

# HIV Pozitif Olgularda Okült Hepatit B Varlığının Araştırılması

## Investigation of Occult Hepatitis B in HIV Infected Patients

Akif ALTINBAŞ<sup>1</sup>, Koray ERGÜNAY<sup>2</sup>, Nursel ÇALIK BAŞARAN<sup>3</sup>, Alpaslan ALP<sup>2</sup>, Didem TURGUT<sup>1</sup>, Gülşen HAŞÇELİK<sup>2</sup>, Ömrüm UZUN<sup>3</sup>, Serhat ÜNAL<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Ankara.

<sup>1</sup> Hacettepe University Faculty of Medicine, Department of Internal Medicine, Ankara, Turkey.

<sup>2</sup> Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

<sup>2</sup> Hacettepe University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Ankara, Turkey.

<sup>3</sup> Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Enfeksiyon Hastalıkları Ünitesi, Ankara.

<sup>3</sup> Hacettepe University Faculty of Medicine, Department of Internal Medicine, Infectious Diseases Unit, Ankara, Turkey.

Geliş Tarihi (Received): 23.12.2010 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 03.02.2011

### ÖZET

Ortak bulaş yolları nedeniyle, insan immünyetmezlik virusu (Human Immunodeficiency Virus; HIV) ile enfekte kişilerde, hepatit B virusu (HBV) veya hepatit C virusu (HCV) koenfeksiyonları izlenebilmekte ve çeşitli ek sorunlara neden olabilmektedir. Okült HBV enfeksiyonu, HBV yüzey antijeni (HBsAg) negatif olgularda viral DNA'nın saptanması olarak tanımlanmaktadır. Seroepidemiyolojik verilere göre Türkiye, orta endemik HBV, düşük endemik HIV bölgesi olarak nitelendirilmektedir. Ülkemizde okült HBV olguları rapor edilmiş olmasına karşın, HIV pozitif popülasyonlarda prevalans incelenmemiştir. Bu çalışmada, hastanemizde izlenen HIV ile enfekte olgularda okült HBV varlığının araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmaya, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı Enfeksiyon Hastalıkları Ünitesinde takip edilen 28 HIV pozitif olgu, bilgilendirilmiş onam alınarak dahil edilmiştir. Olgularda HBsAg, anti-HBs ve anti-HCV belirleyicileri ticari ELISA sistemi (Architect System, Abbott Diagnostics, ABD) ile araştırılmış, mutlak CD4+ ve CD8+ T lenfosit sayıları akım sitometrisi ile saptanmıştır. HIV viral yükünün belirlenmesi için COBAS TaqMan HIV-1 Real-time PCR (Roche Diagnostics, ABD) sistemi kullanılmış; HBV DNA'sının tespiti ise COBAS TaqMan HBV Real-time PCR (Roche Diagnostics, ABD) ve viral genomda S genini hedefleyen bir "nested" PCR yöntemiyle gerçekleştirilmiştir. Çalışmaya alınan 28 olgunun yaş aralığı 27-65 (ortalama: 43.2) yıl olup, 18 (%64.3)'i erkektir. Hastalarda HIV enfeksiyonunun ortalama süresi 4.2 (2-11) yıl olarak izlenmiş; ortalama CD4+ ve CD8+ T lenfosit sayıları ise sırasıyla  $414 \pm 267$  hücre/mm<sup>3</sup> ve  $854 \pm 293$  hücre/mm<sup>3</sup> olarak belirlenmiştir. Hastaların 26 (%92.8)'si-

**İletişim (Correspondence):** Yrd. Doç. Dr. Koray Ergünay, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Morfoloji Binası 3. Kat 06100 Sıhhiye, Ankara, Türkiye. **Tel (Phone):** +90 312 305 1495, **E-posta (E-mail):** ekoray@hacettepe.edu.tr

na farklı HAART (Highly-Active Anti-Retroviral Therapy) protokolleri uygulanmakta olup, tedavi rejimlerinin %88.5'inin HBV'ye etkili ilaçlar olan lamivudin ya da tenofovir içerdiği saptanmıştır. Hastaların 11 (11/28; %39.3)'inde HIV RNA negatif bulunmuş ve bunların 9 (%81.8)'unun HBV'ye karşı aktif antiretroviral tedavi alan hastalar olduğu izlenmiştir. Tüm olgularda HBsAg negatif olup; anti-HBs pozitifliği %39.3 (11/28), anti-HCV pozitifliği ise %3.6 (1/28) oranında belirlenmiştir. Çalışmamızda incelenen 28 olgunun tamamı, "real-time" PCR ve "nested" PCR yöntemleri ile HBV DNA açısından negatif bulunmuş ve buna göre HIV pozitif olgularda okült hepatit B varlığı saptanmamıştır. Bu sonuç, olgu grubumuzda okült HBV enfeksiyonunun olmamasının yanı sıra uygulanan tedavi rejiminin HBV replikasyonunu baskılayarak okült HBV'nin saptanmasını engellemesine de bağlı olabilir. Dolayısıyla ülkemizde HIV ile enfekte olgularda okült HBV enfeksiyonlarının varlığı ve öneminin ortaya çıkarılabilemesi için geniş kapsamlı ek çalışmalara ihtiyaç vardır.

**Anahtar sözcükler:** Okült hepatit; insan immünyetmezlik virusu; HIV; hepatit B virusu; HBV; HBV-DNA; PCR.

## ABSTRACT

Due to their shared transmission route, hepatitis B virus (HBV) or hepatitis C virus (HCV) co-infections can be observed in human immunodeficiency virus (HIV)-infected cases and are associated with more severe clinical courses. The detection of HBV DNA despite HBV surface antigen (HBsAg) seronegativity is defined as occult HBV infections. According to the current seroepidemiological data, Turkey is classified as an intermediate HBV, low HIV endemic region. Occult HBV infections have previously been reported from Turkey but has not been investigated previously in HIV infected cohorts. The aim of this study was to identify occult HBV infections in HIV-infected persons. Twenty-eight HIV-positive cases followed-up at Hacettepe University Hospital, Infectious Diseases Unit were included in the study after informed consent. For the detection of HBsAg, anti-HBs and anti-HCV, commercial ELISA tests (Architect System, Abbott Diagnostics, USA) were employed. Absolute CD4+ and CD8+ T-cell counts were determined via flow cytometry. HIV viral load was calculated via COBAS TaqMan HIV-1 Real-time PCR (Roche Diagnostics, USA) and the presence of HBV DNA was evaluated via COBAS TaqMan HBV Real-time PCR (Roche Diagnostics, USA), in addition to a nested PCR assay targeting HBV S gene. The mean age of the study group was 43.2 (range between 27-65) years, 64.3% (18/28) of them were males and the mean duration of HIV infection was 4.2 (2-11) years. Mean CD4+ ve CD8+ T-cell counts were  $414 \pm 267$  cells/mm<sup>3</sup> and  $854 \pm 293$  cells/mm<sup>3</sup>, respectively. Twenty-six (92.8%) cases were under highly-active anti-retroviral therapy at the time of the study, 88.5% of which included HBV-active drugs (lamivudine or tenofovir). HIV RNA were found negative in 11 (39.3%) patients, of those nine (81.8%) were the cases who treated with HBV-active antiretroviral therapy. HBsAg were negative in all of the 28 patients, while the positivity rates of anti-HBs and anti-HCV were 39.3% (11/28) and 3.6% (1/28), respectively. All samples were negative for HBV DNA via the commercial real-time PCR and in-house nested PCR assays. The absence of occult HBV in the study group may indicate the absence of occult HBV or suppression of viral replication due to the anti-retroviral therapy. In conclusion, further large-scale studies are required to fully understand the impact of occult HBV in HIV-infected patients in Turkey.

**Key words:** Occult hepatitis; human immunodeficiency virus; HIV; hepatitis B virus; HBV; HBV-DNA; PCR.

## GİRİŞ

Hepatit B virusu (HBV)'nin neden olduğu kronik enfeksiyonlar ve insan immünyetmezlik virusu (Human Immunodeficiency Virus; HIV) enfeksiyonları dünya genelinde

önemli bir halk sağlığı sorunudur. Bulaş yollarının ortak olması nedeniyle HBV ve HIV ko-enfeksiyonu nadir değildir ve çeşitli gruplarda %7.6-70 oranlarında bildirilmektedir<sup>1</sup>. HBV ile enfekte HIV pozitif kişilerde, HIV viral yükü yüksek iken HBV replikasyonunun kontrolü zorlaşmakta, başarılı bir tedavi sonrasında ise HIV replikasyonunun baskılanması, kişideki immün yanıtı yeniden etkinleştirerek altta yatan karaciğer hastalığını olumsuz yönde etkilemektedir. Yüksek düzeyde aktif antiretroviral tedavi (Highly-Active Antiretroviral Therapy; HAART) sonrasında HIV pozitif hastaların sağlıklıları belirgin oranda artmakta, buna bağlı olarak da kişilerde altta yatan kronik hepatit gibi uzun dönemli sağlık sorunları dikkat çekmeye başlamaktadır<sup>2,3</sup>.

Okült (gizli) HBV enfeksiyonu, genel olarak hepatit B yüzey antijeni (HBsAg) negatif olgularda, serumda veya karaciğer dokusunda HBV DNA'sının pozitifliği olarak tanımlanmaktadır<sup>4</sup>. Okült HBV enfeksiyonunun kronik karaciğer hasarı oluşturmadaki etkisi net değildir; bununla beraber, özellikle kemoterapi veya steroid tedavisi alan hastalarda immün sistemin baskılanmasına bağlı olarak okült HBV sorun oluşturabilmektedir<sup>4,5</sup>. Bu çalışmada, hastanemizde takip ve tedavi edilen HIV ile enfekte olgularda okült HBV varlığının araştırılması amaçlanmıştır.

## GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmaya, Ekim 2006-Mayıs 2007 tarihleri arasında Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi (HÜTF), İç Hastalıkları Anabilim Dalı Enfeksiyon Hastalıkları Ünitesine başvurarak izleme alınan ve önceki laboratuvar testlerinde HIV pozitif olduğu tespit edilen 28 hasta alındı. Çalışma protokolü için HÜTF Etik Kurulundan alınan onay sonrası, hastalar yazılı bilgilendirilmiş onam formu doldurarak çalışmaya dahil edildi. Hastaların demografik bilgileri, klinik takip ve laboratuvar sonuçları elektronik arşiv ve dosyalardan elde edildi. Ancak olguların hepatit B aşılama durumları konusunda herhangi bir bilgiye ulaşılamadı.

Çalışmaya dahil edilen hastalarda HBsAg, anti-HBs ve anti-HCV antikollarının saptanması amacıyla ticari ELISA testleri (Architect System, Abbott Diagnostics, ABD), üreticinin önerileri doğrultusunda uygulandı. Olgularda mutlak CD4+ ve CD8+ T lenfosit sayıları, akım sitometrisi ile saptanarak hücre/mm<sup>3</sup> şeklinde rapor edildi. HIV ve HBV viral yükünün tespiti için, gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) sistemleri (COBAS AmpliPrep, COBAS TaqMan HIV-1 Real-time PCR, COBAS TaqMan HBV Real-time PCR; Roche Diagnostics, ABD) üretici firmanın önerileri doğrultusunda kullanıldı. Sistemin HBV DNA için saptama alt eşiği 20 IU/ml idi.

Okült HBV varlığının araştırılması için, viral genomda S genini hedefleyen bir "nested" PCR yöntemi uygulandı<sup>6</sup>. Buna göre dış primer seti olarak TCGTGTTACAGGCGGGGTTT ve CGAACCACTGAACAAATGGC dizilerine sahip sentetik oligonükleotidler (5'-3', sens ve antisens) ve iç primer seti olarak ise CAAGGTATGTTGCCCGTTTG ve GGCCTAGTA-ACTGAGCCA dizilerine sahip sentetik oligonükleotidler (5'-3', sens ve anti-sens) kullanıldı. Nükleik asit ekstraksiyonunda üretici firmanın önerileri doğrultusunda "High Pure Viral Nucleic Acid Kit" (Roche Diagnostics, Almanya) spin kolonlu sistemi uygulandı. Düşük HBV viral yüküne (500-700 IU/ml) sahip iki hasta örneği ile HBV DNA negatif bir has-

ta örneği, pozitif ve negatif kontrol olarak saflaştırma ve amplifikasyon işlemlerine alındı. Tüm hasta örnekleri ikişer kez test edildi.

## BULGULAR

Çalışmaya dahil edilen 28 olgunun yaş aralığı 27-65 (ortalama: 43.2) yıl olup, 18 (%64.3)'i erkektir. Hastalarda HIV enfeksiyonunun ortalama süresi 4.2 (2-11) yıl olarak izlenmiştir. Hastaların 26 (%92.8)'sına farklı HAART protokollerinin uygulandığı belirlenmiş ve tedavi rejimlerinin %88.5'inin HBV'ye etkili (HBV-aktif) ilaçlar olan lamivudin ya da tenofoviri içerdiği saptanmıştır.

Hastaların %39.3 (11/28)'ünde HIV RNA negatif olarak bulunmuş; bu hastaların 9 (%81.8)'unun HBV aktif antiretroviral tedavi aldığı gözlenmiştir. Hastaların ortalama CD4+ ve CD8+ T lenfosit sayıları sırasıyla  $414 \pm 267$  hücre/mm<sup>3</sup> ve  $854 \pm 293$  hücre/mm<sup>3</sup>tür. Tüm olgularda HBsAg negatif olup; anti-HBs pozitifliği %39.3 (11/28), anti-HCV pozitifliği ise %3.6 (1/28) oranında belirlenmiştir. Çalışmamızda incelenen 28 olgunun tamamı, kantitatif ticari "real-time" PCR ve "nested" PCR yöntemleri ile HBV DNA açısından negatif olarak saptanmıştır.

## TARTIŞMA

Epidemiyolojik çalışmalardan elde edilen veriler, Türkiye'deki HBsAg seroprevalansının ülkenin farklı bölgelerinde değişiklik göstermekle beraber %2-8 oranında olduğuna işaret etmektedir<sup>7</sup>. Ülkemizde HIV tanısı almış kayıtlı kişilerin sayısı, Haziran 2010 tarihi itibarıyla 4177 olarak verilmektedir<sup>8</sup>. Buna göre Türkiye, HBV enfeksiyonları yönünden orta, HIV enfeksiyonları yönünden düşük endemik bölgede yer almaktadır. Bu çalışmada, hastanemizde takip edilen HIV pozitif hastalarda okült HBV enfeksiyonu varlığının araştırılması amaçlanmış ve incelenen 28 olgunun hiçbirisinde okült HBV enfeksiyonu tespit edilememiştir. Bu durumun olası nedenleri aşağıda tartışılmaktadır.

Okült HBV enfeksiyonlarında, hepatit belirteçlerine ait sonuçların değişiklik göstermesi nedeniyle HBV DNA'sının saptanması, tüm olguları kapsayacak tek tanı yöntemidir. Bununla birlikte anti-HBc antikorlarının pozitifliği, olguların bir kısmında tanıda yardımcı olabilmekte, bazı durumlarda enfeksiyon varlığına ait tek serolojik belirteç olarak ortaya çıkmaktadır ("anti-HBc only" sendromu)<sup>4,9</sup>. Nükleik asit testleri (NAT) ile HBV DNA'sının kalitatif ya da kantitatif olarak saptanması mümkündür; ancak okült HBV'de genom kopya sayılarının düşük olması nedeniyle "nested" PCR tercih edilen saptama yöntemi olmaktadır. Bu amaçla uygulanan protokollerinin çoğunda X ya da S geni dizilerinden elde edilen primerler kullanılmakta, ancak viral genomun diğer bölgeleri de hedef olarak seçilebilmektedir<sup>4,9</sup>. Çalışmamızda sık kullanılan duyarlı ticari bir "real-time" PCR sistemine ek olarak, S genini hedefleyen ve etkinliği önceden gösterilmiş olan bir "nested" PCR protokolü uygulanmıştır<sup>6</sup>. Bu nedenle izlenen sonuçlarda yalnızca negatiflik olasılığının çok düşük olduğu düşünülmüştür. Ancak olgulardan elde edilen serum miktarlarının kısıtlı olması nedeniyle, HBsAg ve anti-HBs'ye ek olarak anti-HBc ya da anti-HBe antikorlarının da eş zamanlı olarak değerlendirilememiş olması, çalışmamızın bir sınırlamasıdır.

Çalışmada incelenen hastaların %92.8 (26/28)'i aktif HAART tedavisi alan hastalardır. Ek olarak bu rejimlerin %88.5'i, HBV'ye karşı da aktivite gösteren ilaçlar olan lamivudin ya da tenofoviri içermektedir. Bu durum, uygulanan tedavinin, olgulardaki HBV replikasyonunu baskılayarak okült HBV'nin saptanmasını engelleyebileceğini düşündürmektedir. Literatürde bu konu ile ilgili yayınlar olmasına karşın, tedavi protokolü ve okült HBV'nin ilişkilendirilemediği çalışmalar da bulunmaktadır<sup>10-13</sup>.

Çalışmada incelenen olgularda anti-HBs seropozitifliği %39.3 (11/28) olarak saptanmış, bu oranın ülkemizdeki sağlıklı popülasyonda izlenen anti-HBs seroprevalansından farklı olmadığı görülmüştür<sup>7</sup>. Olgulardan aşılama öyküsü elde edilememiş olması; anti-HBs pozitifliğinin aşı ya da virusa maruziyet sonucu ortaya çıktığı konusundaki yorumları engellemektedir. Anti-HBs reaktivitesi ile okült HBV sıklığı arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır<sup>6,14</sup>. Ancak anti-HBc pozitifliğinin okült HBV ile ilişkisi nedeniyle, HIV ile enfekte hastalarda rutin olarak anti-HBc varlığının araştırılması önerilmektedir<sup>15</sup>.

Ülkemizde okült hepatit B varlığı ve sıklığı, özellikle hemodiyaliz uygulanan olgular önde olmak üzere çeşitli hasta gruplarında incelenmiştir<sup>16-24</sup>. Bizim çalışma grubumuz, ülkemizde okült hepatit B'nin araştırıldığı HIV pozitif ilk grup olma özelliğini taşımaktadır. Ancak, duyarlı saptama yöntemleri kullanılmasına rağmen, muhtemelen yukarıda tartışılan çeşitli faktörlerle ilişkili olarak çalışma grubunda okült HBV gösterilememiştir. Okült hepatit B enfeksiyonlarının HIV pozitif hastalardaki sıklığı ve hastalığın seyrine etkisi konusunda ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

## KAYNAKLAR

1. Santos EA, Yoshida CF, Rolla VC, et al. Frequent occult hepatitis B virus infection in patients infected with human immunodeficiency virus type 1. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2003; 22(2): 92-8.
2. Thio CL, Netski DM, Myung J, Seaberg EC, Thomas DL. Changes in hepatitis B virus DNA levels with acute HIV infection. *Clin Infect Dis* 2004; 38(7): 1024-9.
3. Shire NJ, Rouster SD, Stanford SD, et al. The prevalence and significance of occult hepatitis B virus in a prospective cohort of HIV-infected patients. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2007; 44(3): 309-14.
4. Allain JP. Occult hepatitis B virus infection. *Transfus Clin Biol* 2004; 11(1): 18-25.
5. Schnepf N, Sellier P, Bendenoun M, Zini JM, Sanson-le Pors MJ, Mazon MC. Reactivation of lamivudine-resistant occult hepatitis B in an HIV-infected patient undergoing cytotoxic chemotherapy. *J Clin Virol* 2007; 39(1): 48-50.
6. Kim SM, Lee KS, Park CJ, et al. Prevalence of occult HBV infection among subjects with normal serum ALT levels in Korea. *J Infect* 2007; 54(2): 185-91.
7. Değertekin H, Güneş G. Horizontal transmission of hepatitis B virus in Turkey. *Public Health* 2008; 122(12): 1315-7.
8. [http://www.hatam.hacettepe.edu.tr/aids\\_2010\\_smp\\_foto/11.pdf](http://www.hatam.hacettepe.edu.tr/aids_2010_smp_foto/11.pdf)
9. Torbenson M, Thomas DL. Occult hepatitis B. *Lancet Infect Dis* 2002; 2(8): 479-86.
10. Lo Re V 3<sup>rd</sup>, Frank I, Gross R, et al. Prevalence, risk factors, and outcomes for occult hepatitis B virus infection among HIV-infected patients. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2007; 44(3): 315-20.
11. Jaureguiberry JP, Chene G, Leport C, et al. Occult hepatitis B in HIV-HCV coinfecting patients. *Scand J Infect Dis* 2008; 40(10): 835-9.
12. Jardim RN, Gonçalves NS, Pereira JS, Fais VC, Gonçalves Junior FL. Occult hepatitis B virus infection in immunocompromised patients. *Braz J Infect Dis* 2008; 12(4): 300-5.

13. Araujo NM, Branco-Vieira M, Silva AC, et al. Occult hepatitis B virus infection in HIV-infected patients: evaluation of biochemical, virological and molecular parameters. *Hepatol Res* 2008; 38(12): 1194-203.
14. Mphahlele MJ, Lukhwani A, Burnett RJ, Moropeng LM, Ngobeni JM. High risk of occult hepatitis B virus infection in HIV-positive patients from South Africa. *J Clin Virol* 2006; 35(1): 14-20.
15. Bloquel B, Jeulin H, Burty C, Letranchant L, Rabaud C, Venard V. Occult hepatitis B infection in patients infected with HIV: report of two cases of hepatitis B reactivation and prevalence in a hospital cohort. *J Med Virol* 2010; 82(2): 206-12.
16. Sav T, Gürsoy Ş, Torun E, et al. Occult HBV infection in continuous ambulatory peritoneal dialysis and hemodialysis patients. *Ren Fail* 2010; 32(1): 74-7.
17. Yakaryılmaz F, Gürbüz OA, Güliter S, et al. Prevalence of occult hepatitis B and hepatitis C virus infections in Turkish hemodialysis patients. *Ren Fail* 2006; 28(8): 729-35.
18. Demir M, Serina E, Göktürk S, Akçae Öztürk N, Kulaksızoğlu S, Yılmaz U. The prevalence of occult hepatitis B virus infection in type 2 diabetes mellitus patients. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2008; 20(7): 668-73.
19. Cenedi O, Ozkurt ZN, Acar K, et al. Occult HBV infection in continuous ambulatory peritoneal dialysis and hemodialysis patients. *World J Gastroenterol* 2010; 16(14): 1765-71.
20. Pinarbasi B, Onel D, Cosan F, et al. Prevalence and virological features of occult hepatitis B virus infection in female sex workers who work uncontrolled in Turkey. *Liver Int* 2009; 29(2): 227-30.
21. Kanbay M, Gur G, Akcay A, et al. Is hepatitis C virus positivity a contributing factor to occult hepatitis B virus infection in hemodialysis patients? *Dig Dis Sci* 2006; 51(11): 1962-6.
22. Goral V, Ozkul H, Tekes S, Sit D, Kadiroglu AK. Prevalence of occult HBV infection in haemodialysis patients with chronic HCV. *World J Gastroenterol* 2006; 12(21): 3420-4.
23. Besisik F, Karaca C, Akyüz F, et al. Occult HBV infection and YMDD variants in hemodialysis patients with chronic HCV infection. *J Hepatol* 2003; 38(4): 506-10.
24. Cenedi O, Ozkurt ZN, Acar K, et al. Hepatitis B-related events in autologous hematopoietic stem cell transplantation recipients. *World J Gastroenterol* 2010; 16(14): 1765-71.