

KISA BİLDİRİ:**HEPATİT D VİRUS (HDV) RNA POZİTİFLİĞİ İLE HDV ANTİKORLARI
ARASINDAKİ İLİŞKİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

SHORT COMMUNICATION: EVALUATION OF THE CORRELATION BETWEEN
HEPATITIS D VIRUS (HDV) RNA POSITIVITY AND HDV ANTIBODIES

Tuncer ÖZEKİNCİ*, **Selahattin ATMACA***, **Nezahat AKPOLAT***
Hakan TEMİZ*, **Eralp ARIKAN***

ÖZET: Bu çalışmada, hepatit D -delta- virus (HDV) enfeksiyonlarının serolojik tanısında kullanılan HDV-IgG ve -IgM antikorları ile serum HDV-RNA pozitifliği arasındaki ilişkinin değerlendirilmesi planlanmıştır. Bu amaçla HBsAg pozitif 153 serum örneğinde, anti-HBc IgM, HDV-IgG ve HDV-IgM ticari enzim immün yöntemleri ile, HDV-RNA varlığı ise gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile araştırılmıştır. Çalışmada 153 HBsAg pozitif örneğin 86'sı (%56.2) HDV antikorları yönünden pozitif bulunmuş, bunların 35'inde sadece IgG, 11'inde sadece IgM ve 40'ında hem IgG hem de IgM pozitifliği belirlenmiştir. Çalışılan örneklerin %21.5'inde (33/153) ise HDV-RNA varlığı saptanmıştır. HDV-RNA pozitif olguların 4'ünde sadece IgG, 8'inde sadece IgM ve 19'unda IgG ve IgM birlikte pozitifliği mevcuttur. Dolayısıyla HDV-IgM antikorlarının pozitif olduğu 51 hastanın 27'sinde (%53) HDV-RNA varlığı tespit edilmiş, bir başka açıdan bakıldığında da HDV-RNA pozitif 33 olgunun 27'sinde (%82) HDV-IgM pozitifliği bulunmuştur. HDV-RNA pozitif bulunan hastaların yaklaşık %85'inde (28/33) serum ALT düzeylerinin yüksek olduğu izlenmiştir. HDV-RNA pozitif örneklerin tümünde anti-HBc IgM antikorlarının negatif olması delta virusu ile süperenfeksiyonu düşündürmüştür. Sonuç olarak PCR'ın, viremik hastaların saptanmasında ve tedavinin izlenmesinde duyarlı ve yararlı bir yöntem olduğu, ancak kaynakları kısıtlı olan ülkemizde HDV-IgM pozitifliği ve ALT yüksekliğinin HDV viremisinin öngörülmesinde yararlı olabileceği izlenimine varılmıştır.

Anahtar sözcükler: *Hepatit D virusu, delta hepatiti, HDV-RNA, anti-HDV antikorları.*

ABSTRACT: The objective of this study was to evaluate the correlation between serum hepatitis D -delta- virus (HDV) RNA detection and anti-HDV IgG and IgM antibodies, in the serodiagnosis of delta hepatitis. A total of 153 HBsAg positive sera were screened for the presence of anti-HBc IgM, anti-HDV

* Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Diyarbakır.

IgG and anti-HDV IgM by commercial enzyme immunoassays and HDV-RNA by real time polymerase chain reaction (PCR). Of 153 sera, 86 (56.2%) were found positive for HDV antibodies. Although isolated anti-HDV IgG was present in 35 and isolated anti-HDV IgM was present in 11 patients, IgG and IgM were present concurrently in 40 additional patients. HDV-RNA was detected in 21.5% (33/153) of the patients. Four of the 33 HDV-RNA positive patients were positive only for anti-HDV IgG, 8 were positive only for anti-HDV IgM, and 19 were positive for both anti-HDV IgG and IgM antibodies. Twenty seven of 51 (53%) anti-HDV IgM positive patients were also found positive for HDV-RNA, while 27 of 33 (82%) HDV-RNA positive patients exhibited anti-HDV IgM positivity. Increased serum ALT levels were detected approximately in 85% (28/33) of viremic patients. As all of the HDV-RNA positive patients were found negative for anti-HBc IgM, superinfection with delta virus were considered. In conclusion, PCR is a sensitive and useful method for the detection of viremic patients as well as for the monitorization of antiviral therapy, anti-HDV IgM positivity together with increased ALT levels appear to be good markers for the prediction of hepatitis delta viremia, especially in the countries with limited economical sources as Turkey.

Key words: Hepatitis D virus, hepatitis delta, HDV-RNA, anti-HDV antibodies.

G İ R İ Ş

Replikasyonu için hepatit B virusunun yüzey antijenine (HBsAg) gereksinim duyan hepatit D virusu (HDV), RNA içeren defektif bir virustur¹. HDV'na fulminant hepatitlerde, kronik B hepatitlerinde ve karaciğer kanserlerinde sıkca rastlanması bu virusun önemini artırmaktadır. HDV'nin epidemiyolojik özelliklerine göre dünyada yüksek, orta ve düşük endemik ülkeler bulunmaktadır. Türkiye dahil olmak üzere Akdeniz ülkeleri orta endemik bölgede yer almaktadır². HDV enfeksiyonunun tanısı; karaciğer biyopsisi veya serumda HDV antijeninin gösterilmesi, daha sık ve yaygın kullanılan şekliyle serum veya plazmada anti-HDV total, IgG veya IgM sınıfı antikorların belirlenmesi ya da moleküler yöntemlerle HDV-RNA'nın saptanması sonucu konulmaktadır^{1,3}. Anti-HDV pozitifliği her zaman aktif HDV enfeksiyonu varlığı anlamına gelmemektedir. PCR ile HDV-RNA varlığının gösterilmesi aktif HDV enfeksiyonu olasılığının değerlendirilmesi için en duyarlı yöntem olarak kabul edilmektedir^{4,5}.

Bu çalışmada, HDV-RNA pozitifliği ile HDV-IgG ve -IgM antikorları arasındaki ilişkinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmaya HBsAg pozitif 153 serum örneği alındı ve bu örneklerde anti-HBc IgM, anti-HDV IgG ve IgM, HDV-RNA ve alanin aminotransferaz (ALT) düzeyleri araştırıldı. Anti-HBc IgM ticari otomatize enzim immün yöntemiyle (MakroEIA, Elecsys 2010, Roche), anti-HDV IgG ve IgM ticari mikroEIA yöntemiyle (Diapro, Diagnostic Bioprobes, Milano, Italy) çalışıldı. HDV-RNA araştırılmasında "real time" polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemi kullanıldı. RNA ekstraksiyonu

(NucleoSpin RNA Virus kit) yapıldıktan sonra, ABI PRISM 5700 (Applied Biosystems) cihazında yöntem gerçekleştirildi. "Forward" primer olarak 5' AGA GGA AAG GAC GCG AGA C 3', "reverse" primer olarak 5' CAG AGT TGT CGA CCC AGT GA 3' kullanıldı.

B U L G U L A R

Çalışmamızda, 153 HBsAg pozitif örneğin 86'sı (%56.2) HDV antikorları yönünden pozitif, 67'si (%43.8) ise negatif bulunmuştur. Anti-HDV pozitif 86 olgunun 35'inde sadece IgG, 11'inde sadece IgM ve 40'ında hem IgG hem de IgM pozitifliği mevcuttur (Tablo I).

Serum örneklerinde HDV-RNA pozitiflik oranı ise %21.5 (33/153) olarak saptanmıştır. HDV-RNA pozitif örneklerin 4'ünde sadece IgG, 8'inde sadece IgM, 19'unda ise hem IgG hem de IgM pozitifliği mevcuttur (Tablo I). HDV-RNA pozitif toplam 33 hastanın 28'inde (%84.8) serum ALT düzeylerinin yüksek, HBc-IgM antikorlarının ise negatif olduğu belirlenmiştir.

Tablo I: HDV-RNA ile Anti-HDV IgG ve IgM Sonuçlarının Karşılaştırılması

	HDV-RNA Pozitif Sayı (%)	HDV-RNA Negatif Sayı (%)	Toplam Sayı (%)
IgG (+) IgM (-)	4 (2.6)	31 (20.2)	35 (22.9)
IgG (-) IgM (+)	8 (5.2)	3 (2.0)	11 (7.2)
IgG (+) IgM (+)	19 (12.4)	21 (13.7)	40 (26.1)
IgG (-) IgM (-)	2 (1.3)	65 (42.5)	67 (43.8)
Toplam	33 (21.5)	120 (78.5)	153 (100)

T A R T I Ş M A

Delta hepatitinin tanısı, karaciğer biyopsi örneklerinde direk immüno Floresans ya da immünoperoksidaz yöntemleriyle veya serumda RIA ya da EIA yöntemleriyle viral antijenin (HDAg) gösterilmesi esasına dayanır. Ancak çok daha pratik olması ve invazif girişim gerektirmemesi açısından yaygın olarak kullanılan yöntem, serumda anti-HDV total, IgG ve IgM antikorlarının EIA ile saptanmasıdır. Özellikle kronik delta hepatitinin tanısı ve takibinde en duyarlı testin anti-HDV IgM olduğu, bunu HDV-RNA ve serum HDAg'nin izlediği bildirilmektedir⁴. Akut delta hepatitinde viral replikasyonun göstergesi olan serum HDV-RNA'sının PCR ile saptanması ve vireminin belirlenmesi büyük önem taşımaktadır^{6,7}.

Çalışmamızda, HBsAg pozitif örneklerde HDV antikor (IgG ve/veya IgM) pozitiflik oranı %56.2, HDV-RNA pozitiflik oranı ise %21.5 olarak bulunmuştur. HDV-RNA pozitif olan 33 örneğin 27'sinde (%82) HDV-IgM pozitifliği mevcuttur. Govindarajan ve arkadaşlarının⁵ çalışmasında, HDV-RNA'nın pozitif olduğu serum örneklerinin %68'i HDV-IgM pozitif, %32'si negatif bulunmuş ve delta hepatitinde HDV-IgM yokluğunun aktif viral enfeksiyonu dışlamak için yeterli olmadığı ifade edilmiştir. Aynı çalışmada araştırmacılar serum HDV-RNA'sı ile karaciğer HDAg'i arasında kuvvetli bir korelasyon olduğunu belirtmişlerdir⁵. Diğer bir çalışmada

Nakasone ve arkadaşları⁸, bundan farklı olarak anti-HDV pozitif hastalarda, HDV-RNA düzeyleriyle kronik karaciğer hastalığının şiddeti arasında hiçbir ilişki olmadığını ileri sürmüşlerdir.

Gupta ve arkadaşları⁶, anti-HDV pozitifliği ile akut delta hepatiti tanısı hastaların %56'sında (27/48) HDV-RNA pozitifliği saptamışlardır. Bu araştırmacılar, hastaların 18'inde (%38) sadece HDV-IgM ve 16'sında (%33) HDV-IgG ve IgM'yi birlikte pozitif bulduklarını rapor etmişlerdir⁶. Bizim çalışmamızda, HDV-RNA pozitif 33 hastanın 8'inde (%24.2) sadece HDV-IgM, 19'unda (%57.6) ise hem IgG hem de IgM pozitifliği belirlenmiştir. Araştırmacılar, HDV seropozitiflik paternlerinin kronikleşmeye geçiş sırasında değişebileceğini ve HDV-RNA ile HDV-IgM sonuçları arasındaki uyumun %40-50 arasında olabileceğini belirtmektedirler⁶. Çalışmamızda HDV-IgM pozitifliği (tek başına ya da IgG ile birlikte) saptanan hastaların %53'ünde (27/51) HDV-RNA pozitifdir.

Tang ve arkadaşlarının⁷ çalışmasında, HDV-RNA'nın diğer HDV belirleyicileri olmaksızın da serumda saptanabileceği ifade edilmektedir. Jardi ve arkadaşları⁴ da, karaciğer biyopsisinde HDAg'i negatif 12 hastadan 2'sinin serumunda HDV-RNA'yı pozitif olarak tespit ederken, sadece 7 hastada HDV-IgM pozitifliği bildirmişlerdir. Çalışmamızda HDV-IgG ve IgM negatif 67 hastanın 2'sinde HDV-RNA saptanmıştır. Ayrıca 31 hastamızda HDV-IgM ve HDV-RNA yokluğuna karşın HDV-IgG varlığının tespit edilmesi, Tang ve arkadaşlarının⁷ bildirdiği şekilde geçirilmiş enfeksiyonu düşündürmüştür.

Sakugawa ve arkadaşları⁹ asemptomatik HDV enfeksiyonlu olguları incelemişler ve HBsAg pozitif örneklerin %22.4'ünde (47/210) anti-HDV pozitifliği bildirmişlerdir. Bu araştırmacılar örneklerdeki HDV-RNA pozitifliğini ise %49 (21/43) olarak tespit etmişler ve HDV-RNA pozitifliğinin, asemptomatik olgularda bile karaciğer hücre hasarı ile yakından ilişkili olduğu sonucuna varmışlardır⁹.

Huang ve arkadaşlarının¹⁰ çalışmasında, HDV-total antikor titre yüksekliği ve HDV-IgM pozitifliğinin virus replikasyonunu göstermekle birlikte, RT-PCR'ın viremiyi gösteren en duyarlı yöntem olduğu vurgulanmaktadır. Bu araştırmacılar, HDV-total ve HDV-IgM düzeyi ile HDV-RNA arasında orta derecede bir uyum olduğunu belirtmektedirler⁸. Arakawa ve arkadaşları¹¹ ise, anti-HDV pozitif olan hastaların yaklaşık %41'inde (13/32) HDV-RNA pozitifliği saptamışlardır, ki bu oran anti-HDV ve HDV-RNA korelasyonu açısından düşük bir uyum göstermektedir. Çalışmamızda HDV-IgG ve/veya IgM pozitif hastaların %36'sında HDV-RNA varlığı saptanmıştır, ancak ülkemizde bu konu ilgili karşılaştırma yapabileceğimiz bir çalışmaya rastlanmamıştır.

HDV-RNA pozitif hastalarımızın yaklaşık %85'inde (28/33) serum ALT düzey yüksekliği belirlenmiştir. Sakugawa ve arkadaşları⁹ bu oranı %62 olarak bildirmişler ve ALT düzeyleri ile HDV-RNA düzeyleri arasında bir paralellik olmadığını ifade etmişlerdir.

Çalışmamızda, HDV-RNA pozitifliği saptanan tüm örneklerde anti-HBc IgM antikorları negatif bulunmuştur. HBsAg ve HDV-IgM pozitif hastalarda, anti-HBc IgM, koenfeksiyon ya da süperenfeksiyonun ayırd edilmesinde önem taşımaktadır.

Böyle bir durumda anti-HBc IgM varlığı aynı anda oluşmuş akut enfeksiyonun (koenfeksiyon) belirleyicisi iken, yokluğu kronik HBV enfeksiyonu üzerine eklenmiş akut delta hepatiti için bir kanıttır¹². Dolayısıyla HDV-RNA pozitif 33 hastamızın, HDV süperenfeksiyonunun farklı dönemlerinde olduğu düşünülebilir.

Sonuç olarak, serumda HDV-RNA'nın saptanması, delta hepatitinin erken tanısında, prognozun ve tedaviye yanıtın izlenmesinde oldukça yararlı, duyarlı ve invaziv olmayan bir yöntemdir. Ancak ülkemiz gibi ekonomik kaynak sıkıntısı olan ülkelerde, delta hepatitli hastaların bu şekilde izlenmesi pratik ve mümkün görünmemektedir. Dolayısıyla, HDV-IgM pozitifliği saptanan olgularımızın %53'ünde HDV-RNA varlığının saptanması, HDV-RNA pozitif olgularımızın %82'sinde HDV-IgM'nin pozitif ve %85'inde de ALT'nin yüksek bulunması, kaynakları kısıtlı ülkelerde HDV-IgM pozitifliği ve ALT yüksekliğinin HDV viremisinin öngörülmesinde yararlı olabileceğini düşündürmektedir.

KAYNAKLAR

1. Rebecca TH, Gray ET: Hepatitis B and D viruses, p. 1464-1479. In: Murray PR (ed), Manual of Clinical Microbiology. 2003, 8th ed. American Society for Microbiology, Washington DC.
2. Bilgiç A, Özacar T: Hepatit D virusu, s. 1370-1377. Topcu AW, Söyletir G, Doğanay M (ed), Enfeksiyon Hastalıkları Mikrobiyolojisi. 2002, Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul.
3. Prescott LM, Harley JP, Klein DA: Microbiology, p. 758-760. 1999, 4th ed. McGraw Hill Co, New York.
4. Jardi R, Buti M, Rodriguez F, et al: Comparative analysis of serological markers of chronic delta infection: HDV-RNA, serum HD-Ag and anti-HD IgM. Virol Methods 1994, 50: 59-66.
5. Govindarajan S, Gupta S, Valinluck B, Redeker AG: Correlation of IgM anti-hepatitis D virus (HDV) to HDV RNA in sera of chronic HDV. Hepatology 1989, 10: 34-35.
6. Gupta S, Govindarajan S, Cassidy WM, Valinluck B, Redeker AG: Acute delta hepatitis: Serological diagnosis with particular reference to hepatitis delta virus RNA. Am J Gastroenterol 1991, 86: 1227-1231.
7. Tang JR, Cova L, Lamelin JP, et al: Clinical relevance of the detection of hepatitis delta virus RNA in serum by RNA hybridization and polymerase chain reaction. J Hepatol 1994, 21: 953-960.
8. Nakasone H, Sakugawa H, Shokita H, et al: Prevalence and clinical features of hepatitis delta virus infection in Miyajo Islands, Okinawa, Japan. Gastroenterol 1998, 33: 850-854.
9. Sakugawa H, Nakasone H, Kawakami Y, et al: Determination of hepatitis delta virus (HDV) -RNA in asymptomatic cases of HDV infection. Am J Gastroenterol 1997, 92: 2232-2236.
10. Huang YH, Wu JC, Sheng WY, et al: Diagnostic value of anti-hepatitis D virus (HDV) antibodies revisited: A study of total and IgM anti-HDV compared with detection of HDV-RNA by polymerase chain reaction. J Gastroenterol Hepatol 1998, 13: 57-61.
11. Arakawa Y, Moriyama, Taira M, et al: Molecular analysis of hepatitis D virus infection in Miyako Island, a small Japanese island. J Viral Hepatol 2000, 7: 375-381.
12. Hollinger FB, Dreesman GR: Hepatitis viruses, p. 702-718. In: Rose NR, Conway de Macario C, Folds JD, Lane HC, Nakamura R (eds), Manual of Clinical Laboratory Immunology. 1997, 5th ed. ASM Press, Washington DC.