

HEMODİYALİZ HASTALARININ GİZLİ HEPATİT B VARLIĞI YÖNÜNDEN ARAŞTIRILMASI

INVESTIGATION OF HEMODIALYSIS PATIENTS IN TERMS OF THE
PRESENCE OF OCCULT HEPATITIS B

**Mustafa ALTINDIŞ¹, İhsan USLAN², Zafer ÇETİNKAYA¹
Şeref YÜKSEL², İ.Hakkı ÇİFTÇİ¹, Neşe DEMİRTÜRK³,
Müjgan ÖZDEMİR¹, Fadime ARSLAN¹, O.Cem AKTEPE¹**

ÖZET: Hepatit B virus (HBV) yüzey antijeni (HBsAg) negatif olan kişilerde HBV-DNA varlığı "gizli (occult) hepatit B" olarak tanımlanmaktadır. Hepatoselüler karsinoma, hemodiyaliz uygulaması ya da hepatit C virus (HCV) ile ko-enfeksiyon durumlarında gizli HBV enfeksiyonuna daha sık rastlandığı ile ilgili raporlar vardır. Bu çalışmada, hemodiyaliz hastalarında ve hemodiyaliz hastası olmayan ancak farklı HBV ve HCV serolojik profillerine sahip tümü HBsAg negatif olan gruplarda HBV-DNA varlığının araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmaya, 153 hemodiyaliz hastası (97 erkek, 56 kadın; yaş ortalaması: 41.3 ± 5.8 yıl) ile 73 hemodiyaliz hastası olmayan kişi (46 erkek, 27 kadın; yaş ortalaması: 36.5 ± 6.9 yıl) olmak üzere, tümü HBsAg negatif toplam 226 kişi dahil edilmiştir. Hemodiyaliz hastalarının %26.1'i (40/153) anti-HCV pozitif iken, hemodiyaliz hastası olmayan grubun 41'i anti-HCV pozitif, 22'si salt anti-HBc IgG pozitif, yedisi anti-HBc IgG ve anti-HBs pozitif, üçü ise anti-HBc IgG ve anti-HBe pozitif kişilerden oluşmaktadır. HBV ve HCV serolojik belirleyicileri ticari enzim immunoassay yöntemiyle (sırasıyla; bioMerieux, France ve Murex, UK), HBV-DNA varlığı ise ticari gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (PCR; 5700 ve 7700 Sequence Detection System, Applied Biosystems, UK) ile araştırılmıştır. Çalışmada, hemodiyaliz hastalarının 19'unda (%12.4) ve hemodiyaliz hastası olmayan bireylerin ise beşinde (%6.8) HBV-DNA pozitifliği saptanmıştır (viral yük sırasıyla; $\geq 10^4$ kopya/ml ve 10^3 - 10^4 kopya/ml). Anti-HCV pozitif hemodiyaliz hastaları ile hemodiyaliz hastası olmayan anti-HCV pozitif kişilerde gizli HBV varlığı oranları sırasıyla %27.5 (11/40) ve %2.4 (1/41) olarak belirlenmiştir. Bu oranlar; anti-HCV negatif hemodiyaliz hastalarında %7.1 (8/113), salt anti-HBc pozitif olanlarda %9.1 (2/22), anti-HBc ile birlikte anti-HBs ya da anti-HBe pozitif olanlarda %20 (2/10) olarak tespit edilmiştir. Sonuç olarak çalışmamızda, HCV ile enfekte olanlarda daha yüksek (%27.5) olmak üzere hemodiyaliz hastalarında gizli HBV enfeksiyonu oranının (%12.4) yadsınamayacak düzeyde olduğu görülmüş ve bu durumun diyaliz ünitelerinde bulaş riski oluşturmaması için, hemodiyaliz hastalarının -HBsAg negatif olsalar bile duyarlı PCR temelli yöntemlerle taranmasının yararlı olabileceği düşünülmüştür.

Anahtar sözcükler: Hepatit B virus (HBV), gizli HBV, hemodiyaliz hastaları.

¹Afyon Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Afyon. (maltindis@hotmail.com)

²Afyon Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Afyon.

³Afyon Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı, Afyon.

ABSTRACT: The presence of hepatitis B virus (HBV) DNA in case of negative HBV surface antigen (HBsAg) in serum is known as “occult hepatitis B”. There are many reports indicating that occult HBV infections are more frequently encountered in case of hepatocellular carcinoma, hemodialysis practice and co-infections with hepatitis C virus (HCV). The aim of this study was to investigate the presence of HBV-DNA in HBsAg negative hemodialysis patients and subjects who had never experienced hemodialysis. A total of 226 HBsAg negative sera were included to the study, of which 153 were from hemodialysis patients (97 male, 56 female; mean age: 41.3 ± 5.8 years), and 73 were from non-hemodialyzed individuals (46 male, 27 female; mean age: 36.5 ± 6.9 years) who had serological evidence of previous HBV and HCV infections. Of these 73 subjects, 41 were anti-HCV positive, 22 were “anti-HBc IgG positive alone”, seven were anti-HBc IgG and anti-HBs positive, and three were anti-HBc IgG and anti-HBe positive, while 40 of 153 (26.1%) hemodialysis patients were anti-HCV positive. HBV and HCV markers were detected by commercial enzyme immunoassays (bioMerieux, France and Murex, UK, respectively), and HBV-DNA testing was performed by a commercial real-time polymerase chain reaction (PCR; 5700 and 7700 Sequence Detection System, Applied Biosystems, UK) assay. Nineteen (12.4%) of HBsAg-negative hemodialysis patients and five (6.8%) of the non-hemodialyzed subjects were found positive for HBV-DNA (viral loads were $\geq 10^4$ copies/ml, and 10^3 - 10^4 copies/ml, respectively). The rates of occult HBV infection in the anti-HCV positive hemodialysis patients and anti-HCV positive non-hemodialyzed subjects were detected as 27.5% (11/40) and 2.4% (1/41), respectively. These rates in the other groups were found as follows; 7.1% (8/113) in the anti-HCV negative hemodialysis patients, 9.1% (2/22) in the “anti-HBc positive alone” subjects, and 20% (2/10) in the subjects positive for anti-HBc+anti-HBs or anti-HBe. The results of this study indicated that the prevalence of HBV viremia (12.4%) in hemodialysis patients being more prominent in those of anti-HCV positive patients (27.5%) should not be overlooked. In conclusion, the hemodialysis patients should be screened by sensitive PCR-based methods for occult HBV infections, even if they were negative for HBsAg, in order to prevent or at least to decrease the transmission risk of HBV infection which is still an important health problem in dialysis units.

Key words: Hepatitis B virus (HBV), occult HBV, hemodialysis patients.

GİRİŞ

Günümüzde, hepatit B virus (HBV) enfeksiyonunun tanı ve prognozunun değerlendirilmesinde, viral antijenlerin ve bunlara karşı oluşan antikorların saptanması ile yapılan serolojik yöntemlerin yetersiz kaldığı benimsenmektedir¹. HBV enfeksiyonunun iyileşmesi; HBsAg'nin kaybolması ile birlikte HBV-DNA'nın da negatifleşmesi olarak tanımlanır. Bununla birlikte, kendiliğinden ya da tedavi ile HBsAg'si kaybolan bazı hastalarda, serum ve/veya karaciğerde hassas moleküler biyolojik teknikler ile düşük düzeyde HBV-DNA varlığı gösterilebilmektedir²⁻⁴. Bu şekilde, HBsAg negatif kişilerde HBV-DNA pozitifliğinin saptanması, “gizli”, “sessiz” veya “latent” (occult) HBV enfeksiyonu olarak tanımlanmaktadır². Bu durumun, kriptojenik hepatit ve hepatoselüler karsinoma olgularında daha sık gözlendiği; ayrıca hepatit C virus (HCV) veya insan immün yetmezlik virusu (HIV) ile enfeksiyon, hemodiyaliz ve transplantasyon uygulanması ve intravenöz ilaç bağımlılığı gibi faktörlerin de etkili olabildiği ifade edilmiştir^{2,3}. Buna karşın, HBsAg negatif, anti-HBc ve/veya anti-HBs pozitif olan ve enfeksiyonu geçirdiği

düşünülen kişilerin bir kısmının yanı sıra, HBV göstergeleri negatif sağlıklı kişilerde de HBV-DNA pozitifliğinin saptanması, gerek klinik gerekse laboratuvar değerlendirmelerinde sorunlara yol açmaktadır^{4,5}.

Bu çalışmada, hemodiyaliz hastaları ile birlikte hemodiyaliz hastası olmayan ancak farklı HBV ve HCV serolojik profillerine sahip kişiler olmak üzere tümü HBsAg negatif olan gruplarda HBV-DNA varlığının araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmaya, hemodiyalize giren 153 hasta ile hiçbir zaman hemodiyalize girmemiş farklı HBV ve HCV serolojik profillerine sahip 73 kişi olmak üzere, tümü HBsAg negatif toplam 226 kişi dahil edildi. Hemodiyaliz hastalarının diyalize girme süreleri 3-180 ay arasında değişmekte olup (ortalama: 44.4±42.4), haftada üç kez dörder saatlik seanslar şeklinde idi. Çalışma gruplarının demografik ve serolojik özellikleri Tablo 1'de gösterildi.

Tablo 1. Tümü HBsAg Negatif Olan Çalışma Gruplarının Demografik Özellikleri ve Serolojik Profilleri

Grup (Sayı)	Serolojik Profil (Sayı)	Cinsiyet	Yaş Ortalaması
Hemodiyaliz Hastaları (153)	Anti-HCV pozitif (40)	97 E, 56 K	41.3±5.8 yıl
	Anti-HCV negatif (113)		
Diğer (73)	Anti-HCV pozitif (41)	46 E, 27 K	36.5±6.9 yıl
	Salt anti-HBc pozitif (22)		
	Anti-HBc ve anti-HBs pozitif (7)		
	Anti-HBc ve anti-HBe pozitif (3)		
Toplam (226)		143 E, 83 K	39.21±8.9 yıl

HBV ve HCV serolojik belirleyicileri, ticari enzim immunoassay (EIA) kitleri (sırasıyla; bioMerieux, France ve Murex, UK) ile üretici firmaların önerilerine göre çalışıldı.

HBV-DNA varlığı, gerçek zamanlı PCR ile araştırıldı. DNA saflaştırılması, proteinaz K kullanılarak spin kolonlu ticari bir kit (Nucleospin Blood, Clontech Lab Inc, Takarabio, Japan) ile, DNA amplifikasyonu ise, TaqMan® temelli Roboscreen amplifikasyon kiti (The Bio-Quantification Company, Germany) ile üretici firmaların önerilerine göre yapıldı. Ticari sistemde kullanılan primer dizileri (sense primer: 5'-GTG TCT GCG GCG TTT TAT CA; antisense primer: 5' GAC AAA CGG GCA ACA TAC CTT), HBV genomunun 379-476 pozisyonundan 98 baz çifti olarak dizayn edilmiş idi. PCR; ABI 5700 ve 770 Sequence Detection System (PE Applied Biosystems, Warrington, UK) cihazlarında, 50°C'de 2 dk, 95°C'de 10 dk ön hazırlık, ardından 94°C'de 15 sn ve 55°C'de 30 sn ve 72°C'de 30 sn'den oluşan 40 döngü şeklinde gerçekleştirildi. Toplam reaksiyon süresinin 65 dk. olduğu her çalışmada, üretici firma tarafından sağlanan pozitif ve negatif kontroller [standart olarak 10²⁻⁸ kopya/ml aralığında referans plazmalar

(1.5×10^8 kopya/ml-cpm, 1.5×10^6 cpm, 1.5×10^4 cpm, 1.5×10^2 cpm); negatif kontrol olarak bidistile PCR grade su] kullanıldı. Yöntemin DNA saptama sınırları 200-200.000.000 kopya/ml arasında olup, lineer aralık 50-108 IU/ml olarak raporlandı. HBV-DNA için 1×10^3 kopya/ml üzerindeki sonuçlar pozitif olarak değerlendirildi. Standartların kalibrasyonu, uluslararası HBV-DNA standartları (97/746; NIBSC, Potters Bar, UK) ile karşılaştırılarak doğrulandı. Örnek eğrilerinin standart eğrilerin üstünde olduğu durumlarda 1:100 oranında dilüsyon yapılarak sonuçlar yeniden değerlendirildi.

BULGULAR

Çalışmamızda, hemodiyaliz hastalarının %12.4'ünde ve hemodiyaliz hastası olmayan ancak farklı serolojik profillere sahip bireylerin ise %6.8'inde HBV-DNA pozitifliği saptanmıştır. Viral yük hemodiyaliz grubunda $\geq 10^4$ kopya/ml iken, diğer gruplarda düşük düzeylerde (10^3 - 10^4 kopya/ml) saptanmıştır. HBV-DNA pozitifliğinin gruplara göre dağılımı Tablo II'de gösterilmiştir.

Tablo II. Tümü HBsAg Negatif Olan Grupların HBV-DNA Pozitiflikleri

Grup (Sayı)	Serolojik Profil	HBV-DNA Pozitif	
		Sayı/Toplam Sayı (%)	Toplam Sayı (%)
Hemodiyaliz Hastaları (153)	Anti-HCV pozitif	11/40 (27.5)	19 (12.4)
	Anti-HCV negatif	8/113 (7.1)	
Diğer (73)	Anti-HCV pozitif	1/41 (2.4)	5 (6.8)
	Salt anti-HBc pozitif	2/22 (9.1)	
	Anti-HBc ve anti-HBs pozitif	1/7*	
	Anti-HBc ve anti-HBe pozitif	1/3*	

* Sayılar az olduğundan yüzde alınmamıştır.

TARTIŞMA

Hepatit B virus (HBV) enfeksiyonları, aşılama programlarına ve alınan önlemlere rağmen hemodiyaliz ünitelerinde önemli bir sorun olmaya devam etmektedir. Hemodiyaliz hastaları arasındaki HBV bulaşının sürekliliği; hastaların aşıya yanıtının yetersiz olması ve diyaliz ünitelerinde kontrol önlemlerinin yeterince uygulanmamasının yanı sıra, HBsAg'nin negatif ancak HBV-DNA'nın pozitif olduğu gizli HBV enfeksiyonlarının varlığı ile de açıklanmaktadır⁶. Yapılan çalışmalarda, HBsAg negatif hemodiyaliz hastalarında HBV-DNA pozitifliği %0 ile %50 gibi çok farklı aralıkta değişen oranlarda bildirilmektedir⁶⁻⁹. Örneğin İspanya'da Cabrerizo ve arkadaşları⁹, HBsAg negatif 33 hemodiyaliz hastasının 19'unda (%58) HBV-DNA pozitifliği bildirirken, bu oran Minuk ve arkadaşlarının⁶ Kanada'da HBsAg negatif 239 hemodiyaliz hastasında gerçekleştirdiği çalışmada yaklaşık %4 olarak rapor edilmiştir. Buna karşın Avusturya'da yapılan bir çalışmada, 67 HBsAg negatif hemodiyaliz hastasının hiçbirinin serumunda HBV-DNA varlığına rastlanmamıştır⁸. Farklı ülkelerden çok farklı oranların bildirilmesi; ülkelerin genel popülasyonundaki HBV enfeksiyonu prevalansına,

PCR yöntemlerinde kullanılan primer setleri ve dizilerine, hasta popülasyonunun seçiminde dikkate alınan kriterlere ve çalışılan hasta sayılarına bağlı olarak farklılık gösterebilir. Bizim çalışmamızda, HBsAg negatif 153 diyaliz hastasının 19'unda (%12.4) tespit edilen HBV-DNA pozitifliği, bu geniş aralığın içinde yer almaktadır.

Diyalize giren hastalarda HBV enfeksiyonları kadar HCV enfeksiyonları da büyük önem taşımaktadır. Gizli HBV enfeksiyonlarının kronik hepatit C'li hastalarda daha sık rastlandığının bildirilmesine rağmen, bu ko-enfeksiyonların klinik önemi tam olarak açık değildir¹⁰. HBsAg negatifliğinde HBV-DNA'nın saptanmasına neden olan mekanizmalar arasında; yüzey antijen geninin "a" determinantında mutasyonların olması¹⁰⁻¹² ve dolaşan HBsAg+anti-HBs immün komplekslerinin varlığı nedeniyle HBsAg'nin standart EIA yöntemleriyle saptanamamasının¹³ yanı sıra, HCV varlığının HBV replikasyonunu baskılamasının^{10,14-16} da etkili olduğunu bildiren raporlar mevcuttur. Kronik HCV enfeksiyonu olan hastalarda gizli HBV enfeksiyon oranını, Kao ve arkadaşları¹⁷ %15 (31/210), Silva ve arkadaşları¹⁸ %14 (15/106), Khattab ve arkadaşları¹⁰ ise %7.5 (4/53) olarak bildirmektedir. Çalışmamızda, hemodiyaliz hastası olan ve olmayan anti-HCV pozitif kişilerde gizli HBV enfeksiyon oranları sırasıyla %27.5 (11/40) ve %2.4 (1/41) olarak belirlenmiştir. Gerek bu iki grup arasında dikkat çekici bir farkın olması, gerekse anti-HCV negatif hemodiyaliz hastalarında bile %7 (8/113) oranında gizli HBV enfeksiyonunun saptanması, hemodiyaliz uygulamasının ilave bir risk faktörü olabileceği konusunda şüphe doğurmaktadır.

HBsAg negatifliğinde HBV-DNA varlığı, HBV enfeksiyonunu geçiren ve anti-HBc IgG ve/veya anti-HBs belirleyicileri pozitif olan kişilerde de saptanabilmektedir. Buna karşın Minuk ve arkadaşları^{5,6}, HBV-DNA varlığının, HBV ile karşılaşmayı gösteren belirleyicilerin varlığından bağımsız olarak da saptandığını ifade etmektedirler. Örneğin bu araştırmacıların yaptığı bir genel popülasyon taramasında, önceden geçirilmiş HBV enfeksiyonunu işaret eden serolojik profile sahip kişilerin %18'inde (14/80), HBV yönünden tamamen seronegatif olan kişilerin ise %8'inde (33/407) gizli HBV enfeksiyonu varlığı rapor edilmiştir⁵. Kao ve arkadaşları¹⁷, salt anti-HBc pozitifliği olan sağlıklı sekiz bireyin ikisinde (%25), anti-HBc ve anti-HBs pozitifliği olan 82 bireyin ise %16'sında HBV DNA'yı pozitif bulmuşlardır. Silva ve arkadaşları¹⁸ da, anti-HBc pozitif 150 kan donörünün altısında (%4) HBV-DNA varlığı bildirmektedir. Ülkemizde yapılan çalışmalarda; Bayram ve Balcı¹⁹ anti-HBc dışında tüm serolojik göstergeleri negatif olan 36 olgunun 11'inde (%30.6), Us ve arkadaşları²⁰ anti-HBe pozitif olguların %13.6'sında, Erensoy ve arkadaşları²¹ ise yine anti-HBe pozitif olguların %20'sinde HBV-DNA'yı pozitif olarak saptamışlardır. Çalışmamızda, salt anti-HBc IgG pozitif olan 22 kişinin ikisinde (%9), anti-HBc IgG ve anti-HBs pozitif yedi kişinin birinde ve anti-HBc IgG ve anti-HBe pozitif üç kişinin birinde HBsAg negatif olmasına rağmen HBV-DNA pozitifliği izlenmiştir.

Çalışmamızda, temel değişken olan HBV DNA'nın saptanmasında kantitatif ticari bir gerçek zamanlı PCR kiti kullanılmış, ancak bu yöntemin performansı ekonomik yetersizlikler nedeniyle başka bir yöntemle karşılaştırılamamıştır.

Bu sistemin duyarlılığının "in-house nested" PCR ya da tek oturumlu PCR protokollerine göre, özellikle düşük kopya sayılı örneklerde düşük olabileceği kanısı mevcuttur¹⁸. Fang ve arkadaşlarının²² Çin'de gerçekleştirdiği çalışmada, HBsAg negatif bireylerde "nested" PCR ile %11.5 oranında HBV-DNA pozitifliği saptanmış ve bu yöntemin oldukça duyarlı olduğu ifade edilmiştir. Buna karşın Mendi ve arkadaşlarının²³ hepatit B taşıyıcılarında HBV-DNA kantitasyonu için üç farklı sistemi karşılaştırdıkları çalışmalarında, ABI 5700 Sequence Detection System ile uygulanan gerçek zamanlı PCR yöntemi ile diğer yöntemler (in house PCR ve Roche Amplicor real time PCR) arasında oldukça yüksek bir korelasyon olduğu bildirilmiştir. Minuk ve arkadaşlarının⁶ çalışmasında, birbirinden bağımsız iki primer seti (kor promotor ve yüzey) kullanılarak "in-house real-time" PCR yöntemi uygulanmış ve 239 HBsAg negatif hemodiyaliz hastasının dokuzunda (%3.8) HBV-DNA pozitifliği belirlenmiştir. Bu araştırmacılar, dokuz HBV-DNA pozitifliğinden yedisinin sG145R mutasyonuna bağlı olduğunu, bu hastalarda viral yükün düşük olduğunu (10^2 - 10^4 kopya/ml) ve gizli HBV varlığının ayırd edilmesinde demografik (yaş, cins, ırk), biyokimyasal (karaciğer enzim düzeyleri) ve serolojik göstergelerin (anti-HBc, anti-HBs) yetersiz kaldığını bildirmektedirler⁶.

Sonuç olarak çalışmamızda, HBsAg negatif hemodiyaliz hastalarında toplamda %12.4 oranında, anti-HCV pozitif olanlarda ise daha yüksek oranda (%27.5) HBV-DNA varlığının belirlenmesi, standart HBsAg testleriyle saptanamayan HBV viremi hastalarının göz ardı edilemeyecek düzeyde olduğunu düşündürmektedir. Her ne kadar gizli HBV enfeksiyonunun nozokomiyal geçişteki önemi konusunda aydınlatılamayan noktalar olsa da, bu durum, gizli hepatit B'li diyaliz hastalarından duyarlı diğer hastalara bulaş riskini artırabilir. Dolayısıyla bu riskin önlenmesi için, konu ile ilgili yeterli veriler elde edilinceye kadar hemodiyaliz hastalarının duyarlı PCR temelli yöntemlerle taranmasının ve tarama protokollerinin belirlenmesinde de daha geniş kapsamlı çalışmaların gerçekleştirilmesinin uygun olacağı düşüncesine varılmıştır.

KAYNAKLAR

1. Zaaijer HL, Borg FT, Cuyppers HTM, Hermus MCAH, Leleie PN. Comparison of methods for detection of hepatitis B virus DNA. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 2088-91.
2. Ergünay K. Gizli (Okült) Hepatit B Enfeksiyonu. *Mikrobiyol Bül* 2005; 39: 241-9.
3. Tonberson M, Thomas DL. Occult hepatitis B. *Lancet Infect Dis* 2002; 2: 479-86.
4. Allain JP. Occult hepatitis B virus infection. *Transfus Clin Biol* 2004; 11: 18-25.
5. Minuk GY, Sun DF, Uhanova J, et al. Occult hepatitis B virus infection in a North American community-based population. *J Hepatol* 2005; 42: 480-5.
6. Minuk GY, Sun DF, Greenberg R, et al. Occult hepatitis B virus infection in a North American adult hemodialysis patient population. *Hepatology* 2004; 40: 1072-7.
7. Joller-Jemelka HI, Wicki AN, Grob PJ. Detection of HBs antigen in "anti-HBc alone" positive sera. *J Hepatol* 1994; 21: 269-72.
8. Oesterreicher C, Hammer J, Koch U, et al. HBV and HCV genome in peripheral blood mononuclear cells in patients undergoing chronic hemodialysis. *Kidney Int* 1995; 48: 1967-71.
9. Cabrerizo M, Bartolome J, De Sequera P, Caramelo C, Carreno V. Hepatitis B virus DNA in serum and blood cells of hepatitis B surface antigen-negative hemodialysis patients and staff. *J Am Soc Nephrol* 1997; 8: 1443-7.

10. Khattab E, Chemin I, Vuillermoz I, et al. Analysis of HCV co-infection with occult hepatitis B virus in patients undergoing IFN therapy. *J Clin Virol* 2005; 33: 150-7.
11. Yamamoto K, Horikita M, Tsuda F, et al. Naturally occurring escape mutants of hepatitis B virus with various mutations in the S gene in carriers seropositive for antibody to hepatitis B surface antigen. *J Virol* 1996; 68: 2671-6.
12. Carman W. The clinical significance of surface antigen variants of hepatitis B virus. *J Viral Hepatitis* 1997; 4 (Suppl 1): 11-20.
13. Ackerman Z, Wands JR, Gazitt Y, Brechot C, Kew MC, Shouval D. Enhancement of HBsAg detection in serum of patients with chronic liver disease following removal of circulating immune complexes. *J Hepatol* 1994; 20: 398-404.
14. Shih CM, Lo SJ, Miyamura T, Chen SY, Lee YH. Suppression of hepatitis B virus expression and replication by hepatitis C virus core protein in HuH-7 cells. *J Virol* 1993; 67: 5823-32.
15. Cacciola I, Pollicino T, Squadrito G, Cerenzia G, Orlando ME, Raimondo G. Occult hepatitis B virus infection in patients with chronic hepatitis C liver disease, *N Engl J Med* 1999; 341: 22-6.
16. Brechot C, Thiers V, Kremsdorf D, Nalpas B, Pol S, Paterlini-Brechot P. Persistent hepatitis B virus infection in subjects without hepatitis B surface antigen: clinically significant or purely "occult"? *Hepatology* 2001; 34: 194-203.
17. Kao JH, Chen PJ, Lai MY, Chen DS. Occult hepatitis B virus infection and clinical outcomes of patients with chronic hepatitis C. *J Clin Microbiol* 2002; 1: 4068-71.
18. Silva C, Goncales NS, Pereira JS, Escanhoela CA, Pavan MH, Goncales FL Jr. The influence of occult infection with hepatitis B virus on liver histology and response to interferon treatment in chronic hepatitis C patients. *Braz J Infect Dis* 2004; 8: 431-9.
19. Bayram A, Balcı İ. Seropozitif ve seronegatif kişilerde hepatit B virus DNA'sının PCR ile araştırılması. *Viral Hepatit Derg* 2000; 3: 206-8.
20. Us T, Akgün Y, Kanan B. HBV-DNA PCR sonuçlarının, HBV serolojik göstergeleriyle karşılaştırılması. *Viral Hepatit Derg* 2000; 3: 175-8.
21. Erensoy S, Özacar T, Zeytinoğlu A, Anda B, Bilgiç A. Serumda HBV-DNA'sının, hepatit B seroloji göstergeleriyle karşılaştırılması. *İnfeksi Derg* 1995; 9: 157-60.
22. Fang ZL, Zhuang H, Wang XY, Ge XM, J Harrison TJ. Hepatitis B virus genotypes, phylogeny and occult infection in a region with a high incidence of hepatocellular carcinoma in China. *World J Gastroenterol* 2004; 15: 3264-8.
23. Mendy ME, Kaye S, van der Sande M, et al. Application of real-time PCR to quantify hepatitis B virus DNA in chronic carriers in The Gambia. *Virol J* 2006; 3: 23.