



# Hybrid Capture Yöntemi ile HBV-DNA'sı 5 pg/mL'nin Altında, HBsAg'si Pozitif Hastalardaki Total HDV Antikorlarının Aranması<sup>#</sup>

Tuncer ÖZEKİNCİ<sup>1</sup>, Nezahat AKPOLAT<sup>1</sup>, Selahattin ATMACA<sup>1</sup>, Saffet ELÇİ<sup>2</sup>, Mahmut METE<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı,  
<sup>2</sup> Dicle Üniversitesi Eğitim Fakültesi, DİYARBAKIR

## ÖZET

Çalışmada, Hybrid Capture yöntemi ile HBV-DNA'sı 5 pg/mL'nin altında hastalardan yüzey antijeni (HBsAg) pozitif olanların 21'inin serumunda total delta antikorunu pozitif olarak tespit edildi. Bu 21 delta antikorunu pozitif serumdan, birinde HBV-DNA düzeyi 3 pg/mL, ikisinde 1 pg/mL, diğerlerinde ise HBV-DNA tespit edilemedi. HBV-DNA'sı 5 pg/mL'nin altında, HBsAg pozitifliği gözardı edilen serumların HDV bulaştırıcılığı yönünden incelenmesinin önemli olduğu sonucuna varıldı.

**Anahtar Kelimeler:** HDV, HBV-DNA, Hybrid Capture.

## SUMMARY

### Testing for Total HDV Antibodies in HBsAg Positive Patients with HBV-DNA Less Than 5 pg/mL by Hybrid Capture

The sera of 21 patients with HBV-DNA less than 5 pg/mL by Hybrid Capture that were positive for the surface antigen (HBsAg) tested positive for total HDV antibodies. These 21 delta antibodies that obtained from positive serum, in the one of them HBV-DNA level 3 pg/mL, the other two 1 pg/mL and HBV-DNA was not observed from the rest of the serum. It has been observed that if the HBV-DNA amount is under 5 pg/mL in the HBsAg positivity neglected serum, it is important to investigate this serum for the HDV infectious direction.

**Key Words:** HDV, HBV-DNA, Hybrid Capture.

<sup>#</sup> Bu çalışma, XXX. Türk Mikrobiyoloji Kongresi (30 Eylül- 5 Ekim 2002)'nde sunulmuştur.

## GİRİŞ

Kan transfüzyonu, organ transplantasyonu vb. durumlarda donörlerden bakılan önemli laboratuvar testlerinden biri hepatit markerleridir (1).

Özellikle son dönemlerde laboratuvar tekniklerindeki moleküler incelemeler, bazı klinisyenlerin rutin olarak yapılan ucuz ve kolay testler yerine direkt olarak nükleik asit düzeyinde sonuç veren testleri tercih etmelerine ve bazı sonuçların göz-



den kaçmasına neden olmaktadır. HBsAg sonucu gözüldü edilerek Hybrid Capture yöntemi ile HBV-DNA'sı 5 pg/mL'nin altında, hepatit B yönünden negatif olarak değerlendirilen bir hastanın serumu delta virüs yönünden potansiyel bir tehlikedir. Bu amaçla çalışmada, Hybrid Capture yöntemi ile HBV-DNA'sı 5 pg/mL'nin altındaki hastalardan önce yüzey antijeni (HBsAg) pozitif olanlar tespit edildikten sonra bu serumlarda total delta virüs antikorları araştırıldı.

#### MATERYAL ve METOD

Değişik kliniklerden laboratuvarımıza gönderilen kan örneklerinin serumları ayrılarak -20°C'de saklandı. Rutin haftalık çalışma programına göre bu serumlarda Hybrid Capture yöntemi (Digene Corporation, Gaithersburg, Md20878 USA) ile HBV-DNA düzeyi "pg/mL" cinsinden tespit edildi (2). Daha sonra tüm serumlar mikro-ELISA (Organon Technika, The Netherlands) yöntemi ile yüzey antijeni (HBsAg) yönünden incelendi. Hybrid Capture yöntemi ile HBV-DNA düzeyleri tespit edilen serumlar, HBV-DNA'sı 5 pg/mL'nin altında ve 5 pg/mL'ye eşit veya üstünde olmak üzere iki gruba ayrıldı. Daha sonra HBsAg'si pozitif ve HBV-DNA'sı 5 pg/mL'nin altındaki serumlardan mikroELISA yöntemi ile total HDV antikorları arandı. HBV-DNA'sı 5 pg/mL'nin altında, HBsAg'si pozitif hastalardan total HDV antikor varlığını doğrulamak amacıyla test tekrar edildi. Ayrıca, total HDV antikorları pozitif bulunan hastaların anti-HCV düzeyleri (Cobas Core II Immunochemistry system, Roche) araştırıldı. Çalışma süresince serumların alanin aminotransferaz (ALT) düzeyleri (Aeroset, Abbott) aynı gün araştırıldı.

#### BULGULAR

Çalışmada, 275 hasta serumu HBV-DNA yönünden incelendi. Bu serumların 189 (%68.7)'unda HBV-DNA düzeyi 5 pg/mL'nin altında, 86 (%31.3)'sında ise 5 pg/mL'ye eşit veya üstünde olarak belirlendi. Çalışmada, 219 (%79.6) serumda HBsAg pozitif, 56 (%20.4) serumda HBsAg negatif bulundu. HBsAg pozitif, HBV-DNA'sı 5 pg/mL'nin altında 136 sonuç elde edilirken, 83 serumda HBsAg'si pozitif, HBV-DNA'sı 5 pg/mL'ye eşit veya üstünde sonuçlar elde edildi. Çalışmanın özel kısmını oluşturan HBV-DNA'sı 5 pg/mL'nin altında, HBsAg'si pozitif 136 hastanın 21 (%15.4; 14'ü erkek, 7'si kadın)'inde total delta antikor pozitif bulundu. Bu 21 serumun birinde HBV-DNA düzeyi 3 pg/mL, ikisinde 1 pg/mL, diğerlerinde ise 1 pg/mL'den az veya belirlenemeyecek miktarda ol-

çüldü. Yüzonbeş hasta serumunda ise total delta antikorları negatif olarak bulundu.

HBV-DNA'sı 5 pg/mL'ye eşit veya üstündeki 86 hastanın HBV-DNA düzeyine göre dağılımına bakıldığında, 21 hastada 5-99 pg/mL, 14 hastada 100-1999 pg/mL arasında, 51 hastada ise 2000 pg/mL'ye eşit veya daha yüksek düzeyde olduğu belirlendi. HBV-DNA'sı 5 pg/mL'nin altında, HBsAg'si pozitif, total delta antikor pozitif 21 hastanın ALT düzeylerine bakıldığında, yedisinin 35 U/mL veya altında, sekizinin 35-99 U/mL arasında, altısının 100 U/mL veya daha yüksek olduğu tespit edildi. Total delta antikor pozitif 21 hastanın anti-HCV'si negatif olarak bulundu.

#### TARTIŞMA

Hepatit yüzey antijeni (HBsAg) taşıyıcılığının tehlikeli yönlerinden biri delta virüs enfeksiyonu riskinin yüksek olmasıdır (3). HDV; hepatit B virüsü (HBV)'nün varlığına bağımlı defektif bir RNA virüsüdür. HDV'nin genomik yapısı, HBsAg ile paketlenmiştir. Bulaşmasında parenteral yol önemlidir (4). HBV şüpheli hastalarda laboratuvar testleri olarak başta HBsAg ve diğer HBV parametreleri ilk düşünülen tetkiklerdir. Özellikle kan transfüzyonunda HBsAg bakılması zorunlu bir testtir (1). Moleküler laboratuvar tetkiklerin gelişmesi HBV açısından da çok yeni tekniklerin ve yeni parametrelerin ortaya çıkmasına neden olmuştur. Bunlardan en önemlisi serumda HBV-DNA miktarının Hybrid Capture yöntemi ile "pg/mL" cinsinden ölçülmesidir. Genel olarak bizim ülkemizde de kabul gören ve kendi laboratuvarımız tarafından da verilen sonuçlarda 5 pg/mL'ye eşit ve üstündeki değerler pozitif olarak değerlendirilirken, 5 pg/mL'nin altındaki değerler negatif olarak tanımlanır (2). Fakat bu negatiflik kişinin serumunda HBsAg'nin hiç olmadığı anlamına gelmese de yanlış yorumlara neden olabilir. Kişinin HBV-DNA'sının 5 pg/mL'nin altında olması ile başta HBsAg ve diğer HBV parametrelerine bakılmaksızın negatif olarak değerlendirilmesi ciddi bir hatadır. Özellikle bir kan transfüzyonunda veya organ transplantasyonunda alıcı için en ciddi tehlikelerden biri HBV-DNA'sı 5 pg/mL'nin altında olmasına rağmen, HBsAg'sinin pozitif olması ile birlikte bu yüzey antijeninin içindeki genomun HDV'ye ait olmasıdır. Yani vericinin HDV antijen taşıyıcısı olmasıdır. Çalışmamızda Hybrid Capture yöntemi ile HBV-DNA'sı 5 pg/mL'nin altında, HBsAg'si pozitif 136 hastanın 21 (%15.4; 14'ü erkek, 7'si kadın)'inde total delta antikorunu pozitif



tespit ettik. Bu oranın oldukça yüksek olmasını kanların çoğunun hepatoloji kliniğinden gelmesine bağlamakla birlikte, bu durum HDV bulaştırıcılığı açısından önemlidir. Çalışmamızın işaret ettiği önemli noktalardan biri, kan transfüzyonu ve organ transplantasyonu vb. durumlarda HBV-DNA miktarı 5 pg/mL'nin altında olsa bile HDV yönünden incelenmesinin gözardı edilmemesidir. Anti-HDV total HBV-HDV koinfeksiyonunun belirlenmesinde HDV'ye bağlı önemli bir markerdir.

HBsAg'si pozitif, HDV antijen virüsü ile koinfeksiyonlu bazı hastaların serumlarında Hybrid Capture yöntemi ile HBV-DNA'ları tespit edilemeyecek düzeyde düşük olarak belirlenmiştir (6). Farklı bir çalışmada HDV antijeni pozitif 19 hastanın 10'unun serumunda HBV-DNA pozitif olarak bildirilmiş, dokuz hasta serumunda ise HBV-DNA miktarı tespit edilememiştir (7).

Scott ve arkadaşları ise HBV-DNA sonuçları ile HBeAg pozitifliği arasında korelasyon eksikliği tespit etmiştir (8).

Sakugawa ve arkadaşları, HBsAg'si ve anti-HDV'si pozitif 34 hasta (hepsinin HBeAg'si negatif) serumunda HBV-DNA miktarlarını "real time" polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemi ile incelemiş, dokuz hasta serumunda HBV-DNA saptamamışlardır (9). Bu araştırma çalışmamıza paralel bir anlayışla serumda sadece HBV-DNA'nın (ister "real time" PCR isterse Hybrid Capture yöntemi ile) belirlenmesinin HBV yönünden herhangi bir kan transfüzyonu sırasında riski azaltmadığını göstermektedir. Aynı çalışmada, serumdaki HBV-DNA miktarı ile ALT düzeyi arasında bir korelasyon tespit edilmemiştir. Bizim çalışmamızda ise HBV-DNA'sı 5 pg/mL'nin altında, HBsAg'si pozitif, total delta antikoru pozitif 21 hastanın ALT düzeylerine bakıldığında, yedisinin 35 U/mL veya altında, sekizinin 35-99 U/mL arasında, altısının 100 U/mL veya daha yüksek olduğu görülmektedir.

#### KAYNAKLAR

1. Beltrami EM, Williams IT, Shapira CN, Chamberland ME. Risk and management of blood-borne infections in health care workers. *Clin Microbiol* 2000; 13: 385-407.
2. Hubert GM, Kraiden M, Cork L, et al. A multicenter study evaluation of the Digene Hybrid Capture II signal amplification technique for detection of hepatitis B virus DNA in serum samples and testing of EUROHEP standards. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 2150-5.
3. Pastore G, Monno L, Santantino T, et al. Hepatitis B virus clearance from and liver after acute hepatitis delta virus superinfection in chronic HBsAg carriers. *J Med Virol* 1990; 31: 284-90.
4. Sureau C, Guerra B, Lanford RE. Role of the large hepatitis B virus envelope protein in infectivity of the hepatitis delta virion. *J Virol* 1993; 67: 366-72.
5. Salassa B, Daziano E, Bonino F, et al. Serological diagnosis of hepatitis B and delta virus (HBV/HDV) coinfection. *J Hepatol* 1991; 12: 10-3.
6. Wolters LM, Van Nunen AB, Honkoop P, et al. Lamivudine high dose interferon combination therapy for chronic hepatitis B patients co-infected with the hepatitis D virus. *J Viral Hepatol* 2000; 7: 428-34.
7. Ramalho F, Carvalho G, Bonino F, et al. Clinical and epidemiological significance of hepatitis delta virus (HDV) infection in chronic HBV carriers in Portugal. *Prog Clin Biol Res* 1987; 234: 409-17.
8. Scott JS, Pan PE, Pace RA, Sloots TP, Cooksley WG. The absence of hepatitis B virus DNA in hepatitis B e antigen positive sera from chronic hepatitis B surface antigen carriers in China. *J Med Virol* 1990; 30: 103-6.
9. Sakugawa H, Nakoasone H, Nakoyoshi T, et al. Hepatitis B virus concentration in serum determined by sensitive quantitative assays in patients with established chronic hepatitis delta virus infection. *J Med Virol* 2001; 65: 478-84.

#### YAZIŞMA ADRESİ

Dr. Tuncer ÖZEKİNCİ

Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi

Mikrobiyoloji ve

Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

21280, DİYARBAKIR

e-mail: tunozek@dicle.edu.tr