

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HEPATİT B VİRUS GENOTİPLERİNİN S
GENİNİN NÜKLEOTİD DİZİ ANALİZİ VE RFLP
YÖNTEMLERİ İLE BELİRLENMESİ

118451

NEVCİVAN ŞENTÜRKER GÜLDAŞ

Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Doktora

118451

DANIŞMAN ÖĞRETİM ÜYESİ
Prof.Dr.Y.HAKAN ABACIOĞLU

İZMİR
2002

“ Hepatit B virus genotiplerinin S geninin nükleotid dizi analizi ve RFLP yöntemleri ile belirlenmesi ” isimli bu tez 19. 06. 2002 tarihinde tarafımızdan değerlendirilerek başarılı bulunmuştur.

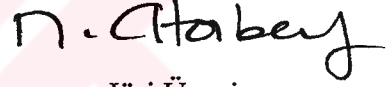

Jüri Başkanı

Prof. Dr. Y. Hakan ABACIOĞLU



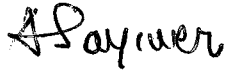
Jüri Üyesi

Prof. Dr. Hakkı BAHAR



Jüri Üyesi

Prof. Dr. Neşe ATABEY



Jüri Üyesi

Doç. Dr. Arzu SAYINER



Jüri Üyesi

Doç. Dr. Selda ERENŞOY

TEŐEKKÖR

Doktora eğitimim sırasındaki değerli yol gōstericilięi ve bu çalışmadaki katkılarından dolayı danışman hocam sayın Prof. Dr. Y. Hakan ABACIOğLU'na, yetişmemde emeiği bulunan tōm hocalarıma, laboratuvar çalışmalarımda yardımını esirgemeyen sayın Sefa KIZILDAğ'a, çalışma arkadaşlarıma ve bana her zaman destek olan aileme teőekkōr ederim.

İÇİNDEKİLER

1. ÖZET.....	1
2. SUMMARY.....	2
3. GİRİŞ ve AMAÇ	3
4. GENEL BİLGİLER.....	5
4.1. HBV: Sınıflandırma ve genel özellikler.....	5
4.2. Genom yapısı.....	6
4.3. Replikasyon.....	8
4.4. Viral proteinler	10
4.4.1. Kılıf (yüzey) proteinler.....	10
4.4.2. Kor proteinleri.....	10
4.4.3. P proteini.....	11
4.4.4. X proteini.....	11
4.5. Subtip ve genotipler.....	11
4.6. HBV mutantları.....	16
4.6.1. Yüzey gen mutantları.....	16
4.6.2. Prekor/kor mutantları.....	17
4.6.3. Polimeraz gen mutantları.....	19
4.6.4. X gen mutantları.....	20
4.7. Epidemiyoloji.....	20
4.7.1. Bulaşma yolları	22
4.7.2. Risk grupları	24
4.8. Patogenez.....	25
4.9. Klinik bulgular	26
4.10. Tanı.....	29
4.10.1. Özgül tanı.....	29
4.11. Sağaltım.....	31
4.12. Korunma.....	34
4.12.1. Özgül Olmayan Korunma.....	34
4.12.2. Özgül Korunma	34
4.13. Filogenetik analiz.....	38
5. GEREÇ ve YÖNTEM.....	45

5.1. GEREÇ.....	45
5.1.1. Çalışma Grubu.....	45
5.1.2. Ayraçlar.....	45
5.2. Yöntemler.....	49
5.2.1. HBV-DNA'nın PZT ile gösterilmesi	49
5.2.2. HBV Genotiplendirmesi.....	51
6. BULGULAR	56
6.1. PZT	56
6.2. Nükleotid dizi analizi bulguları.....	56
6.3. RFLP Bulguları	65
7. TARTIŞMA	70
8. KAYNAKLAR.....	75



TABLO DİZİNİ

Tablo 1: HBsAg determinantlarını özgülleştiren aminoasit pozisyonları.....	13
Tablo 2: Dünya üzerinde HBV genotipleri ve HBsAg subtiplerinin dağılımı	14
Tablo 3: Ülkemizde çeşitli gruplarda HBsAg seroprevelansı.....	22
Tablo 4: Kronik hepatit B'de IFN sağaltımına yanıtı etkileyen faktörler	33
Tablo 5: Çalışmada elde edilen nükleotid dizileri arasındaki evrimsel uzaklık.....	62
Tablo 6: Mva I kesim noktaları.....	66
Tablo 7: Rsa I kesim noktaları	66
Tablo 8: Hinf I kesim noktaları	67
Tablo 9: Genotiplere özgü bileşik kalıplar	67
Tablo 10: Gen-Bank'ten elde edilen DNA dizilerinin Gen-Bank No ve RFLP kalıpları.....	69

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 1: HBV partüküllerinin şematik yapısı	6
Şekil 2: HBV genom yapısı.....	7
Şekil 3: HBV replikasyonunun şematik gösterimi.....	9
Şekil 4: “a” determinantının şematik gösterimi.....	12
Şekil 5: Filogenetik ağaç	38
Şekil 6: Dilüsyonlu çalışılan serum örneğine ait PZT bant görünüşleri	56
Şekil 7: Çalışmada elde edilen nükleotid dizileri ile Gen-Bank’ten sağlanan nükleotid dizilerinin alt alta hizalanmış şekli.....	57
Şekil 8: 420 nükleotid içeren dizilerle oluşturulan filogenetik ağaç.....	61
Şekil 9: 541 nükleotid içeren dizilerle oluşturulan filogenetik ağaç.....	61
Şekil 10: HBV-DNA S gen nükleotid dizilerinin filogenetik analizi.....	63
Şekil 11: HBV-DNA S gen aminoasit dizileri	64
Şekil 12: Elde edilen RFLP kalıplarına iki örnek.....	68

KISALTMALAR

HBV : Hepatit B Virus

PZT : Polimeraz zincir tepkimesi

RFLP : Restriction fragment length polymorphism

ORF : Open reading frame

ALT : Alanin aminotransferaz

AST : Aspartat aminotransferaz

IFN : İnterferon

HBIG : Hepatit B immunglobulin

nt : Nükleotid

1. ÖZET

Hepatit B virus genotiplerinin S geninin nükleotid dizi analizi ve RFLP yöntemleri ile belirlenmesi

Anahtar Sözcükler : HBV, Genotip, PZT, RFLP

Hepatit B virus (HBV) infeksiyonları ülkemiz açısından önemli bir sağlık sorunu olmasına karşın , genotip dağılımına ilişkin yeterli veri yoktur. Bu tez çalışmasında , laboratuvarımızda HBV-DNA olumlu bulunan 23 örnekte DNA dizi analizi ve RFLP yöntemleri ile genotiplendirme yapılmıştır.

Bu amaçla serum örneklerinden proteinaz - K / fenol- kloroform yöntemi ile ekstrakte edilen HBV-DNA dizileri “ S ” genine özgü öncüller kullanılarak PZT yöntemi ile çoğaltıldı. Toplam 541 nükleotidlik bir bölgenin (256-796) çoğaltıldığı bu tepkimenin analitik duyarlılığı 19 kopya /mL olarak belirlendi. Etanol çöktürme yöntemi ile saflaştırılan PZT ürünleri “Sequitherm Excel II DNA Sequencing” kiti ve LI-COR dizileme aygıtı kullanılarak dizilendi. Bu yolla 356 ile 775. pozisyonlar arasında kalan 420 bazlık diziler elde edildi. Bu diziler, Gen-Bank’ten elde edilen ve genotipleri belli diziler ile evrimsel uzaklıkları açısından karşılaştırılarak , “Neighbour-Joining” yöntemi ile filogenetik ağaç oluşturuldu. Bu analiz sonucu, incelenen 23 örneğin tamamının genotip D içinde kümelendiği görüldü. Bilgisayar yardımı ile diziler aminoasit koduna çevrilerek HBsAg subtipleri belirlendi. Yirmibir örnekte ayw2, iki örnekte ise ayw3’e uyan diziler saptandı.

Diğer yandan, dizileme yaklaşımlarının zaman alıcı ve pahalı olması gözönüne alınarak epidemiyolojik çalışmalara uygun, hızlı ve kolay uygulanabilir bir RFLP yöntemi geliştirildi. Bu amaçla Gen-Bank’ten elde edilen ve genotipleri belli 68 HBV-DNA dizisinde 256-796. pozisyonlar arasındaki bölgenin restriksiyon haritalaması yapıldı. Elde edilen veriler ışığında Mva I, Rsa I ve Hinf I enzimlerinin tek ve birarada kullanılması ile oluşan restriksiyon kalıpları belirlendi. Çalışmaya alınan 23 serum örneğinin tamamında genotip D’ye özgün kalıplar saptandı.

2.SUMMARY

Analysis of S gene nucleotide sequence of hepatitis B virus genotypes and determining them with RFLP methods

Key Words : HBV, genotype, PCR, RFLP

Although hepatitis B virus (HBV) infections are a major health problem in Turkey, there is a little information on the genotype distribution of the virus. In this study, DNA sequencing and RFLP methods were used to genotype 23 HBV-DNA positive samples originating from Turkey.

HBV-DNA was extracted by proteinase k / phenol-chloroform method and 541 nucleotide fragment between positions 256 and 796 was amplified using 'S' gene specific primers by single-step PCR. The analytical sensitivity of the procedure was 19 copy/mL. PCR products purified by ethanol precipitation were then used in sequencing reactions utilizing "Sequitheerm Excel II DNA Sequencing" kit and a LI-COR sequencing apparatus. A 420 bp fragment of the S gene between nucleotide positions 356 and 775 was sequenced and aligned with a data set of 19 HBV S gene sequences available from Gen-Bank. Phylogenetic trees were reconstructed using a neighbour-joining method. All samples were clustered with genotype D sequences.

A RFLP based genotyping assay using Mva I, Rsa I and Hinf I enzymes were developed as an easier and less expensive alternative to sequencing. The results of the RFLP analysis of the samples were consistent with the phylogenetic analysis.

3. GİRİŞ ve AMAÇ

Akut ve kronik karaciğer hastalığına neden olan hepatit B virus (HBV) önemli bir sağlık sorunudur. Bugün tüm dünyada üçyüz milyondan fazla kişinin HBV taşıyıcısı olduğu (1) ve her yıl 500,000 ile 1,000,000 kişinin HBV ile ilişkili karaciğer hastalığından öldüğü tahmin edilmektedir (2).

HBV'unun bulaşma yolları ve virolojik özellikleri gibi konularda yeterli bilgi olmasına karşın sağaltıma yanıtı belirleyen, kronikleşme ve hepatosellüler karsinom gelişiminde rol oynayan viral ve konağa ait faktörlerin neler olduğu, niçin bazı ülkelerde dikey geçişin daha sık görüldüğü gibi birçok önemli soru yanıt beklemektedir.

Geçtiğimiz yıllarda HBV kökenlerinin nükleotid dizilerindeki farklılıklara göre genotiplere ayrıldığı saptanmış ve birbirine benzerlik oranı % 92 ve daha fazla olan HBV suşları aynı grupta toplanarak 6 farklı genotip (A-F) belirlenmiştir (3-6). Çok yakın zamanda Stuyver ve arkadaşları yeni bir genotip olarak genotip G'yi tanımlamışlardır (7).

Bilinen dokuz HBsAg subtipi (ayw1, ayw2, ayw3, ayw4, ayr, adw2, adw4, adrq⁺ ve adrq⁻) bu genotiplerden biri veya birkaçı ile ilişkilidir. HBV genotipleri ile virus suşlarının coğrafik kökeni arasında HBsAg subtiplerine göre daha iyi bir korelasyon olduğu düşünülmektedir. Genotip A Kuzeybatı Avrupa ve Sahra altı Afrika'da, genotip B ve C Uzak Doğu'da bulunmaktadır. Genotip D tüm dünyada yaygın olarak görülmekle birlikte Akdeniz bölgesi ve Yakın Doğu'da baskındır. Genotip E Batı Afrika'da, genotip F ise Amerika'da gözlenmektedir (8).

HBV genotipleri ile bulaş yolu, onkojenite, aşılama ile oluşan bağışık yanıtı duyarlılık ve sağaltıma yanıt gibi özellikler arasında da ilişki olduğu belirtilmektedir (9). HBV genotip B ve C'nin baskın olduğu Doğu Asya ülkelerinde dikey geçiş, genotip A ve D'nin hakim olduğu Afrika ve Akdeniz ülkelerinde yatay geçiş ilk sırada yer alan bulaş yollarıdır (10).

HBV genotip C ile infekte bireylerde şiddetli karaciğer hasarının gözlendiği (11, 12), genotip A ile olan infeksiyonlarda interferon sağaltımına yanıtın daha iyi olduğu belirtilmiştir (13). Aşıya yanıtı olmayan vakalarda genotip E (6), birden çok genotiple olan infeksiyonlarda genotip F gözlenmiştir (8).

Ayrıca HBV genotipleri ile mutant suşlar arasındaki ilişki dikkat çekici olup

prekor mutantları genotip A' da nadir, genotip B,C ve D'de yaygın olarak gözlenmektedir (13-15).

HBV kökenlerinin genotiplendirilmesi infeksiyonun epidemiyolojik ve klinik özelliklerine açıklama getirebilir. HBV infeksiyonlarının ülkemiz açısından da önemi gözönüne alındığında Türkiye'deki HBV genotiplerinin dağılımına ilişkin araştırmalara gerek olduğunu düşündürmektedir. Ülkemizde bu konu ile ilişkili veriler son derece sınırlıdır. Biz bu çalışmamızda nükleotid dizilerinin filogenetik analizi ile ülkemizde var olan HBV kökenlerinin genotiplerini belirlemeyi, ayrıca daha kolay ve çok sayıda örneğe uygulanabilir yeni bir RFLP analiz yöntemi tanımlamayı amaçladık.



4. GENEL BİLGİLER

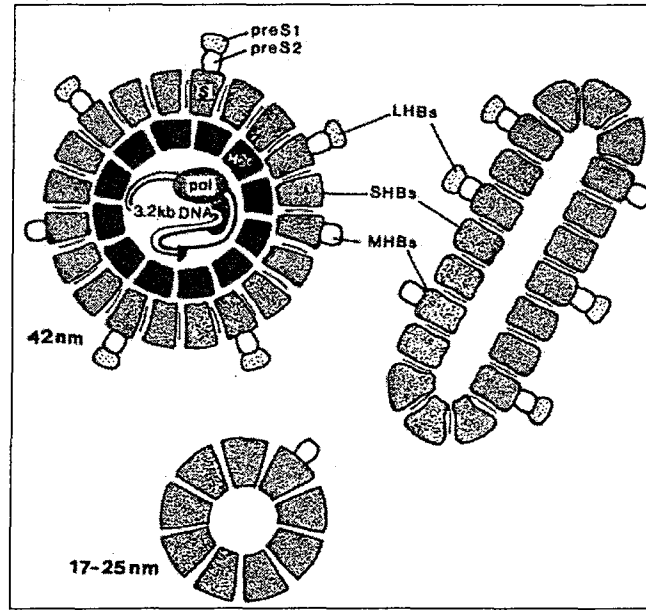
4.1 HBV : Sınıflandırma ve genel özellikler

Hepatit B virusu (HBV) Hepadnaviridae ailesinde yer alan zarflı bir DNA virusudur (16). Tüm hepadnaviruslar hepatotropizm gösterirler ve kendilerine özgü konaklarında benzer yaşam döngüsüne sahiptirler. Çoğu kronik hepatit ve hepatosellüler karsinoma ile ilişkilidir (17). Hepadnavirusların viryon yapı ve genetik organizasyonları benzer olup yaklaşık 3.0-3.3 kb büyüklüğünde, kısmen çift sarmallı bir DNA molekülü taşırlar. DNA replikasyonu RNA ters transkripsiyonunu gerektirir (18).

Bu ailede memeli hepatit viruslarının bulunduğu Orthohepadnavirus ve kanatlı hepatit viruslarının bulunduğu Avihepadnavirus cinsleri yer alır. Orthohepadnavirus cinsi içinde HBV, woodchuck hepatitis virus (WHV), ground squirrel hepatitis virus (GSHV) bulunur. Bu viruslar arasında nükleotid düzeyinde yaklaşık %70 oranında bir homoloji vardır (19-22). WHB ve GSHV insan ve diğer primatları infekte etmezler. Orthohepadnaviruslarda bulunan X geni avihepadnaviruslarda bulunmaz. Orthohepadnaviruslar 3 yüzey proteini (S, M, L), avihepadnaviruslar ise 2 yüzey proteini (S, L) taşırlar (23).

Son yıllara kadar HBV'nun sadece insanlarda infeksiyon oluşturduğu düşünölmekle birlikte yakın zamanda şempanze ve orangutan gibi primatlarda HBV infeksiyonlarının tanımlanması virusun kökeni ve yayılımı hakkında tartışmalar yaratmıştır (24-28).

HBV ile infekte kişilerin serumlarında birbirinden farklı üç tip partiköle rastlanır. Bunlardan yaklaşık 42 nm çapında olan küresel şekilli Dane partikölleri tam bir viryon yapısında olup infeksiyözdür. Dane partikölünün yapısında çembersel bir DNA molekülü, DNA polimeraz , protein kinaz aktivitesi ve DNA'ya bağılı bir protein içeren nükleokapsid ile bunu çevreleyen bir zarf vardır. Viral zarf yüzey antijenini (HBsAg) , nükleokapsid ise kor antijeni (HBcAg) ve bu antijenin yapısal değişikliğe uğramış şekli olan HBeAg'yi içerir. Yaklaşık 22 nm. çapında olan küresel ve tüböler partiköller ise non-infeksiyöz olup sadece yüzey antijeni taşırlar. Bunlar daha fazla üretilir ve kanda dolaşan HBsAg'nin büyük kısmını oluştururlar (29-31).



Şekil 1: HBV partiküllerinin şematik yapısı
(Kaynak 2'den uyarlanarak alınmıştır)

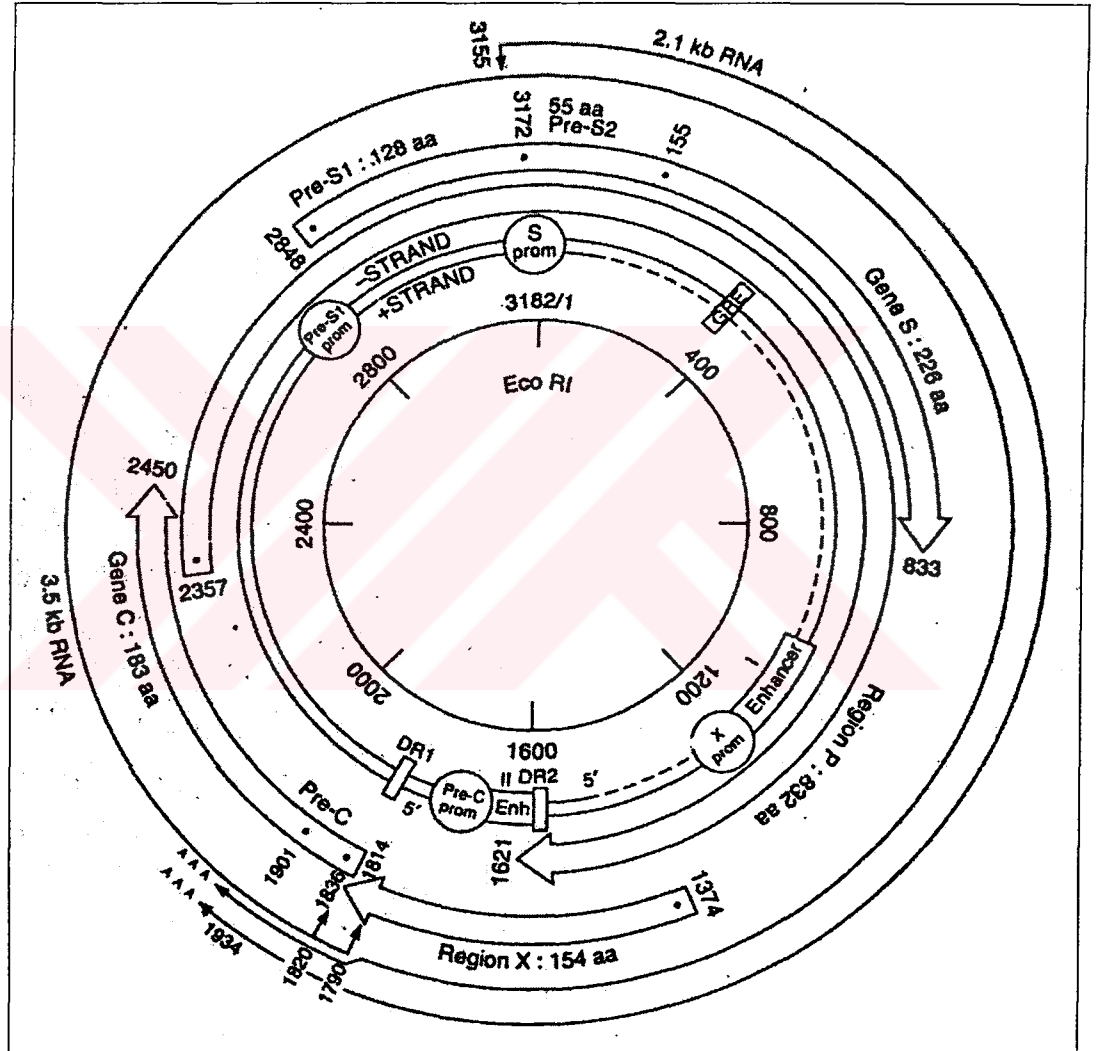
4.2 Genom yapısı

HBV, kısmen çift sarmallı, çembersel bir DNA molekülü taşır ve 3200 nükleotidden oluşan genomik yapısı nedeniyle bilinen tüm hayvan DNA virusları içinde en küçük olanıdır (18).

Genom 3200 nükleotid taşıyan uzun (L veya negatif) ve 1700-2800 nükleotid içeren kısa (S veya pozitif) zincir olmak üzere iki sarmaldan meydana gelir (32). Her iki zincirin 5' uçları sabit ancak kısa zincirin 3' değişkendir. Genomun çembersel yapısı uzun ve kısa zincirin 5' uçlarından birbirlerine tutunmaları ile sağlanır. Uzun zincirin 5' ucu 1826., kısa zincirin 5' ucu 1601. nükleotidde bulunur. Tutunma bölgelerinde 11 baz çiftlik DR (direct repeats) olarak adlandırılan yineleyen diziler (5' TTCACCTC TGC) vardır. DR1 1590. nükleotidden, DR2 ise 1824. nükleotidden başlar (31).

HBV'nda uzun sarmal genetik bilginin tamamını taşır ve dört değişik protein kodlayan nükleik asit dizisi (open reading frame : ORF) içerir. Bunlar S, C, P ve X genleridir. Bu genler bazı bölgelerde birbiriyle binişik durumdadır. Örneğin P geni diğer üç gen ile de binişiktir. S geni yüzey proteinlerini, C geni kor proteinlerini, P geni DNA polimerazı ve X geni de X proteinini kodlar. S geninde pre-S1, pre-S2 ve S olmak üzere üç, C geninde de pre-C ve C olmak üzere iki farklı başlangıç kodonu bulunur (31).

HBV genomunda iki adet enhancer (enh = güçlendirici) yapı saptanmıştır. Enhancer 1 -doku spesifik olup sadece hepatositlerde etkindir ve gen ekspresyonunda rol oynar. Enhancer 2 ise yüzey gen promoterlarının transkripsiyonel etkinliğini artırır (33).



Şekil 2 : HBV genom yapısı

(Kaynak 31'den uyarlanarak alınmıştır)

4.3 Replikasyon

Hepadnavirusların replikasyonu ile ilgili bilgilerin çoğu hayvan modelleri üzerinde yürütülen çalışmalar sonucu elde edilmiştir. Viral replikasyonda üç önemli özellik vardır (33).

1-DNA sarmallarının sentezi sırasında negatif iplikçinin sentezi pozitif iplikçinin sentezinden önce tamamlanmalıdır.

2-Viral polimeraz aynı zamanda ters transkriptaz olarak fonksiyon görür.

3-Negatif iplikçinin sentezinde 5' ucuna kovalen olarak bağlı terminal protein öncül olarak kullanılır. Pozitif iplikçinin öncülü ise viral genomik RNA'dan türeyen bir oligoribonükleotiddir.

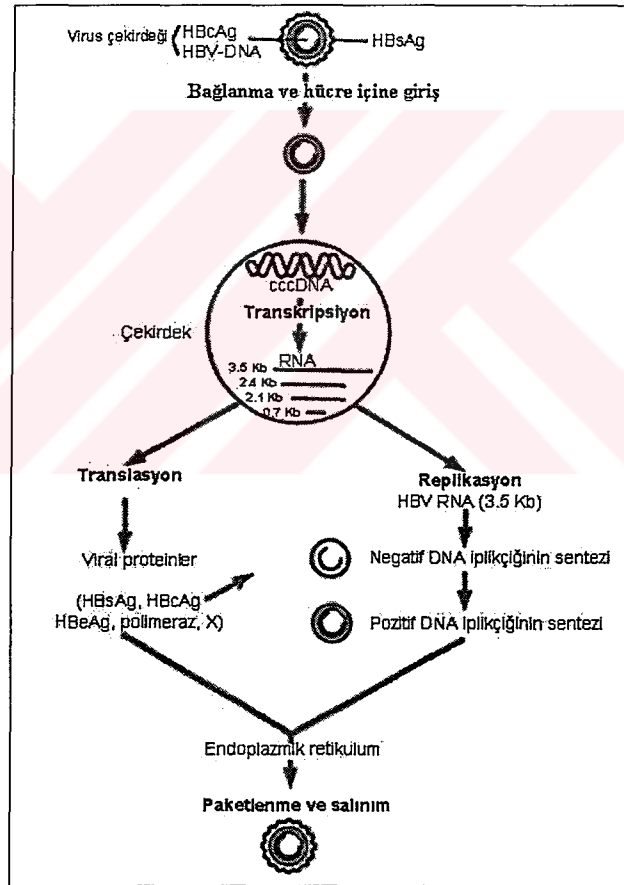
Replikasyonun ilk aşamasında hepatosit yüzeyine bağlanan virus hücre içine girer. Hepatosit içinde nükleokapsid viryondan ayrılır ve işlenmeden konak hücre çekirdeğine taşınır. Kısmen çift sarmallı ve her iki ucu serbest halde bulunan viral DNA tümüyle çift sarmallı, kovalen bağlı, süper kıvrımlı, uçları kapalı, çembersel yapıda bir DNA'ya (covalently closed circular DNA, cccDNA) dönüşür. cccDNA, viral RNA sentezinde kalıp olarak iş görür ve konak hücre RNA polimerazının yardımıyla 4 tip mRNA sentezlenir. Bunlar (33):

- 1- 3.5 kb mRNA : En uzun parçadır. Genom replikasyonunda, precore/core ve polimeraz proteinlerinin sentezlenmesinde kullanılır.
- 2- 2.4 kb mRNA : Pre-S1, pre-S2 ve S proteinlerinin sentezlenmesinde kullanılır.
- 3- 2.1 kb mRNA : Pre-S2 ve S proteinin sentezini sağlar.
- 4- 0.7 kb mRNA : X proteinini sentezletir.

Sentezlenen mRNA'lar sitoplazmada P,C, preS/S ve X gen ürünlerinin sentezini sağlarlar. Bu sırada 3.5 kb mRNA'ların bir kısmı yeni sentezlenen kor (core) partikülleri içine yerleşirler. Bu RNA'lar genom sentezinde kalıp olarak kullanılır ve bu nedenle de pregenomik RNA (pgRNA) olarak adlandırılır. Kor partikülleri içinde viral polimeraz enziminin ters transkriptaz aktivitesi ile pgRNA'dan negatif iplikçik sentezlenir. Sentez DR1'in 3' ucundaki terminal proteinin bulunduğu yerden başlar ve bu devam ederken pgRNA, RNAz H aktivitesi ile yıkılır. Pozitif iplikçinin sentezi polimeraz aktivitesi ile negatif iplikçik kalıp olarak kullanılarak gerçekleştirilir. Sentez DR2'nin 3'ucundan başlar ve uzun zincirin 5'ucundaki terminal protein geçilinceye kadar devam eder. Kısmen çift sarmallı,

çembersel yapıdaki kor kısmının kılıf proteinleri tarafından çevrenmesi ve aynı zamanda polimerazın da tükenmesi nedeniyle kısa zincirin sentezi tamamlanamaz ve bu sarmal eksik kalır. Viral genom oluştuktan sonra endoplazmik retikulum içinde glikoprotein zarfını kazanır ve veziküler taşıyım ile hücre dışına salınır (31, 33).

Kor içinde sürekli bir cccDNA havuzu vardır ve bu yeni sentezlenen HBV DNA moleküllerinin bir kısmının kora taşınması ile oluşur. HBsAg'nin cccDNA oluşumunu inhibe etmesinden dolayı bunun HBV replikasyonunda negatif feedback mekanizması olabileceği düşünülmektedir (34).



Şekil 3 : HBV replikasyonunun şematik gösterimi
(Kaynak 2'den uyarlanarak alınmıştır)

4. 4 Viral proteinler

4. 4. 1 Kılıf (yüzey) proteinleri

HBV-S geni üzerinde başlangıç kodonları farklı ancak ortak 3' ucuna sahip üç ayrı gen bölgesi bulunmaktadır ve bunlar tarafından üç değişik protein molekülü sentezlenmektedir. Okuma işlemi gen üzerindeki ilk kodondan başlarsa pre-S1 + pre-S2 + S gen bölgelerinin tümü okunacağından kılıfın büyük proteini (L protein: LHBs) , ikinci kodondan başlarsa bu kez pre-S2 + S bölgelerinin ürünü olan orta protein (M protein : MHBs), üçüncü kodondan başlarsa sadece S bölgesi okunacağından kılıfın küçük proteini (S protein: SHBs) sentezlenir (23, 35).

HBV'nun hepatositlere bağlanmasında pre-S proteinlerinin önemli rol oynadığı düşünülmektedir. İn-vitro çalışmalarda pre-S1 ve pre-S2 bölgelerinde karaciğere özgü bağlanma bölgeleri saptanmıştır (36-38). Ayrıca pre-S2 gen bölgesi polimerize insan serum albuminine (poly-HSA) bağlanma özelliğine sahiptir. Hepatosit yüzeyinde reseptörü olan bu albuminin "virus - konak hücre" bağlanmasında aracılık ettiği tahmin edilmektedir (37).

SHBs kılıfın major proteini olarak bilinir 226 aminoasitten oluşmuştur (35). Tam bir viryonun yapısında 300-400 molekül SHBs proteini , 40-80 molekül MHBs ve LHBs proteinleri bulunur. Tubuler partiküllerin yüzey proteinlerinin bileşimi tam viryon ile eşdeğer iken, 22 nm çapındaki küresel partiküllerinki oldukça farklıdır. Viral replikasyonunun olduğu kronik taşıyıcılarda non-infektif küresel partiküller SHBs ve MHBs proteinlerini tam bir viryondaki oranda taşıdıkları halde LHBs miktarı 20 kez daha azdır. Viral replikasyonun olmadığı durumda ise küresel partiküllerde yüzey proteinlerinin çoğunluğunu SHBs oluşturur, MHBs %1'in altındadır ve LHBs hiç bulunmaz (23).

4. 4. 2 Kor proteinleri

HBV genomunda C geni üzerinde okuma işleminin başladığı iki farklı kodon (nükleotid 1814 ve nükleotid 1901) bulunmaktadır. Bu şekilde pre-C ve C olmak üzere iki bölgeye ayrılan C geni tarafından antijenik özellikleri farklı iki değişik protein (HbeAg ve HbcAg) sentezlenmektedir. Okuma işlemi C başlangıç kodonundan başladığında tam uzunluktaki C polipeptidi (HbcAg) sentezlenir; pre-C başlangıç kodonundan başladığında ise HbeAg proteini sentezlenir (31, 39, 40).

HBV ile infekte hasta serumlarında eriyik bir antijen olarak tanımlanan HbeAg aktif HBV replikasyonunun iyi bir göstergesi olmakla birlikte in vitro araştırmalar sonucunda HbeAg'nin viral replikasyon için gerekli olmadığı belirlenmiştir (39, 40). Viral paketlenmede önemli rolü olan HbcAg ise dolaşımda serbest halde bulunmaz. Akut ve kronik HBV enfeksiyonu olan hastaların karaciğer dokularında saptanabilir (2).

4. 4. 3 P proteini

P proteini ; ters transkriptaz, endonükleaz (RNAz H) ve DNA'ya bağımlı polimeraz aktivitesine sahiptir. Aminoterminal parçası DNA negatif sarmal sentezini başlatacak olan terminal proteini oluşturur. Orta parçası DNA negatif sarmal sentezi için ters transkriptazı ve DNA pozitif sarmal sentezi için DNA'ya bağımlı polimerazı oluşturur. Karboksi ucundaki parça ise DNA negatif sarmal sentezi sırasında RNA pregenomunun degradasyonu için gerekli olan RNAz H'yı oluşturur (41).

4. 4. 4 X proteini

X geni tarafından sentezlenen HBxAg, 154 aminoasitten oluşmuş, küçük, bazik bir proteindir (31). HBxAg ; HBV transkripsiyonun aktivasyonu, sinyal iletimi yoluyla endojen protein kinaz C (PKC) aktivitesinin artışı ve ribo/deoksi ATPase aktivitesi gibi biyolojik etkilere sahiptir (42, 43). Ancak in vitro çalışmalar bu proteinin gen ekspresyonu veya HBV replikasyonu için mutlaka gerekli olmadığını ortaya koymuştur (44).

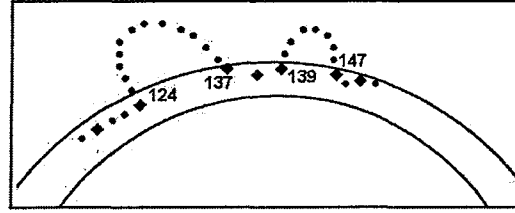
X proteinin çeşitli hücrel ve viral genleri transaktif ettiği aynı zamanda tümör supressör gen ürününün (p53) işlevini bozduğu gösterilmiş olup, HBV ile ilişkili hepatosellüler karsinom patogeneğinde rol oynayabileceği düşünülmektedir (45,46).

4. 5 Subtip ve genotipler

S proteinini oluşturan aminoasitlerin belli bölgelerdeki diziliş farklılıklarına göre dokuz ayrı HBV subtipi (ayw1, ayw2, ayw3, ayw4, ayr, adw2, adw4, adr⁺ ve adr⁻) saptanmıştır (47, 48).

Tüm subtiplerde ortak olarak bulunan gruba özgül “a” determinantı viryonun dış yüzeyinde 124 ile 147. aminoasitler arasında yer alır ve intramoleküler disülfid köprülerince

oluşturulan iki ilmik içerir. Nötralizan antikorlar için major determinant 139 ile 147. aminoasitler arasında bulunan ikinci ilmik üzerindedir (49).



Şekil 4 : “a” determinantının şematik gösterimi

HBsAg için tanımlanmış iki ayrı determinant daha vardır. Bunlardan biri “d” ya da “y” özgülüğünde diğeri ise “w” ya da “r” özgülüğündedir. SHBs’nin aminoasit 122 pozisyonunda lizin varsa “d”, arginin varsa “y” determinantı oluşmakta ; aminoasit 160 pozisyonundaki lizin “w” determinantını oluştururken, arginin “r” determinantının tanımlanmasına yol açmaktadır (50,51).

Ortak determinant ‘a’ ve iki set (d/y ve w/r) allel determinant ile HBsAg’nin dört major subtipi (adw, ayw, adr, ayr) tanımlanmıştır (52,53). Ancak w subdeterminantları (w1- w4) ile ayw için dört (ayw1, ayw2, ayw3, ayw4) ve adw için iki (adw2 ve adw4) serotip belirlenmiştir. Başlangıçta q determinantı adw4 dışındaki tüm subtiplerde belirlenmiş (54) fakat daha sonra Pasifik bölgesindeki adr türlerinde de bulunmadığı gözlenmiş ve böylece adr subtipi q^+ veya q^- olarak tanımlanmıştır (48).

w subtiplerinin belirlenmesinde SHBs’nin 127. pozisyonundaki aminoasit önem taşır. w1 ve w2 subtiplerinde bu pozisyonda prolin bulunur. Bunun yanı sıra w1 aktivitesi için 122. pozisyondaki argininin 134. pozisyondaki fenilalanin veya 159. pozisyondaki alanin ile birlikteliği gerekir. w3 subtipinde 127. pozisyondaki aminoasit treonindir. w4 subtipinde 127. pozisyonda lösin ve 140. pozisyonda serin yer alır (55).

q^+ ve q^- türlerde ortak farklılık 177 ve 178. aminoasit pozisyonlarındadır. q^- türlerde 177. aminoasit pozisyonunda valin yerine alanin ve 178. aminoasit pozisyonunda prolin yerine glutamin bulunur (56).

Tablo 1: HBsAg determinantlarını özgülleştiren aminoasit pozisyonları

Pozisyon	Aminoasit	Özgüllük
122	Lys Arg	d y
127	Pro Thr Leu/Ile	w1*/w2 w3 w4
160	Lys Arg	w r

*w1 reaktivitesi aynı zamanda Arg 122, Phe 134 ve Ala 159 birlikteliğini gerektirir.

HBsAg subtiplerinin yeryüzündeki dağılımları farklıdır. Bu nedenle epidemiyolojik çalışmalarda, infeksiyon kaynağının izinin sürülmesi ve HBV'nun bireyler ve toplumlar arasındaki yayılımının izlenmesinde HBsAg subtiplerinin saptanması önemli ipuçları verir. ayw1 subtipi Vietnam'da, ayw2 subtipi Akdeniz ülkelerinde gözlenirken, ayw3 subtipi Yunanistan ve Yugoslavya'da ayw2 ile birlikte izlenmektedir. ayw4 subtipi Batı Afrika'da ve ayr sadece Vietnam'da dikkati çekmektedir. adw2 subtipi Kuzey ve Orta Avrupa ile Doğu Asya'da, adw4 subtipi ise Amerika, Arjantin ve Polinezya'da baskındır. adrq⁻ türler sadece okyanus bölgesine ait olup Polinezya ve Avustralya'da , adrq⁺ türler ise Vietnam hariç Güneydoğu Asya'da görülür (4, 48).

Son yıllarda moleküler düzeyde yapılan çalışmalar sonucunda HBV genomları arasında farklılık olduğu saptanmış ve birbirine benzerlik oranı % 92 ve daha fazla olan HBV suşları aynı grupta toplanarak 6 farklı genotip (A-F) belirlenmiştir (3-6). Çok yakın zamanda Fransa ve ABD'de tüm genom düzeyinde diğer genotiplerden % 11.7 - %15.3 farklılık gösteren yeni bir genotip bulunmuş ve genotip G olarak adlandırılmıştır (57). Bilinen 9 HBsAg subtipi bu genotiplerden biri veya birkaçı ile ilişkilidir. adw2 türlerinde belirgin bir genetik heterojenite saptanmış olup bunlar genotip A, B ve C içinde bulunmaktadır. Vietnam kökenli ayw1 türleri genotip B, Afrika kökenli ayw1 türleri ise genotip A içinde yer almaktadır. ayw2 ve ayw3 türleri genotip D'ye aittir. ayw4 ve adw4 türleri diğerlerinden büyük farklılıklar göstermektedir ki bu da onların iki yeni genomik gruba sınıflandırılmasını sağlamıştır : genotip E ve genotip F. Tüm adw4 türleri genotip F içinde yer almaktadır. r

determinantını eksprese eden türler (ayr, adr^{q+} ve adr^{q-}) sadece genotip C içinde gözlenir (4, 58). Yeni saptanan genotip G içindeki örneklerin adw2 subtipine ait oldukları tahmin edilmektedir (57).

adw2 subtipinde gözlenen genetik heterojenite HBsAg subtiplerinin genomik farklılığı doğru olarak yansıtmadığını düşündürmektedir (3, 59).

HBV genotipleri ile virus suşlarının coğrafik kökeni arasında HBsAg subtiplerine göre daha iyi bir korelasyon olduğu düşünülmektedir. Genotip A'nın yeryüzündeki dağılımı adw2 subtipi kadar yaygın değildir. Bu subtipin Doğu Asya'lı taşıyıcıları genotip B ve genotip C içinde yer almaktadır.

Genotip A Kuzeybatı Avrupa ve Sahra altı Afrika'da yaygın olarak bulunmaktadır. Genotip B ve C esas olarak Uzak Doğu'ya aittir. Genotip D tüm dünyada yaygın olarak görülmekle birlikte Akdeniz bölgesi ve Yakın Doğu'da dominanttır. Genotip E sadece Batı Afrika'da gözlenmektedir. Genotip F ise Amerika'nın yerli halkında dikkati çekmektedir. Genotip E ve F de tek bir subtip gözlenirken, genotip A ve B de 2, genotip C de 4, genotip D de 2 farklı subtip yer almaktadır. Genotip D içinde Avrupa'ya ait türler intravenöz ilaç bağımlılığı ile ilişkili olduğu düşünülen ayw3 subtipi ile ayrı bir grup oluşturmaktadır (4).

Tablo 2 : Dünya üzerinde HBV genotipleri ve HBsAg subtiplerinin dağılımı

HBV genotipi	HBsAg subtipi	Coğrafik dağılımı
A	adw2 ayw1	Kuzeybatı Avrupa Afrika
B	adw2 ayw1	Endonezya, Çin Vietnam
C	adw2 adr ^{q+} adr ^{q-} ayr	Doğu Asya Kore, Çin, Japonya Polinezya Vietnam
D	ayw2 ayw3	Akdeniz Bölgesi Hindistan
E	ayw4	Batı Afrika
F	adw4 ^{q-}	Amerika, Polinezya

HBV genotipleri arasında coğrafik dağılım yanı sıra bulaş yolu, onkojenite, aşılama ile oluşan bağışık yanıtı duyarlılık ve interferona yanıt gibi özellikler yönünden de farklılıklar olduğu ileri sürülmektedir (8).

HBV bulaşında dikey geçişin ilk sırada olduğu Doğu Asya ülkelerinde genotip B ve C' nin prevalansı yüksektir. Bu durum, kısmen dikey geçişten sorumlu olan HBeAg pozitif (replikatif) dönemin daha uzun oluşu ile açıklanmaktadır. Bunun aksine anti-HBe serokonversiyonunun daha erken olduğu genotip A ve D nin baskın olduğu Akdeniz ve Sahra altı Afrika ülkelerinde yatay geçiş daha ön plandadır. HBV genotipleri vertikal geçişle ilgili olarak replikatif basamağın süresinin belirlenmesinde önemli olarak görünmektedir. Dikey geçişle infekte olan çocuklarda kronikleşme oranı yaklaşık % 80 dir. Bu nedenle hepatit B'nin endemik olduğu bölgelerde yüksek taşıyıcılık oranının sürmesinde en önemli mekanizmanın dikey geçiş olduğu kabul edilmektedir (9).

HBV genotip C ile infekte bireylerde şiddetli karaciğer hasarı söz konusudur. Bu hastaların karaciğer biyopsilerinde nekroinflamatuvar aktivite ve fibrozis skorlarının çok yüksek olduğu gözlenmiştir. Doğu Asya'da yapılan çalışmalarda hepatosellüler karsinomalı hastaların % 90'ının genotip C ile infekte olduğu saptanmıştır (10,11).

Genotip E ve F'de S geninin 140. pozisyonunda treonin yerine serin bulunmakta, bu da "a" determinantının immunodominant halkasını etkilemektedir. Bu durum genotip E'nin hakim olduğu Batı Afrika ülkelerinde aşı başarısızlıklarının nedeni olarak görülmektedir (6). Gambia'da yapılan bir çalışmada koruyucu düzeyde anti-hepatit B yüzey antikoru taşıyan aşılı çocuklarda genotip E infeksiyonları saptanmıştır (60).

Birden çok genotiple infekte olan bireylerde ortak olarak genotip F gözlenmiştir ve bu vakaların tümü parenteral geçişli virus infeksiyonları açısından yüksek risk grubunu oluşturan hemodializ hastalarıdır (8). Güney Amerika'da ciddi karaciğer hasarı olan olgularda HBV - HDV koinfeksiyonları tanımlanmış ve bu vakalarda HBV genotip F ile HDV genotip III birlikteliğinin hastalığın şiddetinden sorumlu olabileceği düşünülmüştür (61).

HBV genotip A ile infekte olan hastaların diğer genotiplerle infekte olanlara göre interferon tedavisine daha iyi yanıt verdikleri, bu yanıtın tedavi öncesi viral replikasyon düzeyi ve dozdan bağımsız olduğu saptanmıştır (12).

Prekor mutantları genotip A' da nadir iken genotip B, C ve D'de yaygın olarak gözlenmektedir (13-15).

Kor promoter mutantları ise sıklıkla genotip C içindeki türlerde saptanmıştır (62).

4. 6 HBV mutantları

HBV genomu mutasyonel değişimlere açıktır. Ortalama nükleotid değişim hızı 4×10^{-5} olarak hesaplanmaktadır (63). Bu oran HIV’ de görülen mutasyon hızından daha düşük olmakla birlikte, bir çok DNA genomundaki hızlardan çok daha yüksektir. HBV replikasyon döngüsü sırasında pregenomik RNA’dan ters transkripsiyonla DNA’ya dönüşmesi açısından retroviruslere benzer. Ters transkriptaz enziminin hata düzeltme yeteneğindeki zayıflık nedeniyle bu aşamada nükleotid yerleşiminde yanlışlıklar meydana gelmekte ve sonuçta genom yapısında moleküler düzeyde mutasyonel değişimler ortaya çıkmaktadır (3).

HBV genomunun bir diğer özelliği 4 adet ORF ile kompakt bir yapı göstermesidir. Bu genomik yapı nedeniyle viral replikasyon sırasında mutasyonlar doğal olarak ortaya çıkabilmektedir. Ayrıca genom üzerinde genler birbirleri ile binişik durumdadır ve bir gende olan mutasyonel değişiklik birlikte bulunduğu diğer gen(ler)i de etkilemektedir (64).

HBV mutantlarının varlığından yıllardır kuşulanılmakla birlikte bunların sistematik olarak saptanması PZT ’nin geliştirilmesi ve ardından DNA dizi analizlerinin yapılması ile mümkün olmuştur (65,66).

4. 6. 1 Yüzey gen mutantları

Bu gen bölgesinde ortaya çıkan mutasyonlar virusun antijenik yapısını etkileyerek aşılı bireylerde infeksiyonların ortaya çıkmasına ve HBV tarama testlerinde yanlış negatif sonuçlara neden olur (67).

HBV S gen bölgesinde 124-147. aminoasitler arasında yer alan “a” determinanı tüm genotiplerde korunmuştur ve aşılama sonucu oluşan nötralizan antikorların hedefidir. Bu bölgede ortaya çıkan mutasyonlar anti-HBs varlığına rağmen varlığını sürdürebilen aşı kaçış mutantlarına yol açar (64, 68, 69).

İtalya’da HBV immünizasyon çalışmaları sırasında bir çok çocuğun aşıya rağmen HBV ile infekte olduğu gözlenmiştir. HBsAg ve anti-HBs’nin birlikte görüldüğü bu vakalarda yapılan moleküler çalışmalarda “a” determinantının 145. pozisyonunda glisin-arginin değişimi saptanmıştır (69).

Singapur’da yapılan geniş kapsamlı bir çalışmada aşılı olmalarına rağmen HBV infeksiyonu saptanan 41 çocukta “a” determinantının değişik pozisyonlarında mutasyonlar

(*Gly-145-Arg, Asp-144-Ala, Met-133-Leu, Gln-129-His, Ile/Thr-126-Ala*) belirlenmiştir (70). Bu tür aşı kaçak mutantlar Japonya ve Çin’de de gözlenmiştir (71, 72).

Fulminant hepatit gelişmiş aşıları Taiwan’lı çocuklarda Thr-126-Ala değişimi olan HBV mutantları dikkat çekmiştir (73).

“a” determinantının 141. pozisyonunda lizin-glutamin değişimi olan aşı kaçak mutantlar Batı Afrika’da gözlenmiş ve ilginç olarak bu mutasyonun sadece ayw4 subtipi dolayısıyla genotip E ilişkili olduğu dikkat çekmiştir (4).

Aşı kaçış mutantları İspanya, İngiltere, Gambia, Zimbabwe ve Almanya’da da saptanmıştır ancak bu ülkelerdeki sıklığı bir çok Asya ülkesinden daha düşüktür (64).

HBsAg mutantları kronik HBV enfeksiyonu nedeniyle karaciğer transplantasyonu uygulanan ve bu nedenle monoklonal veya poliklonal anti-HBs antikorları verilen hastalarda da bildirilmiştir (74, 75).

Yüzey geninin diğer bölgelerinde de mutasyonlar görülebilir. Pre-S1 ve pre-S2 gen bölgeleri delesyonlara eğilimli olarak görünmektedir. Pre-S1 geninin ilk yarısı delesyonlardan ve nokta mutasyonlardan nadiren etkilenmektedir (67).

Pre-S1 gen bölgesinin ikinci yarısında ve pre-S2 gen bölgesinde interferon tedavisinden sonra geniş delesyonlar görülmektedir. Pre-S2 gen bölgesi HBV’nun önemli bir immunolojik yapısı olup bu bölgedeki delesyonlar virusun konağın bağışık yanıtından kaçmasına yardımcı olmaktadır (76, 77).

Pre-S2 defektif HBV varyantlarının fulminant hepatit ve hepatosellüler karsinoma gelişimi ile ilgili olabileceği düşünülmektedir (78).

4. 6. 2 Prekor/kor mutantları

HBeAg viral replikasyonun ve infektivitenin bir göstergesi olup anti-HBe serokonversiyonu genellikle serumdan viral DNA’ temizlenmesi ve hastalığın remisyonu ile ilişkilidir (79). Bununla birlikte bazı hastalarda anti-HBe serokonversiyonuna rağmen HBV-DNA’nın pozitif olduğu gözlenmiş ve bu hastalardan elde edilen viral DNA’ların incelenmesi ile prekor/kor bölgesindeki mutasyonların varlığı ortaya konmuştur.

Prekor bölgesinde görülen en önemli mutasyon 1896. nükleotiddeki guaninin (G) yerine adenin (A) gelmesi sonucu triptofan kodonu da denilen kodon 28’ in (TGG) stop kodon (TAG) haline dönüşmesi ve HBeAg’in sentez edilememesi ile karakterizedir (80, 81).

HBeAg 'nin hepatosit yüzeyinde ekspresyonunu engelleyen stop kodon mutasyonu virüsün, konağın sitotoksik yanıtından kaçarak yaşamını sürdürmesini sağlar (82).

Ayrıca, Akdeniz bölgesindeki bir çok hastada nükleotid 1899 ' da (kodon 29) G→A, bazı Çin'li hastalarda da nükleotid 1898'de G→A mutasyonu tanımlanmıştır (83).

Prekor stop kodon mutantlarının varlığı asemptomatik HBV taşıyıcılarında (81,84), fulminant hepatit (85, 86) ve kronik aktif hepatit olgularında (80, 87), karaciğer transplantasyonu sonrası HBV reinfeksiyonu gözlenen olgularda saptanmıştır (88). Bazı çalışmalarda bu mutantların antiviral sağaltıma yanıtlarının zayıf olduğu belirtilmektedir (89, 90).

Prekor TAG mutantlarının tanısı hastalığın gidişinin izleminde ve sağaltım seçiminde önemlidir (91).

Prekor bölgesinde 1896. nükleotiddeki stop kodon mutasyonu nükleotid 1858 varyantları ile yakın ilişkilidir (15, 92). Bu pregenomik RNA halkasında 1858 ile 1896. nükleotidlerin baz çifti oluşturmasına bağlıdır (93, 94).

Nükleotid 1858' de prekor kodon 15'deki prolin için timin (T) veya sitozin (C) olabilir (CCT veya CCC). Nükleotid 1858'de C bulunan türlerde 1896. nükleotiddeki stop kodon mutasyonu gelişmez iken, T bulunan türlerde gelişmektedir (15, 92).

Genotip A içinde yer alan türlerde prekor mutantlarının düşük prevalansı nükleotid 1858 de C bulunması ile açıklanabilmektedir. Genotip D'ye ait türlerde ise prekor mutantlarının prevalansı çok yüksektir, bu da nükleotid 1858 de T varlığı ile ilişkilidir. Nükleotid 1858'de T varlığı genotip B ve E'ya ait türlerde %100, genotip C'ye ait türlerde %85 ve genotip D'ye ait türlerde %99 oranında gözlenmiştir. Bu da genotip B, C ve D'nin yaygın olduğu Doğu Asya ve Akdeniz bölgesinde TAG mutasyonlarının yüksek prevalansını açıklamaktadır (13).

Genotip F'ye ait türlerde de nükleotid 1858 de timin varlığı ile prekor TAG mutantlarının varlığı saptanmıştır (95).

HBV kor bölgesi mutasyonları, prekor mutasyonları ile birlikte veya bunlar olmadan da ortaya çıkabilir. Bu bölgedeki mutasyonların replikasyonu etkilediği bildirilmektedir (96).

Kor bölgesindeki mutasyonlar sıklıkla kronik HBV infeksiyonu olan hastalarda saptanmaktadır. Bu mutasyonların HBV infeksiyonunun seyri sırasında eşit hızda ortaya çıkmadığı, esas olarak HBe serokonversiyonu sırasında meydana geldiği düşünülmektedir (81, 97-99).

Kor promoter'un 1762. (A-T) ve 1764. (G-A) nükleotidlerinde saptanan iki önemli nokta mutasyonu genotip C içinde sıklıkla gözlenmektedir. Bu mutasyonların ciddi karaciğer hastalığı ve hepatosellüler karsinoma ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir (11, 62).

Kor gen bölgesindeki missens mutasyonlar (*Ile 97 Leu* ve *Pro 130 Non-Pro*) ciddi karaciğer hastalığı gelişiminden sorumlu tutulmaktadır (100).

Nükleotid 1858'de C bulunan türlerde HBe serokonversiyonu sırasında sıklıkla kor promoter mutasyonları gelişmektedir ve bu da ciddi karaciğer hasarı ile ilişkilidir (101, 102).

HBV genotip A'nın baskın olarak görüldüğü bölgelerde fulminant hepatit nedeninin kor promoter mutasyonlarının olabileceği düşünülmektedir (103).

4. 6. 3 Polimeraz gen mutantları

HBV polimeraz genindeki mutasyonlar kronik hepatit B nedeniyle karaciğer transplantasyonu uygulanan ve hepatit B reaktivasyonu sırasında lamivudine ile tedavi edilen hastalarda tanımlanmıştır (104). Bu hastalarda polimeraz geninde ters transkriptazın aktif bölgesinde (domain C) yer alan YMDD (tirozin, methionin, aspartat, aspartat) motifinde mutasyonlar saptanmıştır. Bu mutasyonlar methioninin valin (*Met-552-Val*, YMDD → YVDD) veya izolösine (*Met-552-Ile*, YMDD → YIDD) dönüşü şeklinde olup lamivudine direncine neden olmaktadır (105, 106).

Çok yakın zamanda Bozdayı ve arkadaşları kronik hepatit B enfeksiyonunda lamivudine direnci ile ilişkili olarak YMDD motifinde Met-552-Ser değişimi olan (YMDD→YSDD) yeni bir mutasyonu tanımlamışlardır (107).

Transplantasyon sonrası tekrarlayan HBV enfeksiyonu nedeniyle tedavi edilen hastaların % 22'sinde YMDD mutasyonları saptanmıştır (104). Yapılan çalışmalarda bu mutasyonların lamivudine duyarlılığında 45 kat azalmaya neden olduğu gözlenmiştir (106).

DNA polimerazın B domaininde ortaya çıkan mutasyonlar (*Val-521-Leu* ve *Leu-528-Met*) famsiklovir direncine neden olmaktadır (108).

Polimeraz geninde ortaya çıkan mutasyonlar virusun replikasyon yeteneğini etkilemektedir. Sadece C domaininde ortaya çıkan mutasyonlar (M552I ve M552V) virusun replikasyon yeteneğini belirgin bir şekilde azaltmaktadır. Bununla birlikte hem C hem de B domaininde mutasyonların olduğu suşlarda (L528M / M552I ve L528M / M552V) replikasyon sadece C domaininde mutasyon olan suşlardan daha iyidir (109).

4. 6. 4 X gen mutantları

X gen bölgesinde ortaya çıkan mutasyonların fonksiyonel önemi tam olarak bilinmemekle birlikte bu tip mutantların infektiviteleri ve replikasyon düzeyleri düşüktür (44).

Kronik HBV enfeksiyonlu, fulminant hepatitli, hepatosellüler karsinomalı ve sirozun son döneminde bulunan hastalarda X geni üzerinde 130. (AAG→ATG, lizin→methionin) ve 131. (GTC→ATC, valin→izolösin) kodonlarda nokta mutasyonları bildirilmiştir. HBV genomunda enhancer II- kor promoter bölgesinde yer alan bu mutasyonların HBV replikasyonunu veya X gen transaktivasyonunu etkilemeleri olasıdır (46).

HBV mutantlarına bağlı olarak atipik serolojik profiller (tek başına HBsAg pozitifliği, anti-HBs ve HBsAg'nin birlikte pozitifliği gibi) gözlenmektedir (110). Bu mutantların moleküler olarak tanımlanması daha iyi tanı sistemleri ile daha etkin profilaktik ve terapötik ajanlarının geliştirilmesine yardımcı olacaktır (64).

4. 7 Epidemiyoloji

Akut ve kronik karaciğer hastalığına neden olan hepatitis B virus tüm dünyada önemli bir sağlık problemidir. HBV'na bağlı akut hepatitin yaklaşık %5'inin kronikleştiği ve bu vakalarda siroz ve hepatosellüler karsinoma gelişme riskinin yüksek olduğu bilinmektedir (111). Tüm dünyada her yıl 500,000 ile 1,000,000 kişinin HBV ile ilişkili karaciğer hastalığından öldüğü tahmin edilmektedir (2).

HBV enfeksiyonunun dünyadaki dağılımı coğrafi bölgelere göre farklılıklar göstermektedir. Kronik HBV enfeksiyonu prevalansı, genel enfeksiyon oranı, enfeksiyonun alınma yaşı ve virusun en sık hangi bulaşma yoluyla alındığı gibi kriterler göz önüne alınarak dünya düşük, orta ve yüksek endemisite bölgelerine ayrılmıştır. Toplumda HBsAg pozitifliği yüksek endemisite bölgelerinde % 8'in üzerinde iken orta derecede endemik bölgelerde % 2 ile % 7 arasında ve düşük endemisite bölgelerinde %2'nin altındadır. Dünya nüfusunun yaklaşık % 45'i yüksek, % 43'ü orta ve % 12'si düşük endemisite bölgelerinde yaşamaktadır (2).

Güneydoğu Asya, Afrika ve Pasifik adaları gibi yüksek endemisite gösteren bölgelerde yaşam boyunca HBV ile karşılaşma riski %60'ın üzerindedir. Bu bölgelerde hemen tüm HBV enfeksiyonları yeni doğan ya da erken çocukluk döneminde alınır. Ana bulaşma yolu perinatal veya yatay bulaştır. Güneydoğu Asya'da perinatal bulaş ön planda

iken, Afrika ve Pasifik bölgesinde erken çocukluk çağındaki aile içi yatay bulaş önem kazanmaktadır. Kronik infeksiyon ve hepatosellüler karsinom gelişme oranı yüksektir (112-116).

Bu bölgelerde HBsAg pozitif kadınların % 35 ile % 50 si HBeAg pozitifdir. HBsAg ve HBeAg pozitif annelerden doğan bebeklerin % 70 ile % 90 kadarı immunoprofilaksi yapılmadığı takdirde HBV ile infekte olurken, bu oran HBsAg pozitif, HbeAg negatif annelerden doğan infantlarda yaklaşık % 5 ile % 20 dir.Doğumda infekte olmayan bebeklerde ise erken çocukluk çağında aile içi temas ile bulaş riski yüksektir (117).

Ülkemiz ile birlikte Güney ve Doğu Avrupa, Güney ve Orta Amerika, Orta Asya ve Ortadoğu ülkeleri orta derecede endemik bölgeler içinde yer almaktadır. Bu bölgelerde infeksiyon çoğunlukla çocukluk, ergenlik ve genç erişkinlik dönemlerinde alınmaktadır. Erişkinlerin % 20-60'ı daha önce geçirilmiş infeksiyon kanıtına sahiptir. Başlıca bulaşma yolu yatay olmakla birlikte diğer bulaşma yolları da infeksiyonun yayılmasında rol oynarlar. Perinatal bulaşma taşıyıcı annelerde HBeAg pozitifliğinin düşük olması nedeniyle daha nadirdir. Bu bölgelerde hamile kadınlarda HBsAg pozitifliği % 2-7 arasında olup bunların da % 20'den azında HBeAg pozitifliği söz konusudur (2).

Düşük endemik bölgelerde erişkinler arasında infeksiyonla karşılaşma oranı % 20'nin altındadır. Hastalık ile çoğunlukla erişkin dönemde karşılaşılır ve cinsel temas en önemli bulaş yoludur. Düşük endemisite profili Kuzey Amerika, Kuzey ve Batı Avrupa, Avustralya, Yeni Zelanda gibi gelişmiş ülkelerde görülmektedir. Bu ülkelerde genel popülasyonda hepatit B insidansı düşük iken damar içi uyuşturucu bağımlıları, eşcinseller, çok eşli heteroseksüeller, hemofili ve hemodializ hastaları gibi risk gruplarında yüksektir (2).

Ülkemizde bugüne kadar çeşitli gruplarda HBsAg seroprevalansının araştırıldığı çok sayıda çalışma yayınlanmıştır. Bu araştırmalarda yöntem, bölge ve çalışma grubuna bağımlı olarak HBsAg olumluluğu % 1.9 ile % 15.8 arasında değişmektedir. Bu çalışmalardan bazıları tablo 3 de özetlenmiştir.

Ülkemiz orta derecede endemik bir bölgede yer almaktadır. Viral Hepatitle Savaşım Derneği kronik taşıyıcılık oranının batı bölgelerinde % 3.5, doğu bölgelerinde ise % 7 olduğunu bildirmiştir. Nüfusun 1/3 ü anti-HBs pozitif olup, her yıl 100 000 yeni HBV infeksiyon olgusunun ortaya çıktığı tahmin edilmektedir (110).

Tablo 3 : Ülkemizde çeşitli gruplarda HBsAg seroprevalansı

<u>Araştırmacı (Kaynak)</u>	<u>Çalışılan grup</u>	<u>Bölge</u>	<u>HBsAg olumluluğu (%)</u>
Atmaca ve ark. (118)	Genelev kadınları	Diyarbakır	14.70
Bahar ve ark. (119)	Sağlık çalışanları	İzmir ve Uşak	2.80
Bör ve ark. (120)	Çocuklar	Eskişehir	7.00
Güneri ve ark. (121)	Sağlık çalışanları	İzmir	3.44
Kalkan ve ark. (122)	Psikiyatri hastaları	Elazığ	8.90
Kaygusuz ve ark. (123)	Askerler	Amasya	9.60
Özgüneş ve ark. (124)	Donörler	İstanbul	3.40
Özsoy ve ark. (125)	Sağlık çalışanları	İstanbul	2.60
Sönmez ve ark. (126)	Çocuklar	Malatya	3.09
Sümer ve ark. (127)	Hemodializ hastaları	Sivas	15.8
Sünbül ve ark. (128)	Sağlık çalışanları	Eskişehir	1.90
Tavmergen ve ark.(129)	İnfertil kadınlar	İzmir	2.85
Türk ve ark. (130)	Gebe kadınlar	İzmir	7.40

4. 7. 1 Bulaşma yolları

HBV'nin başlıca bulaşma yolları infekte kan ya da vücut salgıları ile parenteral temas (perkütan), cinsel temas, infekte anneden yeni doğana bulaşma (perinatal-dikey), infekte kişilerle cinsellik içermeyen yakın temas (yatay) dır. Enfeksiyonun yayılmasında su ve gıdaların önemi yoktur, çünkü fekal-oral yolla HBV bulaşmaz. Oral yolla bulaşma ancak infekte materyalin hasarlanmış oral mukozaya teması ile mümkün olabilir. Göz ve bütünlüğü bozulmuş deri de virus bulaşında önemli rol oynar (131).

Perkütan bulaşma

HBV bulaşmasında en önemli kaynak infekte bireylerin kanı ve vücut sıvılarıdır.

Kan ve kan ürünlerinin transfüzyonu, hemodiyaliz, endoskopi, yapay solunum cihazı gibi tıbbi aletlerin kullanımı, akupunktur uygulamaları, aynı enjektörün farklı bireylerde kullanımı, dövme (tatuaj) yaptırma ayrıca havlu, jilet, traş makinesi, diş fırçası, banyo malzemeleri gibi eşyaların ortak kullanımı perkütan bulaşma yollarıdır (131).

Kan transfüzyonu aracılığıyla bulaşma kan bankalarında HBsAg taramalarının zorunlu kılınması ile en aza indirilmişse de HBsAg negatif infeksiyöz sağlıklı taşıyıcıların varlığı ve taramalarda kullanılan kitlerin duyarlılık farklılıkları nedeniyle bu yolla bulaşma henüz ortadan kaldırılamamıştır (132, 133).

Cinsel temasla bulaş

HBV'nin başlıca bulaşma yollarından biridir. Tüm endemisite bölgeleri için geçerli olmakla birlikte düşük endemisite bölgeleri için daha önemli bir bulaş yoludur. Homoseksüeller arası cinsel ilişki en riskli seksüel bulaşma yoludur. Rektal mukoza mikrotravmalarına bağlı infekte kan veya semen teması riski artırmaktadır. Kandan daha az konsantrasyonda virus bulunsa da genital salgılar heteroseksüel temas sırasında bulaşma neden olmaktadır ve bu yolla bulaşmada HBV taşıyıcılarının eşleri en çok tehlike altında olanlardır (134-136).

Perinatal bulaşma

Taşıyıcı annenin perinatal dönemde infeksiyonu bebeğine geçirme olasılığı % 40-50'dir. Bu oran HbeAg pozitif bir annede daha yüksektir. Annenin HBV taşıyıcısı olmasından başka, hamileliğinin üçüncü trimesterinde veya doğum sonrası ilk iki ay içinde akut hepatit B infeksiyonu geçirmesi de bu tip bulaşmaya neden olabilir. Anneden çocuğa geçiş genellikle doğum sırasında veya doğumdan sonra HBV ile infekte maternal sıvılarla bebeğin teması ile olur. Doğum sırasında bulaş, cilt sıyrıkları, mukoza penetrasyonu, vaginal kanaldan geçiş sırasında anne kanının yutulması, sezeryan sırasında anne kanıyla temas ve plasenta hasarı sonucu fetal ve maternal dolaşımın karışması gibi nedenlerle meydana gelir. İntrauterin bulaşma oranı ise nadirdir (%5-10) (137-139).

Anne sütünde HBsAg gösterilmiş olduğundan kuramsal olarak bulaştırıcı olabilir. Fakat anne sütünün var olan riske ek bir risk oluşturmadığı bildirilmiştir (140).

Yatay(horizontal) bulaş

Parenteral, cinsel ya da perinatal temasla bulaşmanın söz konusu olmadığı durumlarda ortaya çıkan bulaşma, yatay bulaş olarak tanımlanır.

Yatay yol özellikle ev içi bulaşmada önemlidir. HBV taşıyıcısı bulunan ailelerde infeksiyonlu sayısının arttığı, HBsAg pozitif bireylerin seronegatif diğer aile fertleri ve

akrabalarına HBV bulaştırdığı gösterilmiştir. Bu tür durumlarda cinsellik içermeyen yakın temasın rolü olduğu düşünülmektedir. Kişisel eşyaların ortak kullanımı , bulaşmış yüzeylerden infeksiyon alınması gibi yolların da yatay bulaşda etkin olabileceğine ilişkin kanıtlar vardır (141).

Düşük endemisite bölgelerinde ev içi temaslarla yatay geçiş nadir olmakla birlikte özellikle zihinsel özürlü bireylerin yakınlarına HBV bulaşmasında etkin olarak gözlenmektedir (142).

Kalabalık yaşam şartları, kötü hijyen ve düşük sosyo-ekonomik düzey HBV'nun yatay bulaşma oranını artırmaktadır. Zeka özürlü çocuk bakımevleri başta olmak üzere anaokulu, kreş, yatılı okul, kışla, yurt, hapisane gibi yerlerde virusun kolay yayıldığı belirlenmiştir (143).

Ülkemizde HBV'nun temel bulaşma yollarını ve infeksiyonun alındığı yaş gruplarını kesin olarak söylemek zordur. Bizde infeksiyon, tüm bulaşma yolları ile çoğunlukla çocukluk ve genç erişkin dönemlerinde alınmaktadır (144). Ancak aile içi geçişi araştırmaya yönelik çalışmalar daha çok yatay geçişin önemini desteklemektedir (145, 146). Erişkinlerde yapılan geniş kapsamlı bir çalışmada olguların yaklaşık yarısında bulaş yolu saptanamamıştır (147). Bu da düşük sosyoekonomik düzey ve kalabalık yaşam koşulları nedeniyle yatay bulaşın ülkemizde etkin bir yol olduğunu düşündürmektedir.

4. 7. 2 Risk grupları

Perkütan bulaşma yolu açısından en riskli grubu hemofili hastaları başta olmak üzere sık sık kan ve kan ürünleri verilen veya hastanelere bağımlı olup sık perkütan girişimlerde bulunan hematoloji-onkoloji ve hemodiyaliz hastaları oluşturmaktadır. Daha çok gelişmiş ülkelerde görülen bir diğer risk grubu, ortak enjektör kullanımı nedeniyle damar içi uyuşturucu kullananlardır. Yeterince sterilize edilmemiş aletlerle dövme yaptıranlar da perkütan bulaşma açısından risk taşırlar. Bu bulaşma yolunda riskli olan bir diğer grup ise sağlık çalışanlarıdır. Bu grupta HBV ile karşılaşma oranının, hastayla temastan çok kanla temas etme oranıyla koşut olarak artış göstermesinden dolayı kanla teması daha fazla olan cerrahlar, diş hekimleri, hemşireler, laboratuvar teknisyenleri ve ilk yardım çalışanları daha çok risk altındadırlar. Cerrahi girişimlerin % 5-10'unda kaza ile perkütan yaralanma

olmaktadır. HBeAg pozitif bir kanla deri yoluyla temas eden bir sağlık çalışanına HBV bulaşma olasılığı yaklaşık % 30'dur (148, 149).

Sağlık görevlilerinden de hastalara HBV bulaşması olasıdır. Evrensel korunma önlemlerinin uygulanmasına karşılık HBV'nin sağlık görevlisinden hastalara bulaştırılmasında, bazı invazif cerrahi ve dental girişimlerin rolü olduğu öne sürülmektedir. Bu girişimler "temasa yatkın girişimler" olarak değerlendirilmekte olup bunların arasında bazı oral, kardiyotorasik, kolorektal ve kadın-doğum girişimleri bulunmaktadır (148, 150). HBeAg pozitif olan sağlık görevlisinin uzman bir kurul tarafından incelendikten sonra belli şartlarda çalışabilmesine izin verilmektedir. Ancak HBeAg negatif olan sağlık görevlilerinden de hastalara bulaş olduğunu bildiren çalışmalar vardır (148, 151).

Cinsel ilişki ile bulaş yönünden başlıca risk grubunu erkek eşcinseller oluştururlar. Bunun yanı sıra HBV taşıyıcılarının cinsel eşleri, fahişeler, çok eşli heteroseksüeller genital salgılarda virus bulunması nedeniyle cinsel yolla bulaşma açısından risk taşırlar.

Perinatal bulaşma yolu açısından riskli grup, HBV taşıyıcısı olan, hamileliğinin son trimesterinde veya doğum sonrasında ilk iki ayı içinde akut HBV enfeksiyonu geçiren annelerin bebekleridir (111).

4. 8 Patogenez

HBV enfeksiyonuna karşı gelişen hücresel ve sıvısal bağışık yanıt oldukça karmaşıktır. Bir çok çalışma HBV'nin direkt sitopatik etkili olmadığını ve çeşitli viral proteinlere karşı oluşan hücresel yanıt ile hastalığın klinik gidişi arasında korelasyon olduğunu göstermiştir (152).

HBV'ye karşı konağın bağışık yanıtı karaciğer hasarına yol açmaktadır. Bu hasarın hepatosit yüzeyinde sınıf I molekülleri tarafından sunulan kor peptidlerini tanıyan CD8+ sitotoksik T lenfositleri (CTL) tarafından oluşturulduğu düşünülmektedir. CD4+ lenfositler, antijen sunan hücreler, özellikle de makrofajlar tarafından sunulan viral peptid parçalarını tanırlar. CD4+ hücreler tarafından viral protein epitoplarının tanınması T hücre proliferasyonunu ve sitokin sentezini uyarır, B hücre yanıtına yardımcı olur (1).

Akut hepatit B'de, iyileşen olgularda güçlü bir CD4+ T hücre ve CD8+ T hücre yanıtı söz konusu iken kronik B hepatitli olgularda CTL yanıtlarının zayıfladığı veya hiç olmadığı görülmüştür. Bu defektif CTL yanıtlarından bir çok mekanizma sorumlu olabilir. Kronik

hepatitlerde CD4+ T hücre yanıtı ortadan kalkmıştır, oysa CTL yanıtı tümüyle CD4+ T hücre yanıtının yardımına bağlıdır. Bir başka olasılık ise kronik hepatitli hastalarda HBV'nin kodladığı antijenlere yönelik T hücre repertuarında bir eksiklik olmasıdır. HBV antijenlerinin sunulmak üzere işlemlenmelerinde bir defekt bulunması, peptidlere bağlanma yeteneği olmayan varyant HLA sınıf I allel ekspresyonu, virusun temizlenmesi için gerekli epitoplar içermeyen viral varyantlarla infeksiyon ve HBV antijenik uyarımına karşı bu hastaların supressif T hücre yanıtı oluşturmaması ise diğer olasılıklardır (33).

Ayrıca kronik B hepatitlilerde HLA sınıf I protein ekspresyonunda ve IFN- α üretiminde bir yetersizlik olduğu ileri sürülmektedir (153).

Konak immun cevabında değişikliklere yol açan birtakım genetik farklılıkların da hastalığın gidişi üzerine etkili olduğu düşünülmektedir. Kronik HBV infeksiyonu olan bireylerde bir viral opsonin olan mannoz bağlayan proteinde virusun opsonizasyonu ve fagositozunu bozan mutasyon saptanmıştır (1, 154). Diğer yandan Gambia'da yapılan bir çalışmada HBV infeksiyonundan iyileşen çocuk ve erişkin hastalarda özel bir MHC sınıf II allel DRB1 1302 ' nin kronik infeksiyon gelişenlere göre anlamlı düzeyde daha sık ekspresse edildiği saptanmış ve bu allelin kronikleşmeyi önlediği ileri sürülmüştür (155).

HBV infeksiyonu immunopatogenezinde hepatosit hasarına humoral immünitinin de katkıda bulunduğu ve bu hasarlanmada kompleman ile dolaşan intrasellüler immun komplekslerin (HBsAg /anti-HBs, HBcAg /anti-HBc) rolü olduğu düşünülmektedir (156).

HBeAg pozitif annelerden doğan bebeklerde plasentadan geçen düşük molekül ağırlıklı nükleokapsid proteinlerine (HBc ve HBe) karşı immun tolerans geliştiği ve sonuç olarak infekte hücrelerin immun mekanizmalarla ortadan kaldırılmasında yetersizlik olduğu ileri sürülmektedir (157, 158).

4. 9 Klinik bulgular

HBV infeksiyonu asemptomatik formdan fulminan hastalığa kadar değişen farklı klinik tablolar göstermektedir. Hastalık çocuklarda ve gençlerde yetişkinlere göre daha hafif ve asemptomatik olarak seyretmektedir. Klinik bulguların ortaya çıkışı çoğunlukla yaş ile bağıntılıdır. Yenidoğanlarda genellikle hiçbir bulgu gözlenmez iken, 1-5 yaş arası çocukların

sadece % 5-15'inde klinik belirtiler dikkat çekmektedir. Daha büyük çocuk ve erişkinlerde ise infeksiyonların %33-50'si semptomatikdir (2, 114).

Akut HBV infeksiyonunun kuluçka dönemi 4-28 hafta olarak belirlenmiş olup bu süre bir çok vakada 60-110 gündür (131).

Akut hepatit B'li hastaların yaklaşık % 10-20'sinde klinik olarak belirgin karaciğer hastalığı belirtilerinin başlamasından birkaç gün veya hafta önce eritematöz makülopapüler döküntü, ürtiker, artralji, nadiren artrit ve bazen de ateş ile kendini gösteren serum hastalığı benzeri bir tablo gelişir (159).

Genellikle 3-10 gün süren prodrom dönemi belirtileri sarılığın ortaya çıkışıyla geriler ve kaybolur. Sarılığın başlaması ve koyu idrar çıkması ile ikterik dönem başlar. Tipik semptomları halsizlik ve yorgunluk olup bunu iştahsızlık, bulantı, kusma ve sağ üst kadranda hafif künt bir ağrı takip eder. İkterik vakalarda semptomlar ilerleyebilir, değişmeden kalabilir veya hızla düzelebilir. Sklerada ikter serum bilirubin düzeyi 2.5-3 mg/dL üstünde olunca gözlenebilir. Hastaların bir kısmında birkaç gün süren hafif kaşıntı oluşur, nadiren kaşıntı uzayabilir. İdrar koyu, dışkı açık veya çamur rengindedir. Olguların büyük bir bölümünde hepatomegali, % 20 kadarında da splenomegali vardır. Bazı hastalarda servikal lenf düğümlerinde büyüme gözlenir. Çocuklar genellikle 2 haftada, erişkinler ise 4-6 haftada iyileşirler (131).

Akut hepatit B'de hematokrit ve hemoglobin konsantrasyonları normal veya orta derecede azalmıştır. Lökosit sayısı normal sınırlarda olup, granülositopeni ve relatif lenfositoz gözlenebilir. Sarılığın başlangıcından önce idrarda saptanan ürobilinojen ve bilirubinin miktarları sarılığın başlaması ile birlikte azalır. Geçici steatore hastalığın erken döneminde olabilir.

Total serum bilirubini genellikle 10-14 gün yüksektir ve çoğu hastada 10 mg/dL'ı geçmez. Akut viral hepatitin esas göstergesi serum transaminaz aktivitesindeki hızlı yükseliştir. Transaminazların yükselmesi semptomlar ortaya çıkmadan önce başlar ve genellikle semptomların birinci haftasında zirve yapar. Serum zirve düzeyi genellikle 1000U/mL' nin üzerindedir ve alanin aminotransferaz (ALT), aspartat aminotransferaz (AST) ' dan daha yüksektir. Zirve düzeyleri karaciğer hastalığı ile doğru orantılıdır ancak prognostik faktör değildir. Hastalığın gerilemesi ile birlikte serum transaminaz aktivitesi de normale döner. Serum alkalen fosfataz seviyesi normal veya hafif yükselmiştir. Serum albumin ve globulin konsantrasyonları genelde normaldir ancak ciddi olgularda albumin

seviyesinin azaldığı ve γ globulin konsantrasyonunun normalin iki katına kadar yükseldiği gözlenebilir (131).

Akut ikterik hepatit B olgularının sadece % 3-5'inde anormal laboratuvar bulguları, hafif semptomlar ve anormal fizik bulgular 3-4 aya kadar devam edebilir, nadiren 12 aya kadar uzayabilir. Bu uzamış akut hepatit B vakalarının prognozu tipik kısa gidişli hepatitden farksızdır ancak HBsAg'nin negatifleşmesi ve hepatitin düzelmesine kadar hepatitin kronik formundan ayırmak zor olabilir (131).

Akut HBV enfeksiyonu subfulminan ya da fulminan gidişli de olabilir. Fulminan hepatit, karaciğer yetmezliği ve ensefalopatinin eşlik ettiği ciddi bir formdur ve HBV fulminan viral hepatit olgularının büyük bir bölümünden sorumludur. Hastalarda huzursuzluk, dalgalıktan komaya kadar değişen bilinç değişiklikleri görülür. Hepatik nekrozla ilişkili olarak karaciğerde küçülme, serum transaminaz düzeylerinde ani azalma, protrombin zamanında uzama dikkat çeker. Oligüri ve azotemi ile birlikte ödem ve asit gelişebilir. Prognoz kötüdür ve her türlü tıbbi desteğe rağmen mortalite %60 düzeyindedir. Genellikle semptomların başlangıcından itibaren 1-3 hafta içinde ölüm gözlenir. Fulminan B hepatiti erişkinlerde, yaşlılarda, kadınlarda ve immunokompetan kişilerde çocuklara göre daha sıklıkla görülmektedir (131).

Akut HBV enfeksiyonlu hastalarda enfeksiyonun alınma yaşına bağlı olarak değişen oranlarda kronikleşme görülür. Perinatal dönemde alınan enfeksiyonda kronikleşme oranı en yüksek olup, HBeAg pozitif annelerden doğan bebeklerde bu oran % 80-90'dır (161). Bir ile beş yaş arası infekte olan çocuklarda bu oran % 25-50 arasında iken daha büyük çocukluk ve erişkin dönemde alınan enfeksiyonlarda % 6-10' dur.

Kronik HBV enfeksiyonu serumda en az 6 ay süren HBsAg pozitifliği veya HBsAg varlığı ile birlikte anti-HBc IgM'in olmaması olarak tanımlanır (2). Hastalığın kronikleşmesi karaciğerde viral replikasyonun devam etmesine ve hastanın immunolojik durumuna bağlıdır. Eğer konağın bağışık yanıtı zayıf ise karaciğer hasarı oluşmaksızın normal karaciğer fonksiyonu ile birlikte virus çoğalmaya devam eder. Böyle hastalar sağlıklı taşıyıcıdır. Serum transaminaz değerleri normal olan ve karaciğer hastalığının diğer belirtileri olmayan HBsAg pozitif bireyler için sağlıklı taşıyıcı terimi kullanılmaktadır. Hücresel bağışık yanıtı biraz daha iyi olan hastalarda hepatosellüler nekroz devam eder, fakat hücresel yanıt virüsü temizlemek için yetersiz olduğundan hastalık kronik hepatitle sonlanır. Kronikleşme daha

çok yenidoğan, homoseksüel, AIDS'li, lösemi ve kanser, böbrek yetmezliği ve immunsupressif sağaltım alanlar gibi bağışıklık sistemi yetersiz olan hastalarda görülür.

Kronik HBV enfeksiyonu klinik olarak genellikle sessizdir. Hastaların çoğu akut bir hastalık dönemi geçirdiğini hatırlamaz ve genellikle donör veya rutin kan taraması sırasında tanı konulur. En önemli genel semptom yorgunluk olup hafif ve intermittan özellik gösterir. Diğer semptomlar bulantı, üst abdominal ağrı, kas ve eklem ağrılarıdır. Semptomlar ve serum transaminazları karaciğer hasarının ciddiyeti ile korele değildir (131).

Kronik HBV enfeksiyonu olan bireylerde karaciğer sirozu ve primer hepatosellüler karsinom gelişme riski yüksektir ve bu risk kronik enfeksiyonun ortaya çıktığı yaş ile bağlantılıdır. Adölesan ve genç erişkin döneminde ortaya çıkan kronik enfeksiyonlarda siroz ve hepatosellüler karsinom gelişme riski % 15 civarında iken erken çocukluk döneminde bu oran % 25'in üzerindedir (2).

4. 10 Tanı

Akut ve kronik hepatitin klinik tanısında karaciğer fonksiyonlarının değerlendirilmesi açısından hematolojik ve biyokimyasal testler çok yardımcıdır. Bu amaçla total, direkt ve indirekt bilirubin, ALT, AST, alkalen fosfataz, gama glutamil transpeptidaz, laktik dehidrogenaz, albümin, globülin, total kan sayımı ve koagülasyon deneyleri yapılır. Karaciğer parankim hasarını saptamada aminotransferazlar (ALT, AST) oldukça duyarlıdır ve özellikle ALT primer olarak karaciğerde lokalize olduğundan en anlamlısıdır. Ancak HBV'una bağlı olarak oluşan hepatit tablosunun diğer etkenlerle oluşan hepatit tablolarından ayrılması için özgül tanı yöntemlerinden yararlanılır (162).

4. 10. 1 Özgül tanı

Akut ve kronik seyirli HBV enfeksiyonunun özgül tanısı virusun antijenleri ve onlara karşı gelişen antikorlarının gösterilmesi ve bunun yanı sıra replikasyonun ya da replikatif tipteki viryonların varlığına işaret eden göstergelerin araştırılması ile konulmaktadır (131).

Özgül serolojik tanıda genel olarak HBV'nin iki antijeni (HBsAg, HBeAg) ve üç antijenine karşı gelişmiş antikorlar (anti-HBs, anti-HBc, anti-HBe) kullanılır. HBsAg, HBV ile temastan 1-12 hafta sonra serumda ortaya çıkar ve bundan ortalama 4 (1-7) hafta sonra hepatit bulguları belirginleşir. HBsAg hastalık boyunca pozitif kalır ve iyileşme döneminde

titresi düşerek kaybolur. Genel bir kural olarak HBsAg'si kaybolan ve klinik hepatiti düzelen hastalarda karaciğer hasarı ve virus persistansı söz konusu değildir. HBsAg'nin serumdaki varlığını 3 aydan daha uzun sürdürmesi kronik hepatit B enfeksiyonu gelişeceğine işaret eder. HBsAg'nin ilk saptanmasından itibaren 6 ay ya da daha uzun süre ile pozitif kalması durumunda kronik taşıyıcılıktan söz edilir. Kronik olarak HBV ile enfekte bireylerde akut hepatit döneminden daha düşük düzeyde de olsa anormal (yüksek) ALT düzeylerine rastlanır. Diğer yandan HBsAg persistansına rağmen normal sınırlar içinde ALT değerine sahip olan bireyler asemptomatik (inaktif, sağlıklı) taşıyıcı olarak tanımlanırlar.

Akut viral hepatit tanısı için tek başına HBsAg varlığı yeterli değildir, tanı anti-HBc IgM pozitifliği ile doğrulanmalıdır. Bunun iki nedeni vardır: Birincisi kişi HBV taşıyıcısı olabilir ancak oluşan hepatit tablosundan bir başka virus sorumludur; ikincisi ise hastalık HBsAg'nin kaybolduğu ancak anti-HBs'nin henüz gösterilebilir düzeylere ulaşmadığı pencere döneminde olabilir. Bunun yanısıra HBsAg'nin gösterilebilir düzeylere ulaşmadığı akut HBV enfeksiyonu vakaları bildirilmiştir ve bu vakalarda anti-HBc IgM tanı açısından çok önemlidir (131).

Anti-HBs, HBsAg'nin konformasyonel epitoplarına karşı gelişen antikorlar olup HBsAg'nin serumda kaybolmasından sonra ve genellikle hastalığın başlangıcından 3 ay sonra ortaya çıkar, iyileşmeyi ve bağışıklığı gösterir. İyileşmiş hastaların büyük çoğunluğunda ömür boyu pozitif kalır. Anti-HBs ile birlikte anti HBc IgG pozitifliği doğal bağışıklığı, tek başına anti-HBs pozitifliği aşılama ile oluşan koruyuculuğu gösterir (131).

Tipik bir akut HBV enfeksiyonunda ilk antikor yanıtı anti-HBc'dir. Hastalığın başlangıcında ya da hemen öncesinde ortaya çıkar. İlk yanıt başlıca Ig M tipindedir (163) ve bunu hemen Ig G antikorları izler. IgM birkaç ay pozitif kalır ve hastalığın başlangıcından 4-8 ay sonra serumda tespit edilemez. Anti-HBc IgM' in sebat etmesi hastalığın kronikleşeceğinin işaretidir. Kronik hepatitlilerde düşük titrede anti-HBc IgM bulunur. HBV'ne maruz kalanlarda anti-HBc IgG yıllarca veya hayat boyu pozitif kalabilir. HBsAg taşıyıcılarında anti-HBc IgG yüksek titrede bulunur. Anti-HBs olmadan yüksek titrede anti-HBc IgG olması viral enfeksiyonun devam ettiğini gösterir. Anti-HBs ile birlikte anti-HBc IgG'nin düşük titrelerde bulunması hepatit B enfeksiyonunun çok önceden geçirildiğini gösterir (131).

HBeAg, akut HBV enfeksiyonunda, hastalığın başlangıcında, HBsAg'den kısa bir süre sonra pozitifleşir ve 10 haftadan daha uzun süre devam etmesi enfeksiyonun

kronikleşeceğinin belirtisidir. HBeAg' nin kaybolmasından sonra serumda anti-HBe ortaya çıkar. Kimi olgularda serumda kısa bir süre için HBeAg ve anti-HBe birlikte bulunurlar. Anti-HBe nisbeten düşük infektivitenin ve hastalığın tamamen iyileşeceğinin güçlü bir göstergesi olup genellikle akut infeksiyondan yıllar sonra kaybolur (131).

HBeAg vireminin göstergesi olarak kabul edilmiş olmakla birlikte son yıllarda HBeAg negatif mutantların varlığı ortaya konulmuş ve HBeAg negatif, anti-HBe pozitif vakalarda viral replikasyon gösterilmiştir (164). Bu nedenle klinik uygulamalarda anti-HBe antikorlarının varlığının saptanmasının HBV replikasyonu ve karaciğer hastalığı olmadığı anlamına gelmediği unutulmamalıdır. Viral replikasyonun direkt göstergesi HBV DNA'dır (131).

HBV DNA'nın serumda gösterilmesi son yıllarda gittikçe önem kazanmıştır. Çoğu kez araştırma, hastalığın prognozunu tayini ve sağaltımın izlenmesi amacıyla yönelik olarak HBV DNA serum ve dokularda dot blot hibridizasyon, serumda sıvı faz hibridizasyon ve dallanmış (branched) DNA sinyal amplifikasyon yöntemleri ile kantitatif olarak saptanabilmektedir. Son yıllarda serumda HBV DNA'sını kalitatif ve kantitatif olarak saptamaya yönelik çok daha duyarlı PZT yöntemleri geliştirilmiştir. Bu yöntemler sayesinde serumda 10 kopya HBV-DNA / mL saptanabilmekte ve duyarlılık dot blot hibridizasyondan 100-1000 kez fazla olmaktadır (165).

HBV infeksiyonunun varlığı in-situ hibridizasyon, spot hibridizasyon veya PZT ile saptandığı halde HBsAg ile birlikte diğer antijen ve antikorların yokluğu ile karakterize 'immünojik negatif' HBV infeksiyonları sağlıklı bireyler, hepatosellüler karsinoma, kronik karaciğer hastalığı, akut iyileşen ya da fulminan hepatit, açık kalp cerrahisi sonrası gelişen posttransfüzyon hepatit ve karaciğer transplantasyonu sonrası gelişen hepatit olgularında bildirilmiştir (166).

4. 11 Sağaltım

Akut HBV infeksiyonu erişkinlerde % 90-95 oranında kendiliğinden iyileşmektedir ve sağaltım genellikle destekleyicidir. Diğer yandan sonuçları açısından önemli olması nedeniyle kronik hepatit B'nin sağaltımı için yoğun çalışmalar yapılmakta ve çok sayıda antiviral ajanın HBV'ye karşı etkinliği araştırılmaktadır.

Kronik HBV infeksiyonlarının sağaltımında asıl amaç siroz ve hepatosellüler karsinom gelişmeden önce HBV'nin replikasyonunu baskılamak ve mümkünse organizmayı tümüyle HBV'den temizlemektir. İnterferonlar (IFN), özellikle de IFN- α 2 HBV'nin replikasyonunu baskılamakta ve hastalığın remisyonunu sağlamada belli bir etkinliğe sahiptir (167, 168). Gerek spontan gerekse IFN sağaltımı sonucu HBeAg kaybı olan vakalarda prognoz daha iyi olduğu gösterilmiştir (169).

Serumda yüksek aminotransferaz konsantrasyonu ile saptanabilen düzeyde HBsAg, HBeAg ve HBV DNA bulunan, karaciğer biopsisi kronik hepatit olarak değerlendirilen kompanse karaciğer hastalığının söz konusu olduğu kronik hepatit B infeksiyonlu hastalara alfa interferon sağaltımı önerilmektedir. Klasik sağaltım şeması IFN'un 4 ay süreyle günde 5MÜ veya haftada 3 kez 10 MÜ subkutan uygulanmasıdır. Serum aminotransferaz düzeyi normal olan vakalarda sağaltım uygulanmaz. Karaciğer biyopsisi yapmak sağaltım öncesi fibrozisin derecesini belirlemek açısından gereklidir (2, 170). Alfa interferon sağaltımı uygulanan hastaların % 25-40'ında uzun süreli bir remisyon gözlenmekte ve sağaltıma yanıt veren vakalarda karaciğer ile ilişkili komplikasyonların ortaya çıkışı daha nadir olmaktadır (171).

Yapılan çalışmalarda hastalara ilişkin bir çok faktörün interferon sağaltımına yanıtı olumlu ya da olumsuz olarak etkilediğı gözlenmiştir. Başlıca olumlu faktörler yüksek aminotransferaz (>100 IU/ml) ve düşük HBV DNA (<200pg/ml) düzeyi ile birlikte karaciğer biopsisinde ılımlı veya şiddetli inflamatuvar aktivitedir (1). Sağaltıma yanıt oranı HBV DNA düzeyi 100 pg/mL'nin altında olan hastalarda % 50 iken, HBV DNA düzeyi 200 pg/ mL'nin üzerinde olan hastalarda % 7 civarındadır (111). Üzerinde en çok durulan olumlu ve olumsuz faktörler tablo 4'de gösterilmiştir.

IFN sağaltımı uygulanan hastalarda bir yıl içinde HBeAg' nin yok olma oranı yaklaşık %30-40 iken, HBsAg negatifliği sadece % 5-10 hastada gözlenmektedir (172). HBeAg kaybına rağmen yüksek enzim düzeyleri sağaltım sırasında ortaya çıkan HBeAg negatif bir mutantın varlığını düşündürür ki bu olasılığı doğrulamak için serum HBV-DNA düzeyinin ölçümü gerekir(1).

Tablo 4 : Kronik Hepatit B’de IFN Sağaltımına Yanıtı Etkileyen Faktörler

Faktörler	Olumlu	Olumsuz
ALT düzeyi	yüksek	hafif yüksek,normal
HBV DNA düzeyi	düşük	yüksek
Hastanın yaşı	yetişkin	çocuk
İnfeksiyonun süresi	kısa	uzun
Cins	kadın	erkek
Seksüel ilgi	heteroseksüel	homoseksüel
Histopatoloji	KAH	KPH
Sağaltım süresi	>4 ay	<3 ay
İmmun sistem	normal	süprese (AIDS v.s)

Yakın zamana kadar IFN sağaltımının siroz ve hepatosellüler karsinom gelişimini önlemeye etkili olup olmadığı tartışılırken Ikeda ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada IFN’un hepatosellüler karsinom riskini azalttığı gösterilmiştir. IFN ile sağaltılan ve sağaltılmayan hastalarda 5 yıllık karsinogenez oranı sırasıyla % 7.0 ve % 19.6, 10 yıllık karsinogenez oranı yine sırasıyla % 17.0 ve % 30.8 olarak bulunmuştur (173).

İnterferon sağaltımı zahmetli, yan etkisi fazla ve oldukça pahalı bir sağaltımdır. Ayrıca sadece aktif bağışık yanıtı olan hastalarda etkin olması (1), immünsüprese hastalarda, perinatal infeksiyonlarda ve sirozlu hastalarda yararının olmaması başka sağaltım arayışlarına yol açmıştır. Bir çok antiviral ilaç kronik HBV sağaltımında denenmiş ve bunlar içinde yalnızca lamivudin ve famsiklovirin yararı görülmüştür. Nükleozid analogu olan her iki ilacın oral alımından sonra absorpsiyonunun iyi olduğu, uzun süreli kullanımında gayet iyi tolere edildiği ve bazı hastalarda HBeAg kaybı ile birlikte serum HBV-DNA ve aminotransferaz düzeylerinde hızlı düşüşe neden oldukları saptanmıştır. Ancak kısa süreli sağaltım sonrası viral DNA’nın hızla sağaltım öncesi seviyeye döndüğü gözlenmiştir (2, 170).

Ters transkriptaz aktivitesini engelleyerek DNA sentezini inhibe eden lamivudin kronik hepatit B infeksiyonu olan hastalarda HBV-DNA düzeyini hızla saptanamayacak düzeye düşürür (174). Aynı zamanda serum HBeAg ve HBsAg konsantrasyonlarını anti-HBe ve anti-HBs oluşumundan bağımsız olarak % 80 oranında azalttığı (175) ve hastaların

%68'inde ALT seviyesini normale getirdiği saptanmıştır. Aynı zamanda günde 100 mg lamivudin alan hastalarda HBeAg serokonversiyonunun kontrol grubuna göre çok daha yüksek olduğu ve fibrozis oluşumunun önlendiği gözlenmiştir (176). İnterferon alfa'nın aksine lamivudine yanıt sağaltım öncesi birtakım özelliklere bağlı değildir. Yapılan çalışmalarda HBV-DNA düzeyi yüksek ve ALT seviyesi normal olan, interferon sağaltımına yanıt vermeyen vakalarda lamivudinin etkin olduğu gözlenmiştir (174, 175). Ancak kalıcı yanıt vakaların sadece % 19'unda söz konusudur ve sağaltımın kesilmesi ile birlikte viremi tekrar başlamaktadır (1). Uzun süre uygulanan sağaltım sonucunda DNA polimeraz geninin YMDD lokusunda mutasyonlar ve bunun sonucu olarak da sağaltıma dirençli mutantlar ortaya çıkmaktadır (1, 177).

DNA polimeraz inhibitörü olan famsiklovir ile sağaltım deneyimleri daha azdır ve etkisinin lamivudine göre daha zayıf olduğu gözlemlenmiştir. Ancak lamivudin ile kombine kullanımı söz konusu olabilirse etki mekanizmasının farklı olması nedeniyle dirençli kökenlerin ortaya çıkması geciktirilebilir veya engellenebilir. Halen uzun süreli lamivudin, uzun süreli famsiklovir ve lamivudin ile alfa interferon birarada kullanımının etkinliğini araştıran çalışmalar devam etmektedir (178-180).

4. 12 Korunma

4. 12. 1 Özgül Olmayan Korunma

Amaç HBV enfeksiyonunun bulaşma zincirinin kırılmasıdır. Cinsel yolla bulaşmanın önlenmesi için prezervatif kullanımı, kan transfüzyonu ile bulaşın engellenmesi açısından kan ve kan ürünlerinin HBsAg yönünden taranması, nozokomiyal bulaşı önlemek için sterilizasyon ve dezenfeksiyon kurallarına tam olarak uyulması özgül olmayan korunmanın temel unsurlarıdır (162, 181).

4. 12. 2 Özgül Korunma

Pasif immunizasyon

Hepatit B immun globulin (HBIG), yüksek titrede anti-HBs'ye sahip donörlerin serumlarından elde edilir ve 100 000 IU/mL anti-HBs içerir.

HBIG temas sonrası korunma amacıyla şu durumlarda önerilmektedir (2):

- HBsAg pozitif anneden doğan bebekler
- HBsAg pozitif kanla kaza sonucu perkütan ya da mukoza teması
- HBsAg pozitif kişi ile cinsel temas

HBIG aynı zamanda karaciğer transplantasyonu sonrası hastaları tekrarlayan HBV enfeksiyonlarından korumak için de kullanılmaktadır (2).

Aktif immunizasyon

Hepatit B aşıları saflaştırılmış HBsAg içerir. Genelde iki tip aşı kullanılmaktadır:

- Plazma kökenli aşılar; kronik taşıyıcıların plazmalarından elde edilen 22 nm'lik subviral partiküllerin ısı ile veya kimyasal olarak inaktivasyonu sonucu elde edilen aşılar
- Rekombinant aşılar; HBsAg partiküllerinin maya hücresinde (*Saccharomyces cerevisiae*) rekombinant DNA'dan ekspresyonu ile elde edilen aşılar

HBsAg'ine karşı oluşan antikorlar (anti-HBs) nötralizandır ve tüm subtiplerde ortak olarak bulunan 'a' determinantını nötralize ettiğinden farklı subtiplerle oluşan enfeksiyonda çapraz korunma söz konusudur (182).

Kullanılmakta olan rekombinant hepatit B aşıları oldukça güvenli olup, aşılanan kişilerin yaklaşık % 22'sinde enjeksiyon yerinde hafif reaksiyon meydana gelebilir. Ateş ve diğer sistemik semptomlar son derece nadirdir. Tek kontrendikasyonu , maya proteinlerine veya aşı içeriğindeki bileşenlerden birine kişinin aşırı duyarlılığının olmasıdır (182).

Tüm yaş grupları için birinci ve ikinci doz arasında 1 ay, ikinci ve üçüncü doz arasında 5 ay bulunan 0-1-6 şeması standart uygulama olarak önerilmektedir. Aşının etkinliği anti-HBs gelişimi ile ilişkili olup 10mIU/mL üzerindeki değerler koruyucudur. Üç doz intramusküler hepatit B aşısı uygulanan 40 yaşın altındaki sağlıklı bireylerin % 90'ından (2), infantların ise % 95'inden fazlasında koruyucu antikor düzeyi (anti-HBs > 10mIU/mL) oluşur. 40 yaşın üzerindeki bireylerde aşılama yanıtı daha düşüktür. İleri yaş, obezite, sigara kullanımı, erkek cinsiyet, HIV enfeksiyonu, immun yetmezlik ve kronik bir hastalığın varlığı antikor oluşumunu olumsuz etkileyen faktörlerdir (2, 183, 184). Aşının HBIG veya diğer aşılarla birlikte uygulanması immunojenitesini azaltmaz (182).

Aşı uygulanmasından sonraki birkaç yıl içinde anti-HBs seviyelerinin düşmeye başladığı, aşıya yanıt veren erişkinlerin yaklaşık % 7-50'sinde aşılama 5 yıl sonra, % 30-60'ında ise aşılama 9-11 yıl sonra antikor seviyesinin 10mIU/mL'nin altına düştüğü saptanmıştır. İmmunize bireylerde akut hepatit B enfeksiyonu hiç bildirilmemiş olup, yapılan çalışmalar aşılama sonucu oluşan koruyuculuğun erişkinlerde en az 11 yıl (2), infantlarda ise 2-8 yıl devam ettiğini göstermektedir. Antikor titresinin saptanabilen düzeylerin altına indiği durumda bile anamnestik antikor yanıtı ile hastalığa karşı koruyuculuğun devam ettiği düşünülmektedir (182, 184).

HBV enfeksiyonu açısından risk taşıyan ve HBV ile enfekte olmamış gruplar için temas öncesi profilaksi önerilir (182).

Temas Öncesi Hepatit B aşısı Önerilen Gruplar

Rutin immunizasyon

- Tüm infantlar ve daha önce aşılanmamış 11 yaş civarı çocuklar

HBV enfeksiyonu açısından risk taşıyan gruplar

- Birden fazla cinsel partneri olan bireyler
- HBsAg pozitif bireyle cinsel veya ev içi teması bulunan kişiler
- Homoseksüel erkekler
- İntravenöz ilaç bağımlıları
- Endemik bölgelere 6 aydan uzun süreli seyahat edecek bireyler
- Mesleki olarak kan veya vücut sıvıları ile temas eden kişiler (doktorlar, diş hekimleri, hemşireler, laboratuvar çalışanları, hemodiyaliz ünitesi çalışanları gibi)
- Bazı hasta grupları; sık kan ve kan ürünü transfüzyonu gerektiren hastalar, kronik renal yetmezliği olan hastalar, mental retardasyonu olan hastalar

Perinatal HBV enfeksiyonunun önlenmesinde HBIG ile hepatit B aşısının birlikte kullanımı ideal olarak kabul edilmektedir (186). HBsAg pozitif anneden doğan bebeklere HBIG ile birlikte hepatit B aşısının uygulanması kronik HBV enfeksiyon gelişimini % 79-98 oranında önlemektedir (2). İmmunize infantlarda kronik enfeksiyon oranı immunize olmayan infantlara göre oldukça düşük olup, aşıya yanıt vermeyen çocukların % 40'ında geç kronik enfeksiyon söz konusudur (186).

Başlangıçta hepatit B aşısının risk gruplarına uygulanması önerilmiş ancak riskli bireylerin saptanması ve aşılamaındaki zorluk nedeniyle hastalığın insidansında azalma olmadığı gözlenmiştir (2, 182). Bu nedenle 1991 yılında universal aşı uygulamasına geçilmesi ve aşının rutin çocukluk çağı aşıları arasına girmesi önerilmiştir (187, 188).



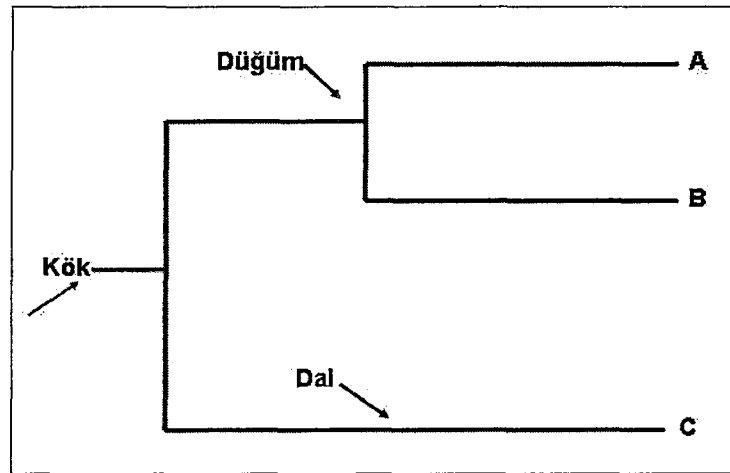
4.13 Filogenetik analiz

Organizmaların evrimsel tarihi filogeni olarak adlandırılır ve farklı türler arasındaki evrimsel ilişkileri ortaya koymak amacıyla filogenetik analiz tekniği kullanılır (189). Moleküler filogenetik çalışmalar ise DNA ve proteinlerde oluşan değişikliklerin hızını ve paternini saptamaya dolayısıyla da genler ve organizmaların evrimsel tarihini oluşturmaya yöneliktir. Filogenetik çalışmalarda türler arasındaki evrimsel ilişkiyi göstermenin en uygun yolu filogenetik ağaç oluşturmaktır (190).

Bir filogenetik ağaç düğümlerden ve dallardan oluşur. (Şekil 5) Her bir düğüm evrimsel yoldaki ayrımın karşılığı olup, taksonomik bir grubu temsil eder. Ağaçtaki dış dallar taksonları, iç dallar ve düğümler ise taksonlar arasındaki ilişkiyi gösterir. Birbiri ile yakın ilişkili türler ağaçta birbirine komşu dallarda yer almaları ile ayırt edilirler. Ağacın dallarının paterni topoloji olarak adlandırılır ve dal uzunluğu genellikle dalda oluşmuş değişikliklerin sayısını ifade eder (190, 191).

Bazı filogenetik analiz tipleri evrimleşme hızının ağacın dallarında aynı olduğunu, bazıları ise farklı olduğunu varsayar. Ağacın dallarında mutasyon hızının aynı olduğu varsayımı moleküler saat hipotezi olarak bilinir ve birbiri ile yakın ilişkili türler için oldukça uygundur (191).

Filogenetik ağaç köklü veya köksüz olabilir. Köklü ağaçlarda kök ağacın herhangi bir yerinde yer alabilir ve ortak bir atayı temsil eder. Köksüz ağaç ise ortak atayı belirtmeksizin sadece türler arasındaki ilişkileri gösterir (190, 191).



Şekil 5 : Filogenetik ağaç

Değişik türlerin nükleik asit/ aminoasit dizilerinin karşılaştırılmasına dayanan moleküler filogenetik analizin temelinde elde edilen dizilerin referans diziler ile ne kadar benzer ya da farklı olduğu sorusu yer alır (192).

Bu amaçla öncelikle incelenecek dizilerin elde edilmesi ve bunların önceden bilinen diziler ile karşılaştırılması gerekir. Son yıllarda moleküler filogenetik alanında önemli gelişmeler kaydedilmiş ve çeşitli türlerden elde edilen diziler dünya üzerindeki veri tabanı sistemlerinde toplanmıştır. Böylece araştırmacılar elde ettikleri dizileri var olan diziler ile karşılaştırma imkanına sahip olmuşlardır (189).

Filogenetik analiz tekniğinde dört basamak yer almaktadır (190):

- 1- Hizalama
- 2- Yer değiştirme modelinin(substitution model) saptanması
- 3- Ağaç oluşturulması
- 4- Ağacın değerlendirilmesi

Hizalama

Nükleotid veya aminoasit dizilerinin karşılaştırılabilmesi için bu dizilerin alt alta aynı hizada dizilmesi (alignment) gerekir. Bunun için çok çeşitli yöntemler vardır (192):

- 1- Elle yapılan hizalama
- 2- Bilgisayarla iki dizinin hizalanması
- 3- Bilgisayarla ikiden fazla dizinin hizalanması

Kullanılacak yöntemin seçimi hizalanacak dizilerin sayısına ve uzunluğuna bağlıdır. Dizi sayısı ve uzunluğu arttıkça elle yapılan hizalama karmaşık ve zaman alıcı hale gelir. Bunun için geliştirilmiş bilgisayar programları vardır. ClustalW ve TreeAlign programları en çok kullanılanlardır (189).

Hizalama, dizilerde hangi pozisyonların korunmuş olduğunu ve hangilerinin ortak diziden farklılaştığını gösterir. Evrimsel ilişki gösteren diziler homolog olarak tanımlanır.

Birbiri ile homolog olmayan iki dizinin boşluklar bırakılarak hizalanması riski vardır. Çok sayıda dizinin birbirleri ile karşılaştırıldığı durumlarda bu boşlukların ortaya çıkma olasılığı daha da artar. Hizalamadaki boşluklar evrim süreci içinde bir veya daha fazla dizi karakterinde ortaya çıkan insersiyon veya delesyonu ifade eder (189, 191).

A dizisi TGAAGTC - - - CACCAAAAAGGAAGACTG
B dizisi TAGGCTCACGCACCAACAT - - CATACTG

Bu dizilerde (-) ile gösterilen boşlukların bir dizideki insersiyonları mı yoksa diğer dizideki delesyonları mı gösterdiğine karar verilemez. Bu durumda nötral bir terim olan indel (**insersiyon-delesyon**) kullanılır (189).

Birçok yöntem bu boşlukları dikkate almaz ve hiç boşluk içermeyen hizalama bölgelerine odaklanır. Bir diğer yaklaşım ise boşluklar için bir ceza puanı (gap penalty) verilerek skor matrisi oluşturulmasıdır. Bu skorlar uzaklık skorlarına dönüştürülebilir, bu da uzaklık metodları ile oluşturulan filogenetik analiz için oldukça uygundur.

Diziler ve bunların oluşturdukları gruplardaki değişikliklerin gözlenmesinde en iyi yol ağaç oluşturmaktır (191). Burada hizalama kritik bir noktayı oluşturur. Kötü bir hizalama yapılmış ise filogenetik ağaç yanlış olur, bu da kendini çok uzun dalların varlığı ile gösterir (193).

Filogenetik analiz oldukça subjektif olup bazı varsayımlarda bulunmak gerekir. Bunlardan en önemlisi bir nükleotidin diğeri ile yer değiştirme hızının (olasılığının) ne olduğudur. Bu yer değiştirme modeli (substitution model) olarak tanımlanır (194).

Yer değiştirme modeli (substitution model)

Bu modelde yer alan yöntemlerden bazıları genel özellikleri ile aşağıda tanıtılmaktadır.

1- Jukes-Cantor : Yer değiştirmelerin rastgele ortaya çıktığı ve mutasyon hızının tüm nükleotidler için eşit olasılıkta olduğu varsayılır.

2- Kimura 2-parameter : Transisyonların (A->G , C->T), transversiyonlardan (A->T , C->G) daha sık olduğu varsayılır.

3- Tajima-Nei : Jukes-Cantor'a benzer. Farklı olarak yer değiştirme oranının tüm nükleotidlerde aynı olduğunu varsayar. (A->T oranı G->T oranı ile aynıdır.)

4- Jin-Nei Gamma : Gama dağılıma göre nükleotid yer değişim oranının bölgeden bölgeye farklı olduğunu varsayar.

5- Tamura : Sabit bir yer değiştirme oranını varsayar. Fakat transisyon ve transversiyondaki farklılıkları da dikkate alır.

Öncelikle Jukes-Cantor yöntemi ile uzaklık hesaplanır. Tüm uzaklıklar her 100 bazda 10 yer değiştirmeye eşit veya daha az ise başka bir yöntem kullanılmasına gerek yoktur. Uzaklıklar her 100 bazda 10 yer değiştirmenin üzerinde ise aşağıdaki kriterlere göre düzeltme metodlarından birisi seçilir.

♦ Jukes-Cantor uzaklığı 10 ile 30 yer değiştirme arasında, transisyon ve transversiyon oranları farklı ise Kimura 2-parameter yöntemi kullanılır.

♦ Jukes-Cantor uzaklığı 30 ile 100 yer değiştirme arasında ve yer değiştirme oranları belirgin olarak bölgeden bölgeye farklı ise Jin-Nei Gamma yöntemi kullanılır.

♦ Uzaklıklar 30 ile 100 arasında ve dört nükleotidin değişimi aynı ise Tajima-Nei yöntemi kullanılır.

♦ Jukes-Cantor uzaklığı bir çok dizi çifti için 100'den daha fazla ise, uzaklık verileri ile oluşturulan ağaç güvenilir olmaz. Bu durumda şu önerilerden biri yardımcı olabilir :

- Kodlayan bölgeler için, kodonun birinci veya birinci ve ikinci pozisyonları kullanılarak uzaklık hesaplaması tekrar edilir.

- Kodlayan bölgeler için, protein dizisi hizalanır ve aminoasit yer değişimleri ile uzaklık hesaplanır.

- Dizinin hızla değişen bölgeleri kesin olarak biliniyorsa bu bölgeler çıkarılarak hizalama düzeltilir ve uzaklık yeniden hesaplanır.

- ♦ Transisyon ve transversiyon oranlarında belirgin bir farklılık ve güçlü bir G + C içeriği varsa Tamura yöntemi kullanılır (193).

Filogenetik ağaç oluşturma

Genellikle üç metod kullanılır :

1-Maximum parsimony

2-Distance

3-Maximum likelihood

Her bir metod farklı bir analiz yöntemi kullanır. Aşağıdaki akış şeması metod seçiminde izlenecek yolu göstermektedir (191).

İlişkili dizilerin seçimi ¹

↓

Hizalama ²

↓

Güçlü bir dizi benzerliği var mı? ³

Evet

→

Maximum parsimony

↓ Hayır

Açıkça tanımlanabilir dizi benzerliği var mı? ⁴

Evet

→

Distance

↓ Hayır

Maximum likelihood ⁵

1- DNA veya protein dizileri seçilir. Seçilen diziler hizalanır.

2- Hizalanmış dizilerde fazla sayıda boşluk olmamalıdır. Filogenetik analiz sadece uygun bir şekilde hizalanmış dizilerde yapılabilir. Genelde, filogenetik metodlar tüm dizilerdeki korunmuş bölgeleri analiz eder. En basit evrimsel model çoklu dizi hizalanmasında her bir kolondaki değişikliğin tek basamaklı değişiklik olduğunu ve tersine dönüş olmadığını ($A \rightarrow T \rightarrow A$) varsayar. Daha fazla basamaklı değişiklikler ($A \rightarrow T \rightarrow G$) ve tersine dönüşler olasıdır. Bu değişimler için düzeltmeler uygulanabilir. Böylece değişikliklerin miktarı daha kabul edilebilir bir değere ulaşır. Düzeltmeler değişikliklerin dizideki tüm pozisyonlarda aynı oranda olduğunu varsayar.

3- Bu soru maximum parsimony analizi için uygun dizilerin seçilmesini sağlamak amacıyla. Aynı olan bu diziler için diğer yöntemler de kullanılabilir. Parsimony analizi için en iyi sonuçlar diziler arasındaki değişim miktarının benzer olduğu durumlarda alınır. Eğer çok fazla değişim varsa çok fazla atasal ilişki olasıdır. Maximum parsimony metodu verilere göre olası tüm ağaçları oluşturmaya yöneliktir ve 11 veya 12 diziden fazlası için uygun değildir.

4- Bu sorunun amacı uzaklık metodları ile filogenetik analiz gerçekleştirmek için uygun dizilerin seçimidir. Diziler arasında orta derecede değişim varlığında uzaklık metodları kullanılarak evrimsel ağaç oluşturulabilir. Hizalanan iki dizi arasında değişmiş pozisyonların sayısının eşleşen pozisyonların toplam sayısına oranı diziler arasındaki uzaklığı tanımlar. Uzaklık metodları fazla sayıdaki diziler için uygundur. ClustalW programı çoklu dizi hizalamasının yanı sıra uzaklık metodu ile ağaç oluşturur.

5- Maximum likelihood metodu birbiri ile ilişkili herhangi bir dizi seti için kullanılabilmeyle birlikte özellikle diziler çok değişken olduğunda uygundur.

Maximum Parsimony Metod

İncelenen diziler ile ağaç oluşturmak için gerekli en az değişikliğin belirlenmesine dayanan bir yöntemdir. Bu nedenle bazen minimum evrimsel metod olarak da isimlendirilir. Benzer ve az sayıdaki dizi için kullanılır. Zaman alıcı olup dizi sayısı ya da değişim miktarı fazla olduğunda yararlı değildir. SeqLab ve PAUP programları bu metodu kullanır.

Çoklu hizalamada sadece belli dizi değişimleri parsimony analizi için uygundur. Bu analizde olası tüm köksüz ağaçlar dikkate alınır.

Uzaklık Metodları

Hizalama tamamlandıktan sonra bu veriler evrimsel uzaklığın hesaplanmasında kullanılabilir. Burada doğru yöntemin seçimi önemlidir.

Uzaklık metodları ile, hizalan diziler arasındaki farklılıkların miktarına göre ağaç oluşturulur. Ağacın dalları boyunca ortaya çıkan değişiklik sayısı diziler arasındaki uzaklığı gösterir. Bu metodlar diğerlerinden daha kolay ve hızlı olup, çok sayıda dizi için de uygundur. Bunlar içinde en çok kullanılanları şunlardır :

UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean)

Ağaç oluşturulmasında basit bir yöntem olup ağacın dalları boyunca değişim oranının değişmez olduğunu varsayar. Bu yöntemde önce birbirleri ile çok yakın ilişkili diziler arasındaki uzaklık hesaplanır, daha sonra bunların ortalama değeri ile diğer diziler arasındaki uzaklık hesaplanır ve bu tüm diziler ağaca dahil oluncaya kadar devam eder. SeqWeb ve SeqLab programları tarafından kullanılan UPGMA metodu, ağacın dallarındaki mutasyon oranı aynı olmadığında yanlış ağaç oluşumuna neden olur.

Neighbour Joining (NJ)

Doğru ağacın oluşturulmasında en uygun yöntemlerden biri olup özellikle ayrı türlerin evrimleşme oranının farklı olduğunun düşünüldüğü durumlarda uygundur. Ağacın toplam dal uzunluğunu en aza indirgeyerek birbirine komşu olan dizileri belirler. ClustalW programı neighbour – joining yöntemini çoklu hizalamaya bir rehber olarak kullanır.

Fitch – Margoliash (FM)

Bu metod bir uzaklık tablosu kullanır ve uzaklık sapmalarını en aza indirir. Ağacın dallarını tanımlamak için diziler ağaçta birleştirilir ve ağacın dal uzunluğu hesaplanır. Beş veya daha az taksonomik birim varlığında kullanılabilir. Phylip program paketi içinde yer alır.

Maximum Likelihood Metod

Dizilerdeki değişime en iyi karşılık gelecek ağacı bulmak için hesap olasılıklarını kullanır. Maximum parsimony metoduna benzer. Sadece az sayıdaki diziler için kullanışlıdır. Olası tüm ağaçlar dikkate alınır. SeqLab ve PAUP programları içinde yer alan bu yöntem çok farklı diziler arasındaki ilişkiyi açıklamak için kullanılabilir (191, 193)

Parsimony yöntemleri sıklıkla skorları aynı olan birçok ağaç oluşturur. En iyi ağacı bulmak için ileri işlemlere gerek vardır. Bunlar ;

1- Exhaustive search (ayrıntılı inceleme) : Olası tüm ağaçlar gözden geçirilerek kullanılan optimalite ölçütüne göre en uygun ağaç belirlenir. Çok zaman alıcı olup , yirmiden fazla dizi varlığında kullanılamaz.

2- Branch and bound : Bu yöntemde önce dizilerin bir bölümü ya da bazı nükleotid pozisyonları kullanılarak alt-ağaçlar oluşturulur (branch). Bunlarda optimalite ölçütleri değerlendirilir ve hesaplanan değer belli bir sınırı (bound) aşarsa, o alt ağaçtaki verileri içeren tüm ağaçlar inceleme dışı bırakılır. Böylece inceleme az sayıdaki alt- kümelerle yoğunlaştırılarak zamandan kazanılır.

3- Heuristic search : En çok kullanılandır. Suboptimal ağaçların oluşturduğu grubu inceler ve her bir grup için en uygununu bulur (189, 193).

Ağacın Güvenilirliği

Filogenetik analizde önemli sorunlardan biri oluşturulan ağaç topolojisinin doğru olup olmadığıdır. Ağaçtaki her bir dalın istatistiksel olarak anlamlılığını tahmin etmek için yaygın olarak kullanılan yöntem rastgele örnekleme (bootstrapping) dir. Burada incelenen dizilerden rastgele nükleotid pozisyonları seçilerek çok sayıda alt-veri kümeleri yaratılır. Bu verilerin her biri için bir ağaç oluşturulur ve bunlar birbiri ile kıyaslanır. Bunun sonucunda dal paterninin aynı olduğu örnek sayısı bootstrap değeri olarak ağacın her bir düğümünde 0-100 arasındaki sayılarla gösterilir. Bu değer, yüze ne kadar yakınsa ağacın topolojisinin o kadar güvenilir olduğu varsayılır. Genel olarak herhangi bir dal % 70'in üzerinde bir bootstrap değerine sahipse bunun doğruluğu % 95 seviyesindedir (189, 191, 193).

5. GEREÇ ve YÖNTEM

5.1 GEREÇ

5.1.1 Çalışma Grubu

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarında HBV – DNA olumlu saptanan 23 serum örneği ile çalışıldı. Serum örnekleri steril eppendorf tüplerde -70°C ' de dondurularak çalışmaya kadar saklandı.

5.1.2 Ayraçlar

1- 4 M NaCl

NaCl	11.68 g
Distile su	50 mL'ye tamamlandı. Otoklavlandı.

2- 1 M Tris (pH:8) (Sigma,T8524)

Trizma base	9.3 g
Distile su	100 mL' ye tamamlandı.

3- EDTA (etilendiamintetraasetikasit) (Sigma, E5134) (pH:8)

	<u>0.2M</u>	<u>0.5M</u>
Na ₂ EDTA	7.44 g	18.6 g
Distile H ₂ O	100 mL	100 mL
Otoklavlandı.		

4- SDS %10 (Sigma)

Lauryl sulfate	10 g
Distile su	100 mL'ye tamamlandı.

5- TNE Buffer + SDS

		<u>Final Kons</u>
4M NaCl	6.9 mL	0.11M
1M Tris (pH:8)	13.75 mL	55mM
0.2M EDTA	1.375 mL	1.1mM
%10 SDS	13.75 mL	%0.55
Distile H ₂ O	214.3 mL	-

6- Proteinaz – K (10mg/mL) (Promega, V3021, 100 mg)

Proteinaz K 100 mg

Steril distile su 10 mL

1 mL'lik alikotlarla -70°C ' de saklandı.

7- Glikojen (20 µg / 50 µL) (Sigma, G1767)

Glikojen 4 mg

Steril distile su 10 mL

1 mL'lik alikotlarla -70°C ' de saklandı.

8- Phenol (pH : 8) (Sigma, P-4557)

9- Kloroform : isoamilalkol

Kloroform (Sigma, C2432) 49 kısım

İsoamilalkol 1 kısım

Her çalışmada taze hazırlandı.

10-Sodyum asetat 3 M (pH : 5.2) (Sigma, S2889)

NaOAc(anhidroz) 24.61 g

ya da NaOAc.3H₂O 39.01 g

Distile H₂O 100 mL'ye tamamlandı.

pH glasiyel asetik asit eklenerek ayarlandı.Otoklavlandı.

11- Ethanol % 100 (Merck)

% 80 Ethanol için % 100 Ethanol 40 mL

Steril Su 10 mL

12- dNTP karışımı (4 µmol her biri; toplam 16 mM) (Promega, U1240)

dATP (100 mM)	40 µL
dCTP (100 mM)	40 µL
dGTP (100 mM)	40 µL
dTTP (100 mM)	40 µL
Steril distile su	840 µL

-20°C de saklandı.

13- 10X Taq buffer (Promega, M190A)

14- 25 mM MgCl₂ (Promega, A351B)

15- Taq DNA polimeraz(5U/µL) (Promega, M186A)

16- Kullanılan primerler, dizileri ve hedef bölgeleri :

<u>Primer Adı</u>	<u>Tip</u>	<u>Sekansı</u>	<u>Nükleotid pozisyonu*</u>
P7	Sense	5'-GTGGTGGACTTCTCTCAATTTTC	256-278
P8	Antisense	5'-CGGTA(A/T)AAAGGGACTCA(A/C)GAT	796-776

* HBV genomunda EcoR1 bölgesi başlangıç pozisyonu olarak alınmıştır (13).

17- Poliadenilikasit (Poly-A) (2 mg/mL) (Boehringer Mannheim, 108626)

Poly-A	100 mg
Steril distile su	50 mL

18- TBE (5X)

Tris base (Sigma, T8524)	54 g
Boric asid (Sigma, B6768)	27.5 g
0.5M EDTA	20 mL
Distile su	1000 mL'ye tamamlandı.
Otoklavlandı. Oda ısısında 1 ay stabildir.	

19- Jel yükleme tamponu (Tip III, 6X)

%0.25 bromfenol mavisi (%10 stoktan)	0.75 mL
%0.25 xylene siyanol FF (%5 stoktan)	1.5 mL
%30 gliserol (su içindeki karışımı)	9 mL
Distile su	18.75 mL

20- Etidium bromid (1000X,5mg/mL) (Sigma, E8751)

Etidium bromid	0.5 g
Distile H ₂ O	100 mL

Işıktan korumak için alüminyum folyo ile kaplandı.4°C de saklandı.

21- %10 DMSO (dimetilsülfoksit) (Sigma, D8418)

DMSO	1 mL
Steril distile su	10 mL' ye tamamlandı.

22- Üre (Sigma, U5378)

23- Rapid-Gel XL %40 (Amersham, US75863)

24- TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylenediamine) (Sigma, T7024)

25- Amonyum persulfat(APS) %10 (Sigma, A9164)

APS	0.1 g
Distile su	1 mL

26- Long Run Buffer, 10X TBE

Tris base	162.0 g (1340 mM)
Boric acid	27.5 g (450 mM)
EDTA(Na ₂ ,2xH ₂ O)	9.3 g (25 mM)
Distile su	1 L'ye tamamlandı.

27- Restriksiyon enzimleri ve bufferlar

Mva I (Boehringer-Mannheim, 1288067)	10 U / µL
Rsa I (Boehringer-Mannheim, 779124)	10 U / µL
Hinf I (Boehringer-Mannheim, 779652)	10 U / µL
Buffer H (Boehringer-Mannheim, 1417991)	
Buffer M (Boehringer-Mannheim, 1417983)	
Buffer L (Boehringer-Mannheim, 1417975)	

28- Akrilamid (Sigma, A8887)

29- Bis-akrilamid (N,N'-Methylene-bis-acrylamide) (Sigma, M7256)

30- Agaroz (Sigma, A9539)

31- φX174 DNA/ BsuRI(Hae III) marker (MBI Fermentas, SM0251)

32- φX174 DNA/ Hinf I marker (MBI Fermentas, SM0261)

5.2 YÖNTEMLER

Serum örneklerinden HBV – DNA ekstraksiyonu proteinaz-K / fenol-kloroform yöntemi ile yapıldı. PZT reaksiyonu ile HBsAg gen bölgesi amplifiye edildi ve nükleotid dizi analizi yapıldı . PZT reaksiyonu sonucu elde edilen S gen bölgesine ait ürünler *Mva I*, *Rsa I* ve *Hinf I* enzimleri ile kesilerek RFLP analizi gerçekleştirildi.

5.2.1 HBV – DNA’nın PZT ile gösterilmesi

HBV – DNA Ekstraksiyonu

Serum örneklerinden HBV – DNA ekstraksiyonu için proteinaz-K / fenol-kloroform yöntemi uygulandı. Bu amaçla sırasıyla şu işlemler gerçekleştirildi.

1. Dokuz volüm TNE buffer, 1 volüm proteinaz-K ve bir test miktarı için 20µg glikojen içeren ekstraksiyon buffer (EB) hazırlandı.
2. Her eppendorf tüpüne 400 µL EB ve 100 µL serum örneği konuldu. Vorteks ile karıştırıldı. 37°C de 1.5 – 2 saat inkübe edildi.
3. Ekstraksiyon tüplerine 450 µL fenol eklendi. 1100 – 1400 devirde 5 dakika karıştırıldı. 1500 rpm de 10 dakika santrifüj edildi.
4. Oluşan üst tabaka 450 µL kloroform / isoamil alkol (50:1) içeren tüplere aktarıldı. 1100 – 1400 devirde 5 dakika karıştırıldı. 1500 rpm de 10 dakika santrifüj edildi.
5. Üst tabaka 40 µL 3M NaOAc içeren tüplere aktarılıp, üzerine 800 µL ethanol (%100) eklendi ve vorteks kullanmadan yavaşça elde karıştırıldı.
6. Bir gece -20°C de bekletildi.
7. Tüpler 1500 rpm de 20 dakika santrifüj edildi.
8. Sıvı kısım boşaltıldıktan sonra dipteki çökelti 600 µL ethanol (%80) ile 1500 rpm de 5 dakika santrifüj edilerek yıkandı.
9. Çökelti kurutuldu ve 25 µL steril distile su ile sulandırıldı. Test öncesinde en az 10 dakika oda ısısında bekletildi.

PZT

HBV – DNA PCR için kullanılacak ayraçların miktarlarını belirleyebilmek için çeşitli optimizasyon ve standardizasyon çalışmaları yapıldı. Elde ettiğimiz sonuçlara göre toplam hacim 50 µL olacak şekilde hazırlanan karışım şu şekilde idi:

10x Taq buffer	5 µL (1x final)
25mM MgCl ₂	3 µL (1.5 mM / final)
Primer 7 (40 pmol / µl)	0.5 µL (20 pmol / final)
Primer 8 (40 pmol / µl)	0.5 µL (20 pmol / final)
dNTP (4 mM / herbiri)	1.25 µL (100 µM / final)
Taq polimeraz (5 U / µL)	0.25 µL (1.25 U / final)
DNA	5 µL
Steril distile su	34.5 µL

Amplifikasyon programı : 94°C de 1 dakika ön denatürasyon sonrası, 94°C 1 dakika, 50°C 1 dakika, 72°C 2 dakika thermocycler programı ile 30 döngü gerçekleştirildi. Son uzatma (final ekstensiyon) için örnekler 72°C de 7 dakika tutuldu.

PZT’de olumlu kontrol olarak moleküler hibridizasyonda HBV – DNA miktarı sırası ile 73 pg/mL, 3500 pg/mL ve 8441 pg/mL olan üç serum kullanıldı. Olumsuz kontrol olarak tüm hepatit göstergeleri olumsuz olan bir serum ve DNA yerine steril distile su eklenmiş bir karışım kullanıldı.

PZT’nin analitik duyarlılığını saptamak amacıyla moleküler hibridizasyonda HBV – DNA miktarı 57.10 pg/mL olan bir serum örneğinin 100 µg/mL poly-A içeren distile su ile sulandırımı yapıldı. Amplifikasyon sonrası olumlu sonuç elde edilen en düşük sulandırımındaki viral kopya sayısı bir pikogram HBV-DNA’nın 3×10^5 kopyaya eşdeğer olduğu varsayılarak hesaplandı (195).

Çalışma sırasında deneyler arası tutarsızlıktan ve kontaminasyondan korunmak için hazırlanan stok çözeltiler bir-iki kullanımlık miktarlara bölünüp saklandı. Aerosollere karşı filtreli pipet uçları kullanıldı. Tüplerin kapakları sürekli kapalı tutuldu. Deneyde oluşabilecek kontaminasyonun aşamasını saptayabilmek amacıyla her etapta negatif kontroller kullanıldı (196).

Elektroforez :

Bu amaçla, 1x TBE içinde % 2 agaroz jel hazırlandı ve manyetik ısıtıcıda eritildi. 50 mL agaroz içerine, 5mg/mL etidyum bromid çözeltisinden 5 µL eklendi. Uygun tarakların takıldığı jel kalıbına dökülen jelin donması beklendi. Donan jelden taraklar çıkartıldı ve oluşan boşluklara φX174DNA/Hae III marker ve örnekler yükleme tamponu eklendikten

sonra (5 µL jel yükleme buffer + 25 µL amplifiye ürün) aktarıldı. Jel 1x TBE içinde 80 V uygulanarak 30-45 dakika yürütüldü. Sonuçlar ultraviyole transilluminatörde 280-340nm dalga boyunda incelendi. Bant büyüklükleri marker ile karşılaştırıldı ve 541 baz büyüklüğündeki bantlar olumlu olarak değerlendirildi.

5.2.2 HBV Genotiplendirmesi

Genotiplendirme, PZT ürünlerinin dizi analizi ve restriction fragment length polymorphism (RFLP) tekniği ile gerçekleştirildi.

1-Dizileme

HBV dizilerinin belirlenmesi için, polimeraz zincir tepkimesi sonucu elde edilen ve S gen bölgesi içinde yer alan 541 bazlık (796-256) bir bölge kullanıldı. PZT ürünleri etanol ile saflaştırıldı. Bu amaçla 40 µL PZT ürünü 3M NaOAc içeren tüplere aktarılıp, üzerine 800µL ethanol (% 100) eklendi ve vorteks kullanmadan yavaşça elde karıştırıldı. Bir gece -20°C de bekletildi. Tüpler 1500 rpm de 20 dakika santrifüj edildi. Sıvı kısım boşaltıldıktan sonra dipteki çökelti 600µL ethanol (% 80) ile 1500 rpm de 5 dakika santrifüj edilerek yıkandı. Çökelti kurutuldu ve 25 µL steril distile su ile sulandırıldı. Test öncesinde en az 10 dakika oda ısısında bekletildi.

Dizileme tepkimeleri, Sequitherm Excel II DNA Sequencing Kits-LC (Epicentre SE9202LC) ile üretici firmanın önerileri doğrultusunda aşağıdaki şekilde gerçekleştirildi.

1-Kit içeriği buz üzerinde çözünmeye bırakıldı.Tüm kit komponentleri vortekslenerek homojen hale getirildi.

2-Premiks olarak işaretlenen bir eppendorfa (0.2 mL) toplam hacim 17 µL olacak şekilde aşağıdakiler kondu.

3.5x SequiTherm Excel II Sequencing buffer	7.2 µL
İşaretli öncül (IRD800 işaretli P7)	2 µL
Kalıp DNA (Pürifiye edilmiş 100-250 fmol / µl)	1 µL
SequiTherm Excel II DNA polimeraz (5U / µl)	1 µL
Deiyonize su ile	17 µL' ye tamamlandı.

3-Dizilenecek her örnek için 4 adet 0.2 µL eppendorf tüpü G, A, T, C olarak işaretlendi. Buz üzerinde

G tüpüne 2 µl SequiTherm Excel II-Lc Termination Mix G

A tüpüne 2 µl SequiTherm Excel II-Lc Termination Mix A

T tüpüne 2 µl SequiTherm Excel II-Lc Termination Mix T

C tüpüne 2 µl SequiTherm Excel II-Lc Termination Mix C' den eklendi.

4-Buz üzerinde premiks tüpünden her bir " Termination Mix " tüpüne 4 µL aktarıldı.

5-Mineral yağ eklendi.

6-Santrifüj yapılarak mineral yağın karışımdan ayrışması sağlandı.

7-G, A, T, C tüpleri 5 dakika 95°C' de ısıtılarak kalıp DNA denatüre edildi.

8-Aşağıdaki ısılarda 30 döngü gerçekleştirildi.

30 sn 95°C

15 sn 50°C

1 dk 70°C

9-3 µL Stop/Loading buffer eklendi. Elektroforez için jele yükleninceye kadar -20°C de saklandı.

Camların temizlenmesi

Sıcak musluk suyu ve ardından distile su ile yıkanan camlar bir kağıt havlu ile kurulandı. Camların her iki yüzeyi etanol ile silindi. Kulaksız olan arka cam, çentikli tarafı (dış yüzey) aşağı gelecek şekilde banko üzerine yerleştirildikten sonra her iki kenara spacer konuldu. Ardından kulaklı olan ön cam çentikli tarafı üste gelecek şekilde spacerların yerleşimlerini bozmadan arka camın üzerine yerleştirildi. Cam sıkıştırıcılar dikkatlice takıldı ve sıkıştırıldı. Üste gelecek kısma "casting plate" yerleştirildi.

Jel hazırlığı

1- Yüz ml beher içerisine sırası ile, 21 g üre, 30.5 mL bidistile/deionize su, 5.6 mL Rapid-Gel XL %40, 5 mL 10x Long Run TBE ve 500 µL DMSO eklendi.

2- Manyetik karıştırıcıda ve oda ısısında tamamen berraklaşmaya kadar (yaklaşık 10 dk) karıştırıldı.

3- Karışım 50 cc enjektöre çekildi ve bir başka beher içerisine filtre edildi.

4- Elli µL TEMED ve 350 µL %10 APS (taze hazırlanmış) eklendi.

5- Zaman kaybetmeden temiz 50 cc enjektöre çekildi, enjektör ucu takılıp, bir miktar jel dışarı atılarak enjektör ucu prime edildi.

6- İki cam arasına ön camın kulakları arasında kalan köşeden başlayarak jel dolduruldu.

7- Camların dip kısmı tamamen jel ile dolduktan sonra doldurma işlemi sonlandırıldı ve camlar hemen yatay konuma getirildi.

8- Tarak (0.25 mm) arka tarafı jel içerisine 0.5 cm girecek şekilde cama paralel olarak jel içerisine yerleştirildi ve polimerizasyon için 2 saat oda ısısında bekletildi.

Örneklerin yüklenmesi

Jel yükleme tamponu eklenmiş ve G, A, T, C olarak işaretlenmiş örnekler 90°C ' de 3 dakika denatüre edildikten sonra buz üzerine alındı ve her bir örnekten 1 µL jele aktarıldı. LI-COR DNA sequencer cihazında aşağıdaki koşullarda elektroforez uygulandı. Yaklaşık sekiz saat sonra bant görüntüleri ve bu bantların semi-otomatik olarak değerlendirilmesi ile DNA dizileri elde edildi.

Elektroforez koşulları

Voltaj	Akım	Güç	Sıcaklık	Tarama hızı	Frame	Pre-run	Buffer
2200 V	40 mA	45 W	45°C	3	35	45 dakika	1x

Dizi Analizi

Elde edilen DNA dizileri, GenBanktan elde edilen Lindh ve ark. (13) tarafından genotipleri belirlenen HBV dizileri (Gen Bank No: M32138*, X75656, X75663, X75664, X75657, X75658, L13994, D23677, Z35716, X51970, L27106, X68292, X72702, M12393, S50225, D00331, X04615, L08805) ve Takahashi ve ark.'nın (25) tanımladıkları bir şempanze HBV dizisi (AB032433) ile Clustal W Multiple Sequence Aligment programı kullanılarak hizalandı. Hizalanmış diziler TREECON programında "Jukes-Cantor distance" ile karşılaştırıldı, "neighbour-joining" yöntemi ile filogenetik ağaç oluşturuldu ve bootstrapping değerleri elde edildi.

* Fransa'da yapılmış bir çalışmada Türk hastaya ait izolat (198)

2-RFLP

Lindh ve ark. (13) ile Mizokami ve ark. (199) tarafından genotipleri belirlenen 68 HBV-DNA dizisi Gen Bank'ten elde edildi. DNASIS v2.5 (200) ve DNA Club (by Xiongfong Chen) programları kullanılarak genotiplere ait restriksiyon enzim paternleri *Mva I* ve *Rsa I* enzimleri ile oluşturuldu. Genotipler arası ayrımın güvenilirliğini artırmak için *Hinf I* enzimi kullanıldı.

Her bir serum örneğinden ekstakte edilmiş DNA ve yukarıda belirtilen primerler kullanılarak tekrar bir PZT reaksiyonu oluşturuldu. PZT ürünlerinin % 2 agaroz jelde yürütülüp, etidium bromide ile boyanması sonucu elde edilen bantlar standart marker ile karşılaştırılarak değerlendirildi. PZT reaksiyonu sonucu elde edilen ve S gen bölgesine ait ürünler *Mva I*, *Rsa I* ve *Hinf I* enzimleri ile ayrı ayrı uygun koşullarda enkübe edildi.

Bu amaçla oluşturulan karışımlar ve enkübasyon süreleri şöyleydi:

<i>Mva I</i> enzimi için ;	Buffer H	3.0 µL
	<i>Mva I</i>	1.0 µL (10 U / µL)
	Steril distile su	1.0 µL
	PCR ürünü	25 µL
	Bir gece 37°C de enkübe edildi.	

<i>Rsa I</i> enzimi için ;	Buffer M	1.5 µL
	Buffer L	1.5 µL
	<i>Rsa I</i>	1.0 µL (10 U / µL)
	Steril distile su	1.0 µL
	PCR ürünü	25 µL
	Bir gece 37°C de enkübe edildi.	

<i>Hinf I</i> enzimi için ;	Buffer H	3.0 µL
	<i>Hinf I</i>	0.25 µL (10 U / µL)
	Steril distile su	1.75 µl
	PCR ürünü	25 µl
	Bir gece 37°C de enkübe edildi.	

Enküasyon sonrası örnekler % 12 poliakrilamid jelde yürütüldü.

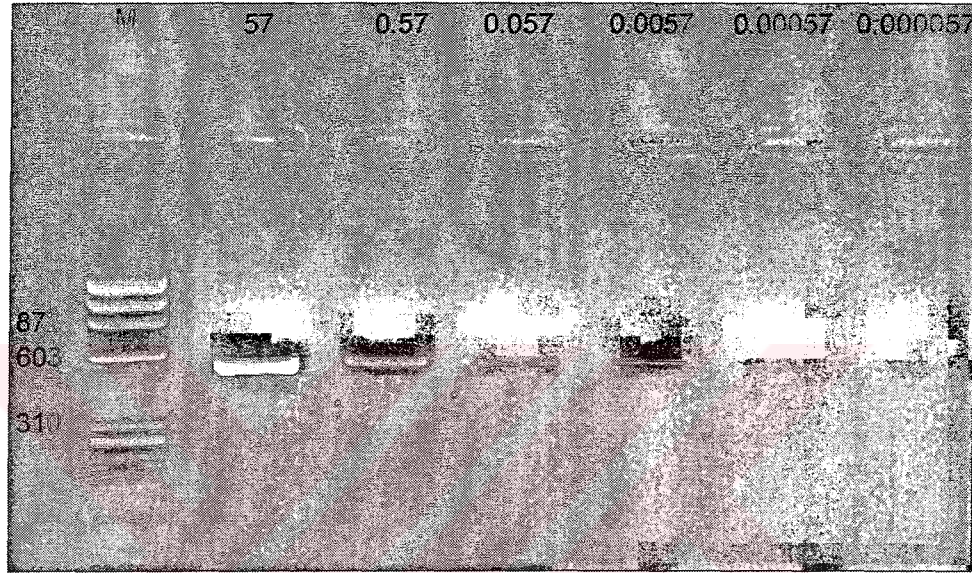
%12 Poliakrilamid jel hazırlığı, örneklerin yüklenmesi ve değeriendirilmesi

- 1- 50 mL beher içerisine sırası ile 4.095 g akrilamid, 0.105 g bis-akrilamid, 14.7 g üre ve 35 mL 1xTBE eklendi.
- 2- Manyetik karıştırıcıda ve oda ısısında tamamen berraklaşınca kadar (yaklaşık 10 dakika) karıştırıldı.
- 3- Karışım 50 cc enjektöre çekildi ve bir başka behere filtre edildi.
- 4- 25 µL TEMED ve 175 µL %10 APS (taze hazırlanmış) eklendi.
- 5- Zaman kaybetmeden temiz 50 cc enjektöre çekildi,enjektör ucu takılıp,bir miktar jel dışarı atılarak enjektör ucu prime edildi.
- 6- Yukarıda sözü edildiği üzere uygun şekilde temizlenen iki cam arasına ön camın kulakları arasında kalan köşeden başlayarak jel dolduruldu.
- 7- Camların dip kısmı tamamen jel ile dolduktan sonra doldurma işlemi sonlandırıldı ve camlar hemen yatay konuma getirildi.
- 8- Tarak (1 mm) arka tarafı jel içerisine 0.5 cm girecek şekilde cama paralel olarak jel içerisine yerleştirildi ve polimerizasyon için 2 saat oda ısısında bekletildi.
- 9- Polimerizasyon sonrası tarak çıkarılarak kuyucuklardaki jel artıkları temizlendi ve jel, içerisine 1xTBE buffer doldurulmuş apaceğine dikey olarak yerleştirildi.
- 10- Standart marker (φX174 DNA/Hinf I) ve her bir örneğin *Hinf I*, *Mva I* ve *Rsa I* enzimleri ile enkübe edilmesi sonucu elde edilen ürünler jel yükleme tamponu ile birlikte (15 µL ürün + 3 µL jel yükleme tamponu) jele aktarıldı.
- 11- 2200 V, 40 mA de yaklaşık 2 saat elektroforez uygulandı.
- 12- Elektroforez bitiminde camların arasından bütünlüğü bozulmadan dikkatlice çıkarılan jel etidium bromide ile boyandı.
- 13- Sonuçlar ultraviyole transilluminatörde 254 nm dalga boyunda incelendi.
- 14- Gözlenen bantların büyüklükleri standart marker ve RFLP paternleri ile karşılaştırılarak genotip tayini yapıldı.

6. BULGULAR

6.1 PZT

Moleküler hibridizasyonda HBV – DNA miktarı 57.10 pg/mL olan bir serum örneğinin 10 katlık 5 dilüsyon serisinde 100 µg/mL poly-A kullanılarak yapılan PZT reaksiyonunda testin 19 kopya/mL HBV-DNA' yı saptayabildiği gözlemlendi (Şekil 6).



Şekil 6 : Dilüsyonlu çalışılan serum örneğine ait PZT bant görünümeleri (M : marker) (Beklenen bant büyüklüğü 541 bp)

6.2 Nükleotid dizi analizi bulguları

Dizileme reaksiyonlarında, tüm örneklerden PZT ile elde edilen ve S gen bölgesine ait olan 541 nükleotidlik ürünler kullanıldı. Ancak teknik şartlar nedeniyle çalışılan tüm örneklerden ortak olarak 420 nükleotidlik (356-775) diziler elde edildi (Şekil 7).

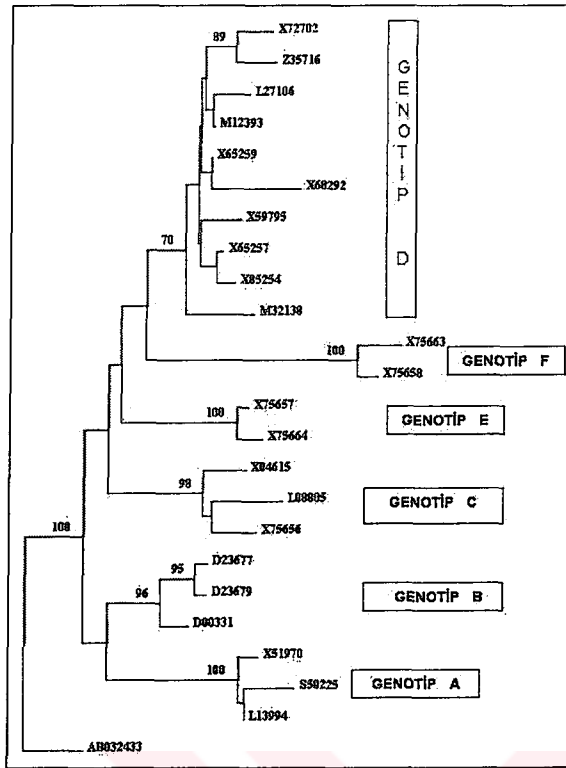
Bu dizilerle oluşturulacak filogenetik ağacın doğruluğunu sınamak için referans diziler ile bir çalışma gerçekleştirildi. Referans dizilerin 541 ve 420 nükleotid içeren bölümleri ile iki ayrı filogenetik ağaç oluşturuldu. Bu ağaçların topolojisinin aynı olduğu ve düğümlerdeki bootstrap değerlerinin birbirine yakın olduğu gözlemlendi (Şekil 8, 9). Bu nedenle 420 nükleotidlik bölgenin genotiplendirmede kullanılabileceğine karar verildi.

M32138	1	ACTTGTCTCTGTTATCGCTGGATGTCTGCGGGGTTTTTATCAATCTTCCTTCATCCCTGCTGCTATGCTCATCTCTCTGTGGTCTCTCTGGACTATCAAGGTATGTTGCCCGTTTGT
TR1	1	
TR2	1	
TR3	1	
TR4	1	
TR5	1	
TR6	1	
TR7	1	
TR8	1	
TR9	1	
TR10	1	
TR11	1	
TR12	1	
TR13	1	
TR14	1	
TR15	1	
TR16	1	
TR17	1	
TR18	1	
TR19	1	
TR20	1	
TR21	1	
TR22	1	
TR23	1	
AB	1	T.....
X75656	1	T.....C.....
X75663	1	C.....T.....
X75664	1	T.....C.....
X75657	1	T.....C.....
X75658	1	C.....T.....
L13994	1	T.....A.....
D23677	1	T.....G.....
Z35716	1	
X51970	1	T.....A.....
L27106	1	A.....T.....
X68292	1	T.....A.....
X72702	1	T.....A.....
M12393	1	
S50225	1	T.....A.....
D00331	1	T.....G.....
X04615	1	C.....
L08805	1	T.....C.....C.....

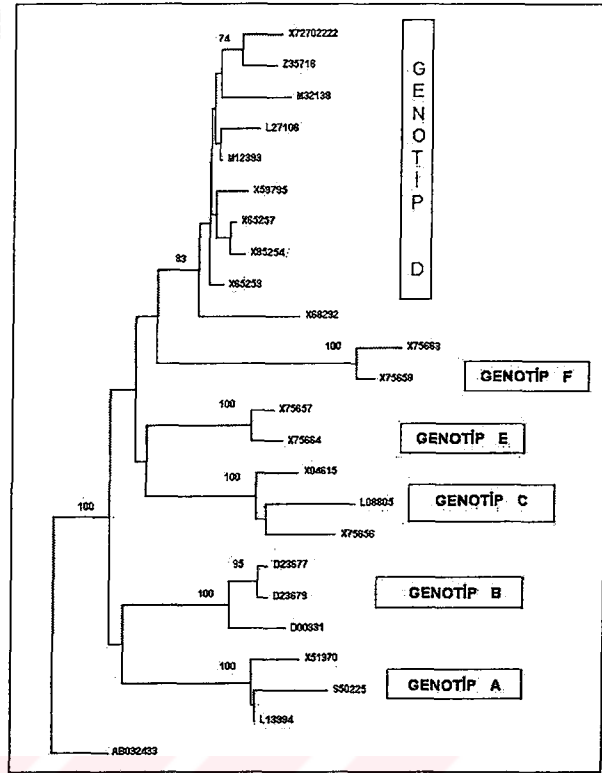
Şekil 7 : Çalışmada elde edilen nükleotid dizileri ile Gen-Bank'tan sağlanan nükleotid dizilerinin alt alta hizalanmış şekli
(TR ön eki ile belirtilenler çalışmada elde edilen dizilerdir)

M32138	121	CCTCTGATTCAGGATCTTCAACACCAAGCAGGACCATGCGAGACCTCTGCTCAAGGAACCTCTATGTATCCCTCTGTTGCTGTACCAAAACCTTCGGACGGAATTGC
TR1	121	A.....
TR2	121	A.....T.....
TR3	121	A.....
TR4	121	A.....A.....T.....
TR5	121	A.....T.....T.....
TR6	121	A.....T.....T.....
TR7	121	A.....G.....A.....
TR8	121	A.....G.....A.....T.....
TR9	121	A.....G.....A.....
TR10	121	A.....
TR11	121	A.....
TR12	121	A.....G.....
TR13	121	A.....T.....
TR14	121	A.....T.....
TR15	121	A.....T.....
TR16	121	A.....T.....
TR17	121	A.....G.....
TR18	121	A.....G.....
TR19	121	A.....
TR20	121	A.....T.....
TR21	121	A.....T.....A.....
TR22	121	A.....T.....
TR23	121	A.....T.....
AB	121	A.....C.....G.....A.....T.....T.....AT.....A.....
X75656	121	AC.....A.....A.....T.....AG.....T.....T.....A.....A.....C.....
X75663	121	AC.....CA.....G.....A.....AG.....T.....T.....T.....C.....C.....
X75664	121	A.....A.....A.....C.....C.....T.....T.....T.....A.....T.....A.....C.....
X75657	121	A.....A.....A.....T.....C.....C.....T.....T.....T.....A.....T.....A.....C.....
X75658	121	A.....A.....A.....G.....A.....A.....T.....T.....T.....C.....C.....
L13994	121	A.....AA.....A.....T.....A.....A.....CA.....T.....A.....A.....T.....C.....
D23677	121	A.....A.....A.....GT.....AG.....T.....A.....A.....T.....A.....T.....C.....
Z35716	121	A.....T.....AA.....A.....T.....A.....A.....T.....C.....A.....A.....T.....
X51970	121	A.....T.....G.....T.....T.....T.....A.....A.....A.....A.....T.....
L27106	121	A.....TA.....A.....G.....A.....
X68292	121	A.....A.....G.....A.....
X72702	121	A.....A.....T.....A.....
M12393	121	A.....AA.....A.....T.....A.....CA.....T.....T.....A.....A.....T.....
S50225	121	A.....A.....A.....A.....A.....A.....A.....A.....A.....C.....
D00331	121	AC.....A.....A.....T.....T.....T.....T.....T.....A.....A.....C.....
X04615	121	AC.....A.....A.....T.....T.....T.....T.....T.....A.....A.....C.....
L08805	121	AC.....A.....A.....T.....T.....T.....T.....T.....A.....A.....C.....

[illegible]



Şekil 8 : 420 nükleotid içeren dizilerle oluşturulan filogenetik ağaç



Şekil 9 : 541 nükleotid içeren dizilerle oluşturulan filogenetik ağaç

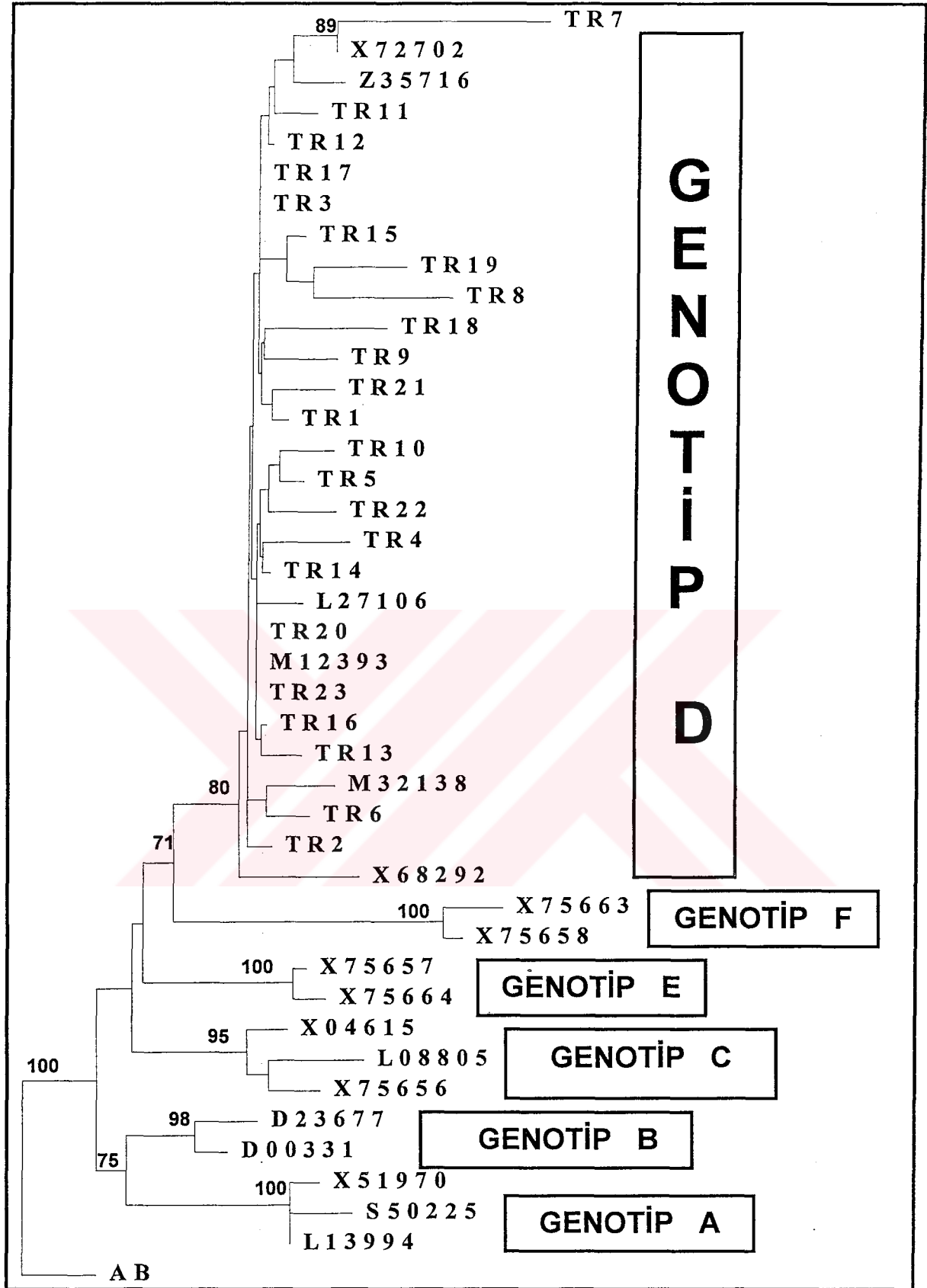
Elde edilen diziler ClustalW programında karşılaştırılarak nükleotidler arasındaki evrimsel uzaklık (distance) değerleri belirlendi. Bu değerler 0.0000 ile 0.0699 arasında idi (ortalama 0.0190) (Tablo 5).

Gen Bank'ten sağlanan genotipleri belli HBV dizileri ile bu çalışmada elde edilen diziler Treecon programında Jukes-Cantor düzeltmesi uygulanmış evrimsel uzaklık değerleri kullanılarak neighbour-joining yöntemi ile karşılaştırıldı. İncelenen 23 örneğin tamamının filogenetik ağaçta genotip D içinde kümelendiği gözlemlendi (Şekil 10).

Dörtüzyirmi nükleotidlik diziler DNASIS v2.5 ve DNA Club programları kullanılarak aminoasit kodlarına çevrildi. Bu dizilerde 122, 127, 134, 159 ve 160. pozisyonlardaki aminoasitlere göre subtip tayini yapıldı (4, 55, 195, 201). Dizilerin tümünde 122. pozisyonunda arginin ve 160. pozisyonunda lizin bulunması ile ayw subtipi belirlendi. w determinantının subtiplerini belirlemek için dizilerde 127, 134 ve 159. pozisyonlardaki aminoasitler incelendi. Bunun sonucunda 21 örnekte 134. pozisyonunda fenil alanin ve 159. pozisyonunda alanin bulunmaksızın 127. pozisyonunda prolin bulunması ile ayw2 subtipi tanımlandı. İki örnekte 127. pozisyonunda treonin bulunması ile ayw3 subtipi saptandı (Şekil 11).

Tablo 5 : Çalışmada elde edilen nükleotid dizileri arasındaki evrimsel uzaklık(distance)
(Sütün ve satır başlarındaki koyu renkli sayılar izolat numaralarını göstermektedir)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
1	0.0000	0.0120	0.0048	0.0217	0.0145	0.0169	0.0493	0.0341	0.0144	0.0169	0.0144	0.0072	0.0144	0.0096	0.0120	0.0096	0.0048	0.0242	0.0267	0.0072	0.0120	0.0169	0.0072
2		0.0000	0.0072	0.0193	0.0120	0.0144	0.0518	0.0366	0.0144	0.0169	0.0169	0.0096	0.0120	0.0072	0.0144	0.0072	0.0072	0.0267	0.0291	0.0048	0.0193	0.0144	0.0048
3			0.0000	0.0169	0.0096	0.0120	0.0442	0.0291	0.0144	0.0120	0.0096	0.0024	0.0096	0.0048	0.0072	0.0048	0.0000	0.0193	0.0218	0.0024	0.0120	0.0120	0.0024
4				0.0000	0.0193	0.0242	0.0544	0.0366	0.0291	0.0242	0.0267	0.0193	0.0217	0.0144	0.0242	0.0169	0.0169	0.0366	0.0391	0.0144	0.0217	0.0120	0.0144
5					0.0000	0.0169	0.0543	0.0366	0.0217	0.0120	0.0144	0.0120	0.0145	0.0096	0.0169	0.0096	0.0096	0.0291	0.0316	0.0072	0.0193	0.0120	0.0072
6						0.0000	0.0569	0.0416	0.0242	0.0242	0.0217	0.0144	0.0169	0.0120	0.0193	0.0120	0.0120	0.0316	0.0341	0.0096	0.0242	0.0193	0.0096
7							0.0000	0.0699	0.0569	0.0544	0.0442	0.0417	0.0543	0.0341	0.0291	0.0468	0.0493	0.0442	0.0622	0.0675	0.0467	0.0518	0.0467
8								0.0000	0.0441	0.0391	0.0391	0.0316	0.0391	0.0341	0.0291	0.0341	0.0341	0.0291	0.0467	0.0341	0.0316	0.0366	0.0316
9									0.0000	0.0267	0.0242	0.0169	0.0217	0.0169	0.0218	0.0169	0.0169	0.0144	0.0291	0.0367	0.0144	0.0217	0.0144
10										0.0000	0.0169	0.0144	0.0218	0.0169	0.0193	0.0169	0.0120	0.0316	0.0341	0.0341	0.0144	0.0217	0.0144
11											0.0000	0.0072	0.0193	0.0144	0.0169	0.0144	0.0096	0.0267	0.0317	0.0120	0.0217	0.0169	0.0120
12												0.0000	0.0120	0.0072	0.0096	0.0072	0.0024	0.0193	0.0242	0.0048	0.0144	0.0144	0.0048
13													0.0000	0.0096	0.0169	0.0072	0.0096	0.0291	0.0316	0.0072	0.0217	0.0169	0.0072
14														0.0000	0.0120	0.0048	0.0048	0.0242	0.0267	0.0024	0.0144	0.0120	0.0024
15															0.0000	0.0120	0.0072	0.0267	0.0193	0.0096	0.0193	0.0193	0.0096
16																0.0000	0.0048	0.0242	0.0267	0.0024	0.0169	0.0120	0.0024
17																	0.0000	0.0193	0.0218	0.0024	0.0120	0.0120	0.0024
18																		0.0000	0.0366	0.0217	0.0316	0.0316	0.0217
19																			0.0000	0.0242	0.0342	0.0341	0.0242
20																				0.0000	0.0144	0.0096	0.0000
21																					0.0000	0.0242	0.0144
22																						0.0000	0.0096
23																							0.0000



Şekil 10 : HBV-DNA S gen nükleotid dizilerinin filogenetik analizi

Ağaçtaki sayılar bootstrap değerlerini göstermektedir(örnekleme sayısı 1000).TR ön eki bulunanlar bu çalışmada yer alan dizileri, diğerleri ise Gen-Bank'ten elde edilen dizileri göstermektedir. Dış grup olarak şempanze HBV izolatı (AB032433) kullanılmıştır (25).

	122	127	134	160
	V	V	V	V
M	TC	PG	YR	WM
X				
TR1				
TR2				
TR3				
TR4				
TR5				
TR6				
TR7				
TR8				
TR9				
TR10				
TR11				
TR12				
TR13				
TR14				
TR15				
TR16				
TR17				
TR18				
TR19				
TR20				
TR21				
TR22				
TR23				

Şekil 11: HBV-DNA S gen aminoasit dizileri (M Gen-Bank'dan elde edilen M32138 ; X Gen-Bank'dan elde edilen X72702 ve TR ile belirlenenler çalışmada elde edilen dizileri tanımlamaktadır)

6.3 RFLP Bulguları

DNASIS v2.5 (200) ve DNA Club programları ile Gen Bank'ten elde edilen genotipleri belli 68 HBV dizisi üzerinde genotiplere özgü restriksiyon paternleri belirlendi. Bunun sonucunda *Mva I* enzimine ait 10 (M1-M10), *Rsa I* enzimine ait 8 (R1-R8) ve *Hinf I* enzimine ait 5 (H1-H5) kalıp olmak üzere 20 bileşik kalıp elde edildi. (Tablo 6, 7, 8, 9,10)

Gen Bank dizilerinden genotip A' yı temsil eden 4 restriksiyon kalıbı (A1-A4) belirlendi. Bunlara ait RFLP'nin karakteristik özelliği *Rsa I* enzimi ile elde edilen R1 ve R2 kalıpları olup, bu kalıplar diğer genotiplerde gözlenmedi. Major genotip A kalıbı A2 Gen Bank dizilerinin % 62.5'inde (5/ 8) saptandı.

Genotip B içinde 3 kombine kalıp (B1- B3) gözlemlendi ve bunlardan B1'in Gen Bank dizilerinin % 75'inde bulunduğu dikkat çekti. B genotipinde gözlenen M4 kalıbı diğer genotiplerde gözlenmez iken M3 kalıbının B genotipi dışında genotip A' da da bulunduğu saptandı. Bu durumda genotip A' dan genotip B' nin ayrımında genotip A' da gözlenmeyen R3 kalıbı yardımcı oldu.

Tüm genotip C Gen Bank dizilerinde nükleotid 633' de *Hinf I* enzimine ait kesim noktası ile özellenen H4 kalıbı saptandı ve bu kalıp diğer genotiplere ait dizilerde gözlenmedi. Bileşik kalıp C1, 20 Gen Bank dizisinin 19'unda bulunurken sadece 1 Gen Bank dizisinde bileşik kalıp C2 belirlendi.

Genotip D içinde 6 bileşik kalıp (D1-D6) belirlendi. Major bileşik kalıp D1 Gen Bank dizilerinin % 36.8'inde (7 / 19); D2 % 31.5'inde (6 / 19); D3, D5 ve D6 % 5.3' ünde (1/ 19); D4 ise % 15.8'inde (3 / 19) inde saptandı. *Mva I* enzimine ait kalıplardan M7, M8, M9 genotip D içindeki dizilerde bulunurken genotip A, B, C ve F'ye ait dizilerde saptanmadı. Ancak M8 kalıbı aynı zamanda genotip E dizilerinde gözlemlendi. Bu noktada genotip D içinde yer alan *Rsa I* kalıplarından R3, R4 ve R5' in genotip E içindeki dizilerde bulunmadığı dikkat çekti.

Genotip E' ya ait dizilerde iki bileşik kalıp (E1- E2) gözlemlendi. *Rsa I* enzimine ait olan R6 ve R7 kalıpları bu genotipe özgü dizilerde saptanırken diğer genotiplerde bulunmadı.

Tüm genotip F dizileri ise *Rsa I* enzimine ait kesim bölgesine sahip olmamaları ile diğer genotiplerden ayrıldılar. Bu genotip içinde 3 bileşik kalıp (F1- F3) bulundu.

Değerlendirmeler sonucunda çalışmamızda yer alan 23 örneğin de genotip D kalıbı gösterdiği saptandı. Ondokuz örnekte (% 82.6) D1 kalıbı gözlenirken 4 örneğin (% 17.4) D4 kalıbına ait olduğu belirlendi. (Şekil 12)

Tablo 6 : *Mva I* kesim noktaları (nt pozisyonu)

Genotip	278	291	299	362	485	618	666	Fragmanlar	Mva I Patern
A				x	x	x		178,133,123,107	M1
				x				434,107	M2
				x	x			311,123,107	M3
B				x	x			311,123,107	M3
	x			x	x			311,123,84,23	M4
C			x	x	x	x	x	133,130,123,63,48,44	M5
			x	x	x		x	181,130,123,63,44	M6
D				x	x	x	x	133,130,123,107,48	M7
				x	x		x	181,130,123,107	M8
	x				x	x	x	207,133,130,48,23	M9
E				x	x		x	181,130,123,107	M8
F		x	x	x	x		x	181,130,123,63,36,8	M10
			x	x	x		x	181,130,123,63,44	M6
			x	x	x	x	x	133,130,123,63,48,44	M5

Tablo 7 : *Rsa I* kesim noktaları (nt pozisyonu)

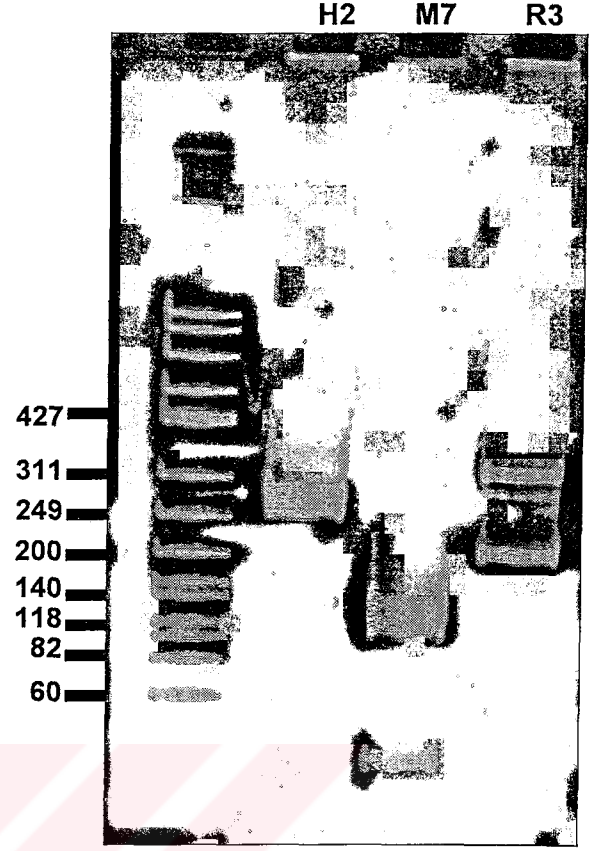
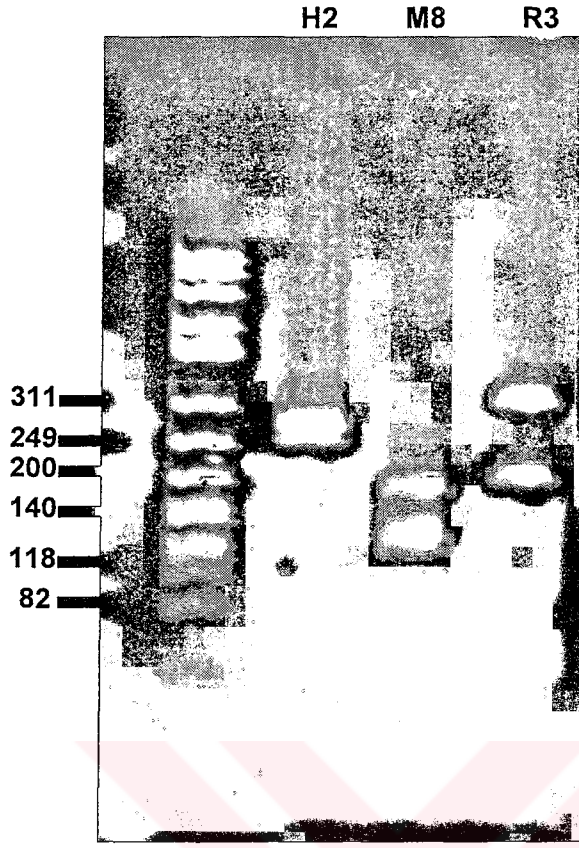
Genotip	489	504	570	751	769	Fragmanlar	Rsa I Patern
A		x	x		x	249,199,66,27	R1
			x	x	x	315,181,27,18	R2
B			x		x	315,199,27	R3
C			x		x	315,199,27	R3
D			x			315,226	R4
			x		x	315,199,27	R3
	x		x		x	234,199,81,27	R5
E					x	514,27	R6
		x			x	265,249,27	R7
F						541	R8

Tablo 8 : *Hinf I* kesim noktaları (nt pozisyonu)

Genotip	482	529	633	781	Fragmanlar	Hinf I Patern
A		x			274,267	H1
		x		x	274,252,15	H2
B		x		x	274,252,15	H2
				x	526,15	H3
C		x	x	x	274,148,105,15	H4
D	x	x		x	252,227,47,15	H5
				x	526,15	H3
		x		x	274,252,15	H2
E		x		x	274,252,15	H2
F				x	526,15	H3

Tablo 9 : Genotiplere özgü bileşik kalıplar

Genotip	Bileşik Kalıplar	Gen Bank. Sayı
A	M1, R1,H1 → A1	1
	M1, R1,H2 → A21	5
	M2, R1,H1 → A31	1
	M3, R2,H2 → A4	1
B	M3, R3,H3 → B1	12
	M3, R3,H2 → B2	3
	M4, R3,H3 → B3	1
	M5, R3,H4 → C1	19
C	M6, R3,H4 → C2	1
	M7, R3,H2 → D1	7
D	M7, R3,H3 → D2	6
	M7, R4,H5 → D3	1
	M8, R3,H2 → D4	3
	M8, R5,H2 → D5	1
	M9, R3,H2 → D6	1
	M8, R6,H2 → E1	1
E	M8, R7,H2 → E2	1
	M5, R8,H3 → F1	1
F	M6, R8,H3 → F2	1
	M10, R8,H3 → F3	1



Şekil 12 : Elde edilen RFLP kalıplarına iki örnek

Tablo 10 : Gen-Bank'ten elde edilen DNA dizilerinin Gen-Bank No ve RFLP kalıpları

Genotip	Gen Bank No	S gen RFLP	Genotip	Gen Bank No	S gen RFLP
A	L13994	A2	C	S75184	C1
	X51970	A3		D16666	C1
	S50525	A1		D50517	C1
	V00866	A2		D50519	C1
	Z35716	A2		D50520	C1
	X70185	A2		D50489	C1
	Z72478	A2		D16665	C1
	M57663	A4		D16667	C1
B	D50521	B3	D	M38636	C1
	D50522	B1		X14193	C1
	X98072	B1		M32138	D3
	X98073	B1		X72702	D2
	X98074	B1		Z35716	D2
	X98075	B1		X85254	D4
	X98076	B1		J02203	D2
	X98077	B1		X02496	D6
	D23677	B1		L27106	D1
	D23678	B1		X68292	D5
	D23679	B1		X59795	D4
	D00329	B2		X65257	D1
	D00330	B1		X65259	D4
	D00331	B2		M12393	D1
	M54923	B2		X80925	D2
	X97851	B1		X97849	D2
C	X75656	C1	E	U95551	D2
	X04615	C1		Y07857	D1
	X75665	C1		X97848	D1
	L08805	C2		X80924	D1
	V00867	C1		X80926	D1
	D23680	C1		X75664	E1
	D23861	C1		X75657	E2
	D23682	C1	F	X69798	F1
	D23683	C1		X75658	F2
	D23684	C1		X75663	F3

7. TARTIŞMA

Hepatit B virus akut ve kronik hepatit yanı sıra siroz ve hepatosellüler karsinom gibi ciddi sağlık sorunlarına neden olabilen ve tüm dünyada yaygın olarak bulunan bir virustur. Tüm dünyada üçyüz milyondan fazla kişinin HBV taşıyıcısı olduğu tahmin edilmektedir (1).

Son yıllarda HBV kökenlerinin nükleotid dizilerindeki farklılıklara göre 6 ayrı genotipe (A-F) ayrıldığı gösterilmiştir. Farklı genotiplerin nükleotid dizileri arasında tüm genom için en az % 8, S geni düzeyinde ise yaklaşık % 4 oranında farklılık vardır (3-6, 55).

HBsAg subtipleri (ayw1, ayw2, ayw3, ayw4, ayr, adw2, adw4, adr^{q+} ve adr^{q-}) bu genotiplerden biri veya birkaçı ile ilişkilidir (4). Yakın zamanda Stuyver ve arkadaşları tarafından yeni bir genotip (genotip G) tanımlanmış ve bu genotip içindeki türlerin adw2 subtipine sahip oldukları bildirilmiştir (7).

HBV genotiplerinin yeryüzündeki dağılımları coğrafi bölgelere göre değişmektedir. Kuzeybatı Avrupa ve Sahra altı Afrika'da genotip A, Uzak Doğu'da genotip B ve C, Batı Afrika'da genotip E, Amerika'da genotip F dikkati çekmektedir. Tüm dünyada yaygın olarak gözlenen genotip D esas olarak Akdeniz bölgesinde baskındır (4).

Ayrıca enfeksiyonun bulaş yolu, hepatosellüler karsinoma gelişimi, aşılama ile oluşan bağışık yanıtı duyarlılık ve tedaviye yanıt gibi özellikler genotiplerle yakın ilişkilidir. Bu nedenle HBV suşlarının genotiplendirilmesi enfeksiyonun epidemiyolojik ve patojenik özelliklerine açıklama getirebilir (6).

HBV genotiplerinin belirlenmesinde en doğrudan yaklaşım nükleotid dizilerinin filogenetik analizidir.

Filogenetik analiz ile HBV genotiplerinin belirlenmesinde ideal olan tüm genoma ait dizilerin kullanılmasıdır. Ancak bu zaman alıcı ve pahalı olduğu için bu tür çalışmalarda S geni gibi subgenomik diziler kullanılmaktadır (5). Norder ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada farklı genotiplere ait HBV suşlarında pre-S1, pre-S2, S, C, P ve X gen dizileri ile oluşturdukları filogenetik ağaçları, tüm genomik dizi kullanılarak elde edilen ağaç ile karşılaştırmışlardır. Bu çalışmada S geninde nükleotid 155-832 arasında yer alan bölgenin (HBsAg) HBV genomunda oldukça korunmuş bir bölge olduğu ve genotiplendirme için kullanılabileceği bildirilmiştir (5). Değişik araştırmacılar S geninin dizi analizi ile gerçekleştirilen HBV genotiplendirmesinin, tüm genom ile yapılanlarla tutarlı olduğunu bildirmişlerdir (56, 199).

Biz de çalışmamızda S gen bölgesine ait dizileri kullandık. Bu bölgenin amplifikasyonu için S gen bölgesinin korunmuş bölgelerine ait olan öncüller (13) ile oluşturduğumuz PZT’de testin 19 kopya/mL HBV-DNA’ yı saptayabildiğini belirledik. Analitik duyarlılığı yüksek olan bu protokolün tanı amaçlı testlerde de kullanılabileceğini düşünüyoruz.

PZT’de tüm serum örneklerinden HBV S gen bölgesine ait olan 541 nükleotidlik diziler elde edilmekle birlikte dizileme analizinde teknik şartlar nedeniyle tüm örneklerde ortak olarak 420 nükleotidlik dizi verisi sağlandı. Bu dizilerle oluşturulacak filogenetik ağacın doğruluğunu kontrol etmek amacıyla referans dizilerin 541 ve 420 nükleotid içeren bölümleri ile iki ayrı filogenetik ağaç oluşturulduğunda ağaç topolojilerinin benzer ve bootstrap değerlerinin birbirine yakın olduğu gözlemlendi. Filogenetik analiz çalışmalarında bootstrap değeri yüze ne kadar yakınsa ağacın topolojisinin o kadar güvenilir olduğu varsayılır (189). Genel olarak herhangi bir dal % 70’in üzerinde bir bootstrap değerine sahipse bunun doğruluğu % 95 seviyesindedir (191, 193). Bu nedenle, 356 ile 775. pozisyonlar arasındaki 420 nükleotidlik bölgenin genotiplendirme için uygun olduğu düşünüldü. S gen bölgesine ait yaklaşık 240 nükleotid içeren genom parçaları ile yapılan genotiplendirme çalışmaları da vardır (60, 202).

S gen bölgesine ait nükleotid dizileri ile gerçekleştirdiğimiz filogenetik analizde diziler arasındaki uzaklığı Jukes-Cantor yöntemi ile hesapladık. Tüm uzaklıklar her 100 bazda 10 yer değiştirmeye eşit veya daha az ise Jukes-Cantor düzeltmesi uygun bir yaklaşımdır (193). Bizim dizilerimizde de nükleotid yer değişim hızı en fazla % 6.99’dur. Genotipleri belli referans diziler ile bu çalışmada elde edilen diziler karşılaştırıldığında genotip F’ye ait örneklerle olan farklılık oranının göreceli olarak yüksek olduğu belirlendi (veriler gösterilmemiştir). Bu bulgu , genotip F virusların diğer genotiplerden %15’e varan oranda farklılık göstermesi ile ilişkili olabilir (59).

Elde ettiğimiz diziler ve Gen-Bank’tan sağlanan genotipleri belli HBV dizileri ile filogenetik ağaç oluşturmak için neighbour-joining yöntemi kullandık. Uzaklık metodları içinde yer alan bu yöntem diziler arasında orta derecede değişim varlığında ve fazla sayıdaki diziler için uygun olup (191, 193) virüslara ait filogenetik analiz çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır (7, 13, 199, 203-205).

Filogenetik analiz sonucunda çalışmaya alınan tüm örneklerin genotip D içinde kümelendiği görüldü.

Ülkemizde var olan HBV genotiplerine ilişkin veriler son derece sınırlıdır. Külâh ve arkadaşları HBV enfeksiyonu olan 42 hastada S gen bölgesinin nükleotid dizi analizi ile

yaptıkları çalışmada tüm izolatların genotip D içinde yer aldığını gözlemişlerdir (206). Mısırlıoğlu ve arkadaşları İskenderun'da 57 HBsAg pozitif ilkökul çocuğunda S gen dizi analizi ile HBV genotip D'yi saptamışlardır (207). Bozdayı ve arkadaşları 67 hasta üzerinde pre-S gen bölgesi dizileri ile yaptıkları genotiplendirme çalışmasında tüm hastalarda genotip D'yi ve multipleks PCR ile ayw subtipini saptamışlardır. Ayrıca genotip D içinde sıklıkla gözlenen prekor stop kodon mutasyonunun HBeAg negatif Türk hastalarda da varlığına dikkat çekmişlerdir (208). Bu veriler ile bizim bulgularımız uyumlu olarak görülmektedir. Bu çalışmalarda ülkemizde genotip D ile birlikte bu genotipe ait ayw subtipinin varlığından söz edilmekle birlikte w determinantının alt grubu hakkında bilgi yoktur.

HBsAg subtiplerinin belirlenmesinde belirlenmesinde temel yaklaşım subtiplere özgü antikorların kullanıldığı immunoassay teknikleridir (209). Ancak, bu yöntem ek bir ekonomik yük getirdiğinden, nükleotid dizilerinin elde edildiği çalışmalarda bu dizilerin aminoasit dizilerine çevrilmesi ve belli bölgelerdeki aminoasit değişimlerinin incelenmesi ile de subtip analizi yapılabilmektedir (7, 8, 56, 210).

Bizim dizilerimizin tümünde 122. pozisyonda arginin ve 160. pozisyonda lizin bulunması ile ayw subtipi belirlendi. Yirmibir örnekte 134. pozisyonda fenil alanin ve 159. pozisyonda alanin bulunmaksızın 127. pozisyonda prolin bulunması ile ayw2 subtipi, iki örnekte 127. pozisyonda treonin bulunması ile ayw3 subtipi saptandı.

Elde ettiğimiz bulgular, Akdeniz bölgesinde genotip D ile birlikte ayw2 ve ayw3 subtiplerinin gözlemlendiğini belirten literatür verileri ile uyumludur (4, 211).

Ayrıca Akdeniz ülkelerinde baskın olan HBV genotip D içinde esas bulaş yolunun yatay geçiş olduğunu belirten literatür verileri (9) ile ülkemizde yatay bulaşın ön planda yer aldığını gösteren bulgular (145, 146) birbirini destekler niteliktedir.

Genotiplendirmelerde nükleotid dizilerinin filogenetik analizi altın standart olmasına karşın bu yöntem çok sayıdaki örnek için pahalı ve zaman alıcıdır. Bu nedenle araştırmacılar HBV kökenlerinin genotiplendirmesi için değişik yöntemler aramaya yönelmişlerdir. Tipe özgü öncüllerin kullanıldığı PZT ile HBV genotiplendirme çalışmaları yapılmış ancak bunların tüm genotipleri tanımlayamadığı ve genotiplerle değil serotiplerle ilişkili olduğu gözlenmiştir (212, 213).

HBV genotiplendirmesinde bir diğer yaklaşım PZT ürünlerinin restriksiyon enzimleri ile kesilerek, elde edilen kalıpların (paternlerin) karşılaştırılmasına dayanan RFLP (restriction fragment length polymorphism) yöntemidir.

Lindh ve arkadaşları HBV S gen ürünlerinin *Hinf I*, *Tsp 5091* ve *BsrI* enzimleri ile restriksiyon analizini yaparak genotiplere özgü RFLP kalıbı oluşturmuşlar ve S geninin RFLP

analizi ile HBV genotiplendirmesinin yapılabileceğini ortaya koymuşlardır (13). Bu çalışmalarında 180 örneğin 166'sında tipik RFLP kalıbı saptarken 14 örneğin atipik kalıp gösterdiğini gözlemişlerdir. Daha sonra, yine Lindh ve arkadaşları pre-S gen bölgesinin analizine dayanan yeni bir RFLP kalıbı ile HBV genotiplendirme çalışması gerçekleştirmişler ve daha önce genotiplendiremedikleri 14 örneğin 11'ini bu şekilde genotiplendirebilmişlerdir (203). Bu çalışmaları ile pre-S gen bölgesinin RFLP analizinin genotiplendirme için uygun olduğunu belirtmişlerdir.

Mizokami ve arkadaşları S gen bölgesine ait PCR ürünlerinin sırasıyla *AlwI*, *EaeI*, *HphI* ve *Nci I*, *Nla IV* enzimleri ile kesilmesiyle adım adım genotip analizi yapmışlar ve her adımda farklı bir genotipi (A-F) tanımlamışlardır (199). Bulgularını nükleotid dizilerinin filogenetik analizi ile doğrulayan araştırmacılar S gen bölgesinin genotiplendirme için uygun olduğunu bir kez daha vurgulamışlardır.

Sheng Li ve arkadaşları, Mizokami ve arkadaşlarının tanımladıkları RFLP analizini kullanarak genotiplendirme çalışması yapmış ve genotipler ile prekor/kor bölge mutasyonları arasındaki ilişkiyi incelemişlerdir (214). Ayrıca epidemiyolojik araştırmalarda RFLP analizi ile HBV genotiplendirmesinin yapıldığı çalışmalar da vardır (215, 216). Biz de çalışmamızda RFLP analizini S gen bölgesine ait ürünlerde gerçekleştirdik. Gen-Bank'ten elde edilen genotipleri belli 68 HBV DNA dizisi üzerinde *Mva I*, *Rsa I* ve *Hinf I* enzimleri ile oluşturduğumuz genotiplere özgü RFLP kalıpları ile tüm örneklerimizin genotip D içinde yer aldığını gözledik. Genotip D içinde saptanan 6 bileşik kalıptan Gen-Bank dizilerinde hakim olan D1 kalıbı bizim örneklerimizde de baskındı.

Genotiplere özgü RFLP kalıpları her enzim için ayrı olarak incelendiğinde M7 kalıbının genotip D'ye özgü olduğu, diğer genotiplerde gözlenmediği dikkati çekti. Bizim dizilerimizin de 19'unda M7 kalıbı saptanmıştır. Bu bilgiler ışığında genotip D'nin baskın olduğu ülkemizde ve diğer coğrafi bölgelerde sadece *Mva I* enzimi ile analiz yapıp M7 kalıbı saptandığında başka enzim analizine gerek olmadığı; M8 kalıbı varlığında ise *Rsa I* analizi ile genotip D'nin tanımlanabileceği söylenebilir. Bu bakış açısıyla genotip A, E ve F analizi sadece *Rsa I* enzimi ile, genotip C analizi ise sadece *Hinf I* enzimi ile yapılabilmektedir. Bu veriler, söz konusu genotiplerin baskın olduğu bölgeler için genotiplendirme çalışmalarında tek enzim ile restriksiyon analizinin ekonomik bir yaklaşım olabileceğini düşündürmektedir. Ancak RFLP uygulamalarında bazen parsiyel kesimlere bağlı olarak atipik kalıpların ortaya çıkabildiği, kalıpların değerlendirilmesinin deneyim gerektirdiği unutulmamalıdır.

Filogenetik analiz verileri ile birlikte değerlendirildiğinde bu çalışmada sunulan RFLP yaklaşımının genotip D'ye ait diziler için doğru sonuç verdiği görülmektedir. Ancak genotip D dışı virus kökenleri elimizde olmadığından , kuramsal olarak bulduğumuz kalıpların gerçek örneklerle sınanması gereklidir.

Sonuç olarak, bu çalışmada

- İncelenen 23 rneğin tümü genotip D ve ayw3 olarak subtipi belirlenen iki örnek dışında tümü ayw2 olarak saptanmış,
- Dizi analizi uygulanan 356 ile 775. pozisyonlar arasındaki bölgenin izolatlar arasındaki filogenetik ilişkilerin tanımlanması açısından uygun olduğu gösterilmiş ve
- RFLP ile *Mva I*, *Rsa I* ve *Hinf I* enzimlerinin tek başına ya da birarada kullanılması ile genotip analizinin yapılabilieceği ortaya konmuştur.



8. KAYNAKLAR

- 1- Lee WM: Hepatitis B virus infection. *N Engl J Med* 1997; 337: 1733-1745
- 2- Mahoney FJ. Update on diagnosis, management and prevention of hepatitis B virus infection. *Clin Microbiol Rev* 1999; 12: 351-366
- 3- Okamoto H, Tsuda F, Sakugawa H, Sastrosoewignjo RI, et al. Typing hepatitis B virus by homology in nucleotide sequence: comparison of surface antigen subtypes. *J Gen Virol* 1988; 69: 2575-2583
- 4- Magnus LO, Norder H. Subtypes, genotypes and molecular epidemiology of the hepatitis B virus as reflected by sequence variability of the S-gene. *Intervirology* 1995; 38: 24-34
- 5- Norder H, Courouce AM, Magnus LO. Complete genomes, phylogenetic relatedness and structural proteins of six strains of the hepatitis B virus, four major of which represent two new genotypes. *Virology* 1994; 198: 489-503
- 6- Norder H, Hammas B, Lee SD, Bile K, Courouce AM, Mushahvar IK, Magnus LO. Genetic relatedness of hepatitis B viral strains of diverse geographical origin and natural variations in the primary structure of the surface antigen. *J Gen Virol* 1993; 74: 1341-1348
- 7- Stuyver L, Gendt SD, Geyt CV, Zoulim F, et al. A new genotype of hepatitis B virus: complete genome and phylogenetic relatedness. *J Gen Virol* 2000; 81: 67-74
- 8- Blitz L, Pujol FH, Swenson PD, Porto L, Atencio R, et al. Antigenic diversity of hepatitis B virus strains of genotype F in Amerindians and other population groups from Venezuela. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 648-651
- 9- Arauz-Ruiz P, Norder H, Visona KA, Magnus LO. Molecular epidemiology of hepatitis B virus in Central America reflected in the genetic variability of the small S gene. *J Infect Dis* 1997; 176: 851- 858
- 10- Kao JH, Chen PJ, Lai MY, Chen DS. Hepatitis B genotypes correlate with clinical outcomes in patients with chronic hepatitis B. *Gastroenterology* 2000; 118: 554-559
- 11- Takahashi K, Akahane Y, Hino K, Ohta Y, Mishiro S. Hepatitis B virus genomic sequence in the circulation of hepatocellular carcinoma patients: comparative analysis of 40 full-length isolates. *Arch Virol* 1998; 143: 2313-2326
- 12- Zhang X, Zoulim F, Habersetzer F, Xiong S, Trepo C. Analysis of hepatitis B virus genotypes and pre-core region variability during interferon treatment of Hbe antigen negative chronic hepatitis B. *J Med Virol* 1996; 48: 8-16

- 13-Lindh M, Andersson AN, Gusdal A. Genotypes, nt 1858 variants and geographic origin of hepatitis B virus-Large scale analysis a new genotyping method. *J Infect Dis* 1997; 175: 1285-1293
- 14-Rodriguez-Frias F, Buti M, Jardi R, Cotrina M, et al. Hepatitis B virus infection: Precore mutants and its relation to viral genotypes and core mutations. *Hepatology* 1995; 22: 1641-1647
- 15-Li JS, Tong SP, Wen YM, Vitvitski L, Zhang Q, Trepo C. Hepatitis B virus genotype A rarely circulates as an HBe-minus mutant: possible contribution of a single nucleotide in the precore region. *Virology* 1993; 67: 5402-5410
- 16-Gust ID, Burrell CJ, Coulepis AG, Robinson WS, Zuckerman AJ. Taxonomic classification of human hepatitis B virus. *Intervirology*. 1986; 25: 14-29
- 17-Szmuness W. Hepatocellular carcinoma and the hepatitis B virus: Evidence for a causal association. *Proc Med Virol*. 1978; 24: 40
- 18-Ganem D, Varmus HE. The molecular biology of hepatitis B viruses. *Annu Rev Biochem*. 1987; 56: 651-693
- 19-Mason WS, Seal G, Summers J. Virus of Pekin ducks with structural and biological relatedness to human hepatitis B virus. *J Virol*. 1980; 36: 829-836
- 20-Summers J, Smolec JM, Snyder R. A virus similar to human hepatitis B virus associated with hepatitis and hepatoma in woodchucks. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1978; 75: 4533-4537
- 21-Marion PL, Oshiro L, Regnery DC, et al. A virus in Beechey ground squirrels that is related to hepatitis B virus of man. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1980; 77: 2941-2945
- 22-Robinson WS. Genetic variation among hepatitis B and related viruses. *Ann NY Acad Sci*. 1980; 354: 371-378
- 23-Heermann KH, Goldman U, Schwartz W, Seyfarth T, Baumgarten H, Gerlich WH. Large surface proteins of hepatitis B virus containing the pre-S sequence. *J Virol*. 1984; 52: 396-402
- 24-Xiolei H, Margolis HS, Purcell RH, Ebert J, Robertson BH. Identification of hepatitis B virus indigenous to chimpanzees. *Proc Natl Acad Sci* 2000; 97: 1661-1664
- 25-Takahashi K, Brotman B, Usuda S, Mishiro S, Prince AM. Full genome sequence analysis of hepatitis B virus (HBV) strains recovered from chimpanzees infected in the wild: implications for an origin of HBV. *Virology* 2000; 267: 58-64

- 26- Warren KS, Heeney JL, Swan RA, et al. A new group of Hepadnaviruses naturally infecting orangutans (*Pongo pygmaeus*). *J Virol* 1999; 73: 7860-7865
- 27- Lanford R, Chavez D, Rico-Hesse R, Mootnick A. Hepadnavirus infection in captive gibbons. *J Virol* 2000; 74: 2955-2959
- 28- Norder H, Ebert JW, Fields HA, Mushahvar IK, Magnus LO. Complete sequencing of a gibbon hepatitis B virus genome reveals a unique genotype distantly related to the chimpanzee hepatitis B virus. *Virology* 1996; 218: 214-223
- 29- Dane DS, Cameron CH, Briggs M. Virus-like particles in serum of patients with Australia antigen associated hepatitis. *Lancet* 1970; 2: 695-698
- 30- Almedia JD, Rubenstein D, Stott EJ. New antigen antibody system in Australia antigen positive hepatitis. *Lancet* 1971; 2: 1225-1227
- 31- Tiollais P, Pourcel C, Dejean A. The hepatitis B virus. *Nature* 1985; 317: 489-495
- 32- Lin HJ. Biochemical detection of hepatitis B virus constituents. *Adv Clin Chem.* 1989; 27: 143-199
- 33- Lau JYN, Wright TL. Molecular virology and pathogenesis of hepatitis B. *The Lancet* 1993; 342: 1335-1339
- 34- Summers J, Smith PM, Horwich AL. Hepadnavirus envelope proteins regulate covalently closed circular DNA amplification. *J Virol.* 1990; 64: 2819-2824
- 35- Stibbe W, Gerlich WH. Structural relationships between minor and major proteins of hepatitis B surface antigen. *J Virol* 1983 ;46 (2): 626-628
- 36- Neurath AR, Kent SB, Strick N, Parker K. Identification and chemical synthesis of a host cell receptor binding site on hepatitis B virus. *Cell* 1986; 46: 429-436
- 37- Pontisso P, Petit MA, Bankowski MJ, Peeples K. Human liver plasma membranes contain receptors for the hepatitis B virus pre-S1 region and, via polymerized human serum albumin, for the pre-S2 region. *J Virol* 1989; 63: 1981-1988
- 38- Gerlich WH, Lu X, Heerman H. Studies on the attachment and penetration of hepatitis B virus. *J Hepatol.* 1993; 17: 10-14
- 39- Uy A, Bruss V, Gerlich WH, et al. Precore sequence of hepatitis B virus inducing e antigen and membrane association of the viral core protein. *Virology* 1986; 155: 89-96
- 40- Ou JH, Laub O, Rutter WJ. Hepatitis B gene function: precore region targets the core antigen to cellular membranes and causes the secretion of e-antigen. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83: 1578-1582

- 41- Wang GH, Seeger C. The revers transcriptase of hepatitis B virus acts as a protein primer for viral DNA synthesis. *Cell* 1992; 71: 663-670
- 42- Kekule AS, Lauer U, Weiss L, Luber B, Hofschneider PH. Hepatitis B virus transactivator HBx uses a tumour promoter signalling pathway. *Nature* 1993; 361: 742-745
- 43- De-Medina T, Haviv I, Noiman S, Shaul Y. The X protein of hepatitis B virus has a ribo/deoxy ATPase activity. *Virology* 1994; 202: 401-407
- 44- Feitelson MA, Duan L-X, Guo J, Blumberg BS. X region deletion mutants associated with surface antigen-positive hepatitis B virus infection. *Gastroenterology* 1995; 108:1810-1819
- 45- Sun BS, Zhu X, Clayton MM, Pan J, Feitelson MA. Identification of a protein isolated from senescent human cells that binds to hepatitis B virus X antigen. *Hepatology* 1998; 27: 228-239
- 46- Hsia CC, Yuwen H, Tabor E. Hot spot mutations in hepatitis B virus X gene in hepatocellular carcinoma. *Lancet* 1996; 348: 625-626
- 47- Magnus LO, Kaplan L, Vyas GN, Perkins HA. A new virus-specified determinant of hepatitis B surface antigen. *Acta Pathol Microbiol Scand* 1975; 83B: 295-297
- 48- Courouce-Pauty AM, Lemaire JM, Roux JF. New hepatitis B surface antigen subtypes inside the ad category. *Vox Sang.* 1978; 35 (5): 304-308
- 49- Bhatnagar PK, Papas E, Blum HE, Milich DR, Nitecki D, Karels Mj, Vyas GN. Immune response to synthetic peptide analogues of hepatitis B surface antigen spesific for a determinant. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1982; 79: 4400-4404
- 50- Okamoto H, Imai M, Tsuda T, Tanaka T, Miyakawa Y, Mayumi M. Point mutation in the S gene of hepatitis B virus for a d/y or w/r subtypic change in two blood donors carrying a surface antigen of compound subtype adyr or adwr. *J Virol* 1987; 61: 3030-3034
- 51- Okamoto H, Imai M, Miyakawa Y, Mayumi M. Site-directed mutagenesis of hepatitis B surface antigen sequence at codon 160 from arginine to lysine of subtype determinant from r to w. *Biochem Biophys Res Commun* 1987; 148: 500-504
- 52- Bancroft WH, Mundon FK, Russell PK. Detection of additional antigenic determinants of hepatitis B antigen. *J Immunol.* 1972 ; 109 (4): 842-848
- 53- Le Bouvier GL. The heterogeneity of Australia antigen. *J Infect Dis* 1971; 123: 671-675
- 54- Magnus LO, Kaplan L, Vyas GN, Perkins HA. Anew virus-specified determinant of hepatitis B surface antigen. *Acta Pathol Microbiol Scand* 1975; 83B: 295-297

- 55-Norder H, Courouce AM, Magnus LO. Molecular basis of hepatitis B virus serotype variations within the four major subtypes. *J Gen Virol* 1992; 73: 3141-3145
- 56-Norder H, Hammas B, Löfdahl S, Courouce AM, Magnus LO. Comparison of the amina acid sequences of nine different serotypes of hepatitis B surface antigen and genomic classification of the corresponding hepatitis B virus strains. *J Gen Virol* 1992; 73: 1201-1208
- 57-Stuvyer L, Gendt SD, Geyt CV, Zoulim F, et al. A new genotype of hepatitis B virus:complete genom and phylogenetic relatedness. *J Gen Virol* 2000; 81: 67-74
- 58-Moraes MTB, Gomes SA, Niel C. Sequence analysis of pre-S/S gene of hepatitis B virus strains of genotypes A, D and F isolated in Brazil. *Arch Virol* 1996; 141: 1767-73
- 59-Naumann H, Schaefer S, Yoshida CFT, Gaspar AMC, et all. Identification of a new hepatitis B virus (HBV) genotype from Brazil that expresses HBV surface antigen subtype adw4. *J Gen Virol* 1993; 74: 1627-1632
- 60-Telenta PFS, Poggio GP, Lopez JL , Gonzales J, Lemberg A, Campos RH. Increased prevalence of genotype F hepatitis B virus isolates in Buenos Aires, Argentina. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 1873-1875
- 61-Casey JL, Niro GA, Engle RE, Vega A, et all. Hepatitis B virus (HBV) / hepatitis D virus (HDV) coinfection in outbreaks of acute hepatitis in the Peruvian Amazon Basin: The role of HDV genotype III and HBV genotype F. *J Infect Dis* 1996; 174: 920-926
- 62-Lindh M, Hannoun C, Dhillon AP, Norkrans G, Horal P. Core promoter mutations and genotypes in relation to viral replication and liver damage in East Asian hepatitis B virus carriers. *JID* 1999; 179: 775-782
- 63-Fares MA, Holmes EC. A rewised evolutionary history of hepatitis B virus (HBV). *J Mol Evol* 2002; 54: 807-814
- 64-Chen WN, Oon CJ. Human hepatitis B virus mutants: significance of molecular changes. *FEBS Letters* 1999; 453: 237-242
- 65- Blum HE. Hepatitis viruses: genetic variants and clinical significance. *Int J Clin Lab Res* 1997; 27: 213-224
- 66- Blum HE.Variants of hepatitis B, C and D viruses:molecular biology and clinical significance. *Digestion* 1995; 56: 85-95
- 67- Feitelson MA. Biology of hepatitis B virus variants. *Lab Invest* 1994; 71; 324-349
- 68- Zuckerman AJ. Effect of hepatitis B virus mutants on efficacy of vaccination. *The Lancet* 2000; 355: 1382-1383

- 69- Carman WF, Zanetti AR, Karayiannis P, Waters J, Manzillo G, et al. Vaccine-induced escape mutant of hepatitis B virus. *Lancet* 1990; 336: 325-329
- 70- Oon CJ, Lim GK, Zhao Y, Goh KT, Tan KL, Yo SL, Hopes E, Harrison TJ, Zuckerman AJ. Molecular epidemiology of hepatitis B virus vaccine variants in Singapore. *Vaccine*. 1995;13 (8): 699-702
- 71- He JW, Lu O, Zhu OR, Duan SC, Wen YM. Mutations in the 'a' determinant of hepatitis B surface antigen among Chinese infants receiving active postexposure hepatitis B immunization. *Vaccine*. 1998 ; 16 (2-3): 170-173
- 72- Okamoto H, Yano K, Nozaki Y, Matsui A, Miyazaki H, et al. Mutations within the S gene of hepatitis B virus transmitted from mothers to babies immunized with hepatitis B immune globulin and vaccine. *Pediatr Res*. 1992; 32 (3): 264-268
- 73- Hsu HY, Chang MH, Ni YH, Lin HH, Wang SM, Chen DS. Surface gene mutants of hepatitis B virus in infants who develop acute or chronic infections despite immunoprophylaxis. *Hepatology* 1997; 26 (3): 786-791
- 74- Carman WF, Trautwein C, Deursen FJvan, Colman K, Dorman E, et al. Hepatitis B virus envelope variation after transplantation with and without hepatitis B immune globulin prophylaxis. *Hepatology* 1996; 24: 489
- 75- Mc Mahon G, Ehrlich PH, Moustafa ZA, McCarthy LA, Dot-tavio D, et al. Genetic alterations in the gene encoding the major HBsAg: DNA and immunological analysis of recurrent HBsAg derived from monoclonal antibody treated liver transplant patients. *Hepatology* 1992; 15:757
- 76- Kidd-Ljunggren K. Variability in hepatitis B virus DNA: Phylogenetic, epidemiological and clinical implications. *Scand J Infect Dis* 1996; 28: 111-116
- 77- Kidd-Ljunggren K, Ekdahl K, Öberg M, Kurathong S, Lolekha S. Hepatitis B virus strains in Thailand: Genomic variants in chronic carriers. *J Med Virol* 1995; 47: 454-461
- 78- Pollicino T, Zanetti AR, Cacciola I, Petit MA, Smedile A, et al. Pre-S2 defective hepatitis B virus infection in patients with fulminant hepatitis. *Hepatology* 1997; 26: 495
- 79- Hoofnagle JH, Dusheiko GM, Seeff LB, Jones EA, Waggoner JC, et al. Seroconversion from hepatitis B e antigen to antibody in chronic type B hepatitis. *Ann Intern Med* 1981; 94: 744-748

- 80- Carman WF, Jacyna MR, Hadziyannis S, Karayannis P, McGarvey MJ, et al. Mutation preventing formation of hepatitis B e antigen in patients with chronic hepatitis B infection. *Lancet* 1989; 588-590
- 81- Okamoto H, Yotsumoto S, Akahane Y, Yamanaka T, Miyazaki Y, et al. Hepatitis B viruses with precore region defects prevail in persistently infected hosts along with seroconversion to the antibody against e antigen. *J Virol* 1990; 64: 1298-1303
- 82- Milich DR, McLachlan A. The nucleocapsid of hepatitis B virus is both a T-cell-independent and a T-cell-dependent antigen. *Science* 1986; 234 : 1398-1401
- 83- Brown JL, Carman WF, Thomas HC. The clinical significance of molecular variation within the hepatitis B virus genome. *Hepatology* 1992; 15: 144-148
- 84- Tur Kasper R, Klein A, Aharonson S. Hepatitis B virus precore mutants are identical in carriers from various ethnic origins and are associated with a range of liver disease severity. *Hepatology* 1992; 16: 1338
- 85- Kosaka Y, Takase K, Kojima M, Shimizu M, Inoue K, et al. Fulminant hepatitis B: induction by hepatitis B virus mutants defective in the precore region and incapable of encoding e antigen. *Gastroenterology* 1991; 100: 1087
- 86- Liang TJ, Hasegawa K, Rimon N, Wands JR, Ben Porath E. A hepatitis B virus mutant associated with an epidemic of fulminant hepatitis. *N Engl J Med* 1991; 324: 1705
- 87- Naoumov NV, Schneider R, Grotzinger T, Jung MC, Miska S, et al. Precore mutant hepatitis B virus infection and liver disease. *Gastroenterology* 1992; 102: 538
- 88- Fang JW, Tung FY, Davis GL, Dolson DJ, Van thiel DH, Lau JY, et al. Fibrosing cholestatic hepatitis in a transplant recipient with hepatitis B virus precore mutant. *Gastroenterology* 1993; 105:901
- 89- Pastore G, Santantonio T, Milella M, Monno L, Mariano N, et al. Anti-HBe positive chronic hepatitis B with HBV-DNA in the serum: response to a 6-month course of lymphoblastoid interferon. *J Hepatol* 1992; 14: 221
- 90- Brunetto MR, Giarin M, Saracco G, Oliveri F, Calvo P, et al. Hepatitis B virus unable to secrete e antigen and response to interferon in chronic hepatitis B. *Gastroenterology* 1993; 105: 845
- 91- Lind M, Furuta Y, Kidd-Ljunggren K, Norkrans G, Horal P. Detection of hepatitis B virus precore TAG mutant by an amplification-created restriction site method. *J Infect Dis* 1997 ; 175: 1285-1293

- 92- Rodriguez-Frias F, Buti M, Jardi R, Cotrina M, et al. Hepatitis B virus infection: Precore mutants and its relation to viral genotypes and core mutations. *Hepatology* 1995; 22: 1641-1647
- 93- Junker-Niebmam M, Bartenschlager R, Schaller H. A short cis-acting sequence is required for hepatitis B virus pregenome encapsidation and sufficient for packaging of foreign DNA. *EMBO J* 1990; 9: 3389-3396
- 94- Pollack JR, Ganem D. An RNA stem-loop structure directs hepatitis B virus genomic RNA encapsidation. *J Virol* 1993; 67: 3254-3263
- 95- Arauz-Ruiz P, Norder H, Visona KA, Magnus LO. Genotype F prevails in HBV infected patients of hispanic origin in Central America and may carry the precore stop mutant. *J Med Virol* 1997; 51: 305-312
- 96- Blackberg J, Kidd-Ljunggren K. Genotyping differences in the hepatitis B virus core promoter and precore sequences during seroconversion from HBeAg to anti-HBe. *J Med Virol* 2000; 60:107-112
- 97- Akarca US, Lok ASF. Naturally occurring hepatitis B virus core gene mutations. *Hepatology* 1995; 22: 50- 60
- 98- Lok AS, Akarca US, Greene S. Predictive value of precore hepatitis B virus mutations in spontaneous and interferon-induced hepatitis B e antigen clearance. *Hepatology* 1995; 21: 19-24
- 99- Takeda K, Akahane Y, Suzuki H, Okamoto H, Tsuda F, et al. Defects in the precore region of the HBV genome in patients with chronic hepatitis B after sustained seroconversion from HBeAg to anti-HBe induced spontaneously or with interferon therapy. *Hepatology* 1990; 12: 1284-1289
- 100- Yuasa R, Takahashi K, Dien BV, Binh NH, et al. Properties of hepatitis B virus genome recovered from Vietnamese patients with fulminant hepatitis in comparison with those of acute hepatitis. *J Med Virol* 2000; 61: 23-28
- 101- Chan HL, Hussain M, Lok S. Different hepatitis B virus genotypes are associated with different mutations in the core promoter and precore region during hepatitis B e antigen seroconversion. *Hepatology* 1999; 29: 976-984
- 102- Lindh M, Gustavson C, Mardberg K, Norkrans N, Dhillon P, Horal P. Mutation of nucleotide 1762 in the core promoter region during hepatitis B e seroconversion and its relation to liver damage in hepatitis B e antigen carriers. *J Med Virol* 1998; 55: 185-190

- 103- Sato S, Suzuki K, Akahanr Y, Akamatsu K, Akiyama K, et al. Hepatitis B virus strains with mutations in the core promoter in patients with fulminant hepatitis. *Ann Intern Med* 1995; 122: 241-248
- 104- Dusheiko G. Lamivudine therapy for hepatitis B infection. *Scand J Gastroenterol* 1999; 230: 76-81
- 105- Allen MI, Deslauriers M, Andrews CW, Tipples GA, Walters KA, et al. Identification and characterization of mutations in hepatitis B virus resistant to lamivudine. Lamivudine Clinical Investigation Group. *Hepatology* 1998; 27 (6): 1670-167
- 106- Bartholomew MM, Jansen RW, Jeffers LJ, ReddY KR, Johnson LC, et al. Hepatitis-B-virus resistance to lamivudine given for recurrent infection after orthotopic liver transplantation. *Lancet*. 1997; 349 :20-22
- 107- Bozdayı AM, Uzunalimoğlu Ö, Türkyılmaz AR, Çınar K, Sezgin O, et al. A new mutation pattern (YMDD→YSDD) in YMDD motif of HBV-DNA polymerase gene in chronic B hepatitis infection resistant to lamivudine. *J Hepatol* 2001; 34: 162
- 108- Aye TT, Bartholomeusz A, Shaw T, Bowden S, Breschkin A, et al. Hepatitis B virus polymerase mutations during antiviral therapy in a patient following liver transplantation. *J Hepatol*. 1997 ;26 :1148-1145.
- 109- Ono SK, Kato N, Shiratori Y, Kato J, Goto T, et al. The polymerase L528M mutation cooperates with nucleotide binding-site mutations, increasing hepatitis B virus replication and drug resistance. *J Clin Invest* 2001; 107: 449- 455
- 110- Badur S, Akgün A. Diagnosis of hepatitis B infections and monitoring of treatment. *J Clin Virol* 2001; 21: 229-237
- 111- Wright TL, Lau JYN. Clinical aspects of hepatitis B virus infection. *The Lancet* 1993; 342: 1340-1344
- 112- Hu MD, Schenzle D, Dienhart F, Scheid R. Epidemiology of hepatitis A and B In Shanghai area: prevalence serum markers. *Am J Epidemiol* 1984; 120: 404-413
- 113- Mahoney F, Woodruff B, Erben J, Coleman P, Reid E, et al. Evaluation of hepatitis B immunization program on the prevalence of hepatitis B in virus infection. *J Infect Dis* 1993; 167: 203-207
- 114- McMahon BJ, Alward WLM; Hall DB, Heyward WL, Bender TR, et al. Acute hepatitis B virus infection: relation of age to the clinical expression of disease and subsequent development of the carrier stage. *J Infect Dis* 1985; 151: 599-603

- 115- Toukan AU, Sharaiha ZK, Abu-el-Rub OA, Hmoud MK, Dahbour SS, et al. The epidemiology of hepatitis B virus among family members in the Middle East. *Am J Epidemiol* 1990; 132: 220-232
- 116- Wong DC, Purcell RH, Rosen L. Prevalance of antibody to hepatitis A and B in selected Pacific populations of the South Pacific. *Am J Epidemiol* 1979; 110: 227-236
- 117- Xu ZY, Liu CB, Francis DP, Purcell RH, Gun ZL, et al. Prevention of perinatal acquisition of hepatitis B virus carriage using vaccine: preliminary report of a randomized double-blind placebo-controlled and comparative trial. *Pediatrics* 1985; 76: 713-718
- 118- Atmaca S, Elçi S, Gül K. Diyarbakır genelevinde çalışan hayat kadınlarında hepatit B prevalansı. *Viral Hepatit Derg* 1997; 2: 111-112
- 119- Bahar H, Hashemipoor R, Yücesoy M, Yuluğ N, Bozkaya A ve ark. Bir meslek hastalığı olarak iki ayrı hastanede hepatit B taraması. *İnfeksiyon Derg* 1993; 7: 265-267
- 120- Bör Ö, Us T, Akgün N, Akgün Y. Çocuklarda hepatit A, hepatit B ve hepatit C virüsü seromarker sonuçları. *Viral Hepatit Derg* 2000; 2: 102-104
- 121- Güneri S, Kumova D, Bilgiç A, Erensoy S, Türker TT. Hastane çalışanlarında hepatit B virus serolojik göstergeleri. *İnfeksiyon derg* 1991; 5: 45-47
- 122- Kalkan M, Kuloğlu M, Bahçecioğlu İH, Namlı M, Felek S. Psikiyatri hastalarında hepatit B ve hepatit C seroprevalansı. *Viral Hepatit Derg* 1999; 1: 46-50
- 123- Kaygusuz S, Çuhadar F. Askerlerde HBsAg araştırılması. *Viral Hepatit Derg* 2001; 1: 260-262
- 124- Özgüneş N, Gergin Gündeş S, Ceyhan T. Donör kanlarında hepatit B prevalansı. *Viral Hepatit Derg* 1999; 1: 40-41
- 125- Özsoy MF, Emekdaş G, Pasha A, Erdemoğlu A, Özer MT. Sağlık çalışanlarında hepatit B ve hepatit C seroprevalansı. *Viral Hepatit Derg* 2000; 2: 71-74
- 126- Sönmez E, Kutlu O, Bayındır Y, Örnek A, Bulut Y, Tevfik M, Durmaz R, Yakıncı C. 0-6 yaş grubunda hepatit A, B, C, D, E virus infeksiyonlarının prevalansının saptanması. *Viral Hepatit Derg* 2000; 1: 12-17
- 127- Sümer H, Şanlıdağ T, Sümer Z, Poyraz Ö. Hemodiyaliz hastalarında hepatit B ve hepatit D'nin serolojik göstergeleri. *Viral Hepatit Derg* 1997; 2: 109-110
- 128- Sünbül M, Saniç A, Eroğlu C, Akçam Z, Hökelek M, Leblebicioğlu H. Sağlık personelinde hepatit B göstergelerinin seroprevalansı. *Viral Hepatit Derg* 1998; 1: 22-24

- 129- Tavmergen E, Oruç S, Erensoy MS, Bilgiç A, Çapanoğlu R. İnfertilite olgularında hepatit B seolojik göstergelerinin bulunma prevalansı. Ege Tıp Derg 1991; 30: 116-119
- 130- Türk M, Mandıracıoğlu A, Doğan F, Kırca Ü. İzmir Konak Doğumevi polikliniğinde izlenen gebelerde HBsAg pozitifliği araştırılması. Viral Hepatit Derg 1998; 2: 123-126
- 131- Robinson WS: Hepadnaviridae: Hepatitis B virus and hepatitis delta virus. Mandell GL, Douglas RG, Bennet JE (Eds). Principles and Practise of Infectious Disease. 3 rd ed. New York, Churchill Livingstone, 1990:1204-1231
- 132- Knodel RG, Conrad ME, Dienstag JL, et al. Etiological spectrum of posttransfusion hepatitis. Gastroenterology 1975; 69: 1278
- 133- Hollinger FB, Wech J, Melnick JL. A prospective study indicating that double-antibody radioimmunassay reduces the incidence of post-transfusion hepatitis B. N Eng J Med 1974; 290: 1104-1109
- 134- Szmunn W, Much MW, Prince AM. On the role of sexual behavior in the spread of hepatitis B infection. Ann Intern Med 1975; 83: 489
- 135- Alter JH, Purcell RH, Gerin JJ. Transmission of hepatitis B to chimpanzees by hepatitis B surface antigen-positive saliva and semen. Infect Immun 1977; 16: 928
- 136- Dietzman DE, Harmisch JP, Ray GC, et al. Hepatitis B surface antigen (HBsAg) and antibody to HBsAg: Prevalance in homosexual and heterosexual men. JAMA 1977; 238: 2625
- 137- Okada K, Kainiyama I, Inometa M, et al. E antigen and anti-e in the serum of asytmomatic carrier mothers as indicators of positive and negative transmission of hepatitis B virus in their infants. N Eng J Med 1976; 294: 746
- 138- Schweitzer IL, Dun AEF, Peters RL, et al. Viral hepatitis in neonates and infants Am J Med 1973; 55: 762
- 139- Tong MJ, Thursby M, Rakela J, et al. Studies of the maternal-infant transmission of the viruses which cause acut hepatitis. Gastroenterology 1981; 80: 999
- 140- Beasley RP, Stevens CE, Shiao IS, et al. Evidence against breast feeding as a mechanism for vertical transmission of hepatitis B. Lancet 1975; 2: 740

- 141- Perillo RP, Gelb L, Campbell C, et al. Hepatitis B e antigen, DNA polymerase activity, and infection of household contacts with hepatitis B virus. *Gastroenterology* 1979; 76: 1319-1325
- 142- Damme PV, Cramm M, Auwera JC, Vranckx R, Meheus A. Horizontal transmission of hepatitis B virus. *Lancet* 1995; 345: 27-29
- 143- Balık İ. Hepatit B epidemiyolojisi. Kılıçturgay K (Ed). *Viral Hepatit'94*, I .baskı, İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri, 1994: 91-101
- 144- Taşyaran MA. HBV infeksiyonu epidemiyolojisi. Kılıçturgay K, Badur S (Eds). *Viral Hepatit 2001. Viral Hepatitle Savaşım Derneği*. 2001:121-128
- 145- Karagöz K, Felek S, Kalkan A, Akbulut A, Kılıç SS. Hepatit B virusunun horizontal yolla geçişinin araştırılması. *Viral Hepatit Derg* 1997; 2: 100-105
- 146- Mert A, Tabak F, Yılmaz E, Otağ F, Bilir M ve ark. Taşıyıcılarda hepatit B virusunun aile içi geçişi. *Viral Hepatit Derg* 1997; 1: 46-51
- 147- Mısıktık R. Yetişkin akut viral hepatit B (AVHB)' de bulaş yolları. *Viral Hepatit Derg* 1995; 1: 20
- 148- MMWR 1991, 40 1-9: Virüslerle temas olasılığının bulunduğu invaziv girişimler sırasında hastalara insan bağışıklık eksikliği virüsünün ve hepatit B virüsünün geçmemesi için alınacak önlemler konusunda öneriler. *JAMA* 1992; 5: 197-201
- 149- Moloughney BW. Transmission and postexposure management of bloodborne virus infections in the health care setting: Where are we now? *CMAJ* 2001; 165: 445-451
- 150- Harpaz R, Seidlein LV, Averhoff FM, et al. Transmission of hepatitis B virus to multiple patients from a surgeon without evidence of inadequate infection control. *N Eng J Med* 1996; 334: 549-554
- 151- Heptonstall J and investigation teams. Transmission of Hepatitis B to patients from four infected surgeons without hepatitis B e antigen. *N Eng J Med* 1997; 336: 178-184
- 152- Chisari F, Ferrari C. Hepatitis B virus immunopathogenesis. *Annu Rev Immunol* 1995; 13: 29-60
- 153- Peters M, Vierling J, Gershwin ME, et al. Immunology of the liver. *Hepatology* 1991; 13: 977
- 154- Thomas HC, Foster GR, Sumiya M, McIntosh D, Jack DL, Turner MW, Summerfield JA. Mutation of gene for mannose-binding protein associated with chronic hepatitis B viral infection. *Lancet* 1996; 348:1417-1419

- 155- Thursz MR, Kwiatkowski D, Torok ME, et al. Association between an MHC class II allele and clearance of hepatitis B virus in The Gambia. *N Eng J Med* 1995; 332: 1065-1069
- 156- Edgington TS, Chisari FV. Immunological aspects of hepatitis B infection. *Am J Med Sci* 1975; 270: 213-227
- 157- Lin HH, Lee TY, Chen DS, et al. Transplacental leakage of HBeAg positive maternal blood as the most likely route in causing intrauterine infection with hepatitis B virus. *J Pediatr* 1987; 3: 877
- 158- Milich DR, James JE, Hughes JL. Is a function of the secreted HBe antigen to induce immunological tolerance in utero? *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 6599
- 159- Gocke DJ. Extrahepatic manifestations of viral hepatitis. *Am J Med Sci* 1975; 270: 49-52
- 160- Reeder Ag. Viral hepatitis: Clinical aspects. *Am J Med Sci* 1975; 270: 9
- 161- Hyams KC. Risk of chronicity following acute hepatitis B virus infection. *Clin Infect Dis* 1995; 20: 992-1000
- 162- Bilgiç A, Özacar T: Hepatit B ve D virusları. Ustaçelebi Ş (Ed). *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji*. Ankara, Güneş Kitabevi Ltd.Şti.1999: 871-80
- 163- Chau K, Hargie MP, Decker RH, Mushahwar IK, Overby LR. Serodiagnosis of recent hepatitis B virus infection by Ig M class anti HBc. *Hepatology* 1983; 3: 142-149
- 164- Tillmann H, Trautwein C, Walker D, Michitaka K, et al. Clinical relevance of mutations in the precore genome of the hepatitis B virus. *Gut* 1995; 37: 568-573
- 165- Wang TH, Sheu JC, Shih LN, et al. Detection of hepatitis B virus DNA by polymerase chain reaction in plasma of volunteer blood donors negative for hepatitis B surface antigen. *J Infect Dis* 1991; 163: 397-399
- 166- Rasenack JW, Schlayer HJ, Hettler F, et al. Hepatitis B virus infection without immunological markers after open-heart surgery. *Lancet* 1995; 345: 355-357
- 167- Hoofnagle JH, Peters M, Mullen KD, et al. Randomized controlled trial of recombinant human alpha interferon in patients with chronic hepatitis B. *Gastroenterology* 1988; 95: 1318-1325
- 168- Alexander GJM, Brahm J, Fagan EA, Smith HM, Daniels HM, et al. Loss of HBsAg with interferon therapy in chronic hepatitis B virus infection. *Lancet* 1987; ii: 66-69

- 169- Niderau C, Heintges T, Lange S, et al. Long-term follow-up of HBeAg-positive patients treated with interferon alfa for chronic hepatitis B. *N Eng J Med* 1996; 334: 1422-1427
- 170- Hoofnagle JH, Di Bisceglie AM. The treatment of chronic viral hepatitis. *N Eng J Med* 1997; 336: 347-356
- 171- Lau DTY, Everhart J, Kleiner DE, et al. Long-term follow-up of patients with chronic hepatitis B treated with interferon alfa. *Gastroenterology* 1997; 113: 1660-1667
- 172- Lok ASF, Chung HT, Liu VWS, Ma OCK. Long-term follow-up of chronic hepatitis B patients treated with interferon alfa. *Gastroenterology* 1993; 105: 1833-1838
- 173- Ikeda K, Saitoh S, Suzuki Y, et al. Interferon decreases hepatocellular carcinogenesis in patients with cirrhosis caused by the hepatitis B virus: a pilot study. *Cancer* 1998; 82: 827-835
- 174- Dienstag JL, Perrillo RP, Schiff ER, et al. A preliminary trial of lamivudine for chronic hepatitis B infection. *N Eng J Med* 1995; 333: 1657-1661
- 175- Nevens F, Main J, Honkoop P, et al. Lamivudine therapy for chronic hepatitis B: a six-month randomized dose-ranging study. *Gastroenterology* 1997; 113: 1258-1263
- 176- Lai CL, Chien RN, Keung NWY, et al. A one year trial of lamivudine for chronic hepatitis B. *N Eng J Med* 1998; 339: 61-68
- 177- Jardi R, Buti M, Rodriguez-Frias F, Cotrina M, et al. Rapid detection of lamivudine-resistant hepatitis B virus polymerase gene variants. *J Virol Methods* 1999; 83: 181-187
- 178- Lau GK, Tsiang M, Hou J, Yuen S, Carman WF, Zhang L, Gibbs CS, Lam S. Combination therapy with lamivudine and famciclovir for chronic hepatitis B-infected Chinese patients: a viral dynamics study. *Hepatology*. 2000; 32: 394-399
- 179- Seehofer D, Rayes N, Berg T, Neuhaus R, Hopf U, Muller AR, Bechstein WO, Neuhaus P. Additional interferon alpha for lamivudine resistant hepatitis B infection after liver transplantation: a preliminary report. *Transplantation*. 2000 27; 69: 1739-1742
- 180- Hultgren C, Weiland O, Milich DR, Sallberg M. Cell-mediated immune responses and loss of hepatitis B e-antigen (HBeAg) during successful lamivudine and famciclovir combination therapy for chronic replicating hepatitis B virus infection. *Clin Infect Dis*. 1999 ; 29: 1575-1577

- 181- Polish LB, Shapiro CN, Bauer F, et al. Nosocomial transmission of hepatitis B virus associated with the use of a spring-loaded finger –stick device. N Eng J Med 1992; 326: 721-725
- 182- Lemon SM, Thomas DL. Vaccines to prevent viral hepatitis. N Eng J Med 1997; 336: 196-204
- 183- Roome AJ, Walsh SJ, Cartter ML, Hadler JL. Hepatitis B vaccine responsiveness in Connecticut public safety personnel. JAMA 1993; 270: 2931-2934
- 184- Wood RC, MacDonald KL, White KE, et al. Risk factors for lack of detectable antibody following hepatitis B vaccination of Minnesota health care workers. JAMA 1993; 270: 2935-2939
- 185- Wainwright RB, Bulkow LR, Parkinson AJ, Zanis C, McMahon BJ. Protection provided by hepatitis B vaccine in a Yupik Eskimo population-result of a 10-year study. J Infect Dis 1997; 175: 674-677
- 186- Xu Z, Duan SC, Margolis HS, et al. Long-term efficacy of active postexposure immunization of infants for prevention of hepatitis B virus infection. J Infect Dis 1995; 171: 54-60
- 187- Kim SC, Sinai LN, Casey R, Pinto-Martin JA. Universal hepatitis B immunization. Pediatrics 1995; 95: 764-766
- 188- MMWR 1995; 44: 574-575 Update : Recommendations to prevent hepatitis B virus transmission-United States. JAMA 1995; 274: 603-604
- 189- Abacıoğlu H. Filogenetik analiz. Ağaçoğlu A, Badur S, Türkoğlu S (Ed) Enfeksiyon Hastalıklarının Laboratuvar Tanısında Moleküler Yöntemler, Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayın No: 42 , İstanbul, 2002: 43-54
- 190- [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ About/primer/phylo.html](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/About/primer/phylo.html)
- 191- Mount DW. Bioinformatics. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor , New York, 2001. Chapter 6: Phylogenetic Prediction; 237-280
- 192- Introduction to Molecular Phylogenetics. Research Computing Center at Harvard Medical School. [http:// rcc.med.harvard.edu](http://rcc.med.harvard.edu)
- 193- <http://cmgm.stanford.edu/help/manual/software/sequence/phylogenetic>
- 194- [http://cmgm. stanford.edu/classes/seqenal/phylogenetic.pdf](http://cmgm.stanford.edu/classes/seqenal/phylogenetic.pdf)

- 195- Yokosuka O, Omata M, Hosoda K, Tada M, et al. Detection and direct sequencing of hepatitis B virus genome by DNA amplification method. *Gastroenterology* 1991; 100: 175-181
- 196- Neumaier M, Braun A, Wagener C. Fundamentals of quality assessment of molecular amplification methods in clinical diagnostics. *Clin Chem* 1998; 44: 12-26
- 197- Van de Peer, Y., De Wachter, R. (1994) TREECON for Windows: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environment. *Comput. Applic. Biosci.* 10, 569-570 (<http://www.evolutionsbiologie.uni-konstanz.de/peer-lab/treeconw.html>)
- 198- Tong SP, Li JS, Vitvitski L, Trepo C. Active hepatitis B virus replication in the presence of anti-HBe is associated with viral variants containing an inactive pre-C region. *Virology* 1990; 176: 596-603
- 199- Mizokami M, Nakano T, Orito E, Tanaka Y, Sakugawa H, Mukaide M, Robertson BH. Hepatitis B virus genotype assignment using restriction fragment length polymorphism patterns. *FEBS Letters* 1999; 450: 66-71
- 200- <http://www.oligo.net/dnasis.htm>
- 201- Ohba K, Mizokami M, Ohno T, Suzuki K, et al. Relationships between serotypes and genotypes of hepatitis B virus: genetic classification of HBV by use of surface genes. *Virus Res* 1995; 39: 25-34
- 202- Yokosuka O, Omata M, Hosoda K, Tada M, et al. Detection and direct sequencing of hepatitis B virus genome by DNA amplification method. *Gastroenterology* 1991; 100: 175-181
- 203- Lindh M, Gonzales JE, Norkrans G, Horal P. Genotyping of hepatitis B virus by restriction pattern analysis of a pre-S amplicon. *J Virol Methods* 1998; 72: 163-174
- 204- Simmonds P, Smith D, McOmish F, Yap PL, Kolberg J, Urdea MS, Holmes EC. Identification of genotypes of hepatitis C virus by sequence comparisons in the core, E1 and NS-5 regions. *J Gen Virol* 1994; 75: 1053-1061
- 205- Simmonds P, Holmes EC, Cha TA, Chan SW, McOmish F, Irvine B, Beall E, et al. Classification of hepatitis C virus into six major genotypes and a series of subtypes by phylogenetic analysis of the NS-5 region. *J Gen Virol* 1993; 74: 2391-2399

- 206- K lah C, Yalınay  ırak M. Genotyping of Turkish hepatitis B virus isolates based on the sequencing of the S regions. 2nd Molecular and Diagnostic Microbiology Congress. April 21-25, 2002. Kemer, Antalya-Turkey
- 207- Mısırlıo lu M, Kayın E, Akman E, Tuncer S. Hepatitis B virus genotypes and viral load analysis in pre and post vaccination sera from carrier children. 2nd Molecular and Diagnostic Microbiology Congress. April 21-25, 2002. Kemer, Antalya-Turkey
- 208- Bozdayı AM, Bozkaya H, T rkyılmaz AR, Saryodlu M,  etinkaya H, et al. Nucleotide divergences in the core promoter and precore region of genotype D hepatitis B virus in patients with persistently elevated or normal ALT levels. J Clin Virol 2001; 21: 91-101
- 209- Swenson PD, Riess JT, Krueger LE. Determination of HBsAg subtypes in different high risk populations using monoclonal antibodies. J Virol Methods 1991; 33: 27-38
- 210- Moraes MTB, Niel C, Gomes SA: A polymerase chain reaction-based assay to identify genotype F of hepatitis B virus. Braz J Med Biol Res 1999;32:45-49
- 211- Courouce-Pauty AM, Plancon A, Soulier JP. Distribution of HBsAg subtypes in the world. Vox Sang 1983; 44: 197-211
- 212- Norder H, Hammas B, Magnusius LO. Typing of hepatitis B virus genomes by a simplified polymerase chain reaction. J Med Virol 1990; 31: 215-221
- 213- Repp R, Rhiel S, Heermann KH, Schaefer S, Keller C, et al. Genotyping by multiplex polymerase chain reaction for detection of endemic hepatitis B virus transmission. J Clin Microbiol 1993; 31: 1095-1102
- 214- Sheng Li K, Yamashiro T, Sumie A, Terao H, Mifune K, Nishizono A. Hepatitis B virus harboring nucleotide deletions in the core promoter region and genotype B correlate with low viral replication activity in anti-HBe positive carriers. J Clin Virol 2001; 23: 97-106
- 215- Orito E, Ichida T, Sakugawa H, Sata M, Horike N, et al. Geographic distribution of hepatitis B virus (HBV) genotype in patients with chronic HBV infection in Japan. Hepatology 2001; 34: 590-594
- 216- Alestig E, Hannoun C, Horal P, Lindh M. Hepatitis B virus genotypes in Mongols and Australian Aborigines. Arch Virol 2001; 146: 2321-2329