

Selim Badur

Son yıllarda moleküler biyoloji konusundaki gelişmelere paralel olarak viral hepatite yol açan etkenlerin listesine yeni ilaveler olmakta; tanı ve tedavi olanaklarının geliştirilmesi sonucu, bu hastalığın önemi ve yaygınlığı daha iyi anlaşılmaktadır. Çeşitli mikroorganizmaların viral hepatite yol açtığı bilinmektedir. Ancak 2000'li yıllara gelindiğinde, başlıca hedefleri karaciğer olan ve hepatotrop virüsler olarak tanımlanan bir grup etkenin, gerçek viral hepatit virüsleri olarak ayrıca ele alınmaları uygun olacaktır. Alfabe-nin harfleri ile isimlendirilen bu virüsler, sırasıyla: hepatit A virüsü (HAV), hepatit B virüsü (HBV), hepatit C virüsü (HCV), hepatit D virüsü (HDV), hepatit E virüsü (HEV), hepatit G virüsü (HGV), transfusion trans-mitted virus (TTV) ve nihayet kısaca SEN (SEN-V) olarak gösterilen etkenlerdir. Her ne kadar, karaciğeri ana hedef organ olarak seçmeleri ortak özellikleri ise de; bu virüslerin bulaş yolları, oluşturdukları hastalıkların inkübasyon süreleri, replikasyon şemaları ya da vücutta kalış süreleri gibi bir dizi özellikleri açısından birbirlerinden farklılıklar gösterdikleri bilinmektedir. Bazıları ülkemizde de yaygın olarak bulunan bu etkenleri şu şekilde gruplandırmak olasıdır:

- **HAV ve HEV:** Özellikle oral fekal yoldan bulaşan ve kronikleşmeye yol açmayan etkenler,
- **HBV, HCV ve HDV:** Başlıca parenteral yoldan bulaşan ve kronik hepatite neden olan etkenler,
- **HGV, TTV ve SENV:** Özellikle parenteral yoldan bulaştıkları saptanmış olan, ancak tek başlarına viral hepatite yol açtıkları kesinlik kazanmamış olan etkenler.

Bu yazıda, kronik hepatite yol açtıkları kesin olarak bilinen HBV, HCV ve HDV infeksiyonlarının laboratuvar tanısı ele alınacaktır.

Kuramsal olarak, bir kronik viral hepatit olgusunun etyolojik tanısı, infekte hepatositlerin yıkımını gerçekleştiren sitotoksik T lenfositlerinin, hangi etkene özgül olduklarının belirlenmesi ile yapılmalıdır. Ancak pratik uygulanabilirliği olmayan bu işlem yerine rutin incelemelerde, standardize edilmiş virolojik tanı yöntemlerinden yararlanılır. Bu arada virüsün kendisinin veya çeşitli antijenik göstergelerinin saptanmasının her zaman karaciğerde-

ki yıkımdan sorumlu olanın belirlenmesi demek olmadığını; indirekt göstergeler olarak tanımlanan konağın antiviral immün yanıtının (antikorlar) tanı için daha spesifik bir bulgu olduğunu unutmamanız gerekir. Özellikle spesifik viral antijenlere karşı oluşan ve virüsün eliminasyonunda rol oynadıkları bilinen IgM sınıfı antikorların, uygun tanı araçları olarak değerlendirilmeleri olasıdır.

1. Kronik hepatit B tanısı: Ülkemizdeki yaygınlığı ve kronik karaciğer hastalarında rastlanma sıklığı gözönüne alındığında, doğal olarak ilk ele alınması gereken etken HBV'dir. Nitekim yapılan tarama çalışmaları gözönüne alındığında, bölgesel farklılıklara göre toplumumuzda ortalama %4-8 arasında HBsAg pozitifliğinin varlığı belirlenmiş; kronik hepatitlerin %45'inde; karaciğer sirozlu hastaların ise %35'inde HBV'nin etken olduğu hesaplanmıştır. Yine ülkemizdeki çalışma sonuçlarına bakılarak her yıl HBeAg (+) kronik hepatit olgularının %12'sinde; anti-HBe (+) olguların ise %15-20'sinde siroz geliştiği; kronik hepatit B'lilerin %0.2-0.7'sinde, karaciğer sirozlularının ise %0.2-7.8'inde hepatoselüler karsinoma oluştuğu belirlenmiştir.

HBV'nin yol açtığı kronik viral hepatitlerin tanısında en önemli kriter, serumda HBsAg'nin saptanmasıdır. Klasik olarak bu antijenin yanısıra, olguların büyük bölümünün serumlarında HBV-DNA ve HBeAg'ye rastlamak, ayrıca karaciğer dokusunda HBeAg saptamak olasıdır. Ancak kronik hepatit B olgularında, hastalık tablosunun seyri bir yandan viral replikasyonun, öte yandan oluşacak immün yanıtın düzeyine bağlı olarak, farklılık gösterebilir. Hastaların büyük bölümünde, serumda HBeAg ve HBV-DNA varlığı ile karakterize olan viral replikasyonun devamlılığı, aktif infeksiyonunun süregeldiğinin kanıtıdır. Bu tip olgularda belirli bir aşamada spontan remisyon veya tedavinin etkinliği sonucunda, HBV-DNA'nın kaybolması ve HBeAg/Anti-HBe serokonversiyonunun ortaya çıkması sözkonusu olabilir. Bu durumda inaktif karaciğer hastalığı ya da nonreplikatif faz (eski terminolojiye göre sağlıklı HBsAg taşıyıcıları) aşamasından bahsetmek mümkündür. Bazı olgularda ise, günümüzde moleküler düzeyde tanımlanması kesin olarak yapılmış olan ve HBeAg sentezlemeyen HBV varyantları etken olabilir; ve HBV-DNA varlığına anti-HBe'nin eşlik etmesi sözkonusudur. Bu tip olguların spontan nonreplikatif faza geçme olasılıkları daha düşüktür. Kronik hepatit B olgularının en belirgin özelliği, HBsAg'nin serumda 20 haftayı aşan bir süre boyunca saptanabilir olmasıdır. Bu arada bazı endemik bölgelerde, kronik hepatit ve/veya siroz tanısı almış ancak HBsAg (-) bulunan olguların %30-40'ında HBV-DNA'nın saptanmış olması, HBsAg negatif kronik hepatit B olgularının varlığına işaret etmektedir. Bu tip olgularda a de-

terminant bölgesi içinde veya dışında (örneğin X geninde) meydana gelebilecek mutasyonlar sonucu ortaya çıkan yeni HBV suşlarına ait HBsAg'nin, ticari kitlerle saptanamadığı anlaşılmaktadır. Öte yandan kronik hepatit B olgularının da anti-HBs antikorlarını sentezlediği; bu durumda oluşacak HBsAg/anti-HBs immüno komplekslerinin, HBsAg'nin saptanmasını engelleyeceği de ileri sürülmüştür. Rutinde kullanılan ve antijen fazlalığında, sentezlenen spesifik antikorları saptayamayan ticari kitler yerine, araştırma amacıyla hazırlanmış ve duyarlılığı yüksek reaktiflerden yararlanıldığında, kronik olguların hemen tamamında spesifik antijenlerinin varlığında bile anti-HBe ya da anti-HBs antikorlarının saptanması olasıdır.

Kronik hepatit B olgularında, HBsAg'nin yanısıra anti-HBc antikorlarının pozitif bulunması olağandır. Ancak bazı olgularda; ya selektif immün yanıt defektine bağlı olarak; ya delesyon türü mutasyona uğramış viral proteinlerin sözkonusu olması nedeniyle; ya da kısıtlı sayıda olguda saptandığı şekliyle, aşırı oranda sentezlenen HBcAg ile kompleksleşmesine bağlı olarak anti-HBc'nin saptanamaması sözkonusudur. Anti-HBc konusuna değinirken IgM sınıfı kor antikorlarının (anti-HBc-IgM) ayrı olarak ele alınması uygun olacaktır. Duyarlı teknikler kullanıldığında tüm akut olguların yanısıra bir kısım taşıyıcı da, hatta iyileşmiş kimi olgularda anti-HBs'nin yanısıra pozitif bulunabilen bu göstergelere ait farklı değerlendirmeler bulunmaktadır. Akut-kronik hepatit B olgularının ayırımında, anti-HBc-IgM titresinin ya da farklı çökme sabitesine (7S-19S) ait olanların ayırımının yararlı olabileceği savunulmuş ise de, günümüzde bu tip yaklaşımların çok kabul görmediğini biliyoruz. Öte yandan, bu göstergenin (anti-HBc-IgM) kantitatif tayininin tedaviye alınacak hastaların seçiminde ve tedavinin etkinliğini izlemede önemli olduğunu savunan araştırmacıların yanısıra, HBV-DNA miktarı ile bu gösterge arasında bir paralellik olmadığını saptayarak karşıt görüşü ileri sürenler de bulunmakta olup, henüz kantitatif anti-HBc-IgM tayininin değeri netleşmemiştir.

HBeAg/anti-HBe sisteminin kronik hepatit B olgularındaki anlamı, son yıllarda belirlenmiş olan mutant suşlar kavramı ile büyük değişime uğramıştır. Özellikle HBeAg negatif kronik hepatit olgularında yoğun viral replikasyonun ve karaciğer yıkımının belirlenmiş olması; ayrıca bu tip olgularda fulminan hepatite rastlanması, sözkonusu durumun moleküler düzeyde incelenmesini zorunlu kılmış; HBV infeksiyonlarında sıkça rastlanılan prekor, kor promotör ve diğer gen bölgelerindeki mutasyonlar ile açıklanmaya çalışılan bu durumun, kronik viral hepatit patogenezindeki önemi son yıllarda daha iyi anlaşılmıştır. Bu arada, spontan olarak ya da kemoterapi veya immünsüpresyon uygulanması durumunda kronik infeksiyonun reakti-

ve olabildiği; anti-HBe → HBeAg şeklindeki klasik yönden farklı yönde bir serokonversiyonun, HBV-DNA titresinde artış ile birlikte ortaya çıkabileceği bildirilmiştir.

Kronik hepatit B olgularında aktif replikasyonunun kesin göstergesi sayılan; ayrıca bu tip hastalara uygulanan tedavi şemalarının etkinliğini ölçmede en önemli kriter olarak kabul edilen HBV-DNA araştırmalarında, moleküler biyoloji tekniklerinden yararlanır. Klasik hibridizasyon uygulamalarında 10-500 pg/mL (10^6 genom) miktarında HBV-DNA saptanırken; amplifikasyon aşaması olan PCR veya benzeri çoğaltma uygulamaları sonucunda, saptanabilirlik sınırı 10-50 genom düzeyine inmektedir. Günümüzde HBsAg, HBeAg ya da anti-HBc-IgM gibi göstergelerin referans standartlar kullanarak miktar tayinlerini yapmak mümkünse de, bu tür uygulamalar yaygın olarak kullanılmamaktadır. Bu nedenle HBV-DNA miktar tayini, viremi düzeyini belirlemede tek altın standart yöntem olarak kabul görmektedir. Moleküler hibridizasyon (örneğin: Digene Hybrid-Capture tekniği) ya da PCR (Amplicor) veya b.DNA (Quantiplex HBV-DNA) gibi standardize edilmiş uygulamalar, laboratuvarların donanımlarına göre tercih edilerek kullanılmaktadır. Bu arada, tedavi etkinliğini ölçmede daha basit ve ucuz olan hibridizasyon yöntemleri ile yetinilmeli mi, yoksa duyarlılığı çok arttıran kantitatif amplifikasyon yöntemlerinden yararlanılmalı mı? sorusunun yanıtı henüz kesinlik kazanmamıştır. PCR ile alınan HBV-DNA sonuçlarını değerlendirirken, gözardı edilmemesi gereken iki noktayı vurgulamak gerekir. Bunlardan biri her pozitif PCR sonucunun, replike olan genom varlığının işareti olarak ele alınmaması gerçeğidir. Yapılan çalışmalarda, replikasyonun sözkonusu olmadığı hayvan modellerinde saptanan pozitifliğin, parçalanmış ve işlevini yitirmiş DNA fragmentlerinden kaynaklanabileceği gösterilmiş ve gerçek replikasyon göstergesinin ara ürün olan mRNA'nın ya da kısmen çift zincirli olan HBV-DNA'sını replike olurken geçirdiği ilk aşama olan tamamen çift zincirli yapının (ccc.DNA) belirlenmesi olduğu ileri sürülmüştür. Bu konuda ikinci unutulmaması gereken nokta ise, HBsAg'nin kaybolmasından sonra da, kronik olguların serum ve karaciğer dokularında HBV-DNA'nın uzun süre varlığını koruyabileceğidir. İstanbul Tıp Fakültesi'ndeki deneyimlerimiz doğrultusunda, özellikle tedavinin etkinliğini izlemede, kantitatif hibridizasyon yönteminin hem standardizasyon hem de maliyet açısından amplifikasyon yöntemlerine oranla daha uygun olduğunu düşünmekteyiz.

2. Kronik hepatit C tanısı: HBV enfeksiyonlarında kullanılanlara oranla C hepatinin tanısında yararlanan testlerin sayısı daha azdır. Yaygın olarak taramalarda kullanılan test anti-HCV araştırması olup, bu göstergenin sap-

tanması HCV ile temasın kanıtıdır. Ancak, serokonversiyon süresinin uzun ve değişken olması, immünsüpre hastalarda antikor yanıtının gerçekleşmemesi ve özellikle olguların büyük bölümünde spesifik antikor varlığında da replikasyonun devam etmesi, HCV-RNA araştırmasını gerekli kılmaktadır. Serolojik testler arasında bir dönem üzerinde durulan anti-HCV-IgM testinin ek bir bilgi sağlamadığı, buna karşın HCV-kapsid antijenini ELISA ile araştırmanın yararlı olabileceği ve bu testin önümüzdeki günlerde kullanıma gireceği bilinmektedir. Bu arada, doğrulama testi olarak tanımlanan ve kısaca RIBA olarak bilinen immüno blot yönteminin artık önemini yitirdiği, HCV'nin farklı antijenlerine karşı oluşacak spesifik antikorları ayrı ayrı gösteren bu testin, yeterli duyarlılığa sahip olmaması nedeniyle değerini kaybettiği görülmektedir.

HCV ile ilgili moleküler biyoloji teknikleri yaygın olarak kullanılmaktadır. PCR esasına dayanan (COBAS Amplicor) amplifikasyon testleri ile HCV-RNA varlığını saptamak, böylece vireminin belirlenmesinin yanısıra, konjenital HCV enfeksiyonu tanısına gitmek, transaminazları normal seyreden olgularda viral replikasyonu göstermek, immünsüpre olguların yanısıra hemodiyaliz ve transplantasyon hastalarında etyolojisi bilinmeyen kronik hepatit olgularının tanısını koymak olasıdır. Söz konusu testin duyarlılığı 100 kopye/mL düzeyine inmiş olup, tedaviye alınacak olguların belirlenmesinde de yarar büyüktür. Bu arada özellikle tedavinin etkinliğini izlemede kantitatif HCV-RNA yöntemine başvurmak gereklidir ve bu amaçla b.DNA (Quantiplex HCV-RNA 2.0, Bayer Diagnostics) ya da kantitatif PCR Amplicor HCV Monitor (Roche Diagnostic Systems) testlerinden yararlanılır.

HCV enfeksiyonlarında moleküler biyoloji testlerinin bir diğer uygulama alanı suşların genotiplendirilmesidir. Böylece tedaviye dirençli/duyarlı olguları belirlemek ve tedavi süresini saptamak olasıdır. Örneğin İstanbul Tıp Fakültesi'nde incelenen 300 olgunun %69'unda, interferona yanıt oranı düşük olan 1b serotipinin varlığı bu teknik ile saptanmıştır.

3. Kronik hepatit D tanısı: Sadece HBV'nin varlığında replike olabilen HDV'nin, koinfeksiyonların %3-10'unda, süperenfeksiyonların ise %90'ında kronik hepatite yol açtığı bildirilmiştir. Kronik delta hepatitlerin tanısı, HBsAg'ye eşlik eden anti-HDV antikorlarının varlığı ile gerçekleşir. Ayrıca moleküler biyoloji teknikleri ile (Northern-Blot hibridizasyonu; PCR) serumda HDV-RNA'nın veya immünofloresans ya da immünperoksidaz boyamaları ile hepatositlerde HDV-antijeninin gösterilmesi tanıyı doğrular. HDV konusunda geliştirilen ELISA kitleri ile anti-HDV-IgM ve HDV-Ag göstergelerinin araştırılması kuramsal olarak önemli, ancak pratikte yararı çok faz-

la gözlenmeyen yöntemler olarak değerlendirilmektedir. Bazı araştırmacı grupları anti-HDV titresinin kriter olarak kullanımı ile akut/geçirilmiş HDV enfeksiyonları ayırımının yapılabileceğini, bazıları ise anti-HDV-IgM'nin kronik enfeksiyon göstergesi olduğunu ileri sürmüşlerse de, bu tip uygulamaların standardize edilmediğini biliyoruz. Belirtilen tüm bu testler arasında HDV-DNA'sının serumda 10-100 genomu saptayabilecek duyarlılıktaki RT-PCR uyarınca araştırılması, tüm diğer tekniklerden daha kesin bir tanı yöntemi olarak ele alınabilir. Uygun primerler seçilerek yalancı negatifliğin önlenildiği PCR tekniği ile serumda HDV-RNA'nın saptanması aktif hepatit D enfeksiyonunun en kesin kanıtıdır. Öte yandan bu yöntem ile kronik delta hepatitinin izlenmesi ve antiviral tedaviye yanıtın belirlenmesi olasıdır.

KAYNAKLAR

1. Hu K-Q Vierling JM. Molecular diagnostic techniques for viral hepatitis. In: Martin P, Friedman LS (eds). Viral Hepatitis. Gastroenterol Clin North Am 1994;23: 479.
2. Desmet VJ, Gerber M, Hoofnagle JH, Manns M, Scheur PJ. Classification of chronic hepatitis: Diagnosis, grading and staging. Hepatology 1994;19:1513.
3. Bonino F, Colloredo Mels G, Bellati G, et al. Problems in diagnosing viral hepatitis. Gut (Suppl) 1993:36.
4. Kato J, Hasegawa K, Torii N, Yamauchi K, Hayashi N. A molecular analysis of viral persistence insurface antigen negative chronic hepatitis B. Hepatology 1996;23:389.
5. Fukuda R, Ishimura N, Kushiyama Y, et al. Hepatitis B virus X gene mutation is associated with the majority of serologically "silent"non-B, non-C chronic hepatitis. Microbiol Immunol 1996;40:481.
6. Maruyama T, McLachlan A, Iino S, Koike K, Kurokawa K, Milich DR. The serology of chronic hepatitis B infection revisited. J Clin Invest 1993;91:2586.
7. Miyakawa Y, Okamoto H, Mayumi M. The molecular basis of hepatitis B e antigen (HBeAg) negative infections. J Viral Hepatitis 1997;4:1.
8. Akarca US, Lok ASF. Naturally occurring hepatitis B virus core gene mutations. Hepatology 1995;22:50.
9. Pawlotsky JM, Bastie A, Lonjon I, et al. What technique should be used for routine detection and quantification of HBV-DNA in clinical samples? J Virol Meth 1997;65:245.
10. Lazizi Y, Pillot J. Delayed clearance of HBV-DNA detected by PCR in the absence of viral replication. J Med Virol 1993;39:208.
11. Lorient MA, Marcellin P, Walker F, et al. Persistence of hepatitis B virus DNA in serum and liver from patients with chronic hepatitis B after loss of HBsAg. J Hepatol 1997;27:251.

12. Carithers RL, Marquard A, Gretch DR. Diagnostic testing for Hepatitis C. *Sem Liver Dis* 2000;20:159.
13. Hadziyannis SJ. Hepatitis delta: An overview. In: Rizzetto M, Purcell RH, Gerin JL, Verme G (eds). *Viral Hepatitis and Liver Disease*. Turin: Minerva Medica, 1997:283.
14. Polish LB, Gallegher M, Fields HA, Madler SC. Delta hepatitis: Molecular biology and clinical and epidemiological features. *Clin Microbiol Rev* 1993;6:211.
15. Dinolfo L, Abate ML, Bertolo P, et al: Detection of Hepatitis D virus RNA in serum by a reverse transcription, polymerase chain reaction based assay. *Int J Clin Lab Res* 1995;25:35.