

# HEPATOPANKREATOBİLİER

## Serumda HBV-DNA Tayiniyle Hepatit Delta Virüsünün Hepatit B Virusu Replikasyonuna Süpressiv Etkisinin Gösterilmesi

Yard.Doç.Dr. İsmail BALIK\*, Prof.Dr. Emin TEKELİ\*, Engin YILMAZ\*\*

•Ankara Üniv. Tıp Fak. İbn-i Sina Hast. Klinik Bakt. ve İnf. Hastalıkları ABD, ANKARA

••Abbott Laboratu'arı

### ÖZET

*Hepatit B Virusu (HBV) replikasyonunu değerlendirmede en duyarlı method, moleküler hibridizasyon tekniğiyle serumda HBV-DNA tayinidir. Çalışmamızda, bu method kullanılarak HBV replikasyonuna HDV'nin etkisi araştırıldı. Bu amaçla HDV infeksiyonu bulunan ve bulunmayan 30 hastanın serumlarında HBV-DNA pozitifite oranı ve konsantrasyonları karşılaştırıldı.*

*Serum HBV-DNA'sı kronik hepatit B (IIB)'li hastaların 5/10'unda, kronik HB/HD'li hastaların ise sadece 1/11 inde tesbit edildi (P<0.05).*

*Akut IIB ve akut HB/HD koinfeksiyonlu hastaların serumlarında HBV-DNA pozitifite oranı benzer (4/4 ve 5\*5) olmasına rağmen, HBV-DNA koinfeksiyonlu hastaların serumlarındaki HBV-DNA konsantrasyonları, HDV infeksiyonu bulunmayan akut HB'li hastalardakinden daha düşük bulundu ("130" "105-150" ve 280 "250-330pg/ml).*

*Bu veriler HDV'nin HBV replikasyonunu süprese ettiğini göstermektedir.*

**Anahtar Kelimeler:** Delta hepatit HBV replikasyonu  
Serum HBV-DNA

Hepatit Delta Virusu (HDV), sadece akut veya kronik Hepatit B Virusu (HBV) infeksiyonu bulunan kişilerde patojenite kazanan ve yalnız HBV ile oluşan hepatitlere göre daha kötü prognoz gösteren bir hepatit virüsüdür (1,2,3). HDV'nun diğer virüslerden farklı, yapısal olarak eksik, çok küçük bir RNA virüsü

Geliş Tarihi: 24.3.1990

Kaimi Tarihi 30.4.1990

**Yazışma Adresi:** Yard.Doç.Dr. İsmail BALIK  
Ankara Üniv. Tıp Fak. İbn-i Sina Hast  
Klinik Bakt. ve İnt. Hastalıkları ABD

### SUMMARY

*THE DEMONSTRATION OF SUPPRESSIVE EFFECT OF HEPATITIS DELTA VIRUS ON THE HEPATITIS B VIRUS REPLICATION BY DETECTION OF HBV-DNA IN SERUM*

*Measurement of serum Hepatitis B Virus (HBV)-DNA by molecular hybridization is the most sensitive method to assess HBV replication. By using this method, we investigated the effect of Hepatitis Delta Virus (HDV) on the HBV replication. For this reason, the concentration and rate of the HBV-DNA positivity in sera of 30 patients with and without HDV infection have been compared*

*Serum HBV-DNA was detected in 5/10 of patients with chronic hepatitis B (FIB) and only in 1/11 of patients with chronic HB/HD (p < 0.05).*

*Although the positivity rates of HBV-DNA among patients with acute IIB and acute HB/HD coinfection were found lower than in acute HB without HDV infection (130 "105-150" pg/ml).*

*These data show that HDV suppresses the HBV replication.*

**Keywords:** Delta hepatitis Serum HBV-DNA  
HBV replication

olduğu ve bu nedenle çoğalabilmesi ve dolayısıyla patojen hale geçebilmesi için HBsAg'den yararlanması gerektiği gösterilmiştir (2,3,4,5).

HDV'nin bu şekilde HBV'na göre daha ciddi hepatit formları\* oluşturduğunun anlaşılmasından sonra Delta hepatitlerinin patogenezi

\* HDV ve ona bağlı oluşan çeşitli hepatit formları hakkında genel bilgi için, TKİ Tıp Bil Araş Dergisi C.6, S.1, 1988, 9-17. bakınız

ile ilgili araştırmalar oldukça yoğunlaşmıştır. Buna rağmen konunun birçok yönü hala tam olarak aydınlatılamamıştır.

Bu çalışmada, en çok tartışılan konulardan biri olan HDV'nun, HBV replikasyonuna etkisi araştırıldı. HBV replikasyonunun değerlendirilmesinde en spesifik ve en sensitif marker olarak kabul edilen, son yıllardaki genetik mühendisliği ve moleküler biyolojideki gelişmelerin bir ürünü olan "HBV-DNA moleküler hibridizasyon testi" kullanıldı. Elde ettiğimiz sonuçlar literatürle karşılaştırılarak tartışıldı.

## MATERYEL VE METOD

Hastalar: Çalışma, HBV ve HDV enfeksiyonlu değişik hasta gruplarından oluşan 30 vakada yapılmıştır.

Vakalar arasında HBV replikasyonu yönünden karşılaştırma yapabilmek için, tanısını önceden bildiğimiz, klinik laboratuvar ve serolojik (Anti-HBeAg ve HBeAg varlığına göre) yönden benzer özelliklere sahip hastalar seçilerek aşağıdaki gibi gruplara ayrıldı ve -20°C de saklanmış olan serumlarında HBV-DNA araştırıldı.

1. Akut HB (hepatit B): Klinik ve serolojik (HBsAg, HBeAg, anti-HBeAg pozitif, anti-Delta negatif) bulgulara göre akut HB tanısı almış olan 5 hasta.

2. Akut HBV/HDV koinfeksiyonu: Klinik ve serolojik olarak (HbsAg, HBeAg, anti-HBeAg pozitif) akut HB'e uyan ve aynı anda serumlarında anti-Delta pozitif bulunduğu akut HBV/HDV koinfeksiyonu tanısı olana 4 hasta.

3. Kronik HB: Daha önce biyopsi ve/veya klinik, laboratuvar bulgularına göre kronik aktif hepatit (KAH) veya siroz tanısı almış, serolojik olarak anti-HBeAg<sup>+</sup> ve anti-Delta(-) bulunan hastalar arasından seçilen (5'i HBeAg(+)/anti-HBe(-), 5'i de HBeAg(-)/anti-HBe(+) veya (-) olan) toplam 10 kronik HB'li hasta.

4. Kronik HB/HD (Kronik hepatit B/Delta): 3. gruptaki hastalarla benzer özelliklere sahip olan, önceden KAH veya siroz tesbit edilmiş olan serolojik olarak anti-HBeAg (-) ve anti-Delta(+) bulunan hastalar arasından seçilen (5'i HBeAg(+)/anti-HBe(-), 6'sı da HBeAg(-)/anti-HBe(+) veya (-) olan) toplam 11 vaka.

HBV-DNA tayini: Serumda HBV-DNA tayini için kullandığımız, "Kantitatif radyoizotopik sıvı faz moleküler hibridizasyon tekniği" adı verilen bu test, son yıllardaki moleküler biyolojideki ilerlemelerden istifade edilerek, Abbott Laboratuvarları tarafından geliştirilmiştir.

İlk defa 1987 Uluslararası Hepatit Sempozyumunda Mc Kuhns ve ark. tarafından tanıtılmıştır. HBV-DNA tayininde kullanılan önceki yöntemlere göre kullanım kolaylığı ve yarılanma ömrünün uzun olması gibi avantajları nedeniyle büyük ilgi görmüştür (6).

Yöntemin esasının, DNA-probe teknolojisi ve moleküler hibridizasyondan oluşması nedeniyle testin spesifitesi ve sensitifitesi çok yüksektir.

Testin yapılışı: HBV-DNA aranacak her serum örneğinin 100ml (mikrolitre)'i dilüe (specimen dilüent ile) edildikten sonra, serumu solübilize eden ve içindeki nükleik asitleri denatüre eden reagenlerle oda ısısında inkübasyona bırakılır. Bunun üzerine, serumdaki HBV-DNA ile birleşecek olan I<sup>125</sup> ile işaretli HBV-DNA probu içeren reagen ilave edilir ve hibridizasyonun oluşumu için 18-20 saat 65°C'de inkübasyona bırakılır, inkübasyondan sonra I<sup>125</sup>-HBV-DNA ile serumdaki HBV-DNA'ın oluşan hibridleşmiş kompleksi içeren karışım, hibridizasyon reaksiyonuna girmemiş 0125-HBV-DNA'dan ve ortamdaki diğer komponentlerden arındırılmak üzere Jel-Metriks ihtiva eden özel bir kolona dökülerek süzülmeğe bırakılır. Böylece kolonun altındaki sayım tüpünde sadece I<sup>125</sup> işaretli HBV-DNA kompleksi toplanmaktadır. Son olarak sayım tüplerinin bir gamma sayacında okunmasıyla, I<sup>125</sup> işaretli kompleksin verdiği radyoaktivite ölçülmekte, dolayısıyla serumdaki HBV-DNA tesbit edilebilmektedir. Kontrol serumlarının (3 negatif, 2 pozitif) verdiği değerlerden hesaplanan "cut off" değerinin üzerinde çıkan sonuçlar pozitif olarak kabul edilmektedir. Pozitif bulunan değerlerin kantitatif tayini ise, belli konsantrasyonda (103 ± 10 pg/ml) HBV-DNA içeren pozitif kontrol serumlarının verdiği değerlerden basit bir formülle yapılabilmektedir.

Diğer Serolojik Testler: Serumda anti-delta ve HBV markerlerinin (HBsAg, anti-HBs, anti-HBeAg ve IgG, HBeAg, anti-HBe) tayininde ELISA yöntemi ve Abbott ticari kiti kullanıldı. Her testin, esas aynı olmakla beraber, yapılışı, değerlendirilmesi ve kullanılan immünolojik reaksiyon prensibi (Sandwich, Competition gibi) az çok birbirinden farklıdır. Bu ELISA yönteminde, bir katı faz (boncuk) ve işaretleyici olarak bir enzim (peroksidaz) kullanılarak serumda aramak istediğimiz antijen (veya antikor) oldukça sensitif ve spesifik olarak tayin edilebilmektedir. Teste göre değişen inkübasyon süreleri sonunda oluşan, katı faza bağlanmış enzim işaretli Ag-Ab kompleksi enzim substratı ile reaksiyona sokularak renk oluşumu sağlanmaktadır. Oluşan rengin otomatik spektrofotometrede okunmasıyla elde edilen optik dansite, aradığımız Ag (veya Ab) konsantrasyonu orantılıdır.

Tablo 1. Akut HB ve HBV/HDV Koinfeksiyonlu Vakalarda Elde Edilen Serolojik Bulgular, HBV-DNA Oranları ve Konsantrasyonlarının Karşılaştırılması

	Anti-Delta	Anti-HBcIgM	HBeAg/Anti-HBe	HBV-DNA	HBV-DNA konsantrasyonu (pg/ml)
Akut HB n = 5	-	+	+/-	-	280(250-330)
HBV/HDV koineksi. n = 4	+	+	+/-	+	130(105-150)

Tablo 2. Kronik HB ve Kronik HB/HDV'li Vakalarda Elde Edilen Serolojik Bulgular, HBV-DNA Oranları ve Konsantrasyonlarının Karşılaştırılması

	HBeAg	Anti-Delta	Anti-HBcIgM	HBV-DNA	HBV-DNA konsant. (pg/ml)	Toplam
Kronik HB n = 10	+(n=5)	-	-	+(4/5)	127(107-160)	5/10*
Kronik HB/HDV n = 11	+(n=5)	±	±	+(1/5)	102	1/11*
	-(n=)	+	-	-(0/6)	-	-

## SONUÇLAR

Hem akut HB, hem de akut HBV/HDV koinfeksiyonlu vakaların tümünde HBV-DNA tesbit edilmesine rağmen, koinfeksiyonlu vakalarda HBV-DNA konsantrasyonları daha düşük bulundu (Tablo 1).

Kronik HB/HDV vakaların 5/10'unda, kronik HB/HDV'li vakaların ise 1/11'de HBV-DNA tesbit edildi (P<0.05). Bu iki grup arasındaki farklılık HBeAg varlığı halinde daha belirgindi. Kronik HB/HDV'li, HBeAg(+) bir vakada bulunan HBV-DNA konsantrasyonu (10,2 pg/ml), kronik HB'li vakalardakilere göre (ort. 127 pg/ml) oldukça düşük bulundu (Tablo 2).

Vakalarımızda elde edilen serolojik bulgular ve HBV-DNA konsantrasyonları Tablo 1 ve 2'de özetlenmiştir. Tüm vakalarımızda anti-HBs(-) ve anti-HBcIgG(+)'di.

## TARTIŞMA

HDV'nin HBV replikasyonunu baskıladığı önceleri, HBV antijenlerine (HBeAg, HBsAg, intrahepatik HBeAg) bakılarak değerlendirilmiştir. Kronik HDV'li vakaların serumlarında düşük titrelerde HBsAg tesbiti, HBeAg'nin düşük ve anti-HBe'nin yüksek prevalansı ile intrahepatik HBeAg'nin kaybolması (veya düşük oranda tesbiti) gibi bulgularla, HDV varlığında HBV replikasyonunun inhibe olduğu düşünülmüştür (2-5,7-12).

Son zamanlarda serumda HBV-DNA tayini için geliştirilen testlerle yapılan karşılaştırmalı çalışmalarda,

HBV replikasyonunu ve infektiviteyi gösteren markerler içinde (HBsAg, HBeAg, HBcAg, DNA-polimeraz) en spesifik ve sensitif olanının HBV-DNA olduğu anlaşılmıştır (6,13-15). Bu nedenle, HBV replikasyonunu HBV-DNA varlığına göre değerlendirmenin daha doğru olacağı düşünüldüğü için, çalışmamızda HBV-DNA testini kullandık. Böylece HDV'nin HBV replikasyonuna etkisini daha kesin bir şekilde ortaya koymayı amaçladık.

Çalışmamızda, HBV/HDV koinfeksiyonlu vakalarda, HBV-DNA konsantrasyonları akut HB'li vakalara göre oldukça düşük bulunmuştur (Tablo 1). Tüm vakalarda serumların yaklaşık olarak infeksiyonun aynı zamanlarında alınmış olanlarıyla, HBeAg(+) olanlarının kullanılmış olmasının, iki grup arasındaki karşılaştırmayı sağlıklı kılaacağını düşünürsek, bu bulguyu vaka sayısı az olmasına rağmen anlamlı kabul edebiliriz.

Saracco ve ark. akut fulminant HBV/HDV koinfeksiyonlu hastaların serumlarında, akut fulminant HBV'li'lere göre daha düşük oranda HBV-DNA tesbit etmişlerdir (16). Daha eski çalışmalarda da koinfeksiyonlu hastalarda HBsAg'nin serumdan kısa sürede kaybolması veya düşük titrelerde tesbit edilmesi gibi bulgulara bakılarak, akut HBV/HDV koinfeksiyonunda, HBV replikasyonunun süprese olduğu sonucuna varılmıştır (2,7,8,9,17). Bulgularımız da bu sonucu destekler mahiyettedir. HDV'nin esas önemli etkisi, kronik

**Tablo 3.** S.Govindarajan ile SD.Lee et al'ın Yaptıkları İki Çalışmada Kronik HB ve Kronik HB/HD'li Vakalarda Tesbit Edilen HBV/DNA Oranları

Literatür no	Vakalar	HBV-DNA oranları		Toplam
		HBe Ag (+)	HBe Ag (-)	
SD Lee et al (19)	Kronik HB/HD	1/3(%33) <sup>a</sup>	0/7(%0) <sup>a</sup>	1/10(%10) <sup>1</sup>
	Kronik HB	35/41(%85) <sup>b</sup>	6/25(%24) <sup>a</sup>	41/66(%62.1) <sup>1</sup>
S.Govindarajan (18)	Kronik HB/HD	2/6(%33)	0/7(%0)	2/13(%15) <sup>2</sup>
	Kronik MB	5/7(%70)	2/7(%28)	7/14(%50) <sup>2</sup>

a1: P&lt; 0.003

a2: P&lt;0.1

b: Fark istatistiksel olarak anlamsız.

c: P&lt;0.003

HBV taşıyıcılarında, süperenfeksiyon yaparak fulminant hepatit veya kısa sürede KAH, siroz ve ölüme neden olmasından gelmektedir (3-5,10).

Çalışmamızda, kronik HB/HD'li vakalarda tesbit edilen HBV-DNA oranı, kronik HB'lilere göre oldukça düşük bulundu (P<0.05). Bu farklılığın HBeAg varlığında daha belirgin olduğu görüldü (Tablo 2). HBeAg (+) olan kronik HB'li hastaların ise 1/5'inde ve düşük konsantrasyonda HBV-DNA tesbit edildi. Buna karşılık HBeAg (–) olan kronik HB/HD'li (0/5) ve kronik HB'li (1/5) vakalarda bulunan HBV-DNA oranları arasında önemli bir fark görülmedi (Tablo 2).

Elde ettiğimiz bulgular, bizimkine benzer iki ayrı çalışmanın sonuçlarıyla da (Tablo 3) uyumlu bulunmuştur (18,19).

Tüm bunlara bakarak, HDV'nin kronik HB'li vakalarda daha belirgin olmak üzere, HBV replikasyonunu baskıladığını söyleyebiliriz. Bu etki doğal olarak, replikatif fazdaki (genellikle HBeAg pozitif) vakalarda daha aşikar görünmektedir. Bu vakalarda kısa sürede HBeAg negatifleşmekte, HBsAg fitreleri düşmekte fakat HDV'nin direkt sitopatik etkisiyle oluşan hızlı bir karaciğer harabiyeti sonucu KAH ve siroz gelişmektedir. Nonreplikatif fazda (genellikle HBeAg negatif) olan HBsAg taşıyıcılığı durumu da, üremesi için sadece HBsAg varlığına ihtiyacı olan HDV'nin karaciğere olan sitopatik etkisini sürdürmesini sağlamaktadır. HBV replikasyonunun olmadığı "integrasyon fazı" da denen bu tip kronik HB vakalarında, HBV-DNA'sının hepatositlere intègre olduğu ve bu şekilde HBsAg'nin karaciğer hücrelerinde sentez edildiği belirlenmiştir (14,15).

Hem, HDV replikasyonu için sadece HBsAg varlığının yeterli olması, hem de HDV'nin, HBV replikasyonunu baskılaması nedeniyle kronik HB/HD'li vakaların serumlarında HBeAg ve HBV-DNA'a nadiren

(%10), anti-HBe'ye ise sıklıkla (%80) rastlanmaktadır (3,4,20,21).

Kronik HDV enfeksiyonunda oluşan karaciğer hasarının HDV'nin sitopatik etkisi ile olduğu, hem histopatolojik olarak (12,11), hem de bu hastalara uygulanan immünoşüpressif (10) ve immunomodülatör (22) tedavilere cevap alınamamışye gösterilmiştir. Halbuki HBV'nin oluşturduğu karaciğer hasarı, sitopatik etkiden çok, virusa karşı konağın geliştirdiği immun yanıt ile olmaktadır (10,23). İşte bu iki virüsün farklı şekilde etki göstermesi nedeniyle oluşan sinerjizme bağlı olarak HDV süperenfeksiyonlarında yalnız kronik HB'e göre, mortalité ve morbidité ileri derecede artmaktadır.

Sonuç olarak, çalışmamızdan elde ettiğimiz bulgular ve literatür ışığında HDV'nin HBV replikasyonunu baskılayıcı etkisinin olduğunu kesin olarak söyleyebiliriz. HDV'nin direkt sitopatik etkisi yanında, bu etkisi de kronik delta hepatitin patogeneziinde rol oynayan faktörlerden biri olabilir. Bu yazımızın içeriğinden de anlaşılacağı gibi delta hepatitleriyle ilgili araştırmaların devamına ihtiyaç vardır.

## KAYNAKLAR

1. Tekeli E ve İ.Balık: Delta Hepatiti. *T Kİ Tıp Bil Araş Dergisi* 6:9-17,1988.
2. Rizzetto M, et al: Transmission of the hepatitis B virus-associated delta antigen to chimpanzees. *J Infect Dis* 141:590-602,1980.
3. Jacobson IM, JL Dienstag: The Delta Hepatitis Agent: "Viral Hepatitis, Type D." *Gastroenterology* 86:1614-7, 1984.
4. Rizzetto M, A Smedile and P Farci: The Clinical Significance of the Delta Antigen-Antibody System in Hepatitis B Infections. *Scand J Infect Dis, Suppl* 36:74-5, 1982.

5. Fagen EA, Williams R: Serological responses to HBV infection. *Gut* 27:858-67,1986.
6. Kuhns MC, A Me Namara, CM Cabal and C Brechot: A new assay for the quantitative detection of hepatitis B viral DNA in human serum (abstract). International symposium on Viral Hepatitis and Liver Disease, pp:64,1987.
7. Moestrup T, BG Hasson, A Widell et al: Clinical aspects of delta infection. *Br Med J* 286: 87-90,1983
8. Fromme D, JP Allain, IIM Courouze, et al: Long Lasting abatement of HBsAg syntethesis induced by acute delta infection. *Lancet* 1:656-7,1983.
- 9: De Cock MK, S Govindarajan, Ag Redeker: Acute delta hepatitis with out circulating HBsAg. *Gut* 26:212-4,1985.
10. Rezzetto M. G Verme, C Recchia, et al: Chronic hepatitis in carriers of hepatitis B surface antigen with intrahepatic expression of the delta antigen. *Ann Intern Med* 98: 437-41,1983.
11. Govindarajan S, GC Kanel, RL Peters: Prevalence of delta antibody among chronic hepatitis B virus-infected patients in tehe Ijds Angeles area: Its carrelation with Liver biopsy diagnosis. *Gastroenterology* 85:160-2,1983.
12. Kanel GC, S Govindarajan, RL Peters: Chronic delta infection an Liver biopsy changes in chronic active hepatitis B *Ann Intern Med* 101: 514,1984.
13. Govindarajan S, et al: Markers of viral replication in patients with chronic hepatitis B vrus infection. *Am J Clin Pathol* 89:233-7,1988.
14. Seeff LB, RS Koff: Evolving concepts of the clinical and serologic consequences of hepatitis B virus infection. *Sem In Liver Dis*9:11-22,1986.
15. Sherlock S: The natural history of hepatitis B. *Postgraduate Med J* 63: 7-11,1987.
16. Saracco G, et al: Serologic markers with fulminant hepatitis in persons potiti ve for hepatitis B surface antigen. *Ann Intern Med* 108:380-383,1988.
17. Govindarajan S, B Valinluck and L Peters: Relapse of acute B viral hipatitis-role of delta agent. *Gut* 27:19-22 1986.
18. Govindarajan S, B Valinluck: Serum hepatitis B virus-DNA in chronic hepatitis B and Delta infection. *Arch Pathol Lab Med* 190:398-8,1985.
19. ILee SD, et al: Hepatitis D virus superinfection in an endemic area of hepatitis B infection: Immunopathohogic and serologic findings. *Soand J Infect Die* 19:173-7,1987.
20. Buti M, et al: Chronic Delta Infection: Correlation of serum HDV spesific RNA and IgM anti-HD with intrahepatic HD-Ag (abstract).International symposium on Vural Hepatitis and Liver Deisease, pp:40,1987.
21. Raimando G, et al: Delta infection in hepatocellular corcinoma positive for hepatitis B surface antigen. *Ann Intern Med* 1010:343-4,1984.
22. Arrigoni A, et al: Levamisole and chronic Delta Hepatitis. *Ann Intern Med* 98:1024,1983.
23. Thomas HC. et al: Immunological mechanisms in chronic hepatitis Bvirus infection. *Hepatology* 2:1165-8,1982.