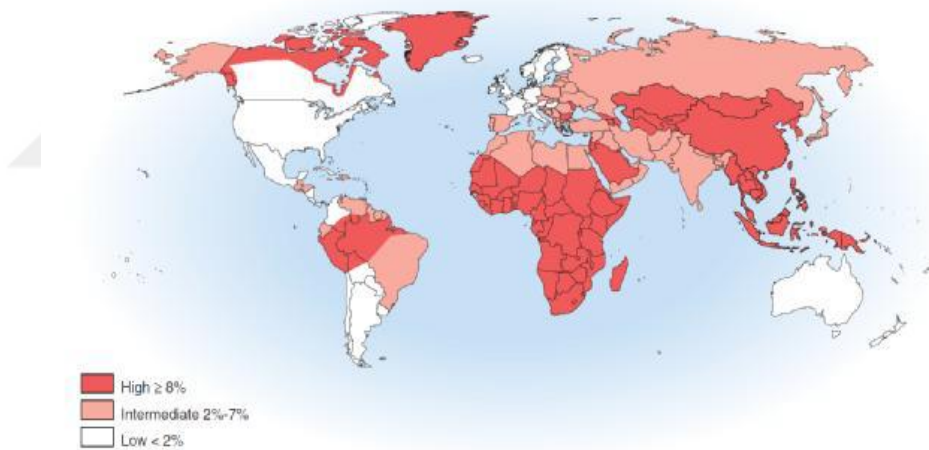
Son asırdaki gelişmelerle virüsün tanı-tedavisi ve virüsten korunmada çok fazla yol kat edilmiştir. Nitekim HBV’den korunmada 1981’den bu yana plazma kökenli aşılar kullanılmaya başlanmış, 1986’dan beri daha güvenilir olan rekombinant aşı kullanılmaktadır (23).

2.2. Epidemiyoloji

Dünya genelinde yaklaşık iki milyar kişinin HBV ile karşılaşmış olduğu, yaklaşık 350-400 milyon KHB enfeksiyonu vakası olduğu, her sene yaklaşık bir milyon

kişinin HBV kaynaklı hastalıklar nedeniyle yaşamını yitirdiği tahmin edilmektedir (24). HBV'nin küresel yaygınlığı hepatit C virüsünün 2 katı, HIV'in 7 katı olarak bilinmektedir (25). Hastalık prevalansı coğrafi bölgeler arasında % 1-20 arasında değişir. Örneğin; Alaska Eskimoları, Asya Pasifik adalarında yaşayanlar, Avustralya aborijinleri ve Hint alt kıtası, Sahra altı Afrika ve Orta Asya bölgelerinde daha yüksek bir oran vardır. Vietnam gibi bazı yerlerde bu oran % 30'a kadar çıkmaktadır. Bu tür varyasyon, iatrojenik bulaşma dahil olmak üzere bulaşma şeklindeki farklılıklar ve enfeksiyonun bulaştığı dönemde hastanın yaşı ile ilişkilidir.

Yaşam boyu HBV enfeksiyonu riski, düşük prevalanslı bölgelerde % 20'den azdır ($< \% 2$; genelde % 0.1-2). Prevalansın yüksek olduğu bölgelerde ($\geq \% 8$, genelde % 10-20), baskın bulaşma şekli perinatal olup, hastalık erken çocukluk döneminde anneden bebeğe dikey olarak bulaşır. HBV ile enfekte olan bireylerin yaklaşık % 45'i, yaşam boyu enfeksiyon riski % 60'ın üzerinde olan yüksek prevalanslı bölgelerde yaşar (7).



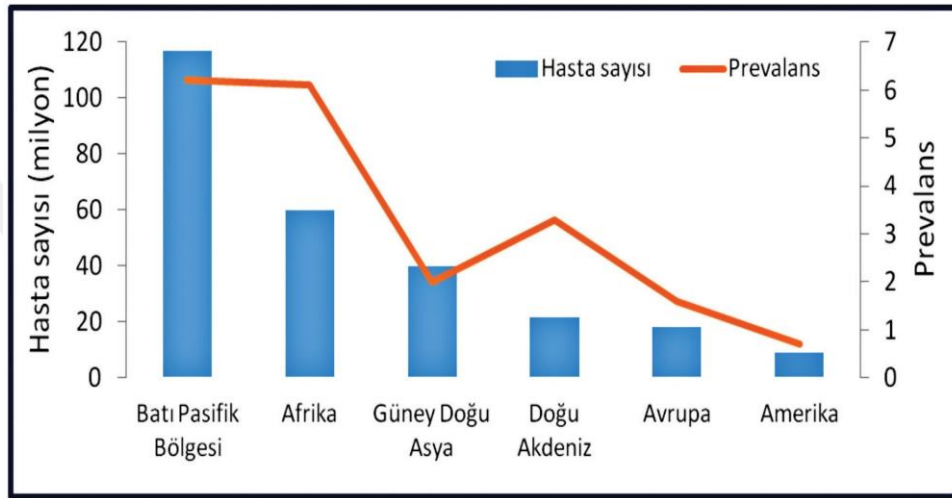
Şekil 2.1. Global HBsAg Seroprevalansı (Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi'nden. Seyahate Bağlı Bulaşıcı Hastalıklar Hepatit B)

Yüksek endemik bölgelerde uygulanan aşılama programları, HBV enfeksiyonu prevalansını azaltmıştır. Tayvan'da HBV seroprevalansı 1984'te (aşılama programlarından önce) % 10 iken, program sonrası 1994'te % 1'in altına düşmüştür ve aynı dönemde HCC insidansı da % 0.52'den % 0.13'e gerilemiştir (3).

Tüm dünyada ise aşılama programı öncesinde (1980 - 2000) 5 yaş altı KHB enfekte çocukların oranı % 4.7 iken, program sonrası 2015'te % 1.3'e düşmüştür (25).

Endemisite oranlarındaki değişkenlik enfeksiyonun edinim yaşı ve şekliyle de yakından ilişkilidir. İmmün sistemi normal kişilerde akut enfeksiyon olarak karşımıza

çıkar ve subklinik seyir, ikterik veya fulminan hepatite varan çeşitli klinik tablolarla seyredebilmektedir. Akuttan kroniğe dönüş, enfeksiyonu edinim şekli ve yaşı ile değişkenlik göstermektedir; erişkin yaş grubunda % 5 olarak, yenidoğan grubunda perinatal temasla bağlantılı olarak % 90, 1-5 yaş aralığında ise % 20-50 civarındadır. Yüksek endemisite bölgelerinde HBV kaynaklı HCC insidansı oldukça yüksektir. Yüzbinde >20 vaka ile HCC oranı en yüksek ülkeler Güney Asya ve Sahraaltı Afrika ülkeleridir (26,27).



Şekil 2.2. Dünyada HBV Prevalansı, DSÖ, 2015

Türkiye'de Hepatit B

İki bin dokuz yılında, 18 yaş ve üzeri kişilerde yapılan bir çalışmada, ülkemizde HBsAg pozitifliği % 4 ve Hepatit B çekirdek antikoru (anti-HBc) pozitifliği % 30.6 bulunmuştur (28). Türkiye’de 1999-2009 arasında yapılan araştırmaların yaş ve bölge bağlamında değerlendirildiği bir sistematik derlemede, HBsAg pozitifliğinin % 4.6 olduğu ve yaklaşık 3.3 milyon kişinin kronik HBV ile enfekte olduğu gösterilmiştir. En düşük prevalansın % 2.8’lik bir oran ile 0-14 yaş grubunda, en yüksek prevalansın ise % 6.3 oran ile 25-34 yaş grubunda olduğu saptanmıştır (29).

Türk Kızılayı Kan Merkezlerindeki kan bağışçılarından toplanan veriler ışığında HBsAg pozitifliği; 1985 yılında % 6.7, 1988’de % 5.3, 1992’de ise % 4.7 olarak ortalama % 5.1 iken, 2012’de % 0.6 olarak tespit edilmiştir (30,31). Bu oran düşüklüğünün sebebi, 1997 senesinden itibaren inaktif HBV taşıyıcısı kişilerden kan alınmamasının katkısı olduğu söylenebilir. Ülkemizde bölgesel olarak HBsAg pozitifliği değerlendirildiğinde, doğu ve güneydoğu anadolu bölgelerindeki oran diğer bölgelere göre nispeten daha yüksek bulunmaktadır (31).

Ülkemizdeki HBV prevelansı Şekil 3’de görüldüğü üzere; Trakya’da yaklaşık % 3.7, Marmarada % 4.4, Batı Karadeniz’de % 4.5, Doğu Karadeniz’de % 7, İç Anadolu’da % 4.9, Doğu Anadolu’da % 8.9, Akdeniz’de % 7.9 ve Güneydoğu Anadolu’da % 12-18’dir (30).

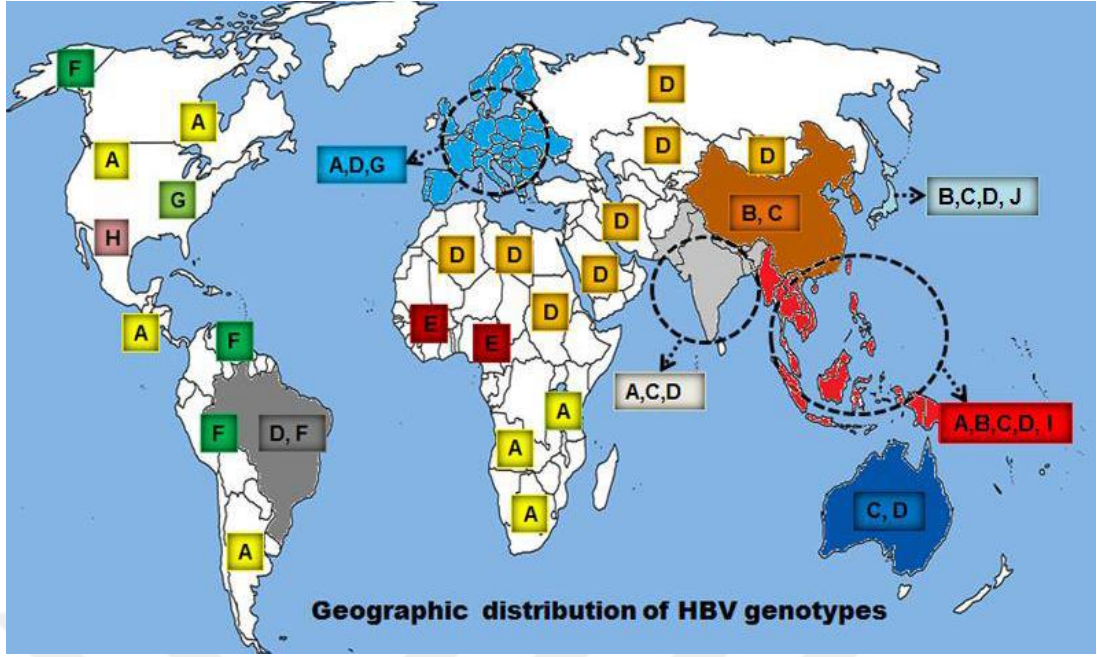


Şekil 2.3. Türkiye’de Hepatit B Prevelansı (30)

Türkiye’de HBV prevelansının topluma dayalı araştırılmasını ilk defa TürkKaraciğer Araştırmaları Derneği yapmıştır. 5471 kişiyle yapılan çalışmada HBsAg(+) % 4.0, anti-HBs (+) % 32,anti-HBc total (+) % 30.6 bulunmuş, HBsAg (+) hastalarda hepatit B antikoru (anti-HBe) (+)oranı da % 92.1 olarak tespit edilmiştir (32).

HBV Genotiplerinin Epidemiyolojik Dağılımı

Genetik çeşitliliğin yüzde 8’den fazla olmasıyla tanımlanan genotiplere göre, son olarak Vietnam ve Japonya’da izole edilen I ve J genotipleri de eklenerek, mevcut genotip sayısı (A-J) onu bulmuştur. Bu genotipler farklı coğrafi dağılım göstermektedir. Türkiye’de genotip D baskındır. Genotipler ile HBeAg seroklirensi, enfeksiyonun doğal seyri, prognoz, interferon tedavisine yanıt, karaciğer hasarı ve kanseri arasında ciddi bir ilişki vardır. Genotipler arasında önemli patolojik farklılıklar görülür. A ve D genotipine sahip kişilerde akut enfeksiyon sonrası kronikleşme daha sık gözlenmektedir. Kronik enfekte C ve D genotipli kişiler, A ve B genotipine kıyasla daha yüksek oranda karaciğer hasarı ve HCC’ye ilerlerken, Cve D genotipli kişilerde interferon tedavi yanıtları nispeten düşük bulunduğu bildirilmiştir (33).



Şekil 2.4. Dünyada HBV Genotip Dağılımı (Kramvis A, Kew M, Francois G. Hepatitis B Genotypes. Vaccine; 23: 2409- 2423,2005)

2.3. HBV Bulaşma Yolları

HBV, enfekte vücut salgılarıyla temas sonucu sadece insandan insana bulaşmaktadır. Bulaşmada kan en önemli faktör olarak karşımıza çıkarken; tükürük ve semen de önemli materyallerdir. HBV'nin dört ana bulaşma şekli vardır: enfekte kan ya da vücut salgılarıyla parenteral/perkütan temas, cinsel temas, enfekte anneden yeni doğana bulaş (perinatal-vertikal), enfekte kişilerle asexual yakın temas (horizontal). Yakın tarihte HBV'nin sağlık uygulamalarıyla bulaşı oldukça sık rastlanır hale gelmiştir. Nozokomiyal bulaş denen bu bulaşma, hem sağlık çalışanları hem de hastalar için önemli risk faktörüdür (31).

HBV bulaşında mevsim ve yaş etkenleri rol almaz. Fekal-oral bulaşma olmadığından, yayılmada su ve gıdalar önemli değildir. Oral bulaşma sadece hasarlı mukozaya enfekte kan temasıyla gerçekleşebilir. Göz ve bütünlüğü hasarlanmış deri de virüs geçişinde önemlidir (34).

Viral hepatitleri önleme komitesi, 1993'te HBV'yi mesleki bir hastalık olarak kabul etmiş; işverenlerin kan ve enfeksiyöz materyalle çalışan sağlık personelinin HBV aşısını şart koşturmuştur. Ülkemizde Sağlık Bakanlığı tarafından yapılan son düzenlemeler neticesinde; HBV risk grubundaki sağlık çalışanlarının işe başlamadan önce HBV serolojilerine bakılıp ücretsiz aşılanması ve riskli temas sonrası çalıştığı kurumca takipleri yapılmaktadır (35).

2.4. Hepatit B Kliniği

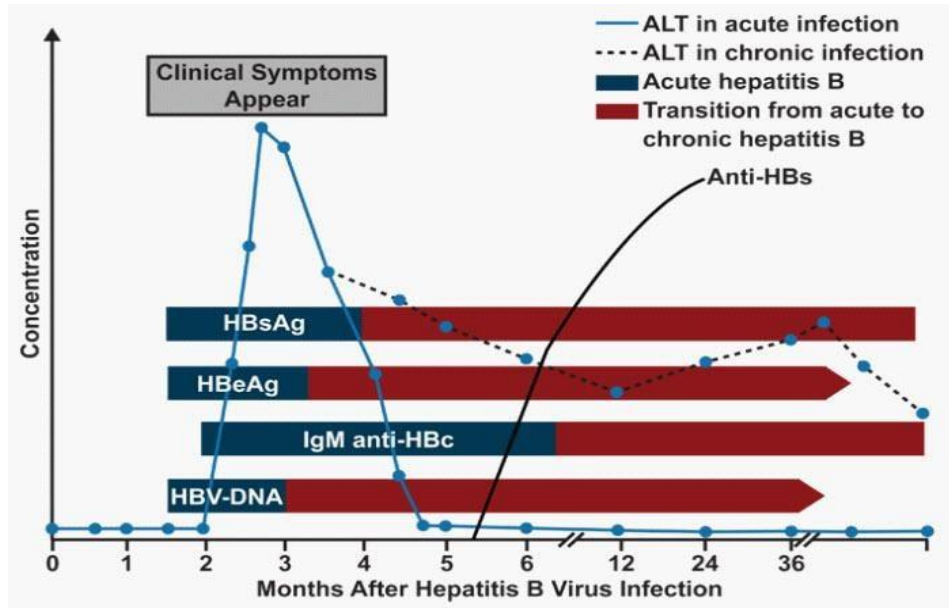
Evre 1: İmmün tolerans: Sağlıklı erişkinlerde yaklaşık 2-4 hafta süren bu evre inkübasyon periyodunu temsil eder. Yenidoğanlar için bu dönemin süresi genellikle onlarca yıldır. Aminotransferaz seviyelerinde çok az veya hiç yükselme ve hastalık belirtisi olmamasına rağmen aktif viral replikasyonun devam ettiği bilinmektedir.

Evre 2: İmmün sistemin aktive olması/ İmmün klirens: İmmün temizleme evresi olarak da bilinen immün aktif evrede, sitopatik etkiye sahip bir inflamatuvar reaksiyon meydana gelir. HBeAg serumda tanımlanabilir ve enfeksiyonu atlatan bazı hastalarda HBV DNA seviyelerinde bir düşüş görülür. Akut enfeksiyonu olan hastalarda bu evrenin süresi yaklaşık 3-4 haftadır (semptomatik dönem). Kronik enfeksiyonu olan hastalarda siroz gelişmeden, immün klirens oluşmadan, HCC gelişmeden veya kronik HBeAg-negatif varyant ortaya çıkmadan önce 10 yıl veya daha fazla bir süre geçebilir.

Evre 3: İnaktif kronik enfeksiyon: Üçüncü evrede, inaktif kronik enfeksiyon evresi, konakçı immün sistemi, enfekte hepatositleri ve HBV'yi hedef alabilir. Viral replikasyon düşüktür veya serumda artık ölçülemez ve anti-HBe saptanabilir. Aminotransferaz seviyeleri referans aralığı içindedir. Viral genomun konağın hepatosit genomuna entegrasyonunun gerçekleşmesi, büyük olasılıkla bu evrede olur. HBsAg hala serumda görülebilir.

Evre 4: Kronik hastalık: Kronik HBeAg-negatif hastalığın ortaya çıkışı, inaktif kronik enfeksiyon evresinden (evre 3) veya doğrudan immün aktif/klirens aşamasından (evre 2) meydana gelebilir.

Evre 5: İyileşme: Beşinci evrede, DNA veya HBsAg tetkikleriyle virüs kanda tespit edilemez ve çeşitli viral antijenlere karşı antikorlar üretilmiştir. Aşağıda HBV enfeksiyonunun serolojik seyri gösterilmektedir (36).



Şekil 2.5. HBV Enfeksiyonu Serolojik Seyri: Düz çubuklar, kendi kendini sınırlayan akut HBV enfeksiyonunda seropozitiflik süresini gösterir. Sivri çubuklar, HBV DNA ve HBeAg kronik enfeksiyon sırasında saptanamaz hale gelebileceğini göstermektedir. Akut hepatit evresinden sonra veya kronik enfeksiyon sırasında, yalnızca anti-HBc'ye karşı gelişen IgG antikorları tahmin edilebilir şekilde saptanabilir. Anti-HBs, genellikle akut HBV enfeksiyonunun bitişinden sonra saptanabilir ancak zamanla kaybolabilir.

2.5. Prognoz

ABD'de yılda en az 5000 kişi, dünya çapında yılda tahmini 1 milyon kişi, KHB hastalığından ölmektedir (37).

Pozitif prognostik faktörler: Hepatit B e antijenini kaybetmiş ve HBV DNA saptanamayan hastalarda, daha yavaş hastalık progresyonu, komplikasyon olmadan uzun süreli sağkalım, HCC ve siroz oranında azalma ve dekompanseasyondan sonra klinik ve biyokimyasal iyileşme klinik iyileşme belirtileridir.

KHB enfeksiyonu, dünya çapında HCC vakalarının yaklaşık % 50'sinin gelişiminde majör katkıyı yapmaktadır. Çalışmalar, viral replikasyonu gösteren HBV DNA seviyesinin, diğer viral faktörlerden bağımsız olarak siroz ve HCC için güçlü bir prediktör olduğunu göstermektedir (38). Batı Avrupa'da sirozu olan hastaların yaklaşık % 9'u, ortalama 73 aylık takipte HBV nedeniyle HCC geliştirir. Siroz tanısı konduktan 5 yıl sonra HCC gelişme olasılığı % 6, dekompanseasyon olasılığı ise % 23'tür.

Türkiye'de siroz, kronik karaciğer hastalığı ve HCC vakalarının çoğunluğu (% 50-70) viral hepatitlere bağlıdır. Ülkemizde yapılan geniş bir kohort çalışmasında tüm HCC'li vakaların % 83'ünün kronik viral hepatit zemininde geliştiği gösterilmiştir (39).

Karsinogenez için önemli risk faktörleri; ileri yaş, aflatoksinlere maruz kalma, alkol, hepatit C (HCV) ve hepatit D (HDV) virüsü ile koenfeksiyon, hastanın bağışıklık durumu, genotip, kor ve prekor mutasyonlar, siroz, trombositopenidir.

Zamanla sürekli artan yüksek serum viral yükü (yani viral replikasyon), HCC gelişimini öngörmede en güvenilir göstergedir. HBsAg veya HBV DNA yokluğunda anti-HBc varlığı bile, HCC riskinin artmasıyla önemli ölçüde ilişkilidir, ancak bu gibi durumlarda siroz olmadıkça HCC süreyansının yapılması için herhangi bir öneri yoktur.

Farklı HBV genotipleri ile ilişkili belirgin mutasyonlar, HCC gelişme riskinde artış ile ilişkilendirilmiştir. Genotip C, HCC ile yakından ilişkilidir; bu, sirozlu ve genotip C'li 50 yaşından büyük hastalarda daha yüksek kor ve prekor mutasyon insidansı ile ilişkili görünmektedir. Genotip B ise genç, sirotik olmayan hastalarda ve cerrahi sonrası nüks durumunda HCC gelişimi ile ilişkilidir (40).

AHB enfeksiyonu esnasında farklı tipte antijenlere (HBsAg, HBeAg ve HBcAg) karşı hücrel ve sıvısal bağışıklık yanıtı oluşur. Enfeksiyonun sonlandırılmasında hücrel tip bağışıklık yanıtı önemlidir. Karaciğerdeki patoloji ve hasar, virüsün direkt sitopatik etkisiyle değil, enfeksiyon sırasındaki bağışıklık yanıtı sonucu oluşur. Hastalığın tedavisinde eksojen kaynaklı interferon etkili olmasına rağmen, doğal enfeksiyonda endojen interferon üretimi tespit edilmemiştir. Buna ilave olarak, bağışıklık yanıtının her zaman koruyucu olduğu söylenemez. Bazı durumlarda immün aracılı karaciğer hasarını artırması ile otoimmünitenin oluşmasına yardım etmektedir. Bazı vakalarda doğrudan hepatosit membran antijenine karşı otoimmün reaksiyon göstererek ilerleyici karaciğer hasarına neden olabilir. Ayrıca immün kompleksler damar duvarlarındaki ağır hasarla karakterize glomerülonefrit, poliarteritis nodosa ve infantil papüler akrodermatit denem sendromlarının patogeneğinde önemlidir (41).

Kronik HBV enfeksiyonlarında oluşan karaciğer hasarı çoğunlukla immün sistem ve HBV ile enfekte hepatositlerin etkileşimiyle yakından ilişkilidir. İnterferon alfa/ beta/ gama ve tümör nekroz faktör α gibi antiviral sitokinler virüs eradikasyonunda önemli vazife üstlenirken, sitotoksik T lenfositlerinin enfekte hepatositleri ortadan kaldırması virüsün temizlenmesine yardımcı olurken aynı zaman da karaciğer hasarına da katkı sağlamaktadır (42). Akut kendini sınırlayan HBV enfeksiyonu gözlenen bireylerde; virüsün kor, polimeraz ve yüzey antijenleri de dahil birçok viral epitopuna poliklonal ve multispesifik hücre aktivasyonu gözlenmektedir. Bu yanıtta, MHC class 2 bağımlı CD4 yardımcı T lenfositleri ve CD8 sitotoksik T lenfositleri rol üstlenir. Akut

enfeksiyonda tip I yardımcı T yanıtı etkin olurken, interleokin-2 ve interferon gamanın da yardımıyla enfekte hepatositlerin ortadan kaldırılıp, organizma virüsten temizlenmeye çalışılır. Böylece iyileşme sağlanmaktadır. Kronik HBV durumunda perifer sitotoksik T lenfosit yanıtı az veya etkisizdir. KHB görülen bireylerde interkolin 4/5/10 salgılanması sonucu tip II yardımcı T lenfosit yanıtı öne çıkmakta ve virüs sitotoksik T lenfositleriyle temizlenmezken hümmoral yanıtı bağışıklık meydana gelir. Hüccresel sitotoksik yanıt, virüsü temizlemekte yetersiz kalmaktadır (43).

Akut HBV enfeksiyonu geçirip iyileşen kişilerde karaciğerin HBV'den tamamen temizlendiği sanılmaktaydı. Ancak yüksek duyarlıklı HBV DNA ölçüm yöntemlerini keşfiyle viral antijen, spesifik sitotoksik T hücrelerin ve antikorun kaybolmasına rağmen, klinik iyileşmeden yıllar sonra bile karaciğer ve serumda HBV genomuna rastlanmıştır. Akut HBV geçirip iyileşmiş fakat sonraki zaman diliminde immünsüpresif veya kanser tedavisine maruz kalmış çoğu hastada alevlenme bildirilmiştir. Tüm bunlar göstermiştir ki; akut enfeksiyon sonrası HBV eradikasyonu tam olamamaktadır. HBV'nin hepatositlerde sürekliliğini sağlayan molekül cccDNA'dır ve antiiviral tedavi sonrası oluşan reaktivasyonlardan sorumludur. Kısacası kordaki cccDNA replikasyona kaynak oluşturur vemevcut tedaviler bunun süpresyonunda yeterli değildir (44).

Gerek primer enfeksiyon gerekse de aşılardan sonra, HBV'nin α antijenik determinantına karşı meydana gelen antikorlar tüm subtiplere çapraz bir koruma sağlar. Fakat başarılı bir aşılamanın akabinde anti-HBs pozitifliği gelişen kimi hastalar daha sonra HBV'yle enfekte olabilmektedir. Bu tip vakalarda virüsün α determinantında, aşının indüklediği nötralizan antikorların tutunduğu epitopta mutasyon olduğu bilinmektedir. Bu sayede mutant virüs oluşan antikorlarla nötralize olamaz. Mutasyon hepatositlere bağlanmayı etkilemediğinden, bu virüsler normal virüsler gibi replike olmaya devam ederler (41).

HBV prekor mutantları

Pekor bölgesindeki nokta ya da çerçeve kaydırma mutasyonları sonucu defektif veya değişmiş prekor varyantları meydana gelmektedir. İnterferona cevap vermeyen ağır karaciğer hastalığı olan vakaların çoğunda prekor varyantları saptanmıştır. Bu tespit prekor varyantların patojenitesinin, doğal virüse kıyasla fazla olabileceğini düşündürmektedir (41).

2.6. Hepatit B Tanısı

HBV enfeksiyonu şüphesi olan bir hastayı değerlendirirken, ilaç hepatotoksitesitesi gibi siroz ve karaciğer yetmezliğine yol açabilecek diğer viral hepatitleri ve etiyolojileri de göz önünde bulundurmak gerekir. Ek olarak, bu hastalığın başlıca bulaşı cinsel yolla olduğundan, HIV veya cinsel yolla bulaşan diğer hastalıklarla enfeksiyon olasılığı da göz önünde bulundurulmalıdır. Ayırıcı tanıda; alkolik hepatit, otoimmün hepatit, kolanjit, siroz, ilaca bağlı karaciğer hasarı, hemokromatoz, hepatit A, hepatit C, hepatit D, hepatit E, HCC ve Wilson hastalığı önemlidir.

2.6.1. Laboratuvar Tanı

Hepatit B tanısı çoğunlukla serolojik testlerle konur.

Serolojik testler, HBsAg, anti-HBs, HBcAg, anti-HBc IgM ve anti-HBc IgG, HBeAg ve anti-HBe'dir.

HBsAg: HBV yüzeyindeki proteindir. Serolojik tanıdaki en önemli belirteçdir. Genelde ELİSA yöntemiyle tespit edilir. HBsAg (+) olması bulaştırmacılık belirtisidir. Klinik semptomlar belirmeden önce serumda tespit edilir. Serumda tespit edildikten 4 hafta sonra, klinik hepatit tablosu görülür. Akut HBV'de 2-6 ay arasında kaybolur ve antikor oluşuncaya kadar geçen döneme pencere dönemi denir. HBsAg (+) 6 aydan uzun sürerse kronik hepatit belirtisidir.

Anti-HBs: HBV enfeksiyonunda iyileşme ve bağışıklığın göstergesidir; ayrıca başarılı aşılamamanın da göstergesidir.

Total Hepatit B Kor Antikoru (anti-HBc Total): HBcAg'nin serumda tespiti oldukça zordur; bu sebeple kor bölgesiyle ilgili pratik öneme sahip tek belirteç anti-HBc'dir. Bilhassa iyileşen akut vakalarda ve pencere döneminde enfeksiyonun tek işareti budur. Uzun süre kalıcıdır. Akut dönemde anti-HBc IgM tipi antikorların varlığı önemli olup, akut hastalıktan iki yıl sonra dahi % 20 oranında tespit edilebilir. Hayat boyu pozitif kalır. Pozitifliği geçirilmiş ya da aktif hastalığı işaret eder (45).

Anti-HBc IgM: Pozitif olması yakın zamandaki gecirilmiş (≤ 6 ay) enfeksiyonun, göstergesidir. Akut enfeksiyondaki ilk gelişen antikordur ve enfeksiyonu takiben 6-8 hafta içinde oluşur.

HBeAg: Nükleokapsid genine ait antijendir. Akut ve kronik durumda bulunabilir. Virüsün replikasyonunu, enfekte kişilerde viral yükün fazla olduğunu gösterir. Akut vakalarda HBsAg ile aynı dönemde belirir ve ondan önce kaybolur.

Pozitifliği serumda HBV DNA varlığına işaretler ki aktif viral replikasyon göstergesidir. Anti-HBe oluşması iyileşmeye gidişin kanıtıdır. Fakat son zamanlarda PCR çalışmaları ile anti-HBe (+) vakalarda % 80 HBV DNA gösterilmesi ya da HBeAg (+) vakalarda HBV DNA bulunmaması bilgilerin değişmesine sebep olmuştur (46,47).

2.6.2. Moleküler Tanı

HBV enfeksiyonunda replikasyon göstergesi HBV DNA'nın gösterilmesi günümüzde önem kazanmıştır. Bu amaçla hibridizasyon ve nükleik asit amplifikasyon yöntemleri kullanılmaktadır.

- a. **Hibridizasyon Yöntemleri:** Hibridizasyon, birbiriyle uyumlu şifreli iki molekülün spesifik olarak birleşmesi demektir. HBV DNA'nın serumda gösterilmesinde kullanılan likit faz hibridizasyon yönteminde duyarlılık sınırı 1.6-5 pg/ml (1 pg/ml yaklaşık 10^5 kopya/mL'ye eşdeğer), slot hibridasyonda ise 10-500 pg/ml'dir. Duyarlılığın düşük olması nedeniyle teşhis ve tedavi takibinde kullanımı sınırlıdır.
- b. **Nükleik Asit Amplifikasyon Yöntemleri (PCR):** PCR tarihte bilinen en eski amplifikasyon yöntemlerindendir. Bu yöntem, kısaca in vitro ortamda DNA'nın hedef bölgesinin çoğaltılması, çoğaltılan bölgenin jel elektroforezde yürütülüp saptanmasıdır. Sonuçlar IU/ ml olarak verilir. IU olan değer, beş ile çarpılarak kopya/ml'e çevrilir.

AHB'de HBV DNA, kanda HBsAg tespit edilemeden önce pozitifleşirken, iyileşen vakalarda da HBsAg'den önce kaybolur. Akut HBV tanısında rutinde HBV DNA bakılması gerekli olmayıp, serolojik testler yeterli olurken bazı durumlarda tanıda yetersiz kalabilmektedir. Hepatit tanısında kullanılan bu moleküler tanı yöntemleri; HBV DNA düzeyi, HBV genotip tayini ve mutasyonların tespiti, tedavi etkinliğinin izlenmesi ve serolojik testlerle tanı koymada yetersiz kalınan bazı durumlarda klinisyene yardımcı olur. Bilhassa seronegatif bireylerden bulaşan HBV vakalarındaki tek belirtecin HBV DNA olması; HBsAg (-) olup transaminazları yüksek olan donörlerin % 9'luk kısmında HBV DNA tespit edilmesi bu konunun önemini ortaya koymuştur. Bu bulgular ışığında HBsAg (-) olan kanların kullanıldığı transfüzyonlar sonrası alıcılarda görülen ve açıklanamayan posttransfüzyonel HBV enfeksiyonunun nedenini ortaya koymaktadır (48). Nükleik asit amplifikasyonu (PCR vb.) ve hibridizasyon temelli olan teknikler arasında duyarlılık ve kantitasyon aralığı bakımından farklılıklar vardır. Nükleik asit amplifikasyonunda yakalama sınırı 10-100

kopya/ml, kantitasyon aralığı üst sınırı 10^5 kopya/ml iken, hibridizasyon tekniğinde ise yakalama sınırı 10^{4-5} kopya/ml ve kantitasyon aralığı 3-4 log'dur. Real-time PCR'da her iki yöntemin avantajları birleştirilerek, yakalama sınırı 10-100 kopya/ml'ye kadar inebilirken, kantitasyon üst sınırı da 10^9-10^{10} kopya/ml'ye varabilmektedir (49-50).

HBV DNA kullanım alanları:

1. Erken tanı: Kanda HBsAg'den 3-5 hafta önce pozitifleşir. Özellikle kan bankacılığında önemlidir.
2. Tedavi kararı verilmesi: Hastalığın evrelendirilmesinde kullanılan göstergelerden biridir. HBV DNA kanda $\geq 10^{4-5}$ kopya/ml ve yüksek ALT olması KHB ve tedavi başlama kriteridir.
3. Tedavi yanıtı izlemi: Tedavi sürerken tedavi öncesi viral yüke kıyasla, en az bir logaritma azalma beklenir.
4. Antiviral ilaç direnci saptanması: Tedavi sürerken HBV DNA miktarında bir ay ara ile iki defa bir logaritma artış olması, antiviral tedaviye direnç geliştiğini gösterir.
5. Hastanın bulaştırıcılık seviyesinin tahmin edilmesi: Bulaşıcılık viral yükle doğru orantılıdır (51).

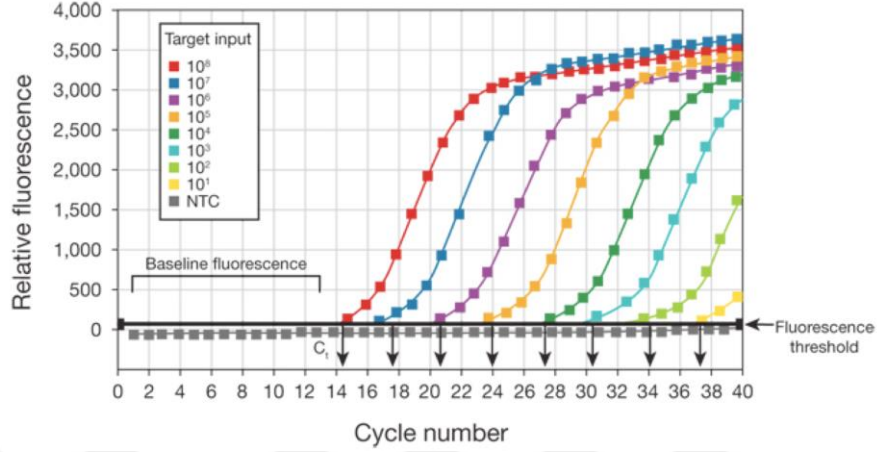
Son yıllarda özellikle de rutin laboratuvarlarda, mikrobiyolojik tanı amaçlı otomatik sistemler kullanıma girmiştir. HBV DNA'nın saptanmasında en özgül ve duyarlı yöntem PCR'dır. Bu yöntemle eser miktarlardaki HBV DNA (10-50 kopya/mL) bile tespit edilebilmektedir. Kantitatif HBV DNA, serumdaki HBV miktarını yani viral yükü ölçer (47).

Real-Time Pcr (RT-PCR)

RT-PCR; PCR çoğaltımını görünür hale getiren ve floresan işaretli prob ve boyaların kullanıldığı yöntemidir. Klasik PCR'da, DNA molekülünün amplifikasyonu ancak son PCR döngüsünden sonra izlenebilirken, RT-PCR'da, DNA miktarı PCR sırasında yani çoğaltılan moleküllerin sayısı ile orantılı bir şekilde artan floresan boyalar aracılığıyla her döngüden sonra ölçülebilmektedir (52).

Ürünlerin analizi reaksiyon sırasında yapıldığı için klasik PCR tekniğinde ihtiyaç duyulan jel elektroforezi, DNA bantlarının mor ötesi ışık altında görüntülenmesi gibi işlemlere gerek duyulmamakta ve çok sayıda örnek çok az bir kontaminasyon riskiyle çalışılabilmektedir (53).

Reaksiyon boyunca floresandaki değişim cihaz tarafından ölçölmekte ve floresan miktarının döngü sayısına göre grafiğini çizilmektedir. Böylece tüm PCR reaksiyonu boyunca ürün birikimini temsil eden bir amplifikasyon grafiği oluşturulmaktadır (54).



Şekil 2.6. Real-Time PCR amplifikasyon grafiği (54).

RT-PCR’da kullanılan prob sistemleri; hidrolizasyon proplar, hibridizasyon proplar ve DNA’ya bağlanan boyalar’dır (55).

Kantitatif HBsAg (qHBsAg)

Son zamanlarda HBV konusundaki çalışmalar göstermiştir ki, HBV DNA (-) olsa dahi viral aktivite ve replikasyon devam edebilmekte ve bu aktivasyon HBsAg’nin kantitatif ölçölmesiyle gösterilebileceği tespit edilmiştir. HBsAg, karaciğer hücre çekirdeğindeki viral cccDNA transkripsiyonuyla meydana gelen iki ayrı mRNA translasyonu ile sentez edilir ve hepatit tedavisinde kullanılmakta olan antiviral ilaçlardan (revers transkriptaz inhibitörleri) etkilenmemektedir. Serum HBsAg düzeyinin enfekte hücre miktarının göstergesi olabileceği ve antijen miktarındaki azalmanın immun yanıtı enfeksiyon kontrolünün dolaylı göstergesi olabileceği gösterilmiştir. HBV’yle enfekte karaciğer hücreleri tarafından küresel partiküller ve tübüler formlar halinde dolaşıma salınmaktadır. Bu sebeple qHBsAg seviyesi, hepatositteki cccDNA ve entegre DNA transkripsiyon aktivite miktarını göstermektedir. Tüm bunlara dayanarak, qHBsAg seviyesi hepatit hastalarının tanı ve tedavi izlem ve takibinde yardımcı bir parametre olarak kullanılabilir (56).

Piyasada iki çeşidi bulunmaktadır. Her ikisi de serum örneklerine dilüsyon önermektedir ve IU/ml olarak sonuç vermektedir. Kitlerin sonuçları birbiriyle uyumlu tespit edilmiştir. qHBsAg tayini cccDNA arasındaki bağlantı açısından da önem arz etmektedir. cccDNA, viral şablon görevi üstlenmesi ve KHB devamlılığı sağlaması

nedeniyle tedavi izleminde önemlidir. Lakin cccDNA izlemi invaziv işlem olduğundan antiviral tedavi esnasında, tedavi yanıtını değerlendirmede cccDNA'ya alternatif bir marker olarak qHBsAg önerilmiştir (57-58).

AHB ile KHB Akut Alevlenmesinin Ayırt Edici İmmünolojik Göstergeleri

KHB'de akut alevlenme sık karşılaşılan bir durum olup, bazen hastalığın ilk semptomu olabilir. Serum alanin amino transferaz (ALT), HBV DNA miktarında artma, nekroinflamatuvar aktivitenin artmasıyla karakterizedir. Akut alevlenme, HBeAg (+) hastalarda daha fazladır. Buna karşın anti-HBe (+) ve izole anti-HBc IgG (+) ve anti-HBs (+) durumlarında da rastlanabilir. Akut ya da asemptomatik olarak görülebilir. Bilhassa ikterik seyreden akut alevlenme, akut hepatit B'yi taklit edebilir. Çok zor olsa da prognoz ve tedavi yaklaşımı farklı olan bu iki klinik durumu birbirinden ayırt etmek gerekir. Akut hepatit hastalarının çoğu fulminan seyirli hâre büyük oranda tedavi gerektirmeden kendiliğinden iyileşirken, akut alevlenmede hepatit dekompanasyon görülebilir ve tedavi gerekir (59).

Anti-HBc IgM: KHB'lerde anti-HBc IgM uzunca bir süre düşük seviyede pozitif olabilir. Bu sebeple testler çoğu zaman nispeten daha yüksek değerleri tespit edecek şekilde hazırlanmıştır. Fakat duyarlılığı yüksek testlerle pozitiflik gösterilebilir. KHB akut alevlenmeye sahip hastaların yaklaşık 3/4'ünde nispeten daha düşük anti-HBc IgM tespit edilebilir ve bu antikorlar farklı molekül ağırlıklarına sahip olabilir. Akut hepatit B'de 19S anti-HBc IgM hakim iken; KHB akut alevlenmede 7S anti-HBc IgM daha yaygındır. Bu farklılık iki durumun ayırt edilmesinde yarar sağlayabilir (60-61).

2.7. Tedavi

KHB'deki antiviral tedavinin virüsün replikasyonunu baskılama, karaciğerdeki enflamasyon ve fibrozisi azaltma, buna bağı olarak hastalığın ilerlemesini engellediğı gösterilmiştir. Buna rağmen, mevcut tedavilerin virüsün tümüyle eradikasyonunda etkili olamadığı; ve bu sebeple hangi hastanın tedaviye ihtiyaç duyduğu, hangi hastanın ise tedavisiz takip edileceğı hala temel konulardır. Tüm dünyada, ulusal ve uluslararası farklı dernek ve kuruluş tarafından hekimlere kolaylık sağlayan kılavuzlar oluşturulmuştur. En sık kullanılanlar; AASLD (13), EASL (11) ve Asian Pacific Association for the Study of the Liver (APASL) (62) derneklerine ait kılavuzlardır.

Kronik HBV'nin progresyonu için risk faktörleri; sürekli yüksek HBV DNA seviyeleri ve bazı hastalarda yüksek ALT seviyeleri, ayrıca HBV genotip C ve D enfeksiyonlarında sık görülen kor ve prekor mutasyonların varlığı, erkek cinsiyet, ileri

yaş, ailede HCC öyküsü, alkol ve sigara kullanımı, yüksek alfa fetoprotein, HCV, HDV veya HIV ile koenfeksiyondur (63).

Prognozun iyileştirilmesi için, viral yükü baskılayan ve immünoterapötik müdahalelerle hastanın immün yanıtını artıran sinerjik bir yaklaşıma ihtiyaç vardır (27). HCC'nin önlenmesi için genellikle pegile interferon veya nükleoz(t)id analoglarının (NA) kullanıldığı antiviral tedavi uygulanır (38). HBV enfeksiyonu kendi kendini sınırlayabilir veya kronik olabilir. Akut hepatit B'li kişiler için özel bir tedavi mevcut değildir; tedavi destekleyicidir. Hepatik nekroinflamasyon riskini artırması sebebiyle kesinlikle interferon verilmemelidir (64). Şu anda kronik aktif hepatit B hastalığı kanıtı olan hastalar için tedavi önerilmektedir (anormal aminotransferaz seviyeleri, pozitif HBV DNA bulguları, pozitif veya negatif HBeAg).

Tedavinin hedefi HBeAg (-) ve HBeAg (+) hastalarda değişkenlik göstermektedir. HBV DNA miktarı, pozitif hastalarda negatif olanlardan daha yüksektir. HBeAg (-) hastalarda tedavi uzun zaman süreceğinden, antiviral ilaçların güç ve direnç riski pozitif olanlardan daha önemlidir. KHB'li hastanın tedaviye aday olabilmesi için minimum 6 ay HBsAg (+) olmalı ve HBeAg ile anti-HBeAg durumu belirlenmelidir. HBeAg pozitif ve negatif hastalarda tedavi sonlandırmada en ideal ölçüt, anti-HBs serokonversiyonsuz veya serokonversiyonlu uzun vadeli HBsAg kaybıdır. Pozitif olanlarda ayrıca iyileşme belirtisidir (11,13).

2.7.1. Farmakolojik Tedavi

Şu anda PEG-IFN- α , entekavir (ETV) ve tenofovir disoproksil fumarat (TDF), hepatit B hastalığının tedavisinde birinci basamak ajanlardır. Bunlar, bu hastalık için dünya çapında onaylanmış ana tedavi ilaçlarıdır, ancak devam eden çalışmalarda, emtrisitabin (FTC) ile kombinasyon halinde tenofovir disoproksil gibi yeni ilaç türleri araştırılmaktadır. Kapsidasyon inhibitörleri, giriş inhibitörleri, TLR7 (Toll Like Receptor 7) agonistleri ve terapötik aşıların tümü geliştirme aşamasındadır.

2009 yılında, kronik HBV enfeksiyonunun tedavisi için klevudin ile yapılan uluslararası faz III denemeleri, çok yüksek bir miyopati riski nedeniyle durdurulmuştur (65). Lamivudin (3TC), telbivudin ve adefovir eskiye dayalı tedavi ajanlarıdır. Bu ajanlar, şu anda ikinci veya üçüncü basamak tedavi veya “tercih edilmeyen” tedavi olarak kabul edilmektedir (66).

Onaylanmış antiviral tedaviler

Aşağıdaki ilaçlar, erişkin ve/veya pediatrik hastalarda KHB tedavisinde onaylanmış ilaçlardır (böbrek fonksiyon bozukluğu durumunda doz ayarlanmalı) (67).

Tercih edilen ajanlar

- PEG-IFN-alfa-2a (erişkinler) veya IFN-alfa-2b (çocuklar): Erişkin dozu haftalık 180 µg; pediatrik doz (≥ 1 yaş): 6 milyon IU/m 2 haftada üç kez
- Entekavir: Erişkin dozu: Günlük 0.5 mg (lamivudin/telbivudin almamış kişiler) veya 1 mg (lamivudin/telbivudin deneyimi olan veya dekompanse sirozu olanlar); pediatrik doz (≥ 2 yaş): Ağırlık bazında 10-30 kg'a kadar; 30 kg'ın üzerindeki çocuklar için günde 0.5 mg kullanın
- Tenofovir dipivoksil fumarat: Erişkin ve pediatrik (≥ 12 yaş) doz: günde 300 mg
- Tenofovir alafenamid: Yalnızca erişkin dozu: günde 25 mg; pediatrik doz yok

Tercih edilmeyen ajanlar

- Adefovir: Erişkin ve pediatrik doz (≥ 12 yaş): günde 10 mg
- Lamivudin: Erişkin dozu: günde 100 mg; pediatrik doz (≥ 2 yaş): günde 3 mg/kg (maksimum: 100 mg)
- Telbivudin: Yalnızca erişkin dozu: günde 600 mg; pediatrik doz yok

Interferon alfa

İnterferonlar, antiviral, antiproliferatif ve immünomodülatör etkileri olan proteinlerdir. Yayınlanmış raporlar, 4 ay boyunca 5 milyon U/gün veya haftada 3 kez 10 milyon U subkutan IFN- α tedavisinden sonra, HBV DNA düzeylerinin ve HBeAg'nin hastaların %30-40'ında saptanamaz hale geldiğini göstermektedir (68). Ayrıca hastaların %10'u HBsAg'den anti-HBs serokonversiyon gösterir. Hastaların %5-10'unda tedavi tamamlandıktan sonra nüks görülür. Geçici bir "alevlenme" (yani, tedavinin başlangıcında artan serum ALT seviyeleri) tanımlanabilir ve bu, aktive edilmiş sitolitik T hücrelerinin enfekte hepatositler üzerindeki etkisini gösterir.

Yüksek aminotransferaz seviyeleri, düşük viral yük ve vahşi tip virüs ile enfeksiyon, IFN- α tedavisine yanıt için iyi prognostik faktörlerdir. Bununla birlikte, Asyalı hastalar ve prekor mutant virüsü olan hastalar, IFN- α tedavisine klinik yanıt vermeme eğilimindedir.

Pegile İnterferon Alfa

Pegile interferonların etki mekanizması standart olanla aynı olup, yarılanma ömrü uzatılmıştır. Standart interferonlardan daha güçlüdür. Yapılan çalışmalar göstermiştir ki, PegIFN- α , HBeAg (+) hasta grubunda genotip A'da tedavi yanıtı çok yüksek iken, genotip D'de en düşüktür. Ülkemizde D genotip baskın olduğundan interferona düşük yanıtın nedeni ortaya çıkmaktadır (69).

Pegile interferon, yüksek etkinlik ve sınırlı kullanım imkanı sayesinde konvansiyonel interferonların yerini almıştır. Pegile formunda tedavi yanıt hızı yüksek olmasına rağmen, uzun vadeli izlemde relaps hızı da yüksek bulunmuştur. Tedavi kararında kullanımın faydalı olacağı düşünülen hastalarda kullanılmalıdır. Yaş, genotip ve tedavi başı ile sonu viral yüke göre virolojik yanıt tahmin edilebilir. HBV DNA 2000-20000 IU/ml ve karaciğer biyopsisinde inflamasyon ve fibrozu tespit edilen genç hastalarda tavsiye edilmektedir (11).

Lamivudin

Bir NA olan 3TC, viral polimerazı inhibe eder. IFN- α 'ya tedavi yanıtı olmayan hastalarda (örneğin, precore mutant virüs ile enfekte olmuş hastalar) etkilidir. Bununla birlikte, alternatif tedaviler ortaya çıktıkça hepatit B tedavisindeki rolü azalmaktadır, bu nedenle bu ajan bir üçüncü basamak tedavidir ve tercih edilmez.

Adefovir dışındaki diğer ajanlar, viral replikasyonun baskılanmasında 3TC'den üstündür. Bu tedavinin bir başka dezavantajı, yüksek ilaç direnci oranı olmasıdır (70). Bununla birlikte, diğer oral tedavilere kıyasla 3TC'nin maliyeti daha düşüktür.

Viral yükü 10^4 pg/mL'den az olan hastalarda HBeAg serokonversiyon oranının 2 yıllık tedaviden sonra % 27, 3 yıl sonra % 40 ve 4 yıllık tedaviden sonra % 47'ye yükseldiği gösterilmiştir. Lamivudin ile tedavinin, HBV reaktivasyonu nedeniyle dekompanse hastalığı olan hastaların durumunu dramatik bir şekilde iyileştirdiği de gösterilmiştir. HIV/HBV koenfeksiyonu olan, antiretroviral tedavi için uygun olan ve daha az ciddi karaciğer hasarı olanlar, karaciğer hasarı düzelene kadar antiretroviral tedaviyi ertelemelidir (71). Direç gelişimi kolay olmasına rağmen hamilelerde ilk tercihtir.

Entekavir

Entekavir, hepatit B tedavisinde birinci basamak ajandır (70). Bu ilaç, daha önce NA ile tedavi öyküsü olmayan hastalarda % 1.2 direnç oranıyla, güçlü bir viral polimeraz guanozin analog inhibitörüdür.

Entekavir, 3TC'ye dirençli hepatit B tedavisinde diğer ajanlardan daha az role sahip olmasına rağmen, bu ajanla tedavinin avantajları arasında güçlü antiviral aktivite ve düşük ilaç direnç oranı bulunur (70).

a-) HBeAg-pozitif hastalar: HBeAg pozitif popülasyonla ilgili olarak, 48 hafta boyunca 100 mg 3TC alan hastalara kıyasla daha önce NA almamış hastalarda 0.5 mg entekavir uygulaması karşılaştırıldığında, 3TC grubunun % 62'sinde histolojik iyileşme görülürken, entekavir grubunda bu oran % 72 olarak bulunmuştur. Lamivudinle tedavi edilen hastaların % 36'sında, entekavir ile tedavi edilen hastalarınca % 67'sinde serumda saptanamayan HBV DNA seviyeleri bildirilmiştir (72).

b-) HBeAg-negatif hastalar: HBeAg negatif bir popülasyonda, 48 hafta boyunca 100 mg 3TC alan hastalarla karşılaştırıldığında, daha önce NA almamış hastalarda 0.5 mg entekavir uygulaması, 3TC grubunun % 61'inde histolojik iyileşme görülürken, entekavir grubunda bu oran % 71 olarak bulunmuştur. Lamivudinle tedavi edilen hastaların % 72'sinde, entekavir ile tedavi edilen hastalarınca % 90'ında serumda saptanamayan HBV DNA seviyeleri bildirilmiştir (72).

Adefovir dipivoxil

Adenozin monofosfatın nükleozid analogudur, adefovirin oral kullanılan ön formudur. Revers transkriptaz ve DNA polimeraz inhibitörüdür. Terminal zinciri oluşturan DNA'ya entegre olur. Çalışmalar göstermiştir ki; sadece vahşi tip virüsleri değil, lamivudin rezistans HBV mutantlarına da etkindir. Oral biyoyararlanımı iyidir ve tek doz kullanım yeterlidir. HBeAg (+) vakalarda; plasebo ile kıyaslandığında ALT normalleşmesi, histolojik iyileşme ve HBV DNA süpresyonu istatistiksel bakımdan anlamlı bulunmuş ve bir yıllık tedavi neticesinde serokonversiyonun % 12 seviyesinde olduğu faz 3 çalışmaları ile kanıtlanmıştır (73). HBeAg (-) vakalarda, 10mg/gün olarak 48 hafta uygulandığında, % 51 DNA negatifliği, % 64 histolojik cevap ve % 72 ALT normalleşmesi tespit edilmiştir. Dezavantajları ise potansiyel nefrotoksik ve renal yetmezlikte doz azaltılması gereksinimidir (74).

Tenofovir

Adefovir gibi siklik olmayan NA'dır. Nefrotoksisitesi daha az olduğundan, daha yüksek dozda (300 mg) kullanılma imkanı sağlar. Böylece daha güçlü antiviral etki sağlamaktadır (75). HBeAg (+) vakalarda 300mg/gün olarak 48 haftanın sonunda % 3 HBsAg kaybı, % 21 HBeAg serokonversiyonu, % 68 ALT normalizasyonu, % 74 histolojik cevap ve % 76 oranında HBV DNA negatifliği tespit edilmiştir. HBeAg(-) vakalardaki aynı süredeki oranlar ise; % 21 HBeAg serokonversiyonu, % 68 ALT

normalizasyonu, % 72 histolojik cevap ve % 93 saptanamayan HBV DNA tespit edilirken, tüm hastalarda HBsAg tespit edilmeye devam etmiştir. Tenofovir; hem vahsi tip, hem de lamivudin ve entekavir rezistans suşlara etkilidir. Dezavantajları ise; böbrek yetmezliği, Fankoni sendromu, osteomalazi ve kemik dansitesinde azalmadır (76).

2.7.2. Cerrahi Tedavi

Ortotopik karaciğer transplantasyonu (Orthotopic Liver Transplantation=OLT), fulminan karaciğer yetmezliği olan ve iyileşmeyen hastalarda ve hepatit B hastalığına bağlı son dönem karaciğer hastalığı olan hastalarda tercih edilen tedavi yöntemidir. OLT dönemi sırasında ve sonrasında hepatit B immünoglobulin (HBIG), OLT öncesi ve sonrası dönemlerde lamivudin veya adefovir uygulanması, hepatit B rekürrensini önemli ölçüde azaltır. Mevcut standart uygulamada, HBIG ve tenofovir disoproksil fumarat veya entekavir kullanılır.

2.8. Aşılama ve Korunma

Kronik hepatit B'yi tedavi etmek için sınırlı sayıda ilaç kullanılabilse de, aşılama güvenli ve etkili bir önleme stratejisidir (77). Endemik bölgelerde yaygın hepatit B aşılama programları devam etmekte ve yüz güldürücü sonuçlar elde edilmektedir. Hepatit B aşısı (HepB), mayadan üretilen rekombinant HBsAg'den oluşur. Üç doz enjeksiyonla, aşılanmış bireylerin yaklaşık % 95'inde 10 IU/mL'den daha yüksek anti-HBs seviyelerine ulaşılabilir. Tek doz aşı 5-10 yılda bir tekrarlanmalıdır.

HBV Temasında Yapılması Gerekenler

HBsAg (+) bireyden (-) bireye deri- mukoza ile bulaşmasında ilk 48 saatte 0.06 ml/kg im. HBIG uygulanıp, aşıya başlanmalıdır. Bu durumda doğan gebelerin bebeklerine doğumu takiben 6-12 saatte 0.5 ml HBIG ve aşı uygulanmalıdır. Hepatit olduğu bilinen bireylerle cinsel temas halinde 14 gün içinde HBIG ve aşı başlanmalıdır.

HBIG: Pasif yoldan anti-HBs oluşumunu sağlar. Standart dozları 3-6 ay geçici bağışıklık sağlar. Esas temas sonrası profilakside aşıyla beraber kullanılır. Primer olarak tek başına aşılamaya yanıt vermeyenlerde HBV temasında koruma amaçlı kullanılır. Yüksek konsantrasyonda anti-HBs içeren donör plazmasından hazırlanmaktadır. Plazma çeşitli yönlerden taranır ve son ürün eldesinde virüsler inaktive edilerek kullanılır. Yetişkin dozu 0.06 ml/kg'dir ve aşıyla beraber aynı zamanda farklı bölgeden im uygulanır. Deltoid ve gluteal bölgeler en uygun yerlerdir (78,79).

Viral Reaktivasyon

HBV, serum antikorlarının varlığına rağmen akut hepatitten klinik olarak iyileştikten sonra on yıllar boyunca kanda kalabilir. İmmünosupresif şartlar veya ilaçlar, latent olan HBV'nin alevlenmesine veya reaktivasyonuna neden olabilir. Ek olarak, genetik faktörler (örneğin, genetik mutasyonlar), anti-HBc yanıtını etkileyerek reaktivasyon riskini etkileyebilir (59).

İmmünosupresif ilaçlarla tedavi ve sonrasında birkaç ay hastaların yakın izlenmesi uygundur. Hepatit B reaktivasyonu meydana gelirse, ajanın durdurulması ve antiviral tedavinin başlatılması gerekir. AASLD ve NIH dahil olmak üzere çeşitli ulusal kuruluşlar, antineoplastik veya immünosupresif tedavi görecektir olan inaktif HBsAg taşıyıcılarında profilaktik antiviral tedavinin kullanılmasını önermektedir (13,59).

Hepatit B reaktivasyonu riskini artırabilecek ilaçlar:

1. Anti-CD20 antikorları: Ofatumumab, rituksimab
2. Antineoplastik ajanlar (metotreksat dahil)
3. Glukokortikoidler, özellikle aniden kesildiğinde
4. İnterlökin reseptör antagonistleri: Ustekinumab, anakinra, tocilizumab
5. Nükleoz(t)id tedavisi, immün rekonstitüsyon sendromu veya anti-HBV özellikli antiviral tedavinin kesilmesi nedeniyle
6. T-hücre regülatörü: Abatacept
7. TNF inhibitörleri: Infliximab, etanercept, adalimumab, certolizumab pegol, golimumab

2.9. Serumda HBV RNA

HBV enfeksiyonunun önlenmesinde, tanı ve tedavi yönetiminde önemli olan biyobelirteçler, HBsAg, HBeAg, farklı HBV antijenlerine karşı oluşan çeşitli antikorlar ve HBV DNA'dır. Serum HBV RNA'sı, viral enfeksiyonun kalıcılığı ve viral rebound ile ilişkili olabilen kapsüllenmiş pregenomik RNA (pgRNA)'dır (80). Kronik HBV enfeksiyonu olan hastalarda HBV DNA'ya ek olarak, serumda görülebilen HBV RNA'nın, pgRNA içeren virionlardan seruma geçtiği ve cccDNA transkripsiyon aktivitesini gösterdiği tahmin edilmektedir (81-83).

HBV'nin yaşam döngüsünde, HBV mRNA'nın oluşumu için cccDNA'nın transkripsiyonu, HBV replikasyonunun başlangıç aşamasıdır ve bu, enfeksiyonun sürekliliğinde önemli bir rol oynar. Bu nedenle cccDNA, HBV enfeksiyonunun ve viral in vivo replikasyonun doğrudan bir göstergesidir. cccDNA'nın saptanması invaziv bir

prosedür olan biyopsiye bağlı olduğundan, intrahepatik cccDNA'nın aktivitesini yansıtan bazı serum biyobelirteçlerinin bulunması çok değerlidir (84). cccDNA, viral replikasyon sırasında 5 farklı RNA'ya kopyalanır. Bu transkriptlerden biri olan pgRNA, yalnızca viral DNA'nın transkripsiyonunun tersine çevrilmesi için şablon görevi görmekle kalmaz, aynı zamanda HBV'nin kor proteini ve polimerazı için de kodlayıcı bir mRNA'dır (85). Son zamanlarda, HBV RNA'nın serumda da saptanabileceğini düşündüren çalışmaların sayısı artmaktadır. Dolaşımdaki HBV RNA, HBV pgRNA'dır ve HBV enfeksiyonu, tedavisi ve prognozu için yeni bir serum biyobelirteci olarak kullanılabileceği gösterilmiştir (86-88).

HBV RNA Ölçümü

İlk kez, Kock ve arkadaşları (89) 1996 yılında tamamlayıcı DNA (complementary DNA=cDNA) uçlarının hızlı amplifikasyonu (rapid amplification of complementary DNA (cDNA)-ends=RACE) yöntemiyle kronik HBV enfeksiyonu olan hastaların serumunda HBV RNA'yı başarıyla tespit etmiştir. Kronik HBV enfeksiyonu olan hasta serumundan HBV RNA'nın ekstraksiyonundan sonra cDNA'yı oluşturmak için özel bir sabitlenmiş diziye sahip spesifik primer kullanılmış olup, HBV RNA amplifikasyonunun özgüllüğünü yüksek tutmak için cDNA, PCR yöntemiyle HBV'ye özgü ileri primer ve özel sabitlenmiş diziyle aynı olan revers primer kullanılarak amplifiye edilmiştir. O zamandan beri, kronik HBV enfeksiyonu olan hastalarda intrahepatik ve serum HBV RNA'yı saptamak için benzer yöntemler kullanılmıştır (89-90). Revers transkripsiyon için tasarlanmış benzersiz primerler kullanan Kairat ve arkadaşları (91) daha sonra serum 3' flRNA(full-length polyadenylated HBV RNA) ve 3' internal kesilmiş poliadenile edilmiş HBV RNA'yı spesifik olarak ölçmek için RACE tabanlı RT-qPCR geliştirmiştir. HBV-spesifik primerlere sahip geleneksel RT-qPCR yöntemi, intrahepatik ve serum HBV RNA'sını ölçmek için de kullanılmış ancak; RT-qPCR'den önce DNA kontaminasyonunu önlemek için ekstrakte edilen nükleik asitlerin DNase I ön tedavisi gerekli görülmüştür (87,88). Son zamanlarda, Wang ve diğerleri tarafından serum HBV RNA'sını ölçmek için HBV spesifik primerler ile süper duyarlı damlacık dijital PCR yöntemi kullanılmaktadır (86).

HBV RNA'yı saptamak ve ölçmek için birçok yöntem kullanılabilir. HBV RNA tespiti için yaygın olarak kabul edilen standartlaştırılmış yöntem mevcut olmadığından, daha doğru ve güvenilir bir HBV RNA tespiti ve niceleme tekniği geliştirmek için daha fazla çalışmaya ihtiyaç olduğu görünmektedir.

3. MATERYAL VE METOD

Çalışmamız için gerekli olan kan örnekleri, 3. basamak tedavi kurumu olan Sakarya Üniversitesi Tıp Fakültesi Eğitim Araştırma Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı'na başvuran Hepatit B tanısı almış veya Hepatit B şüphesi olan hastalarından toplanmıştır. Hasta örnekleri alınmadan önce "Hasta bilgi formu" oluşturulmuş ve bilgiler bu forma uygun olarak kayıt edilmiştir. 'Hepatit B hastalarında HBV RNA'nın tanı ve tedavideki önemi' konusuyla araştırma projesi olarak sunulan çalışmamız için, Malatya Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan 24.07.2019 tarih ve 2019/147 numaralı etik kurul onayı alınmıştır. Tez çalışmamız, İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TDK-2019-1926 proje numarası ile desteklenmiştir.

3.1. Hasta Grubu ve Yöntem

Sakarya Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı'na başvuran HBsAg ve HBV DNA pozitif 13 erkek ve 19 kadın; HBsAg pozitif HBV DNA negatif 17 erkek ve 15 kadın; HBsAg ve HBV DNA negatif 14 erkek ve 8 kadın olmak üzere toplam 86 hepatit hastasından Aralık 2019-Ocak 2021 tarihleri arasında kan örneği toplanmıştır. Hastaların demografik bilgileri, HBsAg ve HBV DNA miktarı hazırlanan hasta bilgi formlarına işlenmiştir. Hastalardan alınan kan örnekleri serumlarından ayrıştırılmış ve her örnek için iki eppendorf tüpe 1mL konularak, çalışmanın yapılacağı zamana kadar -20°C'de saklanmıştır. Toplanan hasta örneklerinde QIAamp®MinElute®Virus Spin Kit (Qiagen, Germany) kullanılarak nükleik asit izolasyonu yapılmış, ardından real-time PCR yöntemi ile İnönü Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Mikrobiyoloji Araştırma Laboratuvarında QIAGEN Rotor Gene PCR cihazında HBV RNA araştırılmıştır.



Şekil 3.1. Hasta Numuneleri

3.2. Demirbaş Malzemeler

- Hız ayarlı vorteks (VelpScientifica, Europe)
- Laminarairflow (Modkim, Türkiye)
- Su banyosu (Memmert, Almanya)
- Buzdolabı (Arçelik, Türkiye)
- Mikropipetler (Eppendorf, Almanya)
- Santrifüj cihazı (Eppendorf, Almanya)
- PCR cihazı Qiagen (Rotor Gene, Almanya)
- Elektronik hassas terazi (Denver, Kanada)
- Elektroforez cihazı (Cleaver Scientific, İngiltere)
- Mikrodalga fırını (Arçelik, Türkiye)



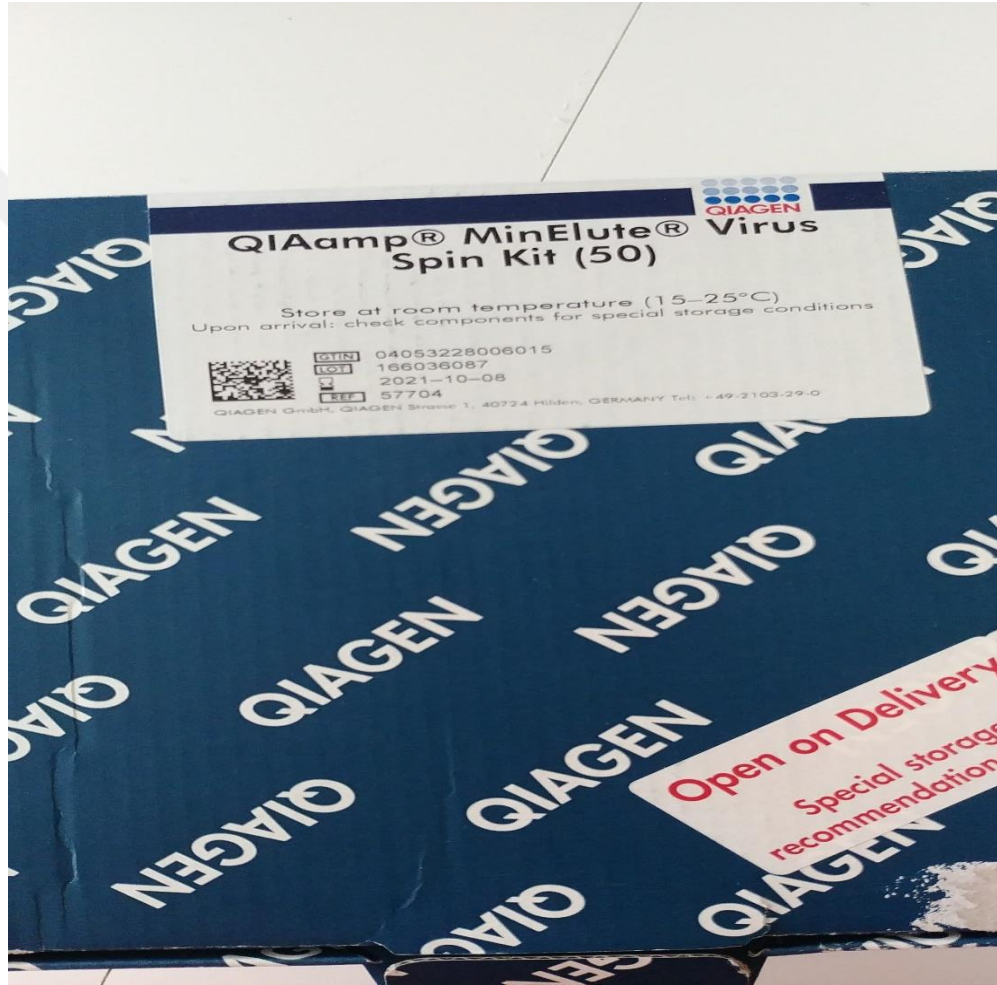
Şekil 3.2. PCR Cihazı

3.3. Sarf Malzemeler

- Enjektör
- Filtreli pipet ucu (10,20,100,200,1000µl'lik)
- Amplifikasyon karışımı
- Nükleik asit izolasyon kiti, Q1Aamp®MinElute®Virus Spin Kit (Qiagen, Germany)
- Primer setleri
- ProbFAM boyası ile işaretli
- M-MuLVReverseTranskriptaz enzimi
- Eppendorf tüpler (1500, 500, 200 µl'lik)
- Kan tüpü
- Etanol (%96)
- Agaroz jel
- 10 X TBE stok solüsyon tampon
- Etidyum bromür

- Blue dye (jel loading)
- Alüminyum folyo kağıt

HBV RNA'nın araştırılması için İnönü Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Araştırma Laboratuvarında önce RNA izolasyonu yapıldı. Ardından Wang J. ve ark. tarafından kullanılan prob ve primerler kullanılarak iki aşamalı RT-PCR ile önce cDNA elde edildi. Elde edilen cDNA kalıp olarak kullanılarak RT-PCR işlemi HBV RNA'nın serumdaki varlığı araştırıldı.



Şekil 3.3. Nükleik Asit İzolasyon Kiti

3.4. Serum Örneklerinden RNA izolasyonu

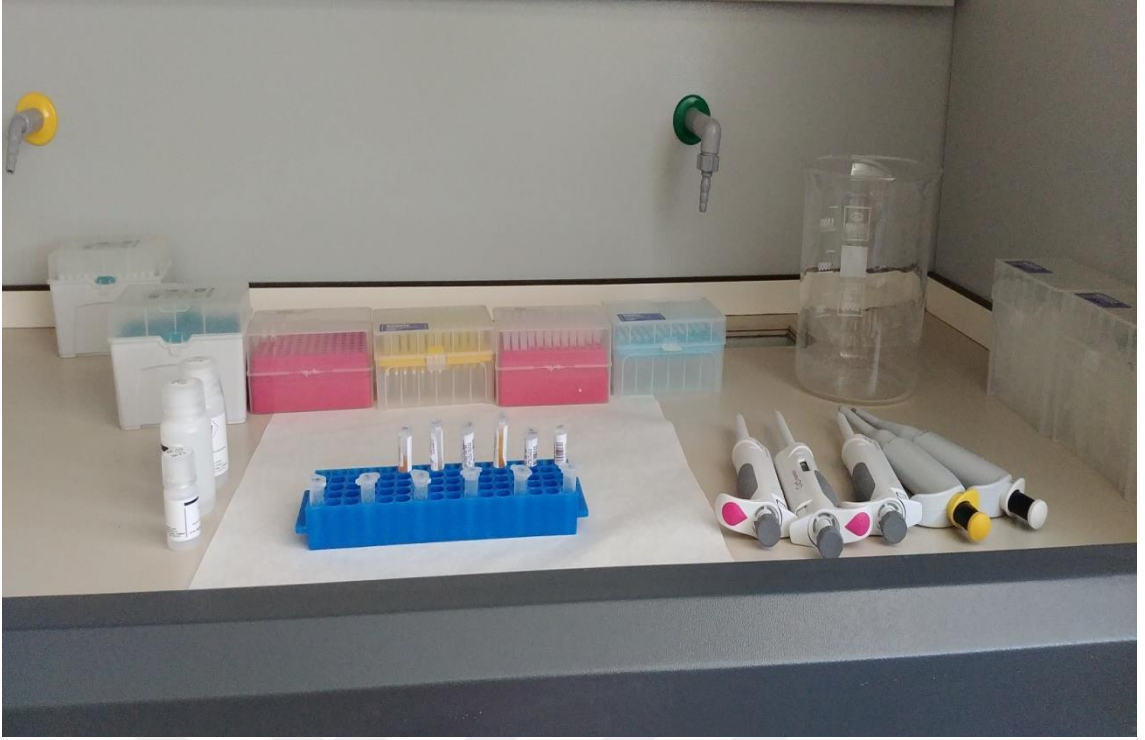
Serum örneklerinden nükleik asit izolasyonu (RNA) için QIAamp®MinElute®Virus Spin Kit (Qiagen, Germany) kullanılmıştır. Ekstraksiyon işlemi üretici firmanın talimatları doğrultusunda aşağıdaki gibi yapılmıştır:

1. Numaralandırılan santrifüj tüplerinin her birine 25 µl Qiagen proteaz pipetlendi.
2. Her bir tüpe kendi numunesinden 200 µl serum eklendi.
3. 200 µl Buffer AL (28 µg/ml taşıyıcı RNA içerir) eklenip, 15 sn pulse-vorteks yapıldı.
4. 56 °C'de su banyosunda 15 dk inkübe edildi
5. Tüplerin kapağının iç kısmındaki damlaları gidermek için, tüplerin kapağı açılmadan spin quick yapıldı.
6. Tüplere 250 µl etanol (%96) eklendi, kapağı kapatıldı ve 15 sn pulse-vorteks yapıldı. Oda sıcaklığında (15-25°C) 5 dk bekletildi.
7. Tekrar spin quick yapıldı.
8. Tüm lizat jantı ıslatmadan QIAampMinElute kolonuna dikkatlice pipetlendi. Kapağı kapatılıp 6000xg'de (8000 rpm) 1dk santrifüjlendi. QIAampMinElute kolonu 2ml'lik temiz toplama tüpüne yerleştirildi ve süzüntüyü içeren alttaki toplama tüpü atıldı.
9. Kolon kapağı dikkatlice açılıp, kenarı ıslatmadan 500 µl Buffer AW1 eklendi ve kapağı kapatıldı. 8000 rpm'de 1 dk santrifüjlendi. QIAampMinElute kolonu 2ml'lik temiz toplama tüpüne yerleştirildi ve süzüntüyü içeren alttaki toplama tüpü atıldı.
10. Kolon kapağı dikkatlice açılıp, kenarı ıslatmadan 500 µl Buffer AW2 eklendi ve kapağı kapatıldı. 8000 rpm'de 1 dk santrifüjlendi. QIAampMinElute kolonu 2ml'lik temiz toplama tüpüne yerleştirildi ve süzüntüyü içeren alttaki toplama tüpü atıldı.
11. Kolon kapağı dikkatlice açılıp, kenarı ıslatmadan 500 µl etanol (% 96) eklendi ve kapağı kapatıldı. 8000 rpm'de 1 dk santrifüjlendi. Süzüntüyü içeren alttaki toplama tüpü atıldı.
12. QIAampMinElute kolonu 2ml'lik temiz toplama tüpüne yerleştirildi ve membranı tamamen etanolden kurutmak için tam hızda (14000 rpm'de) 3 dk santrifüjlendi.
13. QIAampMinElute kolonu 2ml'lik temiz toplama tüpüne yerleştirildi, kapağı açıldı ve 56°C'de 3 dk inkübe edildi. Bu adım kalan sıvıyı tamamen buharlaşmasını sağlar.
14. QIAampMinElute kolonu temiz bir 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne yerleştirildi. Kolonun kapağı dikkatlice açıldı. Zarın merkezine 100 µl

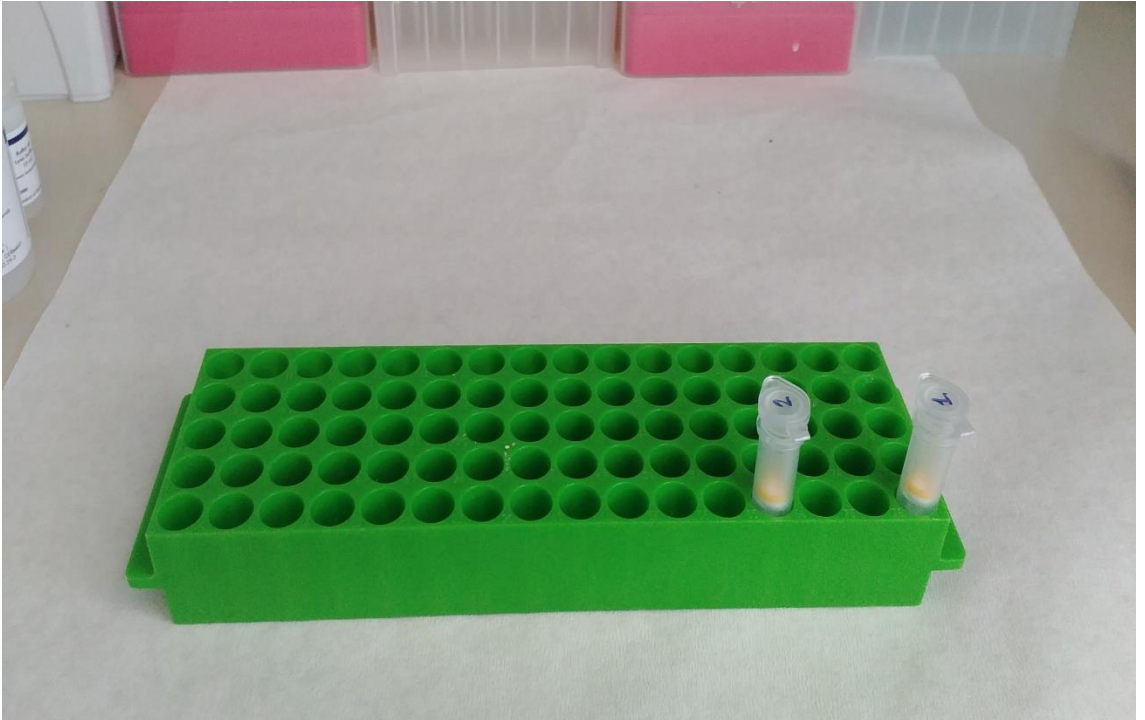
Buffer AVE eklendi. Kapağı kapatıldı ve oda sıcaklığında yaklaşık 5 dk inkübe edildi. 14000 rpm’de 1 dk santrifüjlendi. Elde edilen RNA’lar -20 °C’de çalışma zamanına kadar muhafaza edildi.



Şekil 3.4. Serum Örneklerinden Nükleik Asit İzolasyonu



Şekil 3.5. Numunelerden Nükleik Asit Ekstraksiyonu



Şekil 3.6. Lizatın Kolona Yüklenmesi



Şekil 3.7. Su Banyosunda İnkübasyon



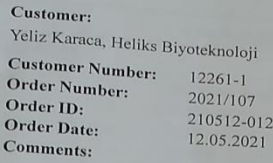
Şekil 3.8. Elde edilen RNA'ların Çalışma Zamanına Kadar Muhafazası

Primer ve Probların Sulandırımı

Çalışmada kullanılacak primerler ve problar derin dondurucudan çıkarılıp, kapağı açılmadan spinquick yapıldı. Üretici firma tarafından hazırlanan ürün sertifikasına göre distile su ile sulandırıldı ve 1000 pmol stok çözeltiden çeşitli konsantrasyonlarda sulandırılar hazırlandı (100,20 ve 10 pmol) ve kullanılıncaya kadar derin dondurucuda -20 °C’de saklandı.



Certificate of Analysis



OligoName: 1

Lot-Number: 1051200633F01 1/38

Delivered:	31,8 OD
	889,5 μg
	61,8 nmol
Conc.:	100,0 μM
MW:	14392
Tm:	76,4

No. Bases:	47		
GC %:	51,1		
Ext. Coeff.:	514.000		
A	C	G	T
13	14	10	10

Synthesis Scale:	200nmol (Tender)
Purification:	HPLC
Delivery Form:	lyophilisiert
Quality Control:	DMT-Monitoring
Dissolve in (µl):	618
Expiration Date:	Mai 2022

OligoName: 2

Lot-Number: 10512A219A07 2/38

5'-CGA GAT TGA GAT CTT CTG CGA C-3'

Delivered:	24,9	OD
	700,7	µg
	103,8	nmol
Conc.:	100,0	µM
MW:	6750	
Tm:	60,3	

No. Bases:	22		
GC %:	50,0		
Ext. Coeff.:	240.000		
A	C	G	T
5	5	6	6

Synthesis Scale:	200nmol (Tender)
Purification:	HPLC
Delivery Form:	lyophilisiert
Quality Control:	DMT-Monitoring
Dissolve in (µl):	1038
Expiration Date:	Mai 2022

Page 1

Date 20.05.2021

SNP Biyoteknoloji Araştırma Geliştirme Ve Üretim Sanayi ve Tic. Ltd. Şti.
 Üniversiteler Mah. 1596. Cad. Hacettepe Teknokent 1 nolu Ar-ge Binası No: 97/10 Beytepe - Çankaya / Ankara
 Tel: 312 299 23 28 • Faks: 312 299 23 48 • www.snp.com.tr • info@snp.com.tr

tel. 312.799.23.26

35

SNP Bioteknoloji Araştırma Geliştirme Ve Üretim Sanayi ve Tic. Ltd. Şti.
 Klopferspitz 19
 82152 Martinsried
 Deutschland

Certificate of Analysis

OligoName: 3 ✕		Lot-Number: 10512A219A01 3/38	
-ATT CTC AGA CCG TAG CAC ACG ACA C-3'			
Delivered: 29,0 OD	No. Bases: 25	Synthesis Scale: 200nmol (Tender)	C 3
805,7 µg	GC %: 52,0	Purification: HPLC	
106,3 nmol	Ext. Coeff.: 273.000	Delivery Form: lyophilisiert	
Conc.: 100,0 µM	A C G T	Quality Control: DMT-Monitoring	
W: 7580	8 9 4 4	Dissolve in (µl): 1063	
n: 64,6		Expiration Date: Mai 2022	

NA

OligoName: 4		Lot-Number: 10512A219A12 4/38	
AYA GAC CAT CAA ATG CCC-3'			
Delivered: 20,6 OD	No. Bases: 18	Synthesis Scale: 200nmol (Tender)	A1
554,5 µg	GC %: 47,2	Purification: HPLC	
102,1 nmol	Ext. Coeff.: 202.000	Delivery Form: lyophilisiert	
Conc.: 100,0 µM	A C G T	Quality Control: DMT-Monitoring	
W: 5429	7 6,5 2 2,5	Dissolve in (µl): 1021	
n: 52,5		Expiration Date: Mai 2022	

NA

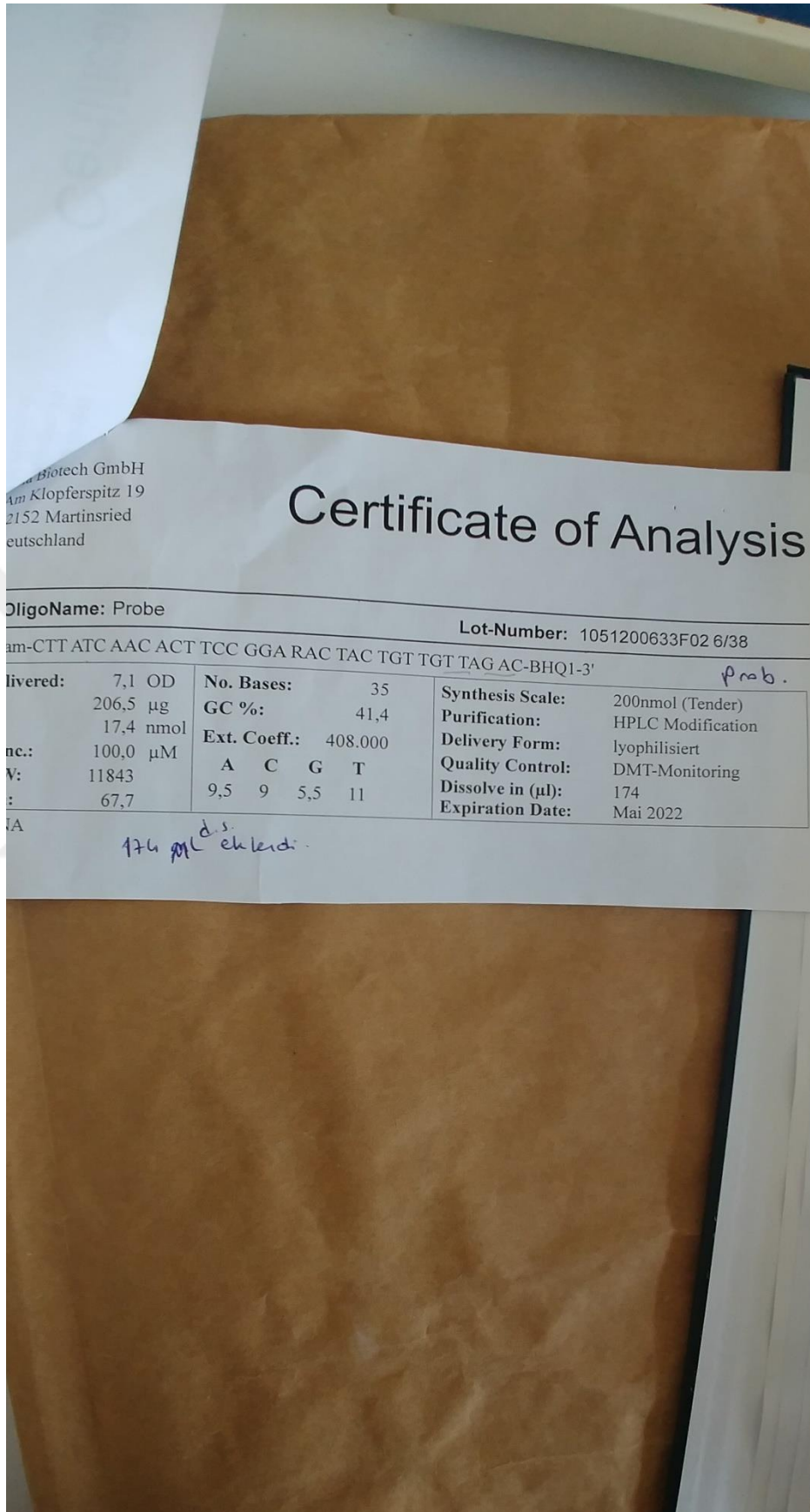
OligoName: 5 ✕		Lot-Number: 10512A219A02 5/38 ✕	
ATT CTC AGA CCG TAG CAC ACG ACA C-3'			
Delivered: 29,3 OD	No. Bases: 25	Synthesis Scale: 200nmol (Tender)	A2
813,5 µg	GC %: 52,0	Purification: HPLC	
107,3 nmol	Ext. Coeff.: 273.000	Delivery Form: lyophilisiert	
Conc.: 100,0 µM	A C G T	Quality Control: DMT-Monitoring	
W: 7580	8 9 4 4	Dissolve in (µl): 1073	
n: 64,6		Expiration Date: Mai 2022	

NA

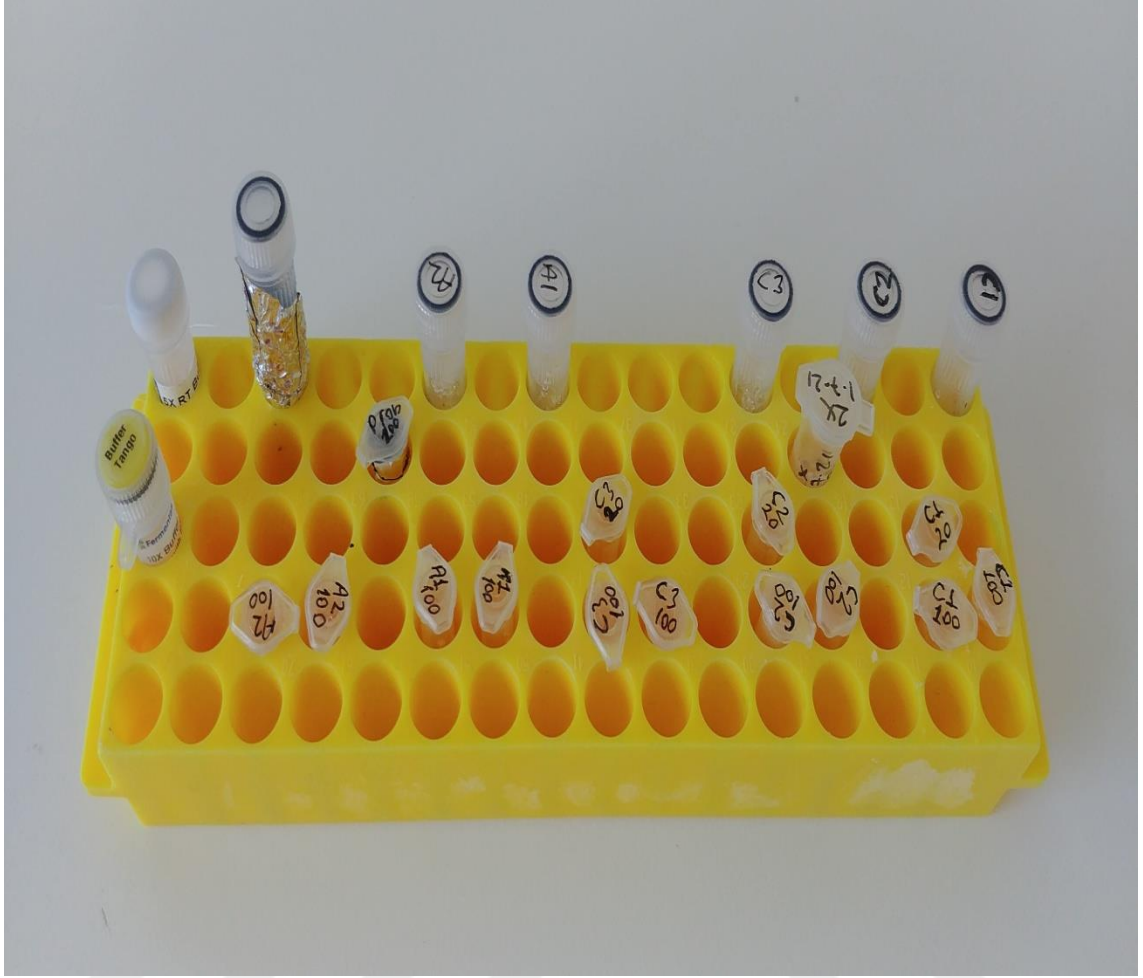
Page 2 Date 20.05.2021

SNP Bioteknoloji Araştırma Geliştirme Ve Üretim Sanayi ve Tic. Ltd. Şti.
 Üniversiteler Mah. 1506. Cad. Hacettepe Teknokent 1. Katlı A-çe Binası No: 92/10 Beştepe - Çankaya / Ankara
 Tel: 312 299 23 28 • Faks: 312 299 23 48 • www.snp.com.tr • info@snp.com.tr

Şekil 3.10. Primer Analiz Sertifikası



Şekil 3.11. Prob Analiz Sertifikası



Şekil 3.12. Primer ve Prob Sulandırımı

3.5. RNA'dan Komplementer DNA (cDNA) Elde Edilmesi

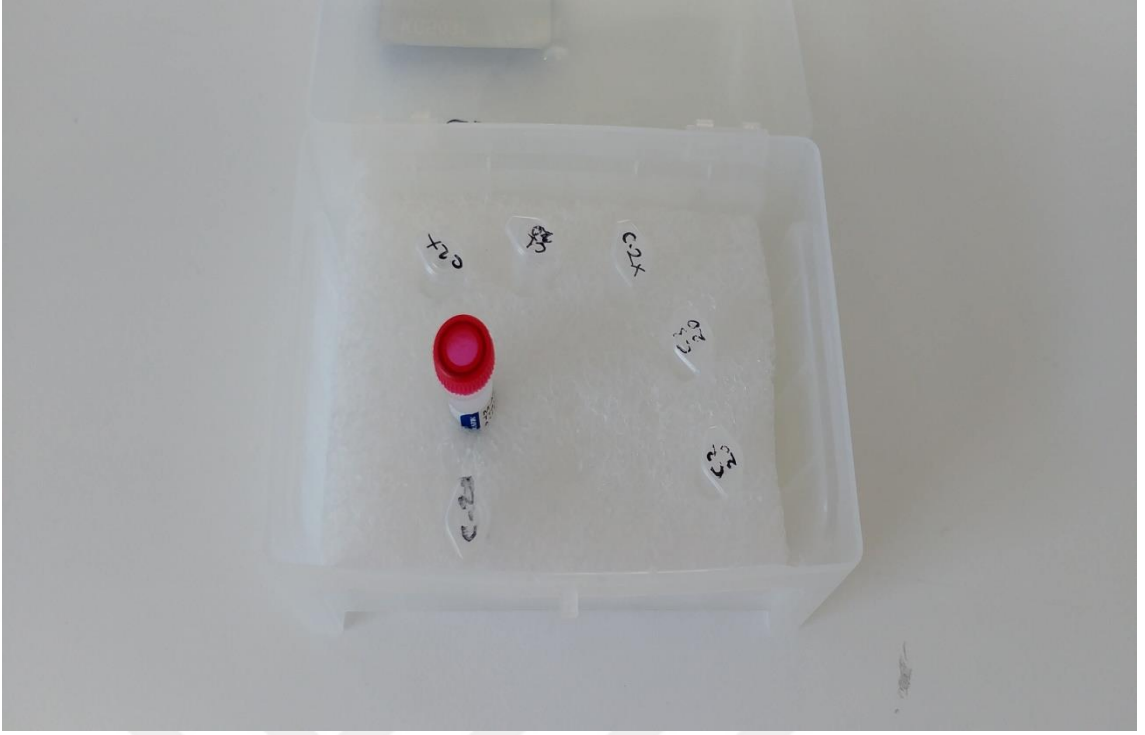
RNA'dan komplementer DNA (cDNA) elde etmek için Wang J. Ve arkadaşları tarafından daha önceki çalışmalarında kullanılan primer dizilimlerinin aynısı kullanıldı. HBV spesifik RT primerinin dizisi 5'- ATT CTC AGA CCG TAG CAC ACG ACA CCG AGA TTG AGA TCT TCT GCG AC-3' (C1), rastgele dizi 5'-ATT CTC AGA CCG TAG CAC ACG ACA C-3' (C3) HBV'ye özgü dizinin CGA GAT TGA GAT CTT CTG CGA C (C2) RT enzim olarak M-MuLVReverseTranscriptase (A1111-1x5KU, 200U/ µl, Biomatik) kullanıldı.



Şekil 3.13. cDNA Elde Edilmesi Hazırlık Aşaması

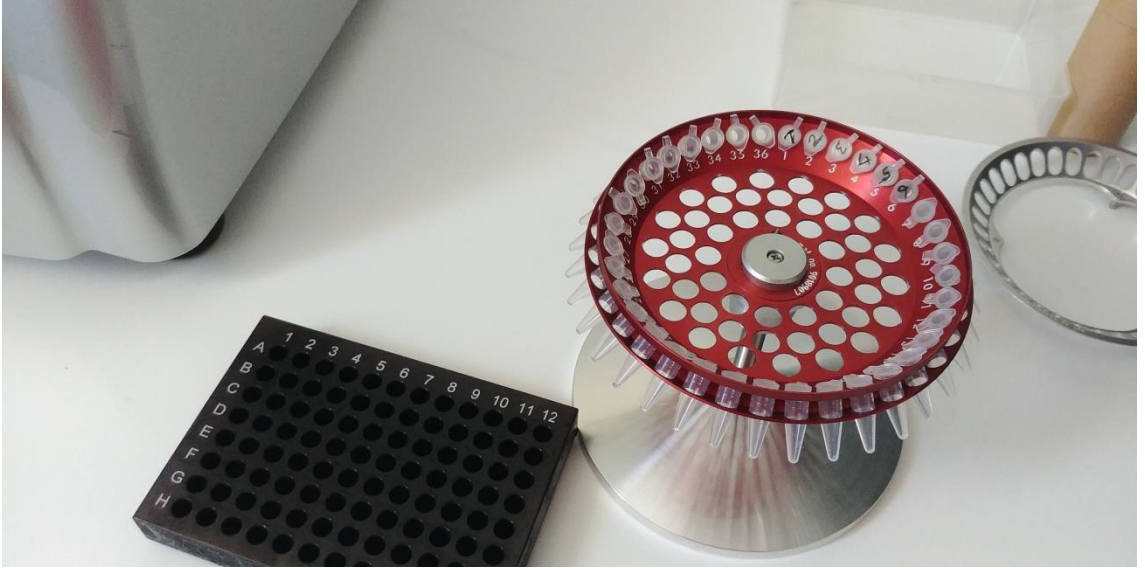
Tablo 3.1. cDNA RT-PCR Bileşenleri

Reaktan	Miktar
C-2x	12.5 µl
C1	1 µl
C2	1 µl
C3	1 µl
M-MuLVReverseTranscriptase	0.5 µl
Distile su	4 µl
Template	5 µl
Toplam	25 µl



Şekil 3.14. cDNA Reaktanları

Örnek başına; 12.5 μ l C-2X, 1 μ l C1, 1 μ l C2, 1 μ l C3, 0.5 μ l RT enzim ve 4 μ l distile su olacak şekilde örnek sayısı+1 mix hazırlandı. Tüplere 20 μ l pipetlendi. Üzerine total volüm 25 μ l olacak şekilde 5 μ l numune eklendi ve PCR cihazına kondu.



Şekil 3.15. cDNA Eldesi İçin PCR Cihazına Yerleştirilmesi

Tablo 3.2. cDNA RT-PCR Döngüleri

Adım	Siklus	Sıcaklık	Zaman
1	1	95°C	3 dk
2	1	42 °C	40 dk



Şekil 3.16. PCR Sonucu Elde Edilen cDNA Havuzu

3.6. HBV RNA Amplifikasyonu

Serum HBV RNA varlığının belirlenmesi Wang J. ve arkadaşlarının daha önceki çalışmalarında kullandıkları primer ve prob setleri kullanıldı. Çalışma “In house PCR” olarak laboratuvarımız şartlarında optimize edildi. Çalışmada pozitif kontrol olarak HBV Core DNA hedef dizilimlerini içeren standart plazmitler kullanıldı. Plazmitlere TA klonlama stratejisi kullanılarak HBV kor bölgesini kodlayan DNA dizilimlerin pGEM-TEasyVector (Promega, Madison, WI) kiti kullanılarak yerleştirilmesi ile elde edilmiştir. Amplifikasyon işlemi Rotor Gene (Germany) cihazı ile yapılmıştır. Primerler ve probun dizileri şu şekildedir; ileri primer 5'-AYA GAC CAT CAA ATG CCC-3'

(A1), reverse primer 5'ATTCTCAGACCGTAGCACACGACAC-3' (A2) ve prob 5' FamCTT ATC AAC ACT TCC GGA RAC TAC TGT TGT TAGAC-BHQ1-3'.



Şekil 3.17. HBV RNA Amplifikasyonu Hazırlık Aşaması

Tablo 3.3. HBV RNA RT-PCR Bileşenleri

Reaktan	Miktar
b-2x	12.5 µl
A1	1 µl
A2	1 µl
Prob	1 µl
Taq DNApol	0.5 µl
Distile su	4 µl
Template (kalıp cDNA)	5 µl
Toplam	25 µl



Şekil 3.18. HBV RNA Reaktanları

Örnek sayısı+1+2 pozitif kontrol için mix hazırlandı. Tüplere 20µl dağıtıldı. Üzerine 5µl cDNA eklendi. Pozitif kontrol (PK) tıpkı örnek gibi hazırlandı. PCR cihazına kondu.



Şekil 3.19. HBV RNA Amplifikasyonu

Tablo 3.4. HBV RNA RT-PCR Döngüleri

Adım	Siklus	Sıcaklık	Zaman
1	1	95°C	3 dk
2	40	95°C	15 sn
		60°C	30 sn

3.7. cDNA'nın Agaroz Jel Elektroforezi

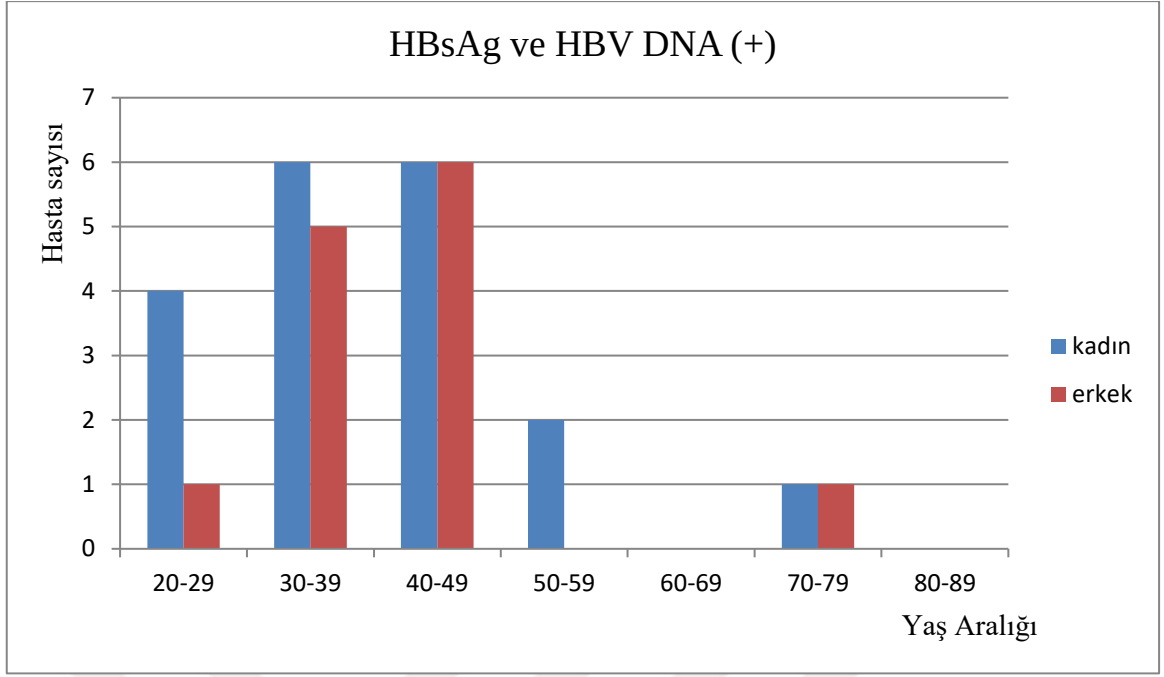
Elde ettiğimiz cDNA'nın varlığını tespit etmek için agaroz jel hazırlandı. Oda sıcaklığındaki 100X TBE (Tris Borik asit, EDTA) stok çözeltimizden 100 ml alınıp, üzerine 900 ml distile su eklenerek 1X TBE çözeltisi hazırlandı. %1.5 agaroz jel hazırlandı (2.25 gram katı agaroz jel hassas terazide tartıldı, balon jojeye kondu, üzerine hazırlanmış olduğumuz 1X TBE'den 150 ml eklendi. Mikrodalgada berraklaşana kadar sık sık kontrol edilerek ısıtıldı. Homojen hale gelen çözeltiye 50 µl Etidyum bromür eklendi. Bu aşamada dikkatli olunmalı ve mümkün olduğunca buharı solunmamalıdır.

İyice karıştırıldıktan sonra jel kalıbına döküldü ve donması bekledi. İyice donan jel elektroforez tankına yerleştirildi ve üzerine kalan 850 ml 1X TBE tamponu eklendi.

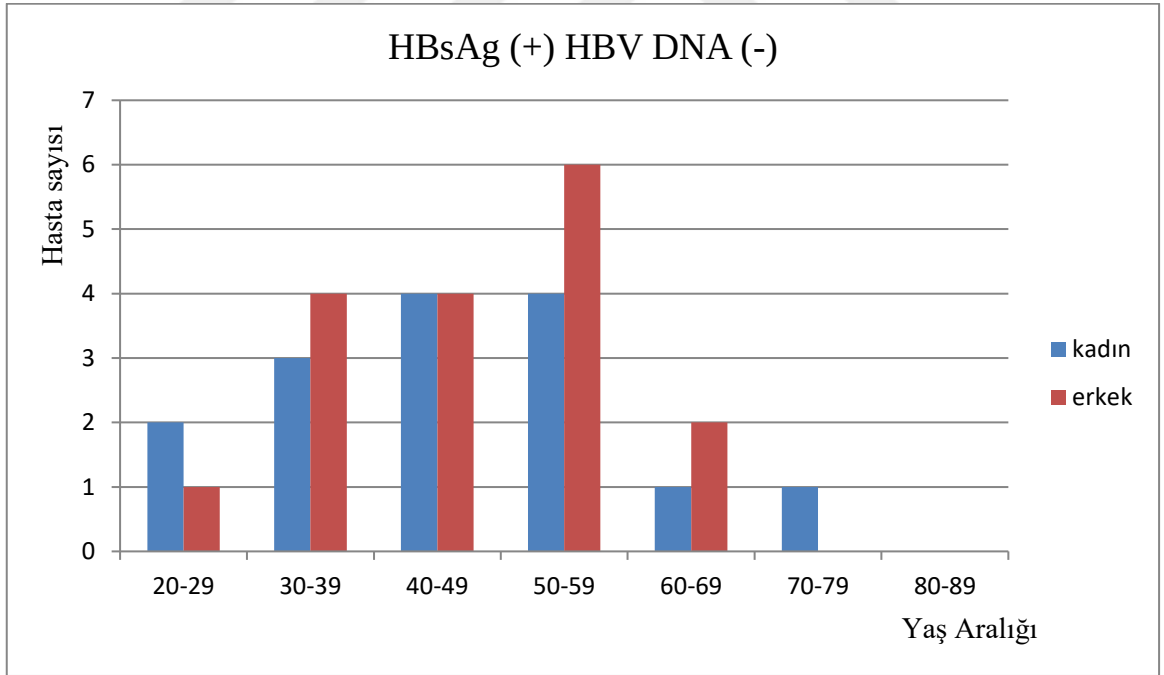


Şekil 3.20. Elektroforez Aşaması

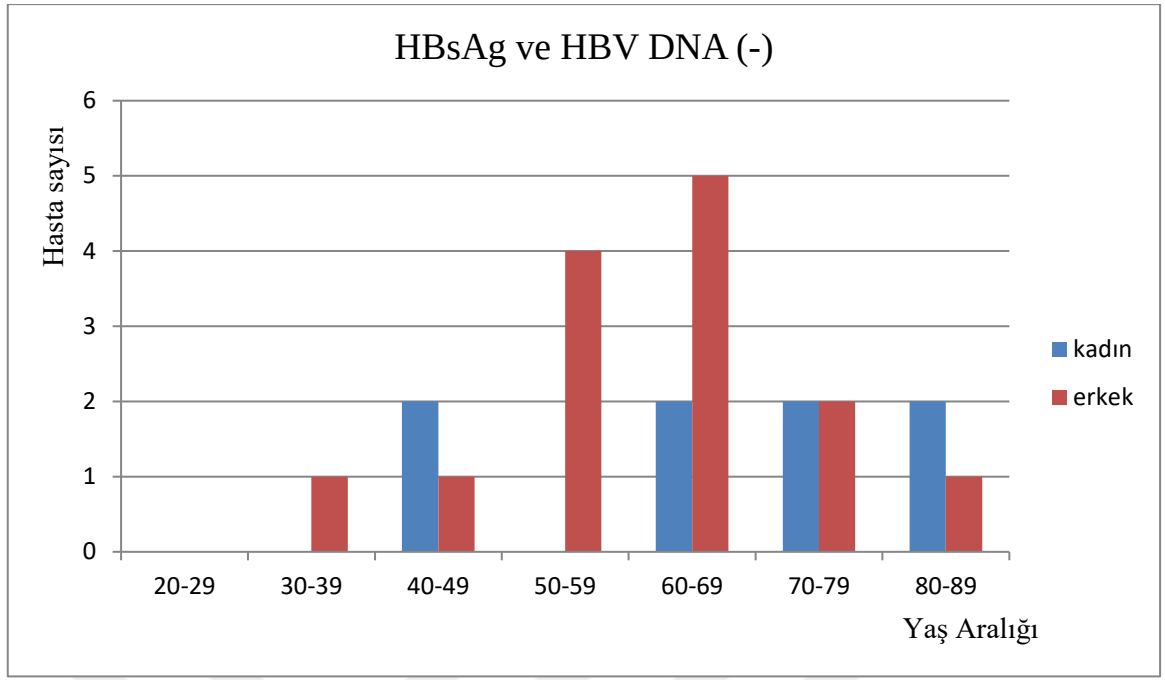
Bir miktar alüminyum folyo kağıt üzerine örnek sayısı kadar 5 μ l jel loading boyası kondu. Üzerine 10 μ l PCR sonucu elde edilen cDNA numuneleri eklendi. Moleküler marker olarak 100bp DNA ladder (Promega, Madison, USA) kullanıldı. Köpürmeden hafifçe karışması sağlandı, 15 μ l pipete alındı ve jeldeki kuyucuklara sırasıyla yüklendi. Bağlantı kabloları takıldı, 120 volt 400 mAmper’de yaklaşık 1 saat elektrik akımı uygulandı. Süre sonunda jel alındı, UV altında gözlemlendi.



Şekil 3.21. HBsAg ve HBV DNA (+) Hasta Grubu



Şekil 3.22. HBsAg (+), HBV DNA (-) Hasta Grubu



Şekil 3.23. HBsAg ve HBV DNA (-) Hasta Grubu

3.8. İstatistiksel Analiz

SPSS (24.0 versiyon) programı kullanılarak yapılmıştır. Veriler sayı ve yüzde olarak programa girilmiştir. Gruplar arası farklılıklar ve değişkenler arası ilişkiler Ki-kare ve Fisher Kesin Ki-kare testi ile analiz edilmiştir. Sonuçların değerlendirilmesinde $p < 0.05$ değeri anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

İn house Real time PCR tekniği kullanarak dizayn ettiğimiz çalışmamızın sonucunda, daha önce ticari kit kullanılarak HBsAg ve HBV DNA pozitif bulunangruptaki hastaların 22'si (% 25) pozitif, 10'u (% 12) negatif olarak tespit ettik($p < 0.05$). HBsAg pozitif HBV DNA negatif olan gruptaki 4 (% 5) hastamız pozitif ve 28 (% 33) hastamız negatif olarak bulunmuştur ($p < 0.05$). Pozitif bulunan hastalarımız için tekrar kontrol çalışması yapılmış ve yine pozitif sonuçlar elde edilmiştir. HBsAg ve HBV DNA negatif olan grupta ise 2 (% 2) hastamız pozitif bulunurken, 20 (% 23) hasta negatif olarak tespit edilmiştir ($p > 0.05$). Pozitif sonuçlar tekrar edilmiş ve yine pozitif sonuç tespit edilmiştir. Sonuçlarımızı değerlendirirken Qiagen Rotor gene programı kullanılmış olup, threshold değeri ortalama 0.02 olarak belirlenmiş ve sonuçlar bu değere göre hesaplanmıştır. Amplifikasyon sırasında beşinci siklustan önce ve 35. siklustan sonraki sonuçlar değerlendirme dışında bırakılmış ve tekrar çalışılacak gruba dahil edilmiştir. Elde edilen PCR sonuçlarımız aşağıdaki tablolarda gruplar halinde verilmiştir.

PCR sonuçları

Tablo 4.1. HBsAg ve HBV DNA pozitif hasta grubu

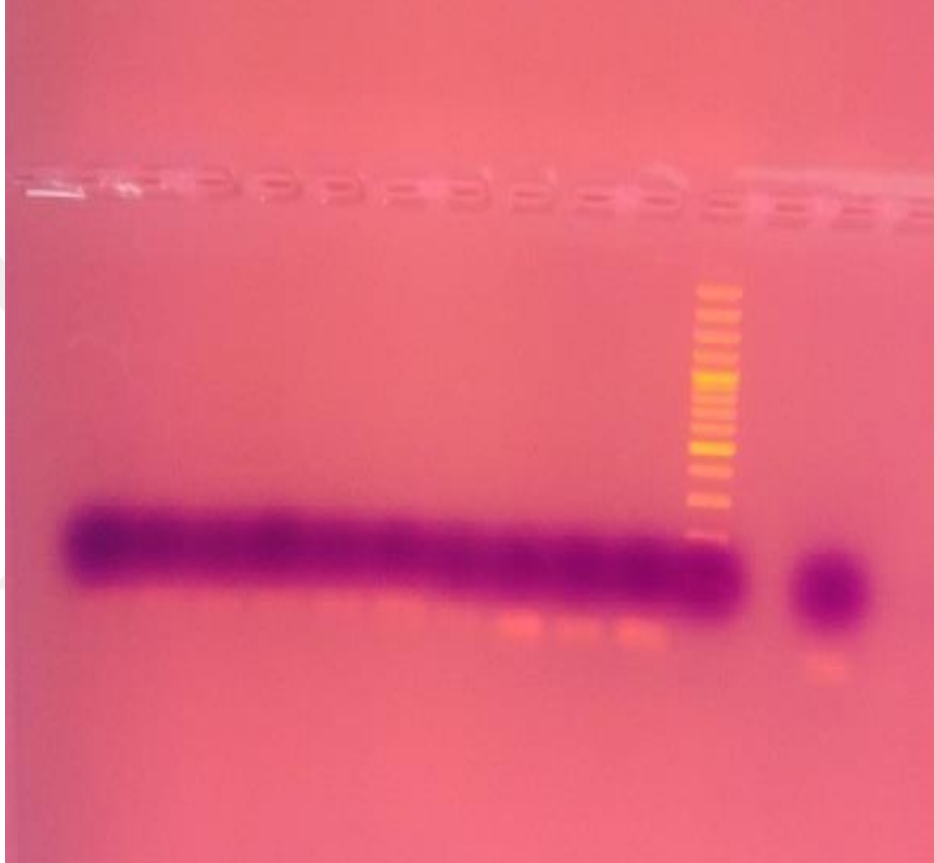
Cinsiyet	Pozitif	Negatif	P değeri
Kadın	13	6	<0.05
Erkek	9	4	<0.05

Tablo 4.2. HBsAg pozitif HBV DNA negatif hasta grubu

Cinsiyet	Pozitif	Negatif	P değeri
Kadın	2	13	<0.05
Erkek	2	15	<0.05

Tablo 4.3. HBsAg ve HBV DNA negatif hasta grubu

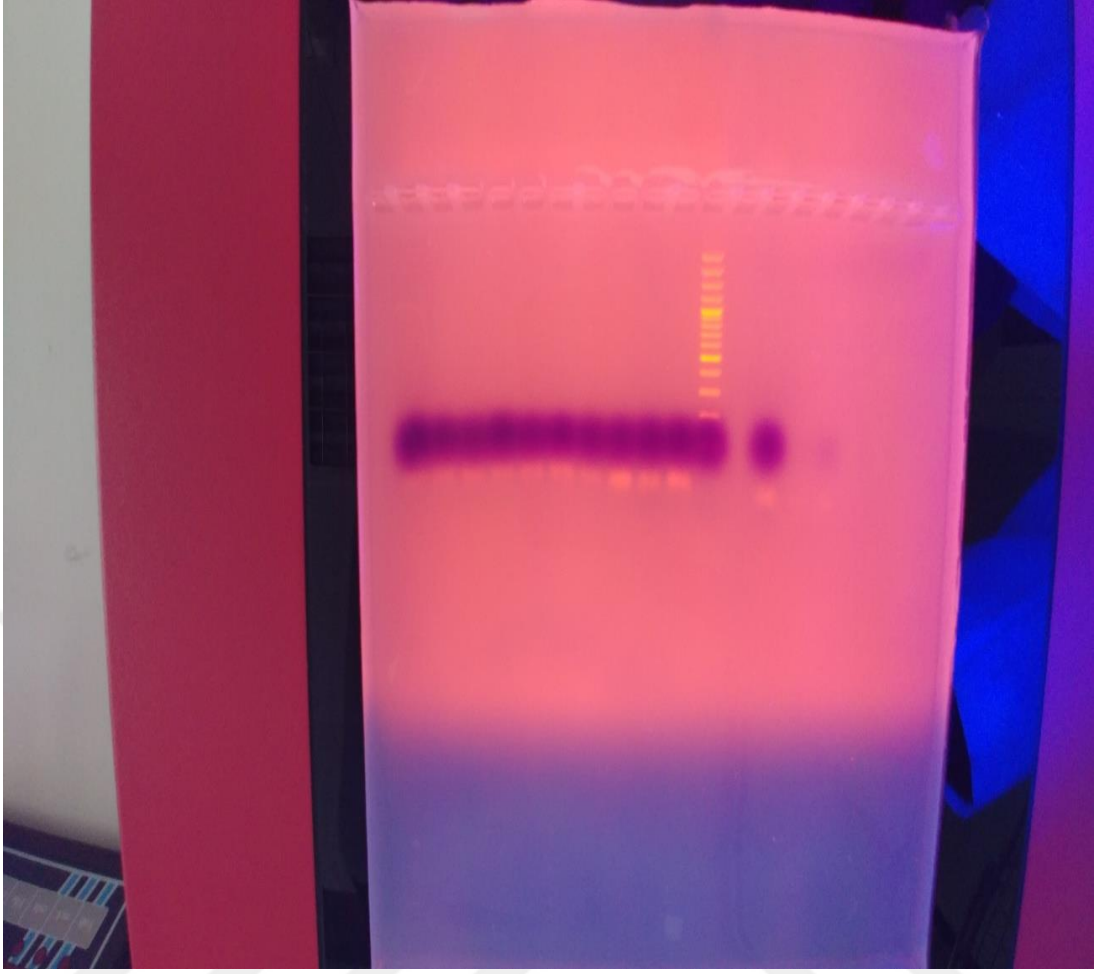
Cinsiyet	Pozitif	Negatif	P değeri
Kadın	0	8	
Erkek	2	12	>0.05



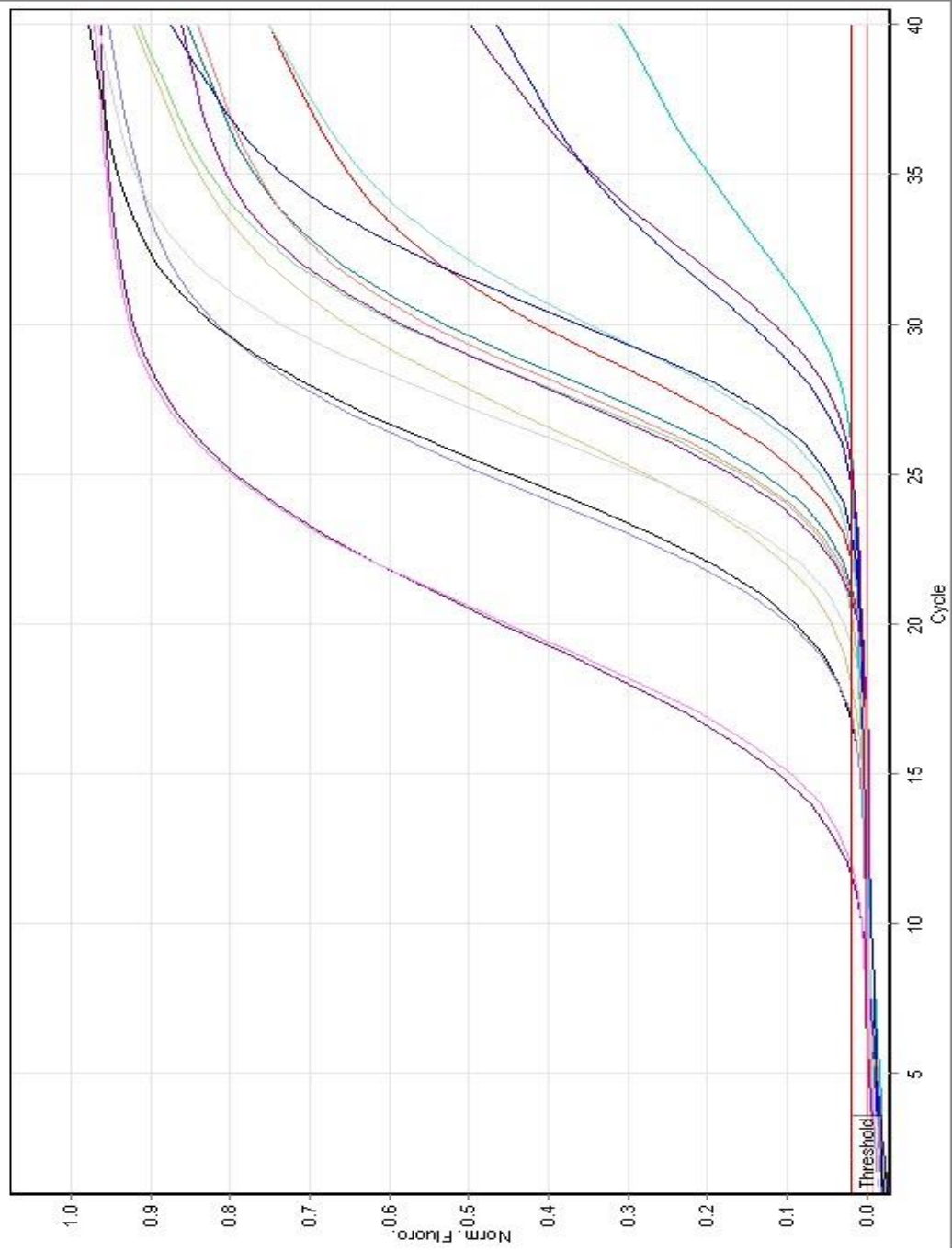
Şekil 4.1. cDNA Jel Elektroforezi



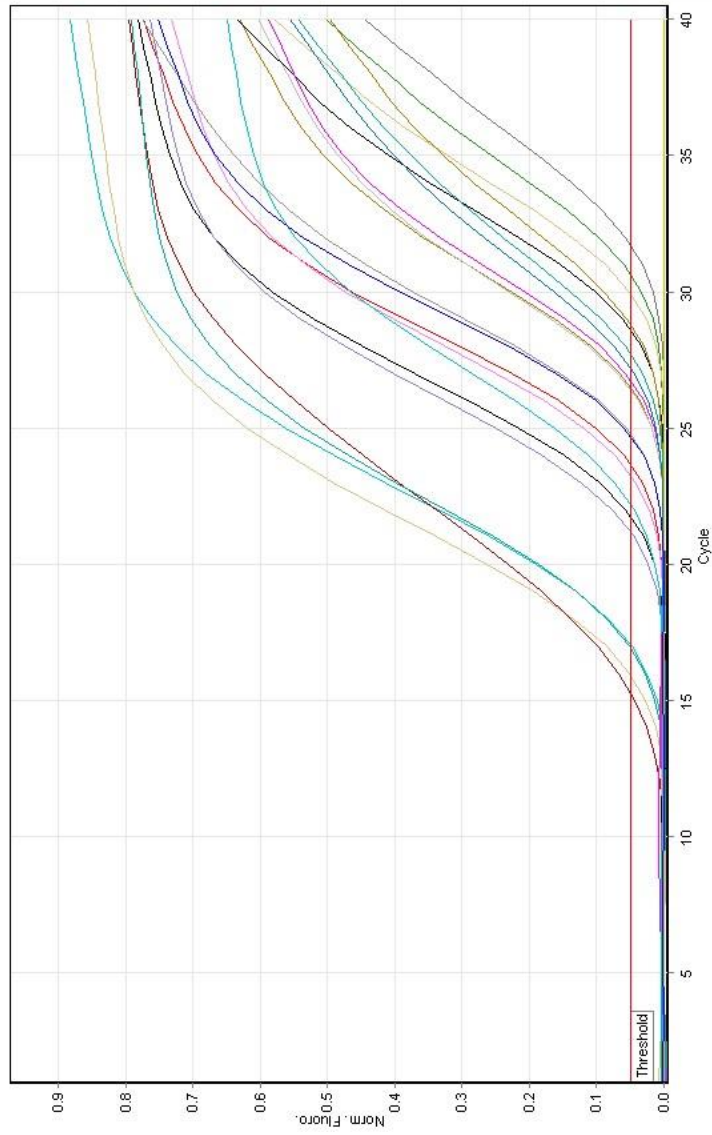
Şekil 4.2. cDNA Jel Elektroforezi



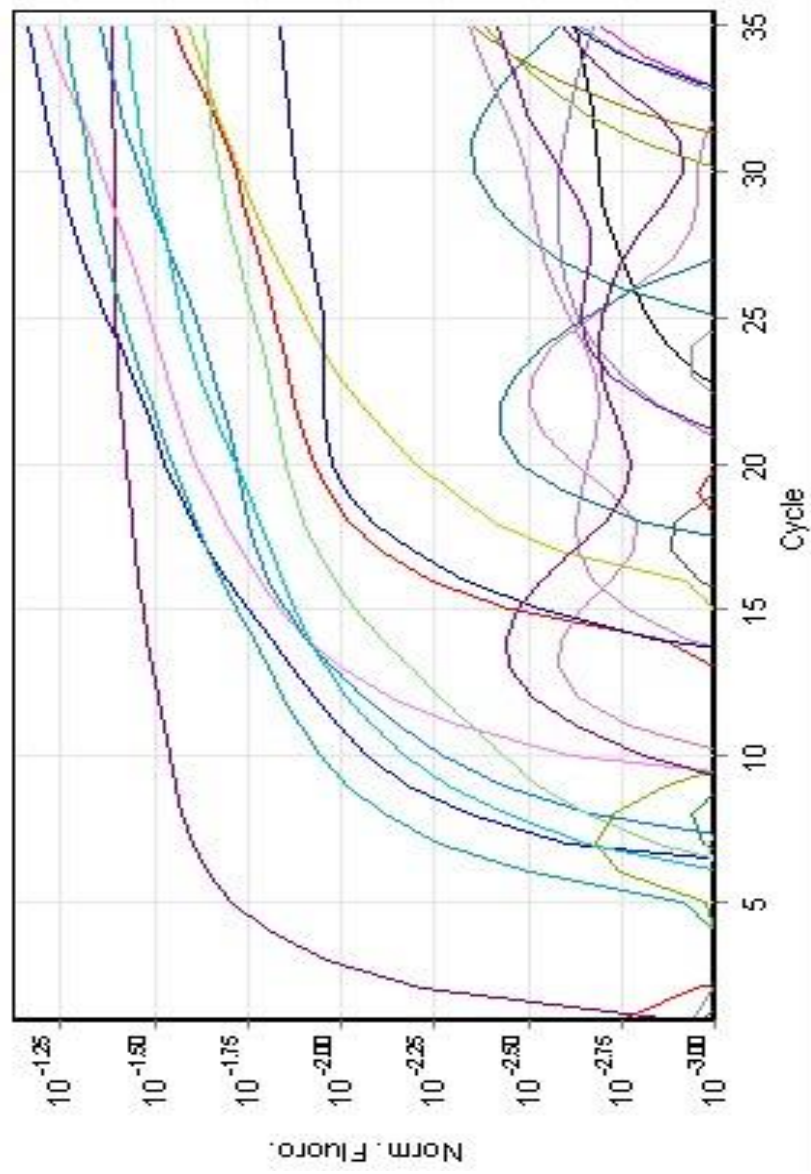
Şekil 4.3. cDNA Jel Elektroforezi



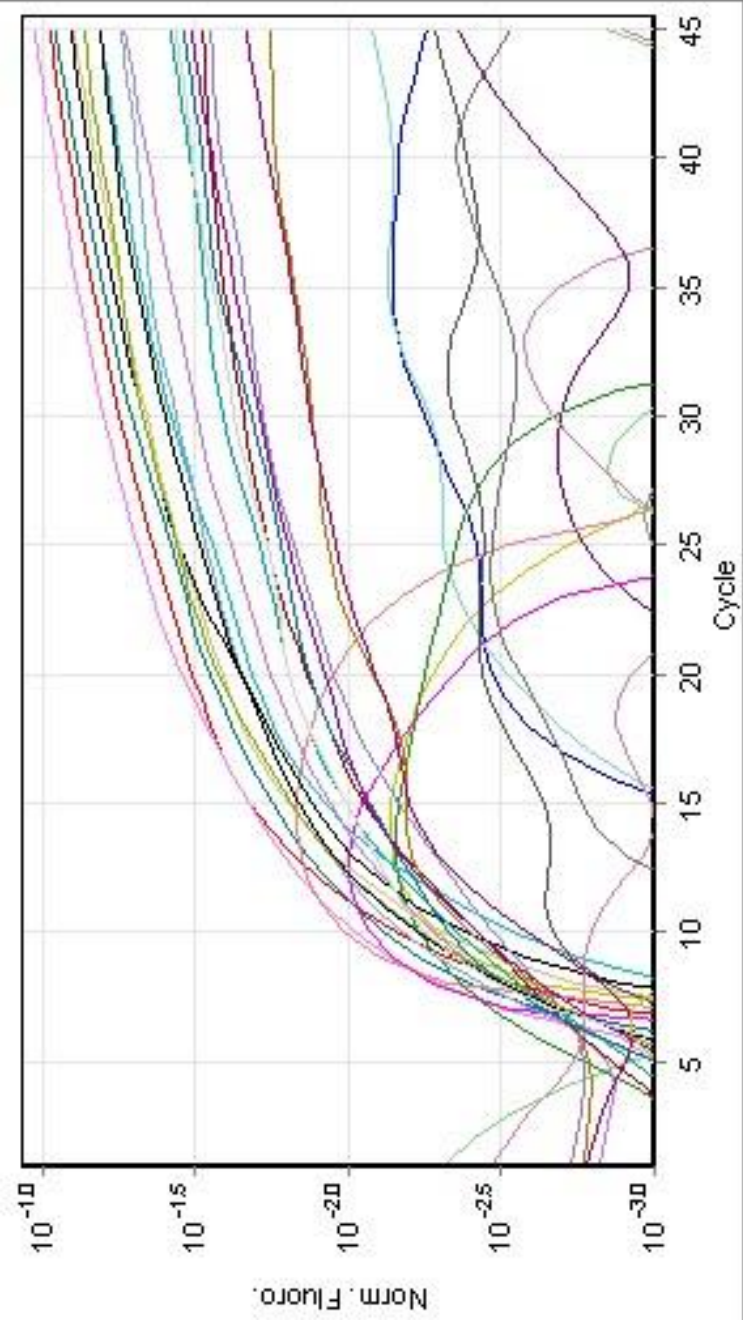
Şekil 4.4. HBV RNA PCR sonuçları



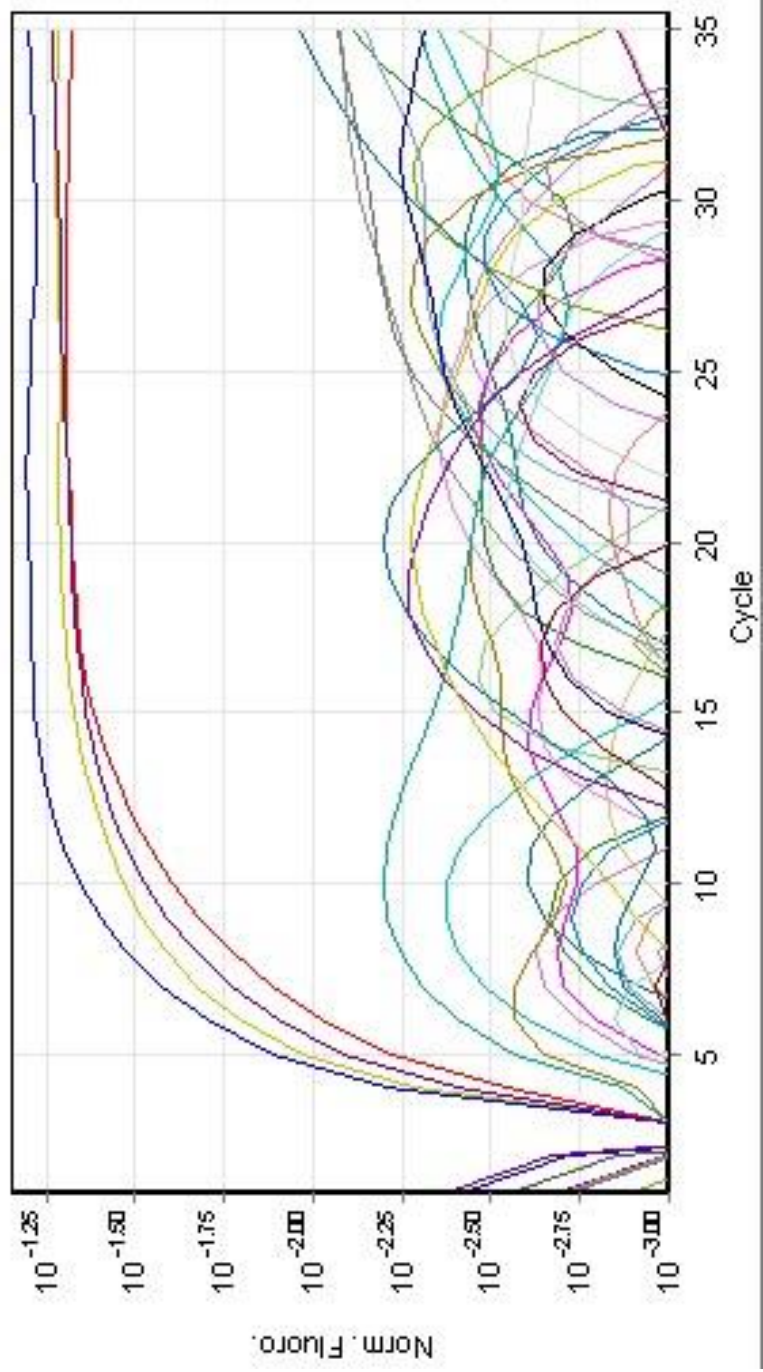
Şekil 4.5. HBV RNA PCR Sonuçları



Şekil 4.6. HBV RNA PCR Sonuçları



Şekil 4.7. HBV RNA PCR Sonuçları



Şekil 4.8. HBV RNA PCR sonuçları

5. TARTIŞMA

HBV, özellikle bizim ülkemizin de aralarında olduğu gelişmekte olan bölgelerde ciddi bir sağlık sorunudur. Dünyadaki insanların yaklaşık üçte biri Hepatit B virusuyla enfektidir. Hepatotrop olan bu virüs partikülünün epidemiyolojisi, virolojisi, doğal seyri ve tedavisi ile ilgili bilgiler konusunda, 1970'lerden bu yana önemli ilerlemeler kaydedilmiştir (1).

HBV, hematojen ve cinsel yolla bulaşır. Karmaşık bir mekanizmaya sahip viral-konak etkileşimi sonucunda, akut fazda subklinik hepatitten ikterik hepatite, fulminan, akut ve subakut hepatite kadar ve kronik fazda asemptomatik bir kronik enfeksiyon durumundan kronik hepatit, siroz ve HCC'ye kadar değişen geniş bir spektruma sahiptir. Hastalar enfeksiyonu atlattıktan sonra anti-HBs geliştirir; ancak kişi HBcAg'ye karşı antikora sahip olduğu sürece reaktivasyon riski devam etmektedir (3).

HBV, hepadnavirüs familyasına mensup, hepatotrop, zarflı ve kısmen çift sarmallı (%70), kısmen tek iplikli (% 30) sirküler fakat kovalent olarak kapalı olmayan ve bu yapısından dolayı rcDNA (relaxedcircular) olarak adlandırılan, çembersel DNA genomlu ikozohedral bir nükleokapsid özüne sahip, 42 nm çapında bir viriondur (92). Sadece insanda ve karaciğer hücrelerinde enfeksiyon yapabilir. Hücre içine girdikten sonra zarf ve kapsidinden soyunup genomunu çekirdeğin içine sokar. Burada kısmi çift sarmal olan genetik yapısı kapalı, kovalent, dairesel hale gelir. Bu yapıdan virüsün antijenlerini sentez ettiren mRNA'lar yapılır. Bu RNA'lardan biri HBV DNA sentezi için şablon rolü görür ve reverse transcriptase enzimi aracılığıyla virüsün DNA'sı sentez edilir (2).

Hepatotropik olmasının yanında karaciğer dışındaki doku ve organlarda da tutulum (kemik iliği, lenf bezleri, dalak, periferik kan mononükleer hücreleri, vb.) görülmektedir. Sadece 3.2 kilobaz baz çiftine sahip genom yapısı sebebiyle bilinen en minik DNA virüsüdür. Elektron mikroskopunda incelendiğinde; yaklaşık 42 nm çapında, yuvarlak şekilde, merkezde çekirdek (kor), etrafta zarf (yüzey antijeni) bulunan enfeksiyöz virion (Dane partikülü) ya da sadece zarf proteininden meydana gelen nükleik asit ihtiva etmeyen enfeksiyöz olmayan tübüler ve küresel partiküller bulunabilir (93). Bu partiküllerin tamamının dış yüzeyinde, HBsAg eksprese edilmektedir

Sağlıklı immün sisteme sahip bireylerin yaklaşık % 5-10'u ve perinatal dönemde enfekte olan yenidoğanların % 90'ının vücudu virüsü temizlemede yetersiz kalır. HBV'nin taşıyıcılığında, akut enfeksiyondan 6-12 ay ve daha uzun bir zaman dilimi geçmesine rağmen HBsAg'nin serumda tespit edilmesi söz konusudur. Küresel çapta yaklaşık 350-400 milyon insan bu durumdadır. Kronikleşen vakalarda viral replikasyon devam ederken, karaciğer biyopsi numunelerinde bu replikatif ürünler tespit edilebilir. Serumda ise HBV DNA, HBsAg ve HBeAg tespit edilir. Patoloji, konağın enfekte hepatositlere verdiği hücresel bağışıklık yanıtı ile oluşur. Replikasyonun uzaması siroz ve HCC'ye neden olur. Viral genom replikasyonda bazen hepatosit kromozomal DNA'ya entegre olabilir ve bunlar klonal olarak çoğalabilir. Enfekte hücrelerin hepatositlerden temizlenmesindeki en temel yol, hepatosit yüzeyindeki viral kor antijenlerini hedef seçen sitotoksik T hücre yanıtıdır. Bu yolun etkisiz olması kronikleşmeye neden olur (41).

HBV replikasyonu tamamen kendine özgüdür. Hepatositlere tutunmayla başlar, serbest virion salınımına değin farklı aşamalardan geçer. Genom replikasyonu, pgRNA'dan revers transkripsiyonla rcDNA senteziyle olur.

Karaciğerde oluşan hasarın düzeyinin tespiti ve diğer karaciğer hastalıklarının ekarte edilmesi amacıyla tanıda altın standart karaciğer biyopsisi olmakla beraber, işlemin invaziv olması dolayısıyla komplikasyon riski mevcuttur. Bu sebeple, rutin uygulamada hastaların bu işleme çok da gönüllü olmadığı tespit edilmiş ve bunun yerine noninvaziv parametrelere ihtiyaç duyulmaktadır. Bununla beraber günümüzde KHB takipli hastalarda, prognozun belirlenmesinde ultrasonografi (USG), koagülasyon testleri, karaciğer enzimleri ve fibrozisin düzeyini göstern bazı serum parametreleri de kullanılmaktadır (94,95).

HBV enfeksiyonu, dünyada ölüm sebepleri arasında 15. sırada yer almaktadır. Dünya genelinde uygulanan rutin aşılama çalışmaları sayesinde yeni vaka insidansında düşüş sağlanmasına rağmen, halen ciddi morbidite ve mortalite etkeni olarak yerini korumaktadır. Hastalığın morbidite ve mortalitesi; hastanın viral replikasyonu sürekliliğine, karaciğer kanseri ve siroz gelişimi ile yakından ilişkilidir. Her yıl bir milyona yakın kişi, HBV ile bağlantılı son evre karaciğer hastalıkları ve HCC nedeniyle yaşamını yitirmektedir (11).

HBV tedavisinde; esas amaç HBV enfeksiyonunu tamamen ortadan kaldırma olmasına rağmen, virüsün hepatosit nükleusunda yerleşmesi vecccDNAoluşturması sebebiyle mevcut tedavide kullanılan ilaçlarla günümüzde bu hedefe varmak mümkün

değildir. Bu yüzden tedaviden beklenen başarılı sonuç, HBsAg serokonversiyonunun sağlanması ve hastalığın ortadan kaldırılmasıdır. Fakat bu sonuca ulaşmak ne yazıkki söylendiği kadar kolay olmamaktadır (12).

HBV enfeksiyonunun biyobelirteçleri hastalığın önlenmesi, tanı ve tedavi yönetiminde önemlidir. HBV enfeksiyonunun rutinde uygulanabilir biyobelirteçleri arasında serum HBsAg, HBeAg, farklı HBV antijenlerine karşı oluşan çeşitli antikorlar ve HBV DNA seviyeleri yer alır. Son zamanlarda EASL klinikleri kurallarında yeni bir biyobelirteç olarak serumdaki HBV RNA önerilmiştir. Kronik HBV enfeksiyonlu hastalarda serum HBV RNA'sının saptanabileceği rapor edilmiştir. Klinikte serum HBV RNA seviyeleri, nükleozid analogu veya PegIFN ile tedavi edilen hastalardaki HBeAg kaybı ile güçlü bir korelasyona sahip olduğu gösterilmiştir. Ayrıca serum HBV RNA seviyesi, antiviral dirençli mutasyonların oluşumu ve KHB hastalarında antiviral tedavi kesilmesinden sonraki reaktivasyonların belirlenmesi için değerli bir erken belirleyicidir. (11,14-17).

Hastanın enfektivite düzeyini değerlendirmek için HBV DNA miktarının belirlenmesi önemlidir ve HBeAg'nin varlığı da belirlenmelidir. Aslında, aktif viral replikasyonun en iyi göstergesi serumda HBV DNA'nın varlığıdır. Serumdaki viral genomun yanı sıra spesifik genotipleri, oral nükleozid ve nükleotid analoglarına dirençli mutantları ve kor ve prekor mutasyonları saptamak için hibridizasyon veya daha hassas PCR teknikleri kullanılır. Pozitif bir sonuç, yalnızca aktif hepatit olasılığını değil, aynı zamanda virüs aktif olarak çoğaldığı için hastalığın çok daha bulaşıcı olduğunu da gösterir (96).

KHB'nin ana nedeni persistan HBV enfeksiyonudur. Sürekli virüs replikasyonu, KHB'nin esas özelliği olan karaciğer iltihabı ve sonuçta fibrozis ile sonuçlanacaktır. HBV RNA'nın ters transkripsiyona şablon oluşturma'nın dışındaki etkisi halen tam olarak anlaşılamamıştır. Patogenezde viral replikasyon kaynaklı sürekli enflamasyon ve karaciğer hücrelerinin kendini onarması sonucu hücre dışı matris proteinlerinin birikmesi ve nihayetinde fibrozis gelişimi rol oynar (84).

KHB hastalarının büyük kısmında, NA'ların uygulanmasıyla HBV DNA miktarı potansiyel olarak azaldığından bu kaynaklı komplikasyonlar da azalır. Fakat, NA'lar HBV ters transkripsiyonunu inhibe eder, yani cccDNA etkilenmez. pgRNA oluşumu ve HBV proteinlerinin üretimi uzun vadede devam edecektir. HBV replikasyonun esas başlangıcı cccDNA'dır. Bunun tespiti ise karaciğer biyopsisi ile olur. İntrahepatik

cccDNA aktivitesini yansıtan serum biyobelirteçleri, replikasyonu erken saptamada kesin bilgi verecektir (84).

Giderek artan sayıda çalışma, serum HBV RNA düzeyinin antiviral tedavi etkinliğini değerlendirmede faydalı bir biyobelirteç olabileceğini göstermiştir. Huang ve ark. NA tedavisi alan KHB hastalarında, tedavinin 12. haftasındaki düşük serum HBV RNA seviyesinin ilk VR'yi öngörebileceğini göstermiştir (97).

Hepatit B hastalarında antiviral tedavinin etkinliği çeşitli yöntemlerle takip edilmektedir. HBV DNA Real Time PCR günümüzde en yaygın olarak kullanılan test olup, virüs replikasyona başladıktan pozitifleşmektedir. HBeAg'nin ELİSA ile tespiti tedavi başarısızlığı ve ve bulaştırıcılığın fazla olduğunu gösteren bir belirteçtir. Ancak mutant suşların varlığı testin duyarlılığını düşürmektedir. Bir diğer gösterge olan HBV RNA, erken dönemde sentez edildiğinden tedavi etkinliği ve reaktivasyonların daha erken fark edilmesine imkan sağlamaktadır. Dolayısıyla küresel çaptaki hasta sayısı ve tedavide kullanılan ilaç maliyeti göz önünde bulundurulduğunda, Hepatit B hastalarında HBV RNA'yı ölçerek, tanı ve tedavideki gidişatı erken tespit etmeyi ve bunun sonucunda dünya ekonomisine katkı sunmayı hedefledik.

HBV'nin yaşam döngüsünde, HBV mRNA'nın oluşumu için cccDNA'nın transkripsiyonu, HBV replikasyonunun başlangıç aşamasıdır ve bu, enfeksiyonun sürekliliğinde önemli bir rol oynar. Bu nedenle cccDNA, HBV enfeksiyonunun ve viral in vivo replikasyonun doğrudan bir göstergesidir. cccDNA'nın saptanması invaziv bir prosedür olan biyopsiye bağlı olduğundan, intrahepatik cccDNA'nın aktivitesini yansıtan bazı serum biyobelirteçlerinin bulunması çok değerlidir (83). cccDNA, viral replikasyon sırasında 5 farklı RNA'yakopyalanır. Bu transkriptlerden biri olan pgRNA, yalnızca viral DNA'nın transkripsiyonunun tersine çevrilmesi için şablon görevi görmekle kalmaz, aynı zamanda HBV'nin kor proteini ve polimerazı için de kodlayıcı bir mRNA'dır (84). Son zamanlarda, HBV RNA'nın serumda da saptanabileceğini düşündüren çalışmaların sayısı artmaktadır. Dolaşımdaki HBV RNA, HBV pgRNA'dır ve HBV enfeksiyonu, tedavisi ve prognozu için yeni bir serum biyobelirteci olarak kullanılabileceği gösterilmiştir (86-88).

HBV RNA, hem viral DNA revers transkripsiyon hem de viral protein sentezi için şablon görevi görmekle birlikte, HBV ile ilişkili hastalıkların patogenezinde de çok önemli bir rol oynar. Son zamanlarda yapılan birçok çalışma, HBV RNA'nın kendisinin, doğrudan ve dolaylı yollarla HBV ile ilişkili hastalıkların ilerlemesine katkıda bulunduğunu ortaya koymaktadır (98-101). NA'lar, HBV'nin revers

transkripsiyonunu inhibe ederek antiviral etki gösterir. Bu olayda cccDNA etkilenmediğinden ve cccDNA'nın transkripsiyonel aktivitesi devam ettiği için, HBV RNA'larının oluşumu da devam eder. Bu nedenle, bazı kronik HBV enfeksiyonu olan hastalarda, HBV DNA, anti-HBV ilaçlar ile aşırı düşük seviyede tutulsa bile, yine de HBV ile ilgili ciddi komplikasyonlar meydana gelebilir (84). HBV RNA, viral replikasyonda, siroz gelişiminde ve hepatokarsinogeneizde önemli bir rol oynayabilir.

Ayrıca, serum HBV RNA'sı, anti-viral ilaçların etkinliğini değerlendirme ve NA tedavisinin güvenli bir şekilde kesilmesini öngörme potansiyeline sahiptir. HBV RNA'nın, NA tedavisi alan ve viral olarak baskılanmış hastalarda cccDNA aktivitesi için iyi bir belirteç olabileceği gösterilmiştir. Klinik olarak, HBV pgRNA virionu, kronik HBV enfeksiyonu olan HBeAg pozitif hastalarda IFN alfa ve NA ile tedavi altında HBeAg kaybı açısından ve NA tedavisinin güvenli bir şekilde kesilmesinin izlenmesi için potansiyel bir biyobelirteç olabilir (81). İntrahepatik HBV pgRNA, HCC'nin prognozunu değerlendirmek için kullanılabilir. Bu nedenle, HBV RNA, kronik HBV enfeksiyonu olan hastalarda HBV DNA için yeni bir yardımcı veya tamamlayıcı biyobelirteç olabilir (84).

Çalışmamızda Wang J ve arkadaşları tarafından dizayn edilen primer ve prob setleri kullanılmıştır. İn house PCR ile iki aşamalı olarak gerçekleştirdiğimiz çalışmanın birinci aşamasında cDNA elde ettik. cDNA kalıp olarak kullandığımız ikinci aşamada HBV RNA'nın varlığı kalitatif olarak araştırılmıştır. Daha önce ticari kit kullanılarak HBsAg ve HBV DNA pozitif olan hastaların 22'sini (% 25) pozitif, 10 tanesini (% 12) negatif olarak tespit ettik. HBsAg pozitif HBV DNA negatif olan grupta 4 (% 5) hastamız pozitif 28 (% 33) hastamız negatif olarak bulunmuştur. Pozitif bulunan hastalarımız için tekrar kontrol çalışması yapılmış ve yine pozitif sonuç elde edilmiştir. HBsAg ve HBV DNA negatif olan grupta 2 (% 2) hastamız pozitif, 20 (% 23) hasta negatif olarak tespit edilmiştir. Sonuçlarımızı değerlendirirken Qiagen Rotor gene programı kullanılmış treeshold değeri ortalama 0.02 olarak belirlenmiş ve sonuçlar bu değere göre hesaplanmıştır. Amplifikasyon sırasında beşinci siklustan önce ve 35.siklustan sonraki sonuçlar değerlendirme dışında bırakılmış ve tekrar çalışılacak gruba alınmıştır.

Çalışmamızda HBsAg ve HBV DNA pozitif olan grupta ve HBsAg pozitif- HBV DNA negatif olan gruptaki hastalarda istatistiksel açıdan anlamlı sonuçlar bulunamamıştır. Ancak HBsAg ve HBV DNA negatif olan grupta anlamlı sonuçlar ($p >$

0.05) bulunmuştur. Literatürle benzer oranda bulduğumuz bu sonucumuz tanı ve tedavi takibinde HBV RNA'nın bir biyobelirteç olabileceğini göstermektedir.

Wang ve arkadaşları serum HBV RNA seviyesinin intrahepatik HBV RNA düzeyi ile korele olduğunu, serum HBV RNA miktarının histolojik değişikliklerinin şiddetini yansıttığını, özellikle NA tedavisi ile replikasyonu baskılanmış KHB hastalarında karaciğer hastalığının ilerlemesi ile ilişkili olduğunu göstermiştir. Bu, serum HBV RNA düzeyinin intrahepatik inflamasyon dercesiyle ilişkili olduğu anlamına gelir. Bilhassa serum HBV DNA'sı NA tedavisi ile baskılanan KHB hastalarında hepatokarsinogenezisi yansıtmak için yeni bir biyobelirteç olarak kullanılabilir (86).

Florian van Bömmel ve arkadaşları tarafından, hali hazırda kullanılan önerilere göre tedaviye aday, kronik HBV enfeksiyonu olan 488 (366 HBeAg (+) ve 122 HBeAg (-)) tedavi edilmemiş (son 6 ay içinde antiviral tedavi almamış) bireyden alınan numunelerde serum HBV RNA seviyeleri ölçülmüştür. HBV RNA seviyesi ile konakçı ve diğer biyobelirteçlerin seviyeleri dahil viral faktörler arasındaki ilişkinin değerlendirildiği çalışmada; HBV RNA, HBV DNA ve serum ALT miktarı ile kuvvetli ve qHBsAg ile orta derecede korelasyon gösterdiği; HBV RNA düzeyi, HBeAg durumu, ALT seviyeleri, bazal kor promotör(BCP) varyantları ve HBV genotipi ile bağımsız olarak ilişkilendiği bulunmuştur. Bu sebeple HBV RNA serum düzeylerinin doğru yorumlanması için bu faktörlerin dikkate alınması gerekmektedir. HBeAg (-) hastalara kıyasla HBeAg (+) hastalarda muhtemelen cccDNA'nın daha yüksek transkripsiyonel aktivitesinin bir ifadesi olan serum HBV RNA seviyeleri ile ilişkili en güçlü faktör olarak HBeAg belirteçidir. HBV RNA'nın, HBVDNA seviyeleri ile korelasyonu HBeAg pozitif ve negatif bireylerde benzer bulunmuştur. HBV genotipi, hem mutlak HBV RNA seviyeleri hem de HBV RNA'nın diğer serum belirteçleri ile korelasyonları ile ilişkilendirilmiş olup, genotip D, en yüksek HBV RNA seviyesi ile ardından B, A ve C genotipleri bulunmuştur. Kronik HBV enfeksiyonu olan bireylerin yaşı ve cinsiyeti, HBV RNA serum düzeylerini etkilememiştir (102).

Hao Luo ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, Eylül 2006'dan Aralık 2007'ye kadar Pekin Üniversitesi Birinci Hastanesinin (Çin) Enfeksiyon Hastalıkları Bölümünde uzun süreli ETV monoterapisi tanısı alan ve tedavi edilen 61 kişi değerlendirilmiş. Ancak HIV ve HCV ile koenfekte bazı hastalar değerlendirme dışı bırakılmış ve sonuçta daha önce tedavi görmemiş 30 kişi değerlendirilmiştir. Serum HBV RNA, iki zaman noktasında 140 µL serum numunelerinden izole edilmiş ve daha

sonra HBV'ye özgü primer ile cDNA'ya ters transkribe edilmiş. Ürün, qRT-PCR ile ölçülmüş. KHB hastalarında HBV RNA değişikliklerinin özellikleri, diğer serolojik belirteçlerle ilişkileri analiz edilmiş ve ek olarak HBeAg serokonversiyonunu tahmin etmede HBV RNA'nın prediktif değeri hesaplanmıştır. ETV tedavisi sırasında bir VR elde eden hastalarda serum HBV RNA'sının azaldığını (tersi de doğru), yani serum HBV RNA'sının hem VR hem de HBeAg serokonversiyonunu öngördüğünü tespit etmişlerdir. HBsAg ve HBV RNA zayıf bir korelasyona sahip olduğu ($r = 0.265$, $P = 0.041$) ve HBV DNA'nın ise HBV RNA ile korelasyonu ($r = 0.242$, $P = 0.062$) olmadığı bulunmuştur (103).

Florian van Bömmel ve arkadaşları tarafından HBV RNA serum düzeylerinin HBeAg serokonversiyonunu tahmin edip edemeyeceğini araştırmak için 76'sı yalnızca peginterferon alfa-2a ve 55'i lamivudinle kombinasyon halinde tedavi edilen 131 hasta (% 70 erkek, % 96 Asyalı, % 35 HBV genotip B ve % 61 C) ile yapılan 2 büyük randomize kontrollü çalışmada; daha önce peginterferon alfa-2a ile tedavi edilen HBeAg (+) hastalardan alınan serum örnekleri geriye dönük olarak analiz edilmiştir. HBV RNA seviyeleri qRT-PCR ile ölçülmüş. Tedavi öncesi HBV DNA, HBsAg, HBeAg ve HBV RNA seviyeleri, tek başına veya 3-TC ile kombinasyon halinde PegIFN alfa-2a ile tedavi edilen hastalar arasında benzerdi. Bireysel biyobelirteçlerin tedaviden 24 hafta sonra HBeAg serokonversiyonunu tahmin etme yeteneği, alıcı işletim özellikleri analizleri ile değerlendirilmiş ve medyan HBV RNA seviyeleri, HBeAg serokonversiyonu olan hastalarda tüm zamanlarda önemli ölçüde daha düşük bulunmuş, özellikli tedavinin 12. ve 24. haftalarındaki HBV RNA seviyeleri, HBeAg serokonversiyonunu öngörmede güçlü bir performans göstermiştir. Böylece serum HBV RNA düzeyinin, peginterferon alfa-2a ile tedavi edilen hastalarda HBeAg serokonversiyonunun erken bir göstergesi olduğu tespit edilmiştir (15).

HBV RNA hepatositleri enfekte edebiliyorsa, NA'larla uzun süreli tedavi gören hastalarda HBV DNA'nın baskılanması sırasında bile cccDNA havuzunu koruyabilir. Bu, bu hastaların çoğunda gözlenen HBsAg düzeyindeki minimal düşüşü açıklayabilir. Buna göre, Giersch ve ark. tarafından yakın zamanda yapılan bir çalışmada, NA'ların yanı sıra PegIFN alfa-2a ile tedavi sırasında serum HBV RNA ve cccDNA arasında güçlü bir korelasyon gösterilmiştir. Bu nedenle, serum HBV RNA, cccDNA aktivitesi için güvenilir bir serum belirtecini temsil edebilir ve serum HBV RNA seviyelerinin izlenmesi, özellikle cccDNA eradikasyonunu amaçlayan gelecekteki tedaviler için yararlı bir ek belirteç olabilir (82).

Son zamanlarda serum HBV RNA düzeyini tespit etmek için çeşitli RT-qPCR tabanlı nicel yöntemler geliştirilmiştir. Limothai ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, HBV enfeksiyonunun doğal seyrinde HBeAg durumuna göre hastaların klinik örneklerinde RT-ddPCR ölçümü ile RT-qPCR testinin performansı doğrudan karşılaştırılmış ve her iki yöntemin de KHB'li hastaların klinik örneklerinde yüksek derecede doğrusalılık ve mükemmel kantitatif korelasyon sergilediği gösterilmiştir (104).

HBeAg serokonversiyonu, KHB enfeksiyonlarının tedavisine son vermede önemli bir göstergedir. van Bömmel F ve ark. KHB'li 62 hasta (50 hasta HBeAg pozitif) ile yaptıkları çalışmada polimeraz inhibitörü ile tedavi esnasında serum HBV RNA düzeyinin HBeAg serokonversiyonu tahmin etmede yardımcı olup olmayacağını araştırmış ve serum HBV RNA seviyesinin, HBeAg-pozitif hastalarda polimeraz inhibitörü tedavisi sırasında serolojik yanıtın tahmin edilmesi için yeni bir belirteç olarak kullanılabileceğini göstermişlerdir (104).

Bizim çalışmamızda, tanı ve tedavi açısından HBsAg (+) iken HBV DNA pozitif ve negatif olan iki grupta anlamlı sonuçlar tespit edilemedi. Ancak HBsAg ve HBV DNA negatif olan grupta ise kayda değer sonuçlar tespit edilmiştir. Ticari kitle HBsAg ve HBV DNA negatif olan grupta HBV RNA tespit etmemiz erken tanı ve dolayısıyla tedavi bakımından çok önemlidir. Yaş ve cinsiyet parametreleri HBV RNA seviyeleri açısından farklılık tespit edilmedi.

HBV DNA'sı pozitif olan 10 hastanın negatif sonuç vermesi standardize edilmiş ve ticari kit haline getirilen HBV DNA yöntemine kıyasla dezavantaj gibi görülse de HBV DNA'sı negatif 6 hastayı pozitif olarak tespit edebilmiştir.

Sonuçların topluca değerlendirilmesi neticesinde yöntemimizin iki aşamalı olması, zaman, maliyet ve laboratuvar iş yükü açısından dezavantajları dikkate alınarak, yöntemimizin tek basamaklı (one step) dizayn edilmesi için ileri çalışmalara gerektiği görülmektedir.

Literatür taraması yapıldığında ülkemizde daha önce böyle bir çalışmanın olmadığını, bizim çalışmamızın bir ilk olduğunu ve bu anlamda literatüre önemli katkı sağlayacağını düşünmekteyiz.

HBV RNA'yı saptamak ve ölçmek için birçok yöntem kullanılabilir. HBV RNA tespiti için yaygın olarak kabul edilen standartlaştırılmış yöntem mevcut olmadığından, daha doğru ve güvenilir bir HBV RNA tespiti ve niceleme tekniği geliştirmek için daha fazla çalışmaya ihtiyaç olduğu görülmektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Hepatit B çok farklı klinik tablolarda karşımıza çıkabilen, uzun vadede artan mortalite ve morbite ile ilişkili bir sağlık sorunu olmaya devam etmektedir. KHB tedavisinde kullanılmakta olan tedavilerden hiçbiri günümüzde HBV'yi eradike etmeyi başaramamaktadır. Bu yüzden HBV ile mücadeledeki en etkin ve güvenilir yol aşılamaştır. Kullanımda olan aşılar hem güvenilir ve etkin koruma sağlarken, hem de ucuz olduklarından maliyet etkindir.

Hepatit B tanı ve tedavi izleminde kullanılan serolojik göstergeler tek başına yeterli olmayabilir. Günümüzde sağlıklı taşıyıcılardaki bulaştırıcılık, antiviral tedavi kararı ve izlenmesi ve hastalık prognozu için sık kullanılan parametre HBV DNA'dır. Ancak tedavi kaynaklı toplumda artan direnç gelişimi mevcut olup, bu durumların erken tespiti tedavi ve maliyet açısından çok önemlidir.

HBV, DNA virüsü olmasına rağmen, RT enzimi kodlayıp, RNA üzerinden replike olur. Bu özelliği sayesinde serumda HBV RNA tespit edilip erken tanı ve tedavi mümkün olabilir. Bu bağlamda yaptığımız çalışmanın sonuçları şöyledir:

1. Ticari kitle HBV DNA'sı pozitif olan 10 hasta negatif, negatif olan 6 kişi ise pozitif bulunmuştur.
2. İki aşamalı olarak yapmış olduğumuz çalışmamızda (birinci aşama cDNA eldesi, ikinci aşama HBV-RNA'nın tespiti) standart tanı testlerine yakın sonuçlar elde edilmesi, HBV DNA'sı negatif gruptan 6 hastayı pozitif olarak belirlemesi yöntemimizin Hepatit B'nin tanı ve tedavi yönetiminde kullanılmak üzere geliştirilmesi yönünde ümit verici olarak değerlendirilmiştir.
3. Rutin kullanımlar için yöntemimizin tek basamaklı dizaynı için ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

KAYNAKLAR

1. Nikolaos TP, Reddy K. Hepatitis B: background, epidemiology, pathophysiology, <https://emedicine.medscape.com/article/177632-overview#a2> Son Erişim Tarihi 04.10.2021.
2. Quasdorff M, Protzer U. Control of hepatitis B virus at the level of transcription. *Journal of Viral Hepatitis* 2010, 17: 527-36.
3. Chang MH, Chen CJ, Lai MS, Hsu HM, Wu TC, Kong MS, Liang DC, Shau WY, Chen DS. Universal hepatitis B vaccination in Taiwan and the incidence of hepatocellular carcinoma in children. Taiwan childhood hepatoma study group. *N Engl J Med* 1997, 336 (26): 1885-9.
4. Fattovich G, Giustina G, Schalm SW, Hadziyannis S, STapias J, Almasio P, Christensen E, Krogsgaard K, Degos F, Moura MC. Occurrence of hepatocellular carcinoma and decompensation in western European patients with cirrhosis type B. The Eurohep study group on hepatitis B virus and cirrhosis. *Hepatology* 1995, 21 (1): 77-82.
5. Yu MC, Yuan JM, Ross RK, Govindarajan S. Presence of antibodies to the hepatitis B surface antigen is associated with an excess risk for hepatocellular carcinoma among non-Asians in Los Angeles County, California. *Hepatology* 1997, 25 (1): 226-8.
6. Yang HI, Yeh SH, Chen PJ, Iloeje UH, Jen CL, Su J, Wang LY, Lu SN, You SL, Chen DS, Liaw YF, Chen CJ. Associations between hepatitis B genotype and mutants and the risk of hepatocellular carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 2008, 100 (16): 1134-43.
7. Te HS, Jensen DM. Epidemiology of hepatitis B and C viruses: a global overview. *Clin. Liver Dis* 2010, 14 (1): 1-21.
8. World Health Organization Weekly Epidemiological Record (WER): global routine vaccination coverage 2011, <http://www.who.int/wer/2011/wer8646/en/index.html> Son Erişim Tarihi 04.10.2021.

9. Kao JH, Chen PJ, Lai MY, Chen DS. Hepatitis B genotypes correlate with clinical outcomes in patients with chronic hepatitis B. *Gastroenterol* 2000, 118: 554-9.
10. *Türkiye Karaciğer Araştırmaları Derneği*. Türkiye Hepatit B Yol Haritası, 2012: 1-38.
11. *EASL clinical practice guidelines*. European Association For The Study Of The Liver Management of Chronic Hepatitis B Virüs İnfection, 2012: 167-85.
12. Schweitzer A, Horn J, Mikolajczyk RT, Krause G, Ott JJ. Estimations of worldwide prevalence of chronic hepatitis B virus infection: a systematic review of data published between 1965 and 2013. *Lancet* 2015, 386: 1546-55.
13. Lok ASF, McMahon BJ. Chronic Hepatitis B: Update 2009. *AASLD Practice Guidelines Hepatology* 2009, 50: 1-38.
14. Nassal M. HBV cccDNA: viral persistence reservoir and key obstacle for a cure of chronic hepatitis B. *Gut* 2015, 64: 1972-84.
15. van Bommel F, Mysickova A, Krauel A, He H, Wat C, Pavlovic V, Yang L, Deichsel D, Berg T, Bohm S. Serum HBV RNA is an early predictor of HBeAg seroconversion in patients with chronic hepatitis B (CHB) treated with pegylated interferon alfa-2a (40KD). *Hepatology* 2015, 62: 336A.
16. Jansen L, Kootstra NA, Dort KA, Takkenberg RB, Reesink HW, Zaaijer HL. Hepatitis B virus pregenomic RNA is present in virions in plasma and is associated with a response to pegylated interferon alfa-2a and nucleos(t)ide analogues. *J Infect Dis* 2016, 213: 224-32.
17. van Bommel F, Bartens A, Mysickova A, Hofmann J, Kruger DH, Berg T, Edelmann A. Serum hepatitis B virus RNA levels as an early predictor of hepatitis B envelope antigen seroconversion during treatment with polymerase inhibitors. *Hepatology* 2015, 61: 66-76.
18. Tsuge M, Murakami E, Imamura M, Abe H, Miki D, Hiraga N, Takahashi S, Ochi H, Hayes CN, Ginba H, Matsuyama K, Kawakami H, Chayama K. Serum HBV RNA and HBeAg are useful markers for the safe discontinuation of nucleotide analogue treatments in chronic hepatitis B patients. *J Gastroenterol* 2013, 48: 118-20.

19. Mahoney FJ. Update on diagnosis, management and prevention of hepatitis B virus infection. *Clin Microbiol* 1999, 12: 351-66.
20. Mandell GL, Douglas RG, Bennett JE. *Principles and Practice of Infectious Disease*, 3rd ed. New York, Churchill Livingstone, 1990: 31-57.
21. Yalçın S. Akut viral hepatit tarihçesi. *T Tıp Ak Mecm* 1976, 10: 36.
22. Trepo C. A brief history of hepatitis milestones. *Liver Int* 2014, 34: 29-37.
23. Oon GCJ, Viral hepatitis the silent killer. *Annals Academy of Medicine* 2012, 41: 279-80.
24. Kıyan M, Hepatit B Virusu. İçinde: Tekeli E, Balık İ (editörler). *Viral Hepatit*, 1.Baskı. İstanbul, Karakter color AŞ Yayıncılık, 2003: 86-120.
25. Lok AS, Heathcote EJ, Hoofnagle JH. Management of hepatitis B: 2000 summary of a workshop. *Gastroenterology* 2001, 120: 1828-53.
26. Nebbia G, Peepa D, Maini MK. Hepatitis B infection: current concepts and future challenges. *QJM* 2012, 105 (2): 109-13.
27. *World Health Organization*. Global Hepatitis Report 2017, <http://www.who.int/hepatitis/publications/global-hepatitis-report2017/en/> Son Erişim Tarihi 09.10.2021.
28. Hou J, Liu Z, Gu F. Epidemiology and prevention of Hepatitis B virus infection. *Int J Med* 2005, 2 (1): 50-7.
29. Franco E, Bagnato B, Marino MG, Meleleo C, Serino L, Zaratti L. Hepatitis B: epidemiology and prevention in developing countries. *World J Hepatol* 2012, 27 (3): 74-80.
30. Tozun N, Özdoğan O, Çakaloglu Y, İdilman R, Karasu Z, Akarca U, Kaymakoglu S, Ergönül O. Seroprevalence of hepatitis B and C virus infections and risk factors in Turkey: a fieldwork Turhep study. *Clin Microbiol Infect* 2015, 21: 1020-6.
31. Toy M, Önder FO, Wörmann T, Bozdayi AM, Schalm SW, Borsboom GJ, Rosmalen J, Richardur HJ, Yurdaydın C. Age and region specific hepatitis B prevalence in Turkey estimated using generalized linear mixed models: a systematic review. *BMC Infect Dis* 2011, 11: 337.

32. Tosun S. Viral hepatitlerin  lkemizdeki değişen epidemiyolojisi. *Ankem Dergisi* 2013, 27 (2): 128-34.
33. Mıstık R. T rkiye’de viral hepatit epidemiyolojisi yayınların irdelenmesi. İ inde: Tabak F, Balık İ, Tekeli E (edit rler). *Viral Hepatit*. Ankara. 2007: 10-50.
34. Karaaslan H, Yurdaydin C. Viral hepatitis at the black sea region: the problem of viral hepatitis in Turkey revisited. *Turk J Gastroenterol* 2009, 20: 1-2.
35. Zhang Q, Cao G. Genotypes, mutations and viral load of hepatitis B virus and the risk of hepatocellular carcinoma. *Hepat* 2011, 2: 86-91.
36. Liaw YF, Chu CM. Hepatitis B virus infection. *Lancet* 2009, 373 (9663): 582-92.
37. Kowdley KV, Wang CC, Welch S, Roberts H, Brosgart CL. Prevalence of chronic hepatitis B among foreign-born persons living in the Unites States by country of origin. *Hepatology* 2012, 56 (2): 422-33.
38. Kim BK, Han KH, Ahn SH. Prevention of hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis B virus infection. *Oncology* 2011, 81 (1): 41-9.
39. Ekinci O, Baran B,  rmeci AC, Soyer OM, G kt rk S, Evirgen S, Poyanli A, G ll oğlu M, Aky z F, Karaca  , Demir K, Besisik F, Kaymak ğlu S. Current state and clinical outcome in Turkish patients with hepatocellular carcinoma. *World J Hepatol* 2018, 10: 51-61.
40. Han YF, Zhao J, Ma LY, Yin JH, Chang WJ, Zhang WH, Cao GW. Factors predicting occurence and pronosis of hepatitis B-virus-releated hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2011, 17 (38): 4258-70.
41. T nger A,  avuş ğlu C, Korkmaz M. *Mikrobiyoloji*, 4. Baskı. İzmir, Asya Tıp Kitabevi, 2005: 406-13.
42. Guidotti LG, Rochford R, Chung J, Shapiro M, Purcell R, Chisari FV. Viral clearance without destruction of infected cells during acute HBV infection. *Science* 1999, 284: 825-9.
43. Jung M, Pape G. Immunology of hepatitis B infection. *Lancet* 2002, 2: 43-50
44. Block TM, Guo H, Guo JT. Molecular virology of hepatitis B virus for clinicians. *Clin Liver Dis* 2007, 11: 685-706.

45. Badur S. Hepatit B virusu (HBV) moleküler viroloji ve serolojik tanı. İçinde: Kılıçturgay K (editör). *Viral Hepatit 94*. İstanbul, Viral Hepatitler Savaşma Derneği, 1994: 120-5.
46. Mast EE, Margolis HS, Fiore AE, Brink EW, Goldstain ES, Wang SA, Moyer LA, Bell BP, Alter MJ. A comprehensive immunization strategy to eliminate transmission of hepatitis B virus infection in the United States: recommendations of the advisory committee on immunization practices. Part I: immunization of infants, children, and adolescents. *MMWR* 2005, 54 (RR-16): 1-23.
47. Altındış M, Yoldaş O. Viral hepatitlerin tanısında serolojik ve moleküler testler. İçinde: Tabak F, Tosun S (editörler). *Viral Hepatit*, 1. Baskı. İstanbul, İstanbul Tıp Kitabevi, 2013: 161-80.
48. Özacar T. Hepatit B virüsü. Topcu AW. Söyletir G. Doğanay M. (editörler). *Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*, 3. Baskı 2. Cilt. İstanbul, Nobel Tıp Kitapevleri, 2008; 1882-904.
49. Niesters HM. Clinical virology in real time. *J Clin Virol* 2002, 25: 3-12.
50. Pas SD, Niesters HM. Detection of HBV DNA using real time analysis. *J Clin Virol* 2002, 25: 93-4.
51. Pawlotsky JM. Hepatitis B virus (HBV) DNA assays (methods and practical use) and viral kinetics. *J Hepatol* 2003, 39, (1): 31-5.
52. Tutar E. Gıda Kaynaklı Patojenlerin Kontaminasyon Miktarlarını Eş Zamanlı PCR Teknolojisi Tanı Kitlerinin Oluşturulması ve Uygulanması. Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyomühendislik ve Bilimleri Anabilim Dalı. Doktora tezi, Kahramanmaraş: Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, 2016.
53. Hanna SE, Connor CJ, Wang HH. Real time polymerase chain reaction for the food microbiologist: technologies, applications and limitations. *Journal of Food Science* 2005, 70 (3): 49-53.
54. Ergören M. Moleküler tanı yöntemi gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) nedir, nasıl uygulanır, https://www.tmconline.org/upload/sunumlar/DESAM_COVID19_PCR_Akademisi_Sunumu_Mahmut_Cerkez_Ergoren.pdf Son Erişim Tarihi 20.03.2022.

55. Palmer DA. Real-time PCR, https://sistem.nevsehir.edu.tr/bizdosyalar/Real-Time_PCR_En_Son_Hali.pdf Son Erişim Tarihi 20 Mart 2022.
56. Chan HLY, Wong VWS, Tse AML, Tse CH, Chim AML, Chan HY, Wong GHL, Sunh JJY. Serum hepatitis B surface antigen quantitation can reflect hepatitis B virus in the liver and predict treatment response. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2007, 5 (12): 1462-8.
57. Tuttleman JS, Pourcel C, Summers J. Formation of the pool of covalently closed circular viral DNA in hepadnavirus infected cells. *Cell* 1986, 47: 451-60.
58. Wursthorn K, Lutgehetmann M, Dandri M, Volz T, Buggisch P, Zollner B, Longerich T, Schirmacher P, Metzler F, Zankel M, Fischer C, Currie G, Brosgart C, Petersen J. Peginterferon alpha-2b plus adefovir induce strong cccDNA decline and HBsAg reduction in patients with chronic hepatitis B. *Hepatology* 2006, 44: 675–84.
59. Hoofnagle JH. Reactivation of hepatitis B. *Hepatology* 2009, 49 (5): 156-65.
60. Rodella A, Galli C, Terlenghi L, Perandin F, Bonfanti C, Manca N. Quantitative analysis of HBsAg, IgM anti-HBc and anti-HBc avidity in acute and chronic hepatitis B. *J Clin Virol* 2006, 37 (3): 206-12.
61. Dao DY, Hynan LS, Yuan HJ, Sander C, Balko J, Attar N, Lok ASF, Word RA, Lee WM. Two distinct subtypes of hepatitis B virus-related acute liver failure are separable by quantitative serum immunoglobulin M antihepatitis B core antibody and hepatitis B virus DNA levels. *Hepatology* 2012, 55 (3): 676- 84.
62. Liaw YF, Kao JH, Piratvisuth T, Chan HLY, Chien RN, Liu CJ, Gane E, Locarnini S, Lim SG, Han KH, Amarapurkar D, Cooksley G, Jafri W, Mohamed R, Hou JL, Chuang WL, Lemana LA, Sollano JD, Suh DJ, Omata M. Asian-Pacific consensus statement on the management of chronic hepatitis B: a 2012 update. *Hepatol* 2012, 6: 531–61.
63. Sorrell MF, Belongia EA, Costa J, Gareen IF, Grem JL, Inadomi JM, Kern ER, McHugh JA, Petersen GM, Rein MF, Strader DB, Trotter HT. National institutes of health consensus development conference statement: management of hepatitis B. *Ann Intern Med* 2009, 150 (2): 104-10.

64. Centers for Disease Control and Prevention 2015 Sexually Transmitted Diseases Treatment Guidelines Viral Hepatitis. <https://www.cdc.gov/std/tg2015/hepatitis.htm> Son Erişim Tarihi 05.10.2021.
65. Medical News Today Pharmasset Voluntarily Halts Clinical Studies with Clevudine in Hepatitis B Infected Patients. <http://www.medicalnewstoday.com/releases/146749.php>. Son Erişim Tarihi 05.10.2021.
66. Mutimer D, Naoumov N, Honkoop P, Marinos G, Ahmed M, Man R, McPhillips P, Johnson M, Williams R, Elias R, Schalm S. Combination alpha interferon and lamivudine therapy for alpha interferon resistant chronic hepatitis B infection: results of a pilot study. *J Hepatol* 1998, 28 (6): 923-9.
67. Terrault NA, Bzowej NH, Chang KM, Hwang JP, Jonas MM, Murad MH. AASLD guidelines for treatment of chronic hepatitis B. *Hepatology* 2016, 63 (1): 261-83.
68. Wong DK, Cheung AM, O'Rourke K, Naylor CD, Detsky AS, Heathcote J. Effect of alpha-interferon treatment in patients with hepatitis B e antigen positive chronic hepatitis B, a meta-analysis. *Ann Intern Med* 1993, 119 (4): 312-23.
69. *Viral Hepatitle Savaşım Derneği*. III. Viral Hepatit Tanı ve Tedavi Rehberi, Nükleosid ve Nükleotid Analogları, 2011: 581-2.
70. Kuo A, Gish R. Chronic hepatitis B infection. *Clin Liver Dis*. 2012, 16 (2): 347-69.
71. New York State Department of Health Prevention of Secondary Disease: Preventive Medicine Viral Hepatitis New York 2010. <http://guideline.gov/content.aspx?id=24043> Son Erişim Tarihi 06.10.2021.
72. Chang TT, Gish RG, de Man R, Gadano A, Sollano J, Chao YC, Lok AS, Han KH, Goodman Z, Zhu J, Cross A, Dehertogh D. A comparison of entecavir and lamivudine for HBeAg positive chronic hepatitis B. *N Engl J Med* 2006, 354 (10): 1001-10.
73. Fung SK, Chae HB, Fontana RJ, Conjeevaram H, Marrero J, Oberhelman K, Hussain M, Lok ASF. Virologic response and resistance to adefovir in patients with chronic hepatitis B. *J Hepatol* 2006, 44 (2): 283-90.

74. Marcellin P, Chang T, Lim SG, Tong MJ, Sievert W, Shiffman ML, Jeffers L, Goodman Z, Wulfshon MS, Xiong S, Fry J. Adefovir dipivoxil for the treatment of hepatitis B e antigen positive chronic hepatitis B. *N Engl J Med* 2003, 348 (9): 808-16.
75. van Bömmel E, Wünsche T, Schürmann D, Berg T. Tenofovir treatment in patients with lamivudine resistant hepatitis B mutants strongly affects viral replication. *Hepatology* 2002, 36 (2): 507-8.
76. Marcellin P, Heathcote EJ, Buti M, Gane E, de Man RA, Krastev Z, Germanidis G, Lee SS, Flisiak R, Kaita K, Manns M, Kotzev I. Tenofovir disoproxil fumarate versus adefovir dipivoxil for chronic hepatitis B. *N Engl J Med* 2008, 359: 2442-55
77. Lin CL, Kao JH. Hepatitis B: immunization and impact on natural history and cancer incidence. *Gastroenterol Clin North* 2020, 49 (2): 201-14.
78. Malarkey MA, Gruber MF. Biologics license application approval (BL125428) hepatitis B vaccine (recombinant) adjuvanted United State Food and Drug Administration, <https://www.fda.gov/downloads/biologicsbloodvaccines/vaccines/approvedproducts/ucm584820.pdf> Son Erişim Tarihi 06.10.2021.
79. Weir J. Biologics license application (BL125428/1) supplement approval hepatitis B vaccine (recombinant) adjuvanted United State Food and Drug Administration, <https://www.fda.gov/downloads/BiologicsBloodVaccines/Vaccines/ApprovedProducts/UCM602537.pdf> Son Erişim Tarihi 06.10.2021.
80. Maurice JB, Brodtkin E, Arnold F, Navaratnam A, Paine H, Khawar S, Dhar A, Patch D, O'Beirne J, Mookerjee R, Pinzani M, Tsochatzis E, Westbrook RH. Validation of the Baveno VI criteria to identify low risk cirrhotic patients not requiring endoscopic surveillance for varices. *J Hepatol* 2016, 65: 899–905.
81. Wang J, Shen T, Huang X, Kumar GR, Chen X, Zeng Z, Zhang R, Chen R, Li T, Zhang T, Yuan Q, Li PC, Huang Q, Colonno R, Jia J, Hou J, McCrae MA, Gao Z, Ren H, Xia N, Zhuang H, Lu F. Serum hepatitis B virus RNA is encapsidated pregenome RNA that may be associated with persistence of viral infection and rebound. *J Hepatol* 2016, 65 (4): 700-10.
82. Giersch K, Allweiss L, Volz T, Dandri M, Lutgehetmann M. Serum HBV pgRNA as a clinical marker for cccDNA activity. *J Hepatol* 2017, 66 (2): 460-2.

83. Wang J, Du M, Huang H, Chen R, Niu J, Jiang J, Zhuang H, Lu F. Reply to: “Serum HBV pgRNA as a clinical marker for cccDNA activity”: consistent loss of serum HBV RNA might predict the “para-functional cure” of chronic hepatitis B. *J Hepatol* 2017, 66 (2): 462-3.
84. Ding WB, Wang MC, Zhang JN, Sun DP, Dong JP, Zhou WP, Yang F. Novel insights of HBV RNA in hepatitis B virus pathogenesis and clinical application. *Hepatoma* 2019, 5: 10.
85. Stahl M, Beck J, Nassal M. Chaperones activate hepadnavirus reverse transcriptase by transiently exposing a C-proximal region in the terminal protein domain that contributes to epsilon RNA binding. *J Virol* 2007, 81: 1354-64.
86. Wang J, Yu Y, Li G, Shen C, Meng Z, Zheng J, Jia Y, Chen S, Zhang X, Zhu M, Zheng J, Song Z, Wu J, Shao L, Qian P, Mao X, Wang X, Huang Y, Zhao C, Zhang J, Qiu C, Zhang W. Relationship between serum HBV RNA levels and intrahepatic viral as well as histologic activity markers in entecavir treated patients. *J Hepatol* 2018, 68: 16-24.
87. Halgand B, Desterke C, Rivière L, Fallot G, Sebah M, Calderaro J, Sage PB, Neuveut J, Buendia MA, Samuel D, Feray C. Hepatitis B virus pregenomic RNA in hepatocellular carcinoma: a nosological and prognostic determinant. *Hepatology* 2018, 67: 86-96.
88. Wang J, Shen T, Huang X, Kumar GR, Chen X, Zeng Z, Zhang R, Chen R, Li T, Zhang T, Yuan Q, Li PC, Huang Q, Colonna R, Jia J, Hou J, McCrae MA, Gao Z, Ren H, Xia N. Serum hepatitis B virus RNA is encapsidated pregenome RNA that may be associated with persistence of viral infection and rebound. *J Hepatol* 2016, 65 (4): 700-10
89. Kock J, Theilmann L, Galle P, Schlicht HJ. Hepatitis B virus nucleic acids associated with human peripheral blood mononuclear cells do not originate from replicating virus. *Hepatology* 1996, 23: 405-13.
90. Su Q, Wang SF, Chang TE, Breitkreutz R, Hennig H, Takegoshi K, Edler L, Schröder CH. Circulating hepatitis B virus nucleic acids in chronic infection: representation of differently polyadenylated viral transcripts during progression to nonreplicative stages. *Clin Cancer* 2001, 7: 2005-15.

91. Kairat A, Beerheide W, Zhou G, Tang ZY, Edler L, Schröder CH. Truncated hepatitis B virus RNA in human hepatocellular carcinoma: its representation in patients with advancing age. *Intervirology* 1999, 42: 228-37.
92. Taşyaran MA. HBV infeksiyonu epidemiyolojisi. İçinde: Tekeli E, Balık İ (editörler). *Viral Hepatit*, 1. Baskı. İstanbul, Karakter Color A. Ş, 2003: 121-34.
93. Değertekin B, Hepatit B patogenezi, doğal seyri ve kliniği. *Türkiye Klinikleri Gastroenterohepatoloji Özel Dergisi* 2010, 3(1): 45-52.
94. Terrault NA, Bzowej NH, Chang KM, Hwang JP, Jonas MM, Murad MH. AASLD guidelines for treatment of chronic hepatitis B. *J Hepatology* 2016, 63 (1): 261-83.
95. Bedossa P, Dargere D, Paradis V. Sampling variability of liver fibrosis in chronic hepatitis B. *Hepatology* 2003, 38: 1449-57.
96. Thomas AB, Sonali JS. Evidence based clinical reasoning in medicine. In: Palter J (ed). *Acute Viral Hepatitis*, 3rd ed. United States of America, Sheridan Books, 2013: 23-31.
97. Huang YW, Takahashi S, Tsuge M, Chen CL, Wang TC, Abe H, Hu JT, Chen DS, Yang SS, Chayama K, Kao JH. On-treatment low serum HBV RNA level predicts initial virological response in chronic hepatitis B patients receiving nucleoside analogue therapy. *Antivir Ther* 2015, 20: 369-75.
98. Wang S, Qiu L, Yan X, Jin W, Wang Y. Loss of microRNA 122 expression in patients with hepatitis B enhances hepatitis B virus replication through cyclin G (1) modulated P53 activity. *Hepatology* 2012, 55: 730-41.
99. Yang X, Li H, Sun H, Fan H, Hu Y, Liu M, Li X, Tang H. Hepatitis B virüs encoded microRNA controls viral replication. *J Virol* 2017, 91(10): 1919-26.
100. Hilger C, Velhagen I, Zentgraf H, Schroder CH. Diversity of hepatitis B virus X gene-related transcripts in hepatocellular carcinoma: a novel polyadenylation site on viral DNA. *J Virol* 1991, 65: 4284-91.
101. Takata A, Otsuka M, Ohno M, Kishikawa T, Yoshikawa T, Koike K. Mutual antagonism between hepatitis B viral mRNA and host microRNA let 7. *Scientific Reports* 2016, 6: 23237.

102. Van Campenhout MJH, van Bömmel F, Fischer J, Deichsel D, Anneke AB, Berg T, Hansen BE, Janssen HLA. Host and viral factors associated with serum hepatitis B virus RNA levels among patients in need for treatment. *Hepatology* 2018, 68(3): 839-47.
103. Hao Luo, Xia-Xia Zhang, Li-Hua Cao, Ning Tan, Qian Kang, Hong-Li Xi, Min Yu, Xiao-Yuan Xu. Serum hepatitis B virus RNA is a predictor of HBeAg seroconversion and virological response with entecavir treatment in chronic hepatitis B patients. *World J Gastroenterol* 2019, 25 (6): 719-28.
104. Limothai U, Chuaypen N, Poovorawan K, Chotiyaputta W, Tanwandee T, Poovorawan Y, Tangkijvanich P. Reverse transcriptase droplet digital PCR vs reverse transcriptase quantitative real-time PCR for serum HBV RNA quantification. *Journal of Medical Virology* 2020, 10: 1002.

EKLER

EK 1. ÖZGEÇMİŞ



EK 2. ETİK KURUL ONAYI



EK 3. HASTA TANIMA FORMU

I.Kimlik ve Adres Bilgileri:

1.Hastanın Adı-Soyadı:

2.Cinsiyeti: () Erkek () Kadın

3.Doğum Tarihi:

4. Medeni Durumu:

5.Adres:

6.Telefon:

7.Mesleği:

8.Öğrenim Durumu (Öğrenci ise Okul Adı ve sınıfı):

II. Hastalık Tanısı Bilgileri

Hastalığın başlama (ilk belirti) tarihi .../.../....	Sağlık Kurumuna başvurma nedeni : :.....
Tanı konma tarihi: .../.../....	
Tanıyı koyan kurum /hekim	Başvuru sırasındaki yakınmaları:
Hastaneye yatırılmışsa tarihi: .../.../...	
Hastada sarılık oldu mu ?(yanıt evet ise türü) Evet () Hayır ()	
Karaciğer biyopsisi yapıldı mı? Evet () Hayır ()	

III.Risk Faktörleri

1.Hanede yaşayan kişi sayısı:

2.Ailede Kronik Hepatit Öyküsü: () Var () Yok

3.Ailede Siroz Öyküsü: () Var () Yok

4.Eşlik Eden Başka Hastalık: () Var () Yok

5.Toplu yaşanan yerlerde (yuva,okul,kışla vs.) bulundunuz mu/bulunuyor musunuz?Oralarda hastalığa rastladınız mı? Evet () Hayır ()

6. Ameliyat oldunuz mu? Evet () Hayır ()

7. Aşı yaptırdınız mı? Kaç kez ve ne zaman yaptırdınız?

8. Hastalıktan 6 Hafta -6 ay önceki süre içinde;

1.Akut ya da kronik Hepatitli biriyle temas ettiniz mi? Evet () Hayır ()

Yanıt “Evet” ise temas biçimi

a) Hane halkından cinsel eş b) hane halkından cinsel eş dışı c)Diğer

2 .Hasta sağlık çalışanıysa kanla yada kan ürünleriyle teması var mı ?

Evet () Hayır ()

Yanıt “evet” ise sıklığı Sık (haftada birkaçkez) () Seyrek ()

3.Kan yada kan ürünleri tranfüzyonu yada transplantasyon yapıldı mı?

Evet () Hayır ()

Yanıt “evet” ise Nerede ?..... Donörün kimliği : Biliniyor () Bilinmiyor ()

IV. Hastanın Takip ve Tedavisi

1.Hastalığınız için şu anda ilaç kullanıyor musunuz? Evet () Hayır ()

Yanıt evet ise kullandığınız ilaçların isimleri

Hastaneye ne sıklıkta gidiyorsunuz?.....